

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

DISSERTATION

**Histopathologische Diagnostik der Arthrofibrose:
Morphologische Charakteristika und immunhistochemische Beta-
Catenin Expression.**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Ruppert

aus Saarlouis

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Krenn
2. Prof. Dr. med. P. Thomas
3. Priv.-Doz. Dr. med. T. Häupl

Datum der Promotion: 07.09.2012

1. Einleitung	1
1.1 Ätiologie	2
1.1.1 Primäre / Generalisierte Arthrofibrose	2
1.1.2 Sekundäre / lokalisierte Arthrofibrose	4
1.2 Pathogenese	4
1.3 Histopathologische Charakterisierung und Graduierung der Arthrofibrose	8
2. Aufgabenstellung	9
3. Material und Methode	11
3.1 Untersuchungsmaterial und Patienten	11
3.2 Aufarbeitung der Gewebe	12
3.2.1 Protokoll der HE-Färbung	12
3.2.2 Immunhistochemische Darstellung von Beta-Catenin	13
3.3 Definition der histologischen Grade der Arthrofibrose, der Neosynovialis vom Indifferenztyp und Fibromatose	14
3.3.1 Histopathologische Kriterien der Arthrofibrose und Arthrofibrosegrade	14
3.3.2 Histopathologische Kriterien der Neosynovialis vom Indifferenztyp	20
3.3.3 Histopathologische Kriterien von Fibromatosen	22
3.4 Histopathologische Auswertung der HE-Schnitte	24
3.5. Analyse der immunhistochemisch gefärbten Beta Catenin Schnittpräparate	24
3.6 Statistische Methoden	26
4. Ergebnisbeschreibung	27
4.1 Patientenkollektiv Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	27
4.1.1 Alter und Geschlecht	27
4.1.2 Häufigkeitsverteilung der histopathologischen Diagnosen im Arthrofibrosekollektiv	27
4.1.3 Lokalisation	28
4.2 Arthrofibrose nach endoprothetischen Revisionseingriffen	30
4.3 Histopathologischer Nachweis von Abriebpartikeln in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	32

4.4 Histopathologische Beurteilung der Entzündungsreaktion in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	33
4.5 Histopathologische Beurteilung der Entzündungsreaktion entsprechend des Arthrofibrosegrades	33
4.6 Quantitative Verteilung der Arthrofibrosegrade (Fibroblastenzellularität) im Arthrofibrosekollektiv und Neosynovialis vom Indifferenztyp	35
4.7 Auswertung der immunhistochemischen Beta-Catenin-Färbung ausgesuchter Fälle	37
4.7.1 Patientenkollektiv	37
4.7.2 Beschreibung des zytologischen Verteilungsmusters von Beta-Catenin in der Arthrofibrose	38
4.7.3 Vergleich der Unterschiede des Arthrofibrosegrades und Neosynovialis vom Indifferenztyp bezüglich Beta-Catenin positiver Fibroblasten pro HPF (0,307 mm ²)	38
4.7.4 Vergleich der Unterschiede des Arthrofibrosegrades mit Fibromatosen bezüglich Beta-Catenin positiver Fibroblasten pro HPF(0,307 mm ²)	40
5. Diskussion	41
5.1 Einleitung	41
5.1.1 Pathogenese des Implantatversagens	42
5.1.2 Arthrofibrose	42
5.2 Gelenk-Lokalisation der Arthrofibrose	43
5.3 Histopathologie der endoprothesen- und nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose	44
5.3.1 Abriebpartikel in der Arthrofibrose im Vergleich zur Neosynovialis vom Indifferenztyp	45
5.3.2 Entzündungsreaktion in der Arthrofibrose im Vergleich zur Neosynovialis vom Indifferenztyp	45
5.4 Zellularität der Fibroblasten in der Arthrofibrose	47
5.5 Beta-Catenin-Expression in der Arthrofibrose	48
5.6 Quantitative Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten in der Arthrofibrose	52
6. Zusammenfassung	55

7. Literaturverzeichnis	57
8. Anhang	66
8.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	66
8.2 Curriculum vitae	67
8.3 Erklärung	69
8.4 Veröffentlichungen	70
8.5 Danksagung	71

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AF	Arthrofibrose
AF-Grad	Arthrofibrosegrad
APC	Adenomatous-polyposis-coli
BQS	Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung gGmbH
BVMed	Bundesverband Medizintechnologie e. V
CC	Zell-Conditioner
CD	Cluster of differentiation
CT	Computertomographie
DAB	3,3 Diaminobenzidin
FGF	Fibroblast Groth Factor
HE	Hämatoxylin Eosin
HPF	High power field, Hauptgesichtsfeld
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LCS	Liquid Coverslip™ Technology
Ki-67	Kiel-67, Immunhistochemischer Proliferationsmarker
MCP	Monozyten-Chemoattraktives Protein
MIP	Makrophagenentzündungsprotein
MD	Morbus Dupuytren
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
OA	Osteoarthrose
PAS-Färbung	Periodic acid-Schiff
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
TEP	Totale Endoprothese
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor

SA-HRP	Konjugierte Meerrettich-Peroxidase Lösung mit einem Proteinstabilisator und einem Konservierungsstoff
siRNA	Small interfering Ribonucleic acid
VKB	Vorderes Kreuzband
Wnt	Wingless Int-1

1. Einleitung

Unter Arthrofibrose versteht man eine in Qualität und/oder Quantität pathologische Bindegewebsvermehrung in Gelenken als Folgezustand von chirurgischen Gelenkeingriffen und Traumata [Zeichen et al 2008].

Klinisch kann man die Arthrofibrose als (schmerzhaft) Bewegungseinschränkung mit Gelenksteife aufgrund exzessiver Bindegewebevermehrung im Rahmen reparativer Prozesse beschreiben [Zeichen et al 2000]. Eine Bewegungseinschränkung definiert sich dabei klinisch durch die im alltäglichen Gebrauch notwendigen Bewegungsausmaße. So ist beispielsweise eine Beugefähigkeit im Kniegelenk von 83° zum Treppensteigen, 93° zum Aufstehen von einem Stuhl und 106° zum Schnüren eines Schuhs notwendig [Laubenthal et al 1972]. Harner et al und Cosgarea et al definierten eine Bewegungseinschränkung des Kniegelenkes nach VKB-Plastik ab einer Extensionseinschränkung von $>10^\circ$ und einer Flexionseinschränkung von $<125^\circ$ [Harner et al 1992, Cosgarea et al 1995]. Dabei bedeutet eine Flexionseinschränkung von $<90^\circ$ eine Therapiebedürftigkeit im Kniegelenk. Dies deckt sich mit einer Großzahl der Angaben in der aktuellen Literatur [Gollwitzer et al 2006].

Bewegungseinschränkungen nach operativen Eingriffen können jedoch verschiedenste Ursachen haben. So sind beispielsweise Revisionen in der Kniegelenksendoprothetik am häufigsten aufgrund Polyäthylenabrieb, aseptischer Lockerung, Instabilität und Infektion [Gollwitzer et al 2006]. Mit einem Anteil von 10-16% je nach Literaturangabe stellt die Arthrofibrose einen weiteren wichtigen Grund zur Revisionsoperation nach Knie-TEP dar. Somit kommt es häufiger zu einer Revisionsoperation aufgrund einer Arthrofibrose, als beispielsweise aufgrund einer Fehlpositionierung [Gollwitzer et al 2006, Sharkey et al 2004, Sharkey et al 2002].

Damit verursacht die Therapie von generalisierten Arthrofibrosen einen erheblichen stationären und ambulanten Behandlungsaufwand, der von großer sozioökonomischer Bedeutung ist [Bosch et al 1999].

Postoperativen Bewegungseinschränkungen können jedoch auch andere Ursachen zugrunde liegen. So sollte beispielsweise differentialdiagnostisch auch an mechanische oder muskuläre Ursachen gedacht werden. Der Begriff Arthrofibrose wird korrekterweise nur für Bewegungseinschränkungen verwendet, die durch eine exzessive Bindegewebsvermehrung mit inflammatorisch-reparativen Prozessen verursacht werden [Bosch 2002].

1.1 Ätiologie

In der Endoprothetik des Kniegelenkes gilt ein verminderter praeoperativer Bewegungsumfang als wesentlicher prognostischer Faktor für das postoperative Bewegungsausmaß, und bildet zusammen mit den übermäßigen perioperativen Schmerzen die Hauptrisikofaktoren zur Ausbildung einer postoperativen Arthrofibrose nach Knie-TEP-Implantation [Fox et al 1981, Nicholls et al 1990]. Ebenfalls sind systemische Grunderkrankungen, wie beispielsweise die rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus oder Neigung zur Keloidbildung Risikofaktoren zur Ausbildung einer postoperativen Arthrofibrose [Nicholls et al 1990, Vezeridis et al 2010]. Für die postoperative Arthrofibrose nach VKB-Plastik ist der präoperative Reizzustand des Kniegelenkes (Schwellung, Überwärmung und intraartikulärer Erguss) ein bedeutender Risikofaktor [Mayr et al 2004]. Die Bedeutung wiederholter Voroperationen für die Ausbildung einer Arthrofibrose ist hingegen umstritten [Mayr et al 2004, Scranton 2001]. In der Literatur beschäftigen sich die allermeisten Arbeiten mit der Arthrofibrose des Kniegelenkes. Hier hat sich eine Unterscheidung zwischen der generalisierten oder primären Arthrofibrose und der lokalisierten oder sekundären Arthrofibrose durchgesetzt [Lobenhoffer et al 1999, Bosch et al 1999].

1.1.1 Primäre / Generalisierte Arthrofibrose

Die primäre Arthrofibrose ist durch eine mehr oder weniger generalisierte Bindegewebsvermehrung im gesamten Gelenk gekennzeichnet, wobei die fibrotische Reaktion mit Abstufungen alle Binnenstrukturen des Gelenkes umfasst [Zeichen et al 2008, Lobenhoffer et al 1999].

Als Ursachen kommen neben den oben genannten Risikofaktoren z. B. Infektionen, chronische Fremdkörperreaktionen oder lang anhaltende lokale Gelenkiritationen in Betracht [Lobenhoffer et al 1999]. In der Regel haben Patienten mit generalisierter Arthrofibrose einen langwierigen Verlauf hinter sich, der über Monate bis Jahre gehen kann [Lobenhoffer et al 1999]. Ausgedehnte physiotherapeutische Maßnahmen und arthroskopische Eingriffe bleiben zumeist ohne Erfolg [Lobenhoffer et al 1999]. Klinisch ist das betroffene Gelenk teilig geschwollen oder generalisiert fibrosiert, die Patella ist hypomobil und häufig distalisiert, die seitlichen Retinaculæ sind kontrakt und druckschmerzhaft, der Hoffa'sche-Fettkörper zeigt sich hypertrophiert [Lobenhoffer et al 1999]. Zudem liegt eine kombinierte Extensions- und Flexionseinschränkung mit endgradig hartem Anschlag vor [Lobenhoffer et al 1999].

Die primäre Arthrofibrose rezidiert häufig trotz Revisionseingriffen. Daher empfehlen die meisten Autoren als Therapie der Wahl die möglichst vollständige Resektion des fibrotischen Gewebes, da nur damit eine Chance besteht, den Prozeß zum Stillstand zu bringen und die Gelenkbeweglichkeit wiederherzustellen [Lobenhoffer et al 1999, Gollwitzer et al 2006].

Nach der Meinung von Lobenhoffer [Lobenhoffer et al 1999] bleiben arthroskopische Therapieversuche mit Synovektomie und Débridement oftmals erfolglos, da mit arthroskopischen Rotationsmessern neue Läsionen erzeugt werden, weshalb frühe Rezidive drohen. Des Weiteren ist aufgrund der derben Konsistenz des Gewebes und teilweise auch extraartikulären Proliferation mit endoskopischen Verfahren eine vollständige Resektion technisch in den meisten Fällen nicht möglich [Lobenhoffer et al 1999]. Aus diesem Grund ist bei der generalisierten Arthrofibrose nach ausbleibendem Erfolg der konservativen Therapiemaßnahmen mit adäquater Analgesie, physiotherapeutischer Beübung und Narkosemobilisation primär die offene Arthrolyse anzustreben. Bei bestehendem Streckdefizit sollte zudem eine dorsale Kapsulotomie durchgeführt werden [Gollwitzer et al 2006, Lobenhoffer et al 1999]

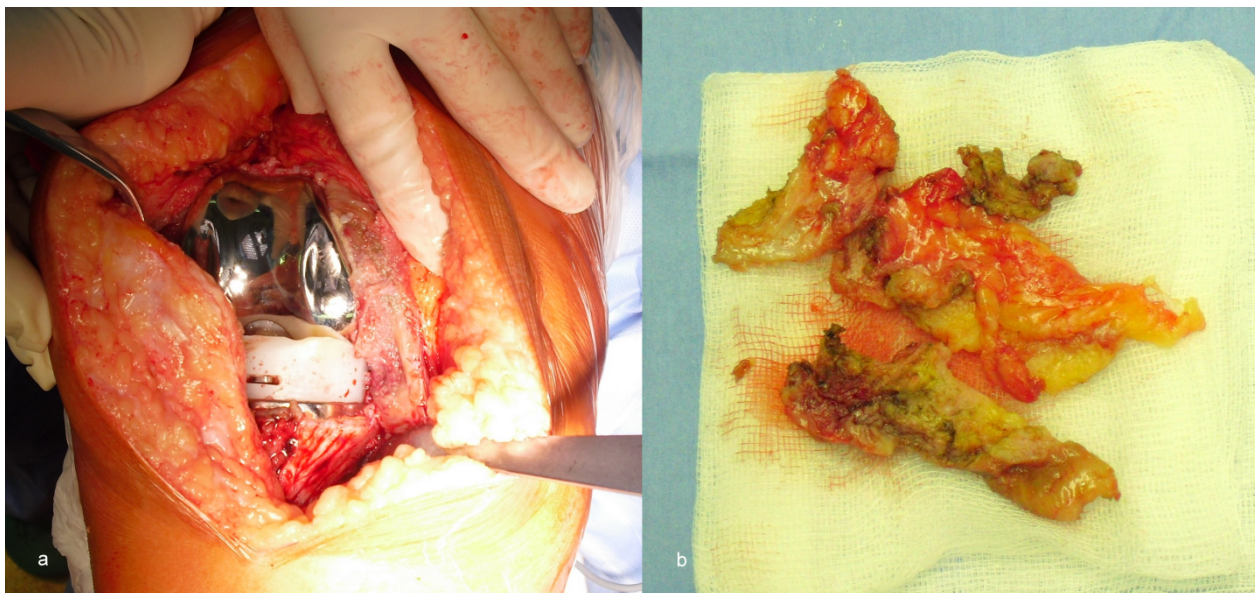


Abbildung 1.1: (a) Makroskopischer, intraoperativer Befund einer generalisierten endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose. Es zeigt sich deutlich die verbreiterte Synovialmembran (rechts im Bild). (b) Makroskopischer Befund der resezierten Synovialmembran: Verdicktes Gewebe mit fester Konsistenz, bei makroskopischem Fehlen von Entzündungszeichen.

1.1.2 Sekundäre / Lokalisierte Arthrofibrose

Einschränkungen der Gelenkbeweglichkeit durch eine sekundäre Arthrofibrose entstehen, im Gegensatz zur primären / generalisierten Arthrofibrose, durch eine lokale, meist mechanische Problematik [Bosch et al 1999, Lobenhoffer et al 1999]. Typisches Beispiel ist das Zykloppsyndrom und die Transplantathypertrophie durch Notch-Impingement nach vorderer Kreuzbandplastik (VKB-Plastik) und intra- und extraartikuläre Bridenbildung nach Gelenkoperationen und Traumata [Lobenhoffer et al 1999, Zeichen et al 2008]. Zum Notch-Impingement kommt es am häufigsten aufgrund eines zu weit ventral platzierten tibialen Bohrkanals. Hierdurch kommt es zu einem Impingement des Transplantates gegen das Notch-Dach. Ein zu weit lateral platzierter Bohrkanal kann zu einem lateralen Notch-Impingement führen. Aufgrund der anatomisch ungünstigen Kreuzband-Transplantat-Platzierung kommt es zu einer chronischen Transplantatirritation, was zu einer Hypertrophie des Sehngewebes mit schmerzhafter Bewegungseinschränkung führen kann [Lobenhoffer et al 1999, Krenn et al 2009]. In Gegensatz zur generalisierten Arthrofibrose lässt sich die lokale Arthrofibrose häufig gut durch eine arthroskopische Therapie beseitigen [Gollwitzer et al 2006, Lobenhoffer et al 1999]. Für den Fall des Notch-Impingement kann ein Débridement des hypertrophierten Transplantates sowie Notch-Plastik zu guten postoperativen Ergebnissen führen [Lobenhoffer et al 1999, Gollwitzer et al 2006, Scranton 2001]. Im Vergleich zur generalisierten Arthrofibrose rezidiert die lokalisierte / sekundäre Arthrofibrose nach Beseitigung des mechanischen Hindernisses bei adäquater Nachbehandlung in der Regel nicht [Lobenhoffer et al 1999].

Einen weiteren wichtigen Faktor stellt die Motivation und Compliance der Patienten dar, da die langwierige intensive krankengymnastische Beübung eine Grundvoraussetzung zum Erhalt des postoperativ gewonnenen Bewegungsausmaßes ist [Gollwitzer et al 2006].

1.2 Pathogenese

Die pathogenetischen Faktoren der Arthrofibrose sind ungeklärt, weshalb auch die Therapie zurzeit aus symptomatischen und weniger aus kausalen Ansätzen besteht.

Bisherige Untersuchungen beschreiben im Wesentlichen eine exzessive, intraartikuläre Neubildung von Bindegewebe im Rahmen reparativer Prozesse [Zeichen et al 2000].

Es existieren mehrere Hypothesen zur Pathogenese, welche meist als gemeinsame Basis von einer (temporären) Hypoxie und Perfusionsstörung der Gelenkinnenhaut ausgehen [Freeman et al 2010, Gollwitzer et al 2006]. Dabei kann eine durch ein

Trauma oder Operation temporär ausgelöste Hypoxie, durch Einblutung in das betroffene Gelenk, zu einem interstitiellen Ödem und zur Ausbildung von Granulationsgewebe führen, was schließlich die Gelenkfibrose initiiert [Gollwitzer et al 2006, O'Driscoll et al 2000].

Die Hypoxie der Synovialis führt zu einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und dadurch zu einer Dilatation der Blutgefäße mit Exsudation von Plasma [Murakami et al 1997, Gollwitzer et al 2006]. Die Folge ist ein Ödem des periartikulären Gewebes, welches klinisch durch gesteigerte Schmerzen und eingeschränkte Beweglichkeit imponiert. Schließlich kommt es zum Ersatz der interstitiellen Flüssigkeit durch extrazelluläre Matrix mit pathologisch gesteigerter Synthese von Kollagen [Murakami et al 1997], insbesondere Kollagen I, III und VI [Gollwitzer et al 2006].

Untersuchungen von systemischen und organspezifischen Fibrosen haben gezeigt, dass es dabei charakteristischerweise zu einer vermehrten Expression von Kollagen Typ VI kommt [Zeichen et al 2000, Lanzafame et al 1994, Magro et al 1995, Pelton et al 1990]. Zeichen et al konnten durch eine immunhistochemische Untersuchung an 18 Patienten mit Arthrofibrose eine starke Immunreaktion für Kollagen Typ VI vor allem perivaskulär und subsynovial nachweisen. Typ-III-Kollagen zeigte dabei ein diffuses Verteilungsmuster. Typ-VI-Kollagen könnte dabei eine Mediatorfunktion haben, da es als mikrofibrilläres Netzwerk der Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten sowie der Bindung anderer Kollagentypen dient [Zeichen et al 2000].

Neuere pathogenetische Konzepte zur Fibrogenese beschreiben eine Fibrose als „pathologische Wundheilung“ oder gestörtes „Remodeling“ [Zeichen et al 2008, Kolb et al 2001]. Bei der Lungenfibrose werden beispielsweise wiederholte Entzündungen im mikroskopischen Bereich, eine gestörte Kommunikation zwischen Entzündungs- und ortsständigen Zellen und fokale Fibroblastenproliferationen angenommen. Diese führen zu einer überschießenden Deposition und reduziertem Abbau extrazellulärer Matrix [Selman et al 2001]. Dabei ist ein wesentlicher pathogenetischer Faktor die Dysregulation auf der Ebene der Zytokine. Über diese Mediatoren läuft ein Großteil der interzellulären Kommunikation ab [Allen et al 2002, Lasky 2000]. Zum Einen gibt es proinflammatorische Zytokine, welche die Entzündungsreaktion fördern und zu einer verstärkten Einwanderung von Granulozyten und Lymphozyten in das Wundgebiet führen, z. B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-1 [Zeichen et al 2008]. Des

Weiteren gibt es antiinflammatorische Zytokine wie PDGF (Platelet Derived Growth Factor), FGFs, TGF- α und TGF- β 1–3 (Transforming Growth Factor β), mit denen der akute Prozess eingedämmt und die Geweberegeneration eingeleitet und gesteuert werden [Remick et al 1995]. Eine Trennung in diese beiden Gruppen hilft dem Verständnis der komplexen Regulationsvorgänge, entspricht aber nicht der Realität [Zeichen et al 2008]. Ein ausgewogenes Zusammenspiel „destruktiver“ und „konstruktiver“ Zytokine ist zur Erhaltung der Organintegrität nötig [Keane et al 2002]. Ist also die antiinflammatorische Zytokinreaktion verstärkt, kann es zu „exzessiver“ Wundheilung kommen, mit der Konsequenz einer irreversiblen Gewebsfibrose [Zeichen et al 2008].

Bereits 1995 konnten Murakami et al an 12 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 23 Jahren in Gewebeproben der Synovialis zwischen dem 5.Tag und 10 Monate nach vorderer Kreuzbandruptur immunhistochemisch eine vermehrte positive Reaktion für TGF- β und PDGF in synovialen Fibroblasten und Makrophagen nachweisen [Murakami et 1995]. Ihrer Meinung nach sind beide Zytokine bei der Entstehung der Arthrofibrose von Bedeutung [Murakami et al 1995]. TGF- β gilt als Schlüsselzytokin für fibrosierende Erkrankungen [Zeichen et al 2008]. In einer weiteren immunhistochemischen Studie von Zeichen et al 2008 bei 7 Patienten im Alter von 18-49 Jahren mit symptomatischer Arthrofibrose und einer mittleren Zeit zwischen Trauma und Probeentnahme von 14,3 Monaten, fand sich ebenfalls eine starke Immunreaktion für TGF- β und PDGF. Hier zeigten sich vornehmlich um lymphoplasmazelluläre Infiltrate vermehrt positive Reaktionen für beide Zytokine [Zeichen et al 2008]. Man weiß, dass TGF- β die Synthese von extrazellulärer Matrix stimuliert, insbesondere von Kollagen und Fibronectin, sowie den Matrixabbau durch eine Änderung des Gleichgewichts von Kollagenasen (Matrix-Metalloproteinasen, MMP) und Kollagenaseinhibitoren („tissue inhibitor of metalloproteinase“, TIMP) vermindert [O’Kane S et al 1997]. Des Weiteren konnten Lafayatis et al 1989 in einer in vitro Studie zeigen, dass TGF- β zu einem Anstieg der mRNA von Kollagen Typ I bei Synovialzellen führt [Lafayatis et al 1989]. Durch intraartikuläre Injektionen konnte auch eine fibröse Hyperplasie der Synovia im Hasenmodell induziert werden [Allen et al 1990, Elford et al 1992].

Im Gegensatz zu TGF- β stimuliert PDGF die Zellproliferation, ist chemotaktisch für Fibroblasten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen/Monozyten und kann die Fibronectin- und Prokollagensynthese steigern, d.h. PDGF stimuliert die Zellproliferation

von Synovialzellen [Zeichen et al 2008]. Es ist also zu vermuten, dass TGF- β und PDGF eine Schlüsselfunktion bei der Arthrofibrose spielen.

Unterhauser et al. konnten 2004 in einer immunhistochemischen Studie an 9 Patienten mit Arthrofibrose nach vorderer Kreuzbandplastik eine erhöhte Zelldichte von α -Smooth muscle actin positiven Myofibroblasten nachweisen [Unterhauser et al 2004]. Dabei war im Vergleich zur Kontrollgruppe I (Gewebeproben während primärer vorderer Kreuzband Plastik) eine 10-fach erhöhte Zelldichte, und im Vergleich zur Kontrollgruppe II (Gewebeproben gewonnen aus second-look Arthroscopien nach primärer vorderer Kreuzbandplastik) eine 5-fach erhöhte Zelldichte von Myofibroblasten nachweisbar [Unterhauser et al 2004]. Myofibroblasten sind hochdifferenzierte Fibroblasten. Von Ihnen ist bekannt, dass sie eine Hauptrolle während der Ausbildung von Fibrosen und kontrakter Wundheilung spielen [Unterhauser et al 2004]. In dieser Untersuchung werden erstmals Myofibroblasten, bzw. die erhöhte Zelldichte von Myofibroblasten als Substrat der Arthrofibrose nach vorderer Kreuzbandplastik immunhistochemisch definiert. Diese Daten sind zwar sehr gut nachvollziehbar, allerdings zeigen die in dieser Publikation dargestellten mikroskopischen Befunde keine charakteristische Morphologie einer ausgeprägten fibrösen Gewebereaktion. Vielmehr wird Synovialgewebe mit leichtgradig erhöhter Zellularität des fibrösen Gewebes dargestellt. Es bestehen hier somit mehr Ähnlichkeiten zu den stromalen Veränderungen einer low grade Synovialitis, als zu einem Substrat einer schwerwiegenden fibrösen Gewebereaktion als mögliches Substrat einer Arthrofibrose. Zusätzlich ist in einer mikroskopischen Aufnahme eine geordnete, organoide Verteilung von Fibroblasten erkennbar. Dies entspricht in erster Linie Bestandteilen einer nur leichtgradig fibrosierten Gelenkkapsel. Als Vergleichsgewebe wurde synoviales Fettgewebe verwendet, welches im formalen und funktionellen Sinn kein optimales Vergleichsgewebe darstellt.

Welche Rolle die Immunantwort bei der Entstehung der Arthrofibrose spielt, wurde von Bosch et al 2001 in einer immunhistochemischen Analyse an 18 Patienten untersucht. Hier zeigte sich eine variabel ausgebildete lymphozytäre entzündliche Infiltration durch CD3-positive Lymphozyten, sowie ein erhöhter Anteil proliferierender, Ki-67-positiver Zellen [Bosch et al 2001].

Möglicherweise stellen auch Abriebpartikel einen pathogenetischen Faktor der Arthrofibrose dar, so dass histopathologisch ein abriebinduzierter Typ von einem nichtabriebinduzierten Typ der Arthrofibrose unterschieden werden kann [Krenn et al 2009]. Diese Subtypisierung wurde auf Basis von histopathologischen Befunden postuliert [Krenn et al 2008], ist jedoch nicht abschließend geklärt.

1.3 Histopathologische Charakterisierung und Graduierung der Arthrofibrose

Nach Krenn et al 2008 wird für die histopathologische Diagnostik eine dreistufige Graduierung der Arthrofibrose vorgeschlagen. Diese orientiert sich an histologischen Kriterien (Fibrosierung der Synovialis / des periprothetischen Gewebes mit Hyalinisierung, fehlende bzw. minimale lymphozytäre entzündliche Infiltration, fehlende bzw. minimale Abriebreaktion) und vor allem an der fibroblastären Zelldichte [Krenn et al 2008]. Die semiquantitativen, abgestuften Kriterien der fibroblastären Zelldichte werden folgendermaßen definiert:

Grad I: Geringgradige fibroblastäre Zellularität: Abgrenzung zu einer unspezifischen Vernarbung ist histopathologisch nicht möglich; klinische Informationen sind nötig.

Grad II: Mäßiggradige fibroblastäre Zellularität mit nodalem Aspekt des fibrösen Gewebes.

Grad III: Hochgradige fibroblastäre Zellularität: histopathologische Ähnlichkeiten zu einer Fibromatose (z.B. Morbus Dupuytren).

Bei Grad II und III der Arthrofibrose ist eine Abgrenzung von der periprothetischen Neosynovialis vom Indifferenztyp eindeutig möglich, bei einem Grad I ist die klinische Information unerlässlich. [Krenn et al 2008]

Diese Klassifikation ermöglicht eine Abgrenzung von der periprothetischen Neosynovialis vom Indifferenztyp, basiert jedoch auf nur orientierend festgelegten Kriterien, eine Beschreibung von Arthrofibrose charakteristischen Zellen ist hier nicht beinhaltet.

2. Aufgabenstellung

Es existieren keine genauen zytopathologischen-, histopathologischen-, und keine immunhistochemischen Kriterien für die Diagnose der Arthrofibrose, insbesondere der endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose. Die klinische Diagnose der Arthrofibrose basiert auf uneinheitlichen Kriterien und Symptomen des Patienten [Gollwitzer 2006, Zeichen et al 2008, Bosch et al 1999]. In der Literatur finden sich bis auf den Vorschlag der oben genannten klinischen Klassifikation einer orientierenden histopathologischen, dreistufigen Graduierung [Krenn et al. 2010] jedoch keine systematisch erhobenen und definierten Kriterien zur histopathologischen Diagnose einer Arthrofibrose. Es bestehen Publikationen mit kleinen Fallzahlen: Diese Veröffentlichungen berücksichtigen einen bestimmten Umstand, wie beispielsweise die Arthrofibrose nach Kniegelenksendoprothetik bzw. nach vorderer Kreuzbandplastik [Gollwitzer 2006, Zeichen et al 2008, Zeichen et al 2000, Murakami et al 1997]. Arbeiten mit Bezug zu der endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose lassen eine genaue Charakterisierung der histopathologisch, pathognomonischen Veränderungen vermissen. Somit ist das histopathologische Äquivalent der Arthrofibrose nicht, beziehungsweise nur unzureichend, charakterisiert.

1-Histopathologische Charakterisierung und Graduierung der Arthrofibrose:

Die Analyse des Gewebes erfolgte durch definierte, zytopathologische und histopathologische Kriterien in klinisch diagnostizierten Arthrofibrose-Fällen: Festgelegt wurde die „gewebliche Dichte“ des fibrösen Gewebes (sog. Zellularität) durch semiquantitative Kriterien: Abstand zwischen den Fibroblasten. Dieser Abstand wurde als relativer Abstand, bezogen auf die Länge der Fibroblasten-Zytoplasmen festgelegt. Da histologische Graduierungsschemata von degenerativen und inflammatorischen Erkrankungen auf einer dreistufigen Abstufung (gering, mittel, viel) basieren [Krenn et al. 2002, Krenn et al 2010], und dieses Prinzip sich als gut reproduzierbar erwiesen hat, wurde das Schema einer „dreistufige Graduierung“ für die Arthrofibrose übernommen.

2-Festlegung immunhistochemischer, quantitativer Kriterien:

Bei fibrösen, tumorähnlichen Läsionen mit hoher Zellularität an Fibroblasten (Fibromatosen) ist eine Expression von Beta-Catenin beschrieben [Mac Donald et al 2009, Kim et al 2011, Ferenc et al 2009]. Somit sollte die Expression von Beta-Catenin immunhistochemisch analysiert werden und ein Schwellenwert festgelegt werden, ab welcher Quantität von Beta-Catenin positiven Fibroblasten pro HPF die Diagnose einer Arthrofibrose, insbesondere in Abgrenzung von einer Neosynovialis vom Indifferenztyp, zulässig ist. In der Literatur finden sich mehrere Schreibweisen für Beta-Catenin. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten wurde sich in der vorliegenden Promotionsschrift für die am häufigsten gewählte Schreibweise „Beta-Catenin“ entschieden. Synonym kann die Schreibweise „ β -Catenin“ verwendet werden.

Ziel dieser Promotionsschrift ist somit die Festlegung zytopathologischer, histopathologischer und immunhistochemischer Charakteristika der Arthrofibrose (Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF), als Basis für eine histopathologische / immunhistochemische Arthrofibrose Diagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität.

3. Material und Methode

3.1 Untersuchungsmaterial und Patienten

Die Gewebeentnahmen von 262 Patienten (Gelenkrevisions Eingriffe von Knie-, Hüft-, Sprung- und Schultergelenk) erfolgte im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik mit den Fragestellungen nach Arthrofibrose und Klassifikation des synovialen / neosynovialen Gewebes bzw. der periprothetischen Membran. Hierbei wurde sowohl die Neosynovialis nach endoprothetischen Revisions Eingriffen als auch die Gelenkkapsel nach nicht endoprothetischen Gelenkeingriffen (z.B. bei Bewegungseinschränkung nach arthroskopischen Eingriffen) analysiert. Entscheidend war die klinische Diagnose einer Arthrofibrose. Das Vergleichs-Kollektiv setzte sich aus 29 Patienten mit periprothetischer Membran vom Indifferenztyp (nichtabriebinduziert, nicht-infektiös, Typ IV-Membran) entsprechend der Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen [Morawietz et al 2004, Krenn et al. 2010] zusammen. Die mikroskopische Befundung wurde an einem Durchlichtmikroskop (DM 2500, Leica, Wetzlar) an vollautomatisch gefärbten Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnittpräparaten (1 bis 3µm) durchgeführt. Die HE-Färbung wurde nach einem in der Routinediagnostik üblichen Standardprotokoll durchgeführt. 30 Fälle mit der histopathologischen Diagnose Arthrofibrose mit ausreichend repräsentativem Gewebe wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Beta-Catenin analysiert. Diese setzten sich aus jeweils 10 Fällen von Arthrofibrose Grad 1, Grad 2 und Grad 3 zusammen. Außerdem wurden jeweils 15 Präparate mit Neosynovialis vom Indifferenztyp (Typ IV) und als Positivkontrolle 8 Fälle mit einer histopathologisch gesicherten Fibromatose, davon 6 Fälle der Palmaraponeurose, sowie jeweils ein Fall der Plantaraponeurose und einer cervikalen Fibromatose, verwendet.

3.2 Aufarbeitung der Gewebe

Das in 4% gepuffertem Formalin zu diagnostischen Zwecken übersandte Gewebe wurde zu einer maximal 0,5cm dicken Scheibe zugeschnitten und in einer Kunststoffkassette für weitere 24-48 Stunden in 4% gepuffertem Formalin fixiert. Es folgte die Entwässerung in einem geschlossenen Entwässerungsgerät (Peloris SOP 8204, Leica, Wetzlar), unter Vakuum und Wärme über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol als Intermedium, gefolgt von einer Paraffineinbettung über Nacht. Nach dieser Behandlung wurden 1-3µm dicke Schnitte angefertigt (Rotationsmikrotom Hyrax M40, Zeiss, Oberkochen; Messer A35, Feather, Osaka, Japan), auf entfettete unbeschichtete Objektträger (Objektträger Superfrost entfettet und geschnitten, Menzel, Braunschweig) aufgezogen, und für ca. 10-15 Minuten im Wärmeschrank (function line, Firma Heraeus, Hanau) bei ca. 70°C abgeschmolzen. Daraufhin wurden die Objektträger für 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

3.2.1 Protokoll der HE-Färbung

Die HE-Färbung wurde unter Verwendung des Leica ST 4040 Färbemoduls für die vollautomatische Verarbeitung von Proben ausgeführt.

Nach Deparaffinierung mittels Xylol und einer Ethanolreihe (s.o.) sowie Spülen mittels Leitungswasser, Beginn mit der Kernfärbung. Hierzu wurden die Objektträger für 4 mal 2 Minuten in Hämatoxylin nach Harris (Hämatoxylin nach Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) eingetaucht. Anschließend wurden die Kerne mittels Eintauchen für jeweils 2 Minuten in 70%iges Ethanol und 25%ige Salzsäure sowie anschließend Spülen mit Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte die Hintergrundfärbung mit Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für insgesamt 4 mal 2 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt und 3 mal für jeweils 2 Minuten in Xylol eingetaucht. Zuletzt wurde im Eindeckautomaten (CV5030, Leica, Wetzlar) mittels eines Eindeckmittels (Fixogum Fotokleber) eingedeckt. Anschließend wurde der gefärbte Schnitt mit einem Deckglas verklebt.

3.2.2 Immunhistochemische Darstellung von Beta-Catenin

Die immunhistochemische Färbung wurde unter Verwendung des Benchmark XT ICH Färbemodul (Ventana Medical Solutions, Tucson, USA) automatischen Slide Stainers für die vollautomatische Verarbeitung von Proben ausgeführt. Die immunhistochemische Färbung wurde mittels des vorgefertigten I-VIEW DAB Färbekit durchgeführt (Ventana Medical Solutions, Tucson, USA). Eine weitere Aufarbeitung in Sinne einer Verdünnung der einzelnen Chemikalien war nicht notwendig.

Nach Deparaffinierung mittels Xylol und einer Alkoholreihe (s.o.), wurde eine Zellkonditionierung mittels Zell-Conditioner 1 (CC1) über 8 Minuten bei 95°C, gefolgt von einer milden CC1 Zellkonditionierung über 30 Minuten, durchgeführt. Darauf folgte eine CC1 Zellkonditionierung über 4 Minuten bei 100°C, und nach 6-maligem Auftragen von CC1 Ausschalten der Heizung und weitere Zellkonditionierung über 8 Minuten. Nach Spülen mit Reaktionspuffer und Inkubieren für weitere 4 Minuten folgte das Auftragen von 1 Tropfen I-VIEW Inhibitor. Dieser wurde 4 Minuten inkubiert, mit Reaktionspuffer gespült, und für weitere 4 Minuten reinkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Reaktionspuffer und das Auftragen des primären Antikörpers gegen Beta-Catenin (Beta-Catenin Antikörper Klon 14, Ventana Medical Solutions, Tucson, USA). Die Schnitte wurden 32 Minuten lang mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Spülung mit Reaktionspuffer und eine 4 Minuten Inkubation bei 37°C, ein erneutes Spülen und Auftragen von 1 Tropfen I-VIEW BIOTIN Ig (Inkubation für 8 Minuten). Folgend Spülung und Auftragen von 1 Tropfen I-VIEW SA-HRP und Inkubieren für 8 Minuten. Danach 2-maliges Spülen mit Reaktionspuffer. Nun erfolgte das Auftragen von DAB (3,3 Diaminobenzidin) als Chromogen und Auftragen von I-VIEW H₂O₂ zum Blockieren der endogenen Peroxidase, dann Auftragen von LCS und Inkubieren für 8 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit Reaktionspuffer gespült und eine nukleäre Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Harris durchgeführt. Die mitgeführten sog. Negativkontrollen zeigten keine spezifische zytoplasmatische und / oder nukleäre Reaktion.

3.3 Definition der histologischen Grade der Arthrofibrose, der Neosynovialis vom Indifferenztyp und Fibromatose

Die histopathologische Graduierung der Arthrofibrose orientierte sich an den Kriterien nach Krenn et al 2008, einer dreistufigen Graduierung, welche auf nur orientierend definierten Veränderungen beruht. Diese histopathologische Graduierung wurde durch Festlegung semiquantitativer Kriterien (Abstand der der fibroblastären Zellen, Fibroblasten zueinander) erweitert. Fibroblasten sind zytomorphologisch durch längsovale, gering eosinophile Zytoplasmen und durch längsovale, hypochromatische, gering nukleolenprominente Zellkerne charakterisiert. Die Bewertung erfolgte in den Gewebsarealen mit am meisten ausgeprägten, geweblichen Veränderungen. Ein Prinzip, das in der histopathologischen Diagnostik als ein generelles Diagnoseprinzip für neoplastische Erkrankungen und auch entzündliche Erkrankungen akzeptiert ist [Krenn 2006 et al].

3.3.1 Histopathologische Kriterien der Arthrofibrose und Arthrofibrosegrade

Grad 1 der Arthrofibrose :

Geringgradige fibroblastäre Zellularität: Der Abstand zwischen den Fibroblasten beträgt mehr als 2 Zelllängen (von Fibroblasten). Dieses Kriterium basiert auf der in der HE-Färbung und in der immunhistochemischen Beta-Catenin Darstellung nachweisbaren Zytoplasmen.

Histopathologisch besteht membranartiges, hochgradig fibrosiertes / hyalinisiertes Bindegewebe, d.h. kollagenes faserreiches Bindegewebe. Die Oberfläche wird abschnittsweise von polarorientierten Fibroblasten, vereinzelt breitzytoplasmatischen Zellen (Makrophagen) begrenzt (synoviale Deckzellschicht). Perivaskulär sind einzelne Lymphozyten / Makrophagen nachweisbar. Polarisationsoptisch findet sich kein bzw. ein geringer Nachweis von Abriebpartikeln. In der PAS-Reaktion kein Nachweis gruppiert gelagerter / degenerierender neutrophiler Granulozyten. In der Berliner-Blau-Reaktion sind nur gelegentlich fokale Hämosiderindepositionen nachweisbar. Die Abgrenzung zu einer unspezifischen, fibrösen Narbenbildung ist histopathologisch nicht möglich (Abbildung 3.1).

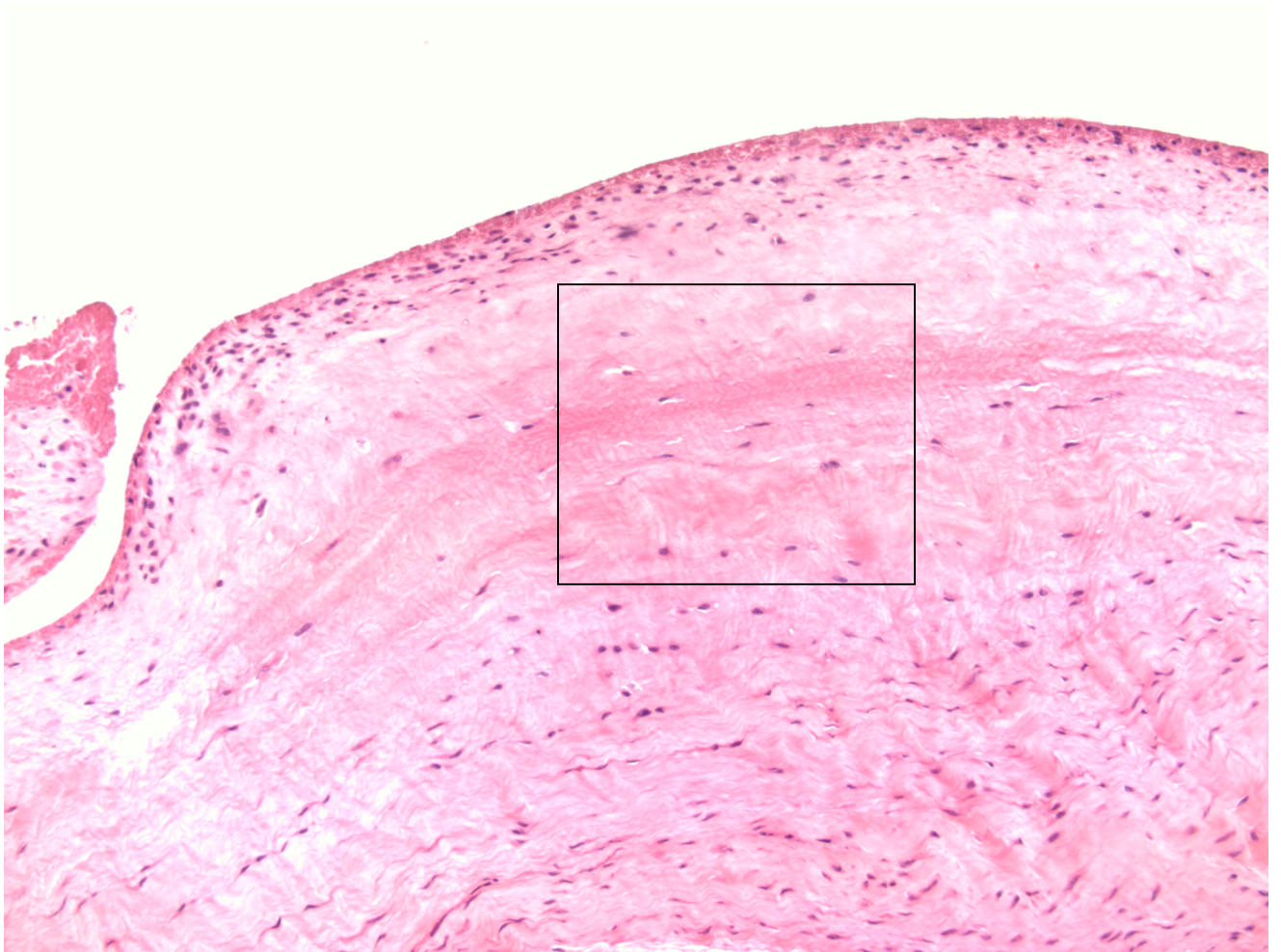


Abbildung 3.1: Arthrofibrose Grad 1. Locker gelagerte Fibroblasten, der Abstand der Fibroblasten zueinander beträgt mehr als 2 Zelllängen, geringradige fibroblastäre Zellularität (siehe Rechteck). (HE-Färbung, Originalvergrößerung 100x)

Grad 2 der Arthrofibrose:

Mäßiggradig erhöhte fibroblastäre Zellularität des fibrösen Gewebes, der Abstand zwischen 2 Fibroblasten beträgt etwas weniger als 2 Zelllängen (von Fibroblasten). Dieses Kriterium basiert auf der in der HE-Färbung und in der immunhistochemischen Beta-Catenin Darstellung nachweisbaren Zytoplasmen.

Histopathologisch stellt sich membranartiges, hochgradig fibrosiertes / hyalinisiertes Bindegewebe, d.h. kollagenes, faserreiches Bindegewebe dar. Die Oberfläche wird abschnittsweise von polar orientierten Fibroblasten, vereinzelt breitzytoplasmatischen Zellen (Makrophagen) begrenzt (Neosynovialis). Perivaskulär finden sich einzelne Lymphozyten / Makrophagen. Polarisationsoptisch findet sich kein bzw. ein geringer Nachweis von Abriebpartikeln. In der PAS-Reaktion kein Nachweis gruppiert gelagerter / degenerierender neutrophiler Granulozyten. In der Berliner-Blau-Reaktion nur gelegentlich fokaler Nachweis von Hämosiderindepositionen (Abbildung 3.2).

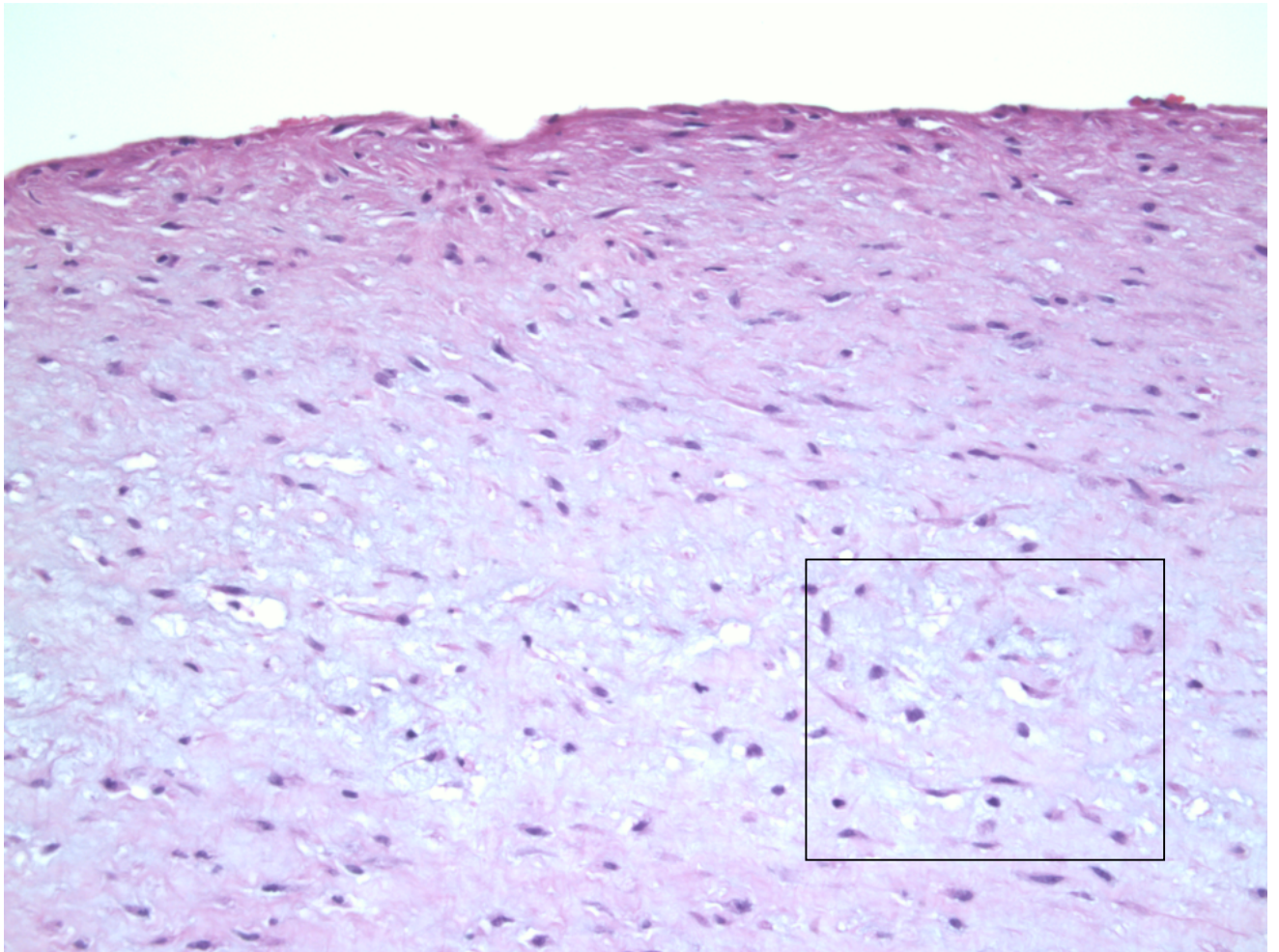


Abbildung 3.2: Arthrofibrose Grad 2. Im Vergleich zu Grad 1 dichter gelagerte Fibroblasten. Der Abstand zwischen 2 Fibroblasten beträgt weniger als 2 Zelllängen von Fibroblasten (siehe Rechteck). (HE-Färbung, Originalvergrößerung 100x)

Grad 3 der Arthrofibrose:

Hochgradige fibroblastäre Zellularität. Der Abstand zwischen den Fibroblasten beträgt weniger als eine Zelllänge (von Fibroblasten), die Zytoplasmen und Zellkerne der Fibroblasten können kontaktiert vorliegen. Dieses Kriterium basiert auf der in der HE-Färbung und in der immunhistochemischen Beta-Catenin Darstellung nachweisbaren Zytoplasmen.

Histopathologisch liegt membranartiges, hochgradig fibrosiertes / hyalinisiertes Bindegewebe vor. Die Oberfläche wird von polar orientierten Fibroblasten, vereinzelt breitzytoplasmatischen Zellen (Makrophagen) begrenzt (Neosynovialis). Perivaskulär finden sich einzelne Lymphozyten / Makrophagen. Polarisationsoptisch findet sich kein bzw. ein geringer Nachweis von Abriebpartikeln. In der PAS-Reaktion kein Nachweis gruppiert gelagerter / degenerierender neutrophiler Granulozyten. In der Berliner-Blau-Reaktion finden sich gelegentlich fokal Hämosiderindepositionen (Abbildung 3.3).

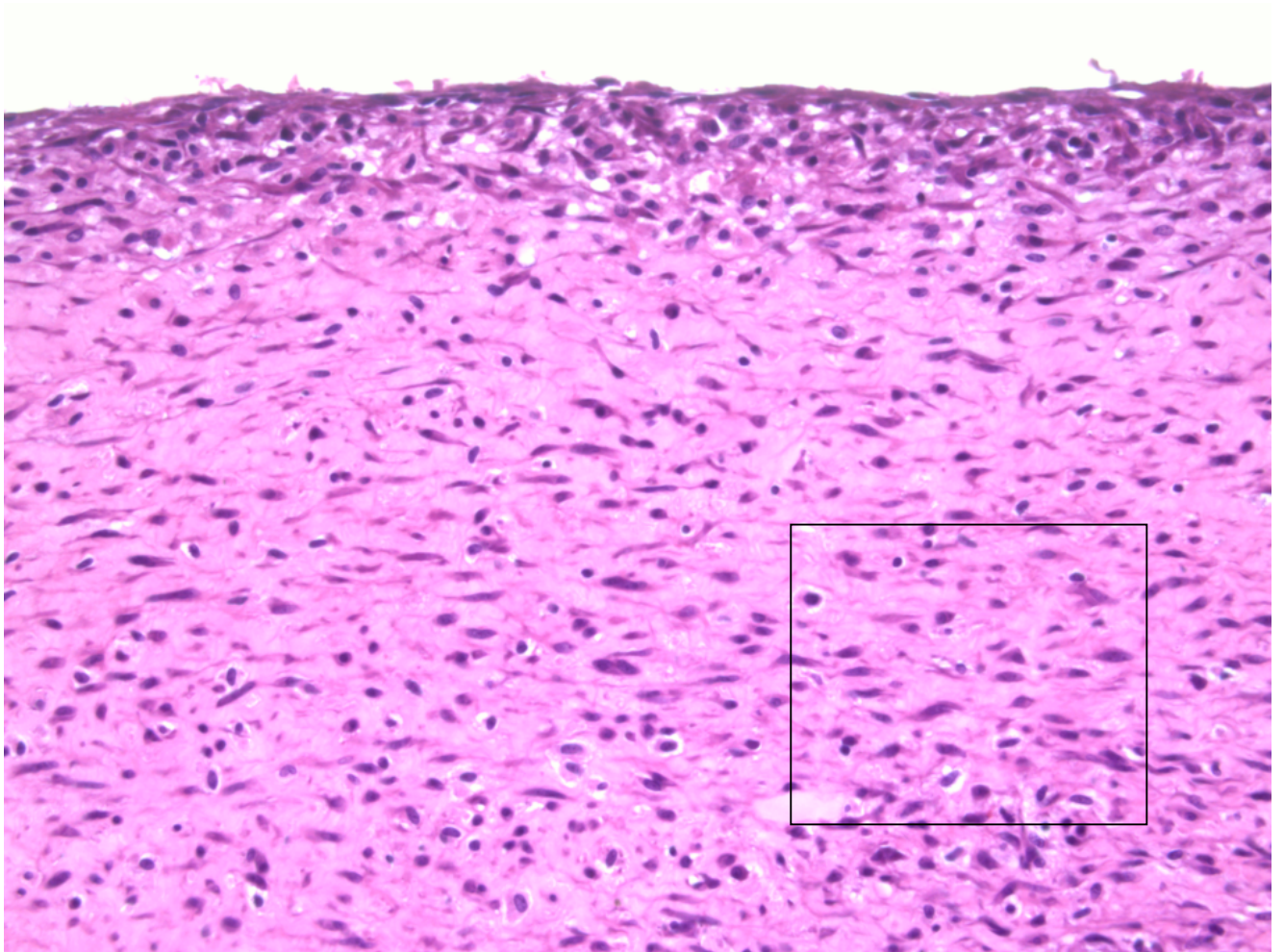


Abbildung 3.3: Arthrofibrose Grad 3. Der Abstand zwischen den Fibroblasten beträgt weniger als eine Zelllänge (von Fibroblasten), die Zytoplasmen und Zellkerne der Fibroblasten können kontaktiert vorliegen (siehe Rechteck).
(HE-Färbung, Originalvergrößerung 100x)

3.3.2 Histopathologische Kriterien der Neosynovialis vom Indifferenztyp

Dieser Membrantyp wurde erstmals durch die Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen durch Morawietz et al 2004 beschrieben und histopathologisch definiert [Morawietz et al 2004]. Histologisch stellt sich zellarmes, kollagenfaserreiches Bindegewebe dar, dessen Oberfläche von einer synovialisähnlichen Deckzellschicht begrenzt wird. Es kommen vereinzelt neutrophile Granulozyten nur im Bereich von Fibrinauflagerungen vor (Abbildung 3.4). Es sind keine oder nur umschriebene Fremdmaterialablagerungen (Abriebpartikel) nachweisbar. Die Ätiologie dieses Membrantyps ist noch nicht definitiv geklärt [Krenn et al 2009], diskutiert werden neben mechanischen Ursachen eine Brüchigkeit des knöchernen Implantatlagers (z. B. Osteoporose) sowie eine nicht optimale Implantatposition.

Bei AF-Grad 2 und AF-Grad 3 der Arthrofibrose ist eine Abgrenzung von der Neosynovialis vom Indifferenztyp eindeutig möglich, bei einem Grad 1 ist die klinische Information unerlässlich.

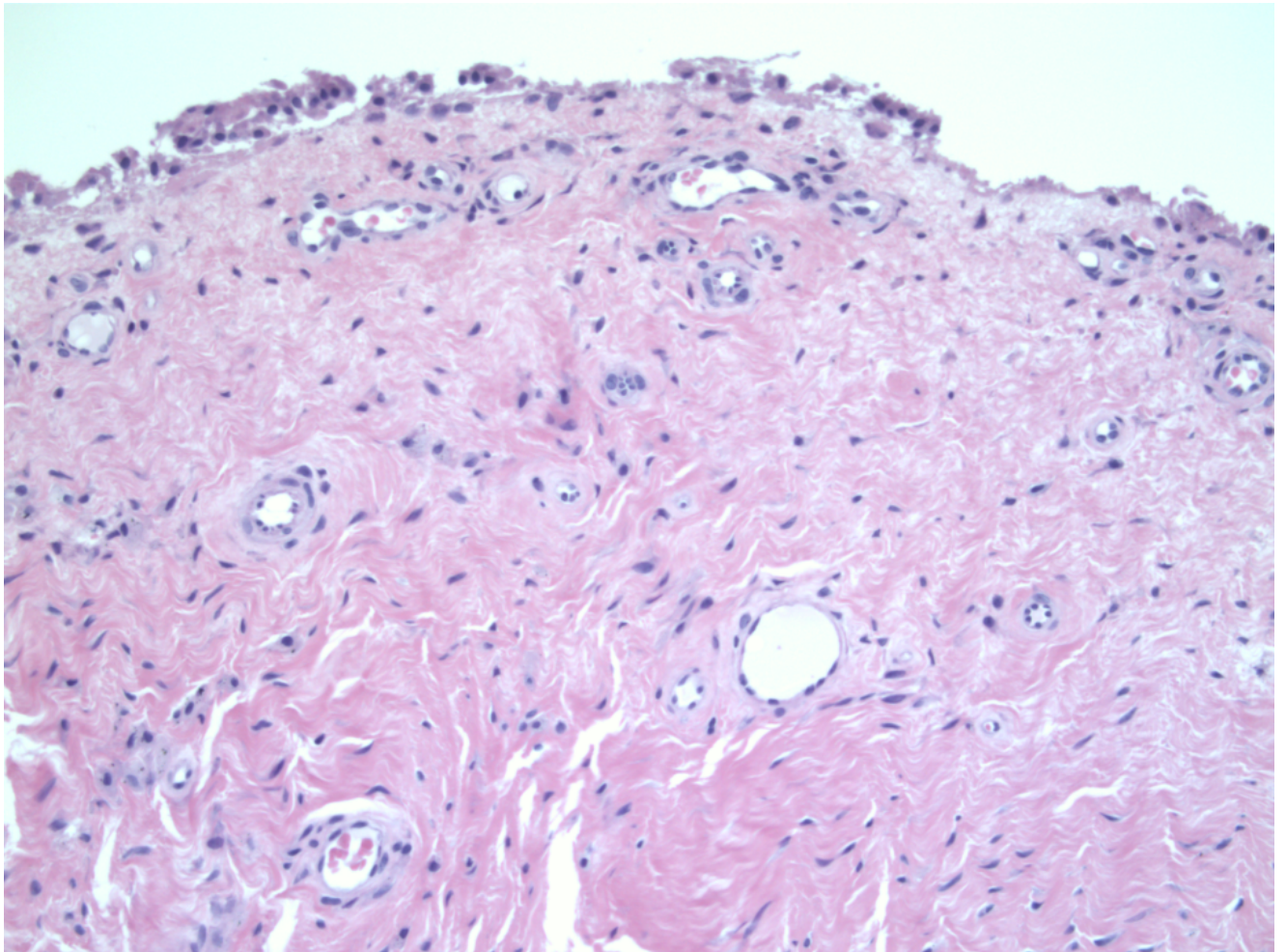


Abbildung 3.4: Neosynovialis / periprothetische Membran vom Indifferenztyp. Die Oberfläche ist begrenzt durch Synoviozyten, subsynovial fibröses Gewebe mit ekstatischen Blutgefäßen, einzelnen Fibroblasten und Makrophagen.
(HE-Färbung, Vergrößerung 100x)

3.3.3 Histopathologische Kriterien von Fibromatosen

Fibromatosen stellen eine Gruppe von proliferativen, mesenchymalen und lokal destruktiv wachsenden Erkrankungen dar [Montgomery et al 2001]. Histopathologisch findet sich bei Fibromatosen ein zellreiches fibrosiertes bzw. hyalinisiertes, d.h. kollagenes, faserreiches Bindegewebe. Es besteht eine variabel ausgebildete, überwiegend sehr hohe Fibroblasten-Zellularität [Margo et al 1995].

Für den Morbus Dupuytren (Fibromatose der Palmaraponeurose) wurden bereits 1959 von Luck drei histologisch unterschiedliche Ausprägungen beschrieben, welche bis heute üblicherweise zur histopathologischen Beurteilung herangezogen werden [Luck 1959, Degreef et al 2008]. Die proliferative Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Zellularität der Myofibroblasten mit Knotenbildung. Daran schließt sich die Rückbildungsphase an. Hier kommt es zu einer Ausrichtung der Fibroblasten entlang der Spannungslinien. Zuletzt kommt es zur Residualphase, in der sich hauptsächlich azelluläres verdicktes kollagenes Bindegewebe zeigt [Tomasek et al 1999].

Klinisch ist der Verlauf einer Fibromatose der Palmaraponeurose variabel, eine Progression findet oft langsam und über Jahre statt, vor allem bei jungen Patienten kann es jedoch auch zu einer raschen Progression kommen [Riolo et al 1991].

Für den klinischen Alltag hat sich die Einteilung der Dupuytren'schen Kontraktur nach Iselin aus dem Jahr 1965 bewährt [Iselin 1965, Mayer et al 1986]. Hiernach wird der Verlauf des Morbus Dupuytren in fünf Stadien eingeteilt. Im Stadium 0 zeigen sich kleine Indurationen und Knoten ohne Funktionsstörungen der Hand. Stadium I zeigt Knoten und Stränge in der Hohlhand mit beginnender Streckhemmung der Fingergrundgelenke. Stadium II zeigt eine Kontraktur im Fingergrundgelenk bis 30° mit beginnender Streckhemmung im Fingermittelgelenk. Im Stadium III finden sich Kontrakturen in einzelnen Fingergelenken, in einem Gelenk über 30°. Stadium IV zeigt eine extreme Beugekontraktur mit Krallenstellung der Finger und einhergehenden Gefühls- und Durchblutungsstörungen [Iselin 1965].

Immunhistochemisch besteht bei einem Teil der Fibromatosen eine Beta-Catenin-Expression der Fibroblasten [Montgomery et al 2005]. Je nach Fibromatose Typ lassen sich verschiedene subzelluläre Verteilungsmuster der Beta-Catenin-Expression unterscheiden. So ist beispielsweise für den Desmoid-Tumor eine hauptsächlich nukleäre Expression von Beta-Catenin beschrieben, wohingegen beim Morbus Dupuytren eine zytoplasmatische und eine variabel ausgeprägte nukleäre Beta-

Catenin-Expression der Fibroblasten (Abbildung 3.5) zur Darstellung kommt [Montgomery et al 2001].

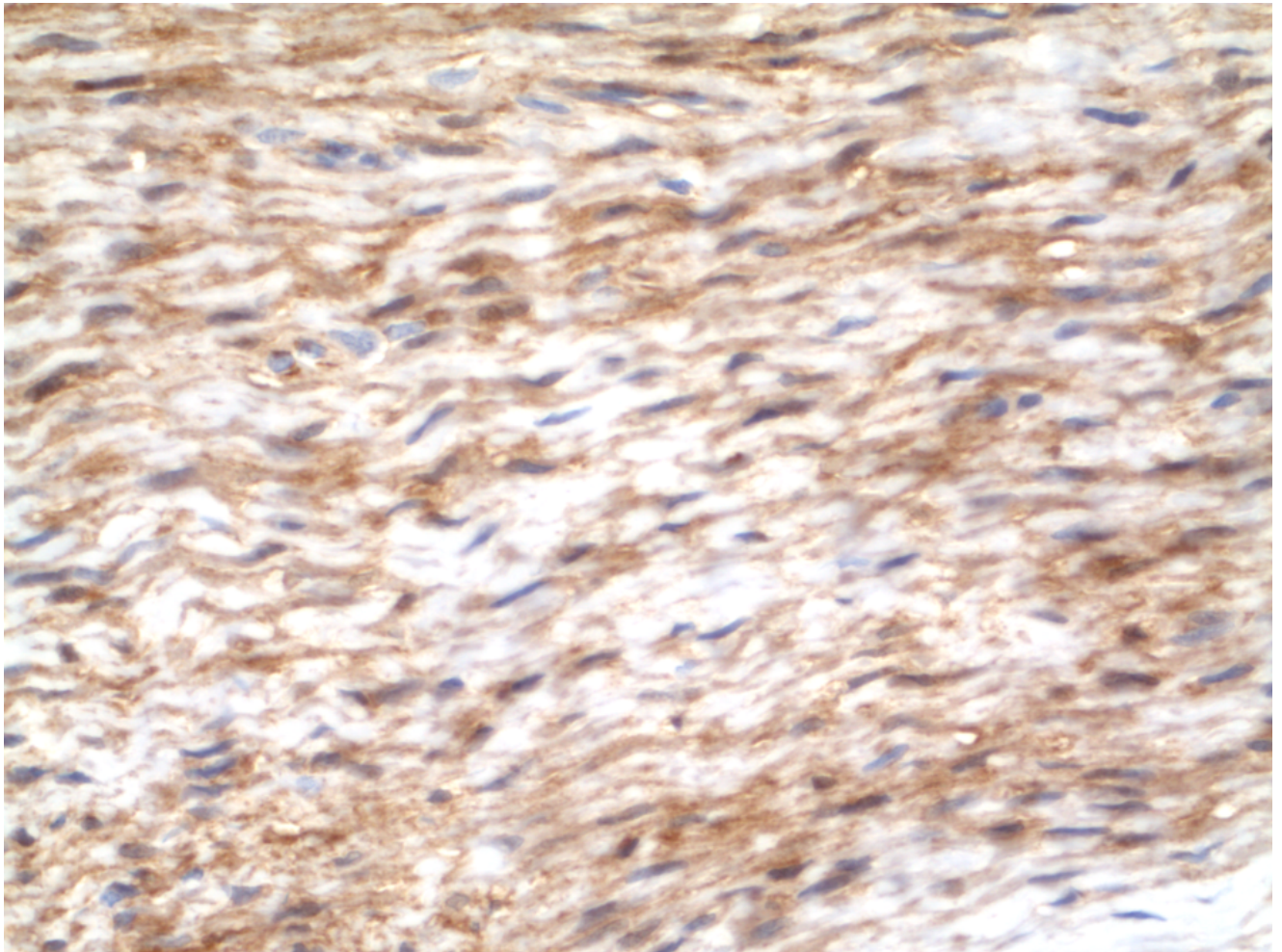


Abbildung 3.5: Proliferative Phase des Morbus Dupuytren mit zytoplasmatischer Beta-Catenin-Positivität der Fibroblasten. In einzelnen Zellen besteht eine intensive perinukleäre Reaktivität (indirekte Immunperoxidase-reaktion, Originalvergrößerung 400x).

3.4 Histopathologische Auswertung der HE-Schnitte

Die HE-gefärbten Gewebeschnitte wurden wie folgt analysiert:

1) Die Festlegung der Fibroblasten-Zellularität erfolgte nach den oben beschriebenen Kriterien.

2) Das leukozytäre Infiltrat wurde entsprechend dem Synovialitis-Score nach Krenn et al 2005 in einer dreistufigen Abstufung (0=normal, 1=gering, 2=mittel, 3=viel) erfasst [Krenn et al 2005].

3) Der Nachweis von Abriebpartikeln wurde in der Durchlicht- und der polarisationsoptischen Analyse bestimmt.

Hier war die Abstufung: 0=kein, 1= wenig und 2=viel Abrieb (1: weniger als 10% des Flächenanteils, 2: mehr als 10% des Flächenanteils)

3.5. Analyse der immunhistochemisch gefärbten Beta Catenin Schnittpräparate

Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines Leica DM 2500 Durchlichtmikroskop. Das zelluläre Verteilungsmuster der Beta-Catenin Expression wurde wie folgt beurteilt: Nukleär, perinukleär, zytoplasmatisch und membranös. Bei einer Vergrößerung von 1/400 wurde ein repräsentatives HPF (high power field / Gesichtsfeld) ausgewertet (Abbildung 3.6). Gezählt wurden Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF. Dabei definierte sich ein HPF in der vorliegenden Arbeit als Fläche von 0,307mm². Die Sehfeldzahl für das verwendete Leica DM 2500 betrug 25mm. Die maximale Objektiv-Vergrößerung betrug 40x. Dividiert man die Sehfeldzahl durch die Vergrößerung, ergibt sich somit ein Durchmesser von 0,625mm für das HPF. Entsprechend der Kreisflächenberechnungsformel gilt: Flächeninhalt = $\pi \cdot \text{Radius}^2$. Der Radius berechnet sich als: Radius = Durchmesser / 2.

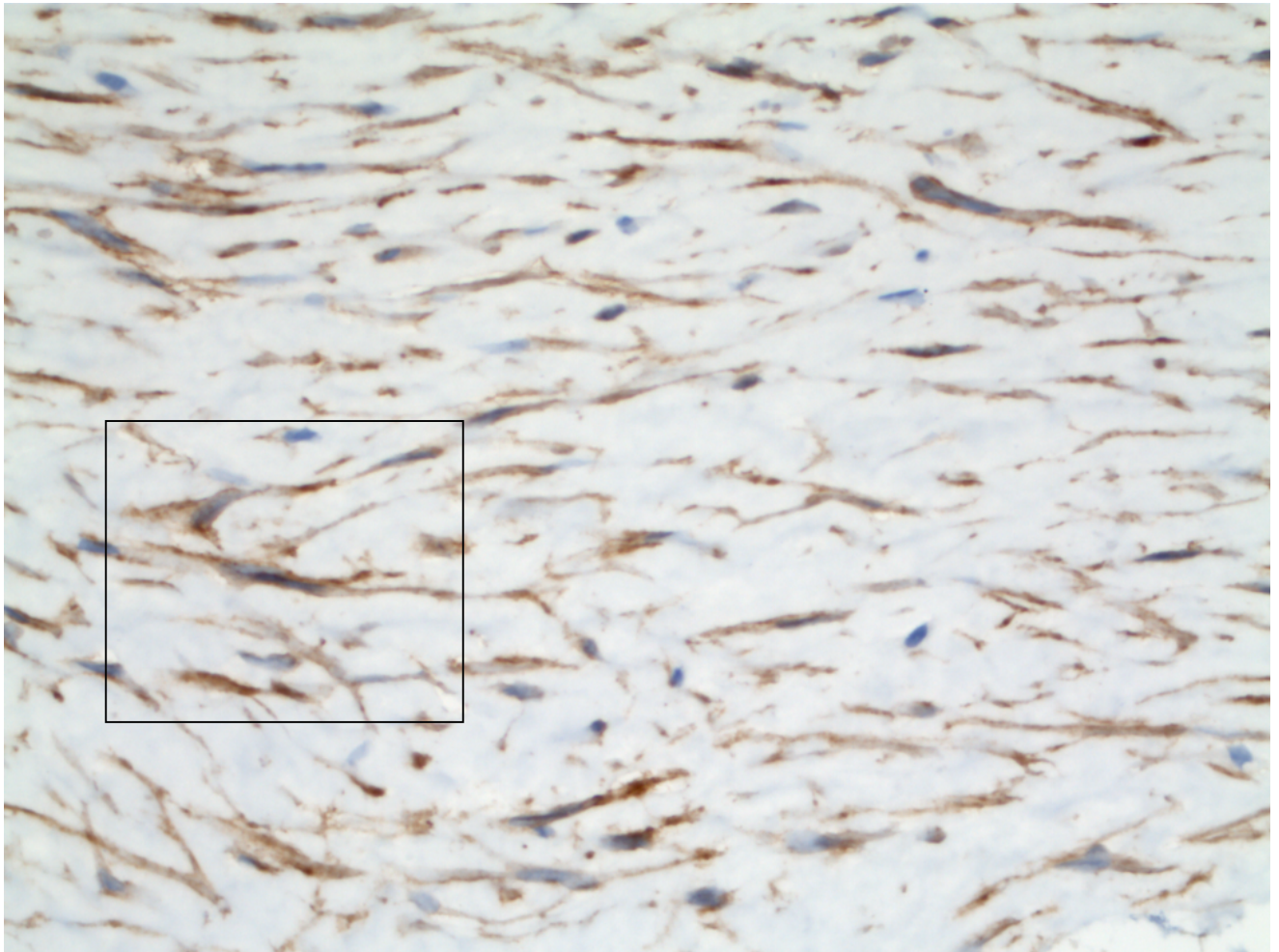


Abbildung 3.6: Immunhistochemische Darstellung der Beta-Catenin-Expression in der Arthrofibrose Grad 3: Der Abstand zwischen den Fibroblasten beträgt weniger als eine Fibroblasten-Zelllänge, die Zytoplasmen der Fibroblasten können sich kontaktieren (siehe Rechteck). Die Fibroblasten sind durch dendritisch verzweigte Zytoplasmen gekennzeichnet. Die zytoplasmatische Reaktivität ist in den kernnahen und kernfernen Zytoplasmaabschnitten nachweisbar. Es besteht eine intensive zytoplasmatische, teilweise auch perinukleäre Reaktivität. Eine nukleäre Beta-Catenin-Expression ist nicht nachweisbar (indirekte Immunperoxidase-reaktion, Originalvergrößerung 400x).

3.6 Statistische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die erhobenen Daten mit SPSS 17 (IBM, SPSS, Chicago, USA) statistisch ausgewertet.

Zur deskriptiven Statistik wurden Häufigkeiten, Medianwerte, Standardabweichung und das obere und untere Quartil bestimmt.

Zur Prüfung der Übereinstimmung von einzelnen Eigenschaften wurde der Chi-Quadrat-Test, bei geordneten oder nicht geordneten numerischen kategorialen Variablen mit nominalem oder ordinalem Niveau der Messwerte, verwendet. Hier musste die erwartete Häufigkeit in jeder Kategorie mindestens 1 betragen. Bei höchstens 20% der Kategorien (Felder) durfte die erwartete Häufigkeit unter 5 liegen. War dies bei einer Vierfeldertafel der Fall, wurde zusätzlich der exakte Test nach Fisher verwendet.

Bei der Testung der semiquantitativen Fibroblastenzellularität auf Signifikanz wurden die Variablen als intervallskaliert angenommen, da hier eine quantitative Steigerung mit einem steigenden Zahlenwert verbunden war. Hier wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft, ob zwei geprüfte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen. Gleiches gilt für mehr als zwei Grundgesamtheiten, in diesem Fall wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Des Weiteren wurde bei intervallskalierten Messwerten zur Testung ob zwei geprüfte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen der Mann-Whitney-U-Test verwendet und bei mehr als zwei Grundgesamtheiten der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Die Sensitivität wurde als Quotient der Fibroblastenzellularität als diagnostisches Kriterium für die Arthrofibrose ab Grad 2 und 3 als Verhältnis richtig erkannter Patienten mit Arthrofibrose zu allen Patienten mit Arthrofibrose bestimmt. Die Spezifität wurde als Quotient der Patienten mit normaler oder niedriger Fibroblastenzellularität als diagnostisches Kriterium für die Patienten mit Neosynovialis vom Indifferenztyp zu allen Patienten Neosynovialis vom Indifferenztyp bestimmt. In analoger Weise wurden Sensitivität und Spezifität für die Anzahl von 20 Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF bestimmt. Zur Bestimmung der Korrelation verschiedener erhobener Eigenschaften innerhalb der verschiedenen Gruppen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet.

4. Ergebnisbeschreibung

4.1 Patientenkollektiv Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

4.1.1 Alter und Geschlecht

In der vorliegenden Arbeit wurden 262 Patienten mit der klinischen Diagnose Arthrofibrose analysiert (58,4%, n=153 weibliche und 41,6%, n=109 männliche). Die Gewebeentnahme erfolgte im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik. Das mittlere Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Revision 61,67 Jahre (16 bis 87 Jahre, Standardabweichung 13,35 Jahre), der Median lag bei 64 Jahren (unteres Quartil 55 Jahre, oberes Quartil 70 Jahre). Das Vergleichs-Kollektiv setzte sich zusammen aus 29 Patienten (58,6%, n=17 weibliche und 41,4%, n=12 männliche) mit der Diagnose Neosynovialis vom Indifferenztyp. Das mittlere Alter der Patienten des Vergleichs-Kollektives betrug zum Untersuchungszeitpunkt 66,03 Jahre (38 bis 85 Jahre, Standardabweichung 11,431 Jahre), der Median lag bei 69,0 Jahren (unteres Quartil 61,69 Jahre, oberes Quartil 70,38 Jahre). Bezüglich des Alters fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Alter des Arthrofibrosekollektives und des Vergleichs-Kollektives mit Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

4.1.2 Häufigkeitsverteilung der histopathologischen Diagnosen im Arthrofibrosekollektiv

Von den untersuchten 262 Fällen mit der klinischen Diagnose Arthrofibrose bestätigte sich histopathologisch die Diagnose Arthrofibrose, entsprechend der festgelegten histopathologischen Kriterien der Arthrofibrose nach Krenn et al 2008, in 222 Fällen (84,7%).

Die 15,3% (n=40) der Fälle mit einer histopathologisch abweichenden Diagnose verteilten sich mit 2,3% (n=6) auf die Diagnose Neosynovialis vom Indifferenztyp, mit 2,7% (n=7) auf die Diagnose Low grade Synovialitis und in 10,3% (n=27) konnte das Gewebe keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden. In den folgenden Berechnungen wurden lediglich die Fälle mit der histopathologischen Diagnose Arthrofibrose, entsprechend der festgelegten histopathologischen Kriterien der Arthrofibrose nach Krenn et al 2008 betrachtet.

Von den 222 Patienten mit der histopathologischen Diagnose Arthrofibrose wurden 28,8% (n=64) als AF-Grad 1 (Arthrofibrose-Grad 1), 47,7% (n=106) als AF-Grad 2 und 23,4% (n=52) als AF-Grad 3 klassifiziert (Abbildung 4.1).

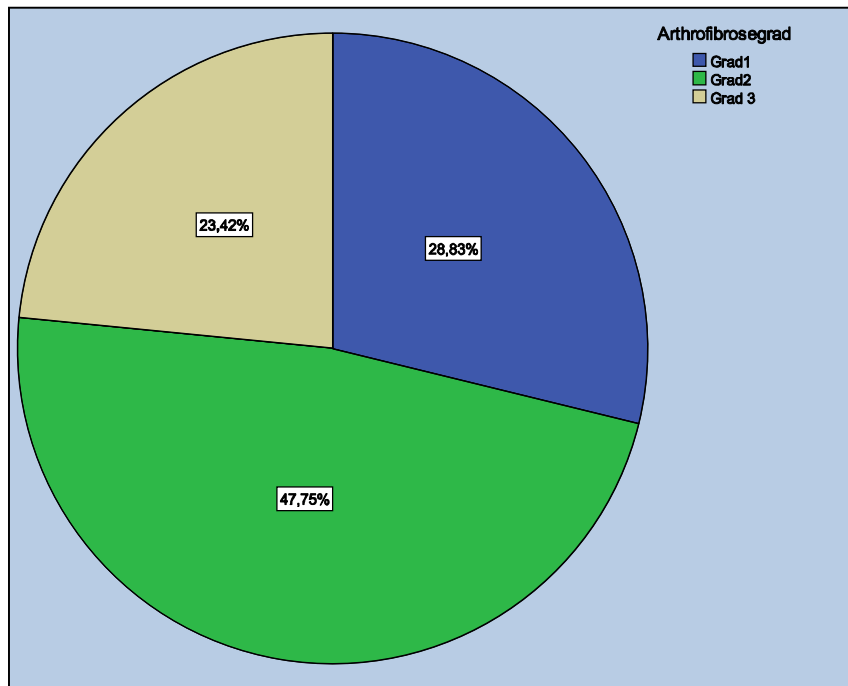


Abbildung 4.1: Häufigkeiten der histopathologischen Arthrofibrosegrade innerhalb der Arthrofibrose

4.1.3 Lokalisation

Bei den eingesandten Gewebeproben handelte es sich für Gruppe der Arthrofibrosepatienten in 3,2% (n=7) der Fälle um Hüftgelenkscapsel-, in 80,2% (n=178) um Kniegelenkscapsel-, in 0,9% (n=2) um Sprunggelenkscapsel- und in 0,5% (n=1) um Schultergelenkscapselgewebe. In 15,3% (n=34) wurde keine Angabe zur Lokalisation gemacht.

Bei den eingesandeten Gewebeproben der Neosynovialis vom Indifferenztyp handelte es sich in 37,9% (n=11) um Hüftgelenkscapsel- und in 44,8% (n=13) um Kniegelenkscapselgewebe. In 17,2% (n=5) wurde keine Angabe zur Lokalisation gemacht (Tabelle 4.1, Abbildung 4.2).

Es fand sich ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Lokalisation Kniegelenk zu sonstigen Lokalisationen zwischen dem Arthrofibrosekollektiv und dem Vergleichskollektiv (Chi-Quadrat-Test $p < 0,001$ und Exakter Test nach Fischer $p < 0,001$).

Tabelle 4.1: Gelenklokalisierung im Arthrofibrosekollektiv und der Neosynovialis vom Indifferenztyp

Lokalisation		Gruppe		Gesamt
		Arthrofibrose	Neosynovialis vom Indifferenztyp	
keine Angabe	Anzahl	34	5	39
	%	15,3%	17,2%	15,5%
Hüftgelenk	Anzahl	7	11	18
	%	3,2%	37,9%	7,2%
Kniegelenk	Anzahl	178	13	191
	%	80,2%	44,8%	76,1%
Sprunggelenk	Anzahl	2	0	2
	%	0,9%	0,0%	0,8%
Schultergelenk	Anzahl	1	0	1
	%	0,5%	0,0%	0,4%
Gesamt	Anzahl	222	29	251
	%	100,0%	100,0%	100,0%

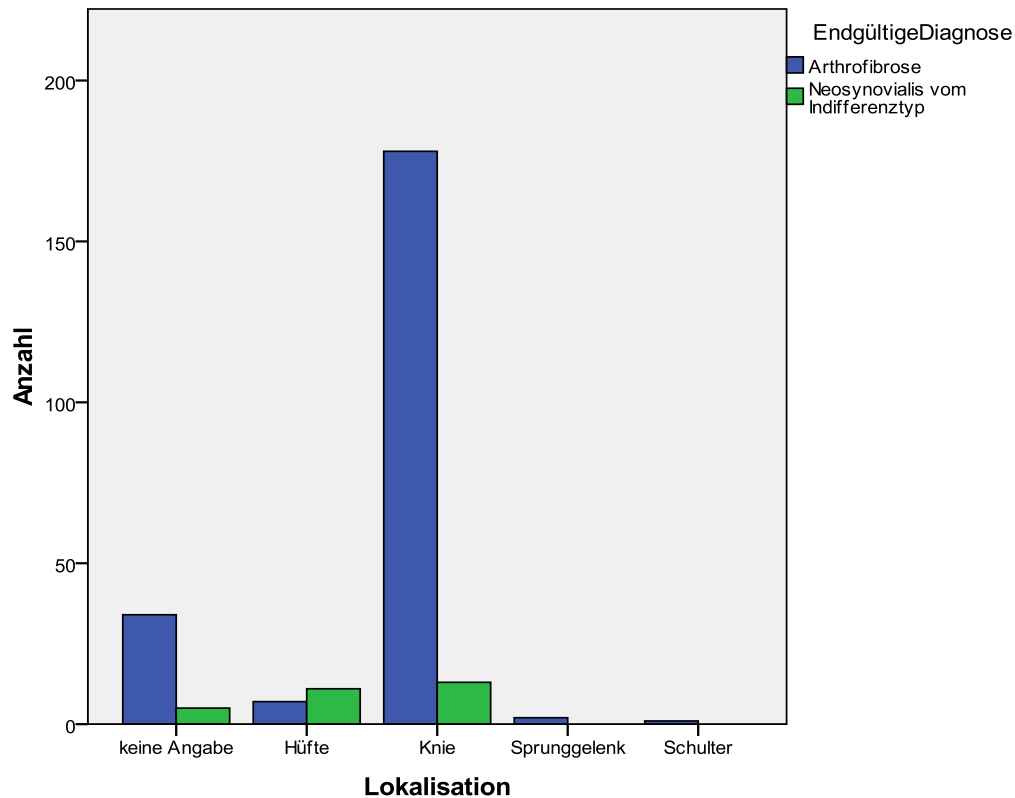


Abbildung 4.2: Gelenklokalisierung der entnommenen Gewebeproben

4.2 Arthrofibrose nach endoprothetischen Revisionseingriffen

Von den 222 Gewebeproben mit der Diagnose Arthrofibrose handelte es sich in 86% der Fälle (n=191) um Neosynovialmembran, gewonnen aus endoprothetischen Revisionseingriffen. In 9% der Fälle (n=20) handelte es sich um Synovialmembran, gewonnen aus Revisionseingriffen nach gelenkerhaltenden Operationen. In 5% der Fälle (n=11) wurden keine weiteren Angaben zur Art des eingesendeten Synovialgewebes außer der klinischen Diagnose Arthrofibrose gemacht. Bei den eingesandeten Gewebeproben der Neosynovialis vom Indifferenztyp handelte es sich definitionsgemäß um Neosynovialis aus endoprothetischen Revisionseingriffen (Abbildung 4.3).

Der Unterschied bezüglich des Arthrofibrosegrades nach endoprothetischen Revisionsoperationen aufgrund einer Arthrofibrose war im Vergleich zum Arthrofibrosegrad nach nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrosen signifikant ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). Das histopathologische Muster der endoprothesen- und nicht-endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose stellen sich jedoch gleich dar, eine klare Trennung ist nicht möglich.

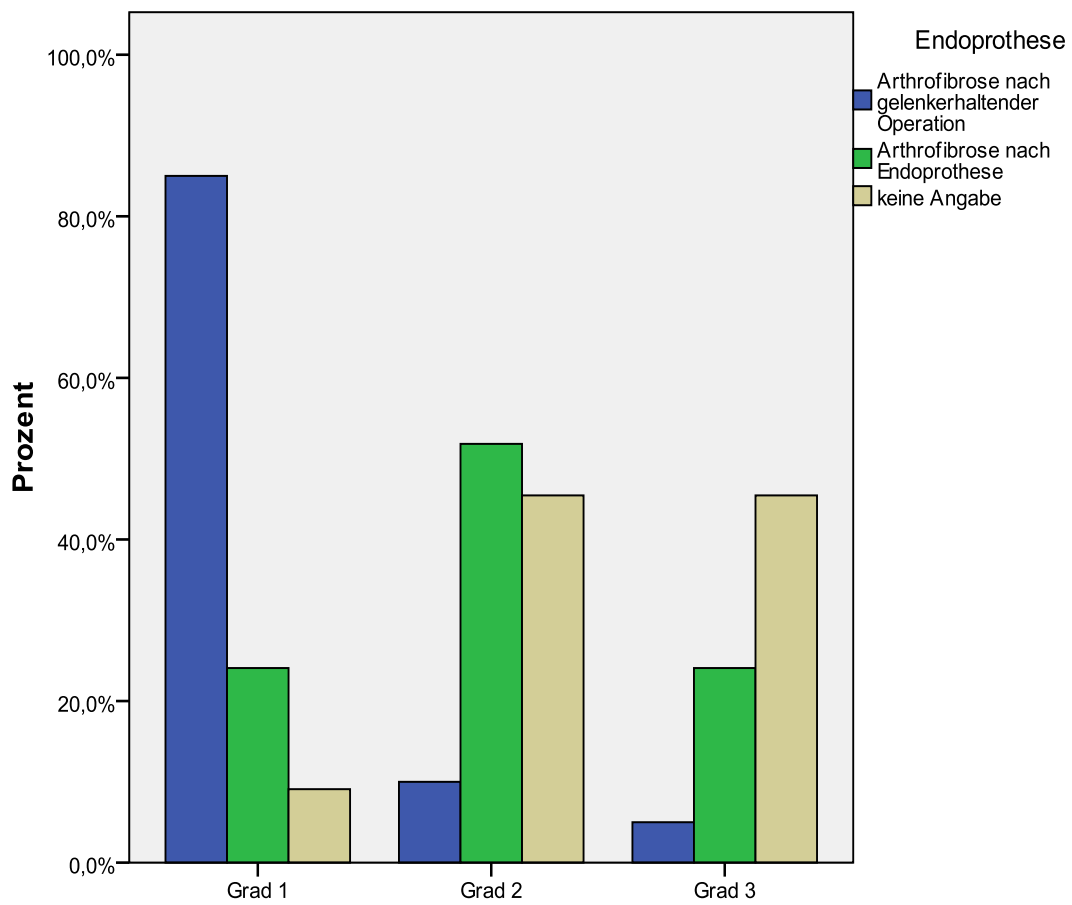


Abbildung 4.3: Arthrofibrose nach gelenkerhaltenden und endoprothetischen Revisionseingriffen

4.3 Histopathologischer Nachweis von Abriebpartikeln in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

In 38 (17,17%) Fällen konnten Abriebpartikel im Arthrofibrosekollektiv (n=222) nachgewiesen werden. Dabei war in 24 Fällen (10,8%) wenig Abrieb nachweisbar und in 14 Fällen (6,3%) viel Abrieb nachweisbar.

- Bei Arthrofibrose Grad 1 (n=64) konnte in 9,4% (n=6) wenig und in 4,7% (n=3) viel Abrieb nachgewiesen werden.
- Bei Arthrofibrose Grad 2 (n=106) konnte in 11,3% (n=12) wenig und in 9,4% (n=10) viel Abrieb nachgewiesen werden.
- Bei Arthrofibrose Grad 3 (n=52) konnte in 11,5% (n=6) wenig und in 1,9% (n=1) viel Abrieb nachgewiesen werden.
- Im Vergleichs-Kollektiv (n=29) konnte in 25% (n=8) wenig Abrieb nachgewiesen werden (Abbildung 4.4).

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nachweis von Abrieb und dem Arthrofibrosegrad im Chi-Quadrat-Test ($p > 0,05$). Ebenfalls kein signifikanter Unterschied bestand im Nachweis von Abriebpartikel zwischen der Diagnose Arthrofibrose und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test, Exakter Test nach Fisher).

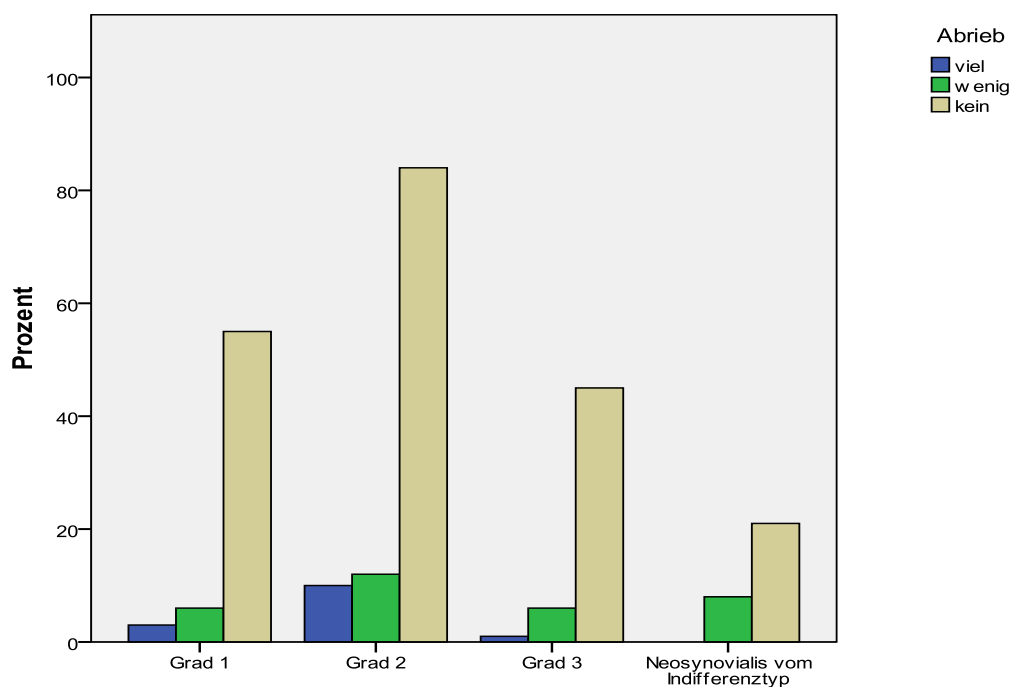


Abbildung 4.4: Abriebpartikel im Arthrofibrosekollektiv und Neosynovialis vom Indifferenztyp

4.4 Histopathologische Beurteilung der Entzündungsreaktion in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

Im Arthrofibrosekollektiv (n=222) fand sich in 28,4% (n=63) kein Hinweis auf eine entzündliche Infiltration, in 61,7% (n=137) eine geringgradige entzündliche Infiltration und 9,9% (n=22) eine mittelgradige entzündliche Infiltration. Im Vergleichs-Kollektiv fand sich in 17,2% (n=5) kein Hinweis auf eine entzündliche Infiltration, in 65,5% (n=19) eine geringgradige entzündliche Infiltration und 17,2% (n=5) eine mittelgradige entzündliche Infiltration. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Entzündungsgrad im Vergleich des Arthrofibroskollektives mit der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test).

4.5 Histopathologische Beurteilung der Entzündungsreaktion entsprechend des Arthrofibrosegrades

Zwischen dem Entzündungsmaß und dem Arthrofibrosegrad konnte eine positive Korrelation nachgewiesen werden ($p < 0,001$ zweiseitig, Spearman-Rho, Korrelationskoeffizient 0,361).

Bei den Patienten mit Arthrofibrose fand sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Arthrofibrosegrades mit dem Entzündungsmaß ($p < 0,01$, Chi-Quadrat-Test). So fand sich bei Grad 1 in 56,3% (n=36) keine entzündliche Infiltration, in 35,9% (n=23) eine geringgradige entzündliche Infiltration und in 7,8% (n=5) eine mittelgradige entzündliche Infiltration. Bei Grad 2 fand sich in 20,8% (n=22) keine entzündliche Infiltration, in 71,7% (n=76) eine geringgradige entzündliche Infiltration und in 7,5% (n=8) eine mittelgradige entzündliche Infiltration. Bei Grad 3 fand sich in 9,6% (n=5) keine entzündliche Infiltration, in 73,1% (n=38) eine geringgradige entzündliche Infiltration und in 17,3% (n=9) eine mittelgradige entzündliche Infiltration. So lässt sich zusammenfassend festhalten, dass mit steigendem Arthrofibrosegrad häufiger eine höhere entzündliche Infiltration vorliegt (Tabelle 4.2, Abbildung 4.5).

Tabelle 4.2: Arthrofibrosegrad und entzündliche Infiltration

Entzündliche Infiltration		Arthrofibrose			Gesamt
		Grad 1	Grad 2	Grad 3	
keine	Anzahl	36	22	5	63
	%	56,3%	20,8%	9,6%	28,4%
gering	Anzahl	23	76	38	137
	%	35,9%	71,7%	73,1%	61,7%
mittel	Anzahl	5	8	9	22
	%	7,8%	7,5%	17,3%	9,9%
Gesamt	Anzahl	64	106	52	222
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

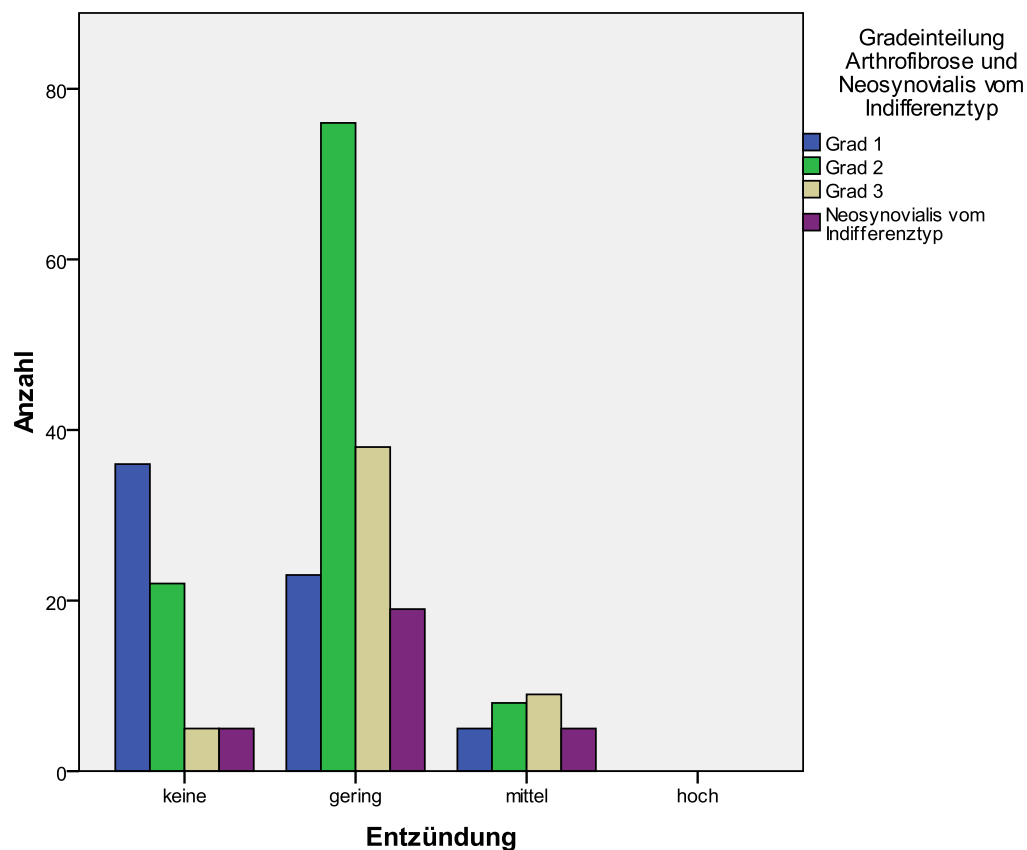


Abbildung 4.5: Entzündungsausmaß in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

4.6 Quantitative Verteilung der Arthrofibrosegrade (Fibroblastenzellularität) im Arthrofibrosekollektiv und Neosynovialis vom Indifferenztyp

Die Zelldichte bei histologisch gesicherter Arthrofibrose (n=222) verteilte sich auf Arthrofibrosegrad Grad 1 mit geringer Zellularität der Fibroblasten (28,8%, n=64), Arthrofibrosegrad Grad 2 mit mittlerer Zellularität der Fibroblasten (47,7%, n=106) und Arthrofibrosegrad Grad 3 mit hoher Zellularität der Fibroblasten (23,4%, n=52). Die Neosynovialis vom Indifferenztyp wies in 34,5% der Fälle (n=10) eine normale Fibroblastenzellularität, in 48,3% der Fälle (n=14) eine geringe Fibroblastenzellularität und in 17,2% der Fälle (n=5) eine mittlere Fibroblastenzellularität auf. Eine hohe Zellularität an Fibroblasten fand sich in der Neosynovialis vom Indifferenztyp nicht (Abbildung 4.6).

Der Unterschied der Fibroblastenzellularität der Neosynovialis vom Indifferenztyp (n=29) gegenüber der Diagnose Arthrofibrose (n=222) war höchst signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Betrachtete man nun die einzelnen Arthrofibrosegrade und untersuchte den semiquantitativen Unterschied der Fibroblastenzellularität, so ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Grad 1 und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,05$ Mann-Whitney-U-Test). Ein hoch signifikanter Unterschied in der Fibroblastenzellularität zeigte sich jeweils im Vergleich zwischen der Neosynovialis vom Indifferenztyp mit Grad 2 und Grad 3 ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Fasste man Arthrofibrose Grad 2 und Grad 3 zusammen, d.h. betrachtete man die Gewebe mit mittlerer und hoher Fibroblastenzellularität zur sicheren Diagnosefindung, so konnte mit einem hohen Sicherheitsgrad die Diagnose Arthrofibrose gestellt werden (Sensitivität 0,7117, positiver prädiktiver Wert 0,9693, Spezifität 0,8276, negativer prädiktiver Wert 0,2727). Sensitivität bedeutete die Anzahl der richtig erkannten Patienten mit der Diagnose Arthrofibrose. Spezifität bedeutete die Anzahl der richtig erkannten Patienten mit Neosynovialis vom Indifferenztyp.

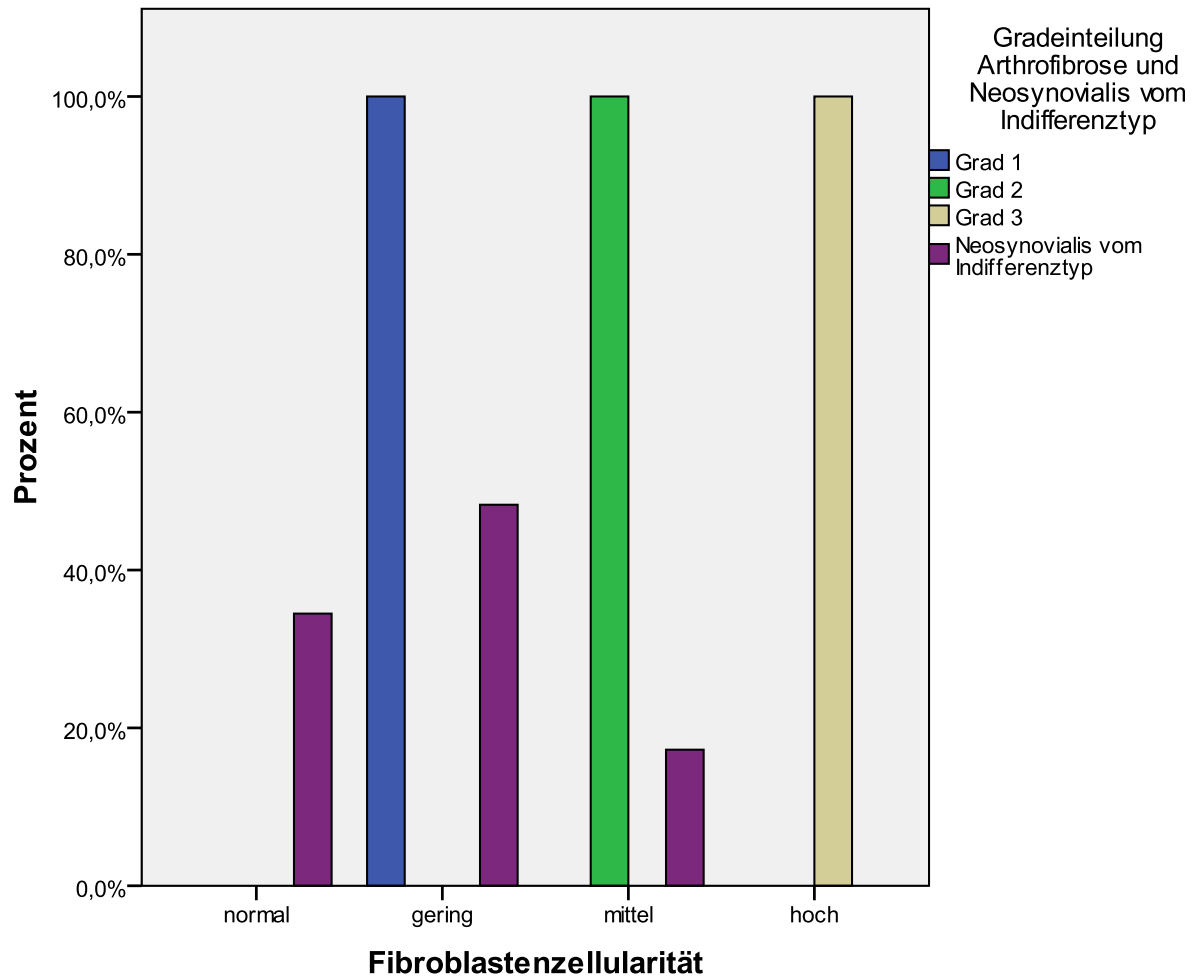


Abbildung 4.6: Vergleich der Fibroblastenzellularität zwischen Arthrofibrosegrad und Neosynovialis vom Indifferenztyp

4.7 Auswertung der immunhistochemischen Beta-Catenin-Färbung ausgesuchter Fälle

4.7.1 Patientenkollektiv

Es wurde jeweils in 10 Fällen mit Arthrofibrose Grad 1, Grad 2 und Grad 3, sowie in 15 Fällen der Neosynovialis vom Indifferenztyp und 8 Fällen einer histologisch gesicherten Fibromatose eine immunhistochemische Beta-Catenin-Färbung durchgeführt.

Das mittlere Alter der 30 Patienten mit der Diagnose Arthrofibrose betrug zum Untersuchungszeitpunkt 62,83 Jahre (38 bis 80 Jahre, Standardabweichung 10,048 Jahre), der Median lag bei 64,5 Jahren (unteres Quartil 59,08 Jahre, oberes Quartil 66,59 Jahre). Davon waren 60% (n=18) der Patienten weiblich und 40% (n=12) männlich.

In 80% (n=24) der Fälle wurde Neosynovialis aus dem Kniegelenk betrachtet, in 3,1% (n=1) war die Entnahmestelle das Hüftgelenk und in 16,7% (n=5) wurde keine Angabe zur Entnahmestelle gemacht.

Das mittlere Alter der 15 Patienten mit der Diagnose Neosynovialis vom Indifferenztyp betrug zum Untersuchungszeitpunkt 66,8 Jahre (38 bis 75 Jahre, Standardabweichung 10,185 Jahre), der Median lag bei 71 Jahren (unteres Quartil 61,16 Jahre, oberes Quartil 72,44 Jahre). Davon waren 60% (n=9) der Patienten weiblich und 40% (n=6) männlich. In 46,7% (n=7) der Fälle wurde Neosynovialis aus dem Kniegelenk betrachtet, in 26,7% (n=4) war die Entnahmestelle das Hüftgelenk und in 26,7% (n=4) wurde keine Angabe zur Entnahmestelle gemacht.

Das mittlere Alter der 8 Patienten mit der Diagnose Fibromatose betrug zum Untersuchungszeitpunkt 53 Jahre (26 bis 76 Jahre, Standardabweichung 16,440 Jahre), der Median lag bei 53,5 Jahren (unteres Quartil 39,26 Jahre, oberes Quartil 66,74 Jahre). Davon waren 25% (n=2) der Patienten weiblich und 75% (n=6) männlich. In 50% (n=4) der Fälle war die eingesandte Probe Gewebe aus der Palmarfascie, in 25% (n=2) war die eingesandte Probe Gewebe aus der Digitalfascie DV, in jeweils einem Fall (12,5%) war die eingesandte Probe Gewebe aus der Plantarfascie und Gewebe aus einer cervikalen Fibromatose.

4.7.2 Beschreibung des zytologischen Verteilungsmusters von Beta-Catenin in der Arthrofibrose

Fibroblasten: In der immunhistochemischen Analyse stellte sich eine Beta-Catenin-Positivität der Fibroblasten dar. Die Beta-Catenin-Positivität war zytoplasmatisch, mit perinukleärer Akzentuierung. Die Beta-Catenin positiven Fibroblasten zeichneten sich durch ausgeprägt dendritisch verzweigte Zytoplasmen aus, die zytoplasmatische Reaktivität war in den kernnahen und kernfernen Zytoplasmaabschnitten nachweisbar. Eine Lokalisation im Zellkern oder in der Zellmembran lag nicht vor. Eine unterschiedliche Intensität in den unterschiedlichen histopathologischen Arthrofibrosegraden war nicht eindeutig erkennbar, Grad 3 Arthrofibrosen zeigten mehrheitlich eine intensivere Beta-Catenin-Positivität der Fibroblasten.

Endothelzellen: Die intensivste zytoplasmatische Reaktivität war in Endothelien nachweisbar. Die Reaktivität in den Fibroblasten war vergleichsweise zu den Endothelien geringer.

4.7.3 Vergleich der Unterschiede des Arthrofibrosegrades und Neosynovialis vom Indifferenztyp bezüglich Beta-Catenin positiver Fibroblasten pro HPF (0,307 mm²)

Zwischen dem Arthrofibrosegrad und der Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten / HPF konnte eine hohe positive Korrelation nachgewiesen werden ($p < 0,001$ zweiseitig, Spearman-Rho, Korrelationskoeffizient 0,796).

In der quantitativen Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten ergab sich ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test) zwischen der Neosynovialis vom Indifferenztyp und der Arthrofibrose.

Es zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten / HPF ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test) und dem angegebenen Arthrofibrosegrad.

Im Einzelnen fand sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten / HPF der Arthrofibrose Grad 2 zur Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) und ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Grad 3 zur Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Nicht signifikant war der Unterschied der jeweiligen Zelldichte / HPF zwischen Grad 1 und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

Es wurde ein Grenzwert von 20 Beta-Catenin positiven Zellen / HPF definiert, ab welchem die histopathologische Diagnose einer Arthrofibrose mit einem hohen Sicherheitsgrad gestellt werden kann (Sensitivität 0,733, positiver prädiktiver Wert 0,9167, Spezifität 0,867, negativer prädiktiver Wert 0,6190) (Tabelle 4.3, Abbildung 4.7).

Tabelle 4.3: Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

Arthrofibrosegrad	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Minimum	Maximum	N
1	15,1	8,913	13,5	5	30	10
2	32,7	11,615	35	14	45	10
3	51,5	21,225	44	35	105	10
Arthrofibrose gesamt	33,1	20,853	35	5	105	30
Neosynovialis vom Indifferenztyp	13,333	7,537	14	3	26	15

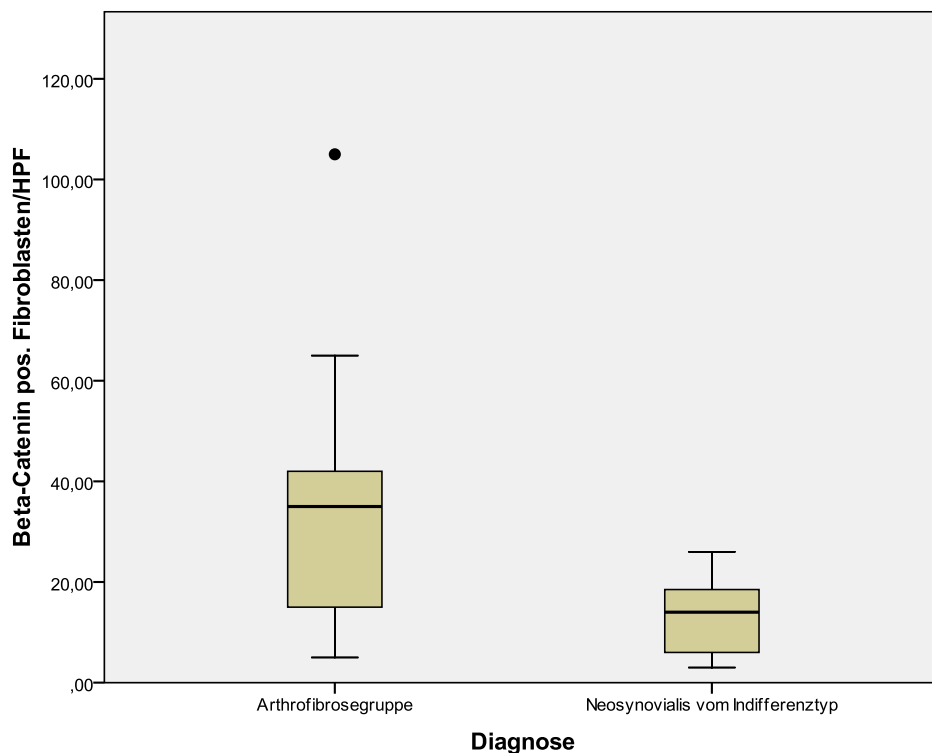


Abbildung 4.7: Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp

4.7.4 Vergleich der Unterschiede des Arthrofibrosegrades mit Fibromatosen bezüglich Beta-Catenin positiver Fibroblasten pro HPF (0,307 mm²)

In der quantitativen Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten fanden sich signifikant mehr Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF in der Fibromatosegruppe (n=8) im Vergleich zur Arthrofibrosegruppe (n=30) ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

In der Arthrofibrosegruppe betrug der Mittelwert der Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF 33,1 (5 bis 105 Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF, Standardabweichung 20,853) der Median lag bei 35 Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF. Bei der Fibromatose betrug der Mittelwert der Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF 94,5 (75 bis 112 Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF, Standardabweichung 11,42679) der Median lag bei 96 Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF (Abbildung 4.8).

Auch der Vergleich der Beta-Catenin positiven Fibroblasten / HPF mit der Arthrofibrose Grad 3, d.h. dem Arthrofibrosegrad mit der höchsten Beta-Cateinin-Expression der verschiedenen Arthrofibrosegrade, zeigte noch eine signifikant niedrigere Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten / HPF ($p < 0,005$, Mann-Whitney-U-Test).

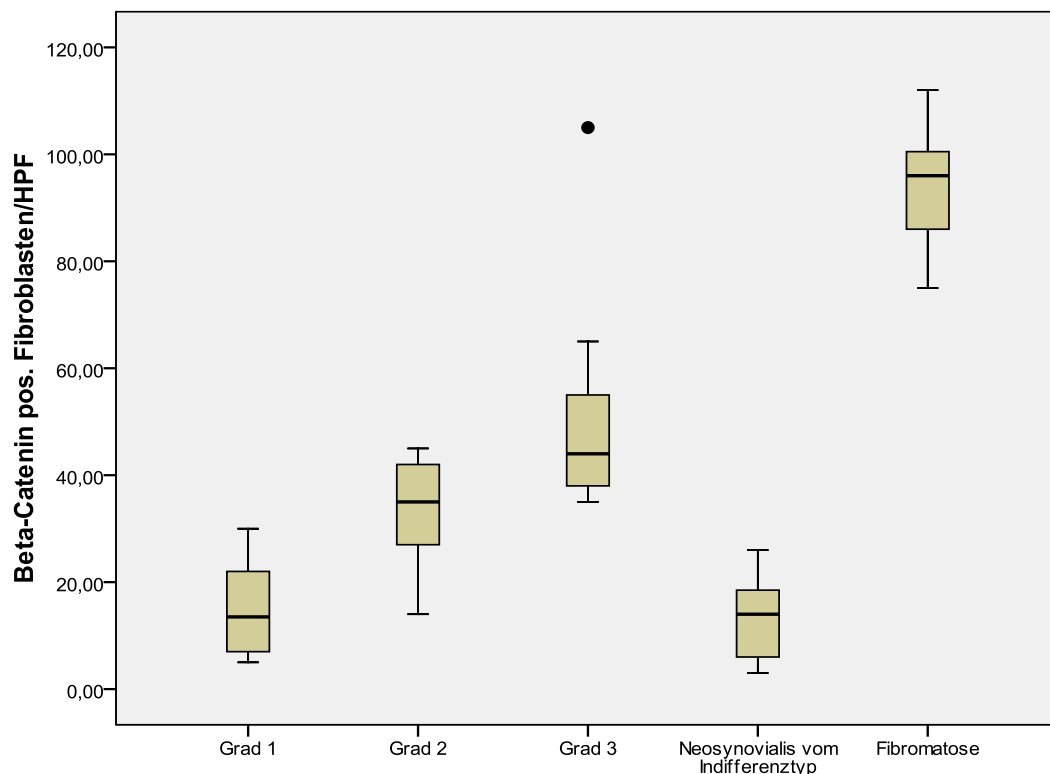


Abbildung 4.8: Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in den einzelnen Arthrofibrosegraden, der Neosynovialis vom Indifferenztyp und in Fibromatosen

5. Diskussion

5.1 Einleitung

In Deutschland werden jährlich nach den statistischen Angaben der im BVMed (Bundesverband Medizintechnologie e. V.) vertretenen Unternehmen rund 400.000 Endprothesen implantiert [BVMed-Medienservice 2011]. So wurden 2010 allein in Deutschland rund 210.000 künstliche Hüftgelenke und 165.000 künstliche Kniegelenke implantiert [BVMed-Medienservice 2011]. Die restlichen Endoprothesenimplantationen verteilen sich auf Schulter-, Ellenbogen-, Finger-, Sprung- und Großzehengrundgelenke [BVMed-Medienservice 2011].

Der Hauptgrund zur endoprothetischen Versorgung eines Gelenkes ist die Osteoarthrose. Dabei stellt die degenerative Arthrose die mit Abstand häufigste Arthroseform dar. Je nach Alter beträgt die Prävalenz bei 20jährigen etwa 9%, bei 34jährigen bis 17% und steigt bei über 65jährigen bis auf über 90% an [Theiler 2002]. Daneben finden sich sekundäre Arthroseformen z.B. nach Gelenktraumata oder aufgrund rheumatischer Grunderkrankungen.

Nach Ausschöpfen konservativer Therapien und gelenkerhaltender operativer Maßnahmen ist die endoprothetische Versorgung die letzte Möglichkeit, die Schmerzen zu beseitigen und damit die Lebensqualität wieder zu verbessern [Schaumberger et al 2011].

Die Standzeiten von Endprothesen haben in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zugenommen [Weissinger et al 2010, Morawietz et al 2004]. In einer Studie an 2.000 amerikanischen Patienten wurde eine Zehnjahresüberlebensrate bei Hüftendoprothesen von 94% ermittelt [Berry et al 2002]. In einer weiteren Studie an 206 Patienten mit zementfreien Hüftendoprothesen zeigte sich eine Zehnjahresüberlebensrate von 93,3% und eine Zwanzigjahresüberlebensrate von 84,5% [Weissinger et al 2010].

Die Standzeiten von Endprothesen haben zwar deutlich zugenommen, jedoch bleibt die Lebensdauer einer Endprothese nach wie vor begrenzt. So wurden im Jahr 2008 in Deutschland rund 23000 Hüftendoprothesen- und 10000 Knieendoprothesen-Revisionsoperationen mit vollständigem Wechsel oder Wechsel einzelner Komponenten durchgeführt [BQS-Bundesauswertung 2008].

5.1.1 Pathogenese des Implantatversagens

Die wichtigsten Entitäten des Implantatversagens bildet die „erweiterte Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran“ ab [Krenn et al 2011, Krenn et al 2009, Schaumburger et al 2011].

Im Falle einer Endoprothesenlockerung als Grund für das Implantatversagen bildet die „Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran“ die wichtigsten Entitäten ab [Morawietz et al 2004]. Man unterscheidet zunächst die aseptische Lockerung (abriebinduziert) von der septischen Lockerung durch eine Infektion. Entsprechend der Konsensusklassifikation teilt man die Neosynovialis bei einer Lockerung in 4 Gruppen ein [Morawietz et al 2004]. Im einzelnen sind dies die periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I), die periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II), die periprothetische Membran vom Mischtyp, d.h. mit Eigenschaften der Neosynovialis von abriebinduzierten und infektiösen Typ (Typ III) und die periprothetische Membran vom Indifferenztyp (Typ IV) [Morawietz et al 2004]. Diese Klassifikation wurde 2009 von Krenn et al um die Arthrofibrose, die allergische Abstoßung des Transplantates, und ossäre Pathologien als histologisch nachweisbare Entitäten des Implantatversagens erweitert [Krenn et al 2009].

5.1.2 Arthrofibrose

Die pathogenetischen Faktoren der Arthrofibrose sind aufgrund der vorliegenden Datenlage noch nicht ausreichend erforscht, weshalb auch die Therapie zurzeit noch hauptsächlich aus symptomatischen und weniger aus kausalen Ansätzen besteht [Zeichen et al 2000]. Es existieren mehrere Hypothesen zur Pathophysiologie, welche im Wesentlichen eine exzessive, intraartikuläre Neubildung von Bindegewebe im Rahmen reparativer Prozesse beschreiben [Zeichen et al 2000, Paulos et al 1987, Sprague et al 1982]. Neuere pathogenetische Konzepte zur Fibrogenese beschreiben eine Fibrose als „pathologische Wundheilung“ oder gestörtes „Remodeling“ [Zeichen et al 2008, Kolb et al 2001]. Jedoch gibt es für die Arthrofibrose nach wie vor keine definierten histologisch reproduzierbaren Klassifikationskriterien.

Klinisch kann man die Arthrofibrose als (schmerzhafte) Bewegungseinschränkung mit Gelenksteife aufgrund exzessiver Bindegewebevermehrung mit inflammatorischen Prozessen definieren [Gollwitzer et al 2006].

Eine Bewegungseinschränkung definiert sich dabei klinisch durch die im alltäglichen Gebrauch notwendigen Bewegungsausmaße. So ist beispielsweise eine Beugefähigkeit

im Kniegelenk von 83° zum Treppensteigen, 93° zum Aufstehen von einem Stuhl und 106° zum Schnüren eines Schuhs notwendig [Laubenthal et al 1972]. Eine Flexionseinschränkung von <90° und eine Extensionseinschränkung von >10° bedeuten somit eine Therapiebedürftigkeit im Kniegelenk. Dies deckt sich ebenso mit einer Großzahl der Angaben in der Literatur [Gollwitzer et al 2006, Esler et al 1999, Fox et al 1981, Lobenhoffer et al 1999].

5.2 Gelenk-Lokalisation der Arthrofibrose

Grundsätzlich kann die Arthrofibrose jedes Gelenk betreffen. Auffällig ist jedoch, dass die Arthrofibrose in der Literatur in den allermeisten Fällen für das Kniegelenk beschrieben ist [Bosch et al 1999, Unterhauser et al 2004, Gollwitzer et al 2006, Zeichen et al 2008]. Dies deckt sich gut mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. So handelte es sich bei den eingesandten Gewebeproben mit der Diagnose Arthrofibrose in 80,2% (n=178) um Synovialgewebe der Kniegelenkscapsel. Die restlichen Gelenklokalisationen verteilten sich auf Hüftgelenkscapsel, Sprunggelenkscapsel- und Schultergelenkscapselgewebe sowie Synovialgewebe ohne Angabe zur Lokalisation. Dabei entfiel der größte Anteil dieser Gruppe mit 77,3% (n=34) auf die Patientengruppe ohne Angabe zur Lokalisation.

Es fand sich ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Lokalisation Kniegelenk zu sonstigen Lokalisationen zwischen dem Arthrofibrosekollektiv und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test und $p < 0,001$, Exakter Test nach Fischer). Ein Pathogenese-Konzept könnte das hohe Bewegungsausmaß des Kniegelenkes sein, weshalb eine mechanische Dysbelastung im Kniegelenk häufiger zu einer Gewebeirritation und somit zu einer fibrösen Wundheilung führt.

5.3 Histopathologie der endoprothesen- und nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose

Es existierten bis dato ausschließlich klinische Kriterien [Bosch 1999, Lobenhoffer et al 1999, Gollwitzer et al 2006] und keine morphologischen und immunhistochemischen Kriterien für Diagnostik der Arthrofibrose. Bei charakteristischer Ausprägung der geweblichen Veränderungen (Grad 2 und Grad 3) ist erstmals die Diagnose einer Arthrofibrose histopathologisch / immunhistochemisch möglich. Diese Diagnose beruht auf charakteristischen zytologischen, histologischen und immunhistochemischen Befunden, welche semiquantitativ definiert sind.

In der histopathologischen Diagnostik ist ein 3-stufiges Graduierungsschema üblich. Dieses wurde entsprechend der Empfehlung nach Krenn et al 2008 für die Beurteilung der Arthrofibrose übernommen und orientiert sich an der fibroblastären Zellularität [Krenn et al 2008].

Es zeigte sich histopathologisch ein gleichförmiges Muster bei der endoprothesen-assoziierten und der nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose. Aus diesem Grund ist eine einheitliche Beurteilung aus histopathologischen Gründen zulässig. Eine klare Trennung dieser beiden Entitäten war nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die o.g. Kriterien sowohl für die endoprothesen-assoziierte, als auch für die nicht endoprothesen-assoziierte Arthrofibrose angewandt. Ohne klinische Angaben ist eine indirekte Unterscheidung z.B. durch Nachweis von Abriebpartikeln möglich.

Ähnliche histopathologische Eigenschaften zeigt die Neosynovialis vom Indifferenztyp nach Krenn et al 2009 [Krenn et al 2009]. Hier ist die Abgrenzung zur Arthrofibrose teilweise schwierig und klinische Informationen zur Diagnosesicherung unerlässlich [Krenn et al 2009]. Die Neosynovialis vom Indifferenztyp zeigt histopathologisch zellarmes, kollagenfaserreiches Bindegewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorliegen und Ausmaß der entzündlichen Infiltration und das Vorhandensein von Abriebpartikeln semiquantitativ untersucht.

5.3.1 Abriebpartikel in der Arthrofibrose im Vergleich zur Neosynovialis vom Indifferenztyp

In der Regel findet sich in der Neosynovialis vom Indifferenztyp entsprechend den Kriterien der Konsensusklassifikation kein Nachweis von Abriebpartikeln [Krenn et al 2009]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in 25% (n=8) der Fälle im Vergleichskollektiv mit Neosynovialis vom Indifferenztyp Abrieb nachgewiesen werden. In der Arthrofibrosegruppe konnte in 17,1% (n=38) Abriebmaterial nachgewiesen werden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich dem Vorkommen von Abrieb zwischen der Arthrofibrose und der Neosynovialis vom Indifferenztyp nachgewiesen werden ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test). Ebenfalls nicht signifikant war das Vorkommen von Abrieb im Vergleich innerhalb der einzelnen Arthrofibrosegrade ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test). Somit scheint das Vorhandensein von Abriebmaterial keinen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung und das Ausmaß der Arthrofibrose zu haben.

5.3.2 Entzündungsreaktion in der Arthrofibrose im Vergleich zur Neosynovialis vom Indifferenztyp

Von anderen fibrösen Erkrankungen, wie z.B. der Lungenfibrose, wird angenommen, dass wiederholte Entzündungsreaktionen im mikroskopischen Bereich von Gewebe zur Ausbildung einer Fibrose führen können [Selman et al 2001]. Dies ist jedoch nicht abschließend geklärt und wird nach wie vor kontrovers diskutiert. So gehen neuere pathologische Konzepte der Fibrogenese von einer „pathologischen Wundheilung“ oder gestörtem „Remodeling“ aus [Selman et al 2001, Selman et al 2002, Kolb et al 2003]. Des Weiteren kann es zum Ausbilden von fibrösen Erkrankungen kommen, bei denen eine entzündliche Reaktion völlig fehlt [Selman et al 2002]. So konnte Adamson et al bereits 1988 am Mausmodell zeigen, dass es zur Ausbildung einer Lungenfibrose nach Hyperoxidation von Mäuselungen kommen kann, trotz völligem Fehlen einer Entzündungsreaktion [Adamson et al 1988].

Für die Arthrofibrose ist die Datenlage begrenzt. Es gibt mehrere Arbeiten mit kleinen Fallzahlen, in denen eine Entzündungsreaktion als Auslöser für eine Arthrofibrose gesehen wird. In einer immunhistochemischen Arbeit von Bosch et al 2001 an 18 Patienten mit Arthrofibrose nach Kniegelenk Eingriffen wurde die T-Zell vermittelte Immunantwort als zentraler Auslöser der Arthrofibroseentwicklung gesehen, und im

Arthrofibrosegewebe eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen gefunden, welche jedoch mit der Zeit nach zurückliegendem Trauma abnahm [Bosch et al 2001].

In einer weiteren Arbeit von Bosch et al 1999 an 18 Patienten mit Arthrofibrose des Kniegelenkes zeigte sich eine variabel ausgebildete lymphozytäre, entzündliche Infiltration durch CD3-positive Lymphozyten sowie ein erhöhter Anteil proliferierender, Ki-67-positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollpräparaten aus makroskopisch unauffälligem Kniegelenkscapselgewebe. Bei der Arthrofibrose fand sich eine synoviale Hyperplasie und eine chronische, inflammatorische Reaktion. Eine vermehrte Vaskularität, vermehrte Proliferationstendenz der Zellen sowie lymphoplasmazelluläre Infiltrate und eine lokale, perivaskuläre Fibrosierung waren in den Gewebeproben nachweisbar. Für Bosch et al 1999 waren diese histomorphologischen Befunde Hinweis auf eine chronische inflammatorische Reaktion [Bosch et al 1999].

Bei der Untersuchung der Gewebe auf das Vorliegen und Ausmaß einer entzündlichen Infiltration zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausmaß der entzündlichen Infiltration im Vergleich des Arthrofibroskollektives mit der Neosynovialis vom Indifferenztyp bestand ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test). Das heißt, in der Neosynovialis vom Indifferenztyp lässt sich ebenfalls, genau wie in der Arthrofibrose, eine variable Entzündungsreaktion nachweisen. Damit ist das Vorhandensein und die Ausprägung des Entzündungsausmaßes kein gutes diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung einer Arthrofibrose von der Neosynovialis vom Indifferenztyp.

Betrachtet man jedoch das Entzündungsausmaß innerhalb der Arthrofibrose, so zeigt sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$ zweiseitig, Spearman-Rho, Korrelationskoeffizient 0,361). Der Unterschied in der Ausprägung des Entzündungsausmaßes zwischen den einzelnen Arthrofibrosegraden war signifikant ($p < 0,01$, Chi-Quadrat-Test). So lässt sich zusammenfassend sagen, dass mit steigendem Arthrofibrosegrad häufiger und ausgeprägter eine entzündliche Infiltration auftritt.

5.4 Zellularität der Fibroblasten in der Arthrofibrose

Definitionsgemäß zeichnet sich eine fibröse Erkrankung, unabhängig von ihrer Genese, durch eine ausgeprägte Bindegewebsvermehrung mit Abbau extrazellulärer Matrix und Fibroblastenproliferation aus [Zeichen et al 2008, Selman et al 2001]. Somit ist es naheliegend, dass das wichtigste diagnostische Kriterium zur Abgrenzung einer Arthrofibrose von der Neosynovialis vom Indifferenztyp die Zellularität der Fibroblasten ist. Der semiquantitative Unterschied in der Fibroblastenzellularität der Neosynovialis vom Indifferenztyp (n=29) gegenüber der Diagnose Arthrofibrose (n=222) war höchst signifikant ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test).

Innerhalb der Arthrofibrose findet sich eine gewisse Varianz in der Zellularität der Fibroblasten. Diesem Umstand wurde durch die Empfehlung nach Krenn et al 2008 zur Anwendung eines 3-stufigen Graduierungsschemas für die Beurteilung der Arthrofibrose Rechnung getragen. Das Graduierungsschema wird gemessen an der fibroblastären Zelldichte [Krenn et al 2008]. In der bisherigen Literatur wurde lediglich die erhöhte Fibroblastenaktivität im Sinne einer Fibroblastenproliferation in der Arthrofibrose beschrieben, quantifiziert wurde diese jedoch bisher nicht [Bosch et al 2002, Zeichen et al 2000, Zeichen et al 2008, Gollwitzer et al 2006, Krenn et al 2009, Krenn et al 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals semiquantitativ die Zellularität der Fibroblasten in der Arthrofibrose ausgewertet. Von den 222 Patienten mit Arthrofibrose ergaben sich in 28,8% (n=64) Grad 1, in 47,7% (n=106) Grad 2 und in 23,4% (n=52) Grad 3.

In einer Arbeit von Unterhauser et al 2004 wurden erstmals Myofibroblasten bzw. die erhöhte Zelldichte von Myofibroblasten als Substrat der Arthrofibrose nach *vorderer* Kreuzbandplastik immunhistochemisch definiert. Möglicherweise ist die in dieser Arbeit nachgewiesene nur leichtgradig erhöhte Zellularität der Fibroblasten für eine Arthrofibrose nach *vorderer* Kreuzbandplastik typisch, und sehr hohe Zelldichten sind nur in der endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit war der Unterschied des Arthrofibrosegrades, der sich an der Fibroblastenzellularität orientiert, signifikant zwischen der endoprothesen- und nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrosegruppe ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose häufiger eine mittel- bis hochgradige Fibroblastenzellularität vorliegt, als bei der nicht endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose.

In einer bildgebenden (CT) und histopathologischen Analyse [Freemann et al 2010] wurden umschriebene reaktive Ossifikationen beschrieben (Periprothetische Ossifikation). In allen Fällen dieser Untersuchung waren keine reaktiven Geflechtknochen Proliferate nachweisbar. Diese Diskrepanz ist möglicherweise dadurch zu interpretieren, dass die periprothetische Ossifikation ein eigenständiges Erkrankungsbild darstellt und ein variabler Bezug zur Arthrofibrose besteht.

Bei der Arthrofibrose Grad 1, d.h. der Abstand zwischen zwei Fibroblasten beträgt etwa 2 Zelllängen, konnte bereits ein signifikanter Unterschied zwischen Grad 1 und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt werden. Ein hoch signifikanter Unterschied in der Fibroblastenzellularität zeigte sich jeweils im Vergleich zwischen der Neosynovialis vom Indifferenztyp mit Grad 2 und Grad 3, d.h. der Abstand zwischen zwei Fibroblasten beträgt weniger als zwei Zelllängen bzw. die Fibroblasten können sich teilweise überlappen ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Fasste man Arthrofibrose Grad 2 und Grad 3 zusammen, d.h. man definiert die Gewebe mit mittlerer und hoher Fibroblastenzellularität zur sicheren Diagnosefindung, so konnte man mit einem hohen Sicherheitsgrad die Diagnose Arthrofibrose histopathologisch stellen (Sensitivität 0,7117, Spezifität 0,8276).

5.5 Beta-Catenin-Expression in der Arthrofibrose

Catenine sind eine Gruppe von Proteinen, die erstmals als Verbindungsproteine zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett bei Zell-Zellverbindungen beschrieben wurden [Alberts et al 2002].

Es sind zwei Funktionen von Beta-Catenin bekannt. Beta-Catenin bildet zusammen mit Alpha-Catenin, P120-Catenin und E-Catherin die sogenannten Adherens junctions [A. Hartsock, W.J. Nelson 2008]. Dabei liegt Beta-Catenin zusammen mit Alpha-Catenin und P120-Catenin in dem intrazellulären Anteil der Adherens junctions vor. Adherens junctions übernehmen verschiedene Funktionen bei der Initiierung und Stabilisierung der Zell-Zell Adhäsion, Regulierung des Actinoskeletts, intrazellulärer Signalweiterleitung und Transkriptionsregulierung [A. Hartsock, W.J. Nelson 2008].

Diese Funktion liegt im Zusammenhang mit einer membranösen und zytoplasmatischen Lokalisation von Beta-Catenin vor.

Des Weiteren spielt Beta-Catenin bei der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges eine Schlüsselrolle, welche mit einer intranukleären Lokalisation verbunden ist. Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Proliferation, Regulierung und embryonalen Entwicklung von Zellen [Kim et al 2011, Mac Donald et al 2009]. Neben dem klassischen Beta-Catenin abhängigen kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg findet sich eine Vielzahl von Beta-Catenin unabhängigen Nebenachsen, die unterschiedliche zelluläre Funktionen regulieren [Najdi et al 2011].

Störungen des Beta-Catenin / Wnt-Signaltransduktionsweges sind bei vielen menschlichen Tumoren nachgewiesen worden. So weiß man vom colorektalen Karzinom, dass es hier häufig zu einer intrazellulären Anreicherung von Beta-Catenin kommt. In 80-85 % aller spontan auftretenden colorektalen Karzinome findet sich eine Mutationen im APC (Adenomatous-polyposis-coli) Tumorsuppressorgen [Kinzler, Vogelstein 1996]. Die tumorsuppressive Wirkung von APC beruht darauf, dass APC die Untereinheit des Degradationskomplexes ist, der im Normalfall Beta-Catenin abbaut und daher ein fester Bestandteil des Wnt-Signalweges ist [Smits et al. 1999, Friedrich und Kullmann 2003]. In colorektalen Tumoren, die keinen Funktionsverlust von APC zeigen, werden häufig Punktmutationen in Beta-Catenin gefunden [Morin et al., 1997]. Dies verdeutlicht die Schlüsselfunktion von Beta-Catenin an der Regulation von Zellteilungsvorgängen.

Der Beta-Catenin / Wnt-Signaltransduktionsweg spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der physiologischen Wundheilung [Bowley et al 2007]. Man unterscheidet 4 Phasen der Wundheilung. Zunächst kommt es in den ersten Stunden nach einer Verletzung zur sog. Exsudativen Phase, hier wird der Wundschorf gebildet und es kommt zum typischen Wundödem. Daran schließt sich die resorptive Phase an (ca.1.-3 Tag). Hier wandern Makrophagen in das Wundgewebe ein, phagozytieren die Blutkoagel, das basale Epithel beginnt sich zu organisieren und es bildet sich Granulationsgewebe aus. Es folgt die Proliferationsphase (4.-7. Tag), oder die sog. anabole Reparatur. Fibroblasten bilden Kollagen und bauen so die Wunde aus. Während der Proliferationsphase konnten erhöhte Beta-Catenin Level in mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden [Cheon et al 2005]. Es wird davon ausgegangen, dass Beta-

Catenin an der Regulation der Prolifertionsrate, Motilität und Invasivität der Fibroblasten beteiligt ist [Cheon et al 2002]. Dabei scheint es auch insbesondere zu Interaktionen zwischen Beta-Catenin und TGF- β zu kommen [Cheon et al 2004]. Ab ca. dem 8. Tag folgt die Reparationsphase und endgültiges Narbengewebe entsteht.

In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen erhöhter zytoplasmatischer und nukleärer Beta-Catenin Expression und der Ausbildung von fibroproliferativen Erkrankungen zeigen [Bowley et al 2007, Degreeef et al 2009, Montgomery et al 2005, Ferenc et al 2009, Kim et al 2011]. So fand sich beispielsweise in einer immunhistochemischen Studie von Ferenc et al 2009 eine signifikant erhöhte Akkumulation von Beta-Catenin in 15 extra-abdominellen und 20 abdominellen Desmoid Tumoren [Ferenc et al 2009]. In einer weiteren Studie von Kim et al 2011 wurde anhand einer Bleomycin induzierten Lungenfibrose am Mausmodell eine signifikant herabgesetzte Fibrosierung des untersuchten Gewebes nach Inhibieren des Wnt- / Beta-Catenin Transduktionsweges mittels intratrachealer Einbringung von Beta-Catenin siRNA festgestellt. Dabei konnte eine Herabsetzung der Metalloproteinase- und TGF- β -Expression nachgewiesen werden [Kim et al 2011]. Auch für den Morbus Dupuytren ist eine erhöhte Beta-Catenin Expression beschrieben [Degreeef et al 2009, Montgomery et al 2005, Montgomery et al 2001].

Die Beta-Catenin Expression ist bisher noch nicht für die Arthrofibrose beschrieben und stellt einen neuen Befund dar.

In der immunhistochemischen Analyse stellte sich eine zytoplasmatische, teils perinukleäre Beta-Catenin Expression in den Fibroblasten dar. Eine eindeutig unterschiedliche Intensität in den unterschiedlichen histopathologischen Arthrofibrosegraden war nicht eindeutig erkennbar. Eine nukleäre Expression, wie sie in den Fibromatosen nachgewiesen wurde, konnte in den Fibroblasten der Arthrofibrose nicht nachgewiesen werden.

Die zytoplasmatische Reaktivität in den Fibroblasten war im Vergleich mit den Endothelzellen geringer. Eine zytoplasmatische Reaktivität von Beta-Catenin in Endothelien ist in vivo und in vitro beschrieben [Pala et al 2011].

Mechanische Dysbelastung von Fibroblasten kann Ursache vieler pathologischer Veränderungen wie beispielsweise pathologischer Wundheilung, bis hin zum Auslösen fibroproliferativer Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Dupuytren sein [Bisson et al 2009]. Dabei wird die Differenzierung und Proliferation von Myofibroblasten durch verschiedene Zytokine, wie z.B. Adhäsionsmoleküle, Komponenten der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren wie TGF- β , durch die Induktion der Beta-Catenin Expression in Myofibroblasten stimuliert [Michou et al 2011].

Somit könnten die Beta-Catenin positiven Fibroblasten in der Arthrofibrose als Ausdruck einer mechanischen Dysbelastung von Fibroblasten interpretiert werden. Diese Annahme wird durch den klinischen Befund unterstützt, dass Arthrofibrose gehäuft bei Implantatdyslokalisationen auftritt [Ghandi et al 2006], welche mit einer chronischen, mechanischen Belastung des periimplantären Gewebes verbunden sind.

5.6 Quantitative Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten in der Arthrofibrose

In der quantitativen Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten ergab sich ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) zwischen der Arthrofibrose und der Neosynovialis vom Indifferenztyp. Es zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahl / HPF und dem angegebenen Arthrofibrosegrad ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test). Im Einzelnen fand sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten / HPF der Arthrofibrose Grad 2 zur Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) und ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Grad 3 zur Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Nicht signifikant war der Unterschied der jeweiligen Zelldichte / HPF zwischen Grad 1 und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

Zusammengefasst zeigten sich also mit steigendem Arthrofibrosegrad signifikant mehr Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF ($p < 0,001$ zweiseitig, Spearman-Rho, Korrelationskoeffizient 0,796). Dieser Unterschied kann jedoch auch durch die erhöhte Zellularität der Fibroblasten bedingt sein, so dass es hier evtl. zu einem relativen Anstieg von Beta-Catenin positiven Fibroblasten aufgrund der höheren Fibroblastendichte mit steigendem Arthrofibrosegrad kommt.

Im Vergleich der Beta-Catenin positiven Fibroblasten der Arthrofibrose mit Fibromatosen zeigten sich jedoch signifikant mehr Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF in der Fibromatosegruppe ($n=8$) als in der Arthrofibrosegruppe ($n=30$) ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Auch der Vergleich der Beta-Catenin positiven Fibroblasten pro HPF im Vergleich mit der Arthrofibrose Grad 3, mit der höchsten Beta-Catenin-Expression der verschiedenen Arthrofibrosegrade, mit Fibromatosen zeigte noch eine signifikant niedrigere Anzahl Beta-Catenin positiver Fibroblasten pro HPF ($p < 0,005$, Mann-Whitney-U-Test). Dieser Befund ist plausibel, da es sich bei Fibromatosen um tumorähnliche Erkrankungen mit lokal destruktivem Wachstum handelt, somit ist von einer wesentlich höheren Zellularität auszugehen.

Es wurde versucht, analog zu bereits anerkannten Scoring-Systemen, einen Grenzwert zu definieren, ab wie vielen Beta-Catenin positiven Fibroblasten pro HPF die Diagnose Arthrofibrose mit einem hohem Sicherheitsgrad gestellt werden kann. So definierten Morawietz et al 2009 eine septische Endoprothesenlockerung in einer Studie mit 147 periprothetischen Membranen ab einem Grenzwert von 23 neutrophilen Granulozyten pro 10 HPF mit einer Sensitivität von 73% und Spezifität von 97% im Vergleich zur mikrobiologischen Diagnose und einer Sensitivität von 77% und Spezifität von 97% im Vergleich zur klinischen Diagnose [Morawietz et al 2009].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Grenzwert von 20 Beta-Catenin positiven Zellen pro HPF definiert. Hier kann die histopathologische Diagnose einer Arthrofibrose mit einem hohen Sicherheitgrad gestellt werden (Sensitivität 0,733, Spezifität 0,867).

Der Vorteil einer Quantifizierung von immunhistochemisch charakterisierten Fibroblasten gegenüber der semiquantitativen Beurteilung der Fibroblasten im HE-Schnittpräparat besteht in der eindeutigeren Identifikation der Fibroblasten und der Fibroblasten-Zytoplasmen. In der Beta-Catenin Immunhistochemie gelangen die Fibroblasten-Zytoplasmen eindeutig zur Darstellung, dies erleichtert die Abstandsbestimmung der Fibroblasten und gewährt dadurch eine höhere diagnostische Sicherheit.

Mögliche Grenzen dieses immunhistochemischen Scoring-Systems könnten in einer technisch bedingten Variabilität der Beta-Catenin Expression bestehen. Hier wäre die Lagerungszeit und Art der immunhistochemischen Präparate, Variationen verschiedener Protokolle und Fixations- bzw. Färbemethoden zu nennen [Zlobec et al 2007]. Jedoch konnten Zlobec et al zeigen, daß eine semiquantitative Auswertung immunhistochemischer Marker für das colorektale Karzinom eine höhere Aussagekraft zur Prognose und prädiktiven Einschätzung von kolorektalen Karzinomen hat als die einfache Einteilung in eine positive und negative immunhistochemische Reaktivität [Zlobec et al 2007].

In der orthopädischen, diagnostischen Pathologie existieren bislang wenige semiquantitative und immunhistochemisch-quantitative diagnostische Scoring-Systeme (Arthrose Graduierung nach Otte, Krenn Synovialitis Score, Morawietz CD15, Pessler Ki67) [Otte 1968, Krenn et al 2006, Morawietz et al 2009, Pessler et al 2008].

Durch diese Arbeit sind charakteristische Veränderungen der Arthrofibrose beschrieben und immunhistochemisch-quantitative Kriterien für die Diagnose einer Arthrofibrose definiert. Hierdurch ist erstmals ein histopathologischer Score mit hoher Sensitivität und Spezifität für die bislang nur durch klinische Kriterien definierte Arthrofibrose gegeben.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung zytologischer, histologischer / immunhistochemischer Charakteristika der Arthrofibrose und Festlegung quantitativer-immunhistochemischer Kriterien, welche die Diagnose der Arthrofibrose ermöglichen. Die Arthrofibrose ist klinisch gekennzeichnet als eine fibrosierende Erkrankung als Folgezustand eines operativen, zumeist endoprothetischen Eingriffes, welche zu einer Bewegungseinschränkung oder gar vollständiger Immobilisation führt. Bis dato existieren keine Kriterien für die histopathologische Diagnostik der Arthrofibrose, welche insbesondere aufgrund der klinisch nur unzureichenden Diagnosemöglichkeiten einen wesentlichen Beitrag in der Diagnose und Differentialdiagnose leisten könnten. Anhand eines Patientenkollektives von 262 Patienten mit der klinischen Diagnose Arthrofibrose bestätigte sich histopathologisch die Diagnose Arthrofibrose in 222 Fällen. In diesen 222 Fällen mit der histopathologischen Diagnose Arthrofibrose, wurden die charakteristischen Veränderungen der Arthrofibrose analysiert und semiquantitativ bewertet. Bewertet wurde neben den histopathologischen Veränderungen die Zellularität an Fibroblasten (Abstand der Fibroblasten zueinander). In der histopathologischen Diagnostik ist ein 3-stufiges Graduierungsschema üblich, dieses wurde für die Arthrofibrose übernommen: Definiert wurde eine Arthrofibrose Grad 1, bei einem Abstand von mehr als 2 Fibroblasten-Zelllängen zwischen 2 Fibroblasten, ein Grad 2 bei einem Abstand etwas weniger als 2 Zelllängen und Grad 3 bei einem Abstand etwas weniger als eine Zelllängen (Zytoplasmen und Zellkerne können in direktem Kontakt stehen). In der semiquantitativen Auswertung der Fibroblastenzellularität des Patientenkollektives von 222 Patienten mit Arthrofibrose ergaben sich in 28,8% (n=64) ein Grad 1, 47,7% (n=106) ein Grad 2 und in 23,4% (n=52) ein Grad 3. Das Vergleichs-Kollektiv setzte sich zusammen aus 29 Patienten mit periprothetischer Membran vom Indifferenztyp. Bei der Arthrofibrose Grad 1 konnte bereits ein signifikanter Unterschied zwischen Grad 1 und der Neosynovialis vom Indifferenztyp ($p < 0,05$) festgestellt werden. Ein hoch signifikanter Unterschied in der Fibroblastenzellularität zeigte sich jeweils im Vergleich zwischen der Neosynovialis vom Indifferenztyp mit Grad 2 und Grad 3 ($p < 0,001$). Fasst man Arthrofibrose Grad 2 und Grad 3 zusammen, so kann man mit einem hohen Sicherheitsgrad die Diagnose Arthrofibrose stellen (Sensitivität 0,7117, Spezifität 0,8276).

Bei Grad 2 und 3 der Arthrofibrose ist eine Abgrenzung von der Neosynovialis vom Indifferenztyp also eindeutig anhand der Fibroblastenzellularität möglich.

Da eine Beta-Catenin-Expression bei Fibromatosen, welche ebenfalls durch eine hohe Fibroblasten-Aktivierung gekennzeichnet sind, beschrieben ist, erfolgte eine immunhistochemische Analyse von 30 Arthrofibrose Fällen. Es wurden je 10 Fälle mit Arthrofibrose Grad 1, 2 und 3, sowie als Vergleichsgruppe 15 Fälle mit periprothetischer Membran vom Indifferenztyp und 8 Fälle mit einer Fibromatose untersucht. Immunhistochemisch zeigte sich eine zytoplasmatische Beta-Catenin-Expression in den Fibroblasten der Arthrofibrose, die Zytoplasmen zeigten eine auffällig starke dendritische Verzweigung. Eine nukleäre Expression, wie sie bei Fibromatosen vorliegt, konnte nicht nachgewiesen werden. In der semiquantitativen Auswertung der Beta-Catenin positiven Fibroblasten ergaben sich signifikant mehr Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF in der Arthrofibrose als in der Neosynovialis von Indifferenztyp ($p < 0,001$), und signifikant weniger Beta-Catenin positive Fibroblasten / HPF als in Fibromatosen. Mit steigendem Arthrofibrosegrad konnten signifikant mehr Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF nachgewiesen werden ($p < 0,001$, Spearman-Rho, Korrelationskoeffizient 0,796). Dabei wurde der Grenzwert von 20 Beta-Catenin positiven Zellen / HPF festgelegt. Hierdurch kann die histopathologische / immunhistochemische Diagnose einer Arthrofibrose mit einem hohem Sicherheitsgrad gestellt werden (Sensitivität 0,733, Spezifität 0,867). Somit sind erstmals histopathologische, charakteristische Veränderungen der Arthrofibrose beschrieben und immunhistochemisch-quantitative Kriterien für die Diagnose einer Arthrofibrose definiert.

7. Literaturverzeichnis

Adamson IYR, Young L, Bowden DH (1988) Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1988, 130:377-383.

Alberts B u. a.: *Molecular Biology of the Cell*. 4. Auflage. Garland Science, New York NY 2002, ISBN 0-8153-4072-9.

Allen JB, Manthey CL, Hand AR et al. (1990) Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 171: 231–247

Allen JT, Spiteri MA (2002) Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. *Respir Res* 3: 13

Berry DJ, Harmsen WS, Cabanela ME et al (2002) Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements: factors affecting survivorship of acetabular and femoral components. *J Bone Joint Surg Am* 84:171–177

Bisson MA, Beckett KS, McGrouther DA et al (2009) Transforming growth factor-beta1 stimulation enhances Dupuytren's fibroblast contraction in response to uniaxial mechanical load within a 3-dimensional collagen gel. 2009 Jul-Aug;34(6):1102-10. Epub 2009 Jun 7.

Bosch U (2002) Arthrofibrosis. *Orthopade* 31(8): 785–790

Bosch U, Zeichen J, Skutek M et al (2001) Arthrofibrosis is the result of a T cell mediated immune response. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 9(5): 282–289

Bosch U., Zeichen J., Lobenhoffer P. et al (1999) Arthrofibrose. Ein chronischer inflammatorischer Prozeß? *Arthroskopie* (1999) 12 :117–120

Bowley E, O’Gorman DB, Gan BS. (2007) Beta-catenin signalling in fibroproliferative disease. *J Surg Res*. 2007;138:141–150.

Cheon S, Poon R, Yu C, et al. (2005) Prolonged beta-catenin stabilization and tcf-dependent transcriptional activation in hyperplastic cutaneous wounds. *Lab Invest* 2005;85:416.

Cheon SS, Cheah AY, Turley S, et al. (2002) Beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6973.

Cheon SS, Nadesan P, Poon R et al (2004) Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp Cell Res* 2004;293:267.

Cosgarea AJ, Sebastianelli WJ, DeHaven KE. (1995) Prevention of arthrofibrosis after anterior cruciat ligament reconstruction using the central third patellar tendon autograft. *Am J. Sports Med.* 23. 87 – 92

Degreef I., De Smet L., Sciot R. et al (2009). b-Catenin Overexpression in Dupuytren's Disease Is Unrelated to Disease Recurrence. *Clin Orthop Relat Res* (2009) 467:838–845

Elford PR, Graeber M, Ohtsu H et al. (1992) Induction of swelling, synovial hyperplasia and cartilage proteoglycan loss upon intra-articular injection of transforming growth factor beta-2 in the rabbit. *Cytokine* 4: 232–238

Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410

Esler CN, Lock K, Harper WM et al (1999) Manipulation of total knee replacements. Is the flexion gained retained? *J Bone Joint Surg Br* 81(1): 27–29

Ferenc T, Wronski JW, Kopczynski J et al (2009), Analysis of APC, alpha-, beta-catenins, and N-cadherin protein expression in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Pathol Res Pract.* 2009;205(5):311-24

Fox JL, Poss R (1981) The role of manipulation following total knee replacement. *J Bone Joint Surg. Am* 63(3): 357–362

Freeman TA, Parvizi J, Dela Valle CJ et al (2010) Mast cells and hypoxia drive tissue metaplasia and heterotopic ossification in idiopathic arthrofibrosis after total knee arthroplasty. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010 Sep 1;3:17

Friedrich A, Kullmann F: (2003) Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms. In: *Med. Klin. (Munich).* 98, Nr. 12, Dezember 2003, S. 776–82.

Gandhi R, de Beer J, Leone J (2006) Predictive risk factors for stiff knees in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2006 Jan;21(1):46-52.

Gollwitzer H, Burgkart R, Diehl P et al. Therapy of arthrofibrosis after total knee arthroplasty. *Orthopade.* 2006; 35(2):143–152

Harner CD, Irrgang JJ, Paul J, et al (1992) Loss of motion after anterior cruciat ligament reconstuktion. *Am. J. Sports. Med.* 20: 499 – 506

Hartsock A., Nelson W.J. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (2008) 660–669

<http://www.bqs-outcome.de/>

<http://www.bvmed.de/stepone/data/downloads/28/da/00/medienservice2011>

Iselin M. (1965) *Chirurgie der Hand.* Thieme, Stuttgart

Keane MP, Strieter RM (2002) The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res* 3: 5

Kim TH, Kim SH, Seo JY et al (2011) Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med.* 2011;223(1):45-54.

Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70

Kolb M, Margetts PJ, Galt T et al. (2001) Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 770–777

Krenn V, Berger I, Kriegsmann J et al (2008) Rheumapathologie/Gelenkpathologie und Infektionsdiagnostik. IAP-Script Nr. 169, Lehrserie IAP, Bonn

Krenn V., Morawietz L., Burmester G.-R. et al (2005) Synovialitis-Score: Histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden. *Z Rheumatol* 64:334-342 (2005)

Krenn V, Morawietz L, Burmester GR et al (2006) Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology.* 2006 Oct;49(4):358-64.

Krenn V, Morawietz L, Häupl T et al (2002) Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract.* 2002;198(5):317-25.

Krenn V., M. Otto M., L. Morawietz L. et al (2009) Histopathologische Diagnostik in der Endoprothetik. *Orthopäde* 2009; 38:520–530

Krenn V., Morawietz L., Jakobs M. et al (2011) Gelenkendoprothesenpathologie - Histopathologische Diagnostik und Klassifikation. *Pathologe* 2011; 32: 210-219.

Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF et al. (1989) Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats: studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 143: 1142–1148

Lanzafame S, Magro G, Colombatti A (1994) Expression and distribution of type VI collagen in gynecomastia. *Acta Histochemica* 96:219–223

Lasky JA, Brody AR (2000) Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 108 (Suppl 4): 751–762

Laubenthal KN, Smidt GL, Kettelkamp DB (1972) A quantitative analysis of knee motion during activities of daily living. *Phys Ther* 52(1): 34–43

Lobenhoffer P, Tausendfreund J, Zeichen J et al (1999) Operative Therapie der Arthrofibrose. *Arthroskopie* 12: 252–259

Luck JV (1959) Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *J Bone Joint Surg Am.* 1959 Jun;41-A(4):635-64.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009 July; 17(1): 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.

Magro G, Colombatti A, Lanzafame S (1995) Immunohistochemical expression of type VI collagen in superficial fibromatoses. *Pathol Res Pract* 191:1023–1028

Mayer M, Donner U, Schlenkhoff D. (1986) Dupuytren'sche Kontraktur – Spätergebnisse der operativen Behandlung in einer allgemeinchirurgischen Klinik. *Chirurg.* 57(11): 733-36

Mayr HO, Weig TG, Plitz W (2004) Arthrofibrosis following ACL reconstruction – reasons and outcome. *Arch Orthop Trauma Surg* 124(8): 518–522

Michou L, Lermusiaux JL, Teyssedou JP et al (2011) Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine*. 2011 Jul 29. [Epub ahead of print]

Montgomery E, Folpe AL. (2005) The diagnostic value of beta-catenin immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2005;12:350–356.

Montgomery E, Lee JH, Abraham SC et al (2001) Superficial fibromatosis are genetically different from deep fibromatoses. *Mod Pathol*. 2001;14:695–701.

Morawietz L, Gehrke Th, Claßen R-A et al (2004) Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. *Pathologe* 25: 375–384

Morawietz L, Tiddens O, Mueller M et al (2009) Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*. 2009 Jun;54(7):847-53.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V et al (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.

Murakami S, Muneta T, Ezura Y et al (1997) Quantitative analysis of synovial fibrosis in the infrapatellar fat pad before and after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 25: 29–34

Murakami S, Muneta T, Furuya K et al. (1995) Immunohistologic analysis of synovium in infrapatellar fat pad after anterior cruciate ligament surgery. *Am J Sports Med* 23: 763–768

Najdi R., Holcombe RF, Waterman ML. (2011) Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *J Carcinog*. 2011; 10: 5.

Nicholls DW, Dorr LD (1990) Revision surgery for stiff total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 5 [Suppl]:73–77

O'Driscoll SW, Giori NJ (2000) Continuous passive motion (CPM): theory and principles of clinical application. *J Rehabil Res Dev* 37(2): 179–188

O'Kane S, Ferguson MW (1997) Transforming growth factor beta and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 63–78

Pala A, D'Elia P, Spampinato G et al (2011). Human amniotic glycodelin actively regulates changes in β -catenin immunoreactivity in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Nov 4.

Paulos L, Rosenberg T, Drawbert J, et al (1987) Infrapatellar contracture syndrome. An unrecognized cause of knee stiffness with patella entrapment and patella infera. *Am J Sports Med* 15:331–341

Peltonen J, Kähäri L, Uitto J et al (1990) Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 33:1829–1835

Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C et al (2008) Increased angiogenesis and cellular proliferation as hallmarks of the synovium in chronic septic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Aug 15;59(8):1137-46.

Remick D (1995) Cytokines and pulmonary fibrosis. In: *Pulmonary fibrosis*. Dekker, New York, pp 599–626

Riolo J, Young VL, Ueda K et al (1991). Dupuytren's contracture. *South Med J*. 1991 Aug;84(8):983-86.

Schaumburger J., Lechler P., Grifka J. et al (2011), Histologisch-pathologische Untersuchung bei Gelenkersatzoperationen. *Z Rheumatol* 70:281–283

Scranton PE Jr (2001) Management of knee pain and stiffness after total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 16(4): 428–435

Selman M, King TE, Pardo A (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136–151

Selman M., Pardo A. (2002) Review: Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* 2002, 3:3

Sharkey PF, Hozack WJ, Rothman RH. et al (2002) Insall Award paper. Why are total knee arthroplasties failing today? *Clin Orthop* 404: 7–13

Sharkey PF., Homesley HD., Shastri S. et al (2004) Results of revision total knee arthroplasty after exposure of the knee with extensor mechanism tenolysis. *J Arthroplasty* 19(6): 751–756

Smits R, Kielman MF, Breukel C, et al. (1999) Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev.* 1999 May 15;13(10):1309-21.

Sprague N, O'Connor R, Fox J (1982) Arthroscopic treatment of postoperative knee fibroarthrosis. *Clin Orthop* 166:165–172

Theiler R. (2002), *Arthrose Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation.* Schweiz Med Forum Nr. 23 5. Juni 2002

Tomasek JJ, Vaughan MB, Haaksma CJ (1999) cellular structure and biology of Dupuytren`s disease. *Hand Clin* 15: 21-34

Unterhauser F, Bosch U., Zeichen J. et al (2004) α -Smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. *ArchOrthop Trauma Surg* 124: 585-591

Vezeridis PS, Goel DP, Shah AA et al (2010) Postarthroscopic arthrofibrosis of the shoulder. *Sports Med Arthrosc.* 2010 Sep;18(3):198-206.

Weissinger M, Helmreich C, Pöll G.(2010) Results covering 20 years use of the cement-free Zweymüller Alloclassic total endoprosthesis of the hip joint. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2010 Jun;77(3):186-93.

Zeichen J., Haeder L., Jagodzinski M. et al (2008) Lokalisation von TGF- β und PDGF und deren Bedeutung für die Pathogenese der Arthrofibrose. Unfallchirurg. 2008; 111:79-84

Zeichen J., van Griensven M., Lobenhoffer P. et al (2000) Die Expression von Typ-VI-Kollagen bei der Arthrofibrose. Unfallchirurg 2000 · 103:640–644

Zlobec I, Terracciano L, Jass JR et al (2007) Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. Virchows Arch. 2007 Oct;451(4):763-9. Epub 2007 Aug 3.bv

8. Anhang

8.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Nummer	Name	Seite
Abb. 1.1	Makroskopischer, intraoperativer Befund einer generalisierten endoprothesen-assoziierten Arthrofibrose.	3
Abb. 3.1	Arthrofibrose Grad 1.	15
Abb. 3.2	Arthrofibrose Grad 2.	17
Abb. 3.3	Arthrofibrose Grad 3.	19
Abb. 3.4	Neosynovialis / periprothetische Membran vom Indifferenztyp.	21
Abb. 3.5	Proliferative Phase des Morbus Dupuytren	23
Abb. 3.6	Immunhistochemische Darstellung der Beta-Catenin Expression in der Arthrofibrose Grad 3	25
Abb. 4.1	Häufigkeiten der histopathologischen Arthrofibrosegrade innerhalb der Arthrofibrose	28
Tab. 4.1	Gelenklokalisierung im Arthrofibrosekollektiv und der Neosynovialis vom Indifferenztyp	29
Abb. 4.2	Gelenklokalisierung der entnommenen Gewebeproben	30
Abb. 4.3	Arthrofibrose nach gelenkerhaltenden und endoprothetischen Revisionseingriffen	31
Abb. 4.4	Abriebpartikel im Arthrofibrosekollektiv und Neosynovialis vom Indifferenztyp	32
Tab. 4.2	Arthrofibrosegrad und entzündliche Infiltration	34
Abb. 4.5	Entzündungsausmaß in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	34
Abb. 4.6	Vergleich der Fibroblastenzellularität zwischen Arthrofibrosegrad und Neosynovialis vom Indifferenztyp	36
Tab. 4.3	Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	39
Abb. 4.7	Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in der Arthrofibrose und Neosynovialis vom Indifferenztyp	39
Abb. 4.8	Beta-Catenin positive Fibroblasten pro HPF in den einzelnen Arthrofibrosegraden, der Neosynovialis vom Indifferenztyp und in Fibromatosen	40

8.2 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3 Erklärung

Ich, Martin Ruppert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Histopathologische Diagnostik der Arthrofibrose: Morphologische Charakteristik und immunhistochemische Beta-Catenin Expression“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 23.11.2011

Martin Ruppert

8.4 Veröffentlichungen

Abstracts:

1. Ruppert M., Knöß P., Gehrke T., Kendoff D., Matziolis G., Krenn V.

Histopathologische Diagnostik der Arthrofibrose: Morphologische Charakteristik und immunhistochemische Beta-Catenin Expression. Endoprothetik Kongress, 23. bis 25. Februar 2012, Berlin.

2. Dierkes C., Knöß P., Ruppert M., Gehrke T., Kendoff D., Theiß C., Krenn V.

Definition und Charakterisierung der Arthrofibrose in der humanen Synovia. Osteologie Kongress, 29.-31. März 2012, Basel.

8.5 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Krenn, der mir diese Promotionsschrift ermöglicht hat und mich während meiner Promotion bestens unterstützte, betreute und immer wieder motivierte.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Neugärtner vom pathologischen Institut Trier, der mir bei Fragen und der Recherche immer zur Verfügung stand.

Auch möchte ich Frau Martin vom pathologischen Institut Trier danken, die als MTA die immunhistochemischen Färbungen durchführte und mich unterwies hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Michael Ames (Firma Hoc Ago) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Geschwistern und insbesondere meinen Eltern Nicole Ruppert und Franz Josef Stein für Ihre jahrelange Unterstützung und ihr offenes Ohr in jeder Lebenslage.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner lieben Freundin Christiane Kemen für Ihre Unterstützung und Geduld bei der Niederschrift meiner Promotionsschrift und Ihrer Mutter Susanne Kemen für die orthographische Korrektur bedanken.