

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Histopathologische Klassifikation der Synovialis bei dysfunktioneller Endoprothese des oberen Sprunggelenks

zur Erlangung des akademischen Grades **Doctor medicinae (Dr. med.)**
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Müller

aus Detmold

Datum der Promotion: 05.06.2016

Abstract

Einleitung

Die für Hüftgelenk und Knie entwickelte erweiterte Konsensusklassifikation der Synovia like Interface-Membran (SLIM) liefert einen wichtigen Beitrag zur Abklärung von Endoprothesendysfunktionen. Eine standardisierte histopathologische Klassifikation zur ätiologischen Einordnung dysfunktioneller Endoprothesen im oberen Sprunggelenk (OSG) existiert jedoch bislang nicht. Ziel dieser Arbeit ist 1- die Anwendung der SLIM-Klassifikation bei dysfunktioneller OSG-Endoprothese mit Berücksichtigung lokalisationspezifischer Aspekte. 2-Die ätiologische Abklärung von periprothetischen Pseudozysten 3-die genaue Erfassung der proliferativen Aktivität (Ki67) in der Umgebung einer Osteolyse mit einer neu entwickelten Quantifizierungssoftware (sog. Inflammationsquantifier).

Material/Methode

Gewebeproben von insgesamt 159 Patienten wurden nach den Kriterien der erweiterten Konsensusklassifikation standardisiert untersucht. 117 Fälle entstammten dem oberen Sprunggelenk (OSG). Die Kontrollgruppe beinhaltete 42 Gewebeproben überwiegend von Hüftgelenk und Knie. Partikelidentifikation und -charakterisierung erfolgten mit dem Partikelalgorithmus. Von allen OSG-Pseudozysten sowie von 19 Kontrollfällen wurde eine Ki67-Immunhistochemie durchgeführt und die Ki67-Proliferationsfraktion bestimmt. Die Auswertung erfolgte automatisiert mit dem sog. Inflammationsquantifier und durch manuelles Auszählen am Computerbildschirm.

Ergebnisse

Die SLIM-Klassifikation ist grundsätzlich auf die dysfunktionelle OSG-Endoprothetik übertragbar. In 39 OSG-Endoprothetikfällen (33,3%) lag eine periprothetischen Pseudozyste mit den histopathologischen Merkmalen des entsprechenden SLIM- Subtyps vor. Bei periprothetischen Pseudozysten war ein SLIM-Typ I (abriebinduzierter Typ) in 20/39 Fällen nachzuweisen (51,3%). In 1/39 Fällen lag ein infektiöser Typ/SLIM Typ II (2,6%) vor, in 3/39 Fällen ein Mischtyp/SLIM Typ III (7,7%), in 10/39 Fällen ein Indifferenztyp/SLIM Typ IV (33,3%) und in 2/39 Fällen (5,1%) eine endoprothesenassoziierte Arthrofibrose (EAF). Die SLIM-Häufigkeiten in nicht-zystischen OSG-Fällen sind in 33/78 Fällen dem SLIM-Typ I (42,3%), 12/78 Fällen dem SLIM-Typ II (15,4%) 1/78 Fall dem SLIM-Typ III (1,3%), 28/78 Fällen dem SLIM-Typ IV (35,9%), 2/78 Fällen der endoprothesenassoziierten Arthrofibrose (2,6%) und 2/78 Fällen dem nekroseprädominanten Typ NOS (not other specified) zuzuordnen (2,6%). Die Ki67-Quantifizierung

erbrachte mit einem Mittelwert von 14% eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate in OSG-Zysten (p-Wert = 0.02037). Calciumpyrophosphat war signifikant häufiger im oberen Sprunggelenk (n=27) als in Hüftgelenk und Knie nachweisbar (n=1); p-Wert = 0.004782.

Schlussfolgerung

Bei periprothetischen Pseudozysten ist der überdurchschnittliche Nachweis eines abriebinduzierten SLIM-Typs (Typ I) mit der signifikant erhöhten Ki67-Proliferationsfraktion als intraossäre Abriebsynovialitis zu werten. Eine hohe mechanische Belastung kann zur vermehrten Freisetzung von Abriebpartikeln führen, die zur Entstehung einer proliferationsaktiven proinflammatorischen Umgebung mit pseudozystischer Osteolysenbildung einhergeht. Der Ki67-Inflamationsquantifier ist ein geeignetes Instrument für die objektive Quantifizierung proliferierender Zellen. Vorgeschlagen wird ein vereinfachtes Klassifikationssystem für die dysfunktionelle Endoprothetik des oberen Sprunggelenks zur Erfassung von periprothetischen Zysten (ZY), Calciumpyrophosphat (CPPD); Ossifikationen (OSS) und Ki67-Proliferationsfraktion (SLIM OSG-Score: SLIM Type I-IV/EAF, ZY+/-, CPPD+/-, OSS+/-, Ki67%).

Abstract

Introduction

Histopathological standardisation concerning endoprosthetical dysfunctions after total ankle replacement (TAR) does not exist. The histopathological Consensual Classification of the synovia like interface membrane (SLIM) was originally developed for periprosthetical membranes of knee and hip. The aim is 1- to develop a SLIM-subclassification especially for periprosthetical membranes of the ankle joint. 2- aetiological investigation of periprosthetic pseudocysts after total ankle replacement (TAR). 3- detailed measurement of osteolysis-associated inflammation by using a new developed Ki67-Quantifier for use in inflamed tissue (Inflammation-Quantifier) in comparison to manually counted quantification.

Material/Method

159 ankle cases were examined with the standardised histopathological Consensus Classification including the particle algorithm. 117 cases derived from periprosthetical membranes after total ankle replacement (TAR), divided in regular periprosthetical membranes (n=78) and pseudocystic structures (n=39). The control group was determined by 42 specimens mainly from hip and knee. In all pseudocystic TAR-cases and 19 control cases a immunohistochemical examination with Ki67 was performed, evaluated by Ki67-Inflammation-Quantification in comparison to manually counted Ki67-Index.

Results

The Consensual Classification of Synovia like Interface membrane fundamentally applies to periprosthetic membranes of the ankle joint. In pseudocystic structures SLIM Type I was over average. Periprosthetic pseudocysts were detectable in 33.3% of all ankle cases (n=39). In periprosthetic pseudocysts SLIM type I was detected in 20/39 cases (51.3%), SLIM type II in 1/39 cases (2.6%), SLIM type III in 3/39 cases (7.7%), SLIM type IV in 10/39 cases (33.3%) and endoprosthesis-associated arthrofibrosis (EAF) in 2/39 cases (5.1%). In non-cystic cases of periprosthetic ankle membranes a SLIM type I was diagnosed in 33/78 cases (42.3%), SLIM type II in 12/78 cases (15.4%), SLIM type III in 1/78 cases (1.3%), SLIM type IV in 28/78 cases (35.9%), endoprosthesis associated arthrofibrosis in 2/78 cases (2.6%) and necrosis-predominated Type NOS (not other specified) in 2/78 cases (2.6%). The Ki67-Index was significantly over average in periprosthetical pseudocysts (p-Score = 0.02037). One important finding were Calcium-Pyrophosphate-Depositions (CPPD) in ankle cases.

Conclusion

In periprosthetic pseudocysts SLIM-Type I was over average and the Ki67-Index was significantly increased, which can be interpreted as local destructive intraosseus synovialitis associated to wear debris. This can be caused by high mechanical stress in ankle endoprosthesis. The Ki67-Inflammation-Quantifier is a suitable computational tool for use in inflamed tissues. Our proposal is a simplified classification scoring-system: Assigning to SLIM-Subtypes I-IV/EAF/NOS, periprosthetic cysts (ZY), Calciumpyrophosphate-Depositions (CPPD), Ossifications (OSS) and Ki67-Index (SLIM TAR-Score: SLIM Type I-IV/EAF, ZY+/-, CPPD+/-, OSS+/, Ki67%).

Abkürzungsverzeichnis

AOFAS	American Orthopaedic Foot and Ankle Society
CPPD	Calciumpyrophosphatdepositionen
D. A. F.	Deutsche Assoziation für Fuß und Sprunggelenk e.V.
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EAF	Endoprothesenassoziierte Arthrofibrose
EULAR	European League Against Rheumatism
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	high power field
NOS	not otherwise specified
ODN	Oligodeoxynucleotide
OR	Odd's ratio
OSG	oberes Sprunggelenk
PAS	Periodic Acid Schiff
PMMA	Polymethylmetacrylat
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PPZ	periprothetische Zyste
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B-Ligand
ROI	Region of Interest
SLIM	Synovia like interface membrane
SOP	Standard operating procedure

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Endoprothetik des oberen Sprunggelenks	1
1.2	Bedeutung zystischer Osteolysen	3
1.3	Definition von periprothetischen Pseudozysten	4
2	Aufgabenstellung	6
3	Material und Methoden	7
3.1	Probenmaterial	7
3.2	HE-Färbeprotokoll	7
3.3	Protokoll der Spezialfärbungen Fe/PAS	8
3.4	Ki67-Protokoll (Immunhistochemie)	9
3.5	Ki67-Antikörper	9
3.6	Ki67-Quantifier und Inflammationsquantifier	10
3.7	Semiquantitatives manuelles Auszählen am Computerbildschirm	13
3.8	Histopathologische Auswertung mit Anwendung des Partikelalgorithmus	14
3.9	Klinisch-pathologische Korrelation	15
3.10	Statistische Methoden	16
4	Ergebnisbeschreibung	17
4.1	Patientenkollektiv OSG-Endoprothetik und Kontrollgruppe	17
4.2	Klinisch-pathologische Korrelation	18
4.3	Histopathologie der periprothetischen Pseudozysten	19
4.4	Anwendung der SLIM-Konsensusklassifikation	20
4.5	Bestimmung der Ki67-Proliferationsrate	25
4.6	Nachweis von Calciumpyrophosphat (CPPD)	31
5	Diskussion	34
5.1	SLIM-Verteilung im Vergleich zu den Literaturdaten	34
5.2	Pathogenese der Endoprothesendysfunktion	37

5.3	Partikelalgorithmus im vorliegenden Kollektiv	38
5.4	Klassifikation bei dysfunktioneller Endoprothese im oberen Sprunggelenk . .	38
5.5	Aktuelle Hypothesen zur Entstehung von periprothetischen Zysten	39
5.6	Calciumpyrophosphat (CPPD) als ätiologischer Kofaktor	41
5.7	Heterotope Ossifikationen	43
5.8	Ki67 im Synovialgewebe	44
5.9	Ki67 in der automatisierten Anwendung	44
	Literaturverzeichnis	47
	Abbildungsverzeichnis	52
	Tabellenverzeichnis	54
	Eidesstattliche Versicherung	55
	Publikationsliste	56
	Lebenslauf	58
	Danksagung	60

1 Einleitung

1.1 Endoprothetik des oberen Sprunggelenks

In der Vergangenheit war die Arthrodesis als gelenkversteifende Operation therapeutisches Standardvorgehen bei der schweren Arthrose des oberen Sprunggelenks. Ein wesentlicher Vorteil bei dieser Methode ist die gute Schmerzreduktion und somit eine allgemeine Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit oftmals jahrelanger Leidensgeschichte. Ein wesentlicher Nachteil der Arthrodesis ist die unphysiologische Fehlbelastung der an die Arthrodesis angrenzenden Nachbargelenke, wodurch degenerative Gelenkveränderungen begünstigt werden [YU, SHESKIER 2014].

Die in den 1970er Jahren aus zwei Komponenten bestehenden Sprunggelenkendoprothesen der ersten Generation zeichneten sich durch eine verhältnismäßig ausgedehnte Knochenresektion mit anschließender Zementfixierung aus [BONASIA, DETTONI, FEMINO, PHISITKUL et al. 2010]. In der Literatur wird die Rate aseptischer Lockerungen bei Prothesen der ersten Generation mit nahezu 90% beziffert [EASLEY, VERTULLO, URBAN, NUNLEY 2002].

Das heutige moderne Implantatdesign besteht aus drei Komponenten einschließlich beweglichem Polyethylenkern (mobile bearing) mit zementloser Implantatverankerung [YU, SHESKIER 2014]. Eine rasche Integration des Implantats in das ossäre Lager wird durch spezielle Implantatbeschichtungen gewährleistet. Klinische Studien zeigen, dass bei Patienten mit zementfreier Endoprothese bessere klinische Ergebnisse zu erzielen sind als bei zementierten Endoprothesen [SCHILL, THABE 2009], sodass im modernen OSG-Prothesendesign ausschließlich zementfreie Endoprothesen Anwendung finden.

Die deutsche Fachgesellschaft für Fuß- und Sprunggelenkchirurgie (D. A. F.) hat auf freiwilliger Basis ein Register für Sprunggelenkendoprothesen errichtet, um klinische Verlaufsdaten zentral zusammenzuführen (<https://memcms.memdoc.org/index.php?id=331&L=de>). In einer aktuellen Register-Datenauswertung wird als häufigste Indikation zur Implantation einer Sprunggelenks-Endoprothese eine posttraumatische Osteoarthritis genannt, gefolgt von einer primären Osteoarthritis und einer rheumatischen Arthritis. Die Implantationsrate

von Sprunggelenksendoprothesen liegt in Deutschland derzeit bei lediglich 1300 pro Jahr [KOSTUJ, PREIS, WALTHER, AGHAYEV et al. 2014]. Im Vergleich hierzu werden in Deutschland jährlich 230.000 Hüftgelenksendoprothesen und 170.000 Kniegelenksendoprothesen implantiert [MORAWIETZ, KRENN 2014].

Häufigste Revisionsgründe nach Implantation einer Sprunggelenkendoprothese sind aseptische Lockerungen und Instabilität [SKYTTÄ, KOIVU, ESKELINEN, IKÄVALKO et al. 2010] sowie persistierende Schmerzen und septische Lockerungen. Während die aseptische Lockerung in der Hüft-, Knie- und Sprunggelenksendoprothetik die häufigste Versagensursache des endoprothetischen Ersatzes darstellt, unterscheiden sich die übrigen Versagensursachen lokalisationsabhängig geringfügig voneinander. Zweithäufigste Versagensursache bei OSG-Endoprothetik sind persistierende Schmerzen, dritthäufigste Versagensursache ist die septische Lockerung [SADOGHI, LIEBENSTEINER, AGREITER, LEITHNER et al. 2013]

Die 5-Jahres-Revisionsrate von Sprunggelenkendoprothesen wird nach aktueller Meta-Datenlage weltweit mit 10% angegeben, wobei hierbei in 40% eine aseptische Lockerung vorliegt [LABEK, TODOROV, IVANESCU, STOICA et al. 2013]. Auf 100 Komponentenjahre der Endoprothesenteile berechnet ergeben die Vergleichsdaten bei primärer Hüftendoprothese 1,29 Revisionen, bei totalen Knieendoprothesen 1,26 Revisionen und 3,29 Revisionen bei Sprunggelenksendoprothesen [LABEK, THALER, JANDER, AGREITER et al. 2011].

Aus den vergleichenden Daten lässt sich ableiten, dass bei Sprunggelenks-Endoprothesen trotz kontinuierlich verbessertem Prothesendesign im Vergleich zu anderen klassischen Prothesenlokalisationen häufigere Revisionen notwendig sind. Komplikationen bei Implantation einer Sprunggelenkendoprothese sind intraoperativ, postoperativ oder im Rahmen einer Spätkomplikation möglich [ORTHNER 2011].

Als unabhängige Risikofaktoren für das Versagen einer OSG-Endoprothese wurden das Patientenalter <70 Jahre (OR 3,84), die Ätiologie der OSG-Arthrose (primäre Arthrose OR 7,19; posttraumatische Arthrose OR 6,20) sowie die Prothesengeneration (Einfache Hydroxylapatitbeschichtung OR 15,04) identifiziert [BARG, ZWICKY, KNUPP, HENNINGER et al. 2013].

Nach aktuellem Stand der Literatur und Technik ist im Falle eines Implantatversagens ist neben einer sog. Post-Prothesen-Arthrode im Sinne einer Defektüberbrückung eine ein- oder zweizeitige Revisionsendoprothetik sowie eine klassische Konversion zu OSG-Arthrode möglich [BARG, WIMMER, WIEWIORSKI, WIRTZ et al. 2015].

Zystische Osteolysen stellen ein zum Teil noch ungeklärtes Problem einer Spätkomplikation dar. Aufgrund der klinischen Relevanz liefert diese Arbeit einen Beitrag zur weiteren Ein-

ordnung von periprothetischen zystischen Läsionen bei einliegender Sprunggelenksendoprothese. Calciumpyrophosphat (CPPD) und heterotope Ossifikationen sind hierbei als ätiologische Kofaktoren zu benennen.

Bei der Behandlung der fortgeschrittenen OSG-Arthrose sollte nach aktueller Meinung nach Abwägung aller Faktoren nicht der Terminus eines sog. „Goldstandards“ im Sinne einer einzigen bestmöglichen Versorgungsoption verwendet werden – weder bei der OSG-Arthrodeese noch bei der OSG-Prothese. Vielmehr sollte es angestrebt werden, ein auf den jeweiligen Patienten zugeschnittenes individualisiertes Konzept zu erarbeiten, welches unter Berücksichtigung aller patientenorientierten Faktoren in der Lage ist, zufriedenstellende postoperative Resultate zu erzielen [BARG, WIMMER, WIEWIORSKI, WIRTZ et al. 2015].

1.2 Bedeutung zystischer Osteolysen

Zystische Osteolysen können schon bei Primärimplantation der Endoprothese vorhanden sein. Aus anatomischen Gründen (kleinere Dimensionen ossärer Strukturen, insbesondere in Bezug auf den Talus) können zystische Osteolysen im zeitlichen Verlauf im Falle einer Reduzierung des Knochenlagers klinisch bedeutsam werden, sodass im Einzelfall aufwändige Revisionen und als letztmögliche Option auch der Umstieg auf eine Arthrodeese erforderlich sein können [ORTHNER 2011]. Dieser Prozess kann asymptomatisch verlaufen und erst radiologisch im Rahmen einer Verlaufskontrolle auffallen oder im Falle einer mechanischen Komplikation mit Mikrofrakturierung der Kortikalis mit einer Schmerzsymptomatik einhergehen [DALAT, BARNOUD, FESSY, BESSE 2013]. Aus diesen Beobachtungen leitet sich ab, dass periprothetischen Zysten im Sinne einer umschriebenen osteolytischen Läsion nach Sprunggelenkendoprothesen-Implantation ein lokal destruierender Prozess zugrunde liegen kann, der im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

Das Auftreten von periprothetischen Zysten im oberen Sprunggelenk liegt je nach Literatur zwischen 33% [PREYSSAS, TOULLEC, HENRY, NERON et al. 2012], 37% [KOIVU, KOHONEN, ALANEN et al. 2009] und 43% des untersuchten Kollektivs [NELL, HAMEL 2013]

In einer größeren Untersuchung [ORTHNER 2011] wurde eine durch Zystenbildung erforderliche Revision in 16 von 456 Fällen (3,5%) dokumentiert. In einem Fall war ein Prothesenwechsel erforderlich, in 15 Fällen wurden die Zysten eröffnet und debridiert. Viermal erfolgte eine Auffüllung mit autologer Spongiosa, zehnmal homolog und einmal mit Knochenzement.

In einem untersuchten Patientenkollektiv [NELL, HAMEL 2013] waren bei 43 von 100 Patienten radiologische Hinweise auf eine Zystenbildung erkennbar, wobei die Zysten 26mal im Talus,

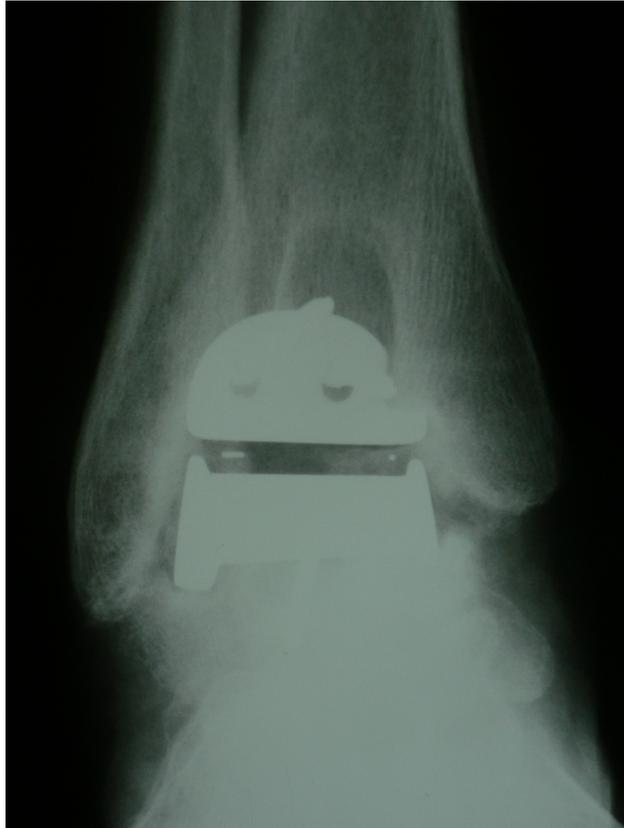


Abbildung 1.1: *Radiologischer Befund einer periprothetischen Tibia-Zyste bei einliegender OSG-Endoprothese*

17mal in der Tibia und 2mal in der Fibula nachzuweisen waren. Bei Patienten mit periprothetischen Zysten war bei Erhebung eines objektivierbaren Funktionalitätsscores der AOFAS (American Orthopedic Foot and Ankle Society) eine signifikant höhere mittlere Beweglichkeit und ein signifikant höherer mittlerer AOFAS-Score nachweisbar. Bei 6 von 43 Patienten (6% des Kollektivs) wurden die periprothetischen Zysten aufgrund von Größenprogredienz und/oder Schmerzsymptomatik operativ revidiert.

1.3 Definition von periprothetischen Pseudozysten

In der Bildgebung sind unterschiedliche periprothetische Läsionen morphologisch voneinander abzugrenzen: Röntgenologisch imponieren Zysten im periprothetischen Kompartiment als klar umschriebene osteolytische Areale, während eine Radioluzenz (= Durchlässigkeit für Röntgenstrahlen) eine Linie entlang der Grenzzone zwischen Implantat und Knochen darstellt[PREYSSAS, TOULLEC, HENRY, NERON et al. 2012].

Eine Zyste ist allgemein definiert „durch eine Gewebskapsel abgeschlossener, ein- oder mehrkammeriger Gewebshohlraum mit dünn- oder dickflüssigem Inhalt; als echte Zyste ausge-

kleidet mit Epithel“ [REICHE 2003]. Da die hier untersuchten Läsionen histopathologisch keine epitheliale Auskleidung aufweisen, entsprechen sie histopathologisch periprothetischen Pseudozysten.

Da der Prozess mit einer intraossären Defektbildung einhergeht, kann die Entstehung der periprothetischen Pseudozysten als Ausdruck einer lokalen, klar umschriebenen Osteolyse verstanden werden.

Allerdings ist in der Literatur offenbar eine Vermischung von periprothetischen Zysten und sog. „Radiolucent lines“ zu beobachten, was in der Literatur zu einer extrem breiten Inzidenzspanne von Radiolucent lines führt [NELL, HAMEL 2013].

Radiologisches Bildmaterial wurde zur Frage nach periprothetischen Zysten in Abgrenzung zu Radiolucent lines an der Knochen-Implantatgrenze untersucht. Periprothetische Pseudozysten wurden hierbei als in periprothetischer Lage lokalisierte rundlich-ovaläre osteolytische Knochenläsionen mit scharfer Demarkation in Form eines Sklerosesaumes definiert, während „Radiolucent lines“ sich durch Osteolysesäume ohne rundlich ovaläres Muster parallel zur Prothesen-Knochengrenze auszeichnen [NELL, HAMEL 2013].

2 Aufgabenstellung

Eine histopathologische Klassifikation zur ursächlichen Abklärung des Endoprothesenversagens im Bereich des oberen Sprunggelenks existiert bislang nicht. Die Anwendung der erweiterten Konsensusklassifikation der sog. Synovia-like-Interface-Membran (SLIM) ist ein etabliertes Verfahren zur ätiologischen Abklärung des Endoprothesenversagens [KRENN, MORAWIETZ, PERINO, KIENAPFEL et al. 2014].

1 - Im Rahmen dieser Arbeit wird die erweiterte SLIM-Konsensusklassifikation erstmalig auf die Endoprothesendysfunktion des oberen Sprunggelenks übertragen und modifiziert um die Besonderheiten des oberen Sprunggelenks zu berücksichtigen.

2 - Ziel dieser Arbeit ist es, die Ätiologie der Endoprothesendysfunktion im oberen Sprunggelenk histopathologisch zu analysieren. Ätiologisch weitestgehend ungeklärt ist die Entstehung von periprothetischen Pseudozysten im oberen Sprunggelenk als möglicher Ausgangspunkt für die Entstehung einer Endoprothesendysfunktion. In dieser Arbeit soll neben der allgemeinen histopathologischen Untersuchung mit Anwendung der SLIM-Klassifikation die Ätiologie von periprothetischen Pseudozysten im oberen Sprunggelenk aufgeklärt werden.

3 - Die konventionell-histologische Untersuchung wird ergänzt durch eine immunhistochemische Bestimmung der Ki67-Proliferationsfraktion. Hierbei wird eine neu entwickelte Software zur automatisierten Erfassung der Ki67-Proliferationsfraktion (sog. Inflammationsquantifier) im periprothetischen Kompartiment erstmals angewendet und validiert.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik wurde bei Revisionseingriffen entnommenes periprothetisches Gewebe von 159 Patienten (78 weiblich, 81 männlich, durchschnittliches Alter 62,0 Jahre) unter akkreditierten Bedingungen (DIN EN ISO/IEC 17020) in der Pathologie Trier (ZHMD-Trier, Germany) histopathologisch und immunhistochemisch in der Routinediagnostik bearbeitet. Die Gewebeentnahme-Prinzipien und die histopathologische Diagnostik erfolgten gemäß der SLIM-Konsensus-Klassifikation.

Die Proben werden klinischerseits standardmäßig in 4%-igem Formaldehyd (Formalin) fixiert übersandt. Im Zuschnitt erfolgt anschließend die makroskopische Aufarbeitung. Nach der Einbettung einer repräsentativen Gewebeprobe wird das Gewebe über Nacht im Automaten (Peloris SOP 8204, Leica, Wetzlar) entwässert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 1-3 Mikrometer dünnen Schnitten mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Hyrax M40, Zeiss, Oberkochen, Messer A35, Feather, Osaka, Japan) wird vom periprothetischen Gewebe standardmäßig neben einer HE-Übersichtsfärbung eine Berliner Blau- sowie eine PAS-Färbung im Färbeautomaten angefertigt.

3.2 HE-Färbeprotokoll

Als Übersichtsfärbung für alle Präparate hat sich die Hämatoxylin-Eosin-Färbung weltweit seit Jahrzehnten bewährt. Man unterscheidet hierbei eine Kernfärbung von einer Plasmafärbung, wobei hierbei möglichst kontrastreiche Farbstoffe zum Einsatz kommen. Das Oxidationsprodukt des Hämatoxylins wird als Hämatein bezeichnet. Durch Zugabe einer Beize (Alaunsalze) kommt es zur Komplexbildung von Hämatein und Metallion. Das gewünschte Färbergebnis ist eine blaue bis violette Kernfärbung. Als Plasmafärbung kommt Eosin zum Einsatz, welches Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot färbt [LANG 2006].

Die Anfertigung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) erfolgt vollautomatisch mit dem Leica ST4040 Färbemodul nach festgelegtem Protokoll. Dieses beinhaltet zunächst eine Deparaffinierung mit Xylol, Hydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe bis zur Stufe Leitungswasser. Danach Beginn der Kernfärbung durch Eintauchen der Objektträger in Hämatoxylin nach Harris (Hämatoxylin nach Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) für 4 mal 2 Minuten sowie Bläuen der Zellkerne in 70%igem Ethanol und 25%iger Salzsäure sowie Spülen mit Leitungswasser. Die anschließende Hintergrundfärbung erfolgte durch Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA) für insgesamt 4 mal 2 Minuten. Anschließend werden die Objektträger zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt sowie für 3 mal 2 Minuten in Xylol geklärt. Die Eindeckung der Objektträger erfolgt vollautomatisch im Eindeckautomaten (CV5030, Leica, Wetzlar) unter Verwendung eines speziellen Eindeckmediums.

3.3 Protokoll der Spezialfärbungen Fe/PAS

In der auch als Berliner-Blau-Reaktion bezeichneten Eisenfärbung wird dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}) mit Kaliumhexacyanoferrat blau dargestellt. In der orthopädischen Pathologie ist der Nachweis von Eisen entitätsassoziiert endogen (z.B. spezifische granuläre Positivität von Hämosiderindepositionen beim tenosynovialen Riesenzelltumor) bzw. exogen im periimplantären Gewebe nach stattgehabter Einblutung zu beobachten.

Die Färbung wird in der Pathologie Trier nach Standard Operation Procedure (SOP) vollautomatisiert am Multistainer ST 5020 Leica unter akkreditierten Laborbedingungen durchgeführt. Bei der Rezeptur werden Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, Kernechtrot sowie Ethanol und Xylol verwendet, wobei die beiden erstgenannten Chemikalien nach festgelegter Rezeptur selbst hergestellt werden. In den beiden ersten Schritten der Färbereihe werden die Objektträger vorbehandelt mit Xylol. Anschließend werden die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol) sowie mit Aqua dest. gespült. Im nächsten Schritt werden die Objektträger für 20min. in Kaliumhexacyanoferratlösung getaucht und erneut gespült. Im nächsten Schritt folgt eine 10minütige Gegenfärbung in Kernechtrot für eine rote Kernfärbung, anschließend erneute Spülung mit Fließwasser. Zum Abschluss werden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (96%iger und 100%iger Alkohol) sowie mit Xylol geklärt.

In der PAS-Reaktion werden Zucker-Makromoleküle mit Perjodsäure zu den entsprechenden Aldehyden oxidiert. Mit fuchsin-schwefeliger Säure (sog. Schiff-Reagenz) ergibt sich eine intensiv rote Darstellung, welche man sich histopathologisch zunutze macht. Da in neu-

trophilen Granulozyten viele Glykogengranula für die Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse nachweisbar sind [JUNQUEIRA, CARNEIRO, KELLY 2002], ergibt sich in der PAS-Reaktion in neutrophilen Granulozyten eine kräftige bis diffuse Anfärbbarkeit. Bei der Untersuchung von periprothetischen Membranen wird deshalb in der Pathologie Trier standardmäßig eine PAS-Färbung angefertigt, um neutrophile Granulozyten besser identifizieren zu können.

Im standardisierten Protokoll umfasst die PAS-Färbung zwanzig Einzelschritte. Die ersten beiden Schritte werden gebildet von zwei Xylol-Durchläufen zur Vorbehandlung. Anschließend werden die Objektträger zur Hydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (100%ig, 96%ig, 70%ig) sowie mit Fließwasser gespült. Danach werden die Objektträger in Perjodsäure getaucht sowie mit Fließwasser abgespült. Die beiden darauffolgenden Schritte beinhalten das Inkubieren in Schiffschem Reagenz sowie einen erneuten Spülvorgang mit mit Fließwasser. Der nächste Schritt besteht aus dem Eintauchen in HCl-Alkohol, gefolgt von Spülen mit Fließwasser. In den nächsten beiden Schritten folgt ein Eintauchen in Isopropanol sowie dreimaliges Klären mit Xylol.

3.4 Ki67-Protokoll (Immunhistochemie)

Grundlage für die Anfertigung der Ki67-Immunhistochemie ist das 90 Teilschritte umfassende Protokoll-Nr. 574 mit der Prozedur XT iVIEW DAB v3 (Benchmark XT I H C Färbemodul). Die Objektträger werden hierfür in das Gerät eingelegt und zunächst in einem mehrstufigen Verfahren gewaschen, deparaffiniert und mit einem sog. Cell Conditioner mit Temperaturen bis 100°C für definierte Zeiträume inkubiert. Anschließend folgen mehrere Inkubationsvorgänge mit Reaktionspuffer. Anschließend wird ein Tropfen des Ki-67 (30-9)-Antikörpers aufgetragen, nachfolgend wird dieser für 32 Minuten inkubiert. In den weiteren Schritten erfolgt neben alternierenden Spülvorgängen mit Reaktionspuffer die Zugabe von I-VIEW Biotin Ig, I-VIEW SA-HRP, I-VIEW DAB als Chromogen mit I-VIEW H₂O₂ zum Blockieren der endogenen Peroxidase, I-VIEW COPPER und Hämatoxylin-Gegenfärbung mit mehrminütigen Inkubationszeiten.

3.5 Ki67-Antikörper

Ki67 bezieht sich auf einen monoklonalen Mäuseantikörper, wobei die Abkürzung *Ki* für den Sitz des Entwickler-Instituts in der Stadt Kiel steht und die Zahl 67 die Position des Origi-

nalklons auf der 96er Mikrotiterplatte bezeichnet. Das Ki67-Protein wird exprimiert in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2- und M-Phase), während es in ruhenden Zellen der G0-Phase nicht nachgewiesen werden kann. Das nukleäre Ki67-Antigen ist somit assoziiert mit Zellproliferation und somit ein geeigneter Marker zur Erfassung der Proliferationsfraktion [GERDES, SCHWAB, LEMKE, STEIN 1983].

Die Bestimmung der Proliferationsfraktion mit dem Ki67-Antikörper stellt ein etabliertes Untersuchungsverfahren in der histopathologischen Diagnostik dar. So ist die Ki67-Proliferationsfraktion aufgrund der prognostischen Relevanz ein wichtiges Kriterium zur Bestimmung des St. Gallen-Phänotyps beim Mammakarzinom [MAISONNEUVE, DISALVATORE, ROTMENSZ, CURIGLIANO et al. 2014] und ist bestimmendes Kriterium bei der Graduierung von neuroendokrinen Neoplasien [McCALL, SHI, CORNISH, KLIMSTRA et al. 2013]. In einer Untersuchung wurden Ki67 positive Zellen in der Synovia vor allem subintimal im entzündlichen Infiltrat nachgewiesen, aber auch in Endothelzellen und in Fibroblasten im Bereich der weniger entzündlich überlagerten Areale. Die höchste Ki67-Expression war in septischen Arthritiden und rheumatoider Arthritis beobachtet worden, wobei bei chronischen septischen Arthritiden zudem proliferierte Endothelzellen in kleineren Blutgefäßen mittels Ki67/CD31-Doppelimmunhistochemie detektiert wurden [PESSLER, DAI, DIAZ-TOME, OGDIE 2008]. In der Ki67-Immunhistochemie stellt sich eine durch die Verwendung von Diaminobenzidin (DAB) eine kräftige bräunliche nukleäre Expression dar. Bei der Auswertung werden in der Tumordiagnostik üblicherweise sog. hot spot-Areale im hoch vergrößerten Gesichtsfeld (high power field/HPF) mit dem 40er Objektiv ausgezählt.

3.6 Ki67-Quantifier und Inflammationsquantifier

Der Ki67-Quantifier ist ein Instrument zur automatisierten Erfassung der Proliferationsfraktion (Fa. VMscope Berlin, zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2012). Basierend auf dem Software-Tool *CognitionMaster* erfolgt eine objektbasierte Bilddatenanalyse nach dem Grundprinzip der konturbasierten Segmentierung. In der Bilddatenanalyse gleich erscheinende Pixelinformationen werden hierbei zu distinkten Segmenten zusammengefasst, klassifiziert (Ki67+ und Ki67-) und quantifiziert [WIENERT, HEIM, KOTANI et al. 2013]. Der in der Tumordiagnostik bereits gut etablierte Ki67-Quantifier erfasst hierbei die Ki67-positiven Tumorzellkerne relativ zu den Ki67-negativen Tumorzellkernen.

Für den Einsatz in der Inflammationsumgebung des periprothetischen Kompartiment erfolgte durch Herrn Dipl.-Inf. Stephan Wienert eine Weiterentwicklung des Inflammationsquantifiers. Da im untersuchten Kompartiment keine Tumorphilpopulation vorliegt, sondern

inflammatorisches Gewebe, wird beim sog. Inflammationsquantifier das Verhältnis Ki67-positiver Zellkerne zu *allen* Zellkernen angegeben. Für die Analyse wurde die Verwendung des 20er-Objektivs empfohlen.

Die einzelnen Teilschritte des Ki67-Quantifiers sind in Abbildung 3.1 dargestellt und umfassen:

- Ki67 gefärbtes Schnittpräparat (A),
- Ergebnis der Kontursuche (B),
- Bestimmung der Zielgröße von Objekten (C),
- Konturbasierte Erkennung der Zellkerne (D),
- zusätzliche Erkennung der Zellkerne durch das Vorder- und Hintergrund-Histogramm (E),
- Klassifikation in Ki67- (grün) und Ki67+ (rot) Zellkerne (F).

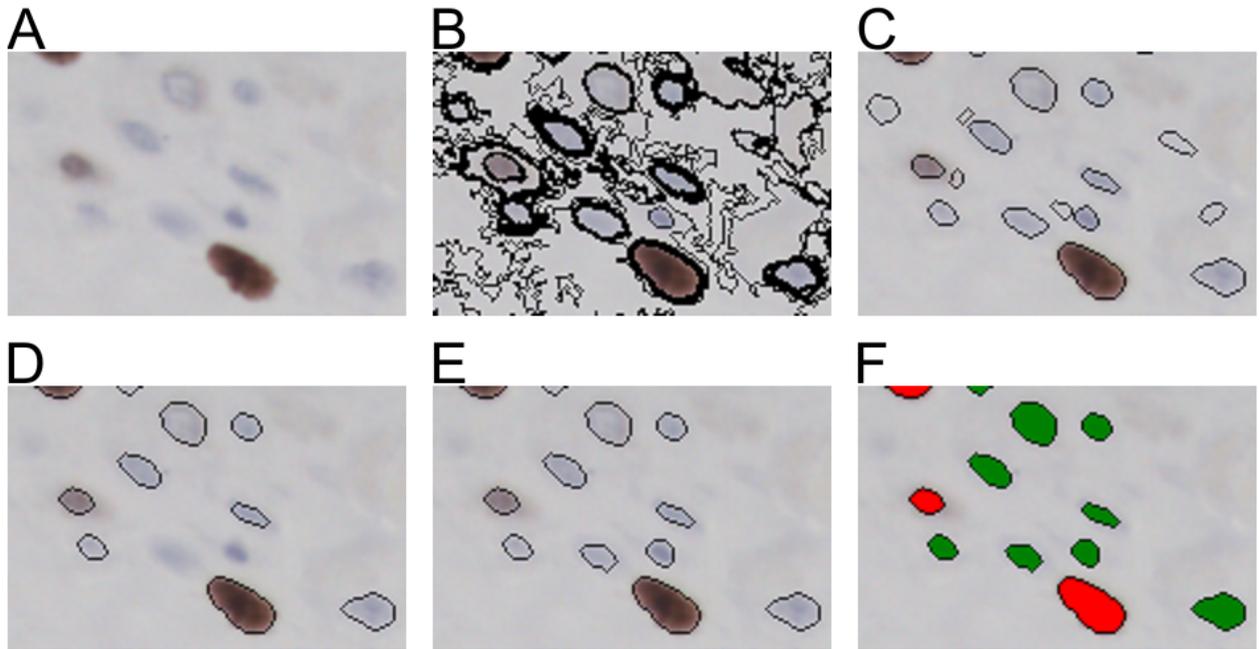


Abbildung 3.1: *Ki67-Inflammationsquantifier: Ablauf der automatischen Zellkernererkennung*

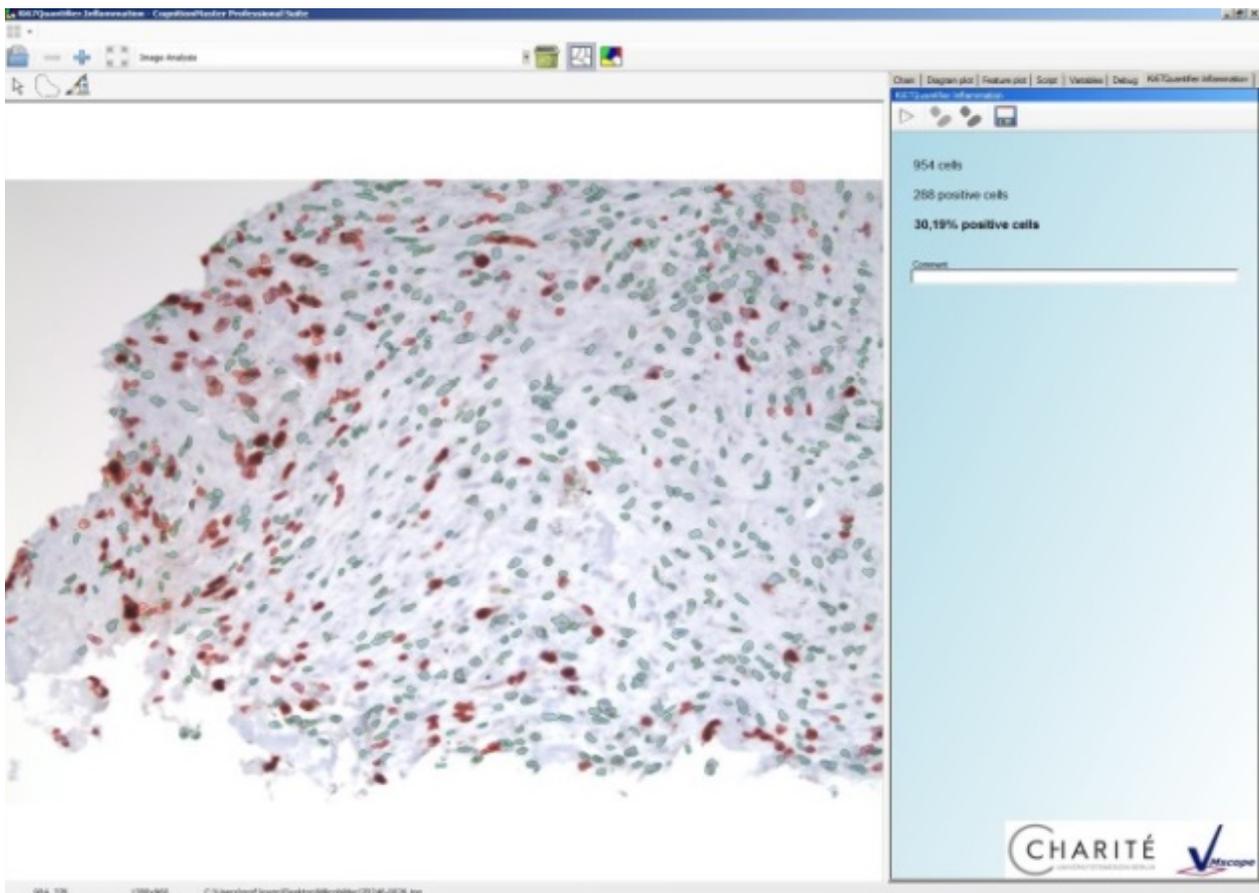


Abbildung 3.2: *Analyse der automatischen Zellkernererkennung mit dem Inflammationsquantifier (Ki67-positive Zellkerne sind rot markiert, Ki67-negative Zellkerne sind grün markiert)*

3.7 Semiquantitatives manuelles Auszählen am Computerbildschirm

Um eine Reproduzierbarkeit für den Vergleich mit der automatisierten Quantifizierung zu gewährleisten, wurde eigens zu diesem Zweck durch Herrn Dipl.-Inf. Jürgen Knauth ein Softwarewerkzeug mit Namen *EasyCellEnumerator* entwickelt, welches am Bildschirm per Mausklick eine Markierung der Ki67-positiv markierten Zellen sowie der Ki67-negativen Zellen in Relation ermöglicht. Die vom Untersucher als Ki67-positiv gewerteten Zellen werden hierbei mit einem Mausklick mit einer roten punktförmigen Markierung versehen, während die Ki67-negativen Zellformen per Mausklick mit einer blauen punktförmigen Markierung versehen werden. Die so erzeugten Bilddateien werden gespeichert und anschließend mit den jeweiligen Bilddateien des automatisierten Messverfahrens verglichen, um so die Unterschiede zwischen automatisierter und manueller Quantifizierung zu erfassen.

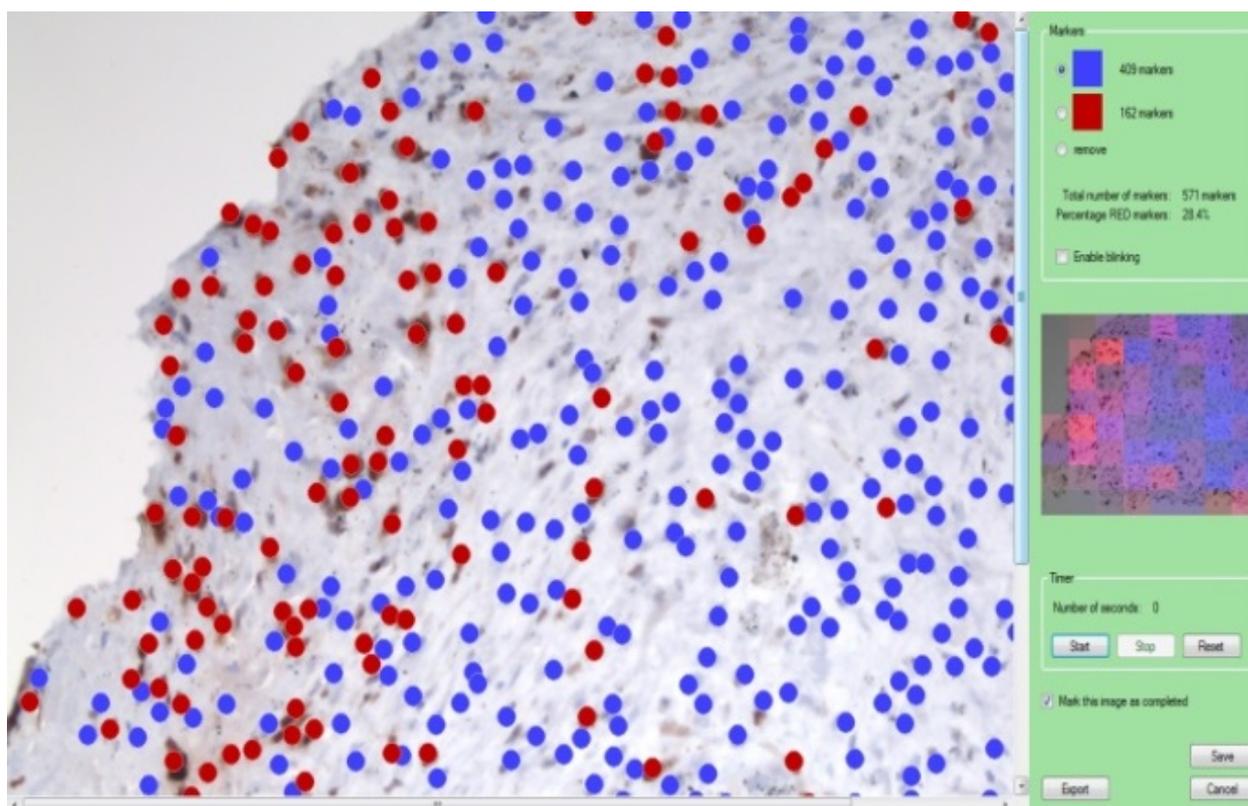


Abbildung 3.3: Toolgestütztes manuelles Auszählen: Ki67-positive Zellen wurden per Mausklick rot markiert, Ki67-negative Zellen wurden per Mausklick blau markiert, angegeben wird das Verhältnis von Ki67 positiven Zellen zu allen Zellen.

Für den Vergleich zwischen automatisierter und manueller Ki67-Quantifizierung wurde der

Bildausschnitt mit der höchsten Ki67 Expression als Hot Spot-Areal von einem erfahrenen Pathologen (VK) identifiziert und auf dem Objektträger eingezeichnet. Dieses Hot-Spot-Areal (ROI) wurde im darauffolgenden Schritt mit Hilfe der Mikroskopkamera (Leica DM 2500) mit dem 20er Objektiv fotografiert. Diese Bilddatei wurde zum einen einer automatisierten Ki67-Quantifizierung mit dem sog. Ki67-Inflamationsquantifier zugeführt, zum anderen konventionell manuell ausgezählt.

3.8 Histopathologische Auswertung mit Anwendung des Partikelalgorithmus

Die histopathologische Auswertung erfolgte standardisiert unter Anwendung der erweiterten Konsensusklassifikation der Synovia-like-Interface-Membran (SLIM). Dies beinhaltet eine Beurteilung des Schnittpräparates in der HE-Übersichtsfärbung sowie in der Berliner-Blau-Färbung sowie der PAS-Reaktion. In der polarisationsoptischen Analyse erfolgt eine Detektion und Charakterisierung von Partikeldepositionen unter Anwendung des sog. Partikelalgorithmus [KRENN, MORAWIETZ, PERINO, KIENAPFEL et al. 2014].

Die Konsensusklassifikation unterscheidet hierbei grundsätzlich vier Membrantypen:

- Periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I)
- Periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II)
- Periprothetische Membran vom Mischtyp (Typ III)
- Periprothetische Membran vom Indifferenztyp/fibrösen Typ (Typ IV)

Bei der periprothetischen Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I) werden hauptsächlich Makrophagen und mehrkernige Fremdkörperriesenzellen (in einem Flächenanteil von >20%) vorgefunden. Vorherrschendes Abriebmaterial ist meist mikropartikuläres oder makropartikuläres Polyethylen. Der Nachweis von Dehiszenzen kann herausgelöstem Fremdmaterial entsprechen. Bei Verwendung von Knochenzement imponieren PMMA-Partikel typischerweise als großvakuolige Dehiszenzen [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006].

Die periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II) zeichnet sich aus durch Granulationsgewebe, welches neben aktivierten Fibroblasten und perivaskulären Lymphozyten auch neutrophile Granulozyten enthält. Mehrkernige Riesenzellen und Makrophagen werden nur selten angetroffen. Man unterscheidet eine high-grade Infektion, die sich durch mikroabzessartige gruppierte Anordnung von neutrophilen Granulozyten auszeichnet, von einer

low-grade-Infektion, für die ein Grenzwert von 23 neutrophilen Granulozyten in zehn hochvergrößerten Gesichtsfeldern (HPF) festgelegt wurde [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006].

In der periprothetischen Membran vom Mischtyp (Typ III) liegt ein kombiniertes Bild einer Typ I-/Typ II-Membran vor.

Der Indifferenztyp (Typ IV) zeigt kollagenfaseriges Bindegewebe, wobei oberflächennah neben Fibrin einzelne neutrophile Granulozyten vorkommen können.

3.9 Klinisch-pathologische Korrelation

In einem Teilkollektiv von 20 Patienten mit Sprunggelenkendoprothese erfolgte eine klinisch-pathologisch-radiologische Korrelation, insbesondere zur Frage nach dem Vorhandensein von Pseudozysten, Ossifikationen und Implantatlockerung. Intraoperativ war in den meisten Fällen ein Bezug der Zyste zum (Neo-)Synovialgewebe zu beobachten (persönliche Beobachtung Prof. Dr. Walther, Schön Klinik München-Harlaching).

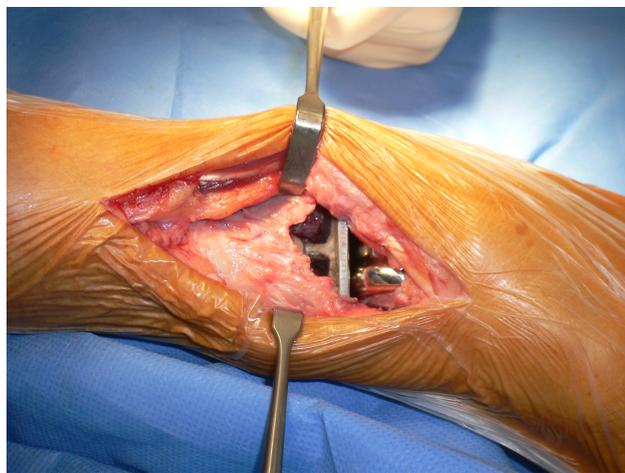


Abbildung 3.4: *Intraoperativer Situs im Rahmen einer OSG-Revisions-Operation: Im periprothetischen Kompartiment der distalen Tibia zeigt sich eine zystische Osteolyse (Quelle: Prof. Dr. med. M. Walther, Schön-Klinik München-Harlaching)*

3.10 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung und Anfertigung grafischer Darstellungen erfolgen mit der Programmiersprache R (The R Foundation for statistical Computing; Version 3.1.1, General Public Licence; [*The R Project* 2015] – www.r-project.org). Hierdurch können Datensammlungen aus unterschiedlichen Datenformaten exportiert werden und entsprechend der statistischen Fragestellung weiter bearbeitet werden.

Es wurden sog. Boxplots (Schachtel- bzw. Kistendiagramme bzw. Kastenplot) erstellt: Hierbei wird eine informative Darstellung in Form eines sog. 5-Zahlenmaßes erzeugt, bestehend aus Median, beiden Quartilen und den Extremwerten. Die Box entspricht einem Rechteck mit einer Querlinie innerhalb des Rechteckes, welche den Median markiert. Die Box entspricht dem Bereich in welchem die mittleren 50% der Daten liegen. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand, aus welchem sich die Streuung der Daten ablesen lässt. Die Länge der sog. „Whisker“ („Antennen“) werden aus der Länge des Interquartil-Abstand und aus den Datenwerten bestimmt. Diese Enden stellen die maximalen und minimalen Werte des Messbereiches dar. Ausreißer liegen außerhalb der "Whisker". Sie sind definiert als Werte, die um das 1,5fache des Interquartilabstands oberhalb oder unterhalb der Box liegen [WOLLSCHLÄGER 2012].

Für die deskriptive Statistik wurden absolute und relative Häufigkeiten, Minimal- und Maximalwerte, oberes und unteres Quartil sowie die Standardabweichungen ermittelt.

Zur Überprüfung, ob die Ki67-Proliferationsrate bei Vorliegen von periprothetischen Pseudozysten höchstens genauso hoch oder höher als bei Abwesenheit von periprothetischen Pseudozysten ist, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Zur Frage, inwieweit das Auftreten von Calciumpyrophosphat (CPPD) abhängig oder unabhängig davon ist, ob die Probe dem oberen Sprunggelenk (OSG) entstammt, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Die Ermittlung des p-Wertes erfolgte aufgrund der Anwesenheit von zwei auf demselben Datensatz zu prüfender Hypothesen nach Bonferroni-Korrektur.

4 Ergebnisbeschreibung

4.1 Patientenkollektiv OSG-Endoprothetik und Kontrollgruppe

Im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik wurde bei Revisionseingriffen entnommenes periprothetisches Gewebe untersucht (n=159). Bei 117 Patienten entstammte die Gewebeprobe dem oberen Sprunggelenk (OSG), wobei diese Gruppe weiter unterteilt wurde in zystische OSG-Läsionen (n=39) und Nicht-zystische OSG-Läsionen (n=78). Der Anteil zystischer Läsionen im Verhältnis zum OSG-Gesamtkollektiv beträgt 33,3%. Das Kontrollkollektiv umfasste 42 Patienten mit Revisionsgewebe aus Hüftgelenk und Knie bei einliegender Endoprothese. Im Gesamtkollektiv liegt eine nahezu ausgeglichene Geschlechterverteilung vor (81 Männer, 78 Frauen). Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Histologie-Entnahme 23 Jahre alt, der älteste Patient 85 Jahre, mit einem Mittelwert von 62,0 Jahren.

Tabelle 4.1 zeigt, dass 117 der 159 Fälle des Gesamtkollektivs dem oberen Sprunggelenk (OSG) entstammen. Das Nicht-OSG-Kollektiv in einem Gesamtumfang von 42 Fällen entstammt anderen Lokalisationen, wobei 18 Fälle dem Hüftgelenk zuzuordnen sind, 17 Fälle dem Kniegelenk und 7 Fälle ohne nähere Lokalisationsangabe.

Lokalisation	Anzahl <i>n</i>
Keine Angabe	7
Hüfte	18
Knie	17
Oberes Sprunggelenk	117

Tabelle 4.1: Übersicht der Lokalisationen

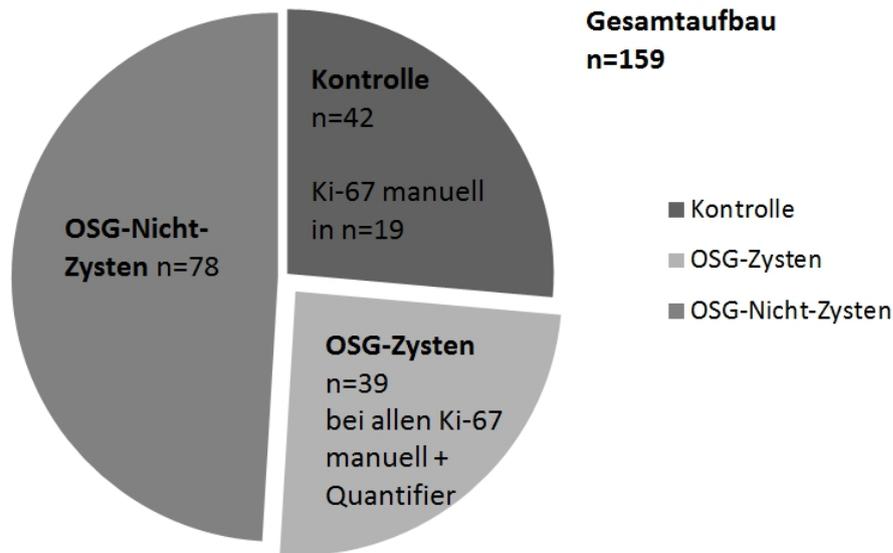


Abbildung 4.1: Übersicht

4.2 Klinisch-pathologische Korrelation

Ein Teil des OSG-Kollektivs (n=20) konnte darüber hinaus mit den klinischen Daten korreliert werden. Diese Korrelation beinhaltete eine radiologische Evaluation bei Vorhandensein zystischer Läsionen (n=17) sowie Angaben zu Ossifikationen und Endoprothesenlockerung.

Der Tabelle 4.2 ist zu entnehmen, dass periprothetische Zysten im untersuchten Teilkollektiv häufiger im Talus als in der Tibia nachzuweisen waren. In sieben Fällen mit Taluszyste lag ein abriebinduzierter Typ (Typ I) vor, in vier Fällen ein Indifferenztyp (Typ IV), in zwei Fällen ein Mischtyp (Typ III) und in zwei Fällen eine Arthrofibrose. Einmal lag ein infektiöser Typ vor (Typ II).

Fünf Fälle aus dem Teilkollektiv mit klinisch-pathologischer Korrelation waren histopathologisch CPPD-positiv (bei gleichzeitigem Nachweis von Ossifikationen).

In sieben Fällen traten Tibia- und Taluszysten gemeinsam auf. In nahezu allen Fällen konnten periprothetische Ossifikationen sowohl im Bereich der Tibia als auch im Talus nachgewiesen werden. Eine Lockerung lag in lediglich zwei Fällen vor, aus diesem Grund wurde auf eine Darstellung in der Tabelle verzichtet.

Fall	Tibiazyste	Taluszyste	Ossifikation Tibia	Ossifikation Talus	SLIM-Typ
1	1	0	1	1	I
2	0	1	1	1	I
3	0	1	1	1	IV
4	0	1	1	1	III
5	0	1	1	1	EAF
6	0	1	1	1	II
7	0	0	0	0	IV
8	0	0	0	1	I
9	0	1	1	1	EAF
10	0	1	1	1	I
11	0	0	1	1	IV
12	1	1	1	1	III
13	1	1	1	1	I
14	1	1	1	1	I
15	1	1	1	1	IV
16	0	1	1	1	I
17	1	1	1	1	IV
18	1	1	1	1	IV
19	1	1	1	1	I
20	0	1	1	1	I

Tabelle 4.2: Lokalisation von Zysten und Ossifikation mit Zuordnung zum SLIM-Subtypen im Teilkollektiv mit klinischer Korrelation

4.3 Histopathologie der periprothetischen Pseudozysten

Die periprothetischen Zysten zeigten histomorphologisch membranartig konfiguriertes Gewebe, welches sich den Membrantypen nach SLIM-Konsensusklassifikation zuordnen liess.

In Analogie zum SLIM-Subtypen wurden in wechselnder Quantität Makrophagenakkumulate, mikro- und makropartikuläre metallische und nicht-metallische Abriebpartikel, Hämosiderindepositionen und Entzündungszellen vorgefunden. Vereinzelt waren myxoide Gewebsareale identifizierbar. In Abbildung 4.2 ist ein Beispiel einer periprothetischen Pseudozyste im HE-Schnittpräparat dargestellt.

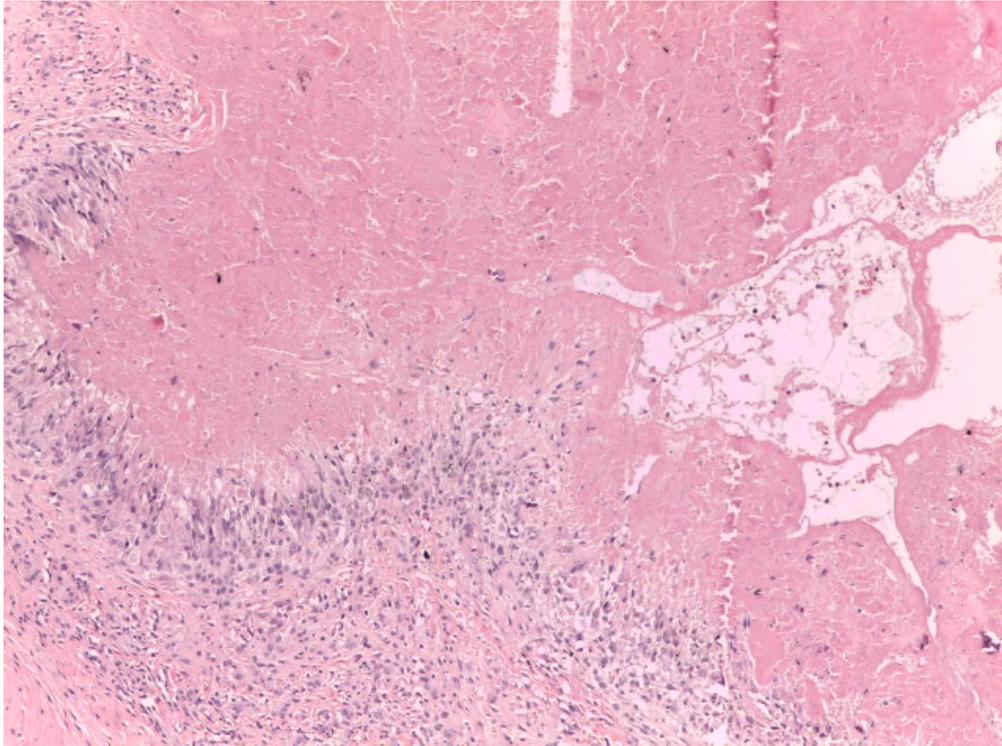


Abbildung 4.2: HE-Morphologie einer periprothetischen Pseudozyste

4.4 Anwendung der SLIM-Konsensusklassifikation

Im Gesamtkollektiv (n=159) fand sich in 71 Fällen ein abriebinduzierter Typ (Typ I), in 13 Fällen ein infektiöser Typ (Typ II), in 6 Fällen ein Mischtyp (Typ III) und in 62 Fällen ein Indifferenztyp (Typ IV). Eine endoprothesenassoziierte Arthrofibrose (EAF) lag in 5 Fällen vor. 2 Fälle waren aufgrund ausgeprägter Nekrosen dem Typ NOS (not otherwise specified) zugeordnet worden. Die Zuordnung zu den SLIM-Typen ist in 4.3 tabellarisch dargestellt.

	OSG (ohne Zysten)	Rel. Anteil	OSG- Zysten	Rel. Anteil	Nicht- OSG	Rel. Anteil	n (total)
SLIM Typ I	33	42,3%	20	51,3%	18	42,9%	71
SLIM Typ II	12	15,4%	1	2,6%	0	0%	13
SLIM Typ III	1	1,3%	3	7,7%	2	4,8%	6
SLIM Typ IV	28	35,9%	13	33,3%	21	50%	62
EAF	2	2,6%	2	5,1%	1	2,4%	5
Typ NOS	2	2,6%	0	0%	0	0%	2
n (total)	78	100%	39	100%	42	100%	159

Tabelle 4.3: Zuordnung nach SLIM-Konsensusklassifikation abhängig von der Lokalisation und dem Auftreten von periprothetischen Pseudozysten

Im nicht-zystischen OSG-Kollektiv sind alle klassischen SLIM-Typen sowie die Arthrofibrose und der Typ NOS vertreten. Die zystischen OSG-Läsionen sind hauptsächlich den SLIM-Typen I (abriebinduzierter Typ) und IV (Indifferenztyp) zuzuordnen. Ein geringer Anteil entspricht den SLIM-Typen II (Infektiöser Typ), III (Mischtyp) und der endoprothesenassoziierten Arthrofibrose (EAF).

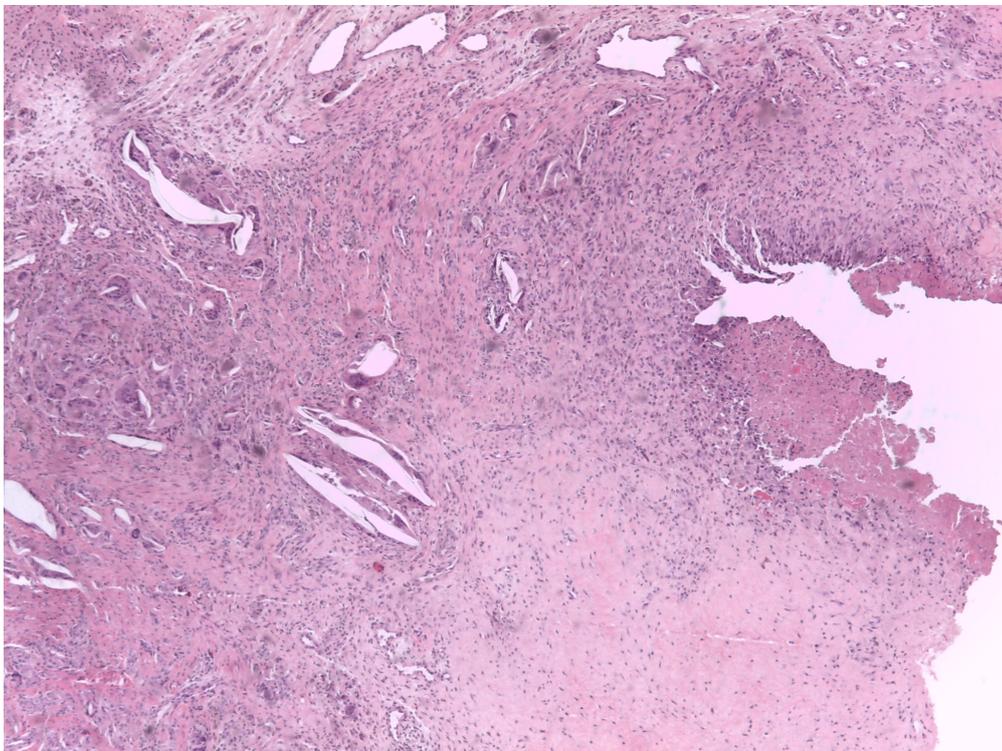


Abbildung 4.3: *Abriebtyp Pseudozyste: Übersichtsvergrößerung*

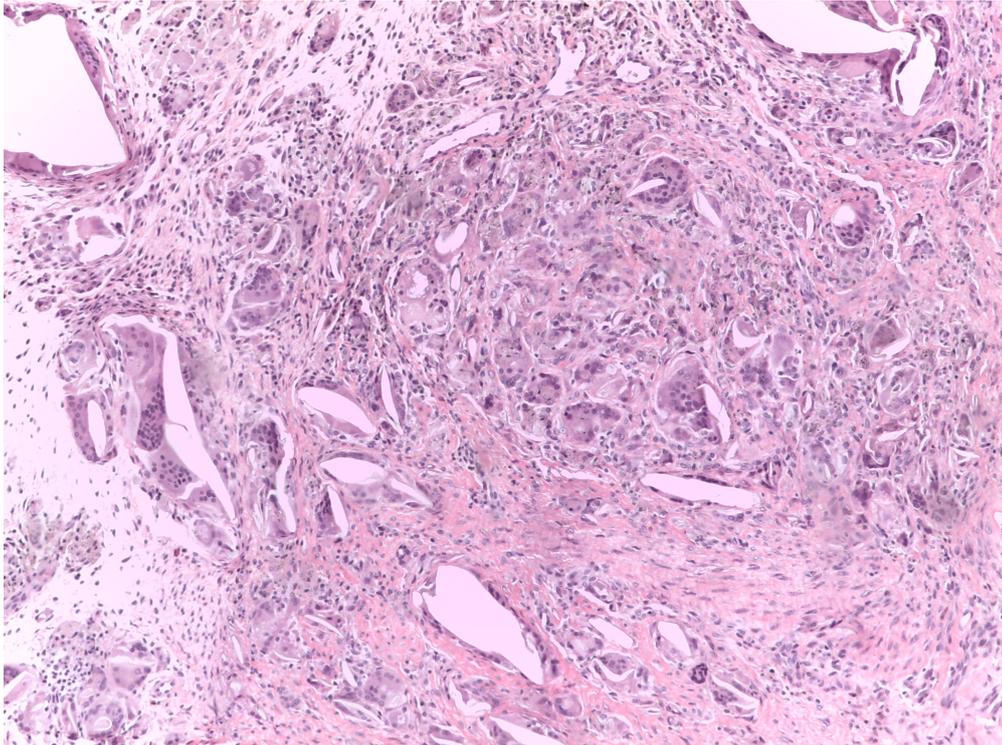


Abbildung 4.4: *Abriebtyp Pseudozyste: Mikropartikuläres und Makropartikuläres Polyethylen (Ausschnitt aus der Übersichtsvergrößerung)*

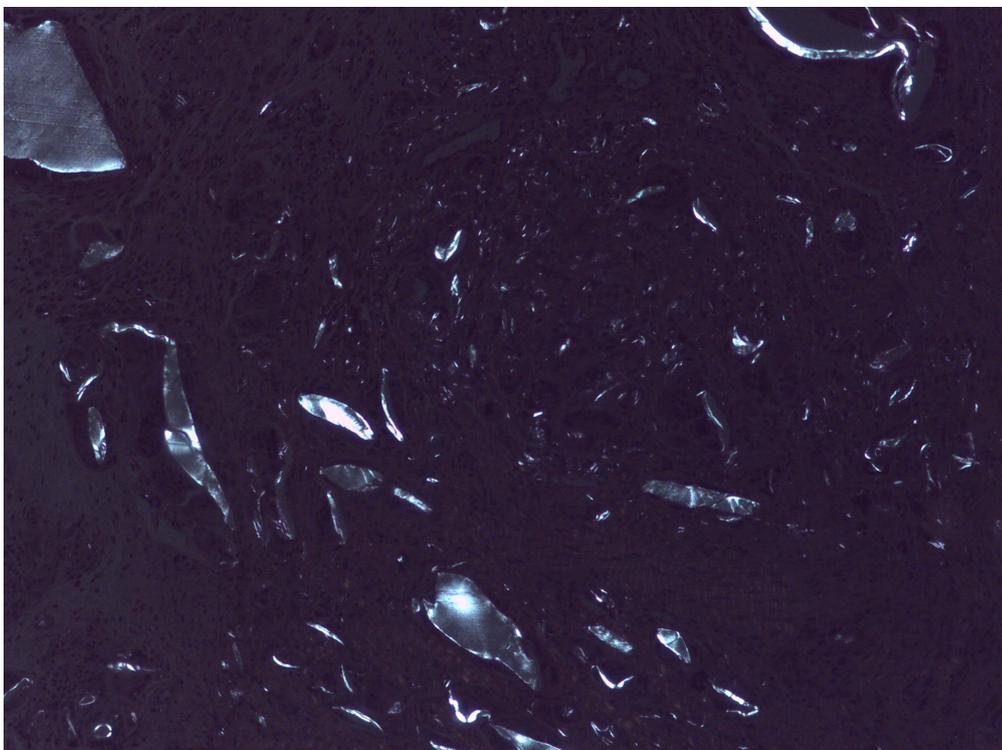


Abbildung 4.5: *Abriebtyp Pseudozyste: Mikropartikuläres und Makropartikuläres Polyethylen im Polarisationslicht (Ausschnitt aus der Übersichtsvergrößerung)*

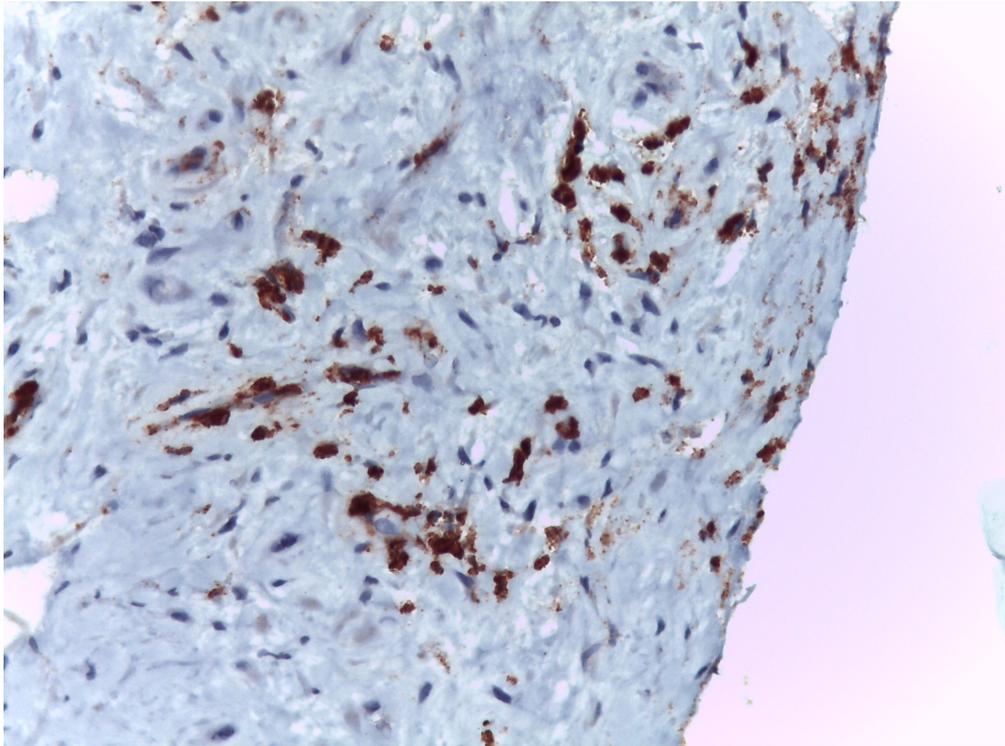


Abbildung 4.6: *Pseudozyste infektiöser Typ CD15*

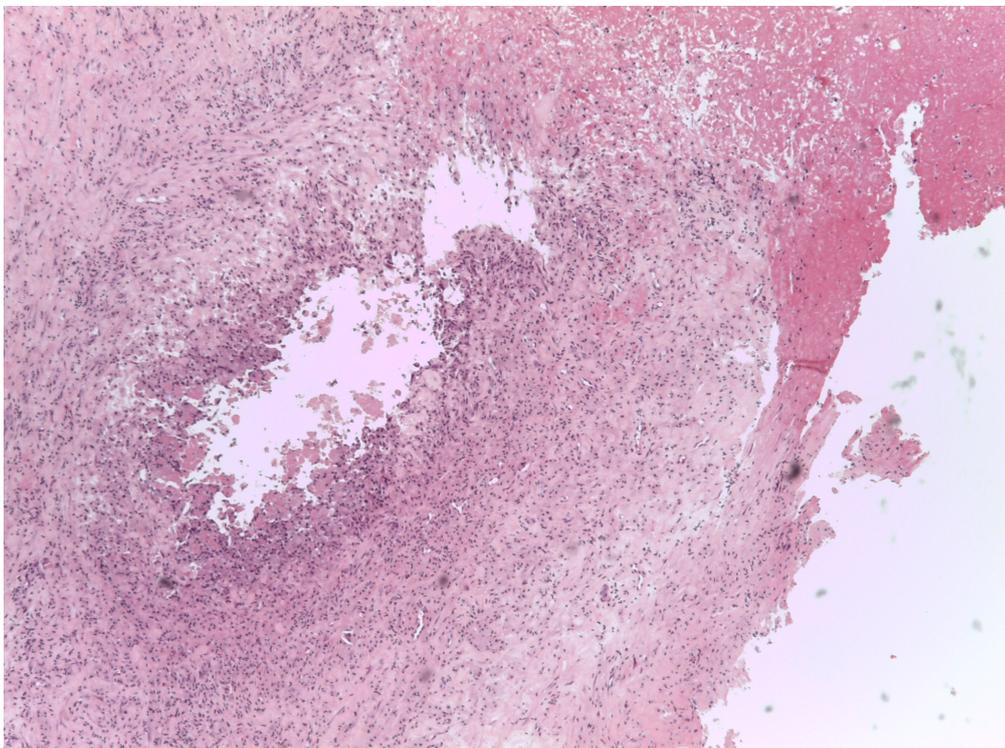


Abbildung 4.7: *Pseudozyste Mischtyp*

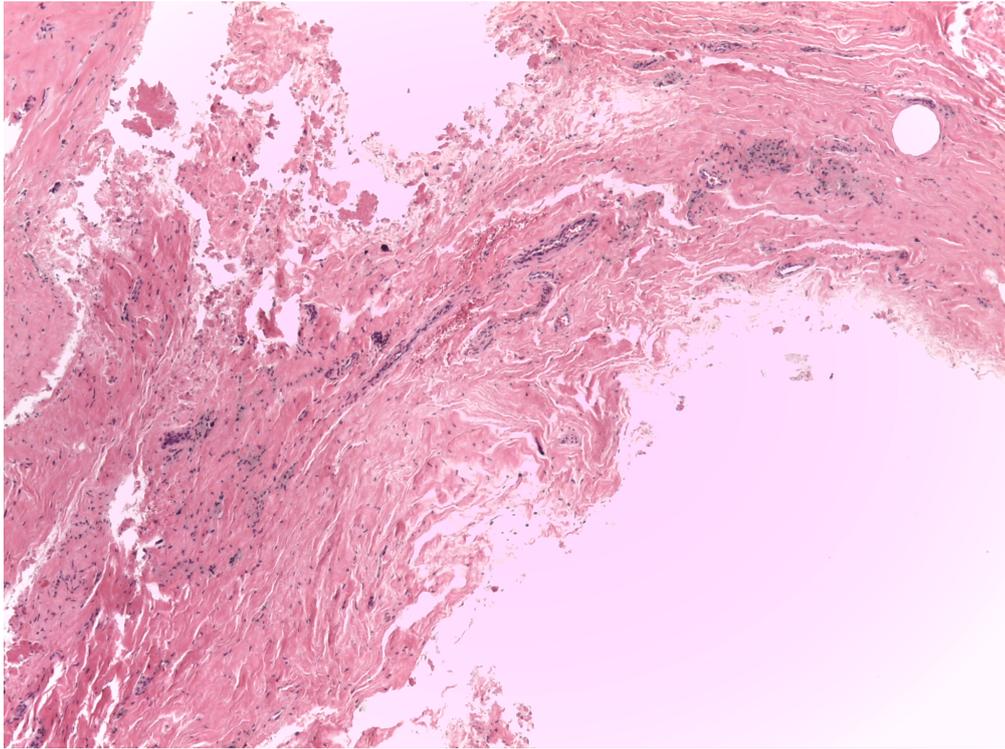


Abbildung 4.8: *Pseudozyste Indifferenztyp*

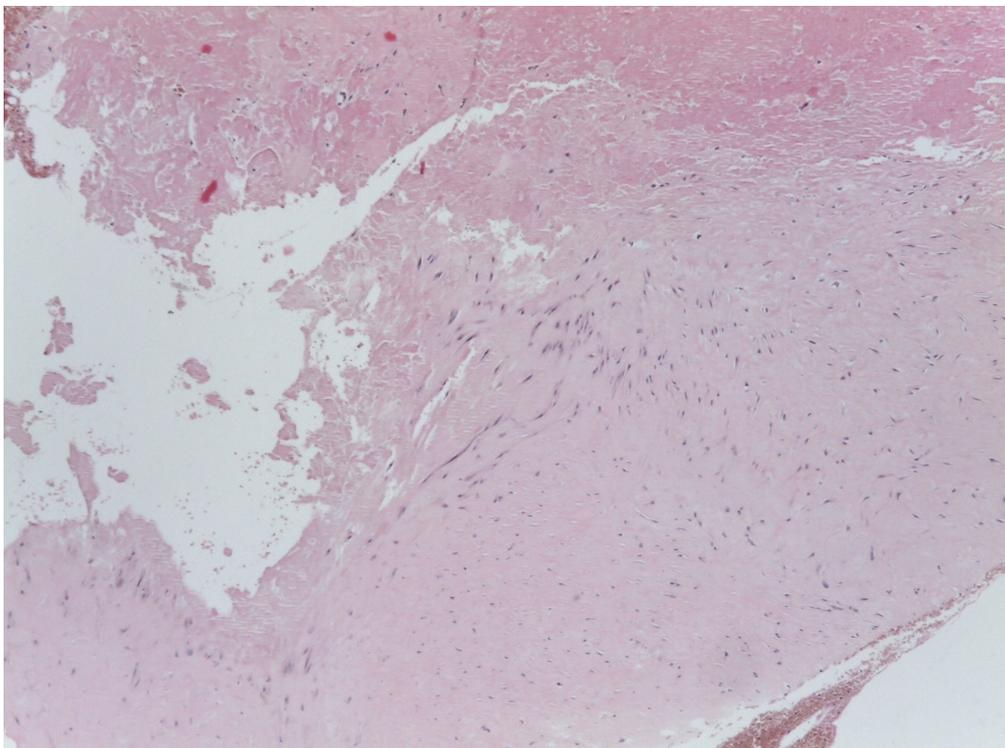


Abbildung 4.9: *Pseudozyste zur endoprothesenassoziierten Arthrofibrose*

4.5 Bestimmung der Ki67-Proliferationsrate

Von allen OSG-Zysten (n=39) und 19 Kontrollfällen anderer Lokalisationen wurde eine Ki-67-Immunhistochemie veranlasst. Die Proliferationsfraktionen wurden zum einen toolgestützt manuell ausgezählt, zum anderen automatisiert mit dem sog. Inflammationsquantifier der Firma VMscope GmbH Berlin.

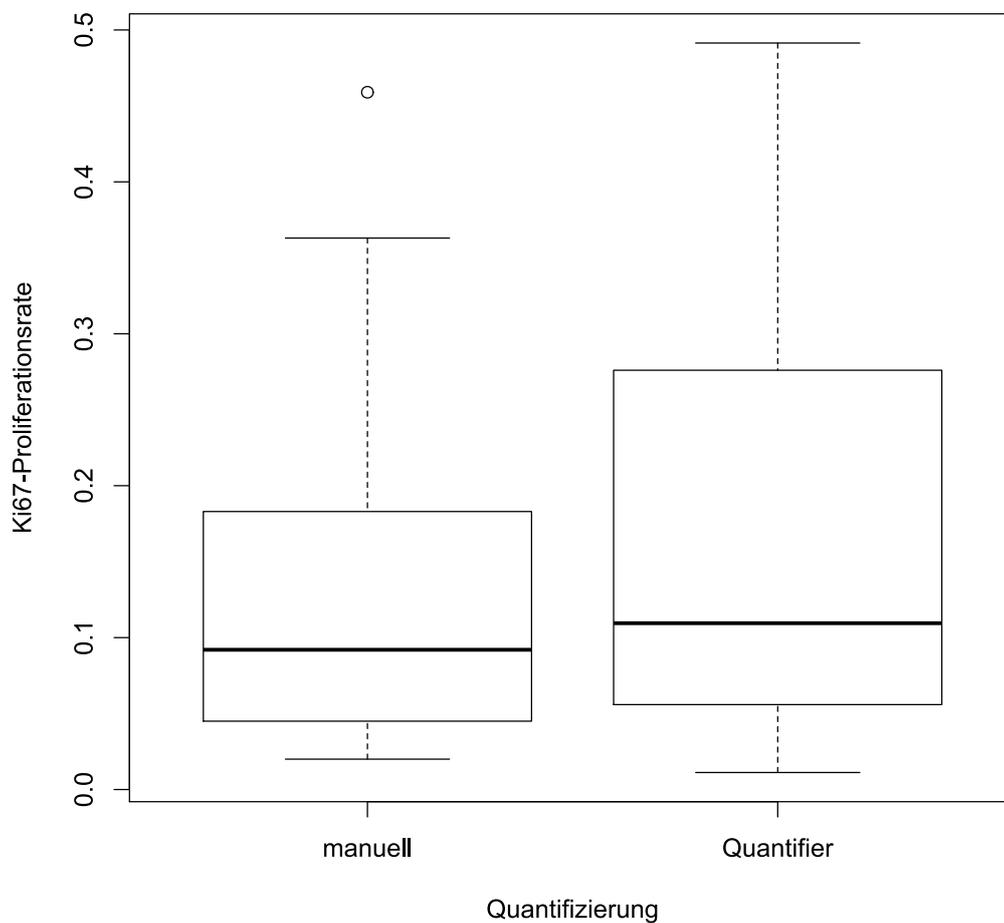


Abbildung 4.10: Vergleich Ki67 manuell / Inflammationsquantifier

Im Boxplot der Abbildung 4.10 ist erkennbar, dass die manuell bestimmten Proliferationsraten (Boxplot links) einen ähnlichen Median im Vergleich zu den automatisiert bestimmten Proliferationsraten (Boxplot rechts) aufweisen. Es fällt auf, dass in den maschinell erhobenen Daten eine größere Spannweite des Datensatzes im Vergleich zu den manuell erhobenen Daten vorliegt. Die nachträgliche Re-Evaluation des Bildmaterials liefert mögliche Erklärungen

zu diesen Abweichungen: In einzelnen Fällen (n=11) lagen immunhistochemische Schnittpräparate mit Artefaktbildungen vor, die bei der automatisierten Quantifizierung zu Messergebnissen mit größerer Abweichung führten. Als Einflussfaktoren waren hierbei identifizierbar:

- Risse im Schnittpräparat mit Überlagerungen
- Unspezifische DAB-Hintergrundreaktion
- Formalinpigment
- geringe Zellularität
- zu dicke Schnittpräparate
- zu geringe Gegenfärbung

Beispiele für die Auszählungen sind in den Abbildungen 4.11, 4.12 und 4.13 ab Seite 27 dargestellt, wobei jeweils links die manuelle Auszählung abgebildet ist, und rechts die Auswertung mit dem Inflammationsquantifier zu sehen ist.

Im Folgenden werden Besonderheiten dargestellt, die Abweichungen beim Vergleich zwischen manueller und automatisierter Quantifizierung geführt haben. Im Abbildungspaar 4.11 wurde in der automatisierten Auszählung auf der rechten Seite schwärzliches Formalinpigment falsch-positiv als Ki67-negative Zellkernkontur gewertet. Aufgrund einer Rissbildung im Schnittpräparat bei 11 Uhr ist eine Überlagerung wie eine Ki67-positive Zellkernkontur quantifiziert worden. Im Abbildungspaar 4.12 ist eine artefiziell entstandene Wellenbildung bei 2 Uhr zu erkennen, welche in der automatisierten Erfassung wie Ki67-negative Kernkonturen gewertet wurden. Im Abbildungspaar 4.13 zeigt sich eine niedrige Zellularität, wodurch geringe Abweichungen bei der Quantifizierung relativ stark ins Gewicht fallen.

In der Simulation einer praktischen Alltagsanwendung konnten verschiedene laborseitige Einflussfaktoren als mögliche Störvariablen identifiziert werden. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist die subjektive Voreinstellung des Hot-Spot-Areals durch den Untersucher. Hierbei wird mittels Durchmusterung festgelegt, wo die höchste Proliferationsfraktion zu vermuten ist. Dieses Areal wird mit dem für den Inflammationsquantifier empfohlenen 20er Objektiv vergrößert und schließlich ausgewertet. Letztendlich gibt es technische bzw. bei niedriger Zellularität auch präparatimmanente Variablen, die eine vollständig automatisierte Auswertung in der Routine-Alltagdiagnostik zum derzeitigen Untersuchungszeitpunkt noch nicht zulassen sowie eine Untersucher-abhängige Variable, die einer Subjektivität unterliegt und durch Automatisierung zumindest minimiert werden könnte.

In der Abbildung 4.14 wurde die manuell am Computerbildschirm ermittelte Proliferationsfraktion grafisch dargestellt. Hierbei zeigt sich bezüglich der Proliferationsfraktion ein Unter-

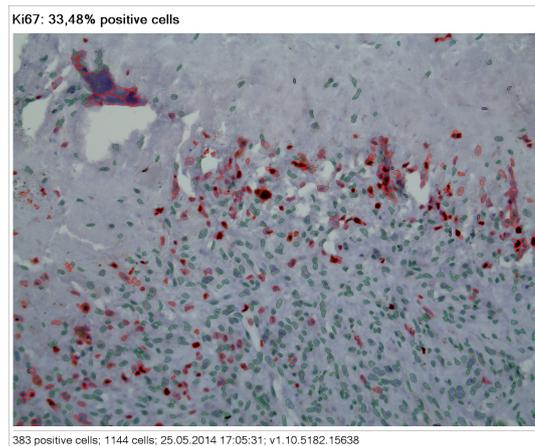
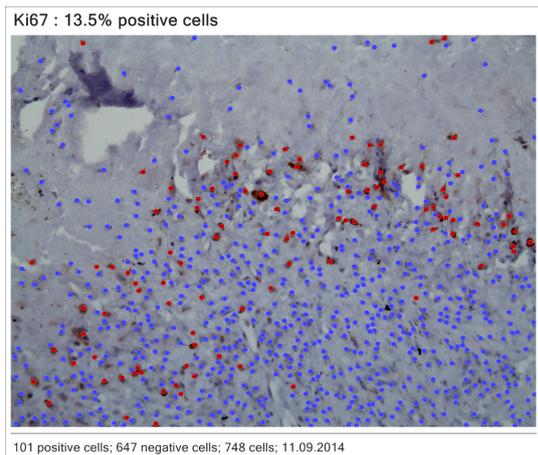


Abbildung 4.11: Vergleichsanalyse I

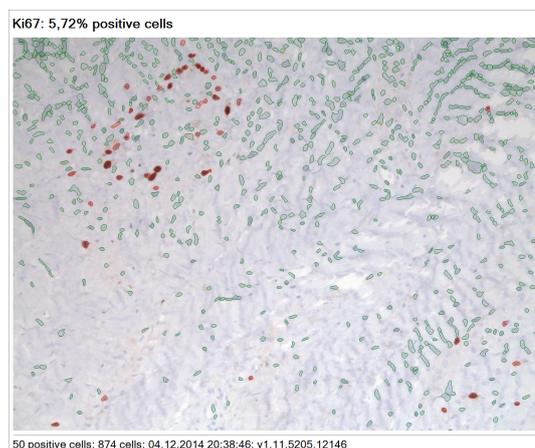
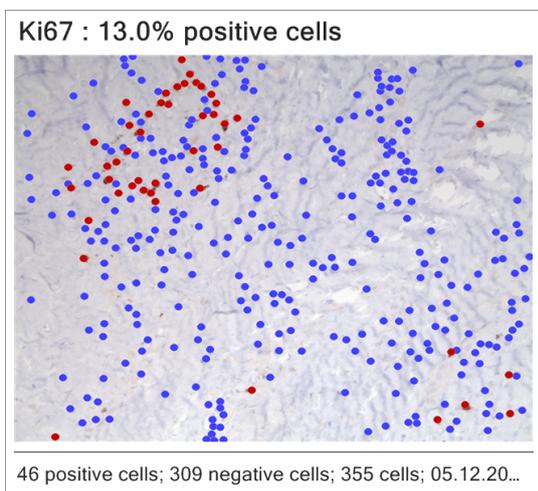


Abbildung 4.12: Vergleichsanalyse II

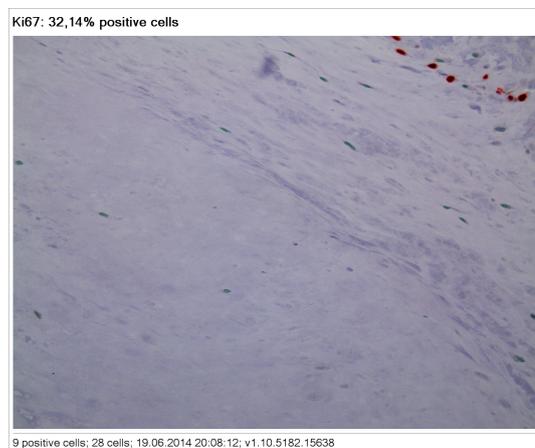
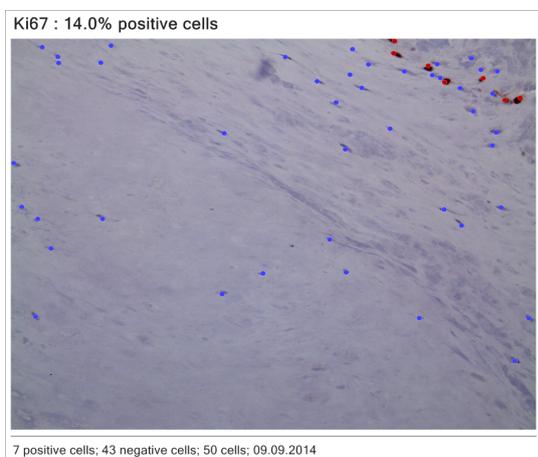


Abbildung 4.13: Vergleichsanalyse III

schied in OSG-Zysten und Kontrollfällen. Auch in der tabellarischen Aufstellung kommt dies zum Ausdruck: Der Mittelwert beträgt in OSG-Zysten 0,14 (=14%), der Median 0,12 (=12%). In der Kontrollgruppe liegender Mittelwert bei 0,09 (=9%) und der Median bei 0,06 (=6%).

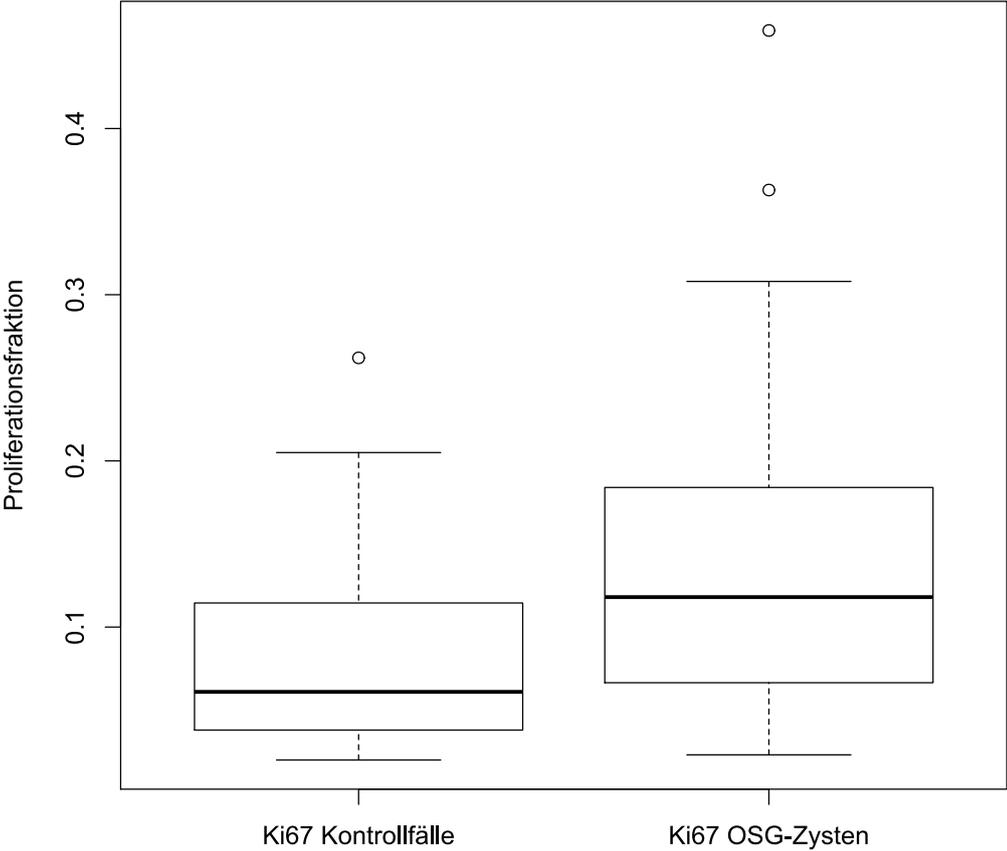


Abbildung 4.14: *Ki67-Proliferationsfraktion in periprothetischen Pseudozysten und in Kontrollfällen anderer Lokalisation*

	OSG-Zysten	Nicht-OSG-Kontrollfälle
Zahl n	39	19
Standardabweichung	0,1	0,07
Median	0,12	0,06
Getrimmter Mittelwert	0,13	0,08
Mittelwert (arithm. Mittel)	0,14	0,09
Median Absolute Deviation	0,1	0,1
Minimum	0,02	0,02
Maximum	0,46	0,26
Spannweite	0,44	0,24
Schiefe	1,16	0,96
Exzess	0,96	-0,46
Spannweite des Mittelwerts	0,02	0,02

Tabelle 4.4: Ki-67 manuell in OSG-Zysten und Nicht-OSG-Kontrollfällen

Zur Frage eines statistischen Zusammenhangs zwischen Ki67-Proliferationsfraktion und dem Vorliegen bzw. der Abwesenheit von periprothetischen Pseudozysten wurde wie in Tabelle 4.5 dargestellt ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Nullhypothese	Alternativhypothese	Signifikanz	Entscheidung
Die Ki67-Proliferationsrate ist bei Vorliegen von periprothetischen Pseudozysten höchstens genauso groß wie bei Abwesenheit von periprothetischen Pseudozysten.	Die Ki67-Proliferationsrate ist bei Vorliegen von periprothetischen Pseudozysten höher als bei Abwesenheit von periprothetischen Pseudozysten.	p-Wert = 0.02037 (Signifikanzgrenze 0,025)	Nullhypothese abgelehnt.

Tabelle 4.5: Mann-Whitney-U-Test

Aufgrund der zu Beginn festgelegten zwei Hypothesen ergibt sich nach Bonferroni-Korrektur eine Signifikanzgrenze von $p=0,05/2=0,025$. Der durch R ermittelte p-Wert liefert mit 0.02037 ein signifikantes Ergebnis.

Die Nullhypothese wird somit verworfen und als Ergebnis des Mann-Whitney-U-Testes resultiert, dass die Ki67-Proliferationsrate bei Vorliegen von periprothetischen Pseudozysten signifikant höher ist als bei Abwesenheit von periprothetischen Pseudozysten.

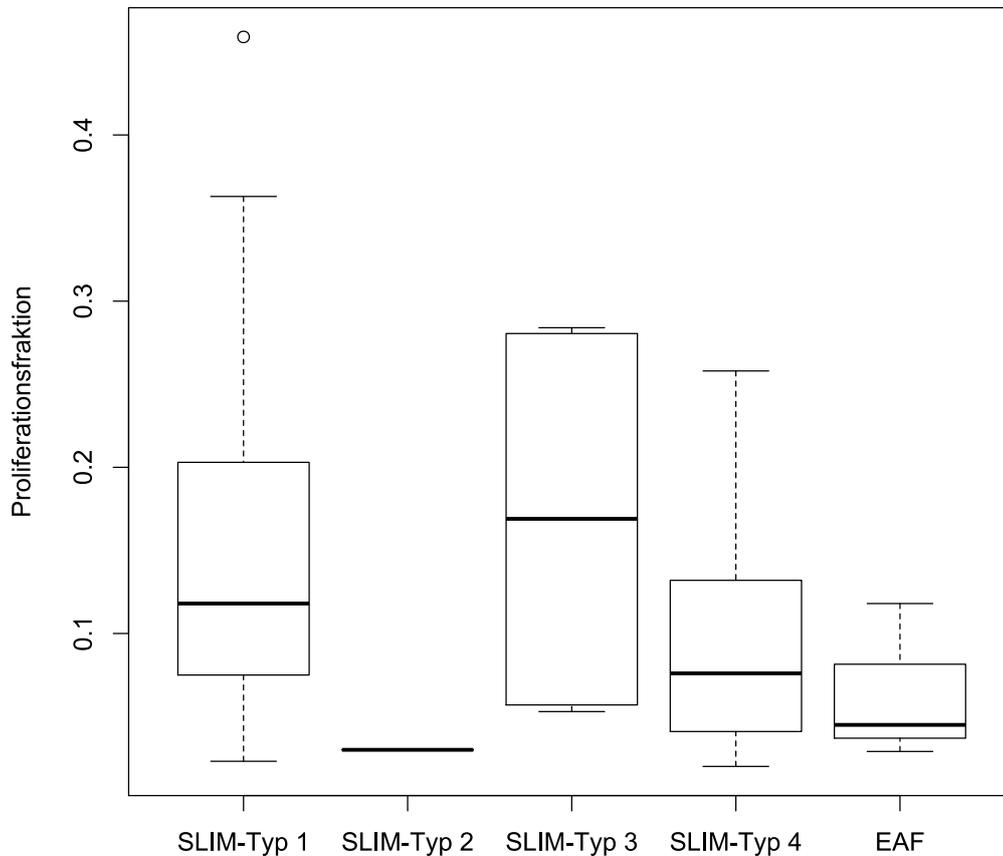


Abbildung 4.15: Manuell bestimmte Ki67-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit vom SLIM-Typ

Zur Erfassung der Proliferationsfraktion in Abhängigkeit zum SLIM-Subtypen wurde die manuell semiquantitativ ermittelte Ki67-Proliferationsfraktion aller periprothetischen Pseudozysten getrennt nach Zugehörigkeit zum SLIM-Subtypen dargestellt (siehe Abbildung 4.15 und Tabelle 4.6).

Es zeigt sich, dass bei den Fällen, welche den abriebinduzierten SLIM-Typ I aufweisen, im Boxplot mit maximaler Ki67-Proliferationsrate von 36% und minimaler Ki67-Proliferationsrate von 2,3% die größte Spannweite vorliegt.

Da nur ein Fall einem infektiösen Typ (SLIM Typ II) unter dem Bild eines low-grade-Infekts zuzuordnen ist, ist es nicht möglich, aus einem Datensatz einen repräsentativen Boxplot zu erstellen. Die Ki67-Proliferationsfraktion beträgt hier 3%. In Fällen, welche einem kombinierten infektiösen und abriebinduzierten Mischtyp (SLIM Typ III) zuzuordnen waren, lag mit 16,9% der höchste Medianwert vor. In Fällen, welche einem Indifferenztyp (SLIM Typ IV), liegt der Ki67-Medianwert bei 7,6%. In Fällen, welche einer endoprothesenassoziierten Arthrosefibrose zuzuordnen waren, beträgt der Medianwert 4,5%.

	SLIM Typ 1	SLIM Typ 2	SLIM Typ 3	SLIM Typ 4	Arthrofibrose
Zahl n	20	1	3	13	2
Minimum	0.02310	0.03	0.0530	0.020	0.02900
Unteres Quartil	0.075	0.03	0.0570	0.041	0.037
Median	0.11803	0.03	0.1690	0.076	0.04500
Oberes Quartil	0.20300	0.03	0.2805	0.132	0.18151
Maximum	0.363000	0.03	0.2840	0.258	0.11802

Tabelle 4.6: *Ki67-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit vom SLIM-Typen*

4.6 Nachweis von Calciumpyrophosphat (CPPD)

Calciumpyrophosphat (CPPD) ist histomorphologisch gemäß Partikelalgorithmus gekennzeichnet durch den Nachweis von polarisationsoptisch doppeltbrechenden kuboidalen Kristallen in einer prominenten bräunlichen Matrix wie in Abbildungen 4.16 und 4.17 dargestellt [KRENN, THOMAS, THOMSEN, KRETZER et al. 2014].

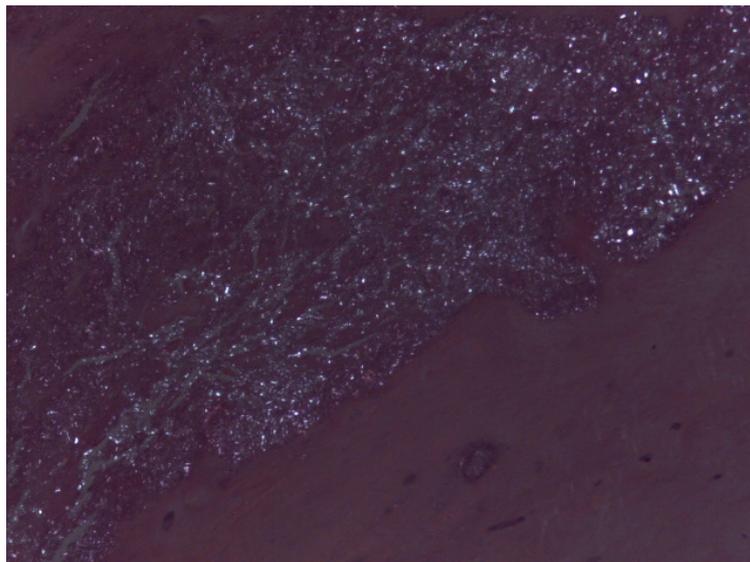


Abbildung 4.16: *Calciumpyrophosphat im Polarisationslicht*

In der Kontrollgruppe (n=42) aus der Lokalisation Hüftgelenk und Knie war lediglich in einem Fall CPPD nachweisbar, während im OSG-Teilkollektiv (n=117) in 27 Fällen CPPD vorgefunden wurde.

Eine Übersicht der Häufigkeiten (relative Häufigkeiten im Bezug zum Gesamtkollektiv in Klammern) ist in Tabelle 4.7 zu finden.

Zur Evaluation, inwieweit das Auftreten von Calciumpyrophosphat (CPPD) von der Lokali-

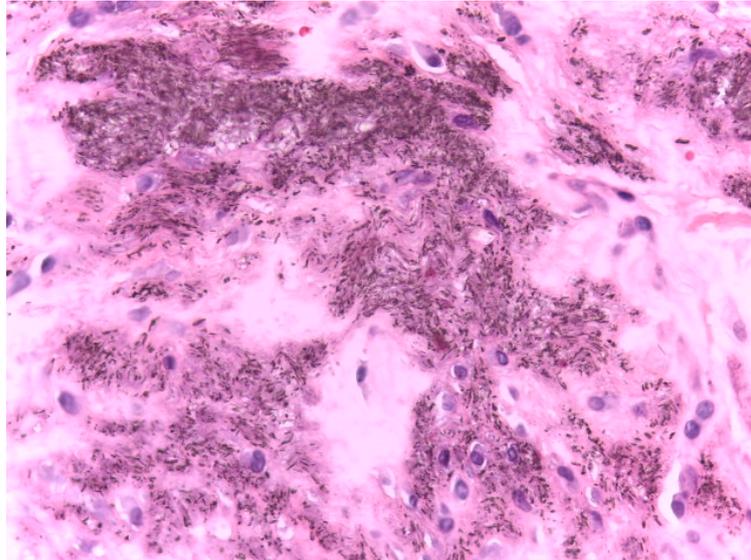


Abbildung 4.17: Calciumpyrophosphat in der HE-Morphologie

	Kontrollfälle	OSG-Fälle	Summe
n (total)	42	117	159
Kein CPPD	41 (25,8%)	90 (56,6%)	131
CPPD-Nachweis	1 (0,6%)	27 (16,9%)	28

Tabelle 4.7: Häufigkeit von CPPD in Abhängigkeit von der Lokalisation

sation abhängig ist, wurde eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese aufgestellt. Als Testverfahren wurde ein Chi-Quadrat-Test angewendet wie in Tabelle 4.8 dargestellt.

Nullhypothese	Alternativhypothese	Signifikanz	Entscheidung
Das Auftreten von Calciumpyrophosphat (CPPD) ist unabhängig davon, ob die Gewebeprobe dem OSG entstammt oder nicht.	Das Auftreten von CPPD ist abhängig davon, ob die Gewebeprobe dem OSG entstammt oder nicht.	p-Wert = 0.004782 (Signifikanzgrenze 0,025)	Nullhypothese abgelehnt.

Tabelle 4.8: Chi-Quadrat-Test

Das Ergebnis des Tests ist signifikant mit $\text{Chi}^2 = 7.9602$, $\text{df} = 1$, $\text{p-value} = 0.004782$. Hieraus leitet sich ab, dass die CPPD-Häufigkeit in unserem Kollektiv davon abhängt, ob die Gewebeprobe dem OSG entstammt oder nicht. In den Fällen mit CPPD lag in Bezug auf die SLIM-Klassifikation in unserer Untersuchung in 15 Fällen ein abriebinduzierter Typ I vor, in 11 Fällen ein Indifferenztyp IV sowie eine infektiöse Typ bzw. eine Arthrofibrose in jeweils einem Fall.

Beim Vergleich dieser Daten mit dem Nicht-CPPD-Kollektiv fällt auf, dass der abriebinduzierte Typ in Koinzidenz mit CPPD in diesem Teilkollektiv überdurchschnittlich vertreten ist (53%) im Vergleich zum Nicht-CPPD-Kollektiv (43%). Die Verteilung des Indifferenztyps ist im CPPD-Kollektiv mit 39,2% und mit 38,1% im Nicht-CPPD-Kollektiv vergleichbar.

5 Diskussion

5.1 SLIM-Verteilung im Vergleich zu den Literaturdaten

Die SLIM-Konsensusklassifikation kann sowohl auf Gewebe der Neosynovialis als auch auf die periprotetische Membran angewendet werden. Es werden grundlegend vier Membrantypen unterschieden: Am häufigsten ist eine periprotetische Membran von abriebinduzierten Typ (Typ I) zu finden. Ein wesentliches diagnostisches Kriterium ist der Nachweis von Makrophagen und/oder multinukleären Riesenzellen in einem Flächenanteil von >20 %. Partikel werden nach dem sog. Partikelalgorithmus mit Hilfe von lichtmikroskopischen, polarisationsoptischen und enzymhistochemischen Analysemethoden standardmäßig untersucht. Es ist möglich, makro- und mikropartikuläres Polyethylen, metallisches Abriebmaterial, Keramik und PMMA-Depositionen zu unterscheiden. Neutrophile Granulozyten sollen bei diesem Membrantypen nicht vorkommen.

Beim infektiösen Typ (Typ II) liegt ein granulierender Entzündungsprozess mit vermehrtem Nachweis von neutrophilen Granulozyten vor. Histopathologisch kann entweder ein abszessartiges Bild als Ausdruck eines high-grade Infekts vorliegen oder eine sog. low-grade Infektion als Korrelat einer Infektion mit niedriger Keimquantität oder niedrig-pathogenen Mikroorganismen. Als diagnostisches Entscheidungskriterium zwischen septischer Endoprothesenlockerung (unter dem Bild eines low grade-Infekts) und aseptischer Endoprothesenlockerung wurde ein Grenzwert von 23 neutrophilen Granulozyten in zehn hochvergrößerten Gesichtsfeldern (high power fields/HPF) definiert, welche zur besseren Visualisierung mit einer CD15-Immunhistochemie dargestellt werden können.

Beim Mischtyp (Typ III) liegt eine abriebassoziierte Genese kombiniert mit einer infektiösen Genese mit den entsprechenden diagnostischen Kriterien vor. Der Indifferenztyp (Typ IV) wird auch als fibröser Typ bezeichnet, da das hier vorgefundene meist recht zellarme Gewebe histopathologisch an eine Narbe erinnert. Die Kriterien für eine abriebassoziierte oder infektiöse Genese sind nicht erfüllt.

Der neue histopathologische Subtyp NOS (not otherwise specified) beinhaltet die Kriterien

eines Indifferenztyps, ergänzt durch flächenhafte Nekrosen und Fibrininsudationen (>20%). Makrophagen- oder lymphozytenreiche Infiltrate, Abriebpartikeldepositionen oder histopathologische Zeichen einer bakteriellen Infektion dürfen bei diesem Typen nicht vorliegen [SCHUH 2014].

Bei der Arthrofibrose findet man eine schmerzhafte Bewegungseinschränkung durch derbes, teils nodulär konfiguriertes Gewebe, welches histopathologisch eine fibroblastäre Zellularität aufweist. Es besteht ein dreistufiges Graduierungssystem.

Die Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran ermöglicht eine gut reproduzierbare Aussage zur Ätiologie des Endoprothesenversagens. Aus diesem Grund ist die Übertragung der primär für Hüftgelenk und Knie entwickelten SLIM-Klassifikation ein Kernprojekt dieser Arbeit. Hierbei zeigte sich, dass die SLIM-Klassifikation grundsätzlich auf die Endoprothesensituation des oberen Sprunggelenks (OSG) anwendbar ist. Im nicht-zystischen Teilkollektiv waren alle klassischen SLIM-Typen, die Arthrofibrose und der durch Nekrosen gekennzeichnete Typ NOS vertreten. Eine Häufung war beim SLIM-Typ I und SLIM-Typ IV vertreten.

Wendet man sich der relativen Häufigkeit des abriebinduzierten SLIM-Typ I in den Teilpopulationen zu, so ergibt sich folgendes Bild:

- Nicht-zystisches OSG-Kollektiv (n=78): 33 Fälle, dies entspricht 42,3%.
- Zystisches OSG-Kollektiv (n=39): 20 Fälle, dies entspricht 51,3%.
- Nicht-OSG-Fälle (n=42): 18 Fälle, dies entspricht 42,9%.

In der Literatur [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006] wird die Häufigkeit einer Typ I-Membran mit 46,7% für unzementierte und 65,1% für zementierte Endoprothesen (Globalwert 55%). Da im oberen Sprunggelenk die Verwendung nicht-zementierter Endoprothesen angenommen werden kann, liegt im zystischen OSG-Kollektiv mit 51,3% eine überdurchschnittliche Häufigkeit im Vergleich zum Literaturwert vor. Die Häufigkeit im nicht-OSG-Kollektiv ist unterrepräsentiert.

Bezüglich der relativen Häufigkeit des infektiösen SLIM-Typ II in den Teilpopulationen ergibt sich folgendes Ergebnis:

- Nicht-zystisches OSG-Kollektiv (n=78): 12 Fälle, dies entspricht 15,4%.
- Zystisches OSG-Kollektiv (n=39): Ein Fall, dies entspricht 2,6%
- Nicht-OSG-Fälle (n=42): keine Fälle, dies entspricht 0%.

In der Literatur [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006] wird die Häufigkeit

einer Typ II-Membran mit 20% angegeben, der Wert von 15,4% im nicht-zystischen OSG-Kollektiv ist unterrepräsentiert.

In Hinblick auf die relative Häufigkeit des SLIM-Typ III (Mischtyp) in den Teilpopulationen zeigt sich folgende Verteilung:

- Nicht-zystisches OSG-Kollektiv (n=78): 1 Fall, dies entspricht 1,3%.
- Zystisches OSG-Kollektiv (n=39): 3 Fälle, dies entspricht 7,7%
- Nicht-OSG-Fälle (n=42): 2 Fälle, dies entspricht 4,8%.

In der Literatur [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006] wird die Häufigkeit einer Typ III-Membran mit 5% angegeben, der Wert von 4,7% im nicht-OSG-Kollektiv ist etwa mit diesem Wert vergleichbar, während der Wert von 7,7% im zystischen OSG-Kollektiv überdurchschnittlich vertreten ist und im nicht-zystischen OSG-Kollektiv mit 2,5% schwach vertreten ist.

Die relative Häufigkeit des SLIM-Typ IV (Indifferenztyp) in den Teilpopulationen gestaltet sich wie folgt:

- Nicht-zystisches OSG-Kollektiv (n=78): 28 Fälle, dies entspricht 35,9%.
- Zystisches OSG-Kollektiv (n=39): 13 Fälle, dies entspricht 33,3%
- Nicht-OSG-Fälle (n=42): 21 Fälle, dies entspricht 50%.

In der Literatur [MORAWIETZ, CLASSEN, SCHRÖDER, DYNBYL et al. 2006] wird die Häufigkeit einer Typ IV-Membran mit 15,4% angegeben, dieser Wert wird in allen Teilpopulationen deutlich überschritten.

Die Auswertung der relativen Häufigkeit der endoprothesenassoziierten Arthrofibrose (EAF) liefert folgendes Ergebnis:

- Nicht-zystisches OSG-Kollektiv (n=78): 2 Fälle, dies entspricht 2,5%.
- Zystisches OSG-Kollektiv (n=39): 2 Fälle, dies entspricht 5,1%
- Nicht-OSG-Fälle (n=42): 1 Fall, dies entspricht 2,4%.

Vergleichsdaten zur Verteilung der Arthrofibrose im allgemeinen histopathologischen Routineeingang liegen hierzu nicht vor.

Der histopathologische Typ NOS war im nicht-zystischen OSG-Kollektiv in 2 Fällen nachzuweisen, dies entspricht 2,6%. Weitere NOS-Fälle lagen nicht vor. In der Konklusion ergibt sich aus den Daten eine grundsätzlich Anwendbarkeit der SLIM-Klassifikation auf die Endoprothesendysfunktion des oberen Sprunggelenks.

Auffallend ist die überdurchschnittliche relative Häufigkeit des abriebinduzierten Typs im zystischen OSG-Kollektiv sowie die stark überdurchschnittliche relative Häufigkeit des Indifferenztyps IV in allen Teilkollektiven.

5.2 Pathogenese der Endoprothesendysfunktion

Nach zugrundeliegendem Pathomechanismus unterscheidet man eine aseptische Prothesenlockerung von einer septischen Prothesenlockerung. Die ohne Infektionszeichen verlaufende aseptische Lockerung geht klassischerweise einher mit einem vermehrten Abrieb von mikro- oder makropartikulären Prothesenpartikeln, welche lokal eine Makrophagenreaktion mit Freisetzung proinflammatorischen Zytokinen auslösen und dadurch zu konsekutiven Osteolysen mit Implantatlockerung führen. Nicht-abriebinduzierte Veränderungen wie primäre mechanische Instabilitäten werden ebenfalls einer aseptischen Genese zugerechnet. Bei der septischen Prothesenlockerung kann eine infektiös-floride high-grade-Infektion von einer klinisch okkulten low-grade Infektion unterschieden werden [KRENN, MORAWIETZ, JAKOBS, KIENAPFEL et al. 2011].

Die erweiterte Konsensusklassifikation beinhaltet zusätzlich adverse Reaktionen, partikelinduzierte und nicht-partikelinduzierte Arthrofibrose sowie ossäre Pathologien, wodurch eine genaue Aussage zur Ätiologie des Endoprothesenversagens möglich ist:

Beim abriebinduzierten Typ (Typ I) sorgt die Freisetzung von makro- und/oder mikropartikulärem Abriebmaterial von der Prothese oder Zementmaterial als sog. Drittkörperabrieb für ein lokales proinflammatorisches Milieu, welches zur Entstehung von Osteolysen führt und so zu einer aseptischen Lockerung des Implantats führt. Die Standzeit für Prothesen mit einer Typ I-Membran beträgt 12,0 Jahre [KRENN, MORAWIETZ, JAKOBS, KIENAPFEL et al. 2011].

Der infektiöse Typ (Typ II) entspricht einer septischen Lockerung des Implantats, wobei hier zwischen einer minimalen low grade-Infektion und einer phlegmonösen, teils auch abszedierenden high grade Infektion unterschieden wird, wobei als Grenzwert für das Vorliegen einer low-grade Infektion 23 neutrophile Granulozyten pro 10 hochvergrößerten Gesichtsfeldern (HPF) empfohlen wurden [MORAWIETZ, TIDDENS, MUELLER, TOHTZ et al. 2009]. Die Standzeit für Prothesen mit einer Typ II-Membran beträgt 2,5 Jahre [KRENN, MORAWIETZ, JAKOBS, KIENAPFEL et al. 2011].

Der Mischtyp (Typ III) vereinigt Charakteristika eines abriebinduzierten Typs und eines infektiösen Typs, die Standzeit beträgt hier 4,2 Jahre [KRENN, MORAWIETZ, JAKOBS, KIENAPFEL et al. 2011].

Der Indifferenztyp (Typ IV), in der neueren Literatur als fibröser Typ beschrieben. Dieser ist gekennzeichnet durch ein kollagenfaserreiches Gewebe, in welchem allenfalls minimales Abriebmaterial nachweisbar ist und in dem weniger als 23 neutrophile Granulozyten/10HPF nachgewiesen werden können. Neben primärer mechanischer Instabilität kommen hier ein insuffizientes knöchernes Implantatlager sowie eine Implantatdislokation in Betracht, wobei die Standzeit durchschnittlich 5,5 Jahre beträgt [KRENN, MORAWIETZ, JAKOBS, KIENAPFEL et al. 2011].

5.3 Partikelalgorithmus im vorliegenden Kollektiv

Im Zystenkollektiv war in den abriebassoziierten SLIM-Typen I und III makro- und mikropartikeluläres Polyethylen, fibrinoide Nekrosen sowie vereinzelt auch metallisches Abriebmaterial nachweisbar. PMMA war in keinem Fall nachweisbar. Nach Partikelalgorithmus (siehe Seite 14) liegen Makropartikel phagozytiert in multinukleären Riesenzellen oder extrazellulär vor ($\geq 5 \mu\text{m}$ bis mehrere mm), Mikropartikel hingegen phagozytiert in Makrophagen ($\leq 5 \mu\text{m}$), wobei Mikropartikel so klein sein können, dass sie im Polarisationslicht nicht mehr detektierbar sind [KRENN, THOMAS, THOMSEN, KRETZER et al. 2014].

In Untersuchungen von Kobayashi et al konnte gezeigt werden dass ein pathogenetischer und lokalisationsabhängiger Zusammenhang zwischen Partikelanzahl, -größe und -form besteht. Bei Hüft- und Knieendoprothesen wurden 10 Milliarden Partikel pro Gramm Gewebe als Grenzwert für die Entstehung einer Osteolyse definiert [KOBAYASI, FREEMAN, BONFIELD, KADOYA et al. 1997]. Im peripheren Blut hingegen besitzen sog. submikrone Partikel die höchste biologische Aktivität in menschlichen Monozyten [MATTHEWS, GREEN, STONE, WROBLEWSKI et al. 2001]. In der rasterelektronenmikroskopischen Analyse zeigte sich ein ähnlicher Partikeldurchmesser im Bereich von Sprunggelenksendoprothesen verglichen mit Kniegelenksendoprothesen, wobei in Sprunggelenksendoprothesen insgesamt rundere Partikel nachgewiesen werden konnten. Die Partikelkonzentration war in beiden Lokalisationen identisch [KOBAYASHI, MINODA, KADOYA, OHASHI et al. 2004].

5.4 Klassifikation bei dysfunktioneller Endoprothese im oberen Sprunggelenk

Es konnte gezeigt werden, dass die ursprünglich für Hüftgelenk und Knie entwickelte SLIM-Klassifikation auch auf die dysfunktionelle OSG-Endoprothetik anwendbar ist, wobei lokali-

sationsspezifische Besonderheiten berücksichtigt werden müssen. Im Kontext der dysfunktionellen OSG-Endoprothetik wird von der Autorin dieser Arbeit ein vereinfachtes Klassifikationssystem vorgeschlagen, welches die wesentlichen lokalisationspezifischen Charakteristika abbilden sollte:

- Zuordnung zum SLIM-Typen
- Vorhandensein von Zysten (ZY)
- Vorhandensein von Calciumpyrophosphat (CPPD)
- Vorhandensein von Ossifikationen (OSS)
- Wenn vorhanden, Angabe der Ki67-Proliferationsfraktion in Prozent

Von der Autorin wird daher ein Score für die dysfunktionelle OSG-Endoprothetik vorgeschlagen: SLIM OSG-Score: SLIM Type I, ZY+/-, CPPD+/-, OSS+/-, Ki67 X%

5.5 Aktuelle Hypothesen zur Entstehung von periprothetischen Zysten

Pathogenetisch gehen periprothetische Zysten mit einer lokalen osteolytischen Defektbildung einher. In der Literatur wurde im Bereich einer periprothetischen Osteolyse eine proinflammatorische Umgebung beschrieben [PURDUE, KOLOUVARIS, NESTOR, SCULCO 2006], die in vorliegender Untersuchung mit dem Inflammationsquantifier erfasst wurde.

In der Untersuchung von [YOON, LEE, CHOI, LEE 2014] wurden 90 Patienten mit 99 OSG-Totalendoprothesen untersucht. In 37,4% der Fälle waren radiologisch Osteolysen nachgewiesen worden. In der histopathologischen Untersuchung zeigen sich in der Nachbarschaft von Osteolysen villöse Projektionen mit erhöhtem Anteil an Histiozyten sowie einer kleineren Population mehrkerniger Fremdkörperriesenzellen. Im Polarisationslicht war in den Histiozyten mikropartikuläres, sog. submikrones partikuläres Polyethylen demonstrierbar. Dieser Befund wird als Fremdkörperreaktion bei Partikelabrieb gewertet.

Die histopathologische Untersuchung des osteolyseassoziierten Gewebes in der Untersuchung von [KOIVU, KOHONEN, ALANEN et al. 2009] zeigte sich makroskopisch grau-bräunliches, histopathologisch überwiegend azelluläres, nekrotisches Gewebe mit vermehrtem Nachweis von Histiozyten und intrazytoplasmatischem mikropartikulärem Material, welches am besten im Polarisationslicht zu erkennen war. In Zusammenschau aller Befunde sind die Autoren der Ansicht, dass Polyethylen-Abrieb, eine Drittkörperabrieb durch Hydroxylapatit oder die direkte Einwirkung der Metallionen aufgrund eines implantatassoziierten

Stress-Shieldings als Ursachen für die periimplantäre Ostolyse in Betracht kommen.

In einem Kollektiv [NELL, HAMEL 2013] wurden 100 Patienten mit primär implantierter OSG-Endoprothese im postoperativen follow-up über einen Zeitraum von 24 Monaten beobachtet. In 43% der Fälle ergaben sich radiologisch Hinweise auf eine Zystenbildung. Hierbei konnten weder intraoperativ makroskopisch noch histopathologisch Abriebpartikel nachgewiesen werden. Bezüglich der Lokalisation waren im Talus am häufigsten periprothetische Zysten nachgewiesen worden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Lokalisationsangaben aus unserer klinisch-pathologischen Korrelation, auch in unserem Teilkollektiv waren im Talus am häufigsten periprothetische Zysten nachweisbar.

In einer Untersuchung aus Frankreich [DALAT, BARNOUD, FESSY, BESSE 2013] waren im periprothetischen Kompartiment Abrieb und fibrinoide Nekrosen demonstrierbar, während im miterfassten ossären Gewebe Zeichen der Resorption vorlagen. Im Zentrum der Zysten wurde reichlich azelluläres eosinophiles Material vorgefunden, während in der Peripherie eine prädominant histiozytäre Makrophagenreaktion nachweisbar war. Fremdmaterial war als Mikro- und makropartikuläres Polyethylen sowie als nicht näher einzuordnendes metallisches Material identifizierbar.

In unserer Untersuchung ergab sich im zystischen OSG-Kollektiv mit 53% eine überdurchschnittliche Häufigkeit einer periprothetischen Membran vom abriebinduzierten Typ. Vorherrschendes Partikelmaterial war mikro- und makropartikuläres Polyethylen. Es ergeben sich somit auch im hier untersuchten Kollektiv Hinweise auf eine abriebassoziierte Genese der Pseudozystenentstehung.

Zu diskutieren ist im oberen Sprunggelenk eine hohe mechanische Belastung, da im Vergleich zu anderen Gelenken mit 350mm^2 eine relativ kleine Gelenkfläche vorliegt, während 1100mm^2 im Hüftgelenk und 1200mm^2 im Kniegelenk jeweils unter Kompressionslast mit 500N gemessen wurden [KIMIZUKA, KUROSAWA, FUKUBAYASHI 1980]. Auf diese relativ kleine Gelenkfläche trifft das maximal 5,5-fache des Körpergewichts, was im Vergleich zum Kniegelenk mit dem maximal 3-fachen des Körpergewichts einer erhöhten mechanischen Belastung entspricht [STAUFFER, CHAO, BREWSTER 1977].

Ätiologisch wird in der Literatur [NELL, HAMEL 2013] eine punktuelle Mehrbelastung im Sinne eines „edge loadings“, welcher aufgrund prothesenspezifischer Besonderheiten auftreten kann und als Grundlage für einen vermehrten Inlayverschleiß mit konsekutiver Osteolysebildung gesehen werden kann.

Abriebpartikel spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Osteolysen [DUMBLETON, MANLEY, EDIDIN 2002], wobei die Initiation der Osteoklastogenese via RANK/RANKL

sowie die lokale Makrophagenaktivierung mit Ausschüttung von Zytokinen als wesentliche Faktoren zu nennen sind [WANG, WU, TIAN, LIU et al. 2014], [SHIN, KIM, LEE et al. 2012].

In der Untersuchung von [VAN WIJNGAARDEN, VAN DER PLAAT, NIEUWE WEME, DOETS et al. 2015] war in 22 untersuchten Fällen Polyethylen nachzuweisen. Metallische Partikel wurden in 16 Zysten vorgefunden. Der Nachweis von Polyethylenpartikeln komplettiert den Befund einer abriebassoziierten Zystenpathogenese, wobei die Autoren Polyethylenpartikel nicht als primäre Ursache einer Zystenentstehung interpretieren, sondern als begünstigenden Sekundärfaktor auf dem Boden einer primär nicht abriebinduzierten Zystengenese, wie z.B. biomechanische Faktoren, Implantatdesign und biochemische/physiologische Faktoren.

Auch die Prothesenbeschichtung wurde in der Literatur im Kontext potentieller Zystenentstehung schon häufig diskutiert, wobei hier grundsätzliche, teils auch gegensätzliche Unterschiede zwischen doppelt beschichteten HA-Titanprothesen und einfach HA-beschichteten Endoprothesen zu erkennen sind [NELL, HAMEL 2013].

In vivo konnte hierzu am Mausmodell mittels Mikro-CT und histologischer Untersuchung eine durch Titanium-Partikel induzierte Osteolyse nachgewiesen werden. Die durch NF- κ B- (RANKL) vermittelte Osteoklastogenese konnte in durch Hemmung des p38-Signalwegs mit dem Flavonon Naringenin reduziert werden. Eine reduzierte Osteolyse unter Naringenin-Wirkung war am Mausmodell nachweisbar [WANG, WU, TIAN, LIU et al. 2014].

In der Untersuchung von Lin et al (2014) wurde gezeigt, dass die NF- κ B-Aktivierung durch spezifische doppelsträngige synthetische DNA -Moleküle (sog. Decoy-Oligodesoxynucleotide = Decoy-ODNs), welche Regulatorprotein-Bindungsstellen besetzen können, abgemildert werden kann und in der Folge eine vermehrte Zytokinexpression mit Induktion der lokalen Osteoklastogenese somit ebenfalls reduziert werden könnte.

5.6 Calciumpyrophosphat (CPPD) als ätiologischer Kofaktor

In 28 Fällen konnten Calciumpyrophosphat-Depositionen (CPPD) nachgewiesen werden, wobei 27 Fälle dem OSG-Kollektiv zuzuordnen waren und ein Fall dem Nicht-OSG-Vergleichskollektiv. In Bezug auf das Gesamtkollektiv von 159 Fällen entspricht dies einer Häufigkeit von 17,6%. Der Altersdurchschnitt beträgt im CPPD-Kollektiv 59,75 Jahre. Eine besondere Assoziation zu zystischen Läsionen bestand nicht, in 14 Fällen war eine Koinzidenz mit OSG-Zysten nachzuweisen, in 13 Fällen nicht. Somit liegt hier keine zystenspezifische, sondern

vielmehr eine lokalisationspezifische Assoziation vor, da Calciumpyrophosphat signifikant häufiger im OSG als in anderen Lokalisationen nachweisbar war. Ein interessanter Befund ist das gleichzeitige Auftreten von Calciumpyrophosphat (CPPD) und Ossifikationen im Teilkollektiv mit klinisch-pathologischer Korrelation in 5 von 20 Fällen (25%).

In der Literatur [TAUSCHE, ARINGER 2014] wurden unter Berücksichtigung der aktuellen EULAR-Empfehlung (<http://ard.bmj.com>) verschiedene Erkrankungsformen bzw. prädisponierende Faktoren angegeben, die mit CPPD-Ablagerungen assoziiert sein können. Neben rein degenerativ-arthrotischen Gelenkschädigungen kommt hier auch eine traumatische Gelenkschädigung wie z.B. im Rahmen lokalen operativen Eingriffen in Betracht, wobei eine Knorpeldestruktion hierbei als entscheidender Faktor gesehen wird, der in unserem Untersuchungsgut ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen dürfte. In der Untersuchung von [RYU, IRIUCHISHIMA, OSHIDA, KATO et al. 2014] konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen Tiefe der Knorpeldegeneration und CPPD-Nachweis besteht. Auch ein höheres Lebensalter ist hier als allgemein-prädisponierender Faktor genannt.

In der Untersuchung von [JOHNSON, TERKELTAUB 2005] wird eine lokale Übersättigung mit anorganischem Phosphat (PPi), die durch eine Dysbalance der lokalen Phosphatkonzentration hervorgerufen wird, wobei das Transmembranprotein ANKH sowie die Nucleotid-Pyrophosphatdiesterase (NPP/NTPPH) hier steuernden Einfluss haben.

Glucosaminoglycane wirken im physiologischen Knorpel-Milieu einer CPPD-Kristallisation entgegen, somit kann eine Herabsetzung von Glucosaminoglycanen einen kristallfördernden Effekt haben. Im Falle einer Knorpelschädigung gelangen Kristalle in den Gelenkspalt und lösen dort über verschiedene Kaskaden eine Entzündungsreaktion mit Zytokinausschüttung aus [TAUSCHE, ARINGER 2014]. Der vermehrte Nachweis von CPPD im periprothetischen Gewebe von Sprunggelenksendoprothesen ist in unserer Untersuchung ein für das obere Sprunggelenk lokalisationspezifischer Faktor ohne besondere Zystenassoziation. In der Untersuchung von [CRAWFORD, PUDDLE, HUNT, ATHANASOU 1999] war in 13 von 789 Fällen einer Hüftrevision histopathologisch Calciumpyrophosphat (CPPD) zu detektieren, dies entspricht einer relativen Häufigkeit von 1,6% in diesem Untersuchungsgut. Bei Primärimplantation war explizit kein CPPD nachgewiesen worden. Auch nicht näher bezeichnete CPPD-prädisponierende Faktoren lagen nicht vor, sodass hier von einem Sekundäreffekt ausgegangen werden muss. In der Pseudokapsel war histopathologisch neben metallischem Abrieb eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion darstellbar. Das als Pseudomembran bezeichnete Gewebe wies fibrocartilaginäre Metaplasien auf.

[UZUKI, SAWAI, RYAN, ROSENTHAL et al. 2014] konnten zeigen, dass Patienten mit Nachweis von Calciumpyrophosphat (CPPD) eine hochregulierte Expression des ANK-Proteins aufwei-

sen. Morphologisch war Calciumpyrophosphat in der Umgebung hypertropher Chondrozyten nachzuweisen.

Zusammenfassend ist zu diskutieren, inwieweit die klassische Modellvorstellung zur Entstehung von CPPD bei einliegender Endoprothese angewendet werden kann und inwieweit die Entstehung von CPPD hier in einem Kausalzusammenhang zum operativen Eingriff steht, da Calciumpyrophosphat in der Literatur auch in etwa 50% der asymptomatischen Bevölkerung über 80 Jahre beschrieben worden sind [McCARTY, HOGAN, GATTER, GROSSMAN 1966]. Zu diskutieren ist, inwieweit bzgl. des Calciumpyrophosphats tatsächlich eine Endoprothesenassoziation vorliegt oder ob das Calciumpyrophosphat bereits vor der Implantation der Endoprothese nachweisbar war.

[MUEHLEMAN, AIGNER, RAPPOPORT, MATTSON et al. 2008] konnten zeigen, dass sowohl das Vorkommen von Natriumurat als auch von Calciumpyrophosphat im oberen Sprunggelenk mit Knorpelläsionen assoziiert waren, wobei die Autoren darauf verweisen, dass aufgrund der unterschiedlichen ätiologischen Genese bei ähnlicher Histologie letztendlich von einer biomechanisch-induzierten Genese ausgegangen werden müsse.

5.7 Heterotope Ossifikationen

Eine heterotope Ossifikation ist definiert als ektopes Vorhandensein von reifem Lamellenknochen innerhalb des Weichgewebes, wobei die für unser untersuchtes Kollektiv relevante erworbene Form häufig im Zuge muskulo-skeletaler Traumatisierung angetroffen wird [SHEHAB, ABDELHAMID, ELGAZZAR, COLLIER 2002].

Die genaue Pathogenese zur Entstehung von heterotopen Ossifikationen ist noch unklar. Mesenchymale Stammzellen mit scheinen jedoch in diesem Kontext eine wesentliche Rolle zu spielen [PETERSON, EBODA, BROWNLEY, CILWA et al. 2015]. In der Untersuchung von [LEE, CHO, PARK, SONG 2011] waren in 25% des Kollektivs aus der Sprunggelenksendoprothetik heterotope Ossifikationen nachgewiesen worden. Die Prävalenz von heterotopen Ossifikationen schwankt je nach Prothesendesign in der Literatur zwischen 3,8% und 82%.

In unserem Teilkollektiv mit klinisch-pathologischer Korrelation (n=20) waren in 19 Fällen radiologisch heterotope Ossifikationen nachgewiesen worden, wobei in 16 der 19 Fällen eine periprothetische Zyste vorlag.

5.8 Ki67 im Synovialgewebe

In der Untersuchung von [PESSLER, DAI, DIAZ-TOME, OGDIE 2008] konnte gezeigt werden, dass in Synovialgewebe mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu Normalgewebe eine signifikante erhöhte subintimale Ki67+ Zelldichte nachzuweisen war, wobei Fälle mit rheumatoider Arthritis eine positive Korrelation zwischen subintimaler Ki67-Expression und histopathologischen Synovialitisscore nach Krenn et al. aufwiesen. Die höchste Ki67+ subintimale Zelldichte konnte in chronischer septischer Arthritis detektiert werden. Auch in weniger entzündlich alterierten Synovialgeweben (bei Osteoarthritis und orthopädisch therapierten Arthropathien) war ebenfalls eine vermehrte subintimale Ki67+ Expression demonstrierbar. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass in o.g. Untersuchung Synovialgewebe im Kontext entzündlich-rheumatischer Genese ohne Bezug zum periprothetischen Kompartiment bei einliegender Endoprothese untersucht wurde.

Zukünftig wäre ein Einsatz des Ki67-Inflamationsquantifiers im Kompartiment der periprothetischen Membran möglich, insbesondere um die entzündliche Aktivität zu im zeitlichen Verlauf zu beobachten.

5.9 Ki67 in der automatisierten Anwendung

Die mit dem monoklonalen Antikörper Ki67 (MIB-1) immunhistochemisch ermittelte Ki67-Proliferationsfraktion hat insbesondere im diagnostischen Alltag eine große Bedeutung bei der Klassifikation von Neoplasien (zum Beispiel bei neuroendokrinen Tumoren und Mammakarzinomen), was erheblichen Einfluss auf die Therapiescheidungen haben kann, da diese z.B. beim Mamma-Karzinom in die Kategorie „Ki67 low“ (<20%) und „Ki67 high“ (>20% eingeteilt) sind bzw. bei neuroendokrinen Neoplasien ein proliferationsbasiertes Grading vorgenommen wird.

Aus diesem Grund war eine valide, reproduzierbare Bestimmung der Ki67-Proliferationsfraktion in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Forschung und führte aufgrund mangelnder Standardisierung zu kontroversen Diskussionen [JONAT, ARNOLD 2011]. In einer Studie von [POLLEY, LEUNG, McSHANE, DONGXIA 2013] konnte in einer internationalen Studie eine gute Reproduzierbarkeit in den einzelnen Laboratorien, jedoch deutlich schlechtere Ergebnisse zwischen den einzelnen Laboratorien, wenn Schnitte und Immunhistochemie vor Ort angefertigt wurden.

Zwischenzeitlich wurde mit vielen computerbasierten Ansätzen die standardisierte Bestim-

mung der Ki67-Proliferationsfraktion weiterentwickelt [KLAUSCHEN, WIENERT, SCHMITT, LOIBL et al. 2014] [McCALL, SHI, CORNISH, KLIMSTRA et al. 2013].

Die aktuelle Anwendung einer vollständig automatisierten, computerassistierten Ki67-Quantifizierung im Rahmen der GeparTrio-Studie zeigte bezüglich des automatisiert erfassten Ki67-Scores einen mit der manuellen Quantifizierung vergleichbaren statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen, sodass die Weiterentwicklung des Quantifizierungssystems einen zukünftigen Einsatz in der Routinediagnostik ermöglichen soll [KLAUSCHEN, WIENERT, SCHMITT, LOIBL et al. 2014].

Periprothetische Zysten sind in der OSG-Endoprothetik ein ätiologisch weitgehend ungeklärter Aspekt einer Endoprothesendysfunktion. Ziel dieser Arbeit ist es, 1- durch Anwendung der erweiterten SLIM-Konsensusklassifikation eine histopathologische Klassifikation zu erarbeiten, welche auf die Endoprothesendysfunktion des oberen Sprunggelenks anwendbar ist. 2- die Erfassung eines ossär-destruierenden Prozesses mit systematischer Untersuchung der periprothetischen Pseudozysten 3- die Bestimmung der Ki67-Proliferationsfraktion unter Anwendung einer neu entwickelten Software im Vergleich zum konventionellen Auszählen. Die histopathologische Auswertung zeigte die typische Morphologie einer Membran aus dem periprothetischen Kompartiment einer einliegenden Endoprothese. Neben fibrösen Gewebsbestandteilen zeigten sich Makrophagenakkumulate sowie entzündliche Infiltrate in unterschiedlicher Ausprägung, welche nach SLIM-Konsensusklassifikation subspezifisierbar waren. Partikelidentifikation und -charakterisierung wurden mit dem Partikelalgorithmus klassifiziert. Bei allen zystischen OSG-Fällen sowie 19 Fällen aus dem Nicht-OSG-Vergleichskollektiv wurde zudem zur Quantifizierung der Proliferationsfraktion eine Ki67-Immunhistochemie angefertigt, welche zum einen mit einer speziell hierfür angefertigten Software am Computerbildschirm manuell ausgezählt wurden, zum anderen automatisiert mit dem hier erstmalig eingesetzten Ki67-Inflamationsquantifier ausgewertet wurden (wie auf Seite 10 ff. dargestellt).

Es konnte gezeigt werden, dass:

1 - die ursprünglich für Hüftgelenk und Knie entwickelte erweiterte SLIM-Konsensusklassifikation grundsätzlich auf die OSG-Endoprothetik als besondere Lokalisation des periprothetischen Kompartimentes anwendbar ist, wobei im Vergleich zu den Literaturdaten mit 51,3% überdurchschnittlich häufig ein abriebinduzierter Typ I im pseudozystischen OSG-Kollektiv vorlag. Ein infektiöser Typ II war in periprothetischen Pseudozysten in einem Fall nachweisbar.

2 - Periprothetische Pseudozysten im untersuchten Kollektiv in 33,3% der Fälle nachgewiesen werden konnten, was bzgl. der Inzidenz vergleichbar mit den Angaben aus der Literatur ist. Histomorphologisch fand sich in allen Fällen membranartig konfiguriertes, pseudozystisches Gewebe, welches sich den Membrantypen nach SLIM-Konsensusklassifikation zuordnen liess.

3 - Die Ki67-Proliferationsfraktion bei Vorliegen einer periprothetischen Pseudozyste im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant gesteigert war ($p = 0.02037$). Periprothetische Zysten können somit als proliferationsaktive Form einer lokal-destruierenden intraossären Abrieb-synovialitis interpretiert werden.

Vorgeschlagen wird ein vereinfachtes Klassifikationsystem (s.S. 38 f.), welches die wesentlichen lokalisationspezifischen Charakteristika im oberen Sprunggelenk (OSG) in einem Scoresystem abbildet (SLIM OSG-Score: SLIM Type I-IV/EAF, ZY+/-, CPPD+/-, OSS+/-, Ki67 %).

Literaturverzeichnis

- BARG A., WIMMER M.D., WIEWIORSKI M., WIRTZ D.C. et al.: Total Ankle Replacement: Indications, Implant Designs, and Results. *Dtsch Arztebl Int.* 2015; 112(11): 177–184.
- BARG A., ZWICKY L., KNUPP M., HENNINGER H.B. et al.: HINTEGRA total ankle replacement: survivorship analysis in 684 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95(13): 1175–1183. DOI: 10.2106/JBJS.L.01234.
- BONASIA D.E., DETTONI F., FEMINO J.E., PHISITKUL P. et al.: Total ankle replacement: why, when and how? *Iowa Orthop J.* 2010; 30: 119–130.
- CRAWFORD R., PUDDLE B., HUNT N., ATHANASOU N.A.: Deposition of calcium pyrophosphate in tissue after revision arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg Br.* 1999; 81(3): 552–554.
- DALAT F., BARNOUD R., FESSY M. H., BESSE J. L.: Histologic study of periprosthetic osteolytic lesions after AES total ankle replacement. A 22 case series. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013; 99(6 Suppl): 285–295. DOI: 10.1016/j.otsr.2013.07.009.
- DUMBLETON J. H., MANLEY M. T., EDIDIN A. A.: A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2002; 17(5): 649–661.
- EASLEY M. E., VERTULLO C. J., URBAN W. C., NUNLEY J. A.: Total ankle arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2002; 10(3): 157–167.
- GERDES J., SCHWAB U., LEMKE H., STEIN H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983; 31(1): 13–20.
- JOHNSON K., TERKELTAUB R.: Inorganic Pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of articular cartilage. *Frontiers in Bioscience.* 2005; 10: 988–997.
- JONAT W., ARNOLD N.: Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol.* 2011; 22(3): 500–502. DOI: 10.1093/annonc/mdq732.
- JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J., KELLY R. O.: Histologie. Herausgegeben von M. GRATZL. 4. Auflage. *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York*, 196.

- KIMIZUKA M, KUROSAWA H, FUKUBAYASHI T: Load-bearing pattern of the ankle joint. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery*. 1980; 96(1): 45–49.
- KLAUSCHEN F., WIENERT S., SCHMITT W., LOIBL S. et al.: Standardized Ki67 diagnostics using automated scoring - clinical validation in the GeparTrio breast cancer study. *Clin Cancer Res*. 2014; : DOI: pii:clincanres.1283.2014.
- KOBAYASHI A., MINODA Y., KADOYA Y., OHASHI H et al.: Ankle arthroplasties generate wear particles similar to knee arthroplasties. *Clinical Orthopedic and related research*. 2004; 424: 69–72.
- KOBAYASI A., FREEMAN M. A., BONFIELD W., KADOYA Y. et al.: Number of polyethylene particles and osteolysis in total joint replacements. A quantitative study using a tissue-digestion method. *J Bone Joint Surg Br*. 1997; 79(5): 844–848.
- KOIVU H., KOHONEN I., ALANEN K. et al.: Severe periprosthetic osteolytic lesions after the Ankle Evolutive System total ankle replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 2009; 91(7): 907–914. DOI: 10.1302/0301-620X.91B7.22434.
- KOSTUJ T., PREIS M., WALTHER M., AGHAYEV E. et al.: German Total Ankle Replacement Register of the German Foot and Ankle Society (D. A. F.) - presentation of design and reliability of the data as well as first results. *Z Orthop Unfall*. 2014; 152(5): 446–454. DOI: 10.1055/s-0034-1382933.
- KRENN V., MORAWIETZ L., JAKOBS M., KIENAPFEL H. et al.: Joint endoprosthesis pathology. Histopathological diagnostics and classification. *Pathologe*. 2011; 32(3): DOI: 10.1007/s00292-011-1418-2.
- KRENN V., MORAWIETZ L., PERINO G., KIENAPFEL H. et al.: Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*. 2014; 210(12): 779–786. DOI: 10.1016/j.prp.2014.09.017.
- KRENN V., THOMAS P., THOMSEN M., KRETZER J. P. et al.: Histopathological particle algorithm. Particle identification in the synovia and the SLIM. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2014; 73(7): 639–649.
- LABEK G., THALER M., JANDER W., AGREITER M. et al.: Revision rates after total joint replacement: cumulative results from worldwide joint register datasets. *J Bone Joint Surg Br*. 2011; 93(3): 293–297. DOI: 10.1302/0301-620X.93B3.25467.
- LABEK G., TODOROV S., IVANESCU L., STOICA CL. et al.: Outcome after total ankle arthroplasty - results and findings from worldwide arthroplasty registers. *Int Orthop*. 2013; 37(9): 1677–1682. DOI: 10.1007/s00264-013-1981-7.

- LANG G.: Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. *Springer-Verlag*.
- LEE K. B., CHO Y. J., PARK J. K., SONG E. K.: Heterotopic Ossification After Primary Total Ankle Arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2011; 93(8): 751–758. DOI: 10.2106/JBJS.J.00178.
- MAISONNEUVE P., DISALVATORE D., ROTMENSZ N., CURIGLIANO G. et al.: Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014; 16(3): DOI: 10.1186/bcr3679.
- MATTHEWS J. B., GREEN T. R., STONE M. H., WROBLEWSKI B. M. et al.: Comparison of the response of three human monocytic cell lines to challenge with polyethylene particles of known size and dose. *J Mater Sci Mater Med*. 2001; 12(3): 249–258.
- MCCALL CHAD M., SHI CHANJUAN, CORNISH TOBY C., KLIMSTRA DAVID S. et al.: Grading of Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Is Improved by the Inclusion of Both Ki67 Proliferative Index and Mitotic Rate. *Am J Surg Pathol*. 2013; 37(11): 1671–1677. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000089.
- MCCARTY D. J., HOGAN J. M., GATTER R. A., GROSSMAN M.: Studies on pathological calcifications in human cartilage. I. Prevalence and types of crystal deposits in the menisci of two hundred fifteen cadavera. *J Bone Joint Surg Am*. 1966; 48(2): 309–325.
- MORAWIETZ L., CLASSEN R. A., SCHRÖDER J. H., DYNBYL C. et al.: Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol*. 2006; 59(6): 591–597.
- MORAWIETZ L., KRENN V.: The spectrum of histomorphological findings related to joint endoprosthetics. *Der Pathologe*. 2014; 59(6): 218–224. DOI: 10.1007/s00292-014-1976-1.
- MORAWIETZ L., TIDDENS O., MUELLER M., TOHTZ S. et al.: Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*. 2009; 54(7): 847–853. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03313.x.
- MUEHLEMAN C., AIGNER L. J., RAPPOPORT L., MATTSON E. et al.: Association between crystals and cartilage degeneration in the ankle. *J Rheumatol*. 2008; 35(6): 1108–1117.
- NELL M., HAMEL J.: Periprothetische Zysten nach S.T.A.R.-Sprunggelenksendoprothese. *Fuss-Sprungg*. 2013; 11: 117–129.
- ORTHNER E.: Complications after total ankle arthroplasty. *Fuß und Sprunggelenk*. 2011; 9: 202–215.

- PESSLER F., DAI L., DIAZ-TOME C., OGDIE A.: Increased angiogenesis and cellular proliferation as hallmarks of the synovium in chronic septic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 59(8): 1137–1146. DOI: 10.1002/art.23915. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/art.23915>.
- PETERSON J. R., EBODA O. N., BROWNLEY R. C., CILWA K.E. et al.: Effects of aging on osteogenic response and heterotopic ossification following burn injury in mice. *Stem Cells Dev.* 2015; 24(2): 205–213. DOI: 10.1089/scd.2014.0291.
- POLLEY M. Y. C., LEUNG S. C.Y., MCSHANE L. M., DONGXIA G.: An International Ki67 Reproducibility Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105(24): 1897–1906. DOI: 10.1093/jnci/djt306.
- PREYSSAS P., TOULLEC É., HENRY M., NERON J.B. et al.: Total ankle arthroplasty - three-component total ankle arthroplasty in western France: a radiographic study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2012; 98(4 Suppl): 31–40. DOI: 10.1016/j.otsr.2012.04.005.
- PURDUE P. E., KOLOUVARIS P., NESTOR B. J., SCULCO T. P.: The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J.* 2006; 2(2): 102–113. DOI: 10.1007/s11420-006-9003-6.
- REICHE D.: Roche Lexikon Medizin. 5. Auflage. URL: <https://www.tk.de/rochelexikon/>.
- RYU K., IRIUCHISHIMA T., OSHIDA M., KATO Y. et al.: The prevalence of and factors related to calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition in the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014; 22(7): 975–979. DOI: 10.1016/j.joca.2014.04.022.
- SADOGHI P., LIEBENSTEINER M., AGREITER M., LEITHNER A. et al.: Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *J Arthroplasty.* 2013; 28(8): 1329–1332. DOI: 10.1016/j.arth.2013.01.012.
- SCHILL S., THABE H.: Long-Term Results after Cemented and Cementless Total Ankle Arthroplasty in Rheumatoid Arthritis. *Akt Rheumato.* 2009; 34(1): 53–58. DOI: 10.1055/s-0029-1202333.
- SCHUH C.: Histopathologische Klassifikation der Neosynovialis bei Gelenk-Endoprothesen-Kurzstandzeit. Dissertation. 2014. Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- SHEHAB D., ABDELHAMID H., ELGAZZAR M., COLLIER B. D.: Heterotopic Ossification. *J Nucl Med March.* 2002; 43(3): 346–353.
- SHIN D. K., KIM M. H., LEE S. H. et al.: Inhibitory effects of luteolin on titanium particle-induced osteolysis in a mouse model. *Acta Biomater.* 2012; 8(9): 3524–3531. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.05.002.

- SKYTTÄ E. T., KOIVU H., ESKELINEN A., IKÄVALKO M. et al.: Total ankle replacement: a population-based study of 515 cases from the Finnish Arthroplasty Register. *Acta Orthop.* 2010; 81(1): 114–118. DOI: 10.3109/17453671003685459.
- STAUFFER R. N. M., CHAO E. Y. S., BREWSTER R. C. M. D.: Force and Motion Analysis of the Normal, Diseased, and Prosthetic Ankle Joint. *Clinical Orthopaedics & Related Research.* 1977; 127: 189–196.
- TAUSCHE A. K., ARINGER M.: Chondrocalcinosis due to calcium pyrophosphate deposition (CPPD). From incidental radiographic findings to CPPD crystal arthritis. *Z Rheumatol.* 2014; 73(4): 349–357. DOI: 10.1007/s00393-014-1364-5.
- The R Project* (2015). URL: <http://www.r-project.org>.
- UZUKI M., SAWAI T., RYAN L. M., ROSENTHAL A. K. et al.: Upregulation of ANK protein expression in joint tissue in calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *J Rheumatol.* 2014; 41(1): 65–74. DOI: 10.3899/jrheum.111476.
- VAN WIJNGAARDEN R, VAN DER PLAAT L, NIEUWE WEME RA, DOETS HC et al.: Etiopathogenesis of osteolytic cysts associated with total ankle arthroplasty, a histological study. *Foot Ankle Surg.* 2015; 21(2): 132–136. DOI: 10.1016/j.fas.2015.02.004.
- WANG W., WU C., TIAN B., LIU X. et al.: The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 21913–21934. DOI: 10.3390/ijms151221913.
- WIENERT S., HEIM D., KOTANI M. et al.: CognitionMaster: an object-based image analysis framework. *Diagn Pathol.* 2013; 8: 34. DOI: 10.1186/1746-1596-8-34.
- WOLLSCHLÄGER D.: Grundlagen der Datenanalyse mit R. 2. Auflage. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 460.
- YOON H. S., LEE J., CHOI W. J., LEE J. W.: Periprosthetic osteolysis after total ankle arthroplasty. *Foot Ankle Int.* 2014; 35(1): 14–21. DOI: 10.1177/1071100713509247.
- YU J. J., SHESKIER S.: Total ankle replacement—evolution of the technology and future applications. *Bull Hosp Jt Dis.* 2014; 72(1): 120–128.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Radiologischer Befund einer periprothetischen Tibia-Zyste bei einliegender OSG-Endoprothese	4
3.1	Ki67-Inflamationsquantifier: Ablauf der automatischen Zellkernerkennung	12
3.2	Analyse der automatischen Zellkernerkennung mit dem Inflamationsquantifier (Ki67-positive Zellkerne sind rot markiert, Ki67-negative Zellkerne sind grün markiert)	12
3.3	Toolgestütztes manuelles Auszählen: Ki67-positive Zellen wurden per Mausklick rot markiert, Ki67-negative Zellen wurden per Mausklick blau markiert, angegeben wird das Verhältnis von Ki67 positiven Zellen zu allen Zellen.	13
3.4	Intraoperativer Situs im Rahmen einer OSG-Revisions-Operation: Im periprothetischen Kompartiment der distalen Tibia zeigt sich eine zystische Osteolyse (Quelle: Prof. Dr. med. M. Walther, Schön-Klinik München-Harlaching)	15
4.1	Übersicht	18
4.2	HE-Morphologie einer periprothetischen Pseudozyste	20
4.3	Abriebtyp Pseudozyste: Übersichtsvergrößerung	21
4.4	Abriebtyp Pseudozyste: Mikropartikuläres und Makropartikuläres Polyethylen (Ausschnitt aus der Übersichtsvergrößerung)	22
4.5	Abriebtyp Pseudozyste: Mikropartikuläres und Makropartikuläres Polyethylen im Polarisationslicht (Ausschnitt aus der Übersichtsvergrößerung)	22
4.6	Pseudozyste infektiöser Typ CD15	23
4.7	Pseudozyste Mischtyp	23
4.8	Pseudozyste Indifferenztyp	24
4.9	Pseudozyste zur endoprothesenassoziierten Arthrofibrose	24
4.10	Vergleich Ki67 manuell / Inflamationsquantifier	25
4.11	Vergleichsanalyse I	27
4.12	Vergleichsanalyse II	27
4.13	Vergleichsanalyse III	27

4.14	Ki67-Proliferationsfraktion in periprothetischen Pseudozysten und in Kontrollfällen anderer Lokalisation	28
4.15	Manuell bestimmte Ki67-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit vom SLIM-Typ	30
4.16	Calciumpyrophosphat im Polarisationslicht	31
4.17	Calciumpyrophosphat in der HE-Morphologie	32

Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht der Lokalisationen	17
4.2	Lokalisation von Zysten und Ossifikation mit Zuordnung zum SLIM-Subtypen im Teilkollektiv mit klinischer Korrelation	19
4.3	Zuordnung nach SLIM-Konsensusklassifikation abhängig von der Lokalisati- on und dem Auftreten von periprothetischen Pseudozysten	20
4.4	Ki-67 manuell in OSG-Zysten und Nicht-OSG-Kontrollfällen	29
4.5	Mann-Whitney-U-Test	29
4.6	Ki67-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit vom SLIM-Typen	31
4.7	Häufigkeit von CPPD in Abhängigkeit von der Lokalisation	32
4.8	Chi-Quadrat-Test	32

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Histopathologische Klassifikation der Synovialis bei dysfunktioneller Endoprothese des oberen Sprunggelenks“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un- wahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Publikationsliste

Publikation 1: Müller S., Walther M., Szeimies U., Krenn V.: SLIM-Klassifikation bei dysfunktioneller OSG-Endoprothese, Poster P-SA-033, DGP-Kongress Frankfurt 2015.

Beitrag im Einzelnen: Erstellung eines Posters, mündliche Posterpräsentation.

Publikation 2: Müller S., Walther M., Saeger K., Wienert S., Krenn V.: SLIM-Klassifikation bei dysfunktioneller OSG-Endoprothese, Poster P39, Endokongress Berlin 2015.

Beitrag im Einzelnen: Eigenständige Erstellung eines Posters.

Publikation 3: Müller S., Krenn V., Walther M.: Übertragung der SLIM-Klassifikation auf die Endoprothesendysfunktion des oberen Sprunggelenks, Poster P51, Endokongress Berlin 2014.

Beitrag im Einzelnen: Eigenständige Erstellung eines Posters, Anfertigung von Mikrofotografien.

Publikation 4: Müller S., Frhr. von Welser R., Walther M., Koelbel B., Hopf F., Kretzer, J., Krenn V.: Consensual SLIM-Classification concerning endoprosthetic dysfunctions after total ankle prosthesis, Poster A-292 / SA-004, DGP-Kongress Berlin 2014.

Beitrag im Einzelnen: Eigenständige Erstellung eines Posters, mündliche Posterpräsentation.

Publikation 5: Krenn V., Morawietz L., Perino G., Kienapfel H., Ascherl R., Hassenpflug G.J., Thomsen M., Thomas P., Huber M., Kendoff D., Baumhoes D., Krukemeyer M.G., Natu S., Boettner F., Zustin J., Kölbl B., Rütger W., Kretzer J.P., Tiemann A., Trampuz A., Frommelt L., Trichilow R., Söder S., Müller S., Parvizi J., Illgner U., Gehrke T.: Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract.* 2014 Dec;210(12):779-86. doi: 10.1016/j.prp.2014.09.017. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25454771

Beitrag im Einzelnen: Mitgestaltung des Artikels.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Leerseite, um Seitenzahlen identisch mit eingereichter Fassung der Arbeit zu halten.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Krenn für die Ermöglichung der Arbeit und die hervorragende Betreuung in allen Promotionsphasen. Ich danke ihm für die stets konstruktive und zielgerichtete Herangehensweise und die Diskussionsbereitschaft, die zum stetigen Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Walther danke ich für sein Engagement bei den klinischen Aspekten der Arbeit. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Stephan Wienert und Herrn Kai Saeger für die Zusammenarbeit rund um die Quantifizierung.

Ich danke Herrn Jürgen Knauth für die Entwicklung des manuellen Datenerfassungstools.

Herrn Jannis Dimitriadis danke ich für die Erklärungen zur Mathematik.

Ferner bedanke ich mich bei den beteiligten Mitarbeitern der Pathologie Trier und meinen Promotionskollegen.