

II. Orthopädischen Klinik
der Hessing-Siftung zu Augsburg
(Leiter: PD. Dr. med. Th. Naumann)

Vergleich von epikutaner Patch Testung mit der synovialen T-Zell Infiltration bei Patienten mit endoprothetischem Gelenkersatz

Eine immunhistologische Untersuchung zur Abklärung
der allergischen Reaktion auf Metalle an der Synovia

DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Markus Wilhelm Laupheimer
aus
Augsburg

2001

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R.Marre
1. Berichterstatter: PD Dr. Naumann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Köhler
Tag der Promotion: 13.6.2002

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Metallallergie und Endoprothetik	6
2.2. Geschichte der Endoprothetik.....	6
2.3. Allergologie der Metallallergie.....	7
2.4. Immunologische Grundlagen der Kontaktdermatitis.....	8
2.5. Die Synovialis und ihre Immunfunktion	9
2.6. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Patientengut	11
3.1.1. Gruppeneinteilung.....	12
3.1.2. Patientenstruktur in den einzelnen Gruppen	13
3.1.3. Selektionskriterien.....	14
3.1.4. Patch-Test.....	15
3.2. Untersuchungsmaterial-Synovialmembran.....	15
3.3. Geräteliste und Testmaterialien (Reagenzien) zur Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung der Präparate.....	16
3.4. Immunhistologische Methoden	17
3.4.1. Paraffinschnitte	17
3.4.2. Labelled Avidin-Biotin-Methode.....	18
3.4.3. Bewertung der Testmethode	20
3.5. Festsetzung der Auswertungskriterien.....	21
3.6. Statistische Verfahren	22
4. Ergebnisse.....	23
4.1. Histologische Untersuchungsbefunde	23
4.1.1. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe A.....	23
4.1.2. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe B	27
4.1.3. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe C	28

4.1.4. Beschreibung des histologischen Befundes eines Patienten mit Nickelallergie	29
4.2. Immunhistochemische Untersuchungen	30
4.2.1. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD3 Antikörper	30
4.2.2. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD4 Antikörper ...	33
4.2.3. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD8 Antikörper ...	35
4.2.4. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des NK Antikörper	37
5. Diskussion	39
5.1. Methoden	40
5.2. Patch-Testung und Endoprothetik	41
5.3. T-Zellinfiltration als Zeichen einer „inneren Allergie“	46
5.4. Patient mit nickelpositivem Patch-Test	50
5.4. Schlussfolgerung.....	51
6. Zusammenfassung	52
7. Anhang.....	53
Patienten der Gruppe A: Klinik/Histologie/Immunhistochemie	53
Patienten der Gruppe B: Klinik/Histologie/Immunhistochemie	66
Patienten der Gruppe C: Klinik/Histologie/Immunhistochemie	75
Patient mit Nickelallergie: Klinik/Histologie/Immunhistochemie	87
8. Literaturverzeichnis	88

1. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
BF	blastogenic factor
CD	Cluster of differentiation
HE	Hämalaun Eosin
HLA	human leukocyte antigen (Humane Histokompatibilitäts Leukozytenantigene)
KC	Keratinozyt
LC	Langerhanszelle
LIF	leukocytosis inducing factor (migration inhibition factor)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK	Natürliche Killerzelle (natural killer cell)
TEP	Totalendoprothese

2. Einleitung

2.1. Metallallergie und Endoprothetik

Metallallergien in der Orthopädie sind ein kontrovers diskutiertes Thema. Allergien auf Metalle in Endoprothesen werden schon seit langem als mögliche Ursache der aseptischen Lockerung diskutiert. Es wurde auch von dermatologischen Veränderungen berichtet. Bereits in den 60er Jahren fanden sich in der Literatur wiederholt Einzeldarstellungen von Hautveränderungen, die mit einer Allergie auf Endoprothesen in Verbindung gebracht wurden. (12, 36)

Die erste Studie, die sich mit der Möglichkeit einer Allergie auf Bestandteile der Metall-Legierung bei Hüft-Totalendoprothesen befasste, führten im Jahre 1974 Evans und Freeman durch. (32,45) Mit Hilfe eines epikutanen Patch-Testes fanden die Autoren eine erhöhte Anzahl von Metallallergikern unter Patienten mit einer aseptischen Lockerung.

2.2. Geschichte der Endoprothetik

Die früheste Beschreibung eines endoprothetischen Gelenkersatzes geht auf das Jahr 1890 zurück. Damals führte Prof. Themistocles Gluck in Berlin Berichten zufolge die erste Endoprothesenoperation durch. (108)

Heute ist die Implantation von Gelenkendoprothesen eine der häufigsten orthopädischen Operationen überhaupt. Deshalb sind Patienten mit mehr als einen Gelenkersatz keine Seltenheit. Die Komplikationsrate nach endoprothetischen Operationen ist generell gering und die meisten Patienten erfahren eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität. Zehn Jahre nach der Implantation eines künstlichen Hüftgelenks zeigt sich bei 10-20% der Fälle eine Implantatlockerung. (4, 56, 96)

Bekannte Ursachen für eine frühzeitige Prothesenlockerung sind nach Gschwend(45):

- a) Infektionen
- b) Schlechte Implantationstechnik (z.B. Femurimplantat bei Hüft TEP in Varusstellung)
- c) Fehler in der Art der Verwendung des Knochenzements: zu frühes oder zu spätes Einbringen des Zements, ungenügende Füllung, Blutbeimischung, Lufteinschlüsse
- d) Ungünstiges Design (z.B. dreieckige Femurschaftform mit medial kantigem Profil bei Hüft TEPs)
- e) Verminderte Knochenresistenz (z.B. schwere Osteoporose)

- f) Trauma, Sturz mit periprothetischer Fraktur
- g) Reaktionen auf Abriebpartikel (z.B. Polyethylenpfanne)
- h) Allergie auf Chrom und Nickel

2.3. Allergologie der Metallallergie

Bei der Metallallergie handelt es sich um eine T-Zell gebundene Spätreaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell. (25)

Unter diesem Allergietyp versteht man Überempfindlichkeitsreaktionen, die erst nach 12 oder mehr Stunden nach Antigenexposition auftreten. Diese Reaktion vom verzögerten Typ wird durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten hervorgerufen. Ein früherer Kontakt mit dem entsprechenden Antigen muss vorausgegangen sein.

Die allergische Kontaktdermatitis ist das häufigste Beispiel für diesen Reaktionstyp. Die Häufigkeit einer nickelinduzierten Kontaktdermatitis liegt ungefähr bei 10% der Frauen in Finnland (82) und 16% in Toronto, Kanada (81). Neuere Zahlen aus Schweden zeigen sogar eine Prävalenz von 21,2% mit steigender Tendenz nach Möller. (71, 75)

Je nach Studie sind 3,2-11,8% der getesteten Patienten gegenüber Chromat und 1,9-4,3% gegenüber Kobalt sensibilisiert (14, 47, 51, 63). Eine Sensibilisierung gegenüber Aluminium und Titan ist ebenfalls beschrieben worden (64, 73).

Bei der Implantation von Endoprothesen werden Metallteile mit Kontakt zum Knochen und zur Synovia in den menschlichen Körper eingebracht. Die dabei verwendeten Metalle sind Legierungen aus folgenden Einzelmetallen: Eisen, Kobalt, Chrom, Nickel, Mangan, Molybdän, Aluminium, Titan und Niob.(9, 87)

2.4. Immunologische Grundlagen der Kontaktdermatitis

Das eigentliche Antigen, auf welches der Körper mit einer allergischen Reaktion antwortet, ist das an körpereigenes Protein gebundene Metallion. Dies wird auch als Hapten bezeichnet.

Zunächst kommt es zu einer Sensibilisierungsphase, während welcher die Langerhanszellen (LC) der Haut das Hapten aufnehmen und zu den regionalen Lymphknoten transportieren. Dort wird das Antigen naiven T-Lymphozyten präsentiert. Zur Verdeutlichung vergleiche hierzu Abbildung 1.

Die T-Zellen erkennen haptenmodifizierte Peptide auf der Zelloberfläche, die mit MHC (major histocompatibility complex) Klasse-II-Molekülen interagieren. (95,31, 93) Die Gene dieser Moleküle befinden sich auf Chromosom 6. Hier finden sich beim Menschen MHC-Klasse-I-Gene (HLA-A,-B,-C) und MHC-Klasse-II-Gene (HLA-DR,-DP,-DQ). Neben den LC können auch andere „antigen presenting cells“ (APC) T-Zellen sensibilisieren (41,97).

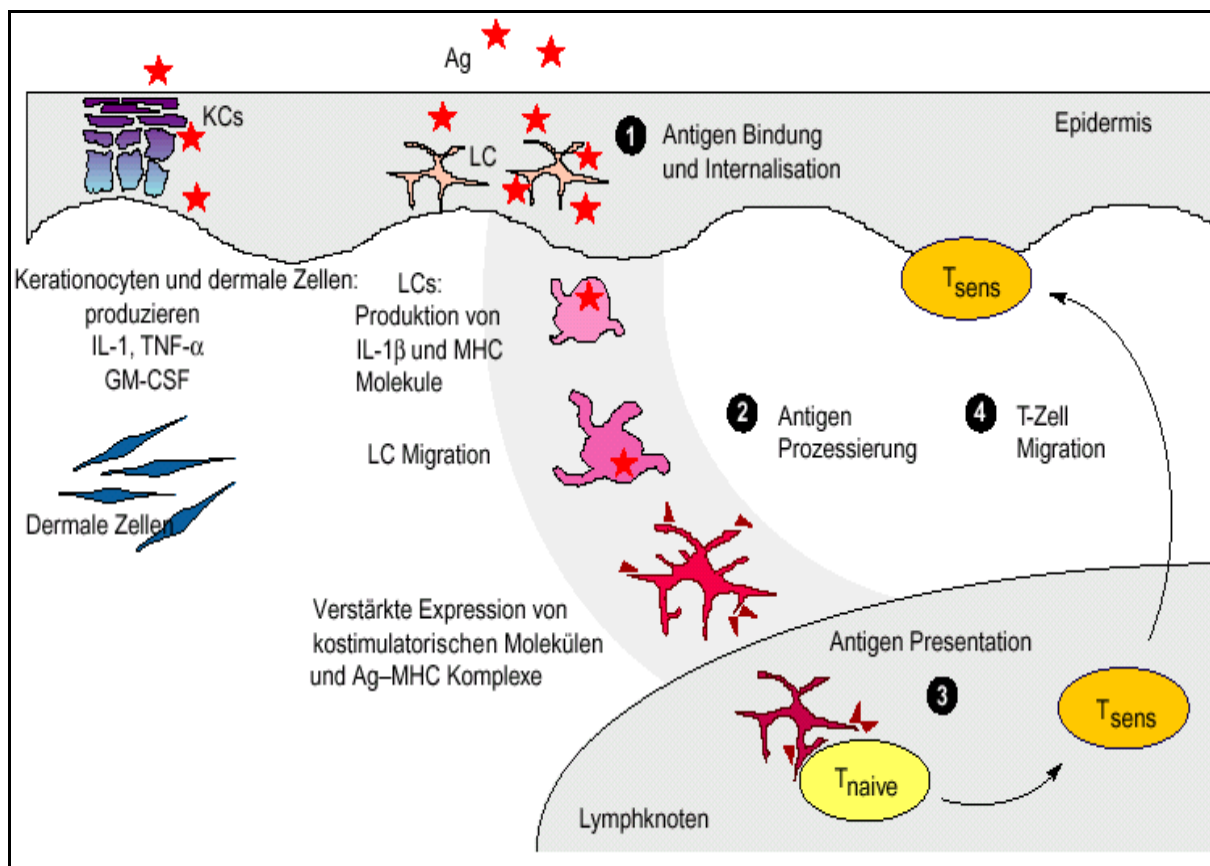


Abbildung 1: Derzeitige Hypothese der Sensibilisierungsphase bei Kontaktallergie, modifiziert nach Grabbe und Schwarz (41)

Die primäre Haptenpräsentation resultiert in der Aktivierung von T-Lymphozyten. Die meisten Haptene rufen eine oligoklonale T-Zellantwort hervor. Es ist jedoch unklar, welche T-Zell-Subpopulation für die Kontaktallergie verantwortlich ist. Neuere Studien zeigen jedoch eine Korrelation zwischen nickelspezifischen CD8 T-Zellen, auch Suppressor- oder Zytotoxische-T-Zellen genannt, und dem Auftreten einer Kontaktallergie. Nickel spezifische CD4 T-Zellen, auch Helferzellen genannt, übernehmen vor allem eine regulierende Funktion der Immunantwort auf das Antigen (22, 76). Die Mehrzahl der Veröffentlichungen stellt jedoch die CD4 Helferzellen als vorherrschende Subpopulation bei der Kontaktdermatitis in den Vordergrund (3,23,54,5).

Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, dass die T-Zellaktivierung ein konzentrationsabhängiger Prozess ist und der Übergang zu toxischen Effekten fließend sein kann. (85, 97, 41)

Betrachtet man das Areal der Kontaktfläche von Epidermis und Metall, so findet man eine Akkumulation von mononukleären Zellen, wobei auch eine erhöhte hapten-spezifische T-Lymphozyten Akkumulation gesehen wird. Nicht nur lokale Immunreaktionen werden der Kontaktallergie zugesprochen, sondern auch die Beeinflussung anderer Immunfunktionen zur Ausbildung einer systemischen Allergie vom Typ IV (55, 97, 94).

2.5. Die Synovialis und ihre Immunfunktion

Die Gelenkkapsel besteht aus dem Stratum fibrosum, einer äußeren Schicht aus straffem, kollagenem Bindegewebe und aus dem Stratum synoviale, einer inneren, die Synovia produzierenden, Schicht. Überwiegend aus lockerem, zellreichem Bindegewebe aufgebaut, finden sich im Stratum synoviale auch Fettzellen, Nerven und Gefäße. Histologisch zeigt sie gelenkseitig platte oder kubische Zellen. Elektronenmikroskopisch lassen sich im Stratum synoviale zwei Zelltypen unterscheiden. A- und B-Zellen, die beide zur Phagozytose befähigt sind, wobei die A-Zellen aktiver zu sein scheinen. Die B-Zellen werden als Synovialflüssigkeit produzierende Zellen angesehen.

Die Gelenkkapsel, die bei TEP-Implantation meist subtotal entfernt wird, stellt sich in Form einer Pseudosynovialis nach 6 Monaten wieder selbst her. Dabei findet sich histologisch als erstes ein gefäßreiches Granulationsgewebe mit reichlich Siderophagen. Im Laufe von mehreren Monaten wird dieses durch ein, die Struktur der ursprünglichen Gelenkkapsel weitgehend imitierendes straffes Bindegewebe ersetzt (10).

Im Jahre 1982 wurde in der normalen synovialen Deckschicht ein großer Anteil zur Gruppe der Makrophagen gehörenden Zellen gefunden, welche HLA-DR exprimieren. HLA-DR positiv sind auch zirkulierende Monozyten, epidermale Langerhans Zellen, Kupfferzellen und eine Reihe gewebständiger Makrophagen. Verbunden mit dieser Entdeckung war die Beobachtung einer Aktivierung der T-Lymphozyten durch HLA-DR exprimierende Zellen, die entweder aus dem synovialen Gewebe selbst oder als Antwort auf zirkulierendes Antigen stammten (58, 57).

Diese Ergebnisse stellen die zelluläre und molekulare Grundlage dar, um eine lokale und systemische Sensibilisierung, bei genetisch prädispositionierten Personen, auf Metalle zu entwickeln. Durch den engen Kontakt einer Endoprothese zur Synovialis, der Freisetzung von Metallionen durch Abrieb (Metallkorrosion) und dem Herauslösen von Metallen aus der Prothese kommt das sensibilisierende Antigen mit dem Immunsystem in Kontakt (91, 85, 101).

2.6. Ziel der vorliegenden Arbeit

Trotz eingehender Literaturrecherche konnte bislang keine Studie gefunden werden, welche bei Patienten mit Wechseloperationen von Endoprothesen mit Metall-Polyethylen-Paarung eine ähnliche T-Zell Infiltration in die Synovialmembran zeigt, wie sie in der Haut von Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis bei Metallallergie beobachtet wird.

In diesem Zusammenhang ist in der bisher beschriebenen Literatur nicht belegt, warum einem Metallallergiker eine Standardprothese aus Chirurgenstahl verwehrt bleibt.

In der hier durchgeführten Studie wurde der Versuch unternommen, zu klären, ob die Synovialmembran eine ähnliche T-Zell Infiltration zeigt, wie die Haut von Patienten mit Kontaktdermatitis nach lokaler Exposition mit Metallen .

Um die auf der Haut getestete Allergie mit einer möglichen Allergie auf Endoprothesen mit Metall-Polyethylen-Gleitpaarung zu vergleichen stellten wir uns die Fragen:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen epikutaner Patch-Testung und T-Zell Infiltrationen der Synovialis?

Gibt es Unterschiede an der Synovialis zwischen Patienten mit Primärexposition von metallischen Prothesen zu solchen mit zurückliegender Exposition in loco oder kontralateral?

Weiterhin sollen folgende Fragen, durch epikutane Patch-Testung geklärt werden:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen aseptischer Lockerung und epikutaner Patch-Testung ?

Findet man eine erhöhte Häufigkeit von Kontaktallergie bei Prothesenträgern ?

3. Material und Methoden

3.1. Patientengut

Es wurden insgesamt 35 Patienten mit Coxarthrose und Gonarthrose, die entweder zur primären Totalendoprothese (TEP) oder zur Wechseloperation anstanden, in die Studie aufgenommen.

Die Patienten waren zwischen 51 und 85 Jahre alt, das Durchschnittsalter aller Patienten zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme lag bei 73,5 Jahren. Unter den Patienten waren 17 Männer und 19 Frauen. (Abbildung 2)

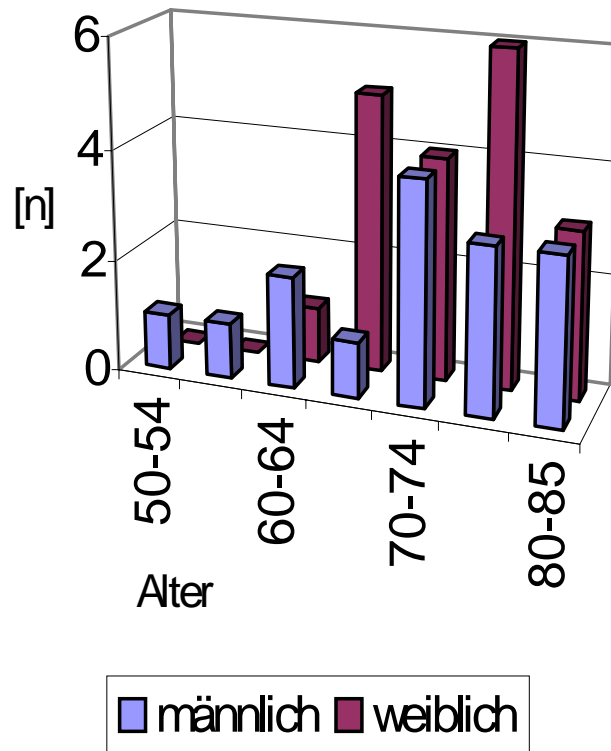


Abbildung 2: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten, die sich einem endoprothetischen Ersatzes unterzogen haben. [n] ist die Zahl der Patienten

3.1.1. Gruppeneinteilung

Das gesamte Patientengut von 35 Patienten wurde nach folgenden Kriterien in drei verschiedene Gruppen eingeteilt.

Gruppe A: Patienten, die erstmalig einen endoprothetischen Gelenkersatz erhielten und zuvor noch nie mit einem Metallimplantat versorgt worden waren

Gruppe B: Patienten, die auf der kontralateralen Seite bereits endoprothetisch versorgt worden waren

Gruppe C: Patienten, bei denen eine TEP-Wechsel-Operation durchgeführt wurde

Die Patienten aller Gruppen wurden mit einer Endoprothese aus Chirurgienstahl (Legierung: Chrom, Nickel, Molybdän) versorgt.

Als Hüft TEP Modell wurde der Lateralistaions-Geradschaft der Firma Alpha-Norm implantiert und als Knie TEP wurde das Modell PFC der Firma Johnson&Johnson zur Implantation verwendet.

Ein weiterer Patient, der nachweislich eine Nickelallergie hatte, wurde in die Studie mit aufgenommen. Dieser Patient wurde per Zufall gefunden. In der Anamnese hatte der Patient vor der Primärimplantation keine Allergie angegeben. Bei einer Seromrevision, die am 7. postoperativen Tag durchgeführt wurde, wurde möglichen Komplikationsursachen nachgegangen. Es fand sich auf explizite Nachfrage eine Nickelallergie, die sich im nach der TEP-Implantation aufgetauchten Allergieausweis bestätigte.

Da es in Deutschland gängige Praxis ist, Metallallergikern eine Titanprothese zu implantieren, konnten keine weiteren Patienten untersucht werden, die trotz Nickelallergie eine metallische Standardprothese erhalten haben.

3.1.2. Patientenstruktur in den einzelnen Gruppen

Die Gruppe A besteht aus 13 Patienten. Die Patienten waren bei Präparatentnahme zwischen 60 und 85 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 72,7 Jahren. (Abbildung 3)

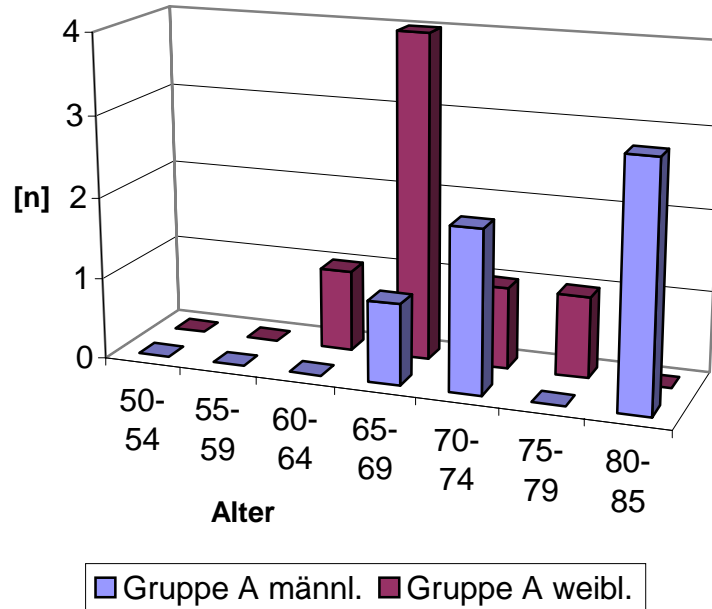


Abbildung 3: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patient der Gruppe A

Die Gesamtzahl der Patienten in Gruppe B ist 9. Die Patienten waren bei Präparatentnahme zwischen 59 und 80 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 72,0 Jahren. (Abbildung 4)

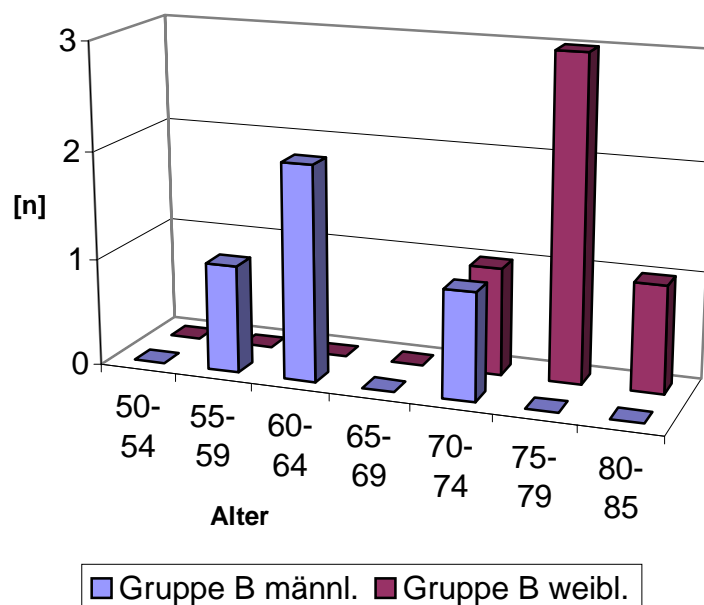


Abbildung 4: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten der Gruppe B

In Gruppe C betrug die Gesamtzahl der Patienten 12. Die Patienten waren bei Präparatentnahme zwischen 51 und 85 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 74,2 Jahren. (Abbildung 5)

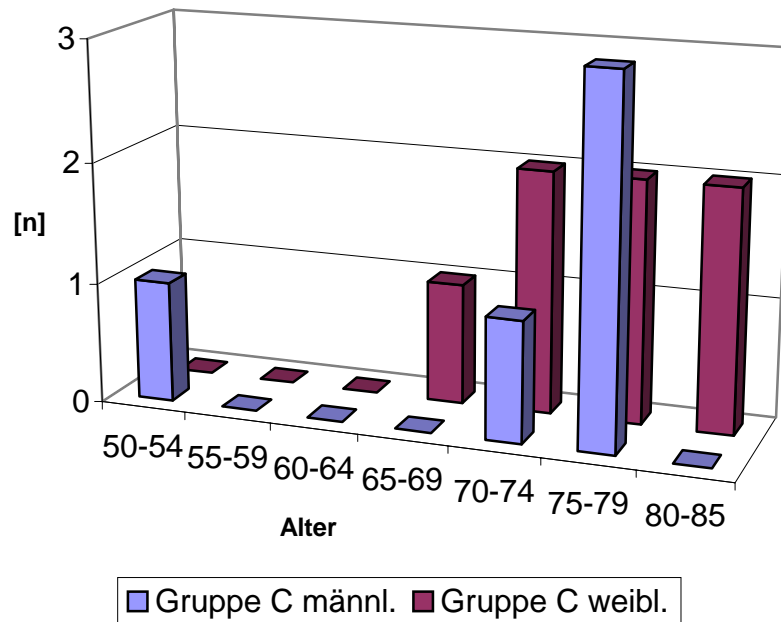


Abbildung 5: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten der Gruppe B

3.1.3. Selektionskriterien

Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. Die Patienten durften unter keiner immunsuppressiven Therapie stehen (z.B. Corticoide, Cyclosporin).
2. Die Patienten durften präoperativ keine Antibiotika erhalten haben.
3. Infekte waren im Vorfeld auszuschließen. Hierunter fielen sowohl infizierte Gelenkprothesen als auch akute oder chronische anderweitige Infekte.
4. Ein negatives Ergebnis im präoperativ durchgeführten Patch Test wurde gefordert, da es im deutschsprachigen Raum üblich ist, nickelsensitive Patienten mit einer Titanendoprothese zu versorgen.
5. Auszuschließen war eine Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis nach den Klassifikationskriterien der American Rheumatism Association.

3.1.4. Patch-Test

Der Epikutantest zur Sicherung der Diagnose Kontaktallergie wurde erstmalig im Jahre 1895 von Jadassohn als „Funktionelle Hautprüfung“ beschrieben. Dieser Test, der heute Patch-Test genannt wird, zeigt nur dann eine positive Reaktion, wenn die Haut schon früher einmal Kontakt mit einem Allergen gehabt hat und eine Sensibilisierung erfuhr. Heutzutage enthalten alle Standardserien zur Patch-Testung auf eine Nickelallergie 5% Nickelsulfat. Ein wichtiger Faktor zur Aussagekraft des Patch-Tests ist seine Kontaktzeit, die im Sinne einer Allergie vom verzögerten Typ mindestens 24 Stunden betragen sollte. Deshalb wurde bei den Studienpatienten darauf geachtet, den Patch-Test 24-36 Stunden vor der Operation an der dorsalen Schulterregion aufzubringen und am Morgen vor der OP abzulesen .

Wir gehen davon aus, dass das Immunsystem im Falle einer „inneren Sensibilisierung“ eine systemische Sensibilisierung zeigen und nach Antigenexposition auch eine Typ IV Reaktion auf der Haut zeigen würde. (2, 15, 53, 62, 65, 104)

Der verwendete Epikutantest stammt von der Firma Abello Deutschland Pharma GmbH, Bornheim. Als Testsubstanzen wurden Kaliumchromat 0,5%, Kobaltchlorid 1% und Nickelsulfat 5% verwendet.

3.2. Untersuchungsmaterial-Synovialmembran

Es wurden Schnitte aus formalinfixierter, paraffineingebetteter Synovialmembran untersucht, die im Zeitraum von September 1998 bis Januar 1999 bei operativen Eingriffen zum endoprothetischen Gelenkersatz in den Hessing-Kliniken in Augsburg (II. Klinik, PD Dr. Naumann) gewonnen wurde. Bei den Operationen wurde darauf geachtet, dass die Gelenkkapsel möglichst nahe am Knochen entfernt wurde.

Eine Aufarbeitung der Präparate erfolgte im Pathologischen Institut des Zentralklinikum Augsburg (Prof. Dr. Arnholt).

Insgesamt wurde die Untersuchung an 35 Gewebeproben der Synovialmembran durchgeführt.

3.3. Geräteliste und Testmaterialien (Reagenzien) zur Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung der Präparate

Geräte:

- Wärmeofen (Firma Memert)
- Mikrowelle (Firma Moulinex)
- Kühlschrank (Firma Bosch)
- Immunfärbecenter Sequenza (Firma Shandon)
- Coverplate (Firma Shandon)
- Objektträger Superfrostplus (Firma Menzel)
- Pipetten (Firma Eppendorf)

Zum Einbetten und Endparaffinieren wurden verwendet:

- Paraffin
- Xylol
- Absteigende Alkoholreihe 100%, 96%, 70%
- Aqua dest.

Für die immunhistochemischen Tests wurden verwendet:

- CD3 (mouse monoclonal antibody), Clone PS1, IgG2a (Firma NOVO CASTRA)
- CD4 (mouse monoclonal antibody), Clone 1F6, IgG1 (Firma NOVO CASTRA)
- CD8 (mouse monoclonal antibody), Clone 4B11, IgG2b (Firma NOVO CASTRA)
- Monoclonal mouse anti-human natural killer cell-like (DAKO-NK1), Clone NK1
- TUF (Target Unmasking Fluid), (Firma Kreatech Diagnostics)
- Antigen Retrieval Citra Solution (Firma BioGenex)
- H₂O₂ (Wasserstoffperoxid)
- Tris-Puffer 0,05 M : pH 7,6 , 6,1g Tris(Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Base) in 50ml Aqua dest. Lösen, 37 ml einer 1N Salzsäure hinzufügen, mit Aqua dest auf ein Gesamtvolumen von 1l auffüllen
- Brückenantikörper, Streptavidin Peroxidase, AEC Chromogen: Universal DAKO LSAB 2-Kit, Peroxidase (Firma DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg)
- Hämalaun
- Ammoniakwasser
- Aquadex

3.4. Immunhistologische Methoden

Um einen Einblick in die Lokalisation, Verteilung und den Aktivierungszustand von immunkompetenten Zellen zu erhalten, die für eine lokale Reaktion bei einer Kontaktallergie verantwortlich sind, wurden CD3-, CD4- und CD8- Antikörper zur Bestimmung der T-Zell Subpopulationen an der Synovialis verwendet. Für den immunhistochemischen Nachweis von Natural Killer Cells an der Synovialmembran wurden NK-Antikörper eingesetzt.

Die ersten Versuche zur Antikörperanfärbung nach Vorbehandlungsangaben des Herstellers erwiesen sich nur im Falle des NK-Antikörpers als erfolgreich. Im Falle des CD3 und CD8 Antikörpers folgten weitere Versuche an der Gelenkkapsel, da es primär entweder zu einer Überfärbung oder zu einer zu geringen Färbung kam. Der CD4 Antikörper zeigte bei den Folgeversuchen keine Reaktion. Die Änderung der Inkubationszeit und Antikörperkonzentration blieb bei allen drei Antikörpern erfolglos, so dass weitere Vorversuche am Lymphknoten zur Spezifizierung der Methode nötig waren.

Nach mehreren Ansätzen konnte die richtige Konzentration, Inkubationszeit und das richtige Vorbehandlungsverfahren festgestellt werden, wobei ein spezieller Mikrowellenpuffer zur Vorbehandlung des CD4 Antikörpers verwendet wurde. Die Lymphknotenimmunhistochemie der verschiedenen Antikörper wurde zur Positivkontrolle herangezogen. Mit den erlangten Erkenntnissen aus den Vorversuchen erfolgte die Färbung der Synovialmembran, wobei auf die interindividuellen Unterschiede der Behandlung der Antikörper hingewiesen sei.

3.4.1. Paraffinschnitte

Die intraoperativ entnommenen Gewebeproben wurden in Natriumchlorid zum Pathologischen Institut des Zentralklinikums Augsburg transportiert. Dort wurden die Proben in 10%igem Formalin fixiert und in Paraplast eingebettet. Danach wurden pro Gewebesblock mit einer Schnittdicke von 5 µm mindestens vier Schnitte pro Paraffinblock, für jeden Antikörper pro Patient ein Schnitt, angefertigt. Es wurde darauf geachtet, dass die vier Schnitte vom gleichen Paraffinblock stammten, hintereinander geschnitten wurden und nach Möglichkeit im Membranbereich der Synovialis lagen. Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 38°C getrocknet, um eine gute Anhaftung der Schnitte zu gewährleisten. Anschließend wurden die Schnitte mit den verschiedenen Markern immunhistologisch markiert.

3.4.2. Labelled Avidin-Biotin-Methode

Bei dieser Methode nützt man die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin, wobei ein biotinylierter Brückenantikörper für dieses Verfahren benötigt wird. Das an Meerrettichperoxidase konjugierte Streptavidin bindet sich an das Biotin des Brückenantikörpers.

Wie bei allen immunhistochemischen Verfahren, muss auch bei diesem eine bestimmte Reihenfolge der Reagenzienapplikation eingehalten werden.

Als erstes wird der Primärantikörper aufgetragen, darauf folgt der biotinylierte Brückenantikörper auf diesen wiederum der Streptavidin-Komplex.

Mit den Erkenntnissen aus Vorversuchen am Lymphknoten und der Synovialmembran wurde folgender Versuchsablauf etabliert:

1. Schritt:

Nach einer Zeit von mindestens 12 Stunden wurden die Schnitte aus dem 38°C warmen Wärmofen entnommen und nach Antikörpern sortiert

2.Schritt: Entparaffinierung

Die Schnitte wurden in Xylol (3 x 2min) eingestellt, um das Paraffin auszuwaschen und über eine absteigende Alkoholreihe (100 % Alkohol: 2 x 2 min; 96 % Alkohol: 2 x 2 min; 70 % Alkohol 2 x 2min) und Aqua dest. (1 x 2min) wieder rehydriert.

3.Schritt: Blockade der endogenen Peroxidase

Peroxidase und peroxidase-ähnliche Enzyme sind in vielen normalen Geweben enthalten, deshalb müssen „falsch positive“ Reaktionen durch Blockade des endogenen Enzyms verhindert werden.

Dies wird je nach Antikörper unterschiedlich erreicht.

CD3 und CD8 erhalten eine 2x5minütige Mikrowellenbehandlung(höchste Stufe). Dabei werden die Schnitte in das Mikrowellenglas mit Antigen Retrieval Citra Solution eingestellt, wobei darauf geachtet werden muß, daß die Präparate immer mit Lösung bedeckt sind. Danach müssen die Präparate mindestens 10 min abkühlen.

CD4 wiederum erhält eine 15 minütige Mikrowellenbehandlung (höchste Stufe) in einer TUF(Target Unmasking Fluid) Lösung.

Vorbehandlung der Präparate des NK Antikörpers mit 7.5% Wasserstoffperoxid (30%iges H₂O₂ der Fa. Merck verdünnt mit Aqua dest.) für 5min hemmt die endogene Peroxidase-Aktivität irreversibel.

Während dieser Zeit werden die Antikörper aus dem 4°C temperierten Kühlschrank entnommen und mit der Herstellung der in den Vorversuchen herausgefundenen Verdünnungen begonnen. Zur Verdünnung der Primärantikörper wurde ein speziell angefertigter Tris-Puffer verwendet.

Herstellung des Tris-Puffer 0,05 M pH 7.6:

6,1g Tris(Tris(hydroxymethyl-) aminomethan-Base) in 50ml Aqua dest. lösen und 37ml einer 1 N Salzsäure hinzufügen. Mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 1l auffüllen. Der pH-Wert sollte bei Raumtemperatur (25°C) gemessen 7.6+/- 0.2 betragen.

Verdünnung der Primärantikörper:

	Antikörper	:	Puffer
CD3	1 : 20		10µl : 200µl
CD8	1 : 5		20µl : 100µl
CD4	1 : 5		20µl : 100µl
NK	1 : 50		10µl : 500µl

Bevor das Immunfärbecenter mit Hilfe der Cover-Plates bestückt wird, stellt man die Präparate zuvor noch kurz in Tris-Puffer.

4.Schritt: Auftragen der Primärantikörper (100µl)

Die monoklonalen Antikörper werden als Primärantikörper in ihrer jeweiligen ausgetesteten Verdünnung auf das Gewebe aufgetragen und für 90 Minuten darauf belassen, um eine spezifische Bindung des Antikörpers mit dem Kernantigen zu ermöglichen. Für jeden Antikörper steht hierfür ein Präparat pro Patient zur Verfügung.

Nachfolgend werden die Proben für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült.

5.Schritt: Auftragen des Brückenantikörpers

Sofortige Inkubation mit dem Brückenantikörper (Biotinylierter Antikörper gegen Kaninchen- und Mausimmunglobuline in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), enthält Trägerprotein und 15 mM Natriumazid) für 20 Minuten zur spezifischen Bindung des Brückenantikörpers mit dem primären Antikörper.

Nachfolgende Spülung der Schnitte für 5 Minuten in Tris-Puffer.

6.Schritt: Auftragen der Streptavidin Peroxidase

Nun folgt die Inkubation mit Streptavidin Peroxidase (an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin in PBS. Dies enthält Trägerprotein und antimikrobielle

Agenzien, um über Verschmutzung falsch positive Ergebnisse zu vermeiden). Nach einer 20-minütigen Einwirkzeit, heftet sich das Peroxidase markierte Streptavidin an die freie Bindungsstelle des biotinylierten Brückenantikörpers an.

Darauf folgte erneut die Spülung der Proben für 5 Minuten in Tris-Puffer.

7.Schritt: Anfärbung der stattgehabten Reaktion

Es wird eine Mischung aus einem Tropfen AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Chromogen auf 2 ml Substratpuffer anfertigt. Danach werden pro Schnitt jeweils 100µl der Mischung aufgetragen und für 40 Minuten inkubiert.

Da das rosarote Farbprodukt, das unter Oxidation durch AEC gebildet wurde, alkohollöslich ist, werden Gegenfärbemittel und Eindeckreagenzien auf wässriger Basis verwendet. Außerdem wurden die Präparate vor starker Sonneneinstrahlung zur Vermeidung der Ausbleichung geschützt, da bei ACE der Oxidationsprozess weiter fortschreiten kann.

Anschließend werden die Präparate für 5 Minuten mit Tris-Puffer gewässert.

8.Schritt: Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun

Nachdem die Cover-Plates mit den Präparaten aus dem Immunfärbecenter entnommen wurden, werden die Schnitte in eine Glasschaukel eingeschichtet. Eine Gegenfärbung erfolgt nach kurzem Spülen in Aqua dest. mit Hämalaun für 3 Minuten, damit die Kerne der Zellen basophil angefärbt werden.

Anschließend werden die Präparate kurz in Aqua dest. und Ammoniakwasser geschwenkt, um danach in lauwarmes Leitungswasser eingestellt zu werden.

Als letzter Schritt folgt das luftblasenfreie Eindecken der Schnitte mit Aquadex.

Die Präparate können nun unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

3.4.3. Bewertung der Testmethode

Die Sensitivität immunhistochemischer Methoden wird von der Qualität der verwendeten Antikörper, der chemischen Struktur der antigenen Determinanten und von der Methode bestimmt. Falsch negative Reaktionen resultieren häufig aus der Modifikation antigenen Determinanten bei Fixierung und Einbettung.

Die LAB-Methode hat sich als besonders sensitives Nachweisverfahren formalin-fixierter, paraffineingebetteter Gewebe bewährt. (38, 79, 83)

3.6. Statistische Verfahren

Ziel der Studie ist es, eine möglichst große Inhomogenität zwischen den untersuchten Gruppen zu finden, um eine Aussage machen zu können über die unterschiedlichen Reaktionen von Patienten in den differenten Gruppen und deren stattgehabter intrakorporaler Exposition und Reaktion gegenüber Metallen.

Zur Objektivierung der Beurteilung der Präparate wird eine Inter- und Intraobservervarianz getestet, um eine Streuung der Beobachtung einer und der selben oder zweier verschiedener Personen zu verifizieren und zu objektivieren. Dabei wurden mehrere Präparate ausgewählt, die von verschiedene Personen und von einer Person mehrmals beurteilt wurden. Die erhaltene Inter- und Intraobservervarianz geht hierbei gegen Null.

Aufgrund der geringen Patientenzahl wird im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse auf eine beschreibende Statistik zurückgegriffen.

4. Ergebnisse

4.1. Histologische Untersuchungsbefunde

Eine histologische Beurteilung fand an HE gefärbten Präparaten statt. Histologische Befunde der Synovialmembranen, die bei TEP-Implantationen gewonnen wurden, zeigten neben planen Arthrosen oft das Bild einer aktivierten Arthrose. Histologische Kennzeichen für eine aktivierte Arthrose als auch für eine rheumatoide Arthritis sind sowohl eine Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht, wie auch zelluläre Infiltrate, die vor allem Lymphozyten, im geringen Umfang auch Monozyten, enthält.

In Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 wurden die histologische Befund der einzelnen Gruppen zusammengefasst.

4.1.1. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe A

Bei den Präparaten dieser Gruppe handelt es sich um Synovialmembranen, die noch keinen Kontakt mit Metallen gehabt hatten. Es konnte ein Metallkontakt sowohl am operierten Gelenk als auch im restlichen Körper (z.B. metallische Versorgung einer Fraktur) ausgeschlossen werden.

Eine lokale oder systemische Sensibilisierung wurde mit dem präoperativ durchgeführten Patch-Test ausgeschlossen. Es konnte infolgedessen angenommen werden, dass weder eine Sensibilisierung gegenüber inkorporierter Metalle, noch gegenüber anderweitiger Metalle (z.B. im Modeschmuck) bestand. Somit stellt Gruppe A sowohl histologisch, als auch immunhistochemisch eine Vergleichsgruppe dar. Eine Immunreaktion bei diesen Präparaten wurde nur im Sinne einer entzündlichen Reaktion aufgrund der Arthrose gewertet.

Eine Hyperplasie der Deckzellschicht findet sich bei allen Präparaten bis auf eines. Von 13 Präparaten zeigten 7 Präparate zusätzlich eine folliculäre Lymphozytenansammlung verschiedenster Ausprägung, teils mit Plasmazellen, teils mit einer Hyperämie der Kapillaren in der Umgebung. In 4 der 13 Präparate wurde Knochen- und/oder Knorpelabrieb, als Zeichen der Arthrose gefunden.

Diese verschiedenen histologischen Befunde wurden im Sinne der verschiedenen Stadien der Arthrose gewertet, die von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Synovialitis begleitet wird. Zusätzlich fand eine Vermehrung von kollagenfaserreichem Bindegewebe im Sinne einer Fibrose statt.

Tabelle 1: Klinische Angaben und histologische Befunde der Synovialmembran der Patienten aus Gruppe A, die sich einer Primärimplantation unterzogen haben.

Patientennummer	Klinische Diagnose	Alter(Jahre)/Geschlecht	Hyperplasie der Synovialis	Besonderheiten /Abrieb Knochen/ Knorpel/Metall	T-Lymphozytenansammlung
20404/98	Destruierende Coxarthrose	65/w			Keine
22788/98	Coxarthrose	84/m	Keine Hyperplasie	-	Keine
22584/98	Dysplasie-coxarthrose	81/m	Leichte Hyperplasie	-	Keine
22178/98	Coxarthrose	68/w	Leichte Hyperplasie	Wenig Knorpel-/Knochenabrieb	Wenig
22177/98	Valgus-gonarthrose	78/w	Leichte Hyperplasie	-	Viel
22034/98	Coxarthrose	71/m	Leichte Hyperplasie	-	Keine
21997/98	Coxarthrose	85/w	Leichte Hyperplasie	-	Keine
21996/98	Varus-gonarthrose	66/m	Leichte Hyperplasie	-	Keine
21647/98	Coxarthrose	75/w	Leichte Hyperplasie	Wenig Knochenabrieb	Wenig
25118/98	Varus-gonarthrose	73/w	Starke Hyperplasie	Wenig Knochenabrieb	Massenhaft
24522/98	Coxarthrose	73/m	Leichte Hyperplasie	-	Wenig
24130/98	Coxarthrose	66/w	Leichte Hyperplasie	-	Massenhaft
26363/98	Dysplasie-coxarthrose	60/w	Starke Hyperplasie	Wenig Knorpel-/Knochenabrieb	viel

Tabelle 2: Klinische Angaben und histologische Befunde der Synovialmembran der Patienten aus Gruppe B, die auf einer Seite bereits endoprothetisch versorgt sind und auf der Gegenseite einen endoprothetische Ersatz erhalten haben

Patientennummer	Klinische Diagnose	Alter(Jahre)/ Geschlecht	Hyperplasie der Synovialis	Besonderheiten/ Abrieb Knochen/ Knorpel/Metall	T-Lymphozyten- ansammlung
21050/98	Varus- gonarthrose	77/w	Starke Hyperplasie	-	Wenig
26417/98	Pangon- arthrose	77/w	Starke Hyperplasie	Reichlich Knochenabrieb	Massenhaft
25289/98	Gonarthrose	84/m	Leichte Hyperplasie	Wenig Knorpel- /Knochenabrieb	Wenig
24521/98	Coxarthrose	59/m	Leichte Hyperplasie	Reichlich Knorpel- /Knochenabrieb	Wenig
24028/98	Pangon- arthrose	70/w	Leichte Hyperplasie	Calciumpyro- phosphat- ablagerungen	Keine
23690/98	Varus- gonarthrose	60/m	Leichte Hyperplasie	-	Viel bis massenhaft
22032/98	Coxarthrose	79/w	Keine Hyperplasie	-	Keine
21098/98	Varus- gonarthrose	80/w	Keine Hyperplasie	Calciumpyro- phosphat- ablagerungen	Keine
23689/98	Coxarthrose	62/m	Keine Hyperplasie	-	Keine

Tabelle3: Klinische Angaben und histologische Befunde der Synovialmembran der Patienten aus Gruppe C, die sich einer Wechseloperation unterzogen haben

Patientennummer	Klinische Diagnose	Alter(Jahre)/Geschlecht	Hyperplasie der Synovialis	Besonderheiten/ Abrieb Knochen/ Knorpel/Metall	T-Lymphozytenansammlung
25865/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	65/w	Keine Hyperplasie	Knochensplitter	Keine
28637/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	84/w	Keine Hyperplasie	-	Keine
23954/98	Aseptische Hüft-pfannen Lockerung	72/m	Keine Hyperplasie	Weinig Knochenabrieb	Keine
30069/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung rezidivierend Hüftgelenksluxationen	79/w	Keine Hyperplasie	Geringe Siderinablagerungen	Keine
20575/98	Aseptische Mecring-Lockerung	77/m	Keine Hyperplasie	Reichlich Metallabrieb	Keine
23448/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	78/w	Keine Hyperplasie	Metall-/Plastikabrieb	Keine
22294/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	51/m	Keine Hyperplasie	-	Keine
21688/98	Aseptische Lockerung des Tibiaplateaus	73/w	Keine Hyperplasie	Reichlich Knochenzementabrieb	Keine
21646/98	Aseptische Mecring-Lockerung	87/w	Keine Hyperplasie	Schwarzes Fremdmaterial	Keine
21451/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	76/m	Keine Hyperplasie	Knorpel-/Knochen-anteile	Keine
20949/98	Aseptische Hüft-TEP Lockerung	74/w	Keine Hyperplasie	Schwarzes Fremdmaterial	Keine
20700/98	Aseptische Mecring-Lockerung	75/m	Keine Hyperplasie	Metall-/Plastikabrieb	Keine

4.1.2. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe B

Bei dieser Gruppe wäre aufgrund des auf der Gegenseite erfolgten endoprothetischen Ersatzes eine vorangegangene systemische Sensibilisierung gegenüber Metallen der verwendeten Prothese und damit der Synovialmembran möglich. Der präoperativ durchgeführte Patch-Test war bei allen Patienten dieser Gruppe negativ. Unter der Annahme, dass ein positiver Patch-Test eine „innere“ Allergie nachweist, wurde davon ausgegangen, dass es primär zu keiner systemischen Sensibilisierung bei den Patienten in dieser Gruppe kam.

Unter den beurteilten Präparaten zeigten 6 der 9 Präparate eine Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht, wie repräsentativ in Bild 1 zu erkennen. Hier ist zusätzlich eine villöse Auffaltung der Synovialmembran zu erkennen. In 5 der 9 histologischen Schnitte fanden sich bei dieser Gruppe folliculäre Lymphozytenansammlungen, zum Teil mit Makrophagen in der Umgebung. Bei 2 Präparaten fanden sich Calciumpyrophosphatablagerungen (morphologisches Korrelat der Pseudogicht), in 4 weiteren Knorpel- und/oder Knochenabrieb. Wie bei Gruppe A zeigten sich unterschiedliche histologische Befunde in dieser Gruppe im Bezug auf die unterschiedlichen Stadien der Arthrose und deren begleitenden Reaktionen.

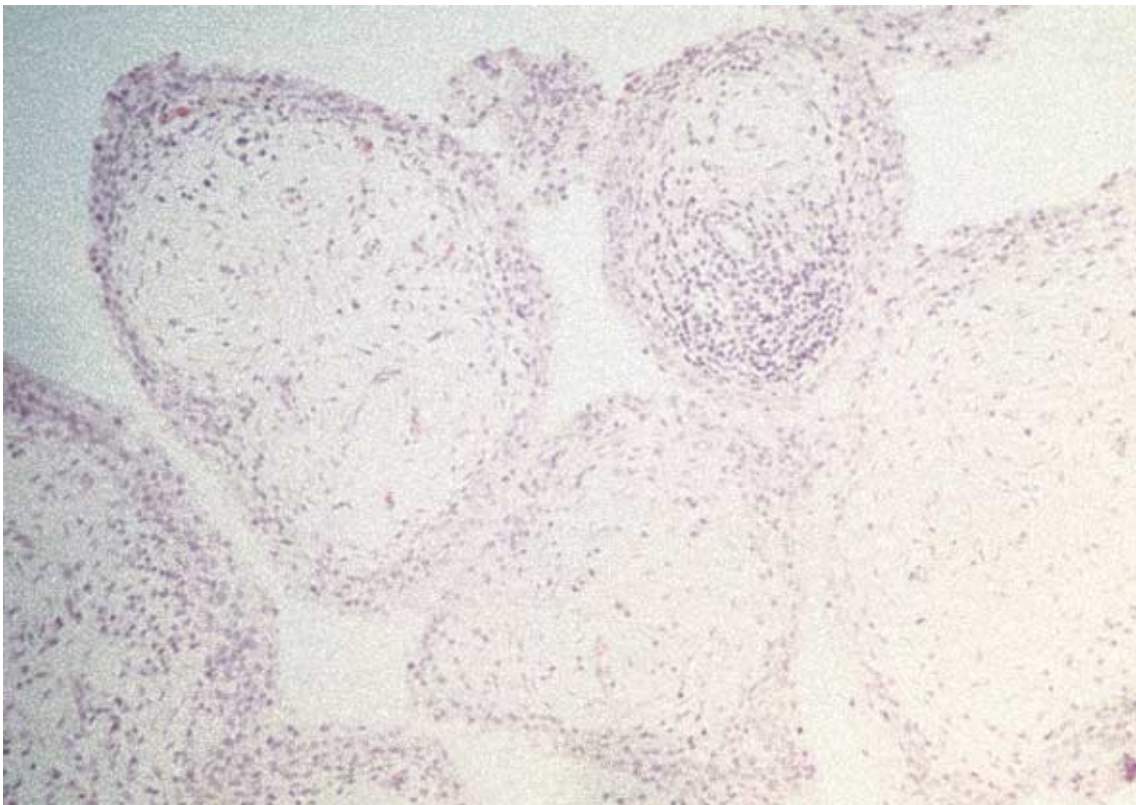


Bild 1 : HE Präparat eines Patienten aus Gruppe B bei 400 facher Vergrößerung

4.1.3. Beschreibung der histologischen Befunde der Gruppe C

Da es sich bei dieser Gruppe um endoprothetische Wechseloperationen handelte, hatte die Synovialmembran bereits direkt und indirekt Kontakt mit Metallen, in Form von Abrieb und gelösten Ionen in der Gelenkflüssigkeit gehabt.

Da der epikutane Patch-Test jeweils negativ ausfiel, spricht dies gegen eine systemische Sensibilisierung. Eine lokale immunologische Reaktion wurde somit nicht erwartet. Da es über derartige Reaktionen keine vergleichende Literatur gibt, konnte eine T-Zellinfiltration nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Nachdem die ursprüngliche Synovialis bei der Primärimplantation meist zum größten Teil entfernt wird handelte es sich bei der zu untersuchenden Gelenkkapsel um eine sogenannte Pseudo- oder Neosynovialis. Eine Hyperplasie der Neosynovialis konnte in keinem der 12 Präparate gefunden werden. Es zeigte sich bei keinem der 12 Pseudomembranen eine Lymphozytenansammlung. Der Zellgehalt war meist gering, darunter waren vor allem Fibroblasten und Makrophagen. Von den 12 Synovialmembranen zeigten 4 Präparate Knorpel- und Knochenabrieb, bei weiteren 4 Präparaten waren Metall- und Polyethylenabrieb nachweisbar. (Bild 2) Bei 4 der 12 Neomembranen zeigte sich eine durch eine Ansammlung von Fremdkörperriesenzellen gekennzeichnete Fremdkörperreaktion. Zusätzlich zeigte sich bei allen Präparaten eine Fibrose.

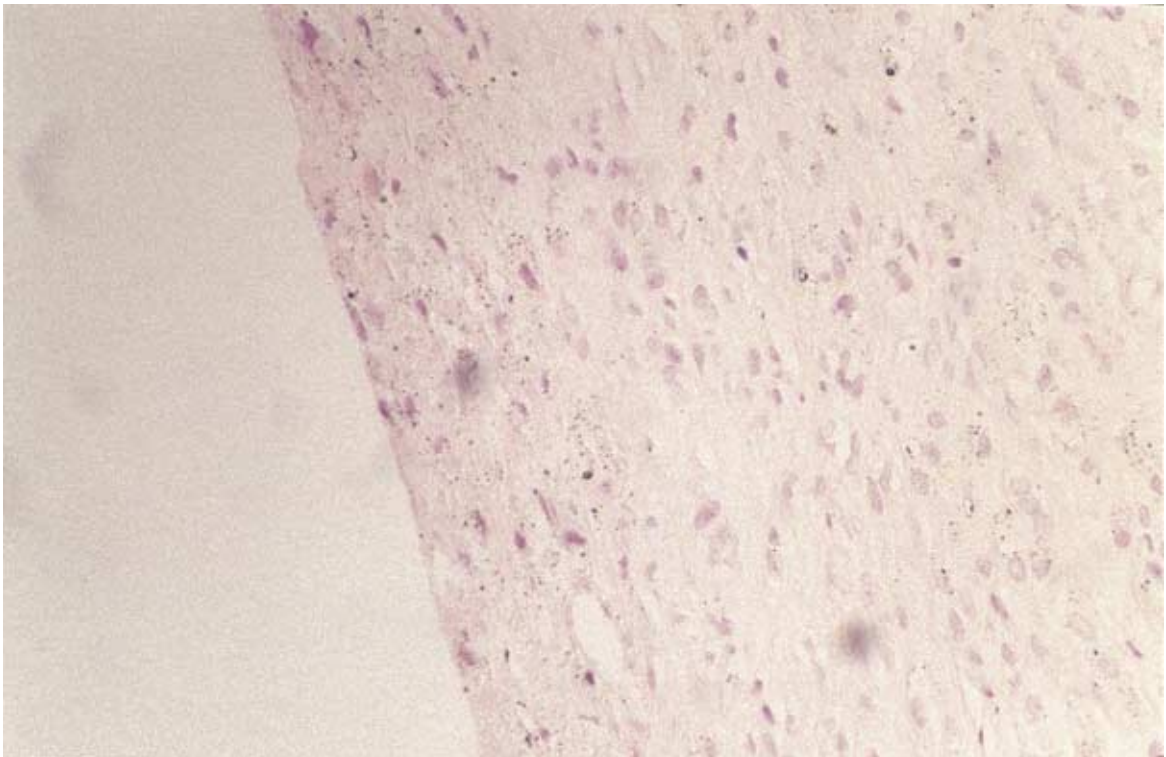


Bild 2 : HE Präparat eines Patienten aus Gruppe C bei 400 facher Vergrößerung

4.1.4. Beschreibung des histologischen Befundes eines Patienten mit Nickelallergie

Eine nachweisliche systemische Sensibilisierung auf Nickel konnte aufgrund eines positiven Epikutantest, der präoperativ beim Dermatologen durchgeführt wurde und im Allergieausweis dokumentiert wurde angenommen werden. Da die Expositionszeit auf die Metalllegierung nach dem primären endoprothetischen Ersatz zur lokalen Reaktion einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ mit 7 Tagen ausreichend war, hätte man an der Synovialmembran eine zur Kontaktallergie vergleichbare Reaktion finden müssen, da ein identischer Pathomechanismus postuliert wurde. Histologisch zeigte die Synovialmembran einen geringen Zellgehalt, wobei vor allem Fibroblasten zu sehen waren. Vereinzelt fanden sich auch Ansammlungen von neutophilen Granulozyten und Erythrozyten, die wohl Folge der Serombildung waren und die daraus resultierende Einblutung. Vergleiche hierzu Bild 3.

Es kam zu keiner Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht. Reichlich kollagenes Bindegewebe, mit vernarbendem Granulationsgewebe zeigte sich neben Fibrin und spärlichem Knochenabrieb im untersuchten Präparat. Klinische Angaben siehe Anhang.

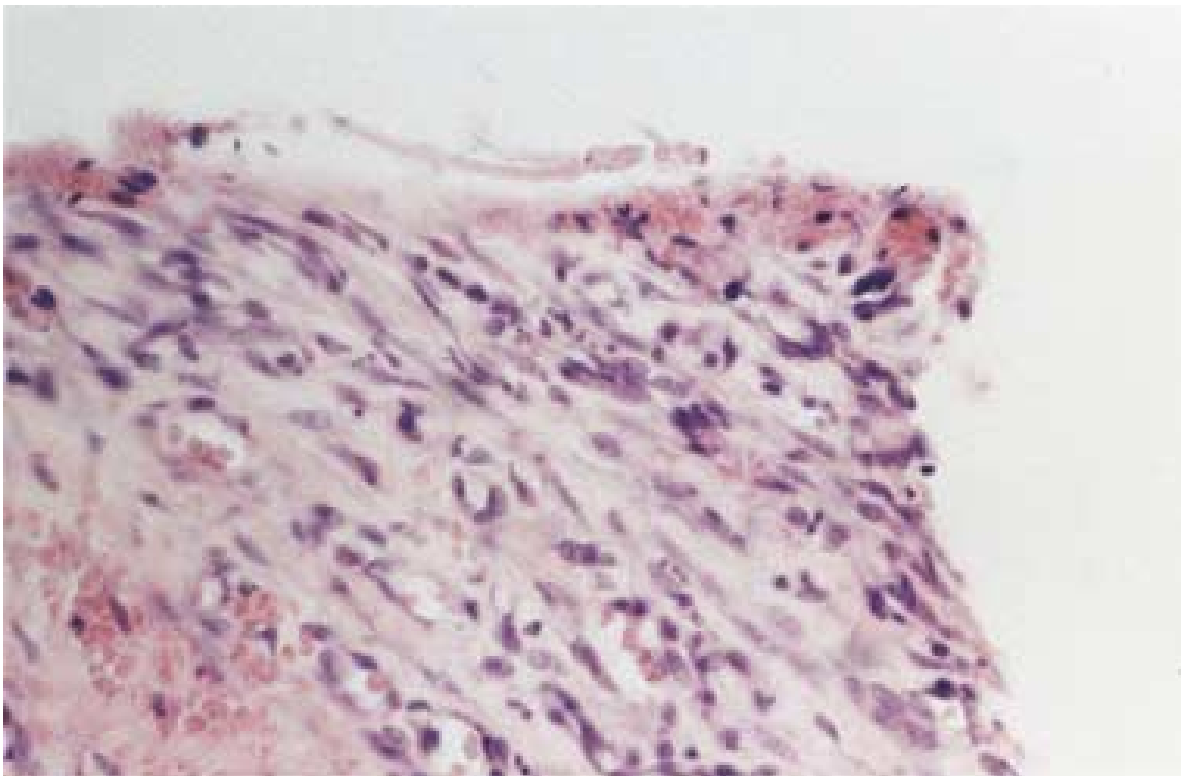


Bild 3 : HE Präparat des Allergiepatienten bei 400 facher Vergrößerung

4.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Beurteilung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden die antikörperpositiven Follikel semiquantitativ erfasst. Das bedeutet, daß in den Präparaten, in denen mehr als 3 oder genau 3 antikörperpositive Follikel zu finden war als „viel“ beurteilt wurde. Dagegen wurden Präparate mit weniger als 3 Lymphfollikeln als „wenig“ beurteilt. Zusätzlich bestimmte man die Gesamtzahl positiver Zellen die in 20 Blickfeldern bei 400facher Vergrößerung entlang der Synovialmembran zu finden waren.

Hierbei wurde darauf geachtet, daß nur Zellen außerhalb der Follikel bei der Zählung berücksichtigt wurden.

4.2.1. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD3 Antikörper

Von den insgesamt 35 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, zeigte ein Patient in Gruppe A und zwei Patienten in Gruppe B wenig Follikel mit CD3 Zellen im jeweiligen Präparat. Viele Follikel mit CD3 Zellen fanden sich bei 4 Patienten der Gruppe A und 2 Patienten der Gruppe B (vgl. Abbildung 6 und Bild 4)

Auffallend war in Gruppe C das völlige Fehlen von CD3 Zellen in den Lymphfollikeln. Entlang der synovialen Deckzellschicht fanden sich 2 Patienten die maximal eine Anzahl von 2 positiven Zellen in 20 Blickfeldern zeigten. (vgl. Bild 5) Vergleiche hierzu Abbildung 6 und Abbildung 7.

Bei Beurteilung der Synovialmembran des Patienten mit nachgewiesener Nickelallergie, wurde eine Gesamtzahl von 10 CD3 Zellen gefunden . Follikeln entlang der Synovialmembran stellten sich nicht dar.

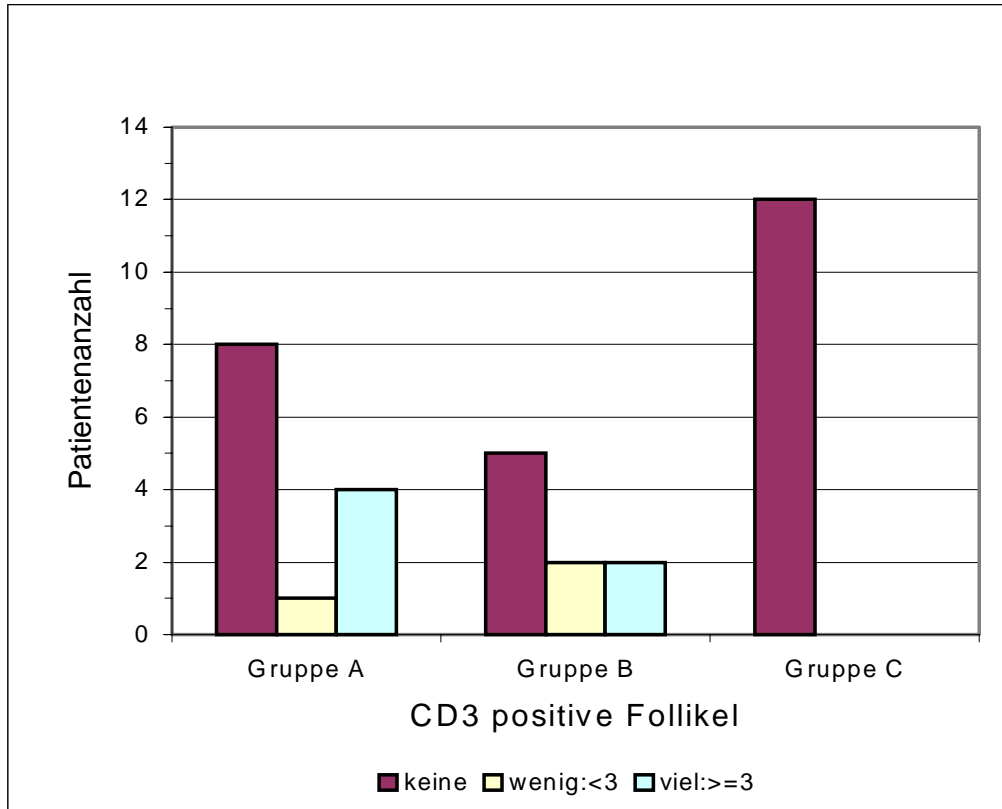


Abbildung 6 : Semiquantitative Beurteilung der CD3 positiven Follikel entlang der Synovialmembran. Vergleichende Darstellung der verschiedenen Gruppen

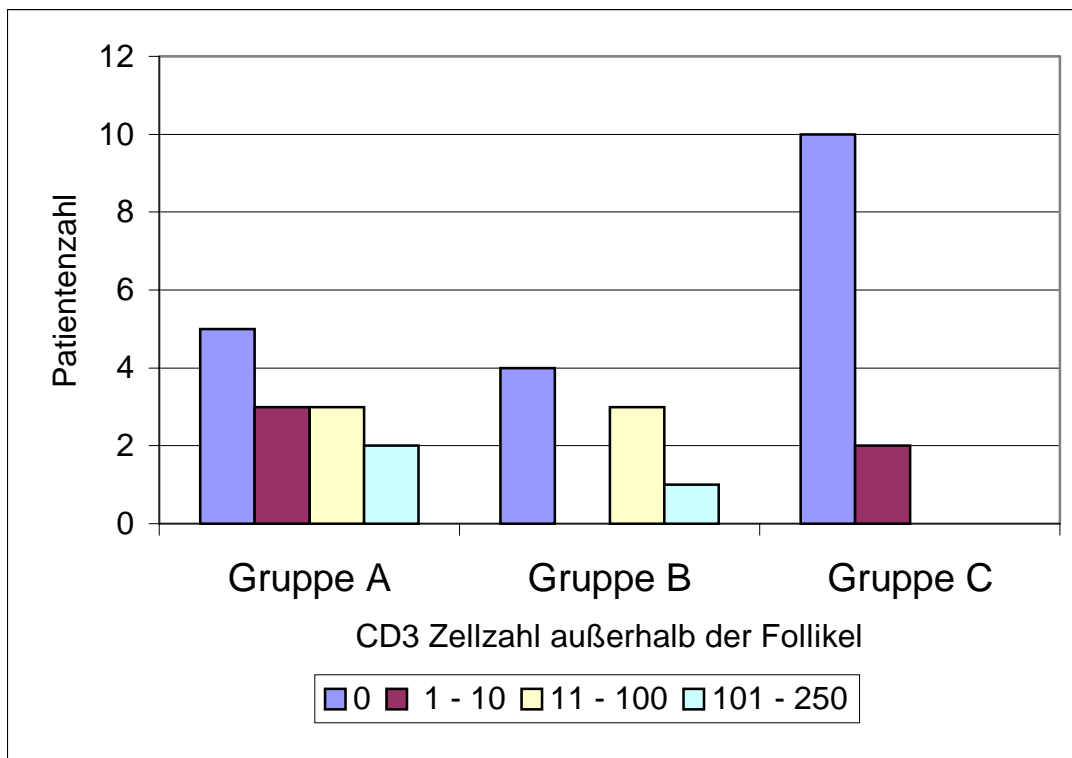


Abbildung 7 : Anzahl der CD3 positiven Zellen außerhalb der Follikel in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran

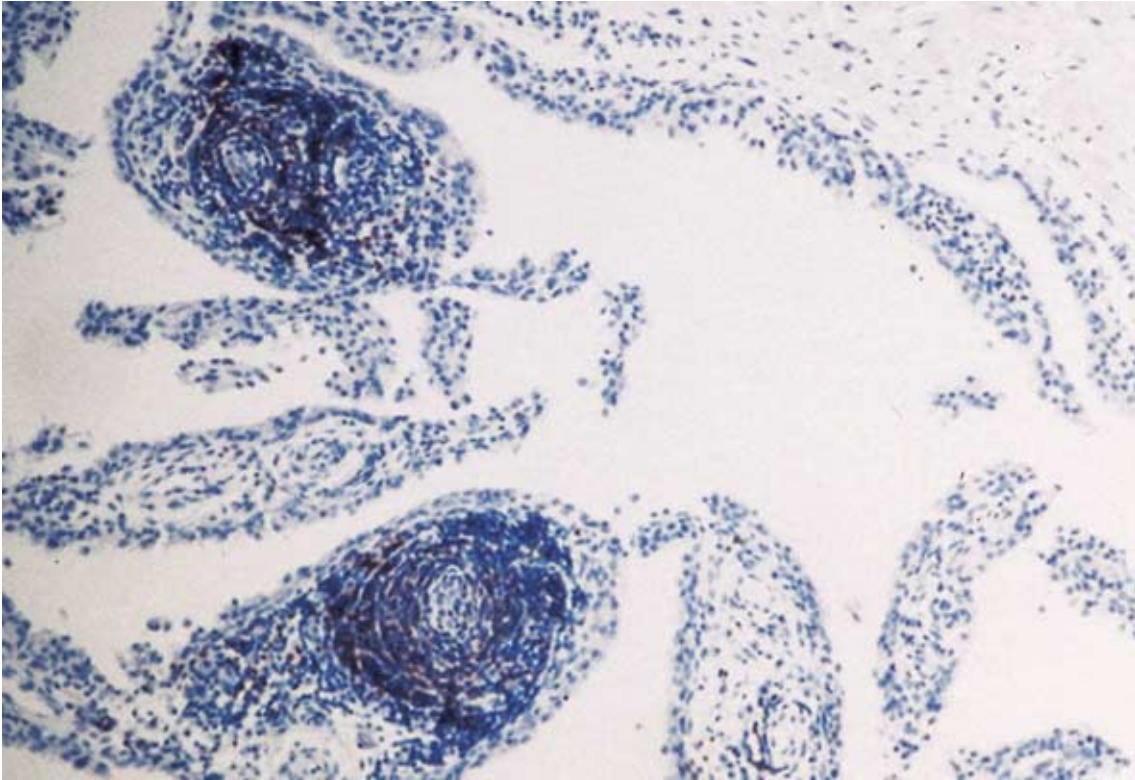


Bild 4 : CD3 positive Follikel eines Patienten aus Gruppe B bei 400 facher Vergrößerung

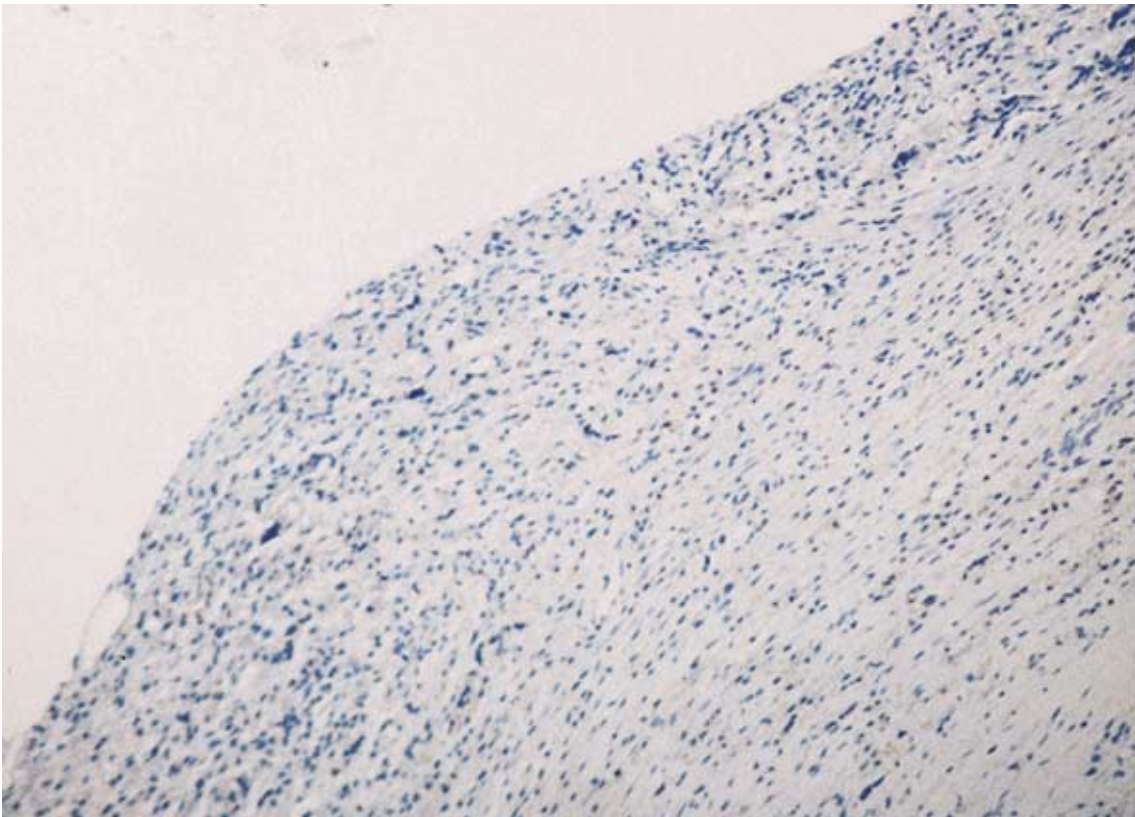


Bild 5 : Synovialmembran eines Patienten aus Gruppe C bei 400 facher Vergrößerung nach CD3-Antikörperfärbung

4.2.2. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD4 Antikörpers

In Gruppe A wurden 2 Patienten mit viel und 2 Patienten mit wenig CD4 Antikörper positiven Lymphfollikeln entlang der Synovialis gefunden. Die restlichen 9 Präparate dieser Gruppe zeigen keine CD4 positiven Follikel.

Betrachtet man Gruppe B, so erhält man von 9 Präparaten eines mit vielen positiven Lymphfollikeln und zwei mit wenig.

In Gruppe C waren bei der Färbung von CD4 – wie zuvor mit CD3 - keine positiven Zellen zu finden. Auch entlang der Synovialmembran konnte in keinem der 20 Blickfelder eine auf CD4 Antikörper gefärbte Zelle gefunden werden. Vergleiche hierzu Abbildung 8 und Abbildung 9 .

Im Falle des Patienten mit Nickelallergie zeigten sich keine positiven CD4 Zellen im Präparat.

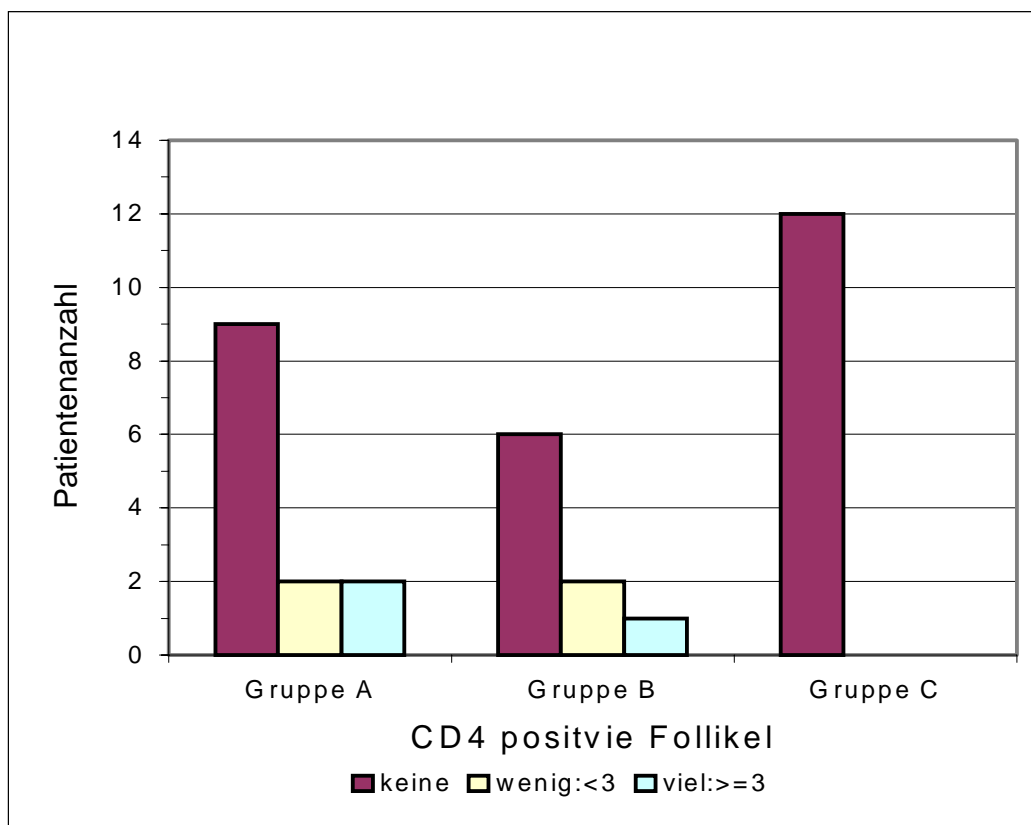


Abbildung 8 Semiquantitative Beurteilung der CD4 positiven Follikel. Vergleichende Darstellung der verschiedenen Gruppen

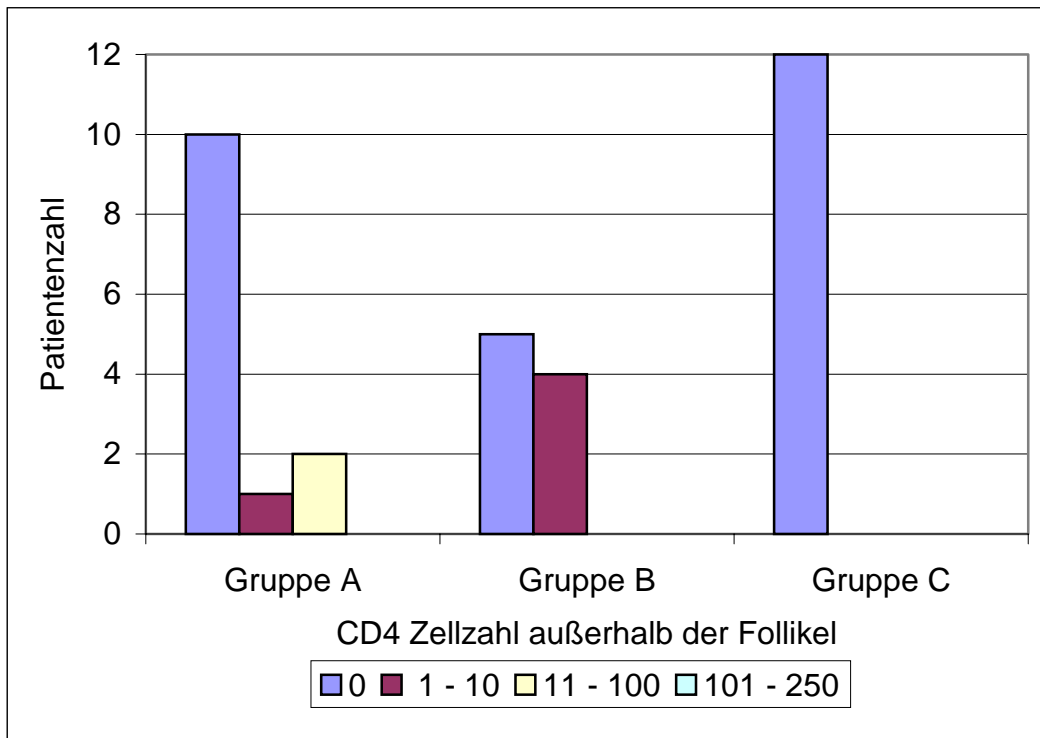


Abbildung 9 : Anzahl der CD4 positiven Zellen außerhalb der Follikel in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran

4.2.3. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des CD8 Antikörpers

Bei der semiquantitativen Beurteilung der folliculären Lymphozytenansammlungen und der freien Zellen entlang der Synovialmembran wurden in Gruppe A bei 3 von 13 Patienten wenig CD8 positive Follikel nachgewiesen. Ein Patient dieser Gruppe zeigte in seinem Präparat viele CD8 positive Follikel.

Bei 2 der 9 Patienten in Gruppe B wurden wenig, bei weiteren 2 viele Lymphfollikel entlang der Synovialis gefunden. CD8 Zellen waren in Gruppe C entlang der synovialen Deckzellschicht bei 4 Patienten zu finden. Die Zellanzahl in 20 ausgezählten Blickfeldern betrug maximal 6.(vgl. Abbildung 11) Es konnten jedoch auch hier keine CD8 positiven Follikel nachgewiesen werden. Vergleiche hierzu auch Abbildung 10.

Bei der Beurteilung des CD8 Antikörpers des Patienten mit Nickelallergie konnten keine CD8 Zellen im immunhistochemischen Präparat gefunden werden.

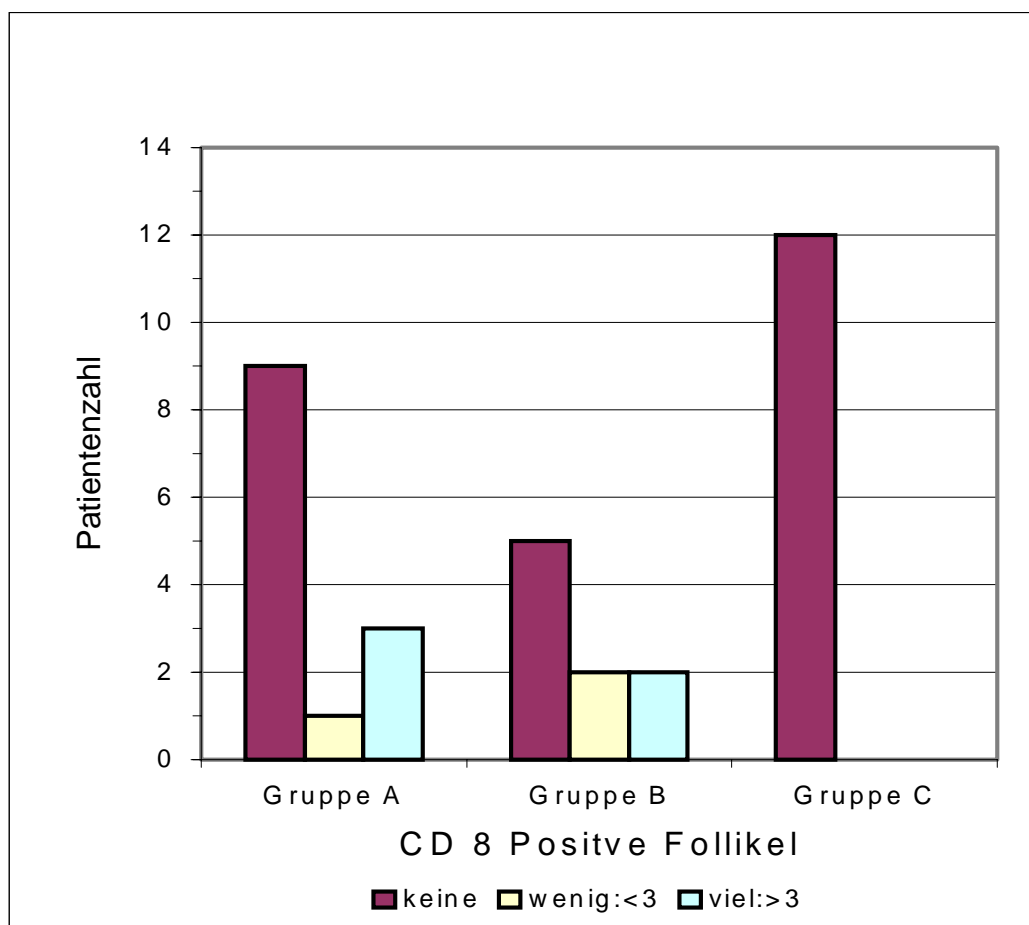


Abbildung 10: Semiquantitative Beurteilung der CD8 positiven Follikel
Vergleichende Darstellung der verschiedenen Gruppen

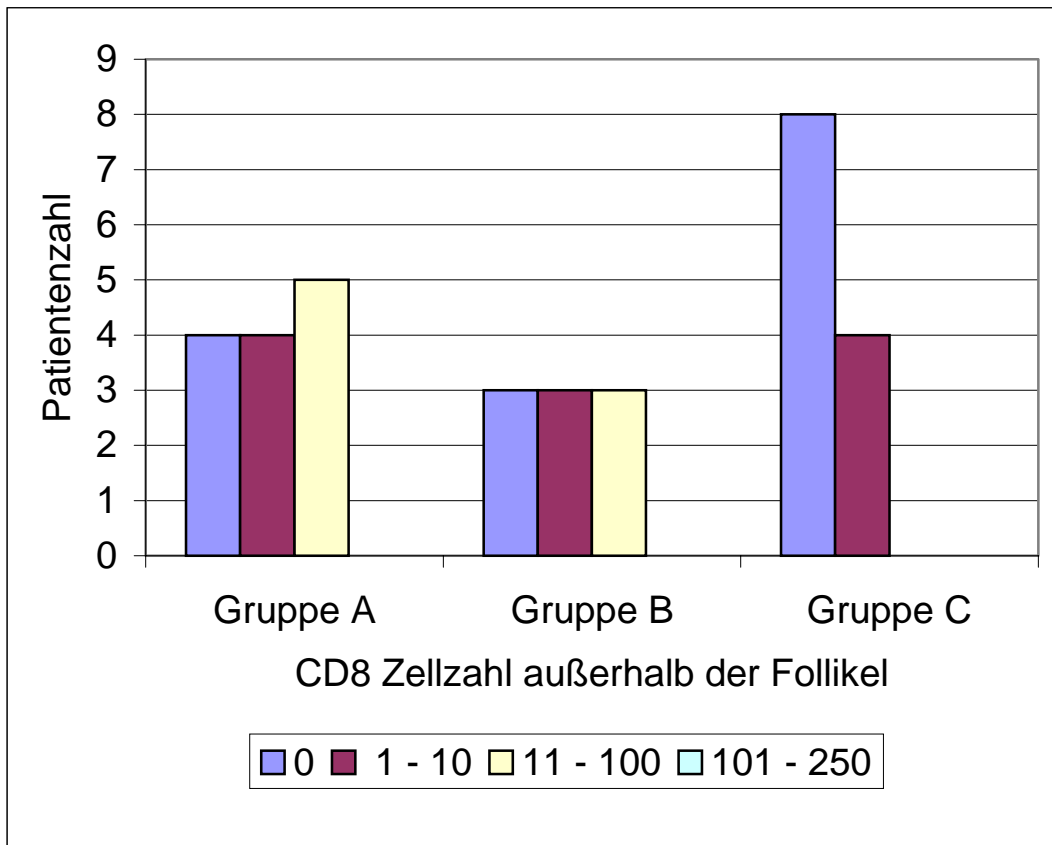


Abbildung 11 : Anzahl der CD8 positiven Zellen außerhalb der Follikel in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran

4.2.4. Immunhistochemische Untersuchungsbefunde des NK Antikörpers

Bei allen Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, zeigte sich in keinem Präparat eine folliculäre Ansammlung von NK Zellen (Bild 6). Vergleiche hierzu Abbildung 12.

Die NK Zellen finden sich vor allem entlang der synovialen Deckzellschicht. In Gruppe A fanden sich 3 Patienten, die NK Zellen in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran zeigten. Bei 3 der 9 Patienten in Gruppe B konnten NK Zellen entlang der Synovialmembran gefunden werden, wobei die Anzahl der NK Zellen zwischen 3 und 47 schwankte. In Gruppe C fanden sich bei 5 der 12 Patienten NK Zellen entlang der synovialen Deckzellschicht. Die Gesamtzahl der NK Zellen pro Patient war jedoch sehr gering. Vergleiche hierzu Abbildung 13.

Bei dem Patienten mit der nachgewiesenen Nickelallergie fanden sich keine Lymphfollikelansammlungen entlang der Synovialis. Es fanden sich insgesamt 6 NK Zellen in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran.

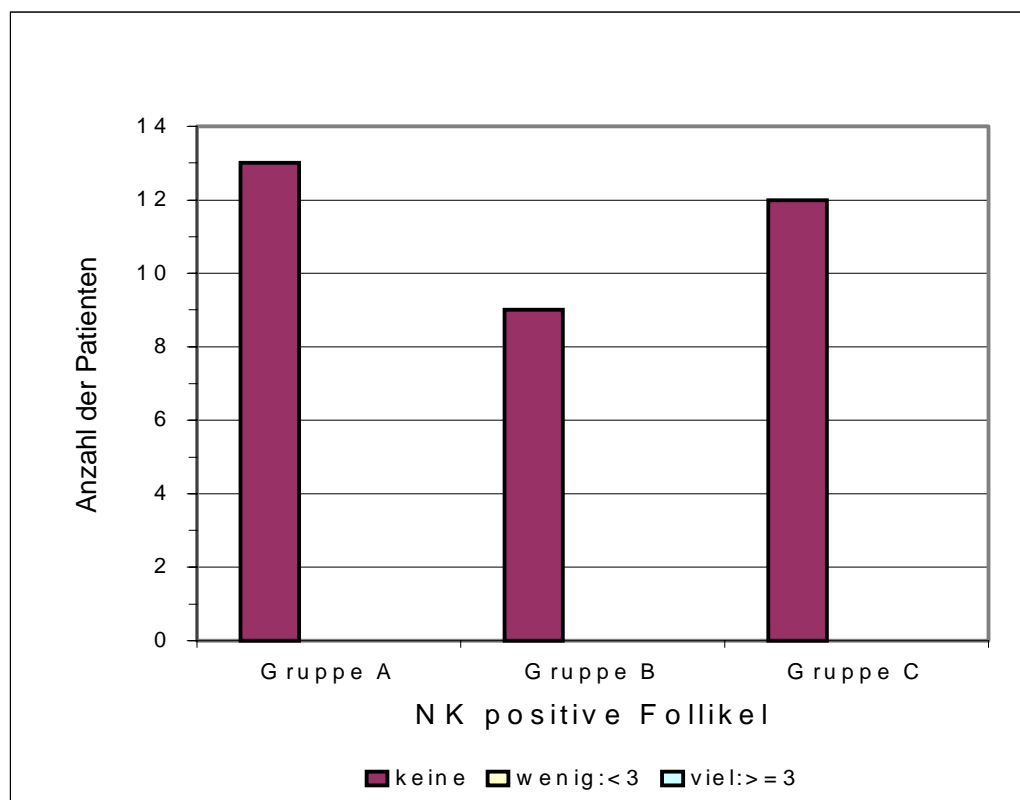


Abbildung 12: Semiquantitative Beurteilung der NK positiven Follikel
Vergleichende Darstellung der verschiedenen Gruppen

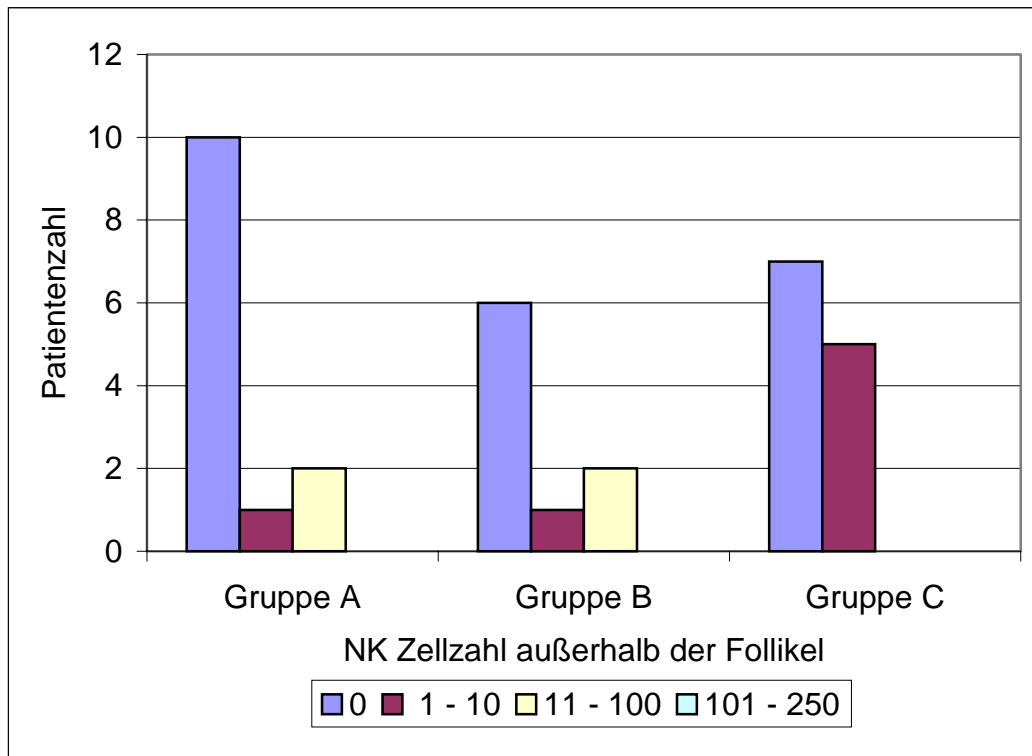


Abbildung 13 : Anzahl der NK positiven Zellen außerhalb der Follikel in 20 Blickfeldern entlang der Synovialmembran

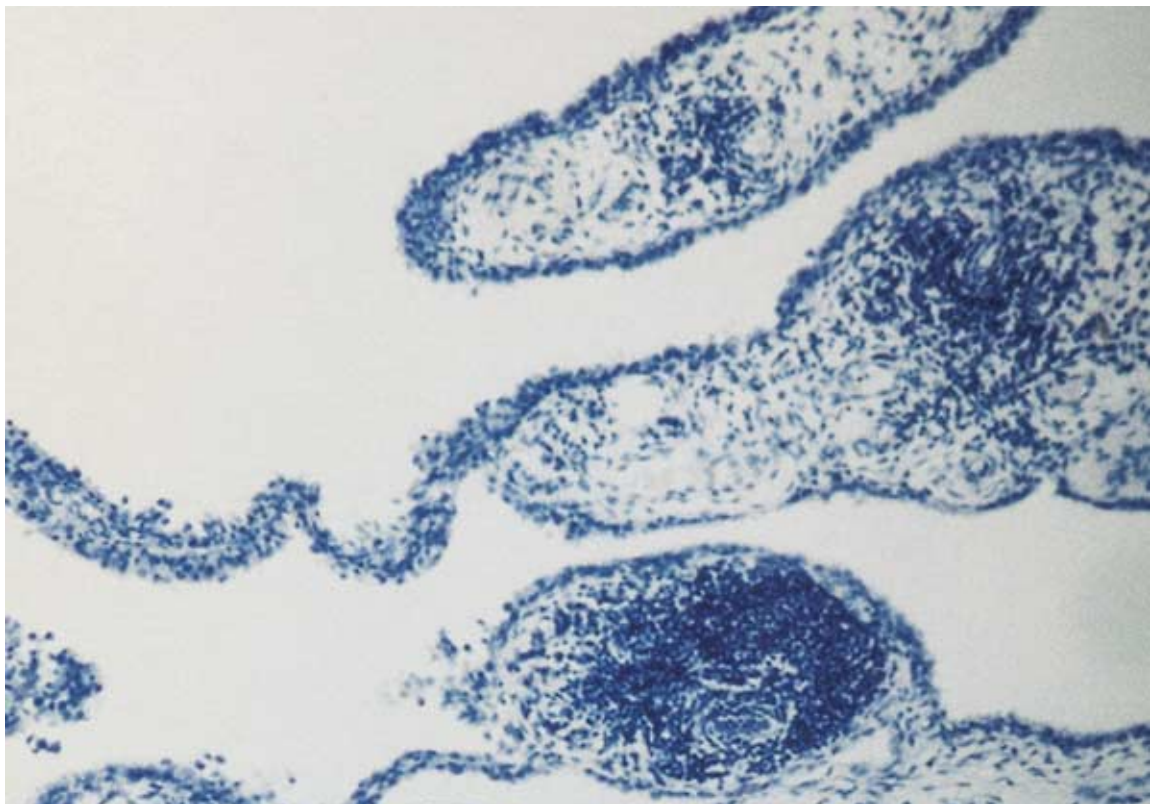


Bild 6 : Synovialmembran eines Patienten aus Gruppe B bei 400 facher Vergrößerung nach Behandlung mit Antikörper zur Darstellung Natural Killer Cells

5. Diskussion

In Deutschland und in der Schweiz, nicht jedoch in den angloamerikanischen Ländern (26) und in Skandinavien (19), erhalten Patienten mit einer Metallallergie meist eine Titanendoprothese. Dies geschieht nicht wegen der besseren Standzeit von Titanendoprothesen, sondern weil Titan gegenüber Reaktionen im Körper inert sei und eine Titanallergie extrem selten ist (16, 35).

Alle bis heute unternommenen Studien auf diesem Gebiet konnten aufgrund ihrer kontroversen und nicht eindeutigen Ergebnisse noch keinen definitiven Zusammenhang zwischen Prothesenlockerung oder dermatologischen Komplikationen und einer „inneren Allergie“ auf Prothesen beweisen (61).

Unter „innerer Allergie“ ist in diesem Zusammenhang eine zelluläre Reaktion, im Sinne einer T-Zellinfiltration an der Synovialmembran auf inkorporierte Metallimplantate zu verstehen. Der Pathomechanismus der Kontaktdermatitis wird hierbei postuliert.

Die meisten Studien, die sich mit Allergien auf Endoprothesen bzw. Metalle zur internen Fixierung beschäftigten, versuchten einen Zusammenhang zwischen epikutaner Patch-Testung und Endoprothesenlockerung festzustellen. Als allergieauslösende Metalle werden neben Nickel auch Chrom und Kobalt verantwortlich gemacht (18, 30, 32, 64, 69, 72, 73).

Einige Autoren propagieren komplexe immunologische Prozesse, wie z.B. T-Zellinfiltration und in diesem Zusammenhang eine vermehrte Cytokinproduktion als Auslöser für eine aseptische Endoprothesenlockerungen (42, 46, 68, 98, 103).

In Untersuchungen zeigte sich eine Freisetzung von Metall aus Implantaten ins Gewebe, und damit die grundsätzliche Voraussetzung sowohl für eine lokale als auch für eine systemische Reaktion auf Metallimplantate (73). Bedeutend scheint die Fähigkeit einiger Metalle als Ionen Bindungen mit körpereigenen Proteinen einzugehen. Diese Bildung eines Haptens ist notwendig, um eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell hervorzurufen (72, 91).

Weiterhin deutet der Nachweis von T-Zellen, die spezifisch auf Nickel, Gold und Titan reagieren, darauf hin, dass metallische Komponenten zur T-Lymphozytenstimulation an der Synovialmembran befähigt sind (64, 84, 103).

Keine der durchgeführten Studien hat bis dato versucht, einen Zusammenhang zwischen einer epikutan durchgeführten Allergentestung auf verschiedene Metalle und einer T-

Zellinfiltration an der Synovialmembran zu untersuchen. Eine vermehrte T-Zellinfiltration wäre das mögliche Korrelat einer eventuellen „inneren Allergie“ in Korrelation zur Kontaktdermatitis.

5.1. Methoden

Die vorliegende Arbeit soll die Möglichkeit einer „inneren Allergie“ nach endoprothetischem Ersatz mit Hilfe eines epikutan aufgetragenen Patch-Testes und einer immunhistochemischen Bestimmung von T-Lymphozyten an der Synovialis untersuchen. Ein solches Vorgehen ist als kritisch zu werten, da manche Autoren anzweifeln, ob der Patch-Test das Mittel der Wahl zur Erkennung einer „inneren Allergie“ ist (33, 72, 88).

Neben falsch negativen Ergebnissen ist der Patch-Test für den Patienten bei richtiger Handhabung auch unbequem (8, 29,44,70). Vorteilhaft ist dagegen die leichte Testdurchführung selbst (5).

Als ein weiteres Verfahren neben der Patch-Testung findet der Lymphozytentransformationstest, als Immuntestung in vitro, Verwendung. Dieser Test liefert jedoch sehr variable Ergebnisse. Der hohe labortechnische Aufwand, ermöglicht keine routinemäßige Anwendung (28). Vorteil könnte jedoch eine höhere Sensitivität gegenüber einer eventuellen „inneren Allergie“ sein (24, 33).

In neueren Ansätzen wurde versucht, den Nachweis von antigenspezifischen Lymphokinen, wie z.B. blastogenic factor (BF) und migration inhibition factor (LIF) zu nutzen, welche bei der Vermittlung einer zellgebundenen Immunreaktion eine Rolle spielen (46, 72).

Die geeignete Entnahmestelle der Gewebeprobe bei endoprothetischen Wechselloperationen wird unterschiedlich beurteilt. Verschiedene Studien sehen als wichtigste Gewebeentnahmestelle das Knochen-Implantat-Interface, welches dem Implantat am nächsten liegt und damit den höchsten Anteil an Metallabrieb bei zementfreier Implantation beinhaltet. An dem Knochen-Implantat-Interface findet die eigentliche Lockerung statt und wird deshalb von einigen Autoren als Entnahmestelle favorisiert (40, 103, 104). Bei der Implantatlockerung in unserem Patientengut (Gruppe C) handelt es sich um eine aseptische Lockerung im Rahmen der sogenannten Polyethylenkrankheit.

In unserer Studie wurde jedoch die am nächsten zum Metallhals der Hüftprothese gelegene Synovialmembran bzw. Pseudosynovialmembran entnommen. Dies hat zum einen den

Grund, dass dort, wie auch an der Knochen-Implantat-Interface, HLA-DR positive Zellen zur Vermittlung zellgebundener Reaktionen gefunden wurden. Der hauptsächliche Grund für die gewählte Entnahmestelle war, dass die Gewebstücke vergleichbar zwischen den verschiedenen Patientengruppen sein sollten und Immunkompetenz zu erwarten ist (10, 39, 57, 58).

Die Entnahme der Synovialis am lateralen Tibiarand bei Knieprothesen, stellt den bestmöglichen Ort dar, da es sich hier um die dem Implantat am nächsten gelegene Stelle handelt.

Zur Vermeidung der Überlagerung von T-Lymphozytenansammlungen an der Synovialmembran wurden Patienten mit rheumatoider Arthritis nicht mit in die Studie aufgenommen, da erkrankungsspezifisch eine erhöhte T-Lymphozyteninfiltration an der Synovialis vorliegt (48, 60). Weitere Einflussmöglichkeiten auf die T-Lymphozytenansammlung, wie Infekte und andere Immunsuppressiva, wurden durch die Selektionskriterien ausgeschlossen.

5.2.Patch-Testung und Endoprothetik

Um einen Zusammenhang zwischen Allergie, Allergieentwicklung und Endoprothesenlockerung zu untersuchen, wurde der Patch-Test herangezogen.

In der hier unternommen Studie konnte kein Zusammenhang zwischen aseptischer Lockerung und einer Reaktion, die einer Kontaktallergie entspricht, gefunden werden. Bei 12 Patienten mit aseptischer Lockerung zeigte sich keine Reaktion auf den epikutan aufgetragenen Patch-Test.

Dies steht v.a. im Widerspruch mit der Studie von Evans et al., welche seit Jahren zitiert wird, wenn es um die Möglichkeit einer Metallallergie nach endoprothetischem Ersatz geht (32). In dieser Studie wurde bei 14 Patienten, die eine aseptische Prothesenlockerung aufwiesen, ein epikutaner Patch-Test durchgeführt. Von diesen 14 Patienten reagierten 9 Patienten mit einem positiven Patch-Test. Bei 24 Patienten mit intakten Prothesen wurde dagegen keine allergische Hautreaktion gefunden. Histologische Untersuchungen zeigten Knochennekrosen und Gefäßobliterationen der Knochenernährung, welche auf eine allergische Reaktion zurückgeführt wurden. Zusätzlich handelte es sich bei allen gelockerten Prothesen um Prothesen mit einer Metall-Metall-Gleitpaarung.

Benson et al. konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer Endoprothesenlockerung und einer positiven Patch-Testung bei Prothesen mit Metall-

Metall-Gleitpaarung feststellen. Man fand jedoch keinen Zusammenhang bei der Verwendung von Prothesen mit Metall-Polyethylen-Gleitpaarung (7). Munro-Asham und Miller fanden bei 16 von 35 Patienten, die eine aseptische Lockerung aufwiesen, den Nachweis einer Kontaktallergie auf Chrom und Nickel im Patch-Test. Auch hier wurden zur Untersuchung Prothesen mit Metall-Metall-Gleitpaarung herangezogen (78).

Unter Verwendung des in-vitro Lymphozytentransformationstestes fanden Christiansen et al. eine Korrelation zwischen Prothesenlockerung und Metallüberempfindlichkeit, wobei es sich in dieser Studie um Endoprothesen mit Metall-Polyethylen-Gleitpaarung handelte (24).

Diese Befunde lassen vermuten, dass der Zusammenhang zwischen einer Sensibilisierung gegenüber Metallen und der Lockerungsrate vom dem jeweils verwendeten Prothesentyp abhängig ist. Zum Beispiel zeigten Prothesen vom Typ McKee-Farrar eine erhöhte Lockerungsraten verbunden mit einer Sensibilisierung gegenüber den verwendeten Metallen (32). Dies konnte jedoch nicht in allen Studien nachgewiesen werden (11).

Gelenkendoprothesen mit Metall-Metall-Gleitpaarungen scheinen durch ihre höhere Konzentration an Metallen im Gelenkraum (69) eher zu einer Kontaktallergie an der Haut zu führen, wie dies bei Metall-Polyethylen-Paarungen der Fall ist. Dies wiederum könnte ein möglicher Grund für eine frühzeitige Endoprothesenlockerung sein, welcher in einer systemischen Reaktion auf das inkorporierte Metall zu suchen ist (32). Postuliert man den Pathomechanismus einer Allergie vom verzögerten Typ, wie er bei der Kontaktallergie gefunden wird, so erklärt sich das unterschiedliche Sensibilisierungsverhalten der verwendeten Prothesentypen durch die Annahme eines konzentrationsabhängigen Prozesses der Kontaktallergie.

Die Patienten in der hier vorliegenden Studie wurden ausnahmslos mit Prothesen mit Metall-Polyethylen-Gleitpaarung versorgt. Da bei keinem Patienten, der zur Wechsellagerung anstand, eine Allergie nachgewiesen wurde, kann eine mögliche Erklärung darin gesehen werden, dass die Entwicklung einer Überempfindlichkeit durch inkorporierte Metalle ein konzentrationsabhängiger Prozess ist. Auch fließende Übergänge in eine toxische Reaktion könnten der Grund für das vermehrte Auftreten von Kontaktallergien bei Endoprothesen mit Metall-Metall-Gleitpaarungen sein (73, 85). Somit besteht neben einer allergischen Reaktion auch die Möglichkeit einer toxischen Reaktion.

Christiansen et al. (24) fanden dagegen in ihrer Studie auch einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Prothesenlockerungsrate und dem Nachweis von sensibilisierten

T-Lymphozyten durch Lymphozytentransformationstests bei Metall-Polyethylen-Paarung. Dies könnte an dem sensitiveren Verfahren des in-vitro Lymphozytentransformationstestes bezüglich des „Aufspürens“ einer „inneren Allergie“ liegen (24, 44).

Die Mehrzahl der Studien, wie auch die hier unternommene Studie, konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer Allergie und einer Prothesenlockerung finden. Somit konnte auch keinen Einfluss einer allergischen Reaktion auf die Standzeit der Prothese gefunden werden.

Im Jahre 1977 führten Brown et al bei 20 Patienten mit aseptischer Lockerung von McKee-Farrar Metall-Metall-Hüftprothesen einen Patch-Test auf Kobalt, Nickel und Chrom durch. Alle Tests waren negativ. Der histologische Befund des umgebenen Gewebes von 17 Patienten zeigte nach Aussage der Autoren keinen Anhalt für eine Allergie vom verzögerten Typ (11). In dieser Studie wurden allerdings keine immunhistochemischen Untersuchungen zur Bestimmung von T-Lymphozyten unternommen. Brown nahm an, dass falls es eine Allergie vom verzögerten Typ auf implantierte Endoprothesen geben sollte, dies als Entzündungsreaktion an der Pseudosynovialis gesehen werden müsste.

Einen anderen Ansatz, einen Zusammenhang zwischen einer Metallallergie und möglichen orthopädischen Komplikationen zu finden, verfolgte Carlson und Möller, indem sie 18 Patienten mit orthopädischen Implantaten versorgten, darunter 9 mit Hüftendoprothesen, die präoperativ allergisch auf Nickel bzw. Chrom reagierten. Beide Metalle waren auch Inhaltsstoffe der verwendeten Prothesen. Die Kontaktallergie wurde mit einem Patch-Test bestätigt. Jahre später, im Durchschnitt 6,3 Jahre, wurden die Patienten klinisch und radiologisch nachuntersucht. Keiner der Patienten hatte kutane oder orthopädische Komplikationen. Drei Patienten verloren sogar ihre Kontaktallergie, was vermutlich auf eine Veränderung des Immunstatus zurückzuführen war (20). Rooker und Wilkinson erhielten ähnliche Ergebnisse (90).

Nach Aussagen von A Carlson konnte er in den letzten 21 Jahren unter der Verwendung von metallhaltigen Prothesen bei Patienten, die nachweislich eine Kontaktallergie auf die verwendeten Metalle zeigten, keine orthopädischen oder dermatologischen Komplikationen nachweisen (19).

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Rakoski et al (86). In dieser Studie wurden 67 Patienten, die mit einer TEP des Hüftgelenks versorgt wurden, vor und 6 Monate nach der Operation durch einen Patch-Test auf eine Kontaktallergie untersucht. Bei 2 Patienten wurde präoperativ eine Allergie auf Kaliumchromat gefunden, bei 3 weiteren Patienten

eine Allergie auf Nickelsulfat und ein Patient zeigte eine Allergie auf Kobaltchlorid. Bei der postoperativen Nachuntersuchung war nur noch bei einem Patienten eine Allergie nachzuweisen, bei den anderen Patienten fiel die Patch-Testung bei der Kontrolluntersuchung negativ aus. Trotz dieser Ergebnisse konnten die Autoren, die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen einer Kontaktallergie und orthopädischen Komplikationen nicht ausschließen.

Hindsen et al (50) führten einen epikutanen Patch-Test bei 60 Patienten vor der Implantation eines orthopädischen Implantates durch. Hierbei reagierten 3 Patienten positiv auf eines der getesteten Metalle. Ein Jahr später wurden 48 von den ursprünglich 60 Patienten erneut auf eine epikutane Reaktion getestet. Es konnte keine Veränderung festgestellt werden. Die 3 Patienten die präoperativ eine Kontaktallergie aufwiesen, zeigten keine dermatologischen oder orthopädischen Komplikationen. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass das Risiko orthopädischer oder dermatologischer Komplikationen sehr gering ist.

Die erwähnten Studien konnten von zahlreichen anderen Autoren bestätigt werden. Keinen Zusammenhang zwischen Prothesenlockerung und einer Kontaktallergie fanden auch Burrow et al (17), Waterman und Schrik (102), Gawkrödger (37), Grasshoff et al (43, 44) und Granchi et al. (42).

Gschwend et al. beobachteten bei 45 Patienten, die eine Prothesenlockerung bei Metall-Polyethylenpaarungen aufwiesen eine einzige Patientin, die eine Kobalt-Nickel-Allergie zeigte. Dies dürfte bei einem Kollektiv von 45 Patienten im Normalbereich liegen, wenn man bedenkt, dass in der Normalbevölkerung die Zahl der Allergiker bis zu 20% betragen kann (71, 75). In dieser Studie wurde jedoch auch eine signifikant höhere Anzahl von Metallallergien bei Patienten mit Metall-Metallpaarungen gefunden. Bei einem Kollektiv von 7 Patienten zeigten 3 eine Allergie. Die Autoren betonen jedoch, dass die Allergie als Ursache oder Mitursache einer Lockerung nicht sicher nachgewiesen wurde (45).

Vergleicht man die verschiedenen Studien, so gibt es Unterschiede im Implantatdesign. Die Verwendung von Metall-Polyethylen ist demnach die sicherere Kombination bezüglich Kontaktallergieentwicklung und einer damit eventuell kausal verbundenen aseptischen Lockerung (7, 32, 34, 37, 45, 50). Einige Autoren sehen die Implantation von Endoprothesen mit Metall-Polyethylen-Gleitpaarungen auch unbedenklich bei Patienten mit einer präoperativ bestehenden Kontaktallergie (20, 26, 37, 50).

Um eine eventuelle Sensibilisierung auf Metalle durch endoprothetischen Ersatz herauszufinden, wurde die Häufigkeit der Kontaktallergie bei Endoprothesenträgern bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie konnten keine erhöhte Häufigkeit von Typ IV Allergie auf die getesteten Metalle bei Patienten mit endoprothetischem Ersatz im Vergleich zur Normalbevölkerung zeigen.

Die Theorie einer Sensibilisierung gegenüber inkorporierten Metallen wurde 1984 von Ziegler und Höhndorf tierexperimentell nachgewiesen (107). Diese Studie wurde unternommen, da man bis dato nicht sicher sagen konnte, ob eine Sensibilisierung durch externen Allergenkontakt (z.B. nickelhaltigen Schmuck) oder durch die implantierten Legierungen hervorgerufen werden konnte. Vorausgegangen waren Studien, die eine erhöhte Prävalenz von Metallallergien bei Endoprothesenträgern zeigten. Studien von Webley et al. und Elves et al. zeigten eine Prävalenz von Patch-Test positiven Patienten von über 30% (30, 105).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in Gruppe B und Gruppe C gefundenen Ergebnissen. Hier konnte, wie auch in der Vergleichsgruppe A, in einem Kollektiv von 21 Patienten, die bereits endoprothetisch versorgt waren, kein Patient gefunden werden, der eine nachweisliche Allergie auf Nickel, Chrom oder Kobalt zeigte. Aufgrund der Selektionskriterien könnte angenommen werden, dass diese Aussage nicht getroffen werden kann. Dies ist jedoch möglich, da im Zeitraum der Patientenrekrutierung kein Patient präoperativ durch einen positiven Patch-Test ausselektiert wurde. Es wurde ein Patient mit Nickelallergie gefunden, der allerdings separat diskutiert wird.

Da es sich jedoch bei Webley et al. und Elves et al. um Metall-Metall gepaarte Endoprothesen handelte, könnte dies eine Erklärung für das Vorliegen eines erhöhten Auftretens sensibilisierter Endoprothesenträger sein.

Keine erhöhte Sensibilisierungshäufigkeit fanden Deutman et al. sowie Rooker et al. (27, 90). Hier wurden Metall-Polyethylen-Implantatträger untersucht. Dies stützt die These der Abhängigkeit vom Prothesentyp bei der Sensibilisierung gegenüber inkorporierten Metallprothesen.

Ein anderes Vorgehen wurde von Nater et al. verfolgt. Es wurden 66 Patienten vor und nach einer Hüftgelenkendoprothesenoperation auf eine Metallallergie getestet. Von 66 Patienten entwickelten 4 Prothesenträger wahrscheinlich aufgrund der Implantation eine Metallallergie (80).

Ebenfalls prä- und postoperative Patch-Tests führten Rooker und Wilkinson durch (90). In dieser Studie waren 6 von insgesamt 69 Patienten präoperativ Patch-Test positiv getestet worden. Von diesen 6 Patienten verloren 4 Patienten ihre Allergie nach dem endoprothetischem Ersatz. Ein Patient der eine Nickelallergie angab und eine Titan-TEP implantiert bekam, behielt seine Nickelallergie. Dies könnte wie bei Carlson et al. für eine Veränderung des Immunstatus nach intrakorporaler Allergieexposition sprechen.

5.3. T-Zellinfiltration als Zeichen einer „inneren Allergie“

Das Ziel der Studie war es die Möglichkeit der Entwicklung einer „inneren Allergie“ auf Metalle an der Synovialmembran zu klären.

Die grundlegenden Voraussetzungen dafür waren durch Anwesenheit von Antigen präsentierenden Zellen (APC) und einer genügend hohen Metallkonzentration an der Synovialis gegeben (91). Mit der Annahme der Ähnlichkeit der Immunreaktion, verglichen mit der Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion an der Haut, müsste eine vermehrte T-Zellinfiltration auf das Vorliegen einer Allergie an der Synovialis hinweisen.

Die einzige Studie, die aufgrund dieser grundlegenden Überlegung unternommen wurde, untersuchte jedoch nicht die Reaktion auf Metallimplantate an der Synovialmembran, sondern die von Titanimplantaten (64). Obwohl die Kontaktallergie auf Titan zahlenmäßig geringer ist, fanden Lalor et al. 1991 neben einer erhöhten Titanpartikelkonzentration eine vermehrte Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Synovialmembran von fünf Patienten mit Hüft-TEP-Wechseloperationen. Dies könnte für eine Allergie vom verzögerten Typ auf das inkorporierte Titan sprechen. Es wurden jedoch keine T-Zellsubpopulationen differenziert. B-Lymphozyten konnten keine gefunden werden. Agins et al., die bei neun Patienten nach Titan-TEP-Wechsel eine vergleichbare Studie durchführten, konnten periprothetisch eine intensive histiozytäre Reaktion und eine vermehrte Plasmazellinfiltration finden (1).

Das Ergebnis der Studie von Lalor et al. wurde als Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion und möglicher Grund der aseptischen Lockerung interpretiert.

Der bei einer systemischen Sensibilisierung gegenüber Titan zu erwartende positive Patch-Test fiel jedoch bei allen 5 getesteten Patienten negativ aus. Die Autoren behaupten jedoch, dass nicht auszuschließen ist, dass Individuen, die Patch-Test negativ sind dennoch auf Metallimplantate reagieren, da die vorhandenen Antikörper oder „deep-tissue-metal complexes“ sich antigenspezifisch von Hautimmunkomplexen unterscheiden können (73).

Die Vermutung einer vergleichbaren Reaktion bei einer Untersuchung der Synovialmembran von Metall-Polyethylen Endoprothesenträgern, die ebenfalls Patch-Test negativ reagierten, konnte in der hier unternommenen Studie nicht nachgewiesen werden. Bei allen 12 untersuchten Patienten mit Endoprothesenwechsel zeigte keine der intraoperativ entnommenen Synovialmembranen eine vermehrte T-Lymphozyteninfiltration.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann als wesentliche Aussage unserer Untersuchung gesagt werden, dass Patienten, die einen negativen epikutanen Patch-Test vor einer TEP-Wechseloperation zeigten, auch keine Infiltration von T-Lymphozyten entlang der Synovialmembran aufwiesen und somit auch mit keiner Reaktion im Sinne einer zellulären Überempfindlichkeitsreaktion zu rechnen ist.

Um eine Typ IV Reaktion bei Patienten mit nachweislicher Allergie auf Prothesenbestandteile an der Synovialmembran auszuschließen, wurden Anstrengungen unternommen, als Vergleichsgruppe Patienten zu finden, die einen positiven Patch-Test aufwiesen und zum Endoprothesenwechsel anstanden. Es ist jedoch in deutschsprachigen Ländern üblich, Patienten mit Metallallergie mit Titanimplantaten zu versorgen. Der Nutzen dieses Vorgehens zur Vermeidung einer Allergie wird von einigen Autoren angezweifelt, da eine grundsätzliche Kreuzreaktivität von nickelreaktiven T-Lymphozyten gegenüber anderen Metallen möglich ist (84). Als weiter Kritikpunkt ist noch zu nennen, dass alle verwendeten Titanprothesen nicht frei von Nickel oder anderen Metallen sind. Es wurde postuliert, dass eine Kontaktdermatitis auf Nickel nicht zwingend die Standzeit einer Endoprothese negativ beeinflusst.

Eine große Anzahl von Veröffentlichungen sieht die Vermeidung von metallhaltigen Prothesen bei Metallallergikern als unnötig, da die Lockerungsrate und auch die Neusensibilisierung gegenüber Endoprothesenmaterialien sehr gering bzw. sehr fragwürdig ist (11, 13, 20, 28, 37,44, 50, 90, 102).

Einige dieser Autoren schließen jedoch die generelle Möglichkeit einer Allergie und die damit verbundenen Komplikationen nicht aus (13, 21, 28, 44).

Vergleicht man die hier unternommene Studie mit der von Lalor et al., in der ausschließlich Titanprothesen untersucht wurden, so sind mögliche Unterschiede der T-Zellinfiltration über die verschiedene Löslichkeit von Metallen zu erklären. Metalle wie Vanadium und Nickel sind leichter löslich und können deshalb besser über die Nieren ausgeschieden werden. Titan dagegen reichert sich im Gewebe an und kann somit höhere

Konzentrationen an der Synovialis erreichen (64). Geht man vom Pathomechanismus der Kontaktallergie aus, so ist eine bestimmte Schwellenkonzentration nötig, um eine zelluläre Reaktion und damit eine Kontaktallergie auszulösen.

Eine mögliche genetische Prädisposition, der von Lalor et al. untersuchten 5 Patienten eine Allergie auf Titan zu entwickeln, könnte eine Ursache der vermehrten T-Zellinfiltration sein.

Im Gegensatz dazu könnte man ebenfalls annehmen, dass sich bei den 12 in dieser Studie untersuchten Endoprothesenwechsellern in Gruppe C kein Patient fand, der die genetischen Voraussetzungen zur Entwicklung einer Kontaktallergie erfüllte (5, 41, 52, 67, 95).

Untersuchungen, ob T-Lymphozyten in der Pseudosynovialis lokal aktiviert werden und eine Bedeutung bei der Implantatlockerung haben, wurden 1998 von Weyand et al. unternommen (103). Es wurde eine Expansion von klonalen T-Zellen in das periprothetische Gewebe gefunden, wobei CD4 und CD8 T-Zellen gleich häufig waren. Zusätzliche epikutane Hauttests wurden allerdings nicht unternommen. Da es sich bei den gefundenen T-Zellen um Zellen handelte, die aus einem Klon stammten, nahmen die Autoren an, dass es sich um eine antigenspezifische Reaktion handelte.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen in der hier unternommenen Studie, so ist die Ursache der unterschiedlichen T-Zellinfiltration in der Entnahmestelle zu suchen (104). Weyand et al. entnahmen die Pseudosynovialis direkt an dem Knochen-Implantat-Interface. Dies ist die am nächsten gelegene Entnahmestelle zum Implantat, welche nach Goldring et al.(39) ebenfalls über eine Pseudosynovialmembran verfügt. Diese exprimiert, wie von Klareskog et al. gezeigt wurde, auch HLA-DR positive Zellen (57, 58).

Somit muss man annehmen, dass die Nähe zum Implantat mit einer höheren Konzentration an Antigenen, d.h. Metallionen einhergeht. Diese ist nötig, um eine antigenspezifische klonale Proliferation im Sinne einer Kontaktallergie zu bewirken.

Weyand et al. schlossen aus ihren Untersuchungen, dass T-Zellen stark zu einer Kette von Ereignissen beitragen, die zum Prothesenverlust führen können. Die Autoren favorisieren ebenfalls CD4 und CD8 T-Zellen als bedeutendste T-Lymphozytensubpopulation. Dabei sollen neben T-Lymphozyten auch Cytokine eine Rolle spielen.

Bisherige histomorphologische Analysen zeigten als Zelltypen der periprothetischen Entzündung v.a. Makrophagen, Fibroblasten, vielkernige Riesenzellen und vereinzelt T-Zellen (40, 68, 92).

Durch Bestimmung der verschiedenen Subpopulationen der T-Lymphozyten in der vorliegenden Studie sollte eine eventuelle Infiltration bestimmter T-Zellen nachgewiesen werden. Welche T-Lymphozyten jedoch hauptsächlich verantwortlich für eine Reaktion vom verzögerten Typ sind ist bis heute noch nicht nachhaltig geklärt.

Nur in Gruppe A und B konnte eine T-Zellinfiltration der Synovialis gezeigt werden. Da die Patienten der Gruppe A bis zur Untersuchung keinen intrakorporalen Kontakt mit Metallen hatten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der gefundenen T-Zellinfiltration um eine Begleitreaktion des arthrotisch veränderten Gelenkes handelt. Dieser Zustand wird als aktivierte Arthrose oder nach Helbig et al. als chronisch unspezifische Entzündung bezeichnet (49).

Die Synovialmembran bei Osteoarthrose wurde von Revell et al. bei 20 Patienten untersucht. Wie in unserer Studie fanden die Autoren bei der konventionellen histologischen Untersuchung eine Synovialdeckzellhyperplasie, Lymphfollikel und eine diffuse Fibrose (89). Immunhistochemisch wurden HLA-DR positive Makrophagen, T-Helfer-, T-Suppressor- und B-Lymphozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen für eine entzündliche Form der Osteoarthrose. Diese Untersuchungen bestätigten die von Johnell et al. in vorhergehenden Jahren gefunden Resultate (52).

Entsprechende Ergebnisse erhielt Haraoui et al. bei medikamentös vorbehandelten Patienten mit Osteoarthrose und rheumatoider Arthritis (48). Da eine medikamentöse Behandlung, v.a. mit Corticoiden, eine eventuelle „allergische Reaktion“ auf die inkorporierten Metalle beeinflussen könnte, wurden solche Patienten nicht in die eigene Studie mit aufgenommen.

Neben einer lokalen Ansammlung von T-Zellen an der Allergenkontaktstelle geht man heute auch davon aus, dass gleiche Reaktionen an allergenfernen Stellen auftreten können (41, 97). Da die Möglichkeit einer metallfernen Manifestation einer Typ IV Allergie ebenfalls am Synovialorgan nicht auszuschließen ist, wurde bei Patienten der Gruppe B, die bereits kontralateral endoprothetisch versorgt waren, Synovialmembranen zur immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

Die immunhistochemischen Befunde zeigen zwar eine vermehrte Ansammlung von T-Lymphozyten, doch sind diese ebenfalls im Rahmen einer entzündlichen Form der Arthrose zu sehen. Bestätigt wird diese Aussage vor allem durch das histologische Bild. Das Vorliegen einer aktivierten Arthrose wird noch dadurch gefestigt, dass die höchste

Zahl an T-Lymphozyten bei Patienten gefunden wurde, welche einen endoprothetischen Ersatz am höher belasteten Kniegelenk erhielten.

Somit konnte eine interne Sensibilisierung auf das metallische Implantat auch bei dieser Gruppe nicht bestätigt werden.

5.4. Patient mit nickelpositivem Patch-Test

Per Zufall fand sich ein Patient mit positiven Patch-Test auf Nickel, der nach Implantation einer Metall-Polyethylen gepaarten TEP postoperativ ein Serom entwickelte. Es konnte jedoch ebenfalls keine T-Zellinfiltration nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung könnte nach Merritt und Brown die zu kurzen Expositionszeit von sieben Tagen sein (72). Die beiden Autoren sind der Meinung, dass eine Sensibilisierung auch noch Jahre nach fortbestehendem Allergenkontakt möglich ist.

Sieben Tage müssten prinzipiell für eine Sensibilisierung jedoch ausreichend sein . (5, 15, 41, 53, 67)

Es könnte auch möglich sein, dass es generell bei Nickelallergikern aufgrund der zu geringen Konzentration an Nickel im Gelenkspalt zu keiner vermehrten Infiltration von T-Lymphozyten an der Synovialmembran kommt, da der Schwellenwert, der nötig ist eine Überempfindlichkeitsreaktion auszulösen, nicht überschritten wird. Das Bedeutet, dass auch bei Patch-Test positiven Patienten, es zu keiner inneren Sensibilisierung auf die durch die Prothese inkorporierten Metalle kommt.

Betrachtet man dieses Ergebnis in seinem immunogenetischen Zusammenhang, so wäre es möglich, dass die genetischen Voraussetzungen zur Kontaktallergieentwicklung nur auf der Haut gegeben sind. Somit muss eine allergische Reaktion auf der Haut nicht zwangsläufig mit Reaktion auf das Metall an der Synovialis einhergehen.

5.4. Schlussfolgerung

Ein komplexer immunologischer Prozess mit Aktivierung von T-Lymphozyten und verstärkter Cyokinproduktion könnte eine bedeutende Rolle bei der aseptischen Lockerung von Endoprothesen spielen. Obwohl theoretisch die Möglichkeit besteht, wurde bei keinem unserer Patienten ein Zusammenhang einer Endoprothesenlockerung und einer vermehrten T-Zellinfiltration gefunden. (Siehe Ergebnisse Gruppe C)

Bisher unternommene Studien haben sich noch nie mit dem Zusammenhang einer epikutan nachgewiesenen Metallallergie und einer vermehrten T-Zellinfiltration an der Gelenkkapsel auseinandergesetzt. Somit ist der hier verfolgte Studienaufbau eine neue Möglichkeit zur Identifizierung zellulärer Reaktionen auf inkorporierte Metalle.

Schlussfolgernd kann die Aussage getroffen werden, dass Patch-Test negative Patienten, die zu einer TEP-Wechseloperationen anstanden, keinen Hinweis auf eine „innere Allergie“ zeigten. Das Vorliegen einer „inneren Allergie“ bei Patch-Test positiven Patienten konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Dies sollte jedoch noch an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

Das Immunsystem und dessen Reaktionen auf inkorporierte Metalle stellen einen solch komplexen Sachverhalt dar, dass die hier unternommene Studie nur einen kleinen Teil der Zusammenhänge erarbeiten konnte. Weitere grundlegende Untersuchungen, die auf den Körper und das Immunsystem als Ganzes eingehen, müssten unternommen werden, um die Möglichkeit einer nachteiligen Beeinflussung des Patienten durch implantierte Metalle und Metallprothesen zu zeigen.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse ist nicht von einer Gefährdung des allergischen Patienten bei einer Standardprothese aus nickelhaltigen Stahl auszugehen, da eine allergische Reaktion an der Synovialis nicht nachgewiesen wurde.

6. Zusammenfassung

Die Fähigkeit der verschiedenen T-Lymphozyten, eine Immunreaktion im Sinne einer Allergie vom Typ IV nach Coombs und Gell auf Metallimplantate an der Synovialmembran hervorzurufen, wurde bisher nur ungenügend untersucht.

In dieser Arbeit sollte ein Zusammenhang zwischen einem epikutan durchgeführten Patch-Test und einer T-Lymphozyteninfiltration der Synovialmembran als Zeichen einer „inneren Allergie“ auf Metall-Polyethylen Endoprothesen untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen epikutaner Patch-Testung und Endoprothesenlockerung sollte geprüft werden und ob die Häufigkeit von Metallallergien im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist.

Bei 35 Patienten wurde präoperativ ein epikutaner Patch-Test auf Nickel, Chrom und Kobalt durchgeführt. Es erfolgte eine Gruppeneinteilung, bei welcher zwischen Patienten mit Primär-Endoprothesen-Implantation, Endoprothesen-Wechseloperation und Patienten mit bereits auf der kontralateralen Seite endoprothetisch versorgtem Gelenk differenziert wurde. Bei allen Patienten wurde intraoperativ eine Synovialmembranprobe entnommen und immunhistochemisch auf verschiedene T-Zellsubpopulationen untersucht. Dabei wurde die Gesamtzahl der T-Lymphozyten durch den cluster of differentiaton (CD)3 Antikörper erfasst. Eine weitere Differenzierung der T-Lymphozyten wurde durch Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8 und NK erreicht.

In der hier unternommenen Studie konnte weder der Nachweis einer „inneren Allergie“ nach endoprothetischem Ersatz erbracht werden, noch konnte ein Zusammenhang zwischen Endoprothesenlockerung und epikutaner Patch-Testung gefunden werden. Ein vermehrtes Auftreten von Metallallergien bei Patienten mit Metall-Polyethylen gepaarten Endoprothesen fand sich im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht. Bei einem Patienten mit nachgewiesener Nickelallergie und einer Metall-Polyethylen-Endoprothese zeigte sich ebenfalls kein Anhalt einer „inneren Allergie“.

Schlussfolgernd kann somit die Aussage getroffen werden, dass Patch-Test negative Patienten mit Wechseloperationen keinen Hinweis auf eine „innere Allergie“ zeigen. Das Vorliegen einer „inneren Allergie“ bei Patch-Test positiven Patienten konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Dies sollte jedoch noch an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD, Pellicci PM, Bullough PG: Metallic Wear in Failed Titanium-Alloy Total Hip Replacements. A Histological and Quantitative Analysis. *J Bone Joint Surg* 70: 347-356 (1988)

- 2 Andersen K E, Burrows D, White I R: Allergens from standard series. In: Rycroft R J G, Menne T, Frosch P J, Benezra C (eds). *Textbook of Contact dermatitis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1992: 413-456

- 3 Asherson GL, Dieli F, Sireci G, Salerno A: Role of IL-4 in delayed type hypersensitivity. *Clin Exp Immunol* 103: 1-4 (1996)

- 4 Barrack RL, Nulroy RD Jr, Harris WH: Improved cementing techniques and femoral component loosening in young patients with hip arthroplasty: A 12-year radiographic review. *J Bone Joint Surg* 74: 385-389 (1992)

- 5 Belatrini VS, Belatirini VP: Contact dermatitis Review article. *Ann Allergy Asthma Immunol* 78: 160-75 (1997)

- 6 Beneke G, Kuprasch R, Mohr W, Paulini K, Mohing W: Die Reaktion der Gelenkkapsel nach Totalarthroplastik des Hüftgelenks. *Arch Orthop Unfall Chir* 75: 289-301 (1973)

- 7 Benson MKD, Goodwin PG, Brostoff J: Metal sensitivity in patients with joint replacement arthroplasties. *British Medical Journal* 4: 374-375 (1975)

- 8 Blomberg von-van der Flier M, van der Burg CKH, Pos O, van de Plassche-Boers EM, Bruynzeel DP, Garotta G, Scheper RJ: In Vitro Studies in Nickel Allergy: Diagnostic Value of a Dual Parameter Analysis. *J Invest Dermatol* 88: 362-368 (1987)

- 9 Borelli S, Citronenbaum C, Düngemann H, Mayenburg v J, Rakoski J, Diebold B, Mayer S, Biehl T, Erd A, Hofmann G, Neiß A: Metallallergien in der Chirurgie. *Hefte zur Unfallheilkunde* 164: 479-486 (1984)

- 10 Bos I, Löhrs U: Morphologie der Sekundärkapsel bei Hüftgelenkendprothesen und Bedeutung des Materialabriebs. *Pathologe* 12: 82-88 (1991)
- 11 Brown GC, Lockshin MD, Salvati EA, Bullough PG: Sensitivity to Metal as Possible Cause of Sterile Loosening after Cobalt-Chromium Total Hip-Replacement Arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 59: 164-168 (1977)
- 12 Brückner L: Kasuistischer Beitrag zur Metallallergie. *Beitr Orthop Traumatol* 26: 211-213 (1979)
- 13 Brückner L, Höhndorf H: Metallallergie nach Osteosynthesen und Totalendoprothesenplastiken. *Zentralbl Chir* 104: 661-665 (1979)
- 14 Brun R: Epidemiology of contact dermatitis in Geneva. *Contact Dermatitis* 1: 214-217 (1975)
- 15 Bruze M: Patch testing. In: *Practical Contact Dermatitis. A handbook of the practitioner*. Guin J D (ed) McGraw-Hill, Inc, 1995: 41-62
- 16 Burrows D: Is systemic nickel important? *J Am Acad Dermatol* 26: 632-635 (Editorial) (1992)
- 17 Burrows D, Creswell S, Merrett JD: Nickel, hands and hip protheses. *Br J Dermatol* 105: 437-444 (1981)
- 18 Cancilleri F, De Giorgis P, Verdoia C, Parrini L, Lodi A, Crosti C: Allergy to components of total hip arthroplasty before and after surgery. *Ital J Orthop Traumatol*. 18: 407-410 (1992)
- 19 Carlsson A: (2000 persönliche Mitteilung)
- 20 Carlsson A, Möller H: Implantation of Orthoaidic Devices in Patients with Metal Allergy. *Acta Derm Venerol* 69: 62-66 (1989)

- 21 Carlson A, Magnusson B, Möller H: Metal Sensitivity in Patients with Metal-to-plastic Total Hip Arthroplasties. *Acta Orthop Scand* 51: 57-62 (1980)
- 22 Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, Pirrotta L, Puddu P, Girolomoni G: Patients with Allergic Contact Dermatitis to Nickel and Nonallergic Individuals Display Different Nickel-Specific T Cell Responses. Evidence for the Presence of Effector CD8 and Regulatory CD4 T Cells. *J Invest Dermatol* 4: 621-627 (1998)
- 23 Cher DJ, Mosmann TR: Two Types of Murine Helper T Cell Clone. Delayed-Type Hypersensitivity is Mediated by TH1 Clones. *J Immunol* 11: 3688-3694 (1987)
- 24 Christiansen K, Holmes K, Zilko PJ: Metal sensitivity causing loosened joint protheses. *Ann Rheum Dis* 38: 476-480 (1979)
- 25 Coombs RRA, Gell PGH: The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell P G H, Coombs R R A (Hrsg) *Clinical aspects of Immunology*, Davis, Philadelphia, S.317-319 (1963)
- 26 Deboere P, McLaren C: (1999: persönliche Mitteilung)
- 27 Deutman R, Mulder Th J, Brian R, Nater JP: Metal Sensitivity before and after Total Hip Arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 59: 862-865 (1977)
- 28 Duchna H-W, Nowack U, Merget R, Muhr G, Schultze-Werninghaus G: Prospektive Untersuchung zur Bedeutung der Kontaktsensibilisierung durch Metallimplantate. *Zentralbl Chir* 123: 1271-1276 (1998)
- 29 Elves MW: Transformation in the Presence of Metals of Lymphocytes from Patients with Total Joint Prosthesis. *J Path* 122: 35-41 (1977)
- 30 Elves MW, Wilson JN, Scales JT, Kemp HBS: Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacement. *British Medical Journal* 4: 376-378 (1975)

- 31 Emtestam L, Olerup O: On T-cell Recognition of Nickel as a Hapten. *Acta Derm Venerol* 76: 344-347 (1996)
- 32 Evans ME, Freeman MAR, Miller AJ, Vernon-Roberts B: Metal sensitivity as a cause of Bone Necrosis and Loosening of the Prosthesis in Total Joint Replacement. *J Bone Joint Surg* 56: 626-642 (1974)
- 33 Fisher AA: The Role of Patch Testing in the Management of Dermatitis Caused by Orthopedic Metallic Prostheses. *Cutis* 33: 258-264 (1984)
- 34 Fitzgerald RH, Kelly PJ: Total Joint Arthroplasty: Biologic Cause of Failure. *Mayo Clin Proc* 54: 590-596 (1979)
- 35 Fournier E: Incidents and side effects of metallic orthopedic and odontologic prostheses. *Bull Acad Natl Med* 179: 507-516 (1995)
- 36 Fousserau J, Laugier P: Allergic Eczema from Metallic Foreign Bodies. *Trans St. Johns Hosp Dermatol Soc* 52: 220-226 (1966)
- 37 Gawkrödger DJ: Nickel sensitivity and the implantation of orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis* 28: 257-259 (1993)
- 38 Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on avidin-biotin interaction. *Diag Immunol* 2: 161-166 (1984)
- 39 Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O'Neil DA, Harris WH: The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg* 65: 575-584 (1983)
- 40 Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Huie Y, Sibley R: Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J Biomed Mater Res* 31: 421-428 (1996)

- 41 Grabbe S, Schwarz T: Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 19: 37-44 (1998)
- 42 Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Cavedagna D, Bettini N, Bianco T, Fontanesi G, Pizzoferrato A: Evaluation of several immunological parameters in patients with aseptic loosening of hip arthroplasty. *Chir Organi Mov* 80: 399-408 (1995)
- 43 Grasshoff H, Reichelt A, Kluge K, Gerke D: Metallallergie bei Hüftgelenktotalendoprothesen. *Beitr Orthop Traumatol* 31: 299-304 (1984)
- 44 Grasshoff H, Schmidt D, Kluge K, Müller WA: Hüftgelenkendoprothetik und Metallsensibilisierung: Untersuchung mit dem Leukozytenmigrationstest. *Beitr Orthop Traumatol* 37: 211-215 (1990)
- 45 Gschwend N, Scherer H, Dybowski R, Hohenmuth H, Razavi R, Staubli A, Würthrich B, Scherrer A: Allergologische Probleme in der Orthopädie. *Orthopäde* 6: 197-204 (1977)
- 46 Hallab NJ, Mikecz K, Jacobs JJ: A triple assay technique for the evaluation of metal-induced, delayed-type hypersensitivity responses in patients with or receiving total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res* 53:480-489 (2000)
- 47 Hammershoy O: Standard patch test results in 3,225 consecutive Danish patients from 1973-1977. *Contact Dermatitis* 6: 263-268 (1980)
- 48 Haraoui B, Pellentier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J: Synovial Membrane Histology and Immunopathology in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 34: 153-163 (1991)
- 49 Helbig B, Gross WL, Borisch B, Starz H, Müller-Hermelink HK: Characterisation of Synovial Macrophages by Monoclonal Antibodies in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 76: 61-66 (1988)
- 50 Hindsen M, Carlson A, Möller H: Orthopaedic metallic implants in extremity fractures and contact allergy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2:22-26 (1993)

51 Hirano S, Yoshikawa K: Patch testing with European and American standard allergens in Japanese patients. *Contact Dermatits* 8: 48-50 (1982)

52 Johnell O, Hulth A, Henricson A: T-lymphocyte subsets and HLA-DR-expressing cells in the osteoarthritic synovialis. *Scand J Rheumatol* 14: 259-264 (1985)

53 Kalimo K, Lamminatausta K: 24 and 48 h allergen exposure in patch testing. Comparative study with 11 common contact allergens and NiCl₂. *Contact dermatitis* 10: 25-29 (1984)

54 Kalish RS, Askenase PhW: Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma and Autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 103: 192-197 (1999)

55 Kapp A, Werfel T: Allergic inflammation: skin. *Allergy* 54: 23-24 (1999)

56 Kavanagh BF, Dewitz MA, Stauffer RN, Coventry MB: Charnley total hip arthroplasty with cement: Fifteen-year result. *J Bone Joint Surg* 71: 1496-1503(1989)

57 Klareskog L, Forsum U, Malmnäs Tjernlund U, Kabelitz D, Wigren A: Appearance of Anti-HLA-DR-Reactive Cells in Normal and Rheumatoid Synovial Tissue. *Scand J Immunol* 14: 183-192 (1981)

58 Klareskog L, Forsum U, Kabelitz D, Plöen L, Sundström C, Nilsson K, Wigren A, Wigzell H: Immune Funktions of Human Synovial Cells. *Arthritis Rheum* 25: 488-501 (1982)

59 Klimiuk P, Yang H, Goronzy J, Weyand CM: Production of Cytokines and Metalloproteinases in Rheumatoid Synovitis Is T Cell Dependent . *Clin Immunol* 99: 65-78 (1999)

60 Koch B, Locher P, Burmester GR, Mohr W, Kalden JR: The tissue architecture of synovial membranes in inflammatory and non-inflammatory joint diseases. *Rheumatol Int* 4: 79-85 (1984)

61 Kubba R, Taylor JS, Marks KE: Cutaneous Complications of Orthopedic Implants. Arch Dermatol 117: 554-560 (1981)

62 Lachapelle JM: First Jadassohn lecture: A Century of Patch testing. Jadassohn Centenary Congress, London 9-12 Oct., 1996

63 Lämmer D: Testergebnisse von 1008 Patienten mit Kontaktallergie. Z Hautkr 54: 517-579 (1979)

64 Lalor AP, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MAR: Sensitivity to Titanium. A Cause Of Implant Failure? J Bone Joint Surg 73: 25-28 (1991)

65 Lamminatausta K, Maibach HI: Clinical concepts in nickel testing. In: Maibach H I, Menne T (eds). Nickel and the Skin: Immunology and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, Florida 1989: 91-99

66 Laschner W, Fritz P, Mischlinski A, Mischlinski G, Rautenstrauch H, Saal HJ, Tuzcek HV, Wegner G: Klinische Wertigkeit der histomorphologischen Untersuchungen von Gelenkkapseln. Z Rheumatol 47: 195-200(1988)

67 Lennart E, Olerup O: On T-cell Recognition of Nickel as a Hapten. Acta Derma Venerol 76: 344-347 (1996)

68 Linder L, Lindberg L, Carlson A: Aseptic Loosening of Hip Prostheses. A Histologic and Enzyme Histochemical Study. Clin Orthop 175: 93-104 (1983)

69 Lyell A: Metal Allergy and Metallic Prostheses. Int J Dermatol 18: 805-807 (1979)

70 Mc Lelland J, Shuster S: Contact dermatitis with negative patch tests: the additive effect of allergens in combination. Br J Dermatol 122: 623-630 (1990)

- 71 Menne T, Christophersen J, Green A. Epidemiology of nickel dermatitis. In: Maibach H I, Menne T(eds). Nickel and the skin: Immunology and Toxicology, CRC Press, Boca Raton, Florida: 109-115 (1989)
- 72 Merritt K, Brown AS: Metal Sensitivity Reactions to Orthopedic Implants. *Int J Dermatol* 2: 89-94 (1981)
- 73 Merritt K, Brown AS: Effects of Metal Particles and Ions on the Biological System. *Techniques in Orthopedics* 8: 228-236(1994)
- 74 Milavec-Puretic V, Orlic D, Marusic A: Sensitivity to metals in 40 patients with failed hip endoprosthesis. *Arch Orthop Trauma Surg* 117: 383-386 (1998)
- 75 Möller H: Unpublished results. Malmö, Sweden (1997)
- 76 Moulon C, Wild D, Dormoy A, Weltzien HU: MHC-Dependent and –Independent Activation of Human Nickel-Specific CD8 Cytotoxic T Cells from Allergic Donors. *J Invest Dermatol* 111: 360-365 (1998)
- 77 Mozzanica N, Rizzolo L, Veneroni G, Diotti R, Hepeisen S, Finizi A F: HLA-A,B,C and DR antigen in nickel contact sensitivity. *Br J Dermatol* 122: 309-313 (1990)
- 78 Munro-Asham D, Miller AJ: Rejection of metal to metal prosthesis and skin sensitivity to cobalt. *Contact Dermatitis* 2: 65-67 (1976)
- 79 Nagele RB: Immunohistochemical demonstration of keratins in human ovarian neoplasms. A comparison of methods. *J Histochem Cytochem* 31: 1010-1017 (1983)
- 80 Nater JP, Brian RG, Deutman R, Mulder ThJ: The development of metal hypersensitivity in patients with metal-to-plastic hip arthroplasties. *Contact Dermatitis* 2: 259-261 (1976)
- 81 Nethercott J, Holness L: Cutaneous nickel sensitivity in Toronto, Canada. *J Am Acad Dermatol* 22: 756-61 (1990)

- 82 Peltonen L: Nickel sensitivity in the general population. *Contact Dermatitis* 5: 27-32 (1979)
- 83 Petrusz P, Ordronneau P: Immunohistochemistry of pituitary hormones. In: Polak MT and van Noorden S, eds. *Immuncytochemistry: practical applications in pathology and biology*. Bristol Wright-PSG: 212-220 (1983)
- 84 Pistor FH, Kapsenberg ML, Bos JD, Meinardi MM, von Blomberg ME, Scheper RJ: Cross-reactivity of human nickel-reactive T-lymphocyte clones with copper and palladium. *J Invest Dermatol* 105: 92-95 (1995)
- 85 Rae T: The Toxicity of Metals used in Orthopedic Prostheses. An experimental study using cultured human synovial fibroblasts. *J Bone Joint Surg* 63: 435-440 (1981)
- 86 Rakoski J, Dügemann H, Borelli S, Götze R, Wasmer G: Prospektive Untersuchungen zur Bedeutung der Metallallergie bei Hüftkopfnekrosen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 189: 879-898 (1987)
- 87 Rakoski J, v. Mayenburg J, Dügemann H, Borelli S: Metallallergien bei Patienten mit Metallimplantaten im Knochen. *Allergologie* 9: 160-163 (1986)
- 88 Rapaport MJ: Patch testing in orthopedic prosthetic patients. *Contact Dermatitis* 6: 229 (Brief an den Herausgeber) (1980)
- 89 Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P: The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 47: 300-307 (1988)
- 90 Rooker GD, Wilkinson JD: Metal Sensitivity in Patients undergoing Hip Replacement. *J Bone Joint Surg* 62: 502-505 (1980)
- 91 Samitz MH, Katz SA: Nickel dermatitis hazards from prostheses. *Br J Dermatol* 92: 287-290 (1975)

- 92 Santavirta S, Konttinen YT, Bergroth V, Eskola A, Tallroth K, Lindholm TS: Aggressive Granulomatous Lesions Associated with Hip Arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 72: 252-258 (1990)
- 93 Schwartz RH: Fugue in T-lymphocyte recognition. *Nature* 23: 738-739 (1987)
- 94 Silvennoinen-Kassinen S, Karvonen J, Ikäheimo I: Restricted and Individual Usage of T-Cell Receptor β -Gene Variables in Nickel-Induced CD4+ and CD8+ Cells. *Scand J Immunol* 48: 99-102 (1998)
- 95 Sinigaglia F: The Molecular Basis of Metal Recognition by T Cells. *J Invest Dermatol* 102: 398-401 (1994)
- 96 Stauffer RN: Ten-year follow-up study of total hip replacement with particular reference to roentgenographic loosening of the components. *J Bone Joint Surg* 73: 38-42 (1982)
- 97 Thestrup-Pedersen K, Larsen GC, Ronnervig J: The immunology of contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 20: 81-92 (1989)
- 98 Toumbis CA, Kronick LJ, Wooley PH, Nasser S: Total Joint Arthroplasty and the Immun Response. *Semin Arthritis Rheum* 27: 44-47 (1997)
- 99 Vollmer J, Fritz M, Dormoy A, Weltzien H, Moulon C: Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity. *Eur J Immunol* 27: 1865-1874 (1997)
- 100 Von Blomberg-van der Flier M, Van der Burg CKH, Pos O, Van de Plassche-Boers EM, Bruynzeel DP, Garotta G, Scheper RJ: In Vitro Studies in Nickel Allergy: Diagnostic Value of a dual Parameter Analysis. *J Invest Dermatol* 88: 362-368 (1987)
- 101 Wapner KLW: Implications of Metallic Corrosion in Total Knee Arthroplasty. *Clin Orthop* 271: 12-20 (1991)

102 Waterman AH, Schrik JJ: Allergy in hip arthroplasty. Contact Dermatitis 13: 294-301 (1985)

103 Weyand CM, Geisler A, Brack A, Bolander ME, Goronzy JJ: Oligoclonal T-Cell Proliferation and Interferon-gamma. Produktion in Periprosthetic Inflammation. Lab Invest 78: 677-685 (1998)

104 Weyand CM: (2000 persönliche Mitteilung)

105 Webley M, Kates A, Snaith L: Metal sensitivity in patients with hinge arthroplasty of the knee. Ann Rheum Dis 37: 373-375 (1978)

106 Yamage M: In Vitro Tests on Patients with Metal Allergies. Hefte zur Unfallheilkunde 189: 890-898 (1987)

107 Ziegler V, Hohndorf H: Animal experiments with nickel-chromium-molybdenum implants. Contact dermatitis 10: 314-315 (1984)

108 Zipple J, Meyer-Ralfs M: Themistocles Gluck (1853-1942), pioneer in endoprosthetics. Z Orthop Ihre Grenzgeb 113:134-139 (1975)