

Aus dem
CharitéCentrum 5 für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Molekularbiologische und histopathologische Klassifizierung und Typisierung chronischer Gelenkerkrankungen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Lars Morawietz
geboren am 09.09.1973 in Bünde/Westfalen

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Röcken
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Irina Berger
Datum der letzten Prüfung: 08.02.2010

Für meine Eltern Edda und Walter Morawietz.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
1.1. Epidemiologie chronischer Gelenkerkrankungen	5
1.2. Wertigkeit der histopathologischen Synovialmembran-Diagnostik	7
1.3. Endoprothetik: Adäquate Therapieoption bei symptomatischen Gelenkschäden.....	8
1.4. Ursachen und Ausprägungen der Endoprothesenlockerung	10
1.5. Chitinase-1, ein potenzieller Marker der abriebinduzierten Endoprothesenlockerung.	12
Ziele.....	14
Ergebnisse	15
Graduierung chronischer Synovialitiden.....	15
3.1.1. Synovialitis-Score: Ein neues histopathologisches Graduierungssystem mit einer hohen diagnostischen Wertigkeit	15
3.1.2. Validierung der semiquantitativen Befunderhebung des Synovialitis-Scores durch computerassistierte Bildanalyse	17
Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen	19
3.2.1. Anhand histopathologischer Charakteristika lassen sich vier Typen der periprothetischen Membran unterscheiden	19
3.2.2. Möglichkeiten und Grenzen der Lockerungsmembrandiagnostik im intraoperativen Schnellschnitt	21
3.2.3. Mittels Immunhistologie wird erstmals ein optimaler Grenzwert für die Anzahl neutrophiler Granulozyten zur Diagnose einer infektiösen Prothesenlockerung bestimmt	23
Molekularbiologische Charakterisierung der periprothetischen Membran.....	25
3.3.1. Untersuchung und Validierung von Genexpressionsprofilen der abriebinduzierten und infektiösen periprothetischen Membran.....	25
3.3.2. Die Relevanz der Chitinase-1 für die Pathogenese und Früherkennung der Endoprothesenlockerung	27
Diskussion	29
4.1. Ein neues Graduierungssystem zur histopathologischen Differenzialdiagnostik chronischer Synovialitiden	29
4.2. Ein neues Klassifikationssystem zur histopathologischen Diagnostik der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen.....	31
4.3. Evaluation potenzieller Früherkennungsmarker der Endoprothesenlockerung	34
4.4. Stellungnahme zur Wertigkeit der Genexpressionsanalysen	36
4.5. Die Rolle der Pathologie in der Beurteilung orthopädischer Krankheitsbilder	39
Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis.....	42
Danksagung.....	54
Erklärung.....	55

Einleitung

1.1. Epidemiologie chronischer Gelenkerkrankungen

Da aufgrund der steigenden Lebenserwartung die Häufigkeit von Erkrankungen des Bewegungsapparats zunimmt, wurde das erste Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als „Bone and Joint Decade“ ausgerufen (24). Von dem demografischen Wandel ist eine Industrienation wie Deutschland besonders betroffen. Ein Großteil der Bevölkerung leidet unter den unterschiedlichen Gelenkerkrankungen, so dass sich 15% der Deutschen mindestens einmal im Jahr damit in ärztliche Behandlung begeben. Als Folge dessen stehen laut des Gesundheitsberichts des Robert-Koch-Instituts die Ausgaben für Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems mit 31 Milliarden Euro, entsprechend 13%, an dritter Stelle hinter den Aufwendungen für Herz-Kreislauf-Leiden und Erkrankungen des Verdauungssystems (116). Angesichts der Tatsache, dass 40% aller Arbeitsunfähigkeiten und Frühberentungen durch Erkrankungen des Bewegungsapparats entstehen, werden die volkswirtschaftlichen Folgekosten als deutlich höher eingeschätzt, beispielsweise beziffert sie die Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Unfallchirurgie auf insgesamt 100 Milliarden Euro pro Jahr (114).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen manifestiert sich im Bereich der Gelenke. Es handelt sich dabei sowohl um degenerative als auch um primär entzündliche, metabolische oder neoplastische Leiden (54). Die Gemeinsamkeit dieser vielfältigen Krankheiten ist, dass sie chronisch verlaufen und mit Schmerzen und Bewegungseinschränkungen einhergehen. Die häufigsten Leiden sind die Arthrose, eingeschlossen die Folgezustände traumatischer Schädigungen bzw. angeborener Fehlstellungen, sowie die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (82). Metabolische Gelenkleiden wie die Gicht oder die seltenen Speichererkrankungen sowie die ebenfalls seltenen Neoplasien der Gelenke sollen im Folgenden nicht weiter besprochen werden.

Die Arthrose ist definiert als eine mechanische Zerstörung des Gelenkknorpels, die nicht durch eine andere identifizierbare und klinisch, radiologisch oder laborchemisch diagnostizierte Erkrankung hervorgerufen wird (82). Sie ist die Folge der fortwährenden Fehlbelastung der Gelenkflächen, die zu einem mechanischen Abrieb des Gelenkknorpels führt (80, 34). Die Hypothese, dass der Krankheit ein definierter biochemischer,

möglicherweise genetisch determinierter Defekt der Knorpelmatrix zugrunde liegt, konnte bisher nicht zweifelsfrei belegt werden. Die Prävalenz der Erkrankung nimmt bei beiden Geschlechtern mit steigendem Lebensalter zu. Beispielsweise sind im Alter von 80 Jahren 55% der Männer und 70% der Frauen von einer definitiven Arthrose (Grad 2) betroffen, und davon leiden jeweils 19% der Männer und Frauen unter einer zumindest mittelschweren (Grad 3) Arthrose (50). Die Gradeinteilung von 0 (gesund) bis 4 (schwerster Befund) basiert auf radiologischen Kriterien, in erster Linie Osteophyten, Gelenkspaltverschmälerung und subchondralen Pseudozysten (so genannte Geröllzysten) (33). Das Befallsmuster der unterschiedlichen Gelenke sowie die subjektiven Beschwerden sind von der individuellen Belastung abhängig (115). Radiologische Arthrosezeichen sind am häufigsten an den Händen, insbesondere den Interphalangealgelenken zu finden, gefolgt vom Großzehengrundgelenk, dem Knie- und dem Hüftgelenk sowie der zervikalen und lumbalen Wirbelsäule (25, 28). Die häufigsten therapiebedürftigen subjektiven Beschwerden werden jedoch von der Hüft- und Kniegelenkarthrose verursacht (106).

Unter dem Begriff der „rheumatischen Erkrankungen“ oder chronischen Gelenkentzündungen werden entzündliche, nicht-degenerative Leiden zusammengefasst (81). Hierbei handelt es sich um verschiedene Krankheitsbilder, die sich hinsichtlich Befallsmuster, Verlauf und Laborparametern unterscheiden. Eine exakte Klassifikation und Nomenklatur dieser Krankheiten ist Gegenstand kontroverser Diskussionen, als Minimalkonsens werden die rheumatoide Arthritis (RA) oder chronische Polyarthritiden (CP) mit ihren Sonderformen (z.B. juvenile CP, Still-Syndrom), die Spondylarthritiden einschließlich der Psoriasisarthritis (PsA), die reaktiven Arthritiden (ReA) wie z.B. das Reiter-Syndrom und Gelenkmanifestationen im Rahmen systemischer entzündlicher Erkrankungen (z.B. Lupus erythematodes, systemische Sklerose) und vaskulitischer Syndrome unterschieden (95). Ebenso wie die Arthrose treten sie bei allen sozialen Schichten und ethnischen Gruppen auf, scheinen jedoch nur die Spezies Mensch zu betreffen, und speziell die RA ist möglicherweise erst nach der Entdeckung Amerikas erstmals in Europa aufgetreten (118, 120). Im Gegensatz dazu sind Zeichen der Arthrose schon bei ägyptischen Mumien zu finden, und nahezu alle Säugetierarten können von der Arthrose betroffen sein (96). Die Prävalenz der RA und der Spondylarthritiden beträgt jeweils ca. 1% mit leichten regionalen Unterschieden sowie einem häufigeren Auftreten beim weiblichen Geschlecht (124). Die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter, insbesondere ab dem 50. Lebensjahr zu (40). Die Ätiologie der chronischen Arthritiden ist nach wie vor ungeklärt. Als Auslöser werden einerseits bakterielle oder virale Erreger und andererseits körpereigene Antigene diskutiert, und die Perpetuation des Krankheitsprozesses

scheint auf eine individuelle, möglicherweise genetisch bedingte Hyperreaktivität des Immunsystems zurückzuführen sein, wie z.B. die häufige Assoziation der Spondylarthritiden mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 nahe legt (19, 32). Unbehandelt schreiten die chronischen Gelenkentzündungen stetig fort und führen schließlich zu einer Zerstörung der betroffenen Gelenke, die mit Schmerzen und Beweglichkeitsverlust einhergeht (139).

1.2. Wertigkeit der histopathologischen Synovialmembran-Diagnostik

Die oben genannten Gelenkerkrankungen gehen mit histomorphologischen Veränderungen in der Synovialmembran einher. Gemeinsam ist allen Entitäten, dass sie ein Entzündungszellinfiltrat hervorrufen, welches überwiegend aus B- und T-Lymphozyten besteht. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung des synovialen Stromas, was sich in einer Proliferation von Kapillaren und Fibroblasten manifestiert. Drittens ist regelmäßig eine Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht zu beobachten (62, 81, 82). Diese Veränderungen treten mehr oder weniger ausgeprägt bei allen Gelenkerkrankungen auf und sind für keine Krankheitsentität charakteristisch oder gar beweisend. Für einzelne Diagnosen existieren jedoch auch spezifische Veränderungen. Beispielsweise kann die RA zur Ausbildung von fibrinoiden Nekrosen oder Rheumagranulomen in der Synovialmembran führen. Problematisch ist jedoch, dass dieses charakteristische Bild nur in etwa fünf Prozent aller Fälle beobachtet werden kann. Nur ein kleiner Teil der Gelenkerkrankungen wie zum Beispiel die Kristallarthropathien oder die Tumoren zeigt regelmäßig spezifische histopathologische Veränderungen, anhand derer eine eindeutige Diagnose möglich ist (22). Insbesondere in der Tumorpathologie muss die definitive Diagnose immer am histologischen Präparat gestellt werden, da klinisch und radiologisch allein eine sichere Dignitätsbeurteilung, beispielsweise die Unterscheidung zwischen Synovialsarkom und tenosynovialen Riesenzelltumor, und damit die Wahl der richtigen Therapie nicht möglich ist (31, 128). In der diagnostischen Wertigkeit unterscheidet sich die Entzündungspathologie aber von der Tumorpathologie. Da die oben genannten degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen in vielen Fällen lediglich uncharakteristische chronische Entzündungszeichen aufweisen, sind sie histopathologisch trotz der Vielfalt an Ätiologien, Befallsmustern und Verläufen nicht eindeutig voneinander zu differenzieren (37). Selbst die Unterscheidung zwischen entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen fällt bisher schwer (62, 69). Die definitive Diagnose der Synovialitiden stützt sich derzeit vielmehr auf

klinische, laborchemische und radiologische Befunde (2, 17, 84).

Bei der Definition von Kriterien zur Diagnose der RA hatte die American Rheumatism Association ARA in ihrer ursprünglichen Version von 1958 auch den histologischen Befund einbezogen; dieser wurde in die modifizierten Kriterien von 1987 jedoch nicht mehr aufgenommen. Grund dafür war weniger eine zu geringe Aussagekraft der Biopsate – die Spezifität wurde mit 95,0% und die Exaktheit mit 68,7% angegeben – als vielmehr die Tatsache, dass eine Biopsie von niedergelassenen Rheumatologen nur selten durchgeführt wurde (5). Dies lag auch daran, dass manche Manifestationsorte wie z.B. die bei der ankylosierenden Spondylitis betroffenen Sakroiliakgelenke und Intervertebralgelenke einer Biopsie schwer zugänglich sind. Allerdings ist ein Teil der Erkrankungsfälle nicht anhand der klinischen Kriterien eindeutig zu klären. In solchen Fällen wird als zusätzliche diagnostische Maßnahme ein Biopsat zur histopathologischen Untersuchung gewonnen (113). Außerdem werden im Rahmen therapeutischer Eingriffe, in erster Linie Gelenkersatzoperationen, Synovialektomiepräparate routinemäßig zur Pathologie übersandt (60). Zur Befundung solcher Gewebeproben besteht jedoch bisher keine einvernehmliche Richtlinie. Da, wie oben beschrieben, die Veränderungen häufig uncharakteristisch sind, erschien ein System zur semiquantitativen Klassifizierung und Graduierung der Entzündung, beispielsweise analog zur Sydney-Klassifikation der Gastritis, erstrebenswert und sinnvoll (43). Damit könnten Krankheitsverläufe und Therapieerfolge beobachtet werden und interindividuelle Unterschiede objektiv erfasst werden (125). Als Graduierungskriterien eigneten sich in erster Linie die oben genannten, regelmäßig anzutreffenden Elemente der chronischen Synovialitis, a) die Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht, b) das lymphozytäre entzündliche Infiltrat und c) die Aktivierung des synovialen Stromas.

1.3. Endoprothetik: Adäquate Therapieoption bei symptomatischen Gelenkschäden

Sowohl degenerative als auch primär entzündliche Gelenkerkrankungen führen zu einer Schädigung des Gelenkknorpels und im weiteren Verlauf möglicherweise der darunter liegenden Knochendeckplatte. Die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels ist äußerst limitiert (4). Unter dem Schlagwort des “Tissue Engineering” werden derzeit Anstrengungen unternommen, umschriebene posttraumatische Knorpeldefekte mittels passgenauer Transplantate wieder aufzubauen, was für die großflächigen Abnutzungserscheinungen der

Arthrose jedoch die technische Machbarkeit übersteigt (4, 30, 68). Bei den rheumatischen Erkrankungen gab es in den vergangenen Jahren gute Behandlungserfolge durch zunehmend spezifischere antiinflammatorische Medikamente aus der Gruppe der so genannten "Biologicals", zu denen Antikörper oder lösliche Rezeptoren gegen die pathogenetisch wichtigen Zytokine TNF-alpha oder Interleukin-1 oder gegen das Lymphozytenantigen CD20 zählen (21, 26, 61). Durch eine solche kostenintensive Therapie kann die Entzündung gut kontrolliert werden, allerdings lässt sich ein bereits entstandener Knorpel- oder Knochenschaden nicht mehr rückgängig machen.

Daher ist bei Befall der Hüft- oder Kniegelenke die Standardtherapie zur Behebung der chronischen Schmerzen, der Bewegungseinschränkungen und der damit verbundenen Fehlhaltungen die Implantation einer Endoprothese (10). Hierbei werden die artikulierenden Gelenkflächen vollständig durch eine Prothese aus Metall, Keramik oder Kunststoff ersetzt und mittels eines Metallschafts bzw. einer Metallpfanne im Knochen verankert. Seit der wegweisenden Verbesserungen der in den 1930er Jahren eingeführten Prothesenmodelle durch Charnley in den 1960er Jahren ist der Einsatz von künstlichen Gelenken zu einer häufigen Operation avanciert (23, 135); so wurden in Deutschland im Jahr 2006 147.000 Hüft- und 125.000 Kniegelenktotalendoprothesen implantiert sowie jeweils mehrere Tausend künstlicher Schulter-, Ellenbogen- und Sprunggelenke (65, 75). Der Kostenaufwand beträgt etwa 8.000 Euro pro Eingriff. Die Recherche verlässlicher Daten zur Häufigkeit der Indikationen ist schwierig, da der Informationsrücklauf zu dem 1994 geschaffenen Deutschen Endoprothesen-Register lediglich 5% der tatsächlich durchgeführten Operationen abdeckt. Vermutlich werden weit über 50% der Prothesen bei fortgeschrittener Arthrose implantiert. Frakturen stehen an zweiter und die rheumatischen Erkrankungen an dritter Stelle der Indikationen (76, 128). Weitere Gründe sind die aseptische Hüftkopfnekrose und die Rekonstruktion nach Entfernung von Knochentumoren oder schweren, destruktiven Osteomyelitiden. Bei der primären Implantation sind die Patienten durchschnittlich 60 Jahre alt (39, 86, 89). Prinzipiell können die Prothesen mit Knochenzement aus Polymethylmethacrylat (PMMA) fixiert werden, was eine frühe postoperative Mobilisation ermöglicht, oder sie werden unzementiert implantiert, mit dem Nachteil einer längeren Rehabilitationsphase und dem Vorteil eines festeren und längeren Haltes (75).

1.4. Ursachen und Ausprägungen der Endoprothesenlockerung

Das wesentliche Problem der Endoprothetik ist – neben den seltenen akuten post- und intraoperativen Komplikationen - die so genannte Endoprothesenlockerung. 5% bis 12% der Prothesenträger entwickeln im Laufe von 10 Jahren Beschwerden des operierten Gelenks, welche unter diesem Begriff zusammengefasst werden. Die Prothesen erscheinen äußerlich kaum locker, vielmehr leiden die Patienten unter Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und gegebenenfalls unter allgemeinen Entzündungszeichen (10, 64, 67).

Prinzipiell ist eine stetige Zunahme der durchschnittlichen Funktionsdauer von Hüftendoprothesen zu verzeichnen, da Materialien und Operationstechniken kontinuierlich verbessert werden. Da Endoprothesen jedoch zunehmend auch jungen Menschen implantiert werden und die Lebenserwartung allgemein steigt, ist damit zu rechnen, dass immer mehr Patienten eine Endoprothesenlockerung erleben werden. Nach 20 Jahren sinkt die Funktionsrate der Endoprothesen auf etwa 75% (39). Wie mehrere retrospektive Untersuchungen nahe legen, scheint die zur Primärimplantation führende Grundkrankheit, insbesondere im Vergleich von Arthrose gegenüber chronischen Gelenkentzündungen, keinen Einfluss auf die Prothesenstandzeit zu haben (55).

„Aseptische“ und „septische“ Lockerung

Prothesen, die Schmerzen hervorrufen, werden klinisch und radiologisch untersucht (15, 127). Bei gelockerten Endoprothesen sind osteolytische Spalträume zwischen Implantat und Knochen zu sehen (35). Diese Spalten sind ein Zeichen dafür, dass die feste Verankerung zwischen Knochen und Prothese aufgehoben ist. Man geht davon aus, dass dadurch Mikroschwingungen der Prothese ermöglicht werden, und dass diese Schwingungen für die Schmerzen verantwortlich sind (138). Je nachdem, ob darüber hinaus auch Entzündungszeichen wie Rötung/Überwärmung des Gelenks, subfebrile Temperaturen, erhöhtes C-reaktives Protein im Serum oder erhöhter Lymphozytengehalt im Blutbild bestehen, wird der Begriff der „aseptischen“ oder „septischen“ Lockerung verwendet. Eindeutige Kriterien einer so genannten septischen Lockerung sind die Aspiration eitrigem Material oder der Nachweis ausreichender Keimmengen bei der Punktion des Gelenks (11). Die aseptische Lockerung tritt mit über 80% wesentlich häufiger auf (83).

Zwei Pathogenesemechanismen werden für die aseptische Lockerung verantwortlich gemacht: Zum einen entstehen bei der Belastung der Prothese Abriebprodukte aus Polyethylen (PE), PMMA-Zement, Keramik oder Metall, die eine Stimulation von

Makrophagen auslösen, welche zu periprothetischen Osteolysen führen (42, 56, 63). Zum anderen können ein Mangel an initialer Stabilität des Implantates und eine inadäquate Belastung die suffiziente Osteointegration der Prothese verhindern, was besonders bei unzementierten Prothesen ein wesentliches Problem sein kann (74).

Die septische Lockerung ist die Folge einer bakteriellen Infektion des periprothetischen Gewebes. Diese kann entweder durch eine direkte Kontamination während der Primäroperation entstehen, oder es kommt zu einer sekundären hämatogenen Keimbesiedelung einer primär keimfrei implantierten Prothese im Rahmen einer Bakteriämie, wie sie z.B. nach Zahnextraktion oder bei chronischen Hautulzerationen auftreten kann (20, 38, 59, 98). Von einer hämatogenen Infektion wird ausgegangen, wenn die Beschwerden später als 2 Jahre nach der Primärimplantation eintreten.

Die periprothetische Lockerungsmembran

Beide Formen der Prothesenlockerung können letztlich nur durch eine Revisionsoperation behandelt werden, bei der die alte Endoprothese entfernt und der Bereich zwischen altem Implantat und Knochen ausgeschabt wird, bevor eine neue Prothese eingesetzt wird (14). Sowohl bei der aseptischen als auch bei der septischen Prothesenlockerung hat sich ein wechselnd breiter Bindegewebssaum zwischen Knochen und Prothese gebildet, welcher als periprothetische Membran bezeichnet wird (44, 47). Dieses Gewebe wird im Rahmen der Wechseloperation zur histopathologischen Untersuchung übersandt und zeigt je nach Ätiologie unterschiedliche Veränderungen, die zur Klärung der Lockerungsursache herangezogen werden könnten. Von der periprothetischen Membran muss die so genannte Neokapsel oder Neosynovialis abgegrenzt werden, welche sich um das künstliche Gelenk herum bildet. Diese besitzt zwar auch Kontakt zur Prothese, aber nicht zum Knochen und ist daher nicht direkt für die Osteolysen verantwortlich (Abb. 1). Das Neokapselgewebe kann ebenfalls diagnostisch genutzt werden, da es mit dem periprothetischen Raum kommuniziert (129) und die histologischen Veränderungen bei einem Patienten in beiden Geweben ähnlich sind.

Bisher wurden mehrere, sehr detaillierte, auf die Anwendung in wissenschaftlichen Studien ausgerichtete Systeme zur Quantifikation der einzelnen Elemente der Lockerungsmembran vorgeschlagen (107), aber eine übersichtliche, in der Praxis problemlos anzuwendende Konsensus-Klassifikation, die den Bedürfnissen der einsendenden Orthopäden und der Pathologen gleichermaßen gerecht wird, fehlte bislang. Die klinische Diagnostik der Ursache der Endoprothesenlockerung ist jedoch unsicher und erfordert eine zuverlässige histologische

Klärung, damit in Abhängigkeit von der Lockerungsursache ein adäquates Wechselregime gewählt werden kann. Außerdem kann die standardisierte Diagnostik der periprothetischen Membran bestimmte, möglicherweise ungeeignete Implantattypen identifizieren, die zukünftig nicht mehr verwendet werden sollten.

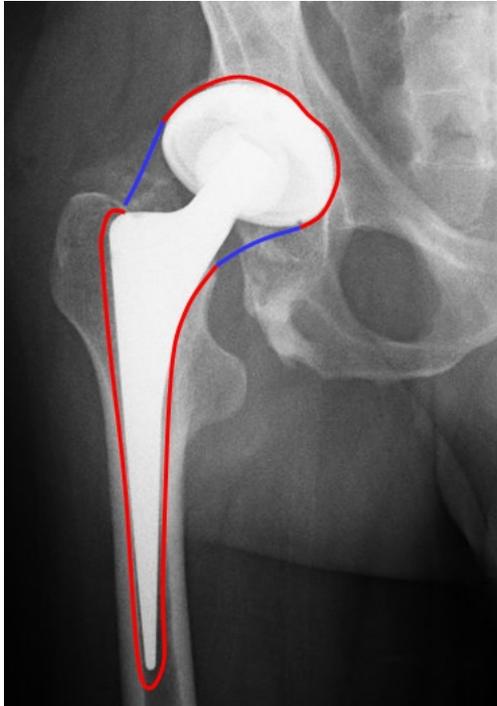


Abb. 1. Radiologische Darstellung einer Totalendoprothese zum Ersatz des rechten Hüftgelenks. Das Gewebe im Rot markierten Bereich zwischen Knochen und Prothese wird als periprothetische Membran bezeichnet. Im Blau markierten Bereich befindet sich die Neosynovialis.

1.5. Chitinase-1, ein potenzieller Marker der abriebinduzierten Endoprothesenlockerung

Die humane Chitinase-1, alternativ auch als Chitotriosidase bezeichnet, ist ein Enzym aus der Gruppe der Chitinasen (112). Diese sind in der Lage, die Spaltung der glykosidischen Bindungen des Polysaccharids Chitin zu katalysieren (12). Phylogenetisch gesehen handelt es sich um sehr alte Substanzen, die bereits in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vorkommen (9, 13). Beim Menschen wurden Chitinasen im Blut, in Chondrozyten, synovialen Deckzellen, Magensaft und Tränenflüssigkeit nachgewiesen (8, 49, 101). Humane Makrophagen produzieren nach Stimulation mit Fremdkörperpartikeln sowie unter Einfluss von Interferon-gamma oder Tumornekrosefaktor-alpha vermehrt Chitinase-1 (77, 131). Eine stark erhöhte Enzymaktivität wurde bei Patienten mit der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Gaucher gefunden, wofür sie mittlerweile als diagnostischer Marker etabliert wurde (52). Ebenso ist

die Aktivität im Serum bei Patienten mit Sarkoidose, nicht jedoch mit Tuberkulose, erhöht (7). In Meerschweinchen wurde eine verstärkte Chitinase-Enzymaktivität nach systemischer Infektion mit Pilzen festgestellt (99). Eine Relevanz der Chitinase-1 für das menschliche Immunsystem ist dennoch fraglich. Es ist bekannt, dass bei 6% der Bevölkerung keinerlei Enzymaktivität nachweisbar ist, was jedoch keinen Krankheitswert zu besitzen scheint (13, 78). Diese Individuen leiden nicht häufiger unter Infektionskrankheiten als Menschen mit erhaltener Enzymaktivität. Der Enzymmangel beruht auf einer Duplikation von 24 Basenpaaren im Exon 10 des Chitinase-1-Gens, die zu einem funktionslosen Genprodukt führt. 35% der Kaukasier sind heterozygot und 6% homozygot für die mutierte Genvariante (117), bei letzteren ist keine Enzymaktivität im peripheren Blut nachweisbar.

Da die abriebinduzierter Endoprothesenlockerung von Makrophagen im periprothetischen Spalt initiiert und perpetuiert wird, und da stimulierte Makrophagen mitunter in großen Mengen Chitinase-1 sezernieren, war die Hypothese nahe liegend, dass bei Patienten mit abriebinduzierter Lockerung die Chitinase-1 messbar erhöht sei, was möglicherweise diagnostisch genutzt werden könnte. Die unter 3.5. dargestellten Genexpressionsprofile waren ein Hinweis auf diese Vermutung.

Ziele

Die Möglichkeiten der histopathologischen Diagnostik auf dem Gebiet der orthopädischen Pathologie werden noch nicht hinreichend ausgeschöpft.

Zur Erhöhung der Aussagekraft der histologischen Analyse bei chronischen Gelenkerkrankungen sollten

- die geweblichen Veränderungen der Synovialmembran bei degenerativen und rheumatischen Erkrankungen standardisiert erfasst und quantifiziert werden und
- die Korrelation zwischen diesen geweblichen Veränderungen und den klinischen Diagnosen evaluiert werden.

Um eine standardisierte und therapeutisch relevante histopathologische Diagnostik der periprothetischen Membran zu ermöglichen, sollten

- die zelluläre Zusammensetzung der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen untersucht werden und
- darauf aufbauend ein Klassifikationssystem für die diagnostische Routine entworfen und dessen Validität überprüft werden.

Zur Verbesserung der Früherkennung und zum besseren Verständnis der Pathogenese der Endoprothesenlockerung sollte

- periprothetisches Membrangewebe mittels Genexpressionsprofilen, RT-PCR und Immunhistologie auf eventuelle neue diagnostische Marker oder therapeutische Angriffspunkte analysiert werden und
- die Eignung der Chitinase-1-Aktivitätsmessung als Test zur Früherkennung einer Endoprothesenlockerung evaluiert werden.

Ergebnisse

Graduierung chronischer Synovialitiden

3.1.1. Synovialitis-Score: Ein neues histopathologisches Graduierungssystem mit einer hohen diagnostischen Wertigkeit

Literatur: Krenn V*, Morawietz L*, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, Haupl T. Synovitis-Score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 2006;49:358-364.

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Zusammenfassung

Diese Studie basiert auf 559 Synovektomiepräparaten bzw. Synovialisbiopsaten, die zwischen 1998 und 2004 in den Universitätsklinikum Würzburg und Berlin zur histopathologischen Untersuchung eingesandt worden waren. Die Proben repräsentierten das Spektrum der häufigsten klinischen Diagnosen: Arthrose (n=212), rheumatoide Arthritis (n=246), Psoriasisarthritis (n=22), reaktive Arthritis (n=9), posttraumatische Arthritis (n=21) und gesunde Kontrollen (n=49).

Es zeigte sich, dass eine semiquantitative Graduierung der morphologischen Veränderungen am besten nach der in Tabelle 1 der angefügten Publikation dargestellten Einteilung durchzuführen war, welche in einem Score resultiert, der von null bis neun Punkten reicht.

Zwei unabhängige Befunder erzielten weitgehend übereinstimmende Befunde, der Korrelationskoeffizient zwischen beiden betrug nach Pearson $r=0,941$.

Die Medianwerte der Scores betrugen für die Kontrollproben 1, Arthrose 1, posttraumatische Arthropathie 2, Psoriasisarthritis 3,5, und für die reaktive und die rheumatoide Arthritis jeweils 5 Punkte. Die statistische Analyse zeigte, dass die Gruppe der primär entzündlichen Erkrankungen Psoriasisarthritis, reaktive und rheumatoide Arthritis signifikant höhere Scores ergaben als die nicht-entzündlichen Proben. Fasste man diese Gruppen zusammen, so lagen

die Scores der primär entzündlichen Erkrankungen in 192 von 277 Fällen (69,3%) zwischen Werten von fünf bis neun und in 85 Fällen (30,7%) zwischen null und vier, während die Scores der nicht-entzündlichen Proben in 270 von 282 Fällen (95,7%) zwischen null und vier und in 10 Fällen (4,3%) zwischen fünf und neun betragen. Legte man eine Grenze zwischen vier und fünf Punkten, so betragen Sensitivität und Spezifität des Synovialitis-Scores für die Diagnose primär entzündlicher Gelenkerkrankungen 69,3% bzw. 95,7%.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass der vorgeschlagene Synovialitis-Score eine standardisierte Graduierung chronischer Synovialitiden ermöglicht und dass Scorewerte ab fünf von neun Punkten für eine Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis sprechen, während Scorewerte von unter fünf Punkten die Diagnose einer degenerativen Gelenkerkrankung favorisieren.

3.1.2. Validierung der semiquantitativen Befunderhebung des Synovialitis-Scores durch computerassistierte Bildanalyse

Literatur: Morawietz L*, Schaeper F*, Schroeder JH, Gansukh T, Baasanjav N, Krukemeyer MG, Gehrke T, Krenn V. Computer-assisted validation of the synovitis score. *Virchows Arch* 2008; Epub Feb 19

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Zusammenfassung

Aus dem zuvor beschriebenen Kollektiv wurden 71 Fälle ausgewählt, die einer computerassistierten Bildanalyse (CABA) zugeführt wurden. Die Fälle deckten das Spektrum niedrig- und hochgradiger Entzündungen ab und stammten sowohl von degenerativen als auch primär entzündlichen Erkrankungen. Mittels CABA wurde die Breite der synovialen Deckzellschicht in μm an zehn verschiedenen Lokalisationen innerhalb einer Probe gemessen, und die Zellen des synovialen Stromas und des entzündlichen Infiltrats wurden jeweils pro Gesichtsfeld bei hundertfacher Vergrößerung ausgezählt und die arithmetischen Mittelwerte für jeden Fall gebildet.

Die Deckzellschichtdicken betragen zwischen 6,2 und 73,3 μm mit einem arithmetischen Mittel von 29,7 μm , die Anzahl der Stromazellen lag zwischen 9,9 und 125,4 (Mittel 50,8) pro Gesichtsfeld, und die der Entzündungszellen zwischen 0 und 392,2 (Mittel 169,1).

Um diese Messwerte von metrischen Skalenniveaus mit den semiquantitativen Scores der Pathologen vergleichbar zu machen, wurde jeweils die Spannweite der Werte bestimmt, durch vier dividiert und so die Grenzen für die Score-Punktzahlen festgelegt. Dann wurde die Summe der drei Kriterien analog zum Synovialitis-Score ermittelt und mit diesem verglichen. In 20 der 71 Fälle (28%) stimmten die aus der CABA hervorgehenden Scores mit denen der Pathologen genau überein, in weiteren 20 Fällen gab es eine Diskrepanz von +/- einem Punkt und in 31 Fällen (44%) war die Abweichung größer als ein Punkt, mit einer höchsten Abweichung von fünf Punkten in zwei Fällen. Die Unterschiede waren – wenngleich in einzelnen Fällen deutlich – statistisch nicht signifikant, die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug nach dem Wilcoxon-Test $p=0,543$. Der Korrelationskoeffizient zwischen den durch CABA und durch die Pathologen ermittelten Scores betrug nach Spearman $r=0,725$.

Um die Ursachen für die Abweichungen zu ermitteln, wurden die Korrelationskoeffizienten für die drei Kriterien des Scores getrennt bestimmt, diese betragen $r=0,458$ für die Evaluation der Deckzellschichtdicke, $r=0,525$ für den Stromazellgehalt und $r=0,733$ für die Dichte des entzündlichen Infiltrats. Die größten Diskrepanzen traten offenbar bei der richtigen Bewertung der Deckzellschichtdicke auf. Daher wurde in einem zweiten Untersuchungsgang die Breite der Deckzellschicht von einem Pathologen nicht semiquantitativ eingeschätzt, sondern ausgezählt. Dies ergab mit $r=0,921$ eine deutlich bessere Korrelation.

Die durch die CABA ermittelten Synovialitis-Scores wurden nach Diagnosen unterteilt, wobei sich die Scores unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Kontroll- und den Arthroseproben ($p=0,484$), jedoch hochsignifikant zwischen diesen Gruppen und der rheumatoiden Arthritis (jeweils $p=0,000$).

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die semiquantitative Erhebung des Synovialitis-Scores durch einen Pathologen von der computerassistierten Bildanalyse objektiviert und bestätigt wird. Die Evaluation der Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht sollte jedoch verbessert werden, indem der Pathologe die Zelllagen an zehn Lokalisationen auszählt und das arithmetische Mittel bildet.

Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen

3.2.1. Anhand histopathologischer Charakteristika lassen sich vier Typen der periprothetischen Membran unterscheiden

Literatur: Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, Neidel J, Gehrke T, Frommelt L, Hansen T, Otto M, Barden B, Aigner T, Stiehl P, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Strobel P, Rader ChP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Bos I, Kriegsmann J, Hendrich C, Krenn V. Proposal a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. J Clin Pathol 2006;59:591-597

Zusammenfassung

Gegenstand der Untersuchung waren periprothetische Membranen von 370 Patienten, die im Rahmen von Prothesen-Wechseloperationen in den Jahren 2002 bis 2005 an der ENDO-Klinik Hamburg, dem Universitätsklinikum Münster und der Charité Universitätsmedizin Berlin entnommen worden waren. Diese wurden histomorphologisch untersucht, und in 242 Fällen wurde eine kulturelle mikrobiologische Untersuchung des Membrangewebes durchgeführt.

94,9% der Proben wiesen auswertbares periprothetisches Membrangewebe auf. Bei der Durchsicht wurde festgestellt, dass sich diese anhand weniger, eindeutiger Kriterien in vier Typen klassifizieren lassen:

Typ I, abriebinduzierter Typ: Das Membrangewebe ist von Makrophagen und multinukleären Riesenzellen vom Fremdkörpertyp durchsetzt. Im Zytoplasma dieser Zellen fanden sich Fremdkörperpartikel, die sich als Abrieb der Prothesenbestandteile (Knochenzement, Kontrastmittel, Polyethylen, Metall oder Keramik) identifizieren ließen. Neutrophile Granulozyten kamen nur sehr vereinzelt vor. Typ I machte mit 54,3% den größten Teil des Kollektivs aus.

Typ II, infektiöser Typ: Dieser zeichnete sich durch ein Granulationsgewebe aus, in dem überwiegend Kapillarproliferate, Fibroblasten, Lymphozyten, Plasmazellen und insbesondere

neutrophile Granulozyten vorkamen. Die neutrophilen Granulozyten wurden als wesentlich für die Diagnose dieses Typs angesehen. Der Frage, ab welcher Dichte von neutrophilen Granulozyten dieser Typ zu diagnostizieren ist, widmete sich eine eigene Studie, welche in Kapitel 3.7. wiedergegeben wird. Typ II war mit 19,7% der zweithäufigste Typ.

Typ III, Mischtyp: Dieser wies sowohl Areale auf, die dem Typ I entsprachen, als auch Abschnitte, die die Kriterien für Typ II erfüllten. Dies machte 5,4% der Fälle aus.

Typ IV: Dieser Typ wurde als „Indifferenztyp“, bzw. in der englischsprachigen Publikation als „indeterminate type“ bezeichnet, weil er weder Abriebpartikel oder eine Fremdkörperreaktion noch Granulationsgewebe oder neutrophile Granulozyten erkennen ließ. Diese Proben bestanden lediglich aus einem mittelgradig zeldichten kollagenen Bindegewebe, welches an der Oberfläche teilweise von einer schmalen synovialisähnlichen Deckzellschicht überkleidet oder mit einem zarten Fibrin saum bedeckt war. Typ IV wurde in 15,4% der Fälle diagnostiziert.

87,1% bzw. 85% der Fälle wurden von zwei bzw. drei unabhängigen Untersuchern übereinstimmend klassifiziert. Dissens zwischen verschiedenen Untersuchern bestand meistens darüber, ob ein Fall als Typ I oder IV bzw. als Typ II oder III zu klassifizieren sei.

In 89,7% der Fälle korrelierte die histologische Typisierung mit dem mikrobiologischen Befund, während in 5,6% trotz kulturellen Keimnachweises histologisch ein nicht-infektiöser Typ (Typ I oder IV) vorlag, und in 4,7% trotz negativen mikrobiologischen Befunds die Histologie für eine Infektion sprach (Typ II oder III).

Die durchschnittlichen Prothesenstandzeiten unterschieden sich zwischen den vier histologischen Typen signifikant ($p=0,000$) und betragen beim abriebinduzierten Typ 10,1 Jahre, beim infektiösen Typ 3,2, beim Mischtyp 4,5 und beim Indifferenztyp 5,4 Jahre.

Der abriebinduzierte Typ war mit 65,1% gegenüber 46,7% signifikant häufiger ($p=0,000$) bei den zementierten Prothesen, während der Indifferenztyp mit 24,3% gegenüber 10,1% signifikant öfter ($p=0,000$) bei den unazementierten Prothesen auftrat.

Zusammenfassend wurden mit dieser Arbeit erstmals Kriterien für die histopathologische Diagnostik der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen definiert und vier Typen der periprothetischen Membran voneinander unterschieden. Der Indifferenztyp (Typ IV) wurde dabei erstmals beschrieben. Zusätzlich zur histopathologischen Charakterisierung wurden auch die Häufigkeit dieser Typen und ihre Korrelation zur Prothesenstandzeit, zur Zementierung der Prothesen und zu mikrobiologischen Befunden beschrieben.

3.2.2. Möglichkeiten und Grenzen der Lockerungsmembrandiagnostik im intraoperativen Schnellschnitt

Die folgenden Ergebnisse einer noch nicht abgeschlossenen Arbeit finden sich nicht in einer der eingefügten Publikationen, sollen aber dennoch zusammenfassend dargestellt werden.

Da die infektiöse und die nicht-infektiöse Prothesenlockerung andere postoperative und teilweise auch andere operative Vorgehensweisen verlangen, könnte einer intraoperativen Schnellschnittdiagnostik der periprothetischen Membran eine besondere Bedeutung zukommen, die die kulturelle mikrobiologische Untersuchung nie erlangen kann. Die im Schnellschnitt üblicherweise angefertigten Gefrierschnitte unterscheiden sich histomorphologisch allerdings erheblich von den formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben, wie in Abb. 2 gegenübergestellt wird.

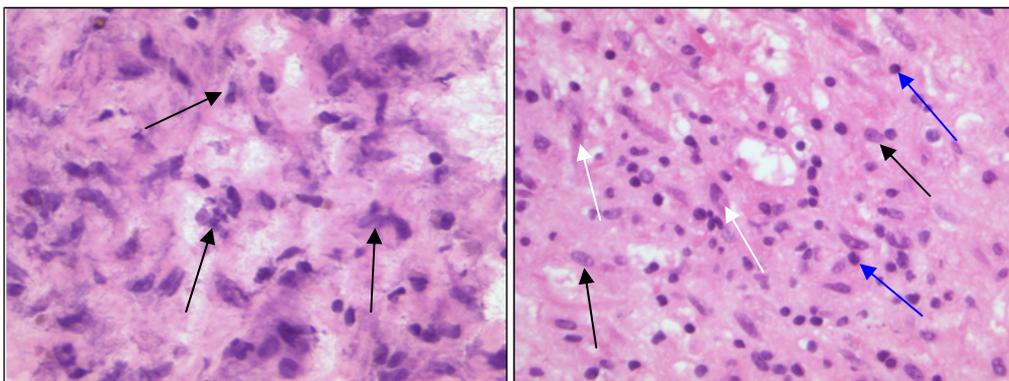


Abb. 2: Im Gefrierschnitt (links) weisen viele mechanisch alterierte Zellkerne eine granulozytenähnliche Morphologie auf (Pfeile). Erst am formalinfixierten, paraffineingebetteten Präparat desselben Falls (rechts) lässt sich erkennen, dass es sich um Makrophagen (schwarze Pfeile), Fibroblasten (weiße Pfeile) und Lymphozyten (blaue Pfeile) handelt. HE, Originalvergrößerung 400fach.

Deshalb wird untersucht, ob sich die unter 3.3. dargestellte Klassifikation der Lockerungsmembran unter Schnellschnittbedingungen anwenden lässt. Hierzu werden am Charité Campus Mitte bei Prothesen-Revisionsoperationen die periprothetischen Membranen ins Schnellschnittlabor eingesandt und in der üblichen Weise untersucht: Von einer Gewebefraktion von ca. 25x25x5mm wird ein Gefrierschnitt angefertigt, das restliche Gewebe wird formalinfixiert, anschließend komplett eingebettet, und vom Paraffinmaterial werden HE-Schnittpräparate angefertigt.

Bisher wurden auf diese Art 46 Fälle bearbeitet. Alle Proben waren in der endgültigen Paraffinhistologie klassifizierbar. Am Gefrierschnitt allerdings konnte sich der Autor in elf Fällen (24%) nicht auf eine Diagnose festlegen, da die technischen Artefakte zu ausgeprägt waren, um die diagnostisch relevanten Zelltypen eindeutig zu identifizieren. Von den übrigen 35 Fällen wurde zehnmal am Gefrierschnitt ein infektiöser Typ diagnostiziert, was sich am Paraffinmaterial in allen Fällen bestätigte. 15 Mal wurde zunächst ein abriebinduzierter Typ festgestellt, wovon sich später je ein Fall als infektiöser Typ, Mischtyp und Indifferenztyp herausstellte. Zehn Fälle wurden am Gefrierschnitt als Indifferenztyp befundet, wovon in sechs Fällen die Diagnose zum abriebinduzierten Typ geändert wurde. Zusammenfassend wurde in 26 von 46 Fällen (57%) die Schnellschnittdiagnose am Paraffinmaterial vollkommen bestätigt, während in 11 Fällen im Schnellschnitt keine Diagnosefestlegung erfolgte und in 9 Fällen die Schnellschnittdiagnose später revidiert wurde. Allerdings kam es für die therapeutisch relevante Frage, ob Anhalt für eine Infektion bestand (Typ II oder III) oder ausgeschlossen werden konnte (Typ I oder IV), nur zweimal zu einer Diskrepanz zwischen Schnellschnitt- und endgültigem Befund, so dass für diese Frage unter Berücksichtigung der neun im Schnellschnitt nicht entscheidbaren Befunde in 76% der Fälle eine definitive Diagnose gestellt wurde.

31 Gefrierschnitte wurden von einem zweiten Pathologen untersucht. Dieser hielt nur einen Fall für nicht beurteilbar, kam jedoch in acht Fällen (27%) zu abweichenden Klassifikationen zwischen Schnellschnitt- und Paraffinmaterial.

Eine Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.2.

Zusammenfassend zeigen diese präliminären Daten an einem noch zu vergrößernden Patientenkollektiv, dass die histopathologische Diagnostik der periprothetischen Membran als intraoperativer Schnellschnitt durchaus möglich ist. Allerdings ist durch die für Gefrierschnitte typischen Artefakte die Beurteilbarkeit eingeschränkt. Etwa ein Viertel aller Fälle ist als Schnellschnitt nicht eindeutig beurteilbar, und es ist vorzuziehen, in solchen Fällen keine intraoperative Diagnose zu stellen, da ansonsten die Möglichkeit besteht, dass diese nachträglich revidiert werden muss.

3.2.3. Mittels Immunhistologie wird erstmals ein optimaler Grenzwert für die Anzahl neutrophiler Granulozyten zur Diagnose einer infektiösen Prothesenlockerung bestimmt

Literatur: Morawietz L*, Tiddens O*, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, Perka C, Krenn V. 23 neutrophil granulocytes in ten high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endprosthesis loosening. *Histopathology in press*

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Zusammenfassung

Zur genaueren Festlegung der Kriterien für die Diagnose einer periprothetischen Membran vom infektiösen Typ wurden 147 Fälle aus dem in Kapitel 3.4. beschriebenen Kollektiv ausgewählt. Ein mikrobiologischer Befund lag von allen Proben vor. Die Anzahl PAS-positiver bzw. CD15-positiver neutrophiler Granulozyten wurde in je zehn Gesichtsfeldern ausgezählt.

Mittels CD15-Immunhistologie wurden signifikant ($p=0,000$, Wilcoxon-Test) mehr neutrophile Granulozyten dargestellt als in der PAS-Färbung. Im Vergleich mit der ursprünglichen Klassifikation der Proben, welche an den HE-Schnitten erfolgt war, zeigte die immunhistologisch bestimmte Granulozytenzahl eine gute Übereinstimmung dahingehend, dass bei den als abriebinduziert klassifizierten Fällen im Mittel lediglich 2,3 Zellen, beim infektiösen Typ hingegen 65,4 und beim Mischtyp 42,6 Granulozyten ausgezählt wurden.

In den Proben, in denen mikrobiologisch Bakterien nachgewiesen wurden, war die Anzahl CD15-positiver Zellen mit durchschnittlich 60,4 signifikant ($p=0,000$) höher als in den Proben ohne Keimnachweis (arithmetisches Mittel 5,8). Ähnlich fiel der Vergleich zwischen Histologie und klinischem Bild aus: In den Fällen, die für nicht-infektiös gehalten wurden, war die Granulozytenzahl mit durchschnittlich 5,2 signifikant ($p=0,000$) niedriger als in den Fällen, die verdächtig auf eine Infektion waren (25,9 Granulozyten) und in denen, die als sicher infektiös galten (62,4).

Angesichts des Verlaufs der ROC-Kurve wurde ein optimaler Grenzwert von 23 CD15-positiven Granulozyten in 10 Gesichtsfeldern ermittelt, bei dem bezogen auf den

mikrobiologischen Befund als bisherigen Goldstandard die Histologie eine Sensitivität von 73% und eine Spezifität von 95% erreichte. Bezogen auf die klinische Verdachtsdiagnose lag der optimale Grenzwert ebenfalls bei 23 Zellen und führte dabei zu einer Sensitivität von 77 und einer Spezifität von 97%.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten zur zuverlässigen Unterscheidung zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Prothesenlockerung geeignet ist. Als optimaler Grenzwert für die Diagnose eines infektiösen Typs der periprothetischen Membran wurden mindestens 23 neutrophile Granulozyten in insgesamt zehn Gesichtsfeldern ermittelt.

Molekularbiologische Charakterisierung der periprothetischen Membran

3.3.1. Untersuchung und Validierung von Genexpressionsprofilen der abriebinduzierten und infektiösen periprothetischen Membran

Literatur: Morawietz L*, Gehrke T*, Frommelt L, Gratze P, Bosio A, Moller J, Gerstmayer B, Krenn V. Differential gene expression in the periprosthetic membrane: lubricin as a new possible pathogenetic factor in prosthesis loosening. *Virchows Arch* 2003;443:57-66.

Guenther R*, Morawietz L*, Friederich M, Gehrke T, Frommelt L, Schroder JH, Krenn V. Expression of CD9, CD11b, CD18, CD52 and PDGFR-beta in the interface membrane of loose endoprostheses. *Pathol Res Pract* 2005;201:435-42

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu den Arbeiten beigetragen.

Zusammenfassung

Nachdem mit der unter 3.3. beschriebenen Studie die unterschiedlichen Typen der periprothetischen Membran definiert worden waren, sollten diese mit molekularbiologischen Methoden näher charakterisiert werden. Mittels Genexpressionprofilen wurde nach Markergenen gesucht, welche charakteristisch für den abriebinduzierten oder den infektiösen Typ waren und damit der diagnostischen Unterscheidung dienen und die Pathogenese der Prothesenlockerung erklären konnten. Außerdem wurden potenzielle Marker zur Früherkennung einer inzipienten Lockerung und Ansatzpunkte für eine nicht-chirurgische Therapie gesucht. Die Validität der Microarray-Technik sollte mittels RT-PCR, Immunhistologie und in-situ-Hybridisierung untersucht werden.

In diesen aufeinander aufbauenden Untersuchungen wurden zunächst die Genexpressionsprofile von drei Fällen abriebinduzierter mit zwei Fällen infektiöser Hüftgelenksendoprothesenlockerungen, die im Jahre 2002 an der ENDO-Klinik Hamburg revidiert wurden, analysiert. Die Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-PCR und Immunhistologie wurde an 16 Fällen abriebinduzierter und 20 Fällen infektiöser Hüft- und

Kniegelenksendoprothesenlockerungen durchgeführt, die zwischen 2002 und 2004 an der ENDO-Klinik und der Charité Universitätsmedizin Berlin revidiert wurden.

Die verwendeten cDNA-Microarrays (PIQOR rheumatology array, Memorec Stoffel GmbH, Köln) enthielten Oligonukleotide für 820 immunologisch relevante Gene. Von diesen wurden 569 mindestens in einem Fall detektiert, pro Chip wurden zwischen 290 und 510 Gene detektiert, im Mittel 411. Zwischen 54 und 172 Gene (arithmetisches Mittel 120) zeigten pro Array eine zumindest zweifache, und davon 5 bis 53 (im Mittel 26) eine fünffache differenzielle Expression.

In der Typ-I-Membran dominierten Gene, die sich durch die größere Anzahl an Makrophagen erklären ließen, zum Beispiel CD 11b, CD 18 und CD 68, während in der Typ-II-Membran verstärkt die Gene exprimiert waren, die mit Bindegewebsneubildung assoziiert sind, wie diverse Kollagentypen, Thrombospondin 2 oder PDGFR-beta.

Pathogenetisch interessant erschien eine starke differenzielle Expression von Megakaryocyte stimulating factor. Das msf Gen kodiert auch für das Splice-Produkt Lubricin, welches physiologisch von synovialen Fibroblasten sezerniert wird und als wesentlicher Faktor für die Gleiteigenschaften der Gelenkflüssigkeit identifiziert wurde. Darauf basierte die Hypothese, dass sich möglicherweise in der abriebinduzierten Prothesenlockerung eine synovialisähnliche Deckzellschicht bildet, welche Lubricin sezerniert, das die feste Verankerung zwischen Knochen und Implantat aufhebt und damit zur Prothesenlockerung beiträgt.

Die Gene CD9, CD11b, CD18, CD52 und PDGFR-beta wurden zur Validierung ausgewählt. Die RNA aller Gene wurde mittels RT-PCR in allen Proben sowohl des abriebinduzierten als auch des infektiösen Typs nachgewiesen. Die Banden für CD9, CD11b und CD52 waren in den infektiösen Proben deutlich schwächer als in den abriebinduzierten Proben, was die mittels Microarray festgestellte geringe Expression in diesem Membrantyp bestätigte.

Immunhistologisch wurde die differenzielle Expression von CD9, CD11b, CD52 und PDGFR-beta auf Proteinebene validiert. Die differenzielle Genexpression von CD18 fand immunhistologisch jedoch keine Entsprechung.

Zusammenfassend zeigten diese Arbeiten, dass der abriebinduzierte und der infektiöse Typ der periprothetischen Membran sich auch auf molekularer Ebene eindeutig unterscheiden lassen, und dass die Genexpressionsprofile weitgehend zuverlässige Daten lieferten, die sich mit etablierten Methoden für die Mehrzahl der Gene validieren ließen.

3.3.2. Die Relevanz der Chitinase-1 für die Pathogenese und Früherkennung der Endoprothesenlockerung

Literatur: Morawietz L*, Weimann A*, Schroeder JH, Kuban RJ, Ungethuen U, Kaps C, Slevogt H, Gehrke T, Krukemeyer MG, Krenn V. Gene expression in endoprosthesis loosening: Chitinase activity for early diagnosis? J Orthop Res 2008;26:394-403

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Zusammenfassung

Die Genexpressionsprofile von jeweils fünf Fällen abriebinduzierter und infektiöser Hüftgelenksendoprothesenlockerungen wurden mittel HG U133 A Microarrays (Affymetrix) erstellt. Die Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-PCR wurde an 30 weiteren Fällen durchgeführt.

826 Gene zeigten eine zumindest zweifache differenzielle Expression. Anhand der Höhe der differenziellen Expression und ihrer möglichen Relevanz für die Endoprothesenlockerung wurden hiervon 11 Gene zur Validierung mittels quantitativer RT-PCR an 30 weiteren Lockerungsmembranen ausgewählt. Für alle 11 Gene konnte die differenzielle Expression validiert werden, darüber hinaus ermöglichte die RT-PCR durch den Vergleich mit dem mitgeführten Haushaltsgen GAPDH eine ungefähre Beurteilung der absoluten Expressionsstärke. Beispielsweise zeigte E-Cadherin zwar eine etwa neunfache differenzielle Expression, aber sie entsprach in den abriebinduzierten Membranen nur 0,99% und in den infektiösen Membranen 0,10% der GAPDH-Expression, was sich dadurch erklären lässt, dass E-Cadherin nur für Epithelzellen relevant ist und daher in den aus Bindegewebe bestehenden periprothetischen Membranen kaum exprimiert wird.

Das Gen für Chitinase 1 wies in der RT-PCR eine 290%ige Expression gegenüber GAPDH in den abriebinduzierten und eine 9,8%ige Expression in den infektiösen Lockerungsmembranen auf ($p=0,0000$). Daraus folgte die Hypothese, dass entweder die Chitinase bei der abriebinduzierten Lockerung eine pathogenetische Rolle spielt und das Gen daher heraufreguliert wird, oder dass es bei einem Teil der Patienten zu einem – möglicherweise durch die in Kapitel 1.5. beschriebene Mutation bedingten – Chitinase-Verlust kommt, der für eine erhöhte Suszeptibilität für periprothetische Infektionen verantwortlich ist.

Daher wurde an 305 Patienten im peripheren Blut der Chitinase-1-Genotyp bestimmt, davon verfügten 65,6% über zwei Allele des intakten Wildtyps, 31,8% waren heterozygot und 2,6% homozygot für die bekannte 24-Basenpaar-Mutation in Exon 10 des Chitinase-1-Gens. Die Chitinase-Enzymaktivität im Blut war zwischen diesen drei Gruppen signifikant verschieden ($p < 0,001$), jedoch bestand keine Korrelation zwischen Chitinase-1-Genotyp und Status der Endoprothese ($p = 0,516$). Insbesondere wies von 16 Patienten mit histologisch und mikrobiologisch nachgewiesener infektiöser Lockerung kein einziger die homozygote Mutation auf (heterozygot 44%). Die oben aufgestellte Hypothese, dass Patienten mit einer Mutation des Chitinase-Gens besonders häufig an einer periprothetischen Infektion erkranken, konnte somit nicht bestätigt werden.

In 313 Patienten wurde die Chitinase-1-Enzymaktivität im Serum gemessen, um zu klären, ob die hohe RNA-Expression in den abriebinduzierten Lockerungsmembranen zu einer Anreicherung des Enzyms im Blut führt. Zwischen den beiden Patientengruppen mit abriebinduzierter bzw. infektiöser Lockerung (Mittelwert 95,9 nmol/h/mL bzw. 43,8 nmol/h/mL) bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,144$). Wenn in die zweite Gruppe nicht nur die infektiösen, sondern auch die beschwerdefreien Prothesenträger sowie die Kontrollpersonen einbezogen wurden (Mittelwert 40,0 nmol/h/mL), zeigte sich eine signifikant ($p = 0,001$) höhere Enzymaktivität bei den Patienten mit abriebinduzierter Prothesenlockerung gegenüber allen anderen Patienten. Daher wurde, dieser Parameter als Bluttest für die Diagnose einer abriebinduzierten Lockerung in Erwägung gezogen. Wenn der Grenzwert anhand der Receiver-Operating-Characteristics Kurve auf 60 nmol/h/mL optimal festgelegt wurde, ergaben sich für diesen diagnostischen Test eine Korrektklassifikationsrate von 80%, eine Spezifität von 83% und ein negativer Vorhersagewert von 92%, jedoch waren die Sensitivität mit 52% und der positive Vorhersagewert mit 24% sehr gering.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass der abriebinduzierte und der infektiöse Typ der periprothetischen Membran sich hinsichtlich ihrer Genexpression deutlich von einander unterscheiden. Ferner wurde gezeigt, dass die Abriebreaktion im periprothetischen Gewebe zu einer messbaren, signifikanten Erhöhung der chitinolytischen Enzymaktivität im Serum führt, wobei diese Messung dennoch nicht ausreicht, um als Diagnostikum zur Früherkennung einer Prothesenlockerung eingesetzt zu werden, weil die Sensitivität und Spezifität zu gering sind.

Diskussion

4.1. Ein neues Graduierungssystem zur histopathologischen Differenzialdiagnostik chronischer Synovialitiden

In der Pathologie ist es – wie in anderen Fachbereichen der Medizin auch – üblich, die Diagnosen anhand von im Konsens festgelegten Standards abzufassen. Dies gilt insbesondere für maligne Tumorerkrankungen, deren Entitäten in Arbeitsgruppen unter dem Dach der WHO und deren Stadieneinteilungen von der UICC definiert und systematisiert werden (122, 136). Solche Standards haben die Vorteile, dass Befunde von Ärzten auf der ganzen Welt verstanden werden können, dass sie untereinander vergleichbar sind, und dass die Pathologen relativ klare Richtlinien und Kriterien haben, die ihnen die Diagnosestellung ermöglichen. Der möglicherweise auftretende Nachteil, dass individuelle Besonderheiten eines Tumors verloren gehen, wenn eine Diagnose in ein zu starres Schema gepresst wird, kann dadurch umgangen werden, dass weitergehende Informationen in einem Diagnosekommentar angefügt werden. Diese Vorgehensweise hat sich spätestens seit der neunten Revision der International Classification of Diseases 1976 und der ersten Version der TNM-Klassifikation 1987 bewährt (27).

Auch für nicht-tumoröse Erkrankungen wurden Klassifikationssysteme vorgeschlagen, die in den klinischen Alltag Einzug gefunden haben. Bekannte Beispiele hierfür sind die so genannte ABC- oder Sydney-Klassifikation der Gastritiden, die Banff-Klassifikation der Transplantatrejektionen oder die Klassifikation der interstitiellen Lungenerkrankungen (36, 43, 123). Diese Systeme werden von Klinikern wie Pathologen gleichermaßen akzeptiert und angewandt.

Chronische Gelenkerkrankungen können schwierig zu diagnostizieren sein, da sich zum einen viele verschiedene, auch systemische Erkrankungen in den Gelenken manifestieren und zum anderen die Symptome, die radiologischen und Laborbefunde bei einer Krankheitsentität sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können. Dies gilt auch für die histopathologischen Befunde, denn nur selten manifestieren sich Gelenkerkrankungen mit spezifischen, als „typisch“ angesehenen Charakteristika wie rheumatoiden Granulomen, Kristalldepositionen oder Detritusfragmenten. Die große Mehrzahl der Fälle – in Publikationen wird von 90% berichtet, aber der eigenen Erfahrung nach liegt der Anteil noch höher – zeigt jedoch lediglich

uncharakteristische Veränderungen (37, 81). Es erschien angebracht, auch diese Befunde zu würdigen und durch ein standardisiertes Graduierungssystem zu erfassen. Damit sollten inter- und intraindividuelle Interpretationsschwankungen der Pathologen weitgehend eliminiert, Klinikern und Pathologen eine gemeinsame Basis gegeben, eine Möglichkeit zur Erfassung des zeitlichen Krankheitsverlaufs bei einem Patienten und zum Vergleich verschiedener Patienten – beispielsweise im Rahmen klinischer Studien – geschaffen sowie ein weiterer Baustein zur Sicherung der Diagnose gegeben werden.

Mit den unter 3.1.1. dargestellten Kriterien wurde der Synovialitis-Score vorgeschlagen, um diese Anforderungen zu erfüllen. Zwischen zwei unabhängigen Untersuchern zeigte sich eine vollständige Übereinstimmung der Befunde in 66,2% und eine Abweichung um maximal einen Punkt auf einer Skala von null bis neun Punkten in 94,8% der Fälle (69, 73). Die Reproduzierbarkeit entsprach somit beispielsweise der des Gleason-Gradings des Prostatakarzinoms oder der Dysplasie-Graduierung der Bronchialschleimhaut oder der Vulvaschleimhaut (1, 97, 110). Daher wurde die Reproduzierbarkeit als gut geeignet für einen diagnostischen Test erachtet.

Die Reliabilität des Synovialitis-Scores wurde zudem durch eine computerassistierte Untersuchung objektiviert. Der Korrelationskoeffizient für die Übereinstimmung von menschlichem Untersucher und computerisierter Bildanalyse betrug $r=0,725$. Die computerassistierte Gradierung ergab die gleichen signifikanten Unterschiede zwischen degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen wie zuvor beschrieben (92).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Scorewerte mit den klinischen Diagnosen korrelierten (69, 73). So wiesen die untersuchten Erkrankungen aus dem Formenkreis der chronischen Gelenkentzündungen (RA, PsA, ReA) signifikant höhere Synovialitis-Scorewerte auf ($p<0,001$) als die Synovialmembranen von Patienten mit Arthrose, Zustand nach Trauma oder ohne Gelenkerkrankung. Eine genaue Diagnosestellung ohne Kenntnis klinischer Befunde war jedoch nicht möglich, da sich die Scorewerte zwischen verschiedenen degenerativen Läsionen oder innerhalb der primär entzündlichen Erkrankungen nicht signifikant unterschieden und die histomorphologischen Charakteristika ähnlich ausgeprägt waren. Der Score machte aber eine Stratifizierung der histopathologischen Befunde in niedriggradige und hochgradige Entzündungen möglich, wobei letztere mit einer Sensitivität von 69,3% und einer Spezifität von 95,7% für die Diagnose einer chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankung sprach (69, 71-73).

Diese Daten basierten auf retrospektiven Studien, bei denen das Gewebe von Patienten mit klinisch bekannten Diagnosen stammte. Limitierend war, dass die Patienten vor der

Probennahme nach unterschiedlichen Therapieregimes mehr oder weniger intensiv anbehandelt waren, so dass insbesondere bei den chronischen Gelenkentzündungen davon ausgegangen werden musste, dass keine natives, sondern ein verändertes, möglicherweise abgeschwächtes histologisches Krankheitsbild vorlag. Der tatsächliche Nutzen des Synovialitis-Scores muss sich in der prospektiven klinischen Anwendung noch bestätigen. Hierzu wurden bereits Biopsate, die anhand des Scores graduiert wurden, in experimentellen Studien eingesetzt und lieferten eine standardisierte Basis zur Interpretation der Ergebnisse, beispielsweise von Genexpressionsanalysen (16, 105). Auch wurden bereits Kasuistiken veröffentlicht, in denen die histopathologische Befundung anhand des Synovialitis-Scores der entscheidende Baustein zur definitiven Diagnose war (57, 70).

4.2. Ein neues Klassifikationssystem zur histopathologischen Diagnostik der periprothetischen Membran gelockerter Endoprothesen

Bislang waren Kenntnisse zur Diagnostik periprothetischer Membranen von gelockerten Endoprothesen in der Pathologie nicht weit verbreitet oder standardisiert (83). Dies zeigte sich schon dadurch, dass kein einheitlicher Begriff für diese Art von Proben bestand bzw. Bezeichnungen verwendet wurden, die darauf schließen ließen, dass die Herkunft des Gewebes letztlich unklar war. Ohne genauere Definition wurden die Begriffe Granulationsgewebe, Lockerungsmembran, periprothetische Membran, Abriebmembran oder Neosynovialis verwendet, wobei manche Orthopäden und auch Pathologen mit der Bezeichnung „Lockerungsmembran“ implizieren wollten, dass kein Abriebmaterial vorhanden sei, während andere Mediziner den Begriff „Abriebmembran“ selbst dann benutzten, wenn kein Abriebmaterial vorhanden war (41, 108). Um Missverständnissen in Zukunft vorzubeugen, wurde in den eingefügten Publikationen vorgeschlagen, nur zwei Begriffe zu verwenden: „Neosynovialis“ bezeichnet die Kapsel um das künstliche Gelenk und „periprothetische Membran“ das Gewebe, das sich zwischen Implantat und Knochen gebildet hat (Abb. 1, 89-91). Beide Gewebe können routinemäßig zur histopathologischen Untersuchung übersandt werden und sollten nach der vorgeschlagenen Einteilung klassifiziert werden, wobei die Neosynovialis im Rahmen einer präoperativen Arthroskopie biopsiert wird und der Befund möglicherweise auf das weitere operative Procedere Einfluss hat, während die periprothetische Membran nur im Rahmen der Endoprothesen-Wechseloperation entfernt werden kann und dann der Diagnosesicherung dient (94).

Der histologische Untersuchungsbefund ist aus zwei wesentlichen Gründen von Belang: Im Falle einer abriebinduzierten Lockerung lässt die Art des Prothesenabriebs Rückschlüsse auf die Qualität des Implantats und der chirurgischen Einpassung zu, denn ungewöhnlich hohe Mengen bestimmter Abriebpartikel sind ein Hinweis auf eine zu starke Verschleißneigung der Prothese oder eine unangemessene Belastung. Durch eine routinemäßige Untersuchung aller periprothetischer Membranen ließen sich ungeeignete Prothesentypen identifizieren und unsere Kenntnisse über die sachgerechte Verwendung von Implantaten erweitern (114).

Im Falle der Diagnose einer periprothetischen Membran vom infektiösen Typ kann der histopathologische Befund eine klinische Verdachtsdiagnose erhärten und so zu einem veränderten Therapieregime führen. So könnte ein zweizeitiger Wechsel erwogen werden, bei dem in einer ersten Operation nur die gelockerte Prothese entfernt und das Prothesenbett lavagiert wird, und erst nach Ausheilung der Infektion in einem zweiten Eingriff die neue Prothese implantiert wird (79). Außerdem ist die Diagnose einer periprothetischen Infektion eine Indikation für eine intensivere und längere antibiotische Behandlung (103). Eine solche würde aufgrund der Kosten und Nebenwirkungen bei Ausschluss eines Infekts nicht durchgeführt werden.

In der unter 3.2.1. dargestellten Studie wurde mit dem so genannten Indifferenztyp eine neue Diagnosekategorie vorgeschlagen und näher charakterisiert (89). Dieser Typ zeichnete sich dadurch aus, dass weder Abriebpartikel bzw. eine Reaktion auf solche, noch neutrophile Granulozyten als Zeichen einer Infektion zu erkennen waren. In 15,4% der untersuchten Fälle wurde dieser Typ diagnostiziert, was als Beleg dafür gewertet wurde, dass es sich um eine echte, nicht zu vernachlässigende oder etwa auf ungenauer Untersuchung beruhende Kategorie handelte. Die Abwesenheit einer Infektion wurde zudem dadurch belegt, dass in lediglich 12% der Fälle dieses Typs mikrobiologisch Bakterien nachgewiesen wurden. Es waren zwar in der Vergangenheit in der Literatur solche Befunde beschrieben worden, die von den Autoren als „Lockerungsmembran“ bezeichnet wurden, aber der Vorschlag, dies als eigenständigen Typ zu klassifizieren, war bislang noch nicht gemacht worden (14, 44, 47).

Wenn Prothesenabrieb und akute Infektionen als Genese einer Prothesenlockerung vom Indifferenztyp nicht nachgewiesen werden können, stellt sich die Frage nach der Pathogenese der Lockerung in diesen Fällen. Eine Hypothese ist, dass der Indifferenztyp entsteht, wenn die Prothese primär nicht suffizient einheilt. Anstatt neue Knochen trabekel zu bilden, die die Prothese fest umschließen, entwickelt der Körper ein Granulations- oder Narbengewebe. Ursache dafür könnte eine zu frühe Belastung einer unzementierten Prothese sein (137). Dafür

spräche, dass der Indifferenztyp bei solchen Prothesen signifikant häufiger auftritt, während er bei zementierten seltener ist, die wiederum häufiger abriebinduzierte Lockerungen zeigen (89). Eine weitere Ursache könnte die Einnahme von Medikamente sein, die die Osteoneogenese nachweislich hemmen. Hierzu gehört mit Ibuprofen eine Substanz, die von Patienten mit Gelenkbeschwerden häufig eingenommen wird (104). Eine andere Hypothese für die Entstehung der periprothetischen Membran vom Indifferenztyp ist, dass Druckspitzen im Kontaktbereich von Prothese und Knochen zu dessen Atrophie führen und diese mechanisch bedingten Osteolysen durch Narbengewebe umgebaut werden. Dass dies möglich ist, wurde im Tierexperiment nachgewiesen (121). Eine dritte Hypothese wäre, dass der Indifferenztyp das Residuum einer periprothetischen Infektion darstellt. Letztere geht ebenfalls mit der Bildung von Granulationsgewebe einher, zeichnet sich aber durch das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten und mikrobiologischen Erregernachweis aus. Sofern der Körper die bakterielle Infektion erfolgreich bekämpfen kann – wofür es allerdings keinen sicher belegten Fall gibt – könnten sich die Zeichen einer Infektion zurückbilden und ein Granulations- oder Narbengewebe verbleiben.

Die unter 3.2.1. und 3.2.3. dargestellten Befunde zeigten, dass die Korrelation zwischen histologischem Membrantyp und mikrobiologischer Erregerdiagnostik vereinzelte Diskrepanzen aufwies (89, 90). Am zuverlässigsten wäre es gewesen, die Klassifikation der periprothetischen Membran an einem Goldstandard zu messen. Hierzu eignete sich der mikrobiologische Befund jedoch nur bedingt, denn es ist bekannt, dass kulturelle Untersuchungen sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse liefern können (102, 103). Zum einen kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Gewebeprobe nach der Entnahme durch versehentliche unsterile Manipulation kontaminiert wurden. Auf diese Möglichkeit wurde in einzelnen mikrobiologischen Befunden hingewiesen, etwa in der Art, dass eine geringe Keimmenge oder der Nachweis von Keimen der Hautflora konstatiert wurden. Es bestand jedoch keine Möglichkeit, im Einzelfall sicher zu entscheiden, ob ein nachgewiesener Erreger relevant war oder nicht. Zum anderen war nicht auszuschließen, dass die übliche mikrobiologische Kulturtechnik besonders langsam wachsende Erreger nicht darstellte. Dass solche Keime die Ursache von infektiösen Prothesenlockerungen sein können, wurde mehrfach zuvor beschrieben (119, 134).

Es musste also festgestellt werden, dass für den Beweis oder den Ausschluss einer Infektion kein perfekter Goldstandard existierte und sowohl der mikrobiologische als auch der histologische Befund Fehlerquellen aufweisen konnten. Daraus sollte konsequenterweise

geschlossen werden, dass man sich für eine möglichst korrekte Diagnosestellung nicht allein auf die Mikrobiologie verlassen kann sondern stets auch die Histologie berücksichtigen und beide Befunde kritisch zusammen bewerten muss.

Um wie im vorletzten Absatz dargestellt auf den Befund einer periprothetischen Infektion zu reagieren, bietet die histologische Untersuchung einen weiteren Vorteil gegenüber der Mikrobiologie: Sie kann als intraoperativer Schnellschnitt innerhalb weniger Minuten erfolgen, während ein kultureller Erregernachweis stets mehrere Tage – bei langsam wachsenden Erregern bis zu 14 Tagen - benötigt. So kann gegebenenfalls noch während der Operation entschieden werden, auf ein zweizeitiges Wechselregime umzustellen und noch keine neue Prothese zu implantieren, die gefährdet wäre, sich nach kurzer Zeit erneut zu infizieren und zu lockern. Die Untersuchung von Gewebeproben im Schnellschnitt ist ein seit langem etabliertes Verfahren, für das die meisten Pathologischen Institute apparativ ausgestattet sind, und für das in der Tumordiagnostik ein großer Erfahrungsschatz besteht (130). Die schnellschnittliche Diagnostik entzündlicher Läsionen und insbesondere der periprothetischen Membran ist weniger gut etabliert (6). Zwei Aspekte können die Aussagekraft der intraoperativen Diagnostik einschränken: Zum einen lässt sich nur ein Teil der Gewebemenge untersuchen, wodurch die Repräsentativität eingeschränkt ist, und zum anderen ist die Morphologie der Zellkerne im Gefrierschnitt deutlich alteriert, sodass sich die Zellformen eines entzündlichen Infiltrats nicht immer sicher differenzieren lassen. Um festzustellen, wie groß die sich daraus ergebende Unsicherheit tatsächlich ist, wurde die in 3.2.2. dargestellte Untersuchung durchgeführt. Die präliminären Ergebnisse zeigten, dass in etwa dreiviertel der Fälle eine korrekte Klassifikation der periprothetischen Membran am Gefrierschnitt möglich war. Allerdings erschien es ratsam, in fraglichen Fällen zunächst keine Diagnose zu stellen. Dies hatte zwar den Nachteil, dass in etwa einem Viertel der Fälle die Schnellschnittuntersuchung keine sichere Information lieferte, allerdings konnte dadurch vermieden werden, dass Diagnosen nachträglich revidiert werden mussten.

4.3. Evaluation potenzieller Früherkennungsmarker der Endoprothesenlockerung

Die unter 3.3. dargestellten Untersuchungen hatten zum Ziel, neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Prothesenlockerung zu gewinnen, mögliche Angriffspunkte für eine

Prävention oder Therapie zu finden und potenzielle Früherkennungsmarker zu identifizieren (45, 46, 87, 88, 93).

Aus der ersten Genexpressionsanalyse ging zunächst das msf-Gen hervor, welches in der abriebinduzierten Membran stark überexprimiert war und einen interessanten Aspekt zur Pathogenese bot (87). Dessen Splice-Produkt Lubricin ist ein Protein, welches physiologischerweise von synovialen Fibroblasten synthetisiert und sezerniert wird und für die Gleitfähigkeit der Gelenkflüssigkeit verantwortlich ist (58). Es wurde also die nahe liegende Hypothese aufgestellt, dass Bindegewebszellen in der periprothetischen Membran Lubricin sezernieren, welches im periprothetischen Spalt die feste Verbindung von Knochen und Endoprothese aufheben und so zur Lockerung führen könnte. Diese Hypothese konnte jedoch nicht verifiziert werden, da zum einen eine immunhistologische Darstellung von Lubricin in Lockerungsmembranen nicht gelang und zum anderen msf in den nachfolgenden Genexpressionsanalysen (siehe 3.3.2.) nicht differenziell exprimiert war (93).

Der Nachweis einer Überexpression von CD9 in den abriebinduzierten Membranen bestätigte sich mehrmals, sowohl in beiden unabhängigen Genexpressionsanalysen mit unterschiedlichen Plattformen (Memorec und Affymetrix), als auch mittels RT-PCR und Immunhistologie. Da das Genprodukt nicht nur ein zellständiges Oberflächenantigen ist, sondern auch in das periphere Blut abgegeben wird (66), könnte möglicherweise ein erhöhter Blutspiegel auf eine Prothesenlockerung hinweisen. Eine Untersuchung, die auf einer Bestimmung der Blutspiegel von CD9 mittels ELISA beruht, ist derzeit noch nicht abgeschlossen.

Der aussichtsreichste Kandidat für eine serologische Früherkennungsmethode einer Endoprothesenlockerung war Chitinase-1. Das Gen zeigte in der Affymetrix-basierten Analyse die stärkste differenzielle Expression aller Gene und in der quantitativen RT-PCR im Vergleich mit dem Haushaltsgen GAPDH in den abriebinduzierten Membranen eine stärkere Expression als dieses, so dass von einer tatsächlich stark gesteigerten Expression ausgegangen werden konnte (93). Zudem ist das Genprodukt nicht zellgebunden sondern wird sezerniert, wodurch Grund zur Hoffnung bestand, dass eine Erhöhung von Chitinase-1 im Blut von Patienten mit abriebinduzierter Prothesenlockerung messbar sei (52). Dies bestätigte sich in der Tat: Die im Serum gemessene Chitinase-1-Enzymaktivität war bei Patienten mit Endoprothesenlockerung signifikant ($p=0,001$) größer als in der Kontrollgruppe. Um die Chitinase-1-Enzymmessung als diagnostischen Test nutzen können, mussten allerdings auch die wesentlichen Testparameter Mindestanforderungen erfüllen. Dies war jedoch nicht der Fall, denn selbst bei optimaler Festsetzung des Grenzwerts anhand der ROC-Kurve betrug

die Sensitivität 52%, die Spezifität 83%, der positive prädiktiver Wert 24% und der negative prädiktive Wert 92%. Die Ursachen, die dafür verantwortlich sein können, dass sich die deutliche differenzielle Genexpression weniger stringent in der Serum-Enzymaktivität widerspiegelt, werden im nachfolgenden Kapitel 4.4. diskutiert. Anhand der Testparameter ließ sich die Chitinase-1-Aktivitätsmessung im Serum weder als Screening zur Früherkennung noch als Diagnostikum zur Unterscheidung zwischen abriebinduzierter und infektiöser Prothesenlockerung empfehlen.

4.4. Stellungnahme zur Wertigkeit der Genexpressionsanalysen

Die Einführung so genannter Microarrays vor etwa zehn Jahren ermöglicht die gleichzeitige Durchführung mehrerer Hundert bis mehrerer Zehntausend quantitativer RNA-Bestimmungen mit einer einzigen Untersuchung (133). Zum einen kann damit das gesamte Genom auf seine RNA-Expression durchsucht werden, und zum anderen lassen sich mit themenspezifischen Arrays einige Dutzend bis hunderte ausgewählte Gene auf ihre Expression hin untersuchen (100). Es besteht die Hoffnung, dass die Kenntnis über die Genexpression in erkranktem Gewebe, insbesondere in Tumoren, aber auch in entzündlichen Veränderungen, jeweils im Vergleich mit dem entsprechenden gesunden Normalgewebe, umfangreiche neue Erkenntnisse über die Pathogenese dieser Erkrankungen liefern kann. Außerdem wird postuliert, dass sich anhand von Genexpressionsprofilen neue Tumorentitäten bzw. Subklassifikationen definieren lassen (111). Diese neuen Klassifikationen sollen Aussagen bzgl. Prognose und Therapieansprechen ermöglichen, mit die mit konventionellen histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bisher nicht möglich sind. Damit soll das Ziel einer individualisierten, nebenwirkungsarmen und wirkungseffizienten Therapie erreicht werden (3). Eine Vielzahl von Genexpressionsprofilen wurde seitdem publiziert. Beispielsweise liefert die Internetsuchmaschine PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/) mit dem Suchbegriff „gene expression profile“ 42.700 Publikation zwischen August 1998 und August 2008.

Der wesentliche Vorteil der Genexpressionsprofile ist zugleich ihr größter Nachteil: Aufgrund der großen Anzahl gleichzeitig untersuchter Gene ist es bei jeglichem experimentellen Ansatz problemlos möglich, ein „Profil“ zu erstellen, welches für eine Population, beispielsweise eine Tumor-Subgruppe mit einem besonders guten Verlauf, typisch zu sein scheint. Die meisten der veröffentlichten Publikationen beschränkt sich darauf, ein solches Profil zu

beschreiben. In einem Teil dieser Studien ist es immerhin gelungen, an einem zweiten Kollektiv das postulierte Profil retrospektiv anzuwenden und den eingetretenen Verlauf in einem hohen Prozentsatz richtig vorherzusagen (48, 51). Um aber zu klären, ob sich durch eine Bestimmung eines Genexpressionsprofils ein klinischer Verlauf präzisieren lässt und anhand eines solchen Profils sich eine therapeutische Entscheidung treffen lässt, sind prospektive Studien unverzichtbar. Derzeit werden lediglich zwei klinische Studien angeboten, in denen jeweils Mammakarzinompatientinnen anhand des so genannten Mammaprints (MINDACT-Studie: Microarray in Node-Negative Diseases May Avoid Chemotherapy) bzw. des 21-Gen-Rückfallcores (Trial Assigning Individualized Options for Treatment) in die Therapiegruppen eingeteilt werden (85, 126). Angesichts der Vielzahl publizierter Profile für nahezu alle Tumorentitäten ist dies ein recht überschaubarer Erfolg.

Die unter 3.3. dargestellten Untersuchungen wählten einen anderen, einfacheren Ansatz. Es sollten nicht die beiden wesentlichen Typen der Endoprothesenlockerung – der abriebinduzierte und der infektiöse Typ – mittels Microarray definiert werden, da dies mit der konventionellen Histologie bereits gut möglich ist. Vielmehr sollten Gene gefunden werden, die bisher noch nicht mit der Prothesenlockerung in Zusammenhang gebracht wurden, aber neue Erkenntnisse über die Pathogenese liefern oder als Ansatzpunkte für neue diagnostische Tests dienen könnten (87, 93). Unsere Studien basierten auf zwei unterschiedlichen Plattformen, einem entzündungsspezifischen Oligonukleotid-Array und auf einem nahezu genomweiten cDNA-Array. Die Vorgehensweise war jeweils identisch. Es wurden supervidierte Analysen durchgeführt, das heißt, dass die histopathologischen Diagnosen der analysierten Proben bereits bekannt waren und mittels der Microarrays die jeweils für einen der beiden Typen (infektiös gegenüber abriebinduziert) charakteristischen Genexpressionen festgestellt werden sollten.

In den unter 3.3. dargestellten Studien gelang es in der Tat, einzelne Gene mit sehr konstanter und deutlicher differenzieller Expression zu identifizieren. Die differenzielle Expression ausgewählter Gene ließ sich in allen Fällen mittels RT-PCR an jeweils neuen Patientenkollektiven validieren, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Microarray-Daten korrekt waren (46, 93). Die Validierung auf Proteinebene mittels Immunhistologie bzw. laborchemischer Methoden war jedoch nicht für alle Gene erfolgreich. Beispielsweise entsprach die immunhistologische Detektion des CD18-Proteins als eines von fünf untersuchten Genprodukten nicht der Genexpression (siehe Kapitel 3.4.). Weiterhin zeigte die Messung der Chitinase-1-Enzymaktivität im Patientenserum deutliche Überschneidungen zwischen der Gruppe der Patienten mit abriebinduzierter und infektiöser

Prothesenlockerung, während die differenzielle Chitinase-1-Genexpression in den periprothetischen Membranen diese Patientengruppen strikt unterscheiden konnte (siehe 3.3.2.). Für die angestrebte Anwendung – die Entwicklung eines diagnostischen Tests – ist die Genexpression in der periprothetischen Membran jedoch nicht entscheidend, da die Bestimmung der Genexpression mittels RT-PCR für die Routinediagnostik zu aufwändig ist. Vielmehr wäre es für einen diagnostischen Test sinnvoll, wenn sich das entsprechende Genprodukt immunhistologisch im Gewebe oder noch besser laborchemisch im peripheren Blut nachweisen ließe.

Für diese Diskrepanz zwischen den eindeutigen Expressionsunterschieden in den Genexpressionsprofilen und den weniger charakteristischen Resultaten der Validierungsversuche auf Proteinebene kommen folgende Mechanismen in Frage: Erstens ist unbekannt, ob der für die Expressionsanalyse verwendete Genabschnitt (bei Affymetrix-Arrays Oligonukleotide mit einer Länge von 25 Basenpaaren) das gesamte Gen repräsentiert (109). Zweitens sagt die mRNA-Menge nichts aus über die posttranskriptionelle Prozessierung (Epigenetik) und die tatsächliche Synthese eines bestimmten Proteins (18). Drittens kann die biologische Halbwertszeit von Protein zu Protein sehr variabel sein (132). Sollte das Ziel der Serumnachweis eines Proteins sein, kommt viertens hinzu, dass der Anteil des von den Zellen sezernierten Proteins unklar ist, ebenso wie der Anteil, der letztlich in das periphere Blut übergeht (53). Fünftens kann die Elimination des Proteins aus der Peripherie interindividuell unterschiedlich sein, beispielsweise abhängig von der Leber- und Nierenfunktion, und schließlich bestand sechstens in der vorliegenden Studie die Möglichkeit, dass andere Erkrankungen, die auch mit einer Vermehrung und Aktivierung von Makrophagen einhergingen, unabhängig von der Endoprothese einen Einfluss auf die Chitinase-1-Enzymaktivität hatten (29).

Es musste also festgestellt werden, dass die Genexpressionsanalysen zwar interessante Ansätze für weitergehende Untersuchungen lieferten, aber zumindest bei unserer Fragestellung keineswegs jenes „powerful tool“ waren, als das sie häufig in der Literatur dargestellt werden.

4.5. Die Rolle der Pathologie in der Beurteilung orthopädischer Krankheitsbilder

Wie in der Einleitung dargestellt, spielte die Pathologie für die Diagnose von Erkrankungen der Gelenke bisher eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu den klinischen, laborchemischen und radiologischen Untersuchungsverfahren. Erst durch die zunehmend spezifische und kostenintensive Therapie, durch die Häufung von Gelenkerkrankungen aufgrund des demographischen Wandels und durch den zunehmenden Wunsch nach Absicherung von Diagnosen wurden zuletzt vermehrt Biopsate und Operationspräparate aus dem orthopädischen Bereich zur histopathologischen Untersuchung übersandt. Um vergleichbare und für die Einsender verständliche Diagnosen zu erstellen, erschien es sinnvoll, definierte Diagnosekategorien und Kriterien dafür zu erarbeiten und diese zu validieren. Mit den oben dargestellten Untersuchungen konnte für zwei Anwendungen die Wertigkeit der histopathologischen Untersuchung erhöht werden: Der Synovialitis-Score ergänzt die Diagnostik degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen, und die Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran ermöglicht erstmals eine aussagekräftige Diagnostik der Prothesenlockerung (Abb. 3).

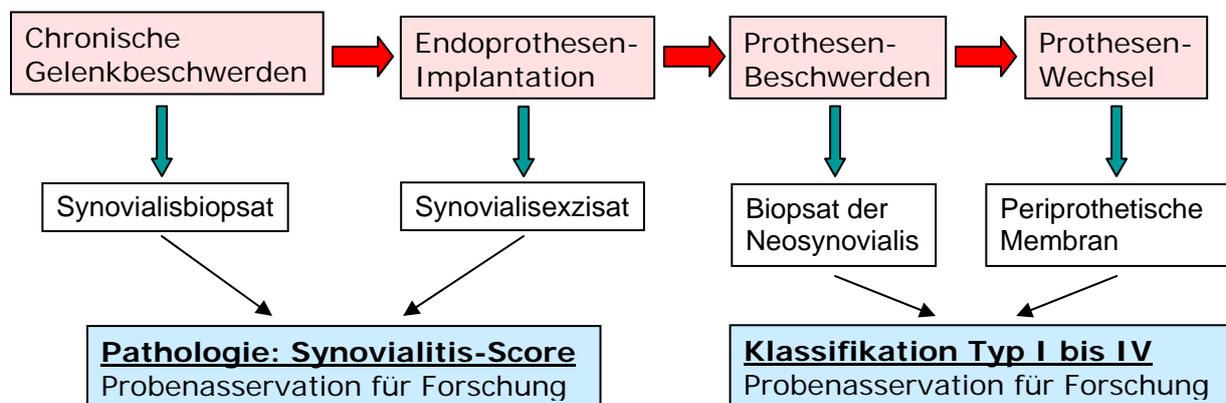


Abb. 3 Schnittstellen zwischen Klinik, Pathologie und Forschung

So kann bei chronischen Gelenkerkrankungen zusätzlich zu den klinischen, radiologischen und serologischen Befunden auch ein Biopsat der Synovialis anhand des Synovialitis-Scores untersucht werden. Diese Proben können zusätzlich zur Routinediagnostik der Erforschung rheumatologischer Erkrankungen dienen. Wird die Implantation einer Totalendoprothese nötig, so sollte das dabei anfallende Synovialektomiepräparat ebenfalls untersucht werden und der Diagnoseabsicherung dienen. Sofern eine Endoprothese Beschwerden verursacht, kann

ein Biopsat der Neosynovialis anhand der in Kapitel 3.3. dargestellten Kriterien klassifiziert werden und somit zur Entscheidung für oder gegen eine Revisionsoperation beitragen. Sollte ein Prothesenwechsel durchgeführt werden, so könnte ein intraoperativer Schnellschnitt Einfluss auf ein ein- oder zweizeitiges Wechselregime haben, und die endgültige histologische Untersuchung der periprothetischen Membran würde der Diagnosesicherung, der Entscheidung für eine intensivere postoperative Antibiose und der Qualitätskontrolle von Implantaten dienen.

Zusammenfassung

Um die Aussagekraft histopathologischer Untersuchungen in der Diagnostik von Gelenkerkrankungen zu erhöhen, wurden zwei neue Evaluierungssysteme etabliert: 1. Der Synovialitis-Score und 2. die Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran.

Mit dem Synovialitis-Score wurde ein Graduierungssystem definiert, welches anhand der semiquantitativen Beurteilung der drei Kriterien a) Deckzellschichtverbreiterung, b) Aktivierung des synovialen Stromas und c) Entzündungszellinfiltrat eine Beurteilung chronischer Synovialitiden jedweder Genese ermöglicht. Es zeigt eine gute Reproduzierbarkeit zwischen unabhängigen Untersuchern und eine gute Korrelation mit klinischen Diagnosen, wobei niedriggradige Befunde für das Vorliegen einer degenerativen, und hochgradige Befunde für eine rheumatische Gelenkerkrankung sprechen.

Für die Diagnostik periprothetischer Membranen gelockerter Endoprothesen wurde ein histopathologisches Klassifikationssystem erstellt, welches vier Typen unterscheidet: Abriebinduzierter Typ (I), infektiöser Typ (II), Mischtyp (III) und Indifferenztyp (IV). Diese Typisierung korreliert mit mikrobiologischen Untersuchungsbefunden. Die histopathologische Untersuchung wird durch die Anwendung dieser Klassifikation die Diagnostik von Endoprothesenlockerungen ergänzen. Als wesentliches Kriterium für die Diagnose einer periprothetischen Infektion wurde die Detektion von insgesamt mindestens 23 neutrophilen Granulozyten in zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern definiert. Die histologische Untersuchung kann als intraoperativer Schnellschnitt durchgeführt werden, wobei eine eingeschränkte Beurteilbarkeit in etwa einem Viertel der Fälle in Kauf genommen werden muss. Zusätzlich ermöglicht die histologische Untersuchung der periprothetischen Membran die Dokumentation des Prothesenabriebs, was der Qualitätskontrolle des Implantats dient.

Genexpressionsprofile von abriebinduzierten und infektiösen Lockerungsmembranen wurden erstellt und zum großen Teil validiert, wobei letztlich die klinische Relevanz dieser Untersuchungen hinter den Erwartungen zurückblieb. Chitinase-1 wird in abriebinduzierten Membranen deutlich überexprimiert, und die chitinolytische Enzymaktivität ist im Serum von Patienten mit abriebinduzierter Prothesenlockerung signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Allerdings ist die Varianz der Messwerte so groß, dass sich dieser Parameter nicht für einen Test zur Früherkennung einer Prothesenlockerung eignet.

Literaturverzeichnis

1. Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, Epstein JI. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. *Hum Pathol* 2001;32:81-88
2. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee – Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039–1049
3. Anagnostopoulos I. Individualized target therapy of malignant lymphomas: an outlook. *Recent Results Cancer Res* 2007;176:177-188
4. Andreas K, Lübke C, Häupl T, Dehne T, Morawietz L, Ringe J, Kaps C, Sittinger M. Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R9
5. Arnett F, Edworthy S, Bloch D, McShane DF, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324
6. Banit DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002;401:230-238
7. Bargagli E, Margollicci M, Nikiforakis N, Luddi A, Perrone A, Grosso S, Rottoli P. Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* 2007;74:548-552
8. Barone R, Sotgiu S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. *Clin Lab* 2007;53:321-333
9. Beintema JJ, Terwisscha van Scheltinga AC. Plant lysozymes. *EXS* 1996;75:75-86
10. Berry DJ, Harmsen WS, Cabanela ME, Morrey BF. Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements: factors affecting survivorship of acetabular and femoral components. *J.Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:171-177
11. Bernard L, Lubbeke A, Stern R, Bru JP, Feron JM, Peyramond D, Denormandie P, Arvieux C, Chirouze C, Perronne C, Hoffmeyer P. Value of preoperative

- investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review. *Scand J Infect Dis* 2004;36:410-416
12. Boot RG, Renkema GH, Strijland A. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 1995;270:26252-26256
 13. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M. The human chitotriosidase gene. *J Biol Chem* 1998;273:25680-25685
 14. Bos I. Tissue reactions around loosened hip joint endoprostheses. A histological study of secondary capsules and interface membranes. *Orthopade* 2001;30:881-889
 15. Bozic KJ, Rubash HE. The painful total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 2004;24:18-25
 16. Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, Ungethüm U, Krenn V, Pruss A, Müller GA, Strutz F, Burmester GR. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R58
 17. Braun J, Kingsley G, van der Heijde D, Sieper J. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the 4th International Workshop on Reactive Arthritis, Berlin, Germany, July 3-6, 1999. *J Rheumatol* 1999;27:2185-2192
 18. Bruserud O. Introduction: RNA and the treatment of human cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2007;8:318-319
 19. Burmester GR. Hit and run or permanent hit. Is there evidence for a microbiological cause of rheumatoid arthritis? *J Rheumatol* 1991;18:1443-1447
 20. Burton DS, Schurman DJ. Hematogenous infection in bilateral total hip arthroplasty. Case report. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:1004-1005
 21. Castro-Rueda H, Kavanaugh A. Biologic therapy for early rheumatoid arthritis: the latest evidence. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:314-319
 22. Chaplin AJ. Calcium pyrophosphate. Histological characterization of crystals in pseudogout. *Arch Pathol Lab Med* 1976;100:12-15
 23. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 1960;42-B:28-30
 24. Connolly JF. The next 10 years--the bone and joint decade. *Clin Orthop Relat Res* 1999;358:255-256
 25. Davis MA. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 1988;4:241-255

26. Dörner T, Burmester GR. 'Life cycle in modern rheumatology' matters: new drugs require new therapeutic strategies and innovative diagnostics. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:237-238
27. Driscoll CE. Cancer care in the 1980s. *Prim Care* 1987;14:243-254
28. Egger P, Cooper C, Hart DJ, Doyle DV, Coggon D, Spector TD. Patterns of joint involvement in osteoarthritis of the hand: The Chingford study. *J Rheumatol* 1995;22:1509-1513
29. Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:497-500
30. Endres M, Neumann K, Schröder SE, Vetterlein S, Morawietz L, Ringe J, Sittinger M, Kaps C. Human polymer-based cartilage grafts for the regeneration of articular cartilage defects. *Tissue Cell* 2007;39:293-301
31. Ewing-Tumor. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) und des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie (BVO). AWMF-Leitlinien-Register 2003, Nr. 033/039
32. Feist E, Egerer K, Burmester GR. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2007;66:212-218
33. Felson DT. Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:499-512
34. Felson DT, Radin EL. What causes knee osteoarthrosis: Are different compartments susceptible to different risk factors? *J Rheumatol* 1994;21:181-183
35. Fink BK, Fink U, Hansen M, Kirsch CM, Pfahler M. The methods and place of digital subtraction arthrography of the hip in detecting endoprosthesis loosening. *Rofo* 1991;155:255-259
36. Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL 3rd, Paine R, Flint A, Lynch JP 3rd, Martinez FJ. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2002;19:275-283
37. Fritz P, Laschner W, Saal J G, Deichsel G, Tuzek H V, Wegner G. Histological classification of synovitis. *Zentralbl allg Pathol pathol Anat* 1989;135:8
38. Frommelt L. Periprosthetic infection – Bacteria and the Interface between Prosthesis and Bone. In: Ian D Learmouth: *Interfaces in Total Hip Arthroplasty*. Springer, Berlin, New York 2000:153-154
39. Furnes O, Havelin LI, Espehaug B, Steindal K, Sørås TE. Report of the Norwegian Arthroplasty Register 2007

40. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum* 1999;42:415-420
41. Gallo J, Kamínek P, Tichá V, Riháková P, Ditmar R. Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2002;146:21-28
42. Gehrke T, Sers C, Morawietz L, Fernahl G, Neidel J, Frommelt L, Krenn V. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand is expressed in resident and inflammatory cells in aseptic and septic prosthesis loosening. *Scand J Rheumatol* 2003;32:287-294
43. Genta RM, Dixon MF. The Sydney System revisited: The Houston international Gastritis Workshop. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1039-1041
44. 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 Am* 1983;65:575-584
45. Guenther R, Morawietz L, Friederich M, Gehrke T, Frommelt L, Schroder JH, Krenn V. Expression of CD9, CD11b, CD18, CD52 and PDGFR-beta in the interface membrane of loose endoprostheses. *Pathol Res Pract* 2005;201:435-442
46. Gunther R, Morawietz L, Gehrke T, Frommelt L, Kaps C, Krenn V. Inflammatory reactions in the wear particle induced and infectious periprosthetic membrane of loosened hip- and knee endoprostheses: pathogenetic relevance of differentially expressed genes CD9, CD11b, CD18, CD52 and PDGFR-beta. *Orthopade* 2005;34:55-64
47. Hahn M, Vogel M, Schultz C, Niecke M, Delling G. Histologic reactions of the bone-implant zone and cortical bone area after long-term hip replacement. *Chirurg* 1992;63:958-963
48. Haibe-Kains B, Desmedt C, Piette F, Buyse M, Cardoso F, Van't Veer L, Piccart M, Bontempi G, Sotiriou C. Comparison of prognostic gene expression signatures for breast cancer. *BMC Genomics* 2008;9:394
49. Hall AJ, Morroll S, Tighe P, Götz F, Falcone FH. Human chitotriosidase is expressed in the eye and lacrimal gland and has an antimicrobial spectrum different from lysozyme. *Microbes Infect* 2008;10:69-78
50. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Scott WW, Reichle R, Plato CC, Tobin JD. The association of body weight, body fatness, and body fat distribution with osteoarthritis of the knee: Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol* 1995;22:488-493

51. Hoffmann K, Firth MJ, Beesley AH, de Klerk NH, Kees UR. Translating microarray data for diagnostic testing in childhood leukaemia. *BMC Cancer* 2006;6:229
52. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994;93:1288-1292
53. Hou C, Zhang Y. Expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: links to disease activity, damage accrual and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Int Med Res* 2008;36:704-713
54. Huskisson EC, Hart FD. Joint diseases: All the arthropathies. John Wright & Sons Ltd., Bristol 1973
55. Ito J, Koshino T, Okamoto R, Saito T. 15-year follow-up study of total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *J Arthroplasty* 2003;18:984-992
56. Itonaga I, Sabokbar A, Murray DW, Athanasou NA. Effect of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand on osteoclast formation by arthroplasty membrane derived macrophages. *Ann Rheum Dis* 2000;59:26-31
57. Jakobs M, Morawietz L, Rothschenk H, Hopf T, Weiner S, Schausten H, Krukemeyer MG, Krenn V. Synovitis score: value of histopathological diagnostics in unclear arthritis: Case reports from rheumatological pathological practice. *Z Rheumatol* 2007;66:706-712
58. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 2000;27:594-600
59. Jellicoe PA, Cohen A, Campbell P. Haemophilus parainfluenzae complicating total hip arthroplasty: a rapid failure. *J. Arthroplasty* 2002;17:114-116
60. Kelly BT, Buly RL. Hip arthroscopy update. *HSS J* 2005;1:40-48
61. Keystone E, Burmester GR, Furie R, Loveless JE, Emery P, Kremer J, Tak PP, Broder MS, Yu E, Cravets M, Magrini F, Jost F. Improvement in patient-reported outcomes in a rituximab trial in patients with severe rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum* 2008;59:785-793
62. Kim HJ, Krenn V, Steinhäuser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 1999;162:3053-3062
63. Kinov P, Leithner A, Radl R, Bodo K, Khoschrorur GA, Schauenstein K, Windhager R. Role of free radicals in aseptic loosening of hip arthroplasty. *J Orthop Res*

2006;24:55-62

64. Kißlinger E, Wessinghage D. Überlegungen zum Einsatz der Überlebens-Analyse in der Medizin, dargestellt an Langzeitergebnissen von 544 vollzementierten Müller-Bogenschaft-Hüftendoprothesen. *Aktuel Rheumatol* 1995;20:239-245
65. Kleimann KH, Markefka B, Holfelder G. Zusammenfassung der Potentialentwicklung für Hüft- und Kniegelenkoperationen in Allgemeinkrankenhäusern der Bundesrepublik Deutschland. *Orthopädie. Informationen BVO-Mitteilungen DGOT* 1996;5:445-448
66. Komada Y, Ochiai H, Shimizu K, Azuma E, Kamiya H, Sakurai M. Shedding of CD9 antigen into cerebrospinal fluid by acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 1990;76:112-116
67. König A, Grussung J, Kirschner S. Ergebnisse der Press-Fit-Condylar-Prothese (PFC). In: Eulert J, Hassenpflug J. *Praxis der Knieendoprothetik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2001:226-233
68. Köse GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysal Y, Ozdemir T, Yildiz C, Hasirci V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* 2005;26:5187-5197
69. Krenn V, Morawietz L, Haupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* 2002;198:317-325
70. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Haupl T. Synovialitis score: histopathological grading system for chronic rheumatic and non-rheumatic synovialitis *Z Rheumatol* 2005;64:334-342
71. Krenn V, Morawietz L, König A, Haeupl T. Differentialdiagnostik der chronischen Synovialitis. *Pathologe* 2006;27:402-408
72. Krenn V, Morawietz L, Koenig B, Otto M, Kriegsmann J, Koepenik A, Boehme T, Haupl T. Low-grade / high-grade Synovialitis: Standardisierte Diagnostik von Synovialektomiepräparaten mittels des Synovialitis-Scores. *Orthopäde* 2006;35:853-859
73. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, Haupl T. Synovitis-Score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 2006;49:358-364
74. Krismer M, Stockl B, Fischer M, Bauer R, Mayrhofer P, Ogon M. Early Migration Predicts Late Aseptic Failure of Hip Sockets. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:422-426

75. Krückhans AR, Dustmann HO. Indications, methods, and results of cemented, hybrid, and cement-free implantation of THR. *Surg Technol Int* 2004;12:253-257
76. Lohmander LS, Engesaeter LB, Herberts P, Ingvarsson T, Lucht U, Puolakka TJ. Standardized incidence rates of total hip replacement for primary hip osteoarthritis in the 5 Nordic countries: similarities and differences. *Acta Orthop* 2006;77:733-740
77. Malaguarnera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal* 2005;19:128-132
78. Masoud M, Rudensky B, Elstein D, Zimran A. Chitotriosidase deficiency in survivors of Candida sepsis. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:116-118
79. McKenna PB, O'Shea K, Masterson EL. Two-stage revision of infected hip arthroplasty using a shortened post-operative course of antibiotics. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008; Epub Aug 2
80. Mohr W. Reaktionsformen des organisierten Bindegewebes. Hyaliner Knorpel. In: Mohr W. *Gelenkpathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2000:93-97
81. Mohr W. Chronische Gelenkentzündungen. In: Mohr W. *Gelenkpathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2000:307-416
82. Mohr W. Arthrose. In: Mohr W. *Gelenkpathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2000:418-439
83. Mohr W. Folgen artikulärer Therapie. In: Mohr W. *Gelenkpathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2000:550-588
84. Moll JMH, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3:55-78
85. Mook S, Van't Veer LJ, Rutgers EJ, Piccart-Gebhart MJ, Cardoso F. Individualization of therapy using MammaPrint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4:147-155
86. Moore RM, Hamburger S, Jeng LL, Hamilton PM. Orthopedic implant devices: Prevalence and sociodemographic findings from the 1988 national health interview survey. *J Appl Biomat* 1991;2:127-131
87. Morawietz L, Gehrke T, Frommelt L, Gratze P, Bosio A, Moller J, Gerstmayer B, Krenn V. Differential gene expression in the periprosthetic membrane: lubricin as a new possible pathogenetic factor in prosthesis loosening. *Virchows Arch* 2003;443:57-66
88. Morawietz L, Friederich M, Frommelt L, Gehrke T, Bosio A, Claßen RA, Gerstmayer B, Krenn V. Differentielle Genexpression in der abriebinduzierten und infektiösen

- periprosthetischen Membran gelockerter Knieendoprothesen. *Verh Dtsch Ges Path* 2003;87:204-214
89. Morawietz L, Gehrke T, Classen RA, Barden B, Otto M, Hansen T, Aigner T, Stiehl P, Neidel J, Schroder JH, Frommelt L, Schubert T, Meyer-Scholten C, Konig A, Strobel P, Rader ChP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Skwara A, Bos I, Kriegsmann J, Krenn V. Proposal for the classification of the periprosthetic membrane from loosened hip and knee endoprotheses. *Pathologe* 2004;25:375-384
 90. Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, Neidel J, Gehrke T, Frommelt L, Hansen T, Otto M, Barden B, Aigner T, Stiehl P, Schubert T, Meyer-Scholten C, Konig A, Strobel P, Rader ChP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Bos I, Kriegsmann J, Hendrich C, Krenn V. Proposal a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 2006;59:591-597
 91. Morawietz L, Gehrke T, Schröder JH, Krenn V. Histopathologische Diagnostik der Endoprothesenlockerung. *Pathologe* 2006;27:439-446
 92. Morawietz L, Schaeper F, Schroeder JH, Gansukh T, Baasanjav N, Krukemeyer MG, Gehrke T, Krenn V. Computer-assisted validation of the synovitis score. *Virchows Arch* 2008;452:667-673
 93. Morawietz L, Weimann A, Schroeder JH, Kuban RJ, Ungethuen U, Kaps C, Slevogt H, Gehrke T, Krukemeyer MG, Krenn V. Gene expression in endoprosthesis loosening: Chitinase activity for early diagnosis? *J Orthop Res* 2008;26:394-403
 94. Müller M, Morawietz L, Hasart O, Strube P, Perka C, Tohtz S. Diagnosis of periprosthetic infection following total hip arthroplasty - evaluation of the diagnostic values of pre- and intraoperative parameters and the associated strategy to preoperatively select patients with a high probability of joint infection. *J Orthop Surg* 2008;3:31
 95. Müller W. Klassifikation entzündlich-rheumatischer Erkrankungen. *Dtsch Ärztebl* 1995;92:A-946-953
 96. Nerlich AG, Rohrbach H, Zink A. Paleopathology of ancient Egyptian mummies and skeletons. Investigations on the occurrence and frequency of specific diseases during various time periods in the necropolis of Thebes-West. *Pathologe* 2002;23:379-385
 97. Nicholson AG, Perry LJ, Cury PM, Jackson P, McCormick CM, Corrin B, Wells AU. Reproducibility of the WHO/IASLC grading system for pre-invasive squamous lesions of the bronchus: a study of inter-observer and intra-observer variation. *Histopathology* 2001;38:202-208

98. Ortega-Andreu, M., Rodriguez-Merchan, E. C., Aguera-Gavalda, M. Brucellosis as a cause of septic loosening of total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 2002;17:384-387
99. Overdijk B, van Steijn GJ, Odds FC. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 1999;145:259-269
100. Page GP, Zakharkin SO, Kim K, Mehta T, Chen L, Zhang K. Microarray analysis. *Methods Mol Biol* 2007;404:409-430
101. Paoletti MG, Norberto L, Damini R, Musumeci S. Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Ann Nutr Metab* 2007;51:244-251
102. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol* 1999;52:118-123
103. Peersman G, Laskin R, Davis J, Peterson M. Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. *Clin Orthop* 2001;15-23
104. Persson PE, Nilsson OS, Berggren AM. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs cause endoprosthetic loosening? A 10-year follow-up of a randomized trial on ibuprofen for prevention of heterotopic ossification after hip arthroplasty. *Acta Orthop* 2005;76:735-740
105. Pessler F, Chen LX, Dai L, Gomez-Vaquero C, Diaz-Torne C, Paessler ME, Scanzello C, Cakir N, Einhorn E, Schumacher HR. A histomorphometric analysis of synovial biopsies from individuals with Gulf War Veterans' Illness and joint pain compared to normal and osteoarthritis synovium. *Clin Rheumatol* 2008;27:1127-1134
106. Pinals RS. Mechanisms of joint destruction, pain and disability in osteoarthritis. *Drugs* 1996;52,Suppl3:14-20
107. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Savarino L, Stea S, Tarabusi C. Results of histological grading on 100 cases of hip prosthesis failure. *Biomaterials* 1988;9:314-318
108. Pizzoferrato A, Stea S, Savarino L, Granchi D, Ciapetti G. Histomorphometric evaluation and pathogenesis of prosthetic loosening. *Chir Organi Mov* 1994;79:245-255
109. Pozhitkov AE, Tautz D, Noble PA. Oligonucleotide microarrays: widely applied--poorly understood. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007;6:141-148
110. Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M. Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: results of an European collaborative study. *BJOG* 2000;107:594-599

111. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006;354:2463-2472
112. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 1995;270:2198-2202
113. Revell PA. The synovial biopsy. In Anthony PP, MacSween RNM. Recent advances in histopathology, vol 13. Churchill-Livingstone, Edinburgh 1987
114. Richter-Kuhlmann E. Endoprothesenregister: „Ganze Produktgruppen werden vom Markt verschwinden“. *Dtsch Arztebl* 2008;105:A-16/B-14/C-14
115. Roach KE, Persky V, Miles T, Budiman-Mak E. Biomechanical aspects of occupation and osteoarthritis of the hip: A case-control study. *J Rheumatol* 1994;21:2334-2340
116. Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. Gesundheit in Deutschland. Juli 2006
117. Rodriguesa MR, Sa Mirandaa MC, Amarala O. Allelic frequency determination of the 24-bp chitotriosidase duplication in the Portuguese population by real-time PCR. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004;33:362–364
118. Rothschild BM, Woods RJ, Rothschild C, Sebes JI. Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: implications for pathogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 1992;22:181-187
119. Salmela PM, Hirn MY, Vuento RE. The real contamination of femoral head allografts washed with pulse lavage. *Acta Orthop Scand* 2002;73:317-320
120. Short CL. The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1974;17:193-205
121. Skripitz R, Aspenberg P. Pressure-induced periprosthetic osteolysis: a rat model. *J Orthop Res* 2000;18:481-484
122. Sobin LH, Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours, sixth edition. Wiley-Liss, Inc., Oxford 2002
123. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-760
124. Spector TD Rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:513-537
125. Stiehl P. Histologie der Rheumatoid-Arthritis. Beitrag zur diagnostischen und pathogenetischen Heterogenität, zur Aktivitätsdiagnose und zur Prognose. In: Sack U. Arthritiden. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin 1997:188-200

126. Strunz K, Deissler H, Kreienberg R, Sauer G. Predicting response to therapy in breast cancer. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2008;48:113-117
127. Stulberg BN, Della Valle AG; Implant Wear Symposium 2007 Clinical Work Group. What are the guidelines for the surgical and nonsurgical treatment of periprosthetic osteolysis? *J Am Acad Orthop Surg* 2008;16,Suppl1:20-25
128. Stürmer KM. Leitlinien Unfallchirurgie. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York 1999:175-183
129. Urban RM, Jacobs JJ, Gilbert JL, Galante JO. Migration of corrosion products from modular hip prostheses. Particle microanalysis and histopathological findings. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:1345-1359
130. van de Vrande S, Meijer J, Rijnders A, Klinkenbijn JH. The value of intraoperative frozen section examination of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; Epub Sep 9
131. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF, Sugar A, Verhoeven AJ, Boot RG, Aerts JM. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1505-1512
132. van Straalen JP, Bossens MM, de Reijke TM, Sanders GT. Biological half-life of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:53-55
133. Vente A, Korn B, Zehetner G, Poustka A, Lehrach H. Distribution and early development of microarray technology in Europe. *Nat Genet* 1999;22:22
134. von Eiff, C., Bettin, D., Proctor, R. A., Rolaufts, B., Lindner, N., Winkelmann, W. et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin.Infect.Dis* 1997;25:1250-1251
135. Wessinghage D. Themistocles Gluck, 100 Jahre Gelenkersatz. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1991;129:383–388
136. WHO Classification of Tumors. 3rd Edition. 10 Volumes. IARC Press, Lyon 2000-2006
137. Willert HG, Buchhorn GH. The biology of the loosening of hip implants. In: Jacob R, Fulford P, Horan F. *European Instructional Course Lectures, Vol. 4. The British Society of Bone and Joint Surgery* 1999:58-82

138. Wirtz DC, Heller KD, Niethard FU. Biomechanical aspects of load-bearing capacity after total endoprosthesis replacement of the hip joint. An evaluation of current knowledge and review of the literature *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1998;136:310-316
139. Wollenhaupt J. Taschenatlas der Rheumatologie. Thieme, Stuttgart, New York 2003

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. med. Manfred Dietel für die Schaffung großzügiger räumlicher und personeller Voraussetzungen für ein eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten und für seine vorbehaltlose Unterstützung meiner Tätigkeit auf dem Gebiet der orthopädischen Pathologie.

Ebenso möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Lehrer Prof. Dr. med. Veit Krenn bedanken, der mir die Grundzüge der medizinischen Forschung nahe gebracht, die Mittel für die vorgelegten Studien zur Verfügung gestellt und meine Arbeiten mit zahllosen innovativen Ideen bereichert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Gabriele Fernahl, die unermüdlich, mit großer Sorgfalt und Sachkenntnis wesentliche Laborarbeiten geplant und durchgeführt hat. Ebenso möchte ich Dr. med. Anja Rieger und den Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe für orthopädische Pathologie danken, insbesondere Monique Pöttsch, Rolf Classen und Obbe Tiddens.

Mein Dank gilt außerdem den Oberärztinnen und Oberärzten des Instituts für Pathologie für Ihre kontinuierliche Ausbildung in der histopathologischen Diagnostik. Weiterhin möchte ich mich bei den Assistenz- und Fachärztinnen und –ärzten des Instituts bedanken, denn mit ihrer diagnostischen Tätigkeit haben sie Freiräume für meine Forschungstätigkeiten geschaffen.

Weiterhin bedanken für eine exzellente Zusammenarbeit möchte ich mich bei den klinischen Kooperationspartnern, insbesondere bei Dr. med. Andreas Weimann, Dr. med. Thorsten Gehrke und Dr. med. Jörg Schröder.

Für ihre unbürokratische und hilfreiche Unterstützung danke ich der Stiftung des Gemeinnützigen Vereins ENDO-Klinik e.V.

Den Laborantinnen des immunhistologischen Labors des Instituts möchte ich ganz herzlich für eine lehrreiche und erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Schließlich gilt ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt und meine Ausbildung und letztlich den Weg zur Habilitation ermöglicht haben.

Erklärung

3 § Abs: 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen / Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Dr. med. Lars Morawietz