

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Proliferation der synovialen Deckzellschicht bei vermuteter Metall-Allergie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Andreas Burkandt
aus Buxtehude

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.09.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Jozef Zustin

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Rüther

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Amling

Inhaltsverzeichnis

1	Originalartikel In Vivo 25 (2011)	4
2	Einleitung.....	12
3	Material und Methodik	13
4	Ergebnisse	15
5	Diskussion.....	17
6	Zusammenfassung.....	19
7	Literatur- und Quellenverzeichnis:	20
8	Danksagung.....	25
9	Lebenslauf.....	26
10	Eidesstattliche Versicherung	26

Proliferation of the Synovial Lining Cell Layer in Suggested Metal Hypersensitivity

ANDREAS BURKANDT¹, ALEXANDER KATZER², KARLHEINZ THALER³, VOLKER VON BAEHR⁴,
REINHARD E. FRIEDRICH⁵, WOLFGANG RÜTHER⁶, MICHAEL AMLING⁷ and JOZEF ZUSTIN¹

¹Institute of Pathology, Departments of ⁵Oral and Maxillofacial Surgery, ⁶Orthopedics,
and ⁷Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany;

²Orthoclinic Hamburg, ³Nuernberger Land Clinic, Lauf a.d. Pegnitz, Germany;

⁴Institute of Medical Diagnostics, Berlin, Germany

Abstract. Synovial tissues in joints with prostheses display characteristic morphological changes in cases with aseptic failure, particularly macrophage infiltration. Since proliferation of the synovial lining cell layer represents a feature characteristic of autoimmune joint diseases, the possibility of morphological changes of the synovial lining cell layer in periprosthetic tissues was investigated. Synovial biopsies from five groups of morphologically well-defined lesions (osteoarthritis, rheumatoid arthritis, aseptic loosened metal-on-polyethylene and metal-on-metal arthroplasty and suggested metal hypersensitivity) were compared using a conventional staining method and immunohistochemistry. The synovial lining cell layer was substantially enlarged in both rheumatoid arthritis and cases suggestive of metal hypersensitivity. Macrophage infiltrates were apparent in rheumatoid arthritis and all specimens from retrieved hip arthroplasties. Although both synovial and subsynovial macrophages were positive for CD163 (indicating synovial M2 macrophages), the remaining fibroblast-like synoviocytes and scattered stromal fibroblasts showed a positive reaction with the D2-40 antibody (indicating fibroblast-like synoviocytes). Furthermore, in contrast to CD163-positive macrophages, the enlarged D2-40-positive fibroblast-like synoviocytes displayed cytoplasmatic tubular projections. Proliferation of the periprosthetic synovial lining cell layer occurred in cases with unexplained groin pain following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty, suggestive of

hypersensitivity. Despite some important study limitations, the present observation adds to the evidence that metal hypersensitivity shares characteristic morphological features with autoimmune diseases of the joints.

Primary total hip arthroplasty is a growing procedure worldwide. Recent improvements in manufacturing processes have led to an important decrease in catastrophic component failures caused by corrosive and non-corrosive wear adverse reactions. Indeed, metal-on-metal technology is now used in over one-third of all hip arthroplasties performed in the United States of America (1). At the same time, there is increasing awareness of potential biological consequences unique to the metal-on-metal bearing couples (2). The metal-on-metal bearing surface is made from high-carbon, cobalt-chromium-molybdenum alloy. Despite a successful decrease in volumetric wear after the implementation of new modern materials and designs, there is growing evidence that the prostheses might evoke specific reactions in bone (3, 4) and the periprosthetic soft tissues (3, 5-12), resulting in the need for revision of prosthesis.

Similar to other inflammatory conditions that take place in the native synovium, both the periprosthetic wear particle-induced reactions and the suggested delayed-type hypersensitivity reactions are associated with cellular infiltration of periarticular tissues due to lymphocytes and macrophages and their interactions with the host. Although most investigators have focused on the presence of necrotic changes, as well as the level and distribution of the lymphocyte infiltration (13-15), within the periprosthetic soft tissue associated with possible delayed-type hypersensitivity reactions in metal-on-metal arthroplasty, other authors considered them nonspecific for metal bearings (16, 17). In our previous study on retrieved hip resurfacing arthroplasty, both excessive osseous T-lymphocyte infiltration and proliferative desquamative synovitis were observed in cases with unexplained groin pain following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty, while lymphocyte infiltration was

Note: This work was part of the promotion thesis of AB.

Correspondence to: Jozef Zustin, MD, Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel: +49 40741053104, Fax: +49 40741052164, e-mail: j.zustin@uke.uni-hamburg.de

Key Words: Arthroplasty failure, hip resurfacing, metal hypersensitivity, podoplanin, synovitis.

quite variable (3). Although a number of distinct variables can be evaluated in inflammatory joint diseases and several two- to seven-tied (18-22) scoring systems are used worldwide for the classification of synovial pathological changes, the proliferation of the synovial lining cell layer represents a generally accepted feature characteristic of autoimmune joint diseases, such as rheumatoid arthritis.

The current retrospective observational morphological study was conducted to investigate the phenotype of the synoviocytes proliferated in a setting of suggested delayed-type hypersensitivity reaction following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty and to compare them with the synovial membrane pattern in other well-defined arthroplasty complications and in the native synovial membrane in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

Materials and Methods

Selected synovial biopsies from the archive of the Institute of Pathology of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf obtained from 2006 to 2009 were retrospectively analyzed in order to characterize phenotype of the synovial lining cells. Five distinct clinically and morphologically well-defined groups were chosen (2 groups with native joint biopsies and 3 groups with synovial biopsies obtained at revision surgery following aseptic failure of hip arthroplasty) for the further investigation. A comparative morphological study was performed on simultaneously stained slides using both conventional staining and immunohistochemical reactions against two established routine markers. All the patients were women between 46 and 68 years of age suffering from hip diseases. The study was performed according to the Declaration of Helsinki.

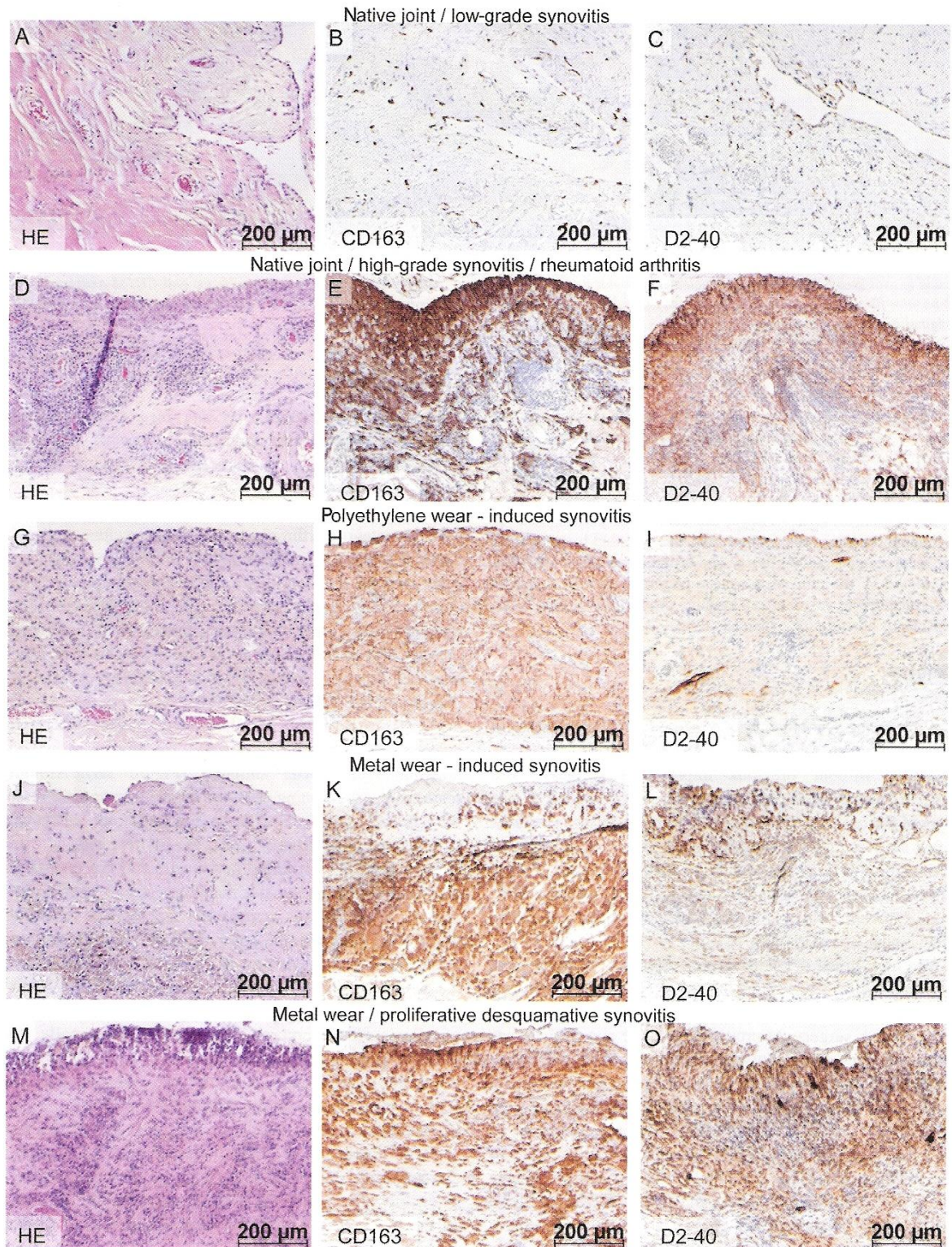
Histopathological criteria. Low-grade synovitis was diagnosed according to the classification schema proposed by Krenn *et al.* (18-19) in native synovial specimens showing minimal hyperplasia of both the synovial lining cells and stromal mesenchymal cells, along with inconspicuous inflammatory infiltration of stroma. High-grade synovitis was characterized by hyperplastic synovial lining cell layer (23, 24), proliferative changes of the stroma and lymphocyte infiltration, as described in the classification's coring system proposed by Krenn *et al.* (18, 19). Polyethylene wear particle-induced synovitis was defined by a dense macrophage infiltration within the synovium in the presence of polyethylene wear particles recognized under polarized light. The excision of the biopsy had been performed during revision surgery for aseptic loosening of metal-on-polyethylene total hip arthroplasty. All the patients in this group were treated for primary osteoarthritis and had not complained about metal allergy (such as itchy disorders, erythema, papules and vesicles). The cases with macroscopic metallosis of the articular tissues following the metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty were characterized by the presence of metallic-colored foreign material within the femoral head and neck tissues and/or within the synovial tissue when investigated with the naked eye. These hips were revised for the malpositioning of the metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty leading to groin pain associated with femoral and/or the acetabular component loosening. Proliferative desquamative synovitis was diagnosed in the synovial specimens from retrieved metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty that were revised for unexplained persistent groin pain

and were histopathologically characterized by conspicuous proliferation and desquamation of the synoviocytes along with variable lymphocyte infiltrate within the synovial membrane (3).

Immunohistochemical analysis. Histological slides from the archive of the Institute of Pathology of University Medical Center Hamburg Eppendorf stained with hematoxylin-eosin and Giemsa stains were re-reviewed in order to select representative tissue for further analyses. One paraffin block was selected from each case for further immunohistochemical investigation. Immunohistochemical reactions with CD163 for synovial M2 macrophages (clone: 10D6; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK; dilution: 1:100) and podoplanin for fibroblast-like synoviocytes (clone: D2-40; Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA, U.S.A.; dilution: 1:40) were performed simultaneously on the freshly cut paraffin-embedded archival tissues from each case. Both staining intensity (scored as negative, weak, moderate or strong) and distribution (cytoplasmic or membranous) were recorded, along with the relative proportion of immunohistochemically positive cells.

Lymphocyte transformation test (LTT). LTT was performed using blood samples from two female patients obtained at the follow-up control investigation. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from the heparinized blood of both patients by density centrifugation on Ficoll-Hypaque solution (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The cells were cultured in RPMI-1640 medium (PAA Laboratories) supplemented with heat-inactivated 10% human AB serum, glutamine, antibiotic-

Figure 1. Synovial lining cell layer phenotypes. A: Synovial surface covered by a single layer of synoviocytes. Vascularized loose to collagen-rich fibrous subsynovial tissue. B: Scattered macrophages both within the synovial lining cell layer and in the subsynovial stroma. C: D2-40 expression in several cells within the synovial lining cell layer. D: Synovial lining cell layer containing more than 5 cell layers and enlarged synoviocytes. E: CD163 strongly positive in both synovial and subsynovial macrophages. F: Fibroblast-like synoviocytes and a few subsynovial fibroblastic cell elements showing positive reactions towards the D2-40 antibody. G: Inconspicuous synovial lining cell layer covering the subsynovial stroma filled with dense histiocytic infiltrate. H: Synovial macrophages showing strong positivity for CD163 and subsynovial macrophages with ingested polyethylene wear particles displaying moderate positive reaction. I: Remaining fibroblast-like synoviocytes and subsynovial lymphatic vessel walls strongly D2-40-positive. Wear particle-phagocytosing macrophages show only a faint nonspecific reaction. J: Superficial zones of the synovial membrane paucicellular in metal wear-induced synovitis, deeper subsynovial soft tissue densely infiltrated by histiocytic cells. K: The majority of CD163-expressing macrophages located in the subsynovial stroma. L: Scattered D2-40-positive stromal cells and fibroblast-like synoviocytes. M: Synovial lining cell layer containing several cell layers of enlarged synoviocytes. Variable number of macrophages and lymphocytes within the subsynovial tissue. N: CD163-expressing macrophages within both the synovial lining cell layer and the subsynovial stroma. O: Similar distribution of enlarged synoviocytes and stromal fibroblasts using D2-40 antibody. HE: Hematoxylin-eosin; CD163 and D2-40 immunohistochemical stain. Original magnification: $\times 100$.



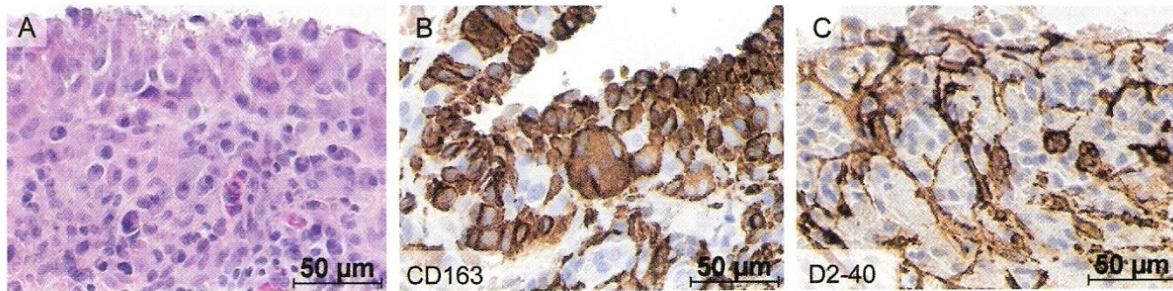


Figure 2. Synovial lining cell layer in high-grade synovitis. A: Distinct populations of enlarged synoviocytes, not distinguishable by HE stain. B: Round to oval synoviocytes and multinucleated synoviocytes showing a strong immunohistochemical reaction with the anti-CD163 antibody. C: D2-40-positive fibroblast-like synoviocytes displaying tubular cell projections. HE: Hematoxylin-eosin; CD163 and D2-40 immunohistochemical stain. Original magnification: $\times 400$.

antimycotic solution and nonessential amino acids. All the cultures were performed in quadruplicate in 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). The stimuli were: the pan T-cell mitogen phytohemagglutinin 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tetanus toxoid 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, NiSO_4 , CrCl_3 , CoCl_2 , MnCl_2 , and Na_2MoO_4 and culture medium alone as control. After 5 days, the cells were pulsed with ^3H thymidine overnight and proliferation was assessed by measuring the incorporated radioactivity. The stimulation index (SI) was calculated by the ratio of the mean count per minute (cpm) of the stimulated to unstimulated cultures. An SI greater than 3 was considered positive for hypersensitivity.

Results

The low-grade synovitis group consisted of five patients with primary osteoarthritis and the histological finding of low-grade synovitis without previous implantation surgery. The superficial layer of the synovial membrane consisted of one layer of flat or oval cells (Figure 1A). Immunohistochemically, a few scattered CD163-positive macrophages were detected within the synovial intima and in the subsynovial fibrous stroma (Figure 1B). Similarly, several D2-40-positive cells were apparent both within the synovial intima and in the subsynovial stroma (Figure 1C).

The high-grade synovitis group contained biopsies from five patients with newly diagnosed seropositive rheumatoid arthritis without any previous anti-inflammatory treatment or implantation surgery. Microscopically, the synovial tissues displayed increased cellularity with 5 and more cell layers thick synovial intima and dense lymphocytic and plasma cell infiltration of synovial fibrous stroma, although it is not possible to differentiate between distinct populations of synoviocytes by conventional histology (Figure 1D and Figure 2A). Both the synovial intima and the stroma contained multiple round to oval CD163-positive macrophages (Figure 1E and Figure 2B) and D2-40-positive fibroblast-like synoviocytes (Figure 1F and Figure 2C). The

latter were characterized by the formation of tubular projections and elongated or centrally, somewhat stellate, cell forms. Interestingly, multinucleated synoviocytes also showed apposite reaction with CD163.

The polyethylene wear particle-induced synovitis group, with five total hip arthroplasty patients, was characterized by dense macrophage infiltrations of the synovial stroma in cases with aseptic loosening caused by massive polyethylene wear particles. Under polarized light, multiple bi-refringent particles were present within the macrophage infiltration (not shown). The synovial lining cell layer consisted of one to two cell layers of round synoviocytes (Figure 1G). The majority of the synovial lining cells had strong reaction with the CD163 antibody. Similarly, the dense subsynovial macrophage infiltration showed also moderate positive reaction with CD163 antibody (Figure 1H). Although scattered synovial lining cells and synovial lymphatic vessels were strongly positive for D2-40 (Figure 1I), the subsynovial stroma contained virtually no D2-40-positive cells.

Two patients with failed metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty showed massive metallosis (metal wear particle-induced synovitis and intraosseous macrophage infiltration leading to their metallic color) of both the soft and bone tissues. The first specimen was revised for the loosening of the acetabular component. The second patient (Figure 1J-L and Figure 3A/B) had a pathological fracture due to severe metallosis of the femoral remnant. Macroscopically, both specimens showed metallic coloring of both the synovial membrane and bone tissue of the femoral remnant. Histologically, however, the synovial membrane displayed a paucicellular synovial surface covered focally by a fibrinous exudate. Subsynovial fibrous tissue was infiltrated by macrophages ingesting the metal wear particles. It is noteworthy that despite the massive wear, the LTT performed on the blood of the patient with the pathological fracture revealed negative results ($\text{SI} < 1.8$).

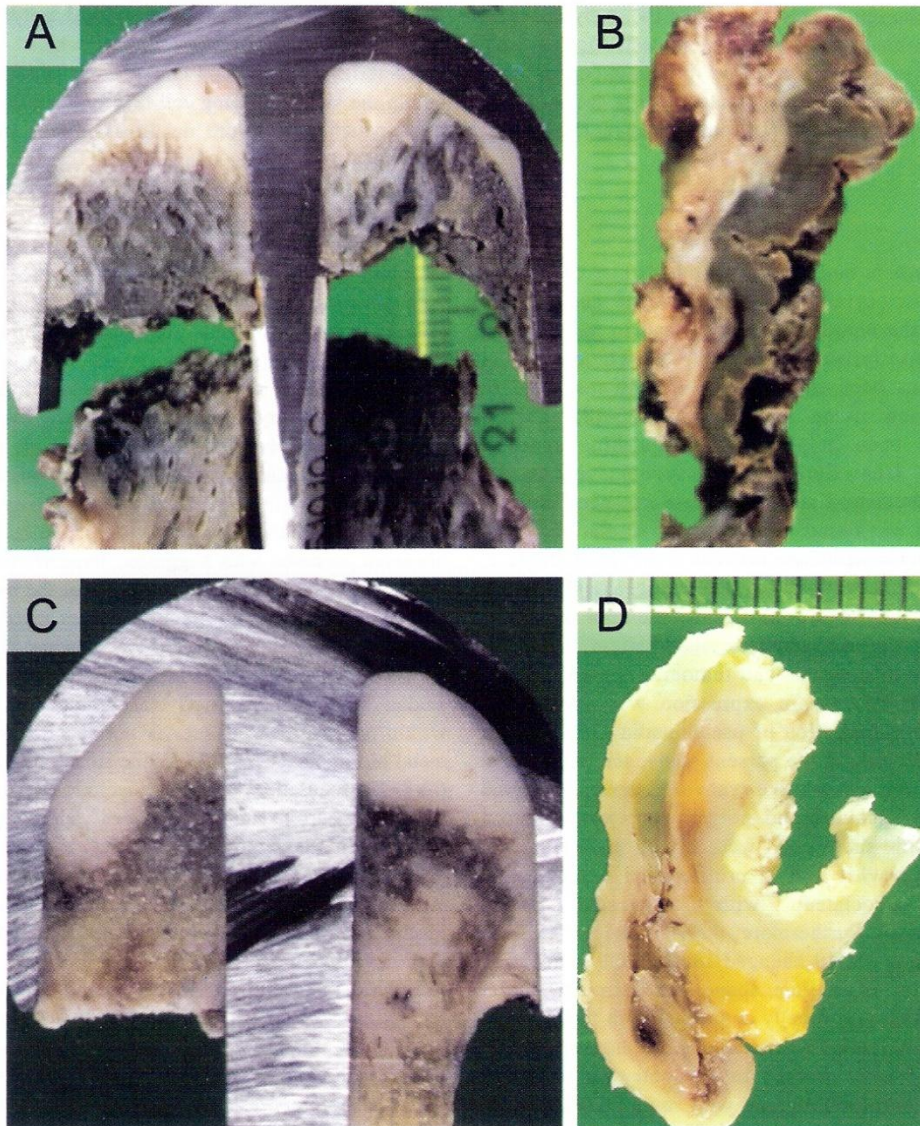


Figure 3. Retrieved metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty from two patients with a negative history of metal allergy. A-B: Patient 1. A 54-year-old woman, 3-year in situ hip resurfacing arthroplasty, revised for several days of lasting groin pain and instability (same patient as shown in Figure 1 J-L). A: Femoral remnant showing a subcapital pathological fracture associated with massive metallosis of bone tissue. B: Synovial tissue adherent to the femoral neck showing similar discoloring. C-D: Patient 2. A 62-year-old woman, 2.7-year in situ hip resurfacing arthroplasty, revised for persistent groin pain lasting over a few months (same patient as shown in Figure 1M-O). C: Between the cement penetration and viable bone tissue of the femoral remnant, a hyperaemic zone can be seen. D: Synovial membrane showing superficial chalky white discoloration without metallosis.

The proliferative desquamative synovitis group consisted of five cases with hip resurfacing arthroplasty which became clinically symptomatic due to unexplained groin pain (Figure 3C/D). Histologically, each specimen was characterized by proliferating synovial lining cells and subsynovial infiltration of macrophages and lymphocytes

of variable cellular density (Figure 1M). CD163 macrophages were present both within the superficial layer and subsynovial stroma (Figure 1N), but fewer than seen on cases with metallosis. Furthermore, D2-40-positive enlarged fibroblast-like synoviocytes with tubular projections were detected immunohistochemically (Figure

10). Due to the retrospective nature of the study material, it was impossible to perform additional tests such as patch tests. Similarly, LTT were not performed except for one patient from this group. The results were negative for all tested metals (SI<1.9), except for molybdenum (Na_2MoO_4 ; SI>3.1).

Discussion

Synovial tissue is built from several distinct cell types, such as synoviocytes, stromal fibroblasts and cellular elements of the blood vessel walls, and in pathological conditions, also inflammatory infiltrates. The expression of CD163 has been shown to be largely restricted to monocytes and tissue macrophages (25-28). CD163 staining has been helpful in distinguishing synovial macrophages from fibroblast-like synoviocytes in the setting of rheumatoid arthritis, where its specificity for macrophages was found to be superior to that of CD68, which does not discriminate between these types (29). D2-40 is a monoclonal antibody to M2A antigen, a 40-kDa O-linked sialoglycoprotein (30). Besides the high specificity of D2-40 for normal lymphatic endothelium, it is also expressed in other normal and tumoural non-endothelial cells (31-37). Podoplanin expression was specifically linked with the formation of pseudopodia (38) and cell migration (39, 40). In the present study, scattered round D2-40-positive fibroblast-like synoviocytes were observed in low-grade synovitis and polyethylene wear-induced synovitis, while these cells were highly proliferated in high-grade synovitis and in proliferative desquamative synovitis (associated with suggested metal hypersensitivity). Furthermore, the size and form of the cells expressing D2-40 changed substantially, becoming longitudinal or of stellate shape and forming tubular projections that were focally connected with the synovial surface. In the cases with metallosis, the number of D2-40-expressing cells seemed to be somewhat increased within the subsynovial stroma, with some D2-40-positive synoviocytes appearing enlarged. However, they did not reach the degree of proliferation seen in high-grade synovitis or in the proliferative desquamative synovitis.

Characteristic enlargement of the synovial lining cell layer was observed in both the high-grade synovitis (native joints of patients with rheumatoid arthritis) and proliferative desquamative synovitis (associated with suggested metal hypersensitivity). Both these lesions were characterized by the presence of stellate to elongated D2-40 positive fibroblast-like synoviocytes that formed tubular projections. Furthermore, the number of CD163-positive macrophages was substantially increased both within the synovial lining cell layer and in the subsynovial stroma in both groups. The number of CD163-expressing macrophages, however, was

even higher in the cases with typical polyethylene and metal wear-induced synovitis, which were also characterized by minimal changes of the cellular content within the synovial lining cell layer. Interestingly, the LTT in the patient with severe metallosis of bone and soft tissue gave negative results.

The positive results of the LTT for molybdenum in the patient with proliferative desquamative synovitis (without metallosis) further supported the suggestion that this morphological lesion might be a characteristic associated with periprosthetic metal hypersensitivity. Based on the present findings, it seems possible that synovial effusion linked with hypersensitivity might be a characteristic associated with proliferative desquamative synovitis. Although laboratory tests for periprosthetic hypersensitivity are considered nonspecific, Thomas *et al.* (9) reported enhanced proliferation in the LTT to molybdenum in 5 out of 16 patients with suggested hypersensitivity. As varying densities of lymphocyte infiltration of the synovium were observed in cases with suggested hypersensitivity in our previous study (3), it seems possible that the morphological changes of the synovial lining cell layer represent an even more characteristic feature of periprosthetic metal hypersensitivity than T-lymphocyte infiltration. In fact, recent studies have demonstrated that lymphocytic infiltration within periprosthetic tissues is not specific for metal-on-metal hip implants (16, 17). While some other investigators (6, 8, 12) focused on analysing necrotic periprosthetic soft tissues, the current study investigated viable synovial tissues adherent to the femoral neck. The observed necrotizing granulomatous reactions, however, preferentially developed anterior to the femoral neck (10), indicating other mechanistic factors might have played a substantial role in their development.

Several important limitations in the current study are recognized. Firstly, although the study and control groups were quite small, every group was defined by standard histopathological criteria. Secondly, it must be noted that specific laboratory tests for hypersensitivity reaction related to arthroplasty are currently unavailable. Nonetheless, both cases with LTT results available represented characteristic examples of metallosis and proliferative desquamative synovitis.

To summarize, substantial morphological similarities were observed between proliferative desquamative synovitis in hips with suggested metal hypersensitivity and high-grade synovitis in native joints suffering from rheumatoid arthritis. Although synovial changes induced by wear particles are typically associated with macrophage infiltration, along with an inconspicuous synovial lining cell layer, suggested metal hypersensitivity is characterized by a considerable proliferation of the synovial lining cell layer similar to that observed in rheumatoid arthritis.

References

- Bozic KJ, Kurtz S, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, Rubash HE and Berry DJ: The epidemiology of bearing surface usage in total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am* 91: 1614-1620, 2009.
- Browne JA, Bechtold CD, Berry DJ, Hanssen AD and Lewallen DG: Failed metal-on-metal hip arthroplasties: a spectrum of clinical presentations and operative findings. *Clin Orthop Relat Res* 468: 2313-2320, 2010.
- Zustin J, Amling M, Krause M, Breer S, Hahn M, Morlock MM, Rüther W and Sauter G: Intraosseous lymphocytic infiltrates after hip resurfacing arthroplasty: a histopathological study on 181 retrieved femoral remnants. *Virchows Arch* 454: 581-588, 2009.
- Zustin J, Hahn M, Morlock MM, Rüther W, Amling M and Sauter G: Femoral component loosening after hip resurfacing arthroplasty. *Skeletal Radiol* 39: 747-756, 2010.
- Campbell P, Shimmin A, Walter L and Solomon M: Metal sensitivity as a cause of groin pain in metal-on-metal hip resurfacing. *J Arthroplasty* 23: 1080-1085, 2008.
- Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons CL, Ostlere S, Athanasou N, Gill HS and Murray DW: Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings. *J Bone Joint Surgery Br* 90: 847-851, 2008.
- Grammatopoulos G, Pandit H, Kwon YM, Gundle R, McLardy-Smith P, Beard DJ, Murray DW and Gill HS: Hip resurfacings revised for inflammatory pseudotumour have a poor outcome. *J Bone Joint Surg Br* 91: 1019-1024, 2009.
- Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS and Athanasou N: Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta Orthop* 80: 653-659, 2009.
- Thomas P, Braathen LR, D  rig M, Aub  ck J, Nestle F, Werfel T and Willert HG: Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy* 64: 1157-1165, 2009.
- Fang CS, Harvie P, Gibbons CL, Whitwell D, Athanasou NA and Ostlere S: The imaging spectrum of peri-articular inflammatory masses following metal-on-metal hip resurfacing. *Skeletal Radiol* 37: 715-722, 2008.
- Kwon YM, Thomas P, Summer B, Pandit H, Taylor A, Beard D, Murray DW and Gill HS: Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumours following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty. *J Orthop Res* 28: 444-450, 2010.
- Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Lugmani R, Ostlere S, Murray DW and Athanasou NA: Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response. *Virchows Arch* 453: 529-534, 2008.
- Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID and Case CP: An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am* 87: 18-27, 2005.
- Korovessis P, Petsinis G, Repanti M and Repantis T: Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty. Five to nine-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 88: 1183-1191, 2006.
- Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, K  ster G and Lohmann CH: Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 87: 28-36, 2005.
- Ng VY, Lombardi AV Jr., Berend KR, Skeels MD and Adams JB: Perivascular lymphocytic infiltration is not limited to metal-on-metal bearings. *Clin Orthop Relat Res* 469: 523-529, 2010.
- Fujishiro T, Moojen DJ, Kobayashi N, Dhert WJ and Bauer TW: Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clin Orthop Relat Res* 469: 1127-1133, 2010.
- Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B and Haupl T: Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 49: 358-364, 2006.
- Slansky E, Li J, Haupl T, Morawietz L, Krenn V and Pessler F: Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. *Histopathology* 57: 436-443, 2010.
- Smeets TJ, Dolhain RJ, Breedveld FC and Tak PP: Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *J Pathol* 186: 75-81, 1998.
- Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D and Walsh DA: Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2173-2177, 2003.
- Flagg SD, Meador R, Hsia E, Kitumnuaypong T and Schumacher HR Jr.: Decreased pain and synovial inflammation after etanercept therapy in patients with reactive and undifferentiated arthritis: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 53: 613-617, 2005.
- Veale D, Yanni G, Rogers S, Barnes L, Bresnihan B and Fitzgerald O: Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36: 893-900, 1993.
- Mohr W, Beneke G and Mohing W: Proliferation of synovial lining cells and fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 34: 219-224, 1975.
- Schaer DJ, Boretti FS, Schoedon G and Schaffner A: Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol* 119: 239-243, 2002.
- Zwadlo G, Voegeli R, Osthoff KS and Sorg C: A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* 55: 295-304, 1987.
- Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van der Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, D  pp EA, Droste A, Van Gaalen FA, Sorg C, H  gger P and Beelen RH: Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 66: 858-866, 1999.
- Lau SK, Chu PG and Weiss LM: CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* 122: 794-801, 2004.
- Fonseca JE, Edwards JC, Blades S and Goulding NJ: Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4⁺ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis Rheum* 46: 1210-1216, 2002.
- Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, Banarjee D and Bauman R: Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 80: 569-578, 1999.
- Zustin J, Scheuer HA and Friedrich RE: Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 39: 115-120, 2010.

- 32 Goma AH, Yaar M and Bhawan J: Cutaneous immunoreactivity of D2-40 antibody beyond the lymphatics. *Am J Dermatopathol* 29: 18-21, 2007.
- 33 Browning L, Bailey D and Parker A: D2-40 is a sensitive and specific marker in differentiating primary adrenal cortical tumours from both metastatic clear cell renal cell carcinoma and pheochromocytoma. *J Clin Pathol* 61: 293-296, 2008.
- 34 Yu H, Gibson JA, Pinkus GS and Hornick JL: Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. *Am J Clin Pathol* 128: 776-782, 2007.
- 35 Ordonez NG: D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 36: 372-380, 2005.
- 36 Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK and Detmar M: Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166: 913-921, 2005.
- 37 Lau SK, Weiss LM and Chu PG: D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30. *Mod Pathol* 20: 320-325, 2007.
- 38 Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G: Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9: 261-272, 2006.
- 39 Shen Y, Chen CS, Ichikawa H and Goldberg GS: SRC induces podoplanin expression to promote cell migration. *J Biol Chem* 285: 9649-9656, 2010.
- 40 Martin-Villar E, Fernandez-Munoz B, Parsons M, Yurrita MM, Megias D, Perez-Gomez E *et al*: Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* 21: 4387-4399, 2010.

Received January 12, 2011

Revised April 7, 2011

Accepted April 8, 2011

2 Einleitung

Weltweit werden immer mehr primäre Hüftgelenktotalendoprothesen implantiert. Durch verbesserte Herstellungsprozesse konnten inzwischen die Fälle von katastrophalem Komponentenversagen infolge von korrosivem oder nicht korrosivem Verschleiß signifikant verringert werden. Heute wird denn auch in mehr als einem Drittel aller in den USA durchgeführten Hüftgelenkarthroplastiken die Metall-auf-Metall-Technologie verwendet (Bozic et al. 2009).

Gleichzeitig wächst das Bewusstsein, dass Metall-Metall-Gleitpaarungen spezifische biologische Konsequenzen haben könnten (Browne et al. 2010). Die Metall-auf-Metall-Gleitfläche ist aus einer hochkohlenstoffhaltigen Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung gefertigt. Es gibt eine wachsende Evidenz, dass Prothesen aus diesem Werkstoff möglicherweise spezifische Reaktionen im Knochengewebe (Zustin et al. 2009, Zustin et al. 2010a) und im periprotetischen Weichteilgewebe (Zustin et al. 2009, Campbell et al. 2008, Pandit et al. 2008a, Grammatopolous et al. 2009, Mahendra et al. 2009, Thomas et al. 2009, Fang et al. 2008, Kwon et al. 2010, Pandit et al. 2008b) hervorrufen.

Wie bei anderen Entzündungsprozessen in der nativen Synovialmembran finden sich auch bei partikelinduzierten Reaktionen, infolge periprotetischer Abnutzung und bei vermuteter Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ zelluläre Infiltrationen durch Lymphozyten und Makrophagen in den periartikulären Geweben. Die meisten Untersuchungen von Überempfindlichkeitsreaktionen nach Metall-auf-Metall-Arthroplastik konzentrierten sich auf nekrotische Veränderungen, sowie auf Grad und Verteilungsmuster der Lymphozyteninfiltrate im periprotetischen Weichteilgewebe (Davies et al. 2005, Korovessis et al. 2006, Willert et al. 2005). Nach Ansicht anderer Autoren sind diese Entzündungszeichen aber nicht spezifisch für Metall-Metall-Gleitpaarungen (Ng et al. 2010, Fujishiro et al. 2010).

In unserer früheren Studie zur Metall-auf-Metall-Oberflächenersatz-Arthroplastik am Hüftgelenk beobachteten wir in Fällen von unklaren Leistenschmerzen, sowohl exzessive T-Lymphozyteninfiltration als auch eine proliferativ-desquamative Synovialitis. Die Lymphozyteninfiltration war ganz unterschiedlich stark ausgeprägt (Zustin et al. 2009). Es gibt eine Reihe eigenständiger Variablen, die für die Beurteilung entzündlicher Gelenkerkrankungen genutzt werden können; weltweit sind diverse Scoringsysteme mit einer Zuordnung von zwei bis sieben Punktwerten für die Klassifizierung pathologischer synovialer

Veränderungen im Gebrauch (Krenn et al. 2006, Slansky et al. 2010, Smeets et al. 1998, Haywood et al. 2003, Flagg et al. 2005).

Die Zellschichtproliferation der Synovialmembran gilt allgemein als ein Charakteristikum von Autoimmun-Gelenkerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis.

In der hier vorgestellten retrospektiven Studie untersuchten wir, welche synovialen Veränderungen bei vermuteter Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ nach Metall-auf-Metall-Oberflächenersatz-Arthroplastik am Hüftgelenk zu beobachten sind. Diese Veränderungen der Phänotypen wurden mit denjenigen verglichen, die bei anderen gut definierten Komplikationen nach Endoprothetik und in der nativen Synovialmembran bei Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis auftreten.

3 Material und Methodik

Verwendet wurden biotisch gewonnene Synovialproben, die in den Jahren 2006 bis 2009 im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf archiviert worden waren. Zur Charakterisierung der Phänotypen von Synovialmembranzellen wurden die ausgewählten Proben retrospektiv ausgewertet. Es wurden fünf klinisch eigenständige und morphologisch gut abgrenzbare Gruppen definiert: zwei Gruppen von nativen Synovialbiopsieproben und drei Gruppen von Synovialbiopsieproben, die bei Revisionseingriffen nach aseptischer Lockerung der Hüftgelenkprothese gewonnen worden waren. Nach konventioneller und immunhistochemischer Färbung der Präparate erfolgte eine vergleichende morphologische Studie. Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Histopathologische Kriterien. Der Schweregrad der Synovialitis wurde anhand des von Krenn et al. ((Krenn et al. 2006, Slansky et al. 2010) vorgeschlagenen Klassifikationsschemas bewertet. Bei den nativen Synovialproben war eine geringgradige Synovialitis anzunehmen, wenn die folgenden Charakteristika vorhanden waren: minimale Hyperplasie der Synovialmembranzellen und der Stromamesenchymzellen bei diskreter entzündlicher Infiltration des Stromas. Die Charakteristika von hochgradiger Synovialitis waren: hyperplastische Synovialmembran (Veale et al. 1993, Mohr et al. 1975), proliferative Stromaveränderungen und Lymphozyteninfiltration.

Die Diagnose "durch Polyethylen-Abriebpartikel induzierte Synovialitis" wurde gestellt, wenn eine dichte Makrophageninfiltration in der Synovialmembran vorlag und unter

polarisiertem Licht Polyethylen-Abriebpartikel identifizierbar waren. Bei den Patienten dieser Gruppe war ein Revisionseingriff zur Korrektur der aseptischen Lockerung einer Metall-Polyethylen-Hüftgelenkprothese erfolgt. Alle Patienten dieser Gruppe wurden wegen einer primären Osteoarthritis behandelt, in keinem Fall war anamnestisch eine Metallallergie (z.B. Auftreten von Juckreiz, Erythem, Papeln oder Vesikeln) bekannt.

Die Fälle mit makroskopischer Metallose waren charakterisiert durch das Vorliegen metallisch angefärbter Fremdschubstanz, die in den Geweben von Femurkopf und -hals und/oder im Synovialgewebe mit dem bloßen Auge erkennbar war. Die Patienten dieser Gruppe hatten sich einem Revisionseingriff am Hüftgelenk zur Korrektur einer Prothesenfehlposition unterzogen, die zu Leistenschmerzen infolge einer Lockerung der Femur- und/oder Acetabulum-Komponente geführt hatte.

Eine proliferativ-desquamative Synovialitis wurde diagnostiziert, wenn wegen unklarer chronischer Leistenschmerzen ein Revisionseingriff am Hüftgelenk erfolgt war und die biotisch gewonnenen Proben histopathologisch durch vermehrte Synoviozytenproliferation und -abschilferung bei unterschiedlich starker lymphozytärer Infiltration der Synovialmembran charakterisiert waren (Zustin et al. 2009).

Immunhistochemische Analyse. Mit Hämatoxylin-Eosin und Giemsa gefärbte Präparate aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden für die weitere Auswertung auf repräsentative Gewebe durchgemustert. Pro Fall wurde ein Paraffinblock für die anschließende immunhistochemische Untersuchung ausgewählt. In allen Fällen wurden in frischen Schnitten des in Paraffin eingebetteten archivierten Gewebes simultan immunhistochemische Reaktionen mit CD163 auf synoviale M2-Makrophagen (Klon 10D6, Novocastra Laboratories, Newcastle-upon-Tyne, Großbritannien; Verdünnung 1:100) und mit Podoplanin auf Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (Klon D2-40, Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA, USA; Verdünnung 1:40) durchgeführt. Die Scorewerte der Anfärbungsintensität (als negativ, schwach, mittelgradig oder stark bewertet) und die Anfärbungsverteilung (Zytoplasma oder Membran) wurden zusammen mit dem relativen Anteil immunhistochemisch positiver Zellen dokumentiert.

Lymphozytentransformationstest (LTT). Ein LTT erfolgte in Blutproben, die bei zwei Patienten während der Kontroll-Nachuntersuchung entnommen worden waren. Durch Dichtezentrifugation über Ficoll-Hypaque-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) wurden aus dem heparinisierten peripheren Blut beider Patienten einkernige Zellen gewonnen. Die Zellkultur erfolgte in RPMI1640-Medium (PAA Laboratories), dem

hitzeinaktiviertes 10% humanes AB-Serum, Glutamin, Antibiotika/Antimykotika-Lösung und nicht-essentielle Aminosäuren hinzugegeben worden waren. Alle Kulturen wurden vierfach auf 96-Well Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Zur Stimulation wurden verwendet: Phytohämagglutinin als Pan-T-Zell-Mitogen (2,4 µg/ml); Tetanustoxoid (5 µg/ml), NiSO₄, CrCl₃, CoCl₂, MnCl₂ und Na₂MoO₄ und das Kulturmedium allein als Kontrolle. Nach fünf Tagen wurden die Zellen über Nacht mit [³H]-Thymidin gepulst, und durch Messung der inkorporierten Radioaktivität die Proliferation beurteilt. Der Stimulationsindex (SI) wurde als das Verhältnis der mittleren Counts pro Minute (cpm) in stimulierten im Vergleich zu nicht stimulierten Kulturen errechnet. Ein SI von mehr als 3 galt als positiv für Überempfindlichkeit.

4 Ergebnisse

Die Gruppe "geringgradige Synovialitis" umfasste fünf Patienten mit primärer Osteoarthrose und histologisch untersuchter geringgradiger Synovialitis ohne vorherige Implantationschirurgie. Die oberflächliche Schicht der Synovialmembran bestand aus einer Lage flacher oder ovaler Zellen. Einzelne verstreute CD163-positive Makrophagen wurden immunhistochemisch in der Synovialintima und im subsynovialen bindegewebigem Stroma nachgewiesen. In der Synovialintima und im subsynovialen Stroma waren außerdem einige D2-40-positive Zellen zu erkennen.

Die Gruppe "hochgradige Synovialitis" umfasste fünf Patienten mit neu diagnostizierter seropositiver rheumatoider Arthritis, bei denen bisher weder eine antiphlogistische Behandlung noch eine Implantationschirurgie erfolgt war. Mikroskopisch zeigte sich in den Synovialgeweben eine verstärkte Zelldichte bei fünf- oder mehrlagiger Synovialintima und eine dichte Infiltration des synovialen bindegewebigen Stromas durch Lymphozyten und Plasmazellen; in der herkömmlichen Histologie waren einzelne Synoviozytenpopulationen jedoch nicht abgrenzbar. Sowohl die Intima als auch das Stroma der Synovialmembran wiesen zahlreiche runde oder ovale CD-163-positive Makrophagen und D2-40-positive Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten auf. Charakteristisch für die letztgenannten Zellen waren die Bildung schlauchförmiger Fortsätze sowie längliche oder sternähnliche Formen. Interessanterweise reagierten auch mehrkernige Synoviozyten positiv auf CD163.

In der Gruppe von fünf Patienten mit Synovialitis, die durch Polyethylen-Abriebpartikel induziert war, stellten dichte Makrophageninfiltrate im Synovialstroma das Charakteristikum

dar. Unter polarisiertem Licht waren im Makrophageninfiltrat zahlreiche doppelbrechende Partikel zu erkennen. Die Synovialmembran-Zellschicht bestand aus einer oder zwei Reihen runder Synoviozyten. Die Mehrzahl der Synovialmembranzellen reagierte stark mit dem CD163-Antikörper. Das dichte subsynoviale Makrophageninfiltrat zeigte eine mittelgradig starke positive Reaktion auf den CD163-Antikörper. Während vereinzelte Zellen der Synovialmembran und Lymphgefäße stark positiv für D2-40 waren, enthielt das subsynoviale Stroma überhaupt keine D2-40-positiven Zellen.

Bei den zwei Patienten, bei denen die Metall-auf-Metall-Oberflächenersatzendoprothese des Hüftgelenks versagt hatte, fand sich eine massive Metallose des Knochen- und Weichteilgewebes. Bei dem ersten Patienten erfolgte ein Revisionseingriff wegen Lockerung der Acetabulum-Komponente. Der zweite Patient erlitt eine pathologische Fraktur infolge hochgradiger Metallose des Restfemurs. Makroskopisch fand sich in beiden Proben ein metallischer Aspekt der Synovialmembran und des Restfemur-Knochengewebes. Histologisch war die zellarme Synovialmembran fokal von einem fibrinösen Exsudat bedeckt. Das subsynoviale Bindegewebe war infiltriert von Makrophagen, die Metall-Abriebpartikel phagozytiert hatten. Bemerkenswert ist, dass das LTT-Ergebnis im Blut des Patienten mit der pathologischen Fraktur trotz der massiven Verschleißerscheinungen negativ war (SI <1,8).

Die Gruppe "proliferativ-desquamative Synovialitis" umfasste fünf Patienten mit unklaren Leistenschmerzen nach Oberflächenersatzendoprothese am Hüftgelenk. Die charakteristischen histologischen Befunde in allen, bei diesen Patienten gewonnenen, Proben waren die Proliferation der Synovialmembranzellen und ein subsynoviales Infiltrat von unterschiedlicher Zelldichte, das aus Makrophagen und Lymphozyten bestand. In der oberflächlichen Schicht und im subsynovialen Stroma lagen CD163-positive Makrophagen vor, deren Zahl aber geringer war, als in Fällen von Metallose. Immunhistochemisch wurden hyperplastische Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten mit tubulären Fortsätzen gefunden. Da dies eine retrospektive Studie war, konnten keine zusätzlichen Tests dieser Proben durchgeführt werden. Auch wurde nur bei einem Patienten dieser Gruppe der LTT durchgeführt. Die Ergebnisse waren für alle getesteten Metalle negativ (SI <1,9), die einzige Ausnahme war Molybdän (Na_2MoO_4 ; SI >3,1).

5 Diskussion

Das Synovialgewebe setzt sich zusammen aus unterschiedlichen Zelltypen wie z.B. Synoviozyten, stromale Fibroblasten und Zellelementen der Blutgefäßwand; unter pathologischen Bedingungen liegen auch entzündliche Infiltrate vor. Die Expression von CD163 beschränkt sich nachweislich vor allem auf Monozyten und Makrophagen im Gewebe (Schaer et al. 2002, Zwadlo et al. 1987, Van den Heuvel et al. 1999, Lau et al. 2004). Die CD163-Anfärbung trägt zur Abgrenzung synovialer Makrophagen von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis bei. Da CD68 nicht zwischen diesen Zelltypen unterscheidet, steht die Spezifität von CD163 für Makrophagen im Vordergrund (Fonseca et al. 2002). D2-40 ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Antigen M2A, ein 40 kDa O-gebundenes Sialoglykoprotein (Marks et al. 1999). Neben der starken Spezifität von D2-40 für normales Lymphendothel wird das M2A-Antigen auch in anderen gesunden und entarteten nicht-endothelialen Zellen exprimiert (Zustin et al. 2010b, Gomaa et al. 2007, Browning et al. 2008, Yu et al. 2007, Ordonez 2005, Schacht et al. 2005, Lau et al. 2007). Die Expression von Podoplanin steht in spezifischem Zusammenhang mit der Bildung von Pseudopodien (Wicki et al. 2006) und der Zellmigration (Shen et al. 2010, Martin-Villar et al. 2010).

In der vorliegenden Studie beobachteten wir bei geringgradiger Synovialitis und bei durch Polyethylenverschleiß verursachter Synovialitis ein diffuses Vorliegen von D2-40-positiven Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten. Reichlich vorhanden waren diese Zellen bei hochgradiger Synovialitis und proliferativer-desquamativer Synovialitis (in Zusammenhang mit vermuteter Metallüberempfindlichkeit). Außerdem fanden sich erhebliche Veränderungen von Größe und Form der D2-40-exprimierenden Zellen, die eine längliche oder sternähnliche Form annahmen und schlauchförmige Fortsätze bildeten, die fokal mit der Synovialoberfläche verbunden waren. In den Metallose-Fällen schien, neben einer Hyperplasie einiger D2-40-positiver Synoviozyten, die Anzahl D2-40-exprimierender Zellen im subsynovialen Stroma etwas erhöht zu sein. Diese Zellen proliferierten aber nicht im selben Maß, wie dies bei hochgradiger Synovialitis oder proliferativ-desquamativer Synovialitis zu beobachten war.

Die charakteristische Verdickung der synovialen Deckzellschicht fand sich sowohl bei hochgradiger Synovialitis (native Gelenke von Patienten mit rheumatoider Arthritis) als auch bei proliferativer-desquamativer Synovialitis (in Zusammenhang mit vermuteter Metallüberempfindlichkeit). In beiden Fällen waren die Läsionen charakterisiert durch das Vorliegen sternförmiger oder länglicher D2-40-positiver Fibroblasten-ähnlicher Synoviozyten, die schlauchförmige Fortsätze ausbildeten.

In beiden Gruppen war außerdem die Anzahl CD163-positiver Makrophagen in der synovialen Deckzellschicht und im subsynovialen Stroma beträchtlich erhöht.

Noch höher war die Anzahl CD163-exprimierender Makrophagen in den Fällen von Synovialitis, wie sie typischerweise durch Polyethylen- und Metallverschleiß induziert wird. Ebenfalls charakteristisch für solche Fälle waren minimale Änderungen des Zellgehalts der synovialen Deckzellschicht. Interessanterweise erbrachte der LTT bei der Patientin mit hochgradiger Knochen- und Bindegewebsmetallose negative Ergebnisse. Das positive LTT-Ergebnis für Molybdän bei der Patientin mit proliferativer-desquamativer Synovialitis (ohne Metallose) spricht dafür, dass dies eine, für periprotehetische Metallüberempfindlichkeit, charakteristische morphologische Läsion sein könnte. Von unseren Befunden ausgehend, könnte ein mit Überempfindlichkeit zusammenhängender Synovialerguss Merkmal einer proliferativen-desquamativen Synovialitis sein. Labortests gelten bei periprotehetischer Überempfindlichkeit zwar als unspezifisch, Thomas et al. (Thomas et al. 2009) beobachteten jedoch bei fünf von 16 Patienten mit vermuteter Überempfindlichkeit eine verstärkte Proliferation im LTT in Reaktion auf Molybdän. Da wir in unserer früheren Studie (Zustin et al. 2009) in Fällen von vermuteter Überempfindlichkeit unterschiedlich dichte Lymphozyteninfiltrationen der Synovialmembran beobachteten, erscheint es möglich, dass die morphologischen Veränderungen in der synovialen Deckzellschicht ein sogar noch stärker charakteristisches Merkmal der periprotehetischen Metallüberempfindlichkeit sein könnten, als die T-Lymphozyteninfiltration. Tatsächlich wurde denn auch in neueren Studien gezeigt, dass die Lymphozyteninfiltration in periprotehetischem Gewebe kein Spezifikum von Metall-auf-Metall-Hüftgelenkimplantaten ist (Ng et al. 2010, Fujishiro et al. 2010). Im Gegensatz zu anderen Studien, die sich mit nekrotischem periprotehetischem Weichteilgewebe befassten (Pandit et al. 2008a, Mahendra et al. 2009, Pandit et al. 2008b), untersuchten wir das am Femurhals anhaftende lebensfähige Synovialgewebe. Die beobachteten nekrotisierenden granulomatösen Reaktionen entstanden vor allem anterior des Femurhalses (Fang et al. 2008), was ein Hinweis auf eine bedeutende Rolle anderer mechanischer Faktoren bei ihrer Entstehung sein könnte.

Wir sind uns bewusst, dass die Aussagen der vorliegenden Studie einige wichtige Einschränkungen aufweist. Erstens: obwohl die Studie und die Kontrollgruppen relativ klein sind wurden alle Gruppen anhand histopathologischer Standardkriterien definiert. Zweitens ist zu bedenken, dass es bisher keine spezifischen Labortests bei Überempfindlichkeitsreaktionen im Rahmen der Endoprothetik gibt. Trotzdem sind die beiden Fälle, in denen LTT-Ergebnisse vorliegen, typische Beispiele für Metallose bzw. proliferative-desquamative Synovialitis. Aus

der Zusammenschau ergibt sich, dass die proliferative-desquamative Synovialitis im Hüftgelenk bei vermuteter Metallüberempfindlichkeit wesentliche morphologische Gemeinsamkeiten mit der hochgradigen Synovialitis in nativen Gelenken bei rheumatoider Arthritis hat. Während Synovialveränderungen, die durch Abriebpartikel induziert sind, typischerweise mit Makrophageninfiltration und einer unauffälligen synovialen Deckzellschicht einhergehen, ist das Charakteristikum der Metallüberempfindlichkeit die massive Proliferation der synovialen Deckzellschicht, wie dies auch bei rheumatoider Arthritis beobachtet wird.

6 Zusammenfassung

Bei aseptischer Prothesenlockerung weist das Synovialgewebe prothesentragender Gelenke typische morphologische Veränderungen auf (insbesondere Makrophageninfiltration). Da die Proliferation der synovialen Deckzellschicht ein charakteristisches Merkmal autoimmuner Gelenkerkrankungen ist, untersuchten wir die Veränderungen der Deckzellschicht bei Fällen mit Implantatversagen. Die bei den Prothesenrevisionen gewonnenen Synovialproben wurden nach Zuordnung zu fünf Gruppen morphologisch exakt definierter Läsionen (Arthrose, rheumatoide Arthritis, aseptische Lockerung einer Metall-Polyethylen- und Metall- Metall-Gelenkersatz bei vermuteter Metallüberempfindlichkeit) unter Einsatz konventioneller Färbung bzw. der Immunhistochemie vergleichend untersucht. Sowohl bei rheumatoider Arthritis als auch bei vermuteter Metallüberempfindlichkeit war eine erhebliche Zellproliferation in der Synovialmembran festzustellen. Makrophageninfiltrate fanden sich bei rheumatoider Arthritis und in allen Proben aus revidierten Hüftgelenkarthroplastiken. Obwohl synoviale und subsynoviale Makrophagen CD163-positiv waren (Hinweis auf synoviale M2-Makrophagen), reagierten die übrigen Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und vereinzelte Stroma-Fibroblasten positiv auf den D2-40-Antikörper (Hinweis auf Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten). Außerdem wiesen die hyperplastischen D2-40-positiven Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten, im Gegensatz zu CD163-positiven Makrophagen, zytoplasmatische tubuläre Fortsätze auf. In Fällen von unklaren Leistenschmerzen bei Metall-auf-Metall-Oberflächenersatzendoprothesen am Hüftgelenk wurde eine Proliferation der Zellschicht der periprothetischen Synovialmembran beobachtet, die auf eine Überempfindlichkeitsreaktion hindeutet. Trotz relevanter Einschränkungen der Aussagekraft dieser Studie tragen die hier vorgestellten Befunde zu der Evidenz bei, dass die Metallüberempfindlichkeit ähnliche charakteristische morphologische Merkmale hat, wie Autoimmunerkrankungen der Gelenke.

Schlüsselwörter: Endoprothesenversagen, Oberflächenersatz am Hüftgelenk, Metallüberempfindlichkeit, Podoplanin, Synovialitis

7 Literatur- und Quellenverzeichnis:

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

Browne JA, Bechtold CD, Berry DJ, Hanssen AD, Lewallen DG (2010) Failed metal-on-metal hip arthroplasties: a spectrum of clinical presentations and operative findings. Clinical orthopaedics and related research. 468(9):2313-2320.

Browning L, Bailey D, Parker A (2008) D2-40 is a sensitive and specific marker in differentiating primary adrenal cortical tumours from both metastatic clear cell renal cell carcinoma and pheochromocytoma. Journal of clinical pathology. 61(3):293-296.

Campbell P, Shimmin A, Walter L, Solomon M (2008) Metal sensitivity as a cause of groin pain in metal-on-metal hip resurfacing. The Journal of arthroplasty. 23(7):1080-1085.

Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID, Case CP (2005) An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. The Journal of bone and joint surgery American volume. 87(1):18-27.

Fang CS, Harvie P, Gibbons CL, Whitwell D, Athanasou NA, Ostlere S (2008) The imaging spectrum of peri-articular inflammatory masses following metal-on-metal hip resurfacing. Skeletal radiology. 37(8):715-722.

Flagg SD, Meador R, Hsia E, Kitumnuaypong T, Schumacher HR Jr.(2005) Decreased pain and synovial inflammation after etanercept therapy in patients with reactive and undifferentiated arthritis: an open-label trial. Arthritis and rheumatism. 53(4):613-617.

Fonseca JE, Edwards JC, Blades S, Goulding NJ (2002) Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis and rheumatism*. 46(5):1210-1216.

Fujishiro T, Moojen DJ, Kobayashi N, Dhert WJ, Bauer TW (2011) Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clinical orthopaedics and related research*. 469(4):1127-1133.

Gomaa AH, Yaar M, Bhawan J (2007) Cutaneous immunoreactivity of D2-40 antibody beyond the lymphatics. *The American Journal of dermatopathology*. 29(1):18-21.

Grammatopolous G, Pandit H, Kwon YM, Gundle R, McLardy-Smith P, Beard DJ, Murray DW and Gill HS (2009) Hip resurfacings revised for inflammatory pseudotumour have a poor outcome. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 91(8):1019-1024.

Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D and Walsh DA (2003) Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 48(8):2173-2177.

Korovessis P, Petsinis G, Repanti M, Repantis T (2006) Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty. Five to nine-year follow-up. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 88(6):1183-1191.

Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B and Haupl T (2006) Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*. 49(4):358-364.

Kwon YM, Thomas P, Summer B, Pandit H, Taylor A, Beard D, Murray DW and Gill HS (2010) Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 28(4):444-450.

Lau SK, Chu PG, Weiss LM (2004) CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *American journal of clinical pathology*. 122(5):794-801.

Lau SK, Weiss LM, Chu PG (2007) D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 20(3):320-325.

Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS, Athanasou N (2009) Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta orthopaedica.* 80(6):653-659.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, Banarjee D, Bauman R (1999) Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *British journal of cancer.* 80(3-4):569-578.

Martin-Villar E, Fernandez-Munoz B, Parsons M, Yurrita MM, Megias D, Perez-Gomez E et al (2010) Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Molecular biology of the cell.* 21(24):4387-4399.

Mohr W, Beneke G, Mohing W (1975) Proliferation of synovial lining cells and fibroblasts. *Annals of the rheumatic diseases.* 34(3):219-224.

Ng VY, Lombardi AV Jr., Berend KR, Skeels MD and Adams JB (2010) Perivascular lymphocytic infiltration is not limited to metal-on-metal bearings. *Clin Orthop Relat Res* 469: 523-529.

Ordonez NG (2005) D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Human pathology.* 36(4):372-380.

Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons CL, Ostlere S, Athanasou N, Gill HS and Murray DW (2008a) Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 90(7):847-851.

Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Luqmani R, Ostlere S, Murray DW, and Athanasou (2008b) Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 453(5):529-534.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *The American journal of pathology*. 166(3):913-921.

Schaer DJ, Boretti FS, Schoedon G, Schaffner A(2002) Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *British journal of haematology*. 119(1):239-243.

Shen Y, Chen CS, Ichikawa H, Goldberg GS(2010) SRC induces podoplanin expression to promote cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 285(13):9649-9656.

Slansky E, Li J, Haupl T, Morawietz L, Krenn V, Pessler F (2010) Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. *Histopathology*. 57(3):436-443.

Smeets TJ, Dolhain RJ, Breedveld FC, Tak PP (1998) Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *The Journal of pathology*. 186(1):75-81.

Thomas P, Braathen LR, Dörig M, Auböck J, Nestle F, Werfel T and Willert HG (2009) Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy*. 64(8):1157-1165.

Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, Döpp EA, Droste A, Van Gaalen FA, Sorg C, Högger P and Beelen RH (1999) Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *Journal of leukocyte biology*. 66(5):858-866.

Veale D, Yanni G, Rogers S, Barnes L, Bresnihan B, Fitzgerald O (1993) Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 36(7):893-900.

Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer cell*. 9(4):261-272.

Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, Lohmann CH (2005) Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 87(1):28-36.

Yu H, Gibson JA, Pinkus GS, Hornick JL (2007) Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. *American journal of clinical pathology*. 128(5):776-782.

Zustin J, Amling M, Krause M, Breer S, Hahn M, Morlock MM, Rütger W und Sauter G (2009) Intraosseous lymphocytic infiltrates after hip resurfacing arthroplasty : a histopathological study on 181 retrieved femoral remnants. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 454(5):581-588.

Zustin J, Hahn M, Morlock MM, Rütger W, Amling M, Sauter G (2010) Femoral component loosening after hip resurfacing arthroplasty. *Skeletal radiology*. 39(8):747-756.

Zustin J, Scheuer HA, Friedrich RE (2010) Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 39(1):115-120.

Zwadlo G, Voegeli R, Osthoff KS, Sorg C (1987) A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Experimental cell biology*. 55(6):295-304.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sauter, der mir ermöglichte an seinem Institut eine „externe“ Dissertation durchzuführen.

Sehr herzlich danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jozef Zustin für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche Begleitung, sowie sein stetes Interesse am Voranschreiten der Publikation und dieser Arbeit.

9 Lebenslauf

10 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: