

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Diagnostische Wertigkeit von extrazellulären Vesikeln
bei der periprothetischen Infektion
an Knie-, Hüft- und Schultergelenk

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Charlotte Bielefeld
aus Datteln
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

Link: https://duepublico2.uni-due.de/receive/duepublico_mods_00078152

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter/in:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Jäger
2. Gutachter/in:	Frau Priv.-Doz. Dr. med. S. H. Schramm
3. Gutachter/in:	Herr Prof. Dr. med. C. D. Fingas

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2023

Aus der Promotion hervorgegangene Publikationen:

Bielefeld C, Engler H, Jäger M, Wegner A, Wassenaar D, Busch A.

Synovial Alpha-defensin at Reimplantation in Two-stage Revision Arthroplasty to Rule Out Persistent Infection.

In Vivo. Mar-Apr 2021. DOI: 10.21873/invivo.12352.

Busch A, Jäger M, Bielefeld C, Engler H, Haversath M, Wegner A.

Diagnostic Accuracy of Neopterin, TNF- α and Presepsin in Periprosthetic Joint Infection: A prospective study.

Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie. 2020 Dec 9. DOI: 10.1055/a-1303-5105.

Busch A, Jäger M, Engler H, Haversath M, Bielefeld C, Landgraeber S, Wegner A.

Is Procalcitonin (PCT) a reliable biomarker for preoperative diagnosing of low grade periprosthetic joint infection? A prospective study.

BMC Musculoskeletal Disorders. 2020 Apr 20. DOI: 10.1186/s12891-020-03266-6.

Wissenschaftliche Vorträge und Poster:

Jäger M, Busch A, Engler H, Wegner A, Bielefeld C.

Diagnostische Wertigkeit synovialer Biomarker bei periprothetischen Infektionen.

18. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universität Duisburg-Essen,

Essen, 22. November 2019. Poster.

Bielefeld C, Busch A, Wegner A, Engler H, Jäger M.

Entzündungsparameter zum Ausschluss persistierender PPI vor TEP-Reimplantation?

19. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universität Duisburg-Essen,

Essen, 27. November 2020. Vortrag.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	Grundlagen zur Entstehung der periprothetischen Infektion.....	8
1.1.1	Klinische Relevanz der periprothetischen Infektion.....	8
1.1.2	Pathogenese der aseptischen und septischen Endoprothesenlockerung	9
1.1.3	Biofilmbildung im Rahmen der PPI	11
1.2	Klinik und Diagnostik der PPI.....	12
1.2.1	Infektionswege und Einteilung der PPI	12
1.2.2	Konventionelle Verfahren zur Diagnostik der PPI.....	13
1.3	Extrazelluläre Vesikel als neuartige Biomarker.....	15
1.3.1	Entstehung, Struktur und Funktion extrazellulärer Vesikel	15
1.3.2	Immunologische Eigenschaften extrazellulärer Vesikel bei Infektionen	18
1.3.3	Oberflächenmarker der extrazellulären Vesikel.....	20
2	FRAGESTELLUNGEN	23
3	MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Geräte / Instrumente.....	24
3.1.2	Laboraausstattung und -material	24
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.4	Antikörper und Isotyp-Kontrollantikörper	26
3.1.5	Software	26
3.2	Methoden	27

3.2.1	Studiendesign und Patienten	27
3.2.2	Befunderhebung.....	28
3.2.3	Grundlagen der Gelenkpunktion	29
3.2.4	Durchführung der Gelenkpunktion.....	31
3.2.5	Probenasservierung	32
3.2.6	Prinzip der bildgebenden Durchflusszytometrie	33
3.2.7	Probenaufbereitung von sEV-Präparaten.....	36
3.2.8	Proben- und Datenanalyse mit Amnis ImageStreamX MkII	37
3.2.9	Statistische Methoden	38
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Patientenkollektiv.....	40
4.1.1	Geschlechts- und Altersverteilung in beiden Gruppen	40
4.1.2	BMI und Vorerkrankungen der Probanden.....	42
4.1.3	Gelenkbeteiligung der Patienten.....	45
4.2	Standarddiagnostik der PPI.....	46
4.2.1	Erregerspektrum der PPI in der septischen Gruppe.....	46
4.2.2	Entzündungsparameter im Blut	47
4.2.3	Leukozytenesterasereaktion in der Synovialflüssigkeit.....	50
4.3	Messergebnisse möglicher sEV-Marker.....	52
4.3.1	Deskriptive Statistik und Signifikanztestung der sEV-Marker	52
4.3.2	ROC-Analyse der sEV-Marker als diagnostische Tools bei der PPI	57
4.3.3	Vergleich der Konzentrationen der sEV-Marker bei Hüft- und Kniegelenk ..	59
5	DISKUSSION.....	60

5.1	Präoperativ erhobene Parameter	61
5.1.1	Patientenkollektiv der Studie.....	61
5.1.2	Mikrobiologische Analyse: Erregerspektrum und diagnostische Lücke	61
5.1.3	Stellenwert der Blutuntersuchung bei der Diagnose PPI.....	63
5.1.4	LE-Reaktion als Bestätigungstest der PPI	64
5.2	Möglichkeiten und Herausforderungen der Analyse von sEV-Präparaten	65
5.2.1	Fallstricke bei der Untersuchung von sEVs.....	66
5.2.2	Aufbereitung und Analyse von sEV-Präparaten – viele Methoden, viele Resultate	66
5.2.3	Möglichkeiten und Grenzen der IFCM.....	67
5.3	Potential und Limitationen der sEVs als neuartige Biomarker.....	69
5.3.1	Nachweis von sEVs in der Gelenkflüssigkeit	70
5.3.2	Keine erhöhten Konzentrationen ubiquitärer EV-Marker bei der PPI	71
5.3.3	CD66b und HLA-DR – keine geeigneten Indikatoren für die PPI.....	72
5.3.4	CD82 – der „indirekte Erregernachweis“	73
5.3.5	Bakterielle Membranvesikel bei der PPI als zukünftige Alternative.....	74
5.4	Problematik der Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Lockerung...75	
5.4.1	Prothesenlockerung aus immunologischer Sicht.....	75
5.4.2	Die fragliche Existenz der „aseptischen“ Prothesenlockerung	77
5.4.3	Potentielle Unterschiede immunologischer Prozesse an Hüfte und Knie.....	78
5.5	Die PPI - eine häufige, schwerwiegende und lebensgefährliche Komplikation	79
5.6	Fazit	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	LITERATURVERZEICHNIS	84

8 TABELLENVERZEICHNIS	94
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	99
11 DANKSAGUNG.....	100
12 LEBENSLAUF.....	101

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen zur Entstehung der periprothetischen Infektion

1.1.1 Klinische Relevanz der periprothetischen Infektion

Die Anzahl der Primärimplantationen von Gelenkendoprothesen steigt in der westlichen Welt stetig an. Dies hängt insbesondere mit dem demographischen Wandel und der Zunahme degenerativer Gelenkerkrankungen im höheren Alter zusammen (Kildow et al., 2022; Winkler et al., 2014). Im Jahre 2020 wurden deutschlandweit 227.851 Totalendoprothesen (TEPs) am Hüftgelenk, 173.625 TEPs am Kniegelenk und 28.565 TEPs an Gelenken der oberen Extremität implantiert (Statistisches Bundesamt, 2021a). Die Primärimplantationen einer Hüft- und einer Knie-TEP befanden sich 2020 auf Platz 6 bzw. 14 der in Deutschland am häufigsten durchgeführten Eingriffe (Statistisches Bundesamt, 2021b). Damit nimmt die absolute Zahl der Komplikationen und Folgeeingriffe ebenso kontinuierlich zu (Abb. 1). Es erfolgten deutschlandweit im Jahre 2020 32.918 Revisionen am Hüftgelenk, 23.442 am Kniegelenk und 4.223 an Gelenken der oberen Extremität (Statistisches Bundesamt, 2021a).

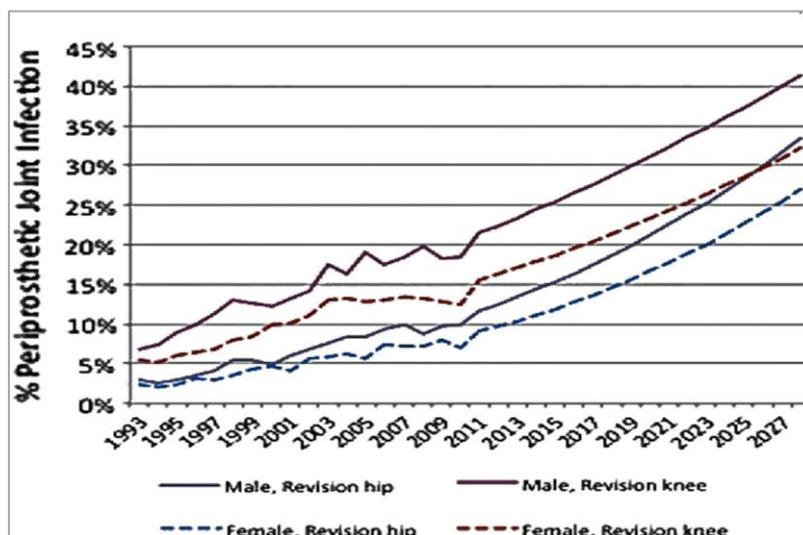


Abb. 1: Tendenz der Anzahl an Revisionsoperationen durch PPI über 25 Jahre

Seit 1993 hat die Anzahl an Revisionsoperationen aufgrund der periprothetischen Infektion (PPI) zugenommen und wird in den nächsten Jahren voraussichtlich weiter steigen (Abb. modifiziert nach O'Toole et al. 2016).

Die periprothetische Infektion (im Folgenden PPI bzw. im Plural PPIs) bezeichnet den Erregerbefall des Gewebes um eine TEP (Otto-Lambertz et al., 2017). An Knie-, Hüft- und Schultergelenk kommt es in 1-2% aller Primärimplantationen zu einer PPI. Bei Revisionsoperationen steigt die Infektionsrate durchschnittlich auf 5% an (Li et al., 2018a; Mühlhofer et al., 2015) .

Die PPI ist derzeit in ca. 25% der Fälle Ursache für eine Revisionsoperation am Kniegelenk und in ca. 15% der Fälle am Hüftgelenk (Abb. 1) (Deirmengian et al., 2018; Vicenti et al., 2019). Da sich sog. „low-grade“-Infekte häufig durch unspezifische Symptome wie Gelenkschmerzen und TEP-Lockerung äußern und folglich fälschlicherweise als aseptische Prothesenlockerungen diagnostiziert und therapiert werden, wird eine weitaus höhere Dunkelziffer an Gelenkinfekten vermutet (McNally et al., 2021; Winkler et al., 2014).

Jede Revisionsoperation stellt für den Patienten* ein gesundheitliches Risiko dar, verursacht hohe Kosten und führt zu einem erheblichen Verlust an Knochensubstanz (Bauer et al., 2018; Kildow et al., 2022; Landgraeber et al., 2014). Die Behandlung der PPI unterscheidet sich grundlegend von der Therapie der aseptischen TEP-Lockerung und bedarf einer schnellstmöglichen und korrekten präoperativen Diagnose. Die entscheidende Herausforderung besteht darin, einen sog. „low-grade“-Infekt von einer aseptischen Lockerung zu differenzieren. Jedoch fehlt hierzu ein diagnostischer Goldstandard (Busch et al., 2020; Goswami et al., 2018; Lazic et al., 2022).

1.1.2 Pathogenese der aseptischen und septischen Endoprothesenlockerung

Die aseptische und die septische TEP-Lockerung beruhen auf z.T. ähnlichen Pathomechanismen. Mögliche Ursache und zugleich Folge einer Lockerung ist die periprothetische Membran, ein bindegewebiger Saum zwischen Knochen und Implantat (Morawietz et al., 2006).

Die aseptische Lockerung ist der häufigste Grund für Revisionsoperationen und äußert sich als Immunreaktion auf verschiedene biomechanische Faktoren, insbesondere auf

* Soweit in dieser Arbeit zwecks besserer Lesbarkeit als allgemeine Personenbezeichnung das generische Maskulinum verwendet wird, bezieht sich dies ebenfalls auf weibliche und andere Geschlechteridentitäten.

Abriebpartikel der Implantatbestandteile (Landgraeber et al., 2014). Die am häufigsten in der Endoprothetik eingesetzten Werkstoffe sind Metall (Cobalt-Chrom-Molybdän, Nickel und Titan), Polyethylen, Keramik und PMMA-Zement (Gibon et al., 2017; Grifka and Kuster, 2011). Abriebpartikel entstehen kontinuierlich im Rahmen eines Verschleißprozesses durch die Bewegung der Artikulationspartner gegeneinander (Haversath et al., 2018). Sie verursachen im periprothetischen Gewebe eine chronische Entzündung. Daraus resultiert ein fokaler Knochenverlust im Bereich der Prothese (Pajarinen et al., 2014; Samelko et al., 2017). Makrophagen gelten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des aseptischen Lockerungsprozesses als Schlüsselmediatoren. Sie werden über toll-like Rezeptoren (TLR) auf ihrer Oberfläche durch Abriebpartikel stimuliert, phagozytieren kleinere Fremdkörper und setzen infolgedessen proinflammatorische Zytokine, z.B. Interleukine (IL-1, IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie Chemokine und weitere Wachstumsfaktoren frei. Diese stimulieren lokale Osteoklasten; die Osteoblastenbildung und -funktion hingegen werden supprimiert (Landgraeber et al., 2014; Pajarinen et al., 2014; Valladares et al., 2014). Die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten führen zu periprothetischer Osteolyse und folglich zur Prothesenlockerung (Haversath et al., 2018).

Der über Jahre voranschreitende aseptische Lockerungsprozess verläuft abhängig von dem Ausmaß des Materialverschleißes und der Immunantwort individuell. Im Laufe der Zeit migrieren die Prothesenbestandteile und verursachen durch Mikroschwingungen im osteolytischen Spalt zwischen Knochen und Prothese Schmerzen (Morawietz et al., 2006).

Bei der lokalen bakterieninduzierten Entzündungsreaktion im Rahmen der PPI infiltrieren Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort das periprothetische Gewebe. Auch hier kommt es zur inflammatorisch getriggerten Osteolyse. Daraus resultieren nach variabler Zeit Fehlstellung und Instabilität der infizierten Prothese. Eine wesentliche Rolle spielt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen durch Bindung von mikrobiellen Molekülen, sog. PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), an TLR (Josse et al., 2019; Pajarinen et al., 2014).

1.1.3 Biofilmbildung im Rahmen der PPI

Die Mehrzahl der mikrobiologisch bestätigten PPIs wird durch Bakterien verursacht. Bakterien kommen in zwei Lebensformen vor, nämlich als planktonische Phase und als sessile Phase im sog. Biofilm, die ineinander übergehen können. Der Begriff Biofilm bezeichnet ein komplexes, mehrschichtig strukturiertes Aggregat einer oder mehrerer Spezies von Mikroorganismen, das einer nicht-lebendigen Oberfläche (z.B. abgestorbenes Gewebe wie Knochensequester oder abiotische Materialien wie Implantate) fest anhaftet. Im Biofilm synthetisieren die Bakterien eine sie umgebende mechanische Schutzschicht (Abb. 2), die sog. Matrix, aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, Lipoteichonsäuren und extrazellulärer DNA (Boyle et al., 2018; Gbejuade et al., 2015; Zimmerli and Sendi, 2017). Sie kann sich innerhalb weniger Stunden ausbilden und sich über Jahre weiterentwickeln. Ausgereift ist der Biofilm nach ca. 2 bis 4 Wochen. (Gbejuade et al., 2015; Mühlhofer et al., 2015). Der Biofilm gilt als Schlüsselfaktor der Pathogenese von nahezu asymptomatischen „low-grade“-Infekten und schützt die Erreger vor der Immunabwehr des Wirtes (Abb. 2) (Boyle et al., 2018; Zaborowska et al., 2021).

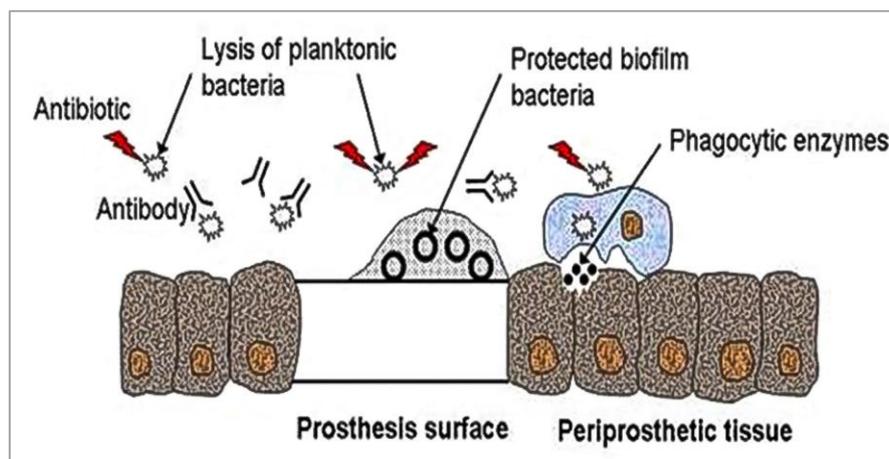


Abb. 2: Folgen der Biofilmbildung bei der PPI

Die sich im Biofilm auf der Prothesenoberfläche befindenden Mikroorganismen umgeben sich mit einer selbst produzierten Matrix und schützen sich dadurch vor Phagozytose durch Makrophagen und Markierung durch Antikörper sowie vor Antibiotika, während Bakterien in der planktonischen Phase durch diese Mechanismen zerstört werden. Aktivierte Makrophagen schütten lytische Enzyme aus, welche jedoch statt des Biofilms das periprothetische Gewebe schädigen (Abbildung verändert nach Renz et al. 2015).

Wegen der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit und des Austausches von Virulenz- und Resistenzgenen verschiedener Subpopulationen sind Bakterien in der sessilen Phase

widerstandsfähig gegenüber Antibiotika (Josse et al., 2019; Zimmerli and Sendi, 2017). Da die Erreger im Biofilm der Prothese fest anhaften, können sie im Synovialaspirat oftmals nicht nachgewiesen werden. Infolgedessen führen falsch negative mikrobiologische Untersuchungsbefunde dazu, dass periprotetische „low-grade“-Infekte nicht als solche diagnostiziert und nicht adäquat operativ therapiert werden können (Li et al., 2018a; McNally et al., 2021; Renz et al., 2015).

1.2 Klinik und Diagnostik der PPI

1.2.1 Infektionswege und Einteilung der PPI

Zu rund zwei Drittel aller PPI kommt es durch eine intraoperative Kontamination der TEP mit Erregern. In ca. einem Drittel der Fälle breitet sich eine Infektion von einem Primärfokus (z.B. Haut, Weichteile, Mundraum, Atem-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt) hämatogen oder lymphogen ins periprotetische Gewebe und auf das Implantat aus. Das Risiko für eine hämatogene Infektion aufgrund einer Bakteriämie besteht bei einliegender TEP dauerhaft (Li et al., 2018a; Winkler et al., 2014). Therapeutisch relevant ist die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer PPI anhand der Länge des Zeitraums zwischen Symptombeginn und Therapie. Wird eine PPI innerhalb von 2 bis 4 Wochen nach Erstkontakt der Erreger zum Implantat erkannt, gilt die Biofilmbildung auf der Prothese als noch nicht komplett abgeschlossen, so dass die Pathogene durch chirurgisches Débridement und Antibiotika zerstört werden können und die TEP belassen werden kann. Wird die PPI später diagnostiziert, sollten alle Fremdmaterialien explantiert werden, da die Bakterien im ausgereiften Biofilm durch antimikrobielle Substanzen kaum mehr eliminiert werden können und bei prothesenerhaltenden Verfahren die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass die Infektion persistiert (Mühlhofer et al., 2015; Zimmerli and Sendi, 2017).

Die akute Infektion bringt meist typische lokale und evtl. systemische Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Überwärmung und anhaltende Wundsekretion im Bereich des betroffenen Gelenkes sowie Fieber und allgemeines Krankheitsgefühl mit sich. Sie wird i.d.R. durch hoch-virulente Erreger, z.B. *Staphylococcus aureus* und gramnegative Bakterien, verursacht (McNally et al., 2021; Sallai et al., 2022). Bei chronischen „low-grade“-Infektionen durch niedrig-virulente

Pathogene, bspw. koagulasenegative Staphylokokken und *Propionibacterium acnes*, zeigen sich oftmals subtile und unspezifische Symptome wie zunehmende oder bestehende Schmerzen im Bereich der TEP und radiologische Hinweise auf eine Frühlockerung (Boyle et al., 2018; Otto-Lambertz et al., 2017). Typische Zeichen einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion fehlen. Folglich sollte jede Form von Schmerzen an einer Endoprothese bis zum Beweis des Gegenteils als potentielles Infektionszeichen angesehen werden (Goswami et al., 2018; Winkler et al., 2014).

1.2.2 Konventionelle Verfahren zur Diagnostik der PPI

Kein einzelnes Testverfahren vermag die Diagnose PPI sicher zu bestätigen oder auszuschließen (Goswami et al., 2018; Shahi and Parvizi, 2017). Die Wahrscheinlichkeit, eine PPI korrekt zu diagnostizieren, steigt durch Kombination verschiedener Verfahren, z.B. klinischer, laborchemischer, mikrobiologischer, histopathologischer und bildgebender Untersuchungen, auf schätzungsweise 80% der Fälle (Bauer et al., 2018; Lazic et al., 2022). Im Jahre 2011 hat die Musculoskeletal Infection Society (MSIS) Kriterien zur Definition der PPI vorgestellt. Diese wurden im Rahmen des „International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection“ in Philadelphia 2013 modifiziert. 2018 wurde auf Basis der Ergebnisse einer Multizenterstudie ein standardisierter diagnostischer Algorithmus mit neuen Minorkriterien etabliert (Tab. 1). Darauf basierend entwickelte die European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) ein Modell zur Einstufung der Wahrscheinlichkeit einer PPI (McNally et al., 2021).

Vor jeder Prothesenwechseloperation werden standardmäßig Entzündungsparameter im Blut, z.B. die Leukozytenzahl, das Akut-Phase-Protein CRP (C-reaktives Protein) und Procalcitonin, bestimmt (Kildow et al., 2022; Vicenti et al., 2019). Im Rahmen einer Gelenkpunktion wird Synovialflüssigkeit gewonnen. Diese wird mikrobiologisch untersucht. Häufige Erreger der PPI sind u.a. koagulasenegative Staphylokokken und *Staph. aureus* (Lazic et al., 2022; Ong et al., 2022). Seltener nachgewiesen werden Streptokokken und Enterokokken, gramnegative Stäbchen, Anaerobier und Pilzarten wie *Candida albicans*. Das Erregerspektrum der Gelenkinfekte unterscheidet sich je nach Körperregion des betroffenen Gelenkes (z.B. vermehrt *Cutibacterium acnes* bei PPI der Schulter). Mischinfektionen sind in 10 bis 20% nachweisbar. Bei 10 bis 30% der

vermuteten PPI in fällt der Erregernachweis negativ aus (Li et al., 2018a; Renz et al., 2015). Die Biofilmbildung, eine verkürzte Inkubationszeit, die Anwendung eines ungeeigneten Kulturmediums oder präoperative Antibiotikatherapie können dies bedingen (Goswami et al., 2018; Otto-Lambertz et al., 2017). Es sollte beachtet werden, dass bei einer Punctio sicca eine PPI präoperativ nicht ausgeschlossen werden kann (Ong et al., 2022).

Majorkriterien (≥1 erfüllt)		Diagnostische Konsequenz
≥2-maliger Nachweis desselben Erregers		<i>PPI gesichert</i>
Nachgewiesene Fistel / Verbindung zur Prothese		
Minorkriterien		
Serum-CRP/D-Dimere ↑	2	≥6 Punkte: <i>PPI gesichert</i> 2-5 Punkte: <i>PPI möglich; unsicher</i> 0-1 Punkte: <i>keine PPI</i>
Blutsenkungsgeschwindigkeit ↑	1	
synoviale Zellzahl ↑ / LE-Reaktion zweifach positiv	3	
synoviales Alpha-Defensin ↑	3	
synoviale PMN% ↑	2	
synoviales CRP ↑	1	
Unklarer präoperativer Score / Punctio sicca		
Präoperativer Score	X	≥6 Punkte: <i>PPI gesichert</i> 4-5 Punkte: <i>unsicher</i> ≤3 Punkte: <i>keine PPI</i>
Histologie weist auf PPI hin	3	
Eiter im OP-Gebiet	3	
Einzelner positiver Erregernachweis	2	

Tab. 1: 2018 modifizierte Diagnosekriterien der PPI

Ist kein Majorkriterium erfüllt, werden als Minorkriterien präoperativ Parameter in Blut und Synovialflüssigkeit in die Diagnostik der PPI integriert und anhand der Ergebnisse eine Punktzahl ermittelt, die die Wahrscheinlichkeit für eine PPI bei erhöhten Werten widerspiegelt. Bei einem unsicheren Ergebnis oder einer präoperativen Punctio sicca werden intraoperative Kriterien in die Diagnostik miteinbezogen und erneut eine Punktzahl ermittelt. Möglich ist, ein unsicheres Gesamtergebnis zu erhalten. Grenzwerte für die jeweiligen Parameter sind in „The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria“ festgelegt (Parvizi et al., 2018).

Die synoviale Leukozytenzahl und der Anteil polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) sowie die Höhe der Konzentrationen von Biomarkern wie synoviales CRP und α-Defensin können auf eine intraartikuläre Entzündungsreaktion hinweisen (Lazic et al., 2022; Li et al., 2018a; Shahi and Parvizi, 2017). Das Enzym Leukozytenesterase (LE) kann über ein semiquantitatives Schnelltestverfahren nachgewiesen werden (Tab. 1), das ursprünglich zur Diagnostik von Harnwegsinfekten im Urin konzipiert wurde. Die LE wird von aktivierten PMN in infiziertem Gewebe vermehrt produziert. Wird Gelenkflüssigkeit auf das Teststreifenfeld gegeben, werden

PMN lysiert und setzen das Enzym frei, wodurch ein Farbumschlag entstehen kann, der abhängig von seiner Stärke einen groben Rückschluss auf die Menge der in der Flüssigkeit enthaltenen PMN erlaubt (Koh et al., 2017; Shahi et al., 2017; Wetters et al., 2012).

Intraoperativ entnommene Gewebeproben, bspw. periprothetische Membran und Neokapsel, können mikrobiologisch und histopathologisch untersucht werden und im Nachhinein Hinweise auf das Vorliegen einer PPI geben (Tab. 1). Infiltrate neutrophiler Granulozyten im periimplantären Gewebe können auf ein infektiöses Geschehen hindeuten (Li et al., 2018a; McNally et al., 2021; Morawietz et al., 2006).

1.3 Extrazelluläre Vesikel als neuartige Biomarker

1.3.1 Entstehung, Struktur und Funktion extrazellulärer Vesikel

Der Begriff „extrazelluläre Vesikel“ (EVs im Plural) bezeichnet eine heterogene Gruppe kleiner Partikel, die von nahezu allen eukaryotischen Zelltypen gebildet und in den Extrazellulärraum abgegeben werden. EVs spielen eine zentrale Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation. Sie dienen dabei als Transportvehikel verschiedener Biomoleküle (Devhare and Ray, 2017; Lozano-Andrés et al., 2019; Zou et al., 2022). Anhand der Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle werden EVs spezifisch an Zielzellen adressiert und von diesen aufgenommen (Böker et al., 2018; Doyle and Wang, 2019; Li et al., 2018a). EVs können lokal auf Nachbarzellen wirken oder mit endokrinem Effekt durch den systemischen Kreislauf zirkulieren und in diversen Körperflüssigkeiten, u.a. Plasma, Serum, Synovialflüssigkeit und Urin, nachgewiesen werden (Konoshenko et al., 2018; Witwer et al., 2013).

Der Durchmesser der EVs kann zwischen ca. 30nm und 5µm betragen. EVs werden von einer Lipiddoppelschicht umgeben. Sie trägt zur Stabilität und Widerstandsfähigkeit der EVs im Extrazellulärraum bei und schützt den vesikulären Inhalt. Dieser setzt sich aus Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Molekülen der Ursprungszelle zusammen (Hough et al., 2018; Wang et al., 2019; Zou et al., 2022). Auch Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine konnten in EVs nachgewiesen werden. EVs können durch den Transport von Nukleinsäuren u.a. eine Genregulation in den Empfängerzellen bewirken (Li et al., 2018b). An der Vesikeloberfläche befinden sich eine

Vielzahl von Transmembranproteinen der Ursprungszelle. Diese Moleküle aktivieren Oberflächenrezeptoren der Zielzellen, stoßen so intrazelluläre Signalkaskaden an und induzieren die Internalisierung des EV-Inhaltes (Doyle and Wang, 2019; Yanez-Mo et al., 2015).

Einzelne EVs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Zusammensetzung, ihres Ursprungs und ihrer Funktion voneinander (Abb. 3). Verschiedene Zelltypen bilden unterschiedliche EV-Subpopulationen. Anhand ihres Entstehungsweges werden EVs in der Literatur oftmals in die Subgruppen Exosomen (Vesikel endosomal Ursprungs, vermutlich kleinste EVs bis 100 nm), Mikrovesikel (direkte Abschnürungen der Plasmamembran) und apoptotische Körperchen (Bestandteile in Apoptose gehender Zellen, eher größere Vesikel) unterteilt (Devhare and Ray, 2017; Zou et al., 2022). Kaum eine der bisher angewandten Analysemethoden kann sichere Auskunft über den Ursprung einzelner Vesikel geben, so dass hier gemäß den Empfehlungen der „International Society of Extracellular Vesicles“ der Oberbegriff EVs verwendet wird. Nach ihrer Größe können EVs in sEVs (small EVs, Durchmesser ≤ 200 nm) und m/lEVs (medium/large EVs, Durchmesser > 200 nm) eingeteilt werden (Thery et al., 2018; Witwer et al., 2013). Insbesondere sEVs sind in diverse Vorgänge der Zell-Zell-Kommunikation involviert (Yanez-Mo et al., 2015).

Die Bildung von sEVs in der Ursprungszelle (Abb. 3) erfolgt über z.T. bekannte Mechanismen auf Grundlage unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden.

Bei der Entstehung von sEVs über den endosomal Weg werden im Endosom verschiedene Peptide sortiert, recycelt und gespeichert, und Transport und Freisetzung derselben werden reguliert. Die Membran des Endosoms stülpt sich nach innen ein. Dadurch bilden sich sog. „multivesicular bodies“ (MVBs) mit darin enthaltenen intraluminalen Vesikeln (ILVs; Abb. 3) (Doyle and Wang, 2019; Li et al., 2018b; Wang et al., 2019). ILVs werden mit spezifischen Molekülen beladen. Die MVBs fusionieren mit der Zellmembran und setzen so ILVs als sEVs frei (Abb. 3). Dieser Prozess wird durch die ESCRT-Maschinerie (endosomal sorting complex required for transport) (Abb. 5) und auf übergeordneter Ebene durch den Funktionszustand der jeweiligen Ursprungszelle reguliert (Li et al., 2018b; Pols and Klumperman, 2009; Schorey et al., 2015). Bspw. kann ein einziger Zelltyp unterschiedlich zusammengesetzte Vesikel

abhängig von seinen Umgebungsbedingungen, seiner Lage oder einem aktivierenden Stimulus freisetzen (Yanez-Mo et al., 2015).

Mithilfe des Zytoskeletts und der zellulären Fusionsmaschinerie können auch auf direktem Weg Teile der Zellmembran als EVs abgeschnürt werden. Abhängig vom Oberflächenmuster der Ursprungszelle enthalten sie verschiedene zytosolische und membranständige Proteine. Apoptotische Körperchen (meist m/IEVs) werden von absterbenden Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt und beinhalten z.T. intakte Zellorganellen (Abb. 3) (Doyle and Wang, 2019; Schorey et al., 2015).

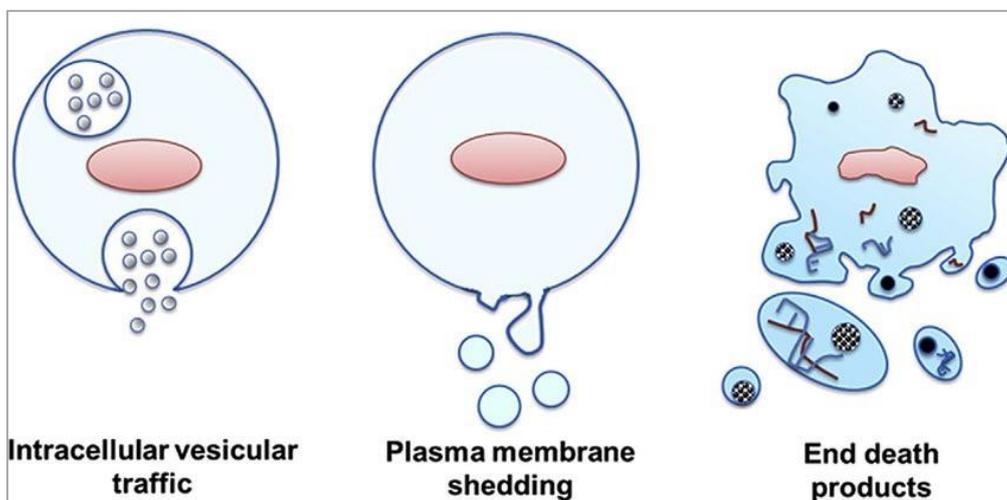


Abb. 3: Verschiedene Entstehungswege von EVs

EVs können auf unterschiedlichen Wegen entstehen und freigesetzt werden, z.B. durch Bildung von ILVs im Endosom und Fusion der MVBs mit der Plasmamembran (links; i.d.R. sEVs), durch direkte Abschnürungen der Zellmembran und durch den Zerfall apoptotischer Zellen (rechts; in den Vesikeln befinden sich vollständige Zellorganellen) (Abb. modifiziert nach Devhare and Ray 2017).

EVs setzen durch den Transport von Proteinen und anderen Biomolekülen inter- und intrazelluläre Signalkaskaden in den Zielzellen in Gang und tragen u.a. zur Adhäsion, zur Motilität und zum Wachstum von Zellen bei (Doyle and Wang, 2019; Wang et al., 2019). Eine weitere Funktion der EVs ist, Zellschrott in den Extrazellulärraum zu entfernen, z.B. Transferrinrezeptoren bei der Reifung von Retikulozyten (Yanez-Mo et al., 2015). Im Hinblick auf Anzahl und Zusammensetzung der sEVs lassen sich verschiedene Krankheitszustände der Ursprungszelle detektieren. sEVs leisten einen Beitrag zur Progression einer Reihe von chronisch-entzündlichen Prozessen. Außerdem können sie als neue Biomarker zur Diagnostik verschiedener Erkrankungen, z.B. von Tumorleiden

und Infektionskrankheiten, und zur Immunforschung genutzt werden. Ihre Konzentrationen in Körperflüssigkeiten korrelieren unter pathologischen Bedingungen mit der Krankheitsaktivität und einem Therapieansprechen. sEVs sind stabil und robust gegenüber äußeren Einflüssen wie bspw. Gefrier-Tau-Zyklen (Böker et al., 2018; Pérez et al., 2019; Schorey et al., 2015; Wiklander et al., 2018) .

Therapeutisch könnten sEVs angewandt werden, um Medikamente zu spezifischen Zielzellen in bestimmten Organsystemen zu transportieren. Dies ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Eine neuartige Option im Rahmen immunmodulatorischer Therapien ist, sEVs mit antiinflammatorischen Eigenschaften aus multipotenten Stammzellen zu erzeugen und bei einer Reihe von chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu applizieren (Yanez-Mo et al., 2015; Zou et al., 2022).

1.3.2 Immunologische Eigenschaften extrazellulärer Vesikel bei Infektionen

Membranvesikel werden von Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren freigesetzt und fördern die Ausbreitung einer Infektion. Ebenso dienen körpereigene sEVs der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Abwehrzellen und tragen wesentlich zur Immunreaktion gegen Erreger bei. Beide Mechanismen hängen von unterschiedlichen Faktoren, z.B. dem Infektionsort, der Virulenz der Pathogene und der Immunlage des Wirtes, ab und gehen im Rahmen einer Infektion miteinander einher (Mehanny et al., 2020; Schorey et al., 2015; Yanez-Mo et al., 2015).

Innerhalb des Wirtsorganismus schnüren grampositive und -negative Bakterien Anteile ihrer Zellmembran als sog. Membranvesikel (MVs) ab. Gramnegative Erreger bilden hierbei aus ihrer äußeren Membran sog. „outer membrane vesicles“ mit einem Durchmesser von 20-250nm (Dauros Singorenko et al., 2017; Fantappiè et al., 2014). MVs beinhalten pathogene Moleküle (PAMPs, z.B. Lipopolysaccharide), welche das Immunsystem des Wirtsorganismus – bspw. durch Bindung an TLR der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten - aktivieren können. MVs transportieren jedoch ebenso Toxine und Virulenzfaktoren in die Wirtszellen und tragen somit zum Fortschreiten einer Infektion bei (Fantappiè et al., 2014; Schorey et al., 2015; Zaborowska et al., 2021). Bakterien tauschen über MVs als Transportvehikel Resistenzgene gegen Antibiotika aus

und schützen sich gegen äußere Einflüsse. Unter anderem unterstützen MVs die Bildung und den Erhalt eines Biofilms (Mehanny et al., 2020; Yanez-Mo et al., 2015).

Hingegen präsentieren Abwehrzellen mittels sEVs Antigene und verstärken bzw. modulieren auf diesem Wege die Immunantwort. Neutrophile Granulozyten bilden den Hauptanteil der zirkulierenden Leukozyten im menschlichen Blut. Als Vertreter der unspezifischen Immunabwehr phagozytieren sie unmittelbar nach Antigenkontakt Bakterien und Pilze und sezernieren Chemo- und Zytokine. Makrophagen und Neutrophile setzen im Rahmen einer Infektion vermehrt sEVs frei, die pro-, aber z.T. auch antiinflammatorisch auf die beteiligten Immunzellen wirken (Abb. 4) (Li et al., 2018b; Pérez et al., 2019; Yanez-Mo et al., 2015).

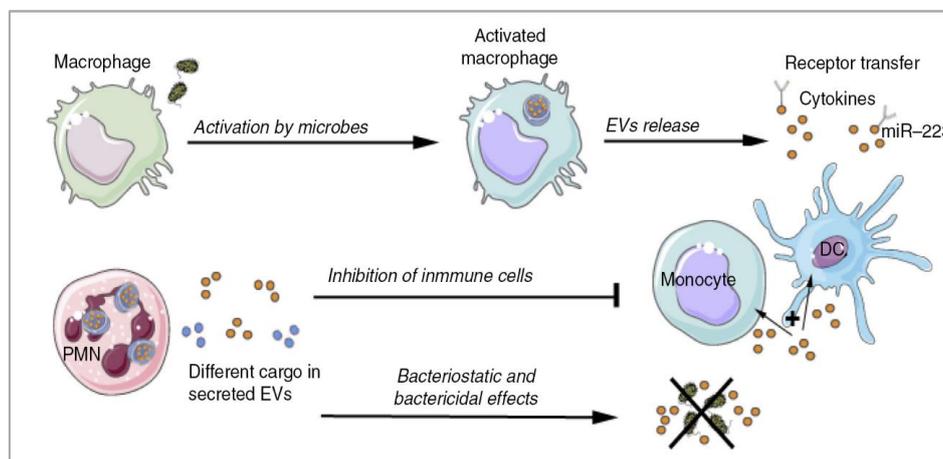


Abb. 4: Beispiel zur Regulation der Immunreaktion durch EVs

Makrophagen werden durch Kontakt mit Pathogenen aktiviert und setzen daraufhin sEVs frei, welche u.a. Zytokine enthalten. Zielzellen sind z.B. dendritische Zellen. Auch neutrophile Granulozyten synthetisieren je nach Aktivierungszustand unterschiedlich zusammengesetzte sEVs und können dadurch die Zell-Zell-Kommunikation mit anderen Immunzellen verstärken oder die Verbreitung von Bakterien direkt inhibieren, indem sie bakteriostatisch bzw. bakterizid wirken. Neutrophile können ebenfalls sEVs freisetzen, die eine immunsuppressive Wirkung aufweisen (Abbildung modifiziert nach Yanez-Mo et al. 2015).

Zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) gehören Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. APZ erkennen Pathogene anhand von PAMPS über sog. PRRs (pattern recognition receptors) an ihrer Oberfläche, internalisieren sie und zerlegen sie in ihre Bestandteile. Über MHC-Klasse-I- oder -Klasse-II-Moleküle präsentieren sie Pathogenfragmente den T-Zellen und setzen so die adaptive Immunantwort in Gang (Renz and Gierten, 2019; Saiz et al., 2018). MVs oder EVs aus infizierten Wirtszellen können an APZ Antigene in Form von PAMPs überliefern

(Abb. 4) oder costimulatorische Moleküle zu T-Zellen transportieren, um diese zu aktivieren. APZ generieren nach Aufnahme eines Antigens EVs, welche über ihre Oberfläche die Pathogenbestandteile im Komplex mit MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren und CD4- und CD8-positive T-Zellen stimulieren. Aktivierte T-Zellen setzen ebenfalls an andere Abwehrzellen adressierte sEVs frei, um eine Immunreaktion zu verstärken oder abzuschwächen (Saiz et al., 2018; Schorey et al., 2015; Zou et al., 2022).

1.3.3 Oberflächenmarker der extrazellulären Vesikel

Bestimmte Oberflächenmarker erlauben Rückschlüsse auf den Ursprung der EVs (Devhare and Ray, 2017; Schorey et al., 2015). Typische Markerproteine sind die Tetraspanine, nämlich Transmembranproteine (Abb. 5), die ubiquitär auf menschlichen Zellmembranen exprimiert werden. Sie dienen der Adressierung der EVs an ihre Zielzellen und spielen eine vielfältige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie der Modulation der Immunabwehr (Böker et al., 2018; Khan et al., 2019; Pols and Klumperman, 2009).

Es existieren ca. 33 verschiedene humane Tetraspanin-Subtypen (Saiz et al., 2018). Tetraspanine setzen sich aus 4 Transmembrandomänen, einer kurzen und einer langen extrazellulären Schleife, zwei kurzen Amino- und Carboxyketten und insgesamt aus 200 bis 300 Aminosäuren zusammen. Sie sind in modifizierter Form gemeinsam mit anderen Membranproteinen in sog. TEMs (tetraspanin-enriched microdomains) angeordnet (Abb. 5) und können so das Recycling und die Internalisierung von Biomolekülen steuern. Jede Zelle verfügt über eine individuelle Zusammensetzung der TEMs, die ständig variiert und an die Umgebung der jeweiligen Zelle adaptiert werden kann. Verschiedene EV-Subpopulationen weisen unterschiedliche Tetraspaninmuster an ihrer Oberfläche auf, anhand derer sie identifiziert werden können (Koliha et al., 2016; Wang et al., 2019). Wie die meisten Transmembranproteine werden Tetraspanine im endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgi-Apparat modifiziert. Anschließend werden sie zur Zellmembran transportiert und in TEMs angeordnet (Abb. 5) oder in die Oberfläche intraluminaler Vesikel (nach Fusion mit der Zellmembran EVs) integriert (Brosseau et al., 2018; Pols and Klumperman, 2009; Yanez-Mo et al., 2015).

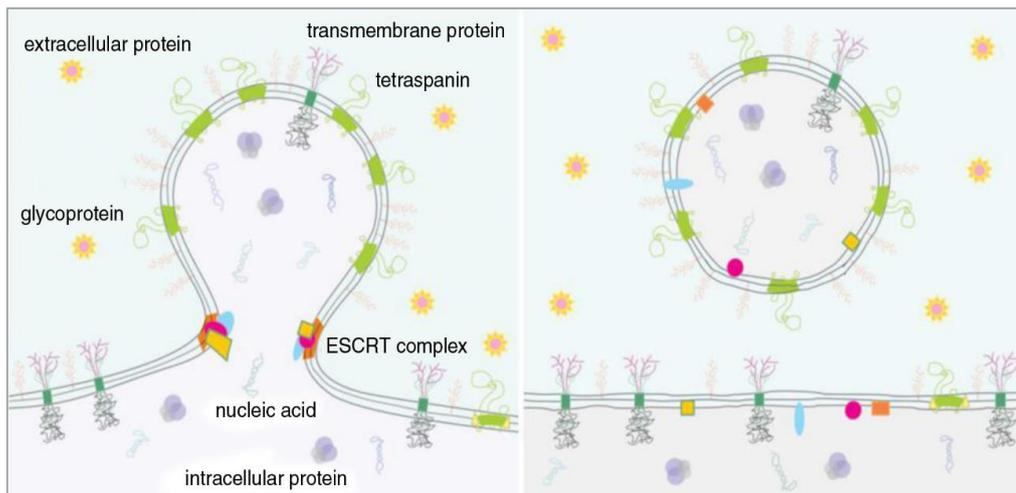


Abb. 5: Zusammensetzung und Oberflächenstruktur der EVs

Die Freisetzung der EVs erfolgt u.a. durch Abschnürung der Plasmamembran im Bereich des ESCRT. Die in den Extrazellulärraum abgegebenen Vesikel tragen in angereicherter Form die Oberflächenmoleküle der Membran ihrer Ursprungszelle, z.B. Tetraspanine und Glykoproteine. In ihrem Inneren befinden sich verschiedene Moleküle, z.B. intrazelluläre Proteine, Nucleinsäuren und Bestandteile des ESCRT. Der Inhalt der Ursprungszelle wird durch die Vesikel zu den jeweiligen Zielzellen transportiert. Die Aufnahme erfolgt über Interaktion mit den Oberflächenrezeptoren (Abb. modifiziert nach Yanez-Mo et al. 2015).

Im Folgenden wird auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tetraspanine CD9, CD63 und CD82 sowie auf CD66b und das HLA-DR-Molekül eingegangen.

CD9 befindet sich in der Plasmamembran diverser Zelltypen mit immunologischer und nicht-immunologischer Funktion und ist mitverantwortlich für die Zellmotilität, -fusion und -adhäsion. Es gilt ähnlich wie CD63 als sog. „pan-EV“-Marker, da es ubiquitär auf sEVs nachweisbar ist und zur Quantifizierung der EV-Gesamtzahl in einer Probe genutzt werden kann. Der Einbau immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle in die Plasmamembran (z.B. MHC-Klasse-II-Moleküle) wird ebenso durch CD9 orchestriert (Böker et al., 2018; Brosseau et al., 2018). Jedoch kann CD9 auch zur Adhäsion von Bakterien an Wirtszellen beitragen (Ventress et al., 2016).

CD63 besitzt ähnliche Funktionen wie CD9. Als lysosomales Membranprotein spielt es eine wichtige Rolle beim hochregulierten intrazellulären Transport von Proteinen in ILVs und deren Freisetzung als EVs. CD63 passiert das späte Endosom und wird ubiquitär auf ILVs angereichert (Cashikar and Hanson, 2019; Schorey et al., 2015).

Durch Stimuli wie Bakterienbestandteile exprimieren Neutrophile (Abb. 4) verstärkt das Oberflächenmolekül CD66b, ein Mitglied der CEA-Familie, und bilden vermehrt EVs, auf denen CD66b ebenfalls nachweisbar ist. Bei der Aggregation der Neutrophilen

interagiert CD66b mit diversen anderen Transmembranproteinen und Signalmolekülen und fördert die Freisetzung lytischer Sauerstoffradikale und proinflammatorischer Zytokine aus Neutrophilen (Genschmer et al., 2019; Schmidt et al., 2012).

CD82 reguliert in TEMs die Zusammensetzung der Zellmembran und fördert die interzelluläre Adhäsion. Bei Tumorerkrankungen wird es im erkrankten Gewebe vermindert exprimiert und kann im Blut in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Li et al., 2018b; Wang et al., 2019). Im Rahmen von Infektionen ist CD82 für den intrazellulären Transport des TLR-9 und die Aktivierung der Signaltransduktion über diesen Rezeptor essentiell. TLR-9 befindet sich im Endosom der APZ und detektiert spezifische Muster mikrobieller DNA in phagozytierten Pathogenbestandteilen. CD82 steuert die TLR-9-abhängige Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern, was die Bildung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF- α , bewirkt und eine Entzündungskaskade zur Infektionsabwehr in Gang setzt (Khan et al., 2019; Mehanny et al., 2020). Außerdem vermittelt CD82 die Beladung von MHC-II-Molekülen mit degradierten Pathogenbestandteilen aus dem Phagosom und den Transport der MHC-II-Antigen-Komplexe an die Oberfläche der APZ. CD82 ist in der Zellmembran aktivierter APZ mit MHC-Klasse-II-Molekülen assoziiert (Artavanis-Tsakonas et al., 2011; Khan et al., 2019; Saiz et al., 2018).

CD9, CD63 und CD82 beeinflussen die Anordnung immunologisch wirksamer Oberflächenmoleküle wie HLA-DR in der Zellmembran von APZ (Saiz et al., 2018; Zhuang et al., 2017). HLA-DR, ein glykosyliertes Transmembranprotein, ist ein MHC-Klasse-II-Molekül und wird an der Oberfläche professioneller APZ exprimiert. Es dient der Antigenpräsentation an T-Zellen, den Effektorzellen der adaptiven Immunantwort. Nachdem APZ Bestandteile von bspw. Bakterien oder Pilzen aufgenommen und im Phagolysosom in Peptide gespalten haben, werden diese exogenen Antigene an MHC-II-Moleküle gebunden und an die Zellmembran transportiert. Sie können dort über komplementäre T-Zell-Rezeptoren von CD4-positiven T-Zellen erkannt werden (Gauvreau et al., 2009; Renz and Gierten, 2019; Zhuang et al., 2017). MHC-II-Moleküle, insbesondere HLA-DR, sind in angereicherter Form auf sEVs nachweisbar, die von aktivierten APZ und auch von T-Zellen freigesetzt wurden (Gauvreau et al., 2009). HLA-DR kann als Markerprotein der Überprüfung der Immunfunktion im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion dienen (Zhuang et al., 2017).

2 FRAGESTELLUNGEN

Bis heute fehlt ein einheitlicher diagnostischer Goldstandard zur Erkennung der PPI, insbesondere von „low-grade“-Infekten. Das übergeordnete Ziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie ist, herauszufinden, ob die Untersuchung verschiedener Biomarker in der Gelenkflüssigkeit die Diagnostik der PPI verbessern kann und diese sich als neue diagnostische Tools bewähren können.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung von sEV-Präparaten im Synovialaspirat. sEVs spielen bei der körpereigenen Immunreaktion und der Zell-Zell-Kommunikation eine Schlüsselrolle. Es wird erforscht, inwiefern die Konzentrationen verschiedener EV-Oberflächenmarker, nämlich CD9, CD63, CD66b, CD82 und HLA-DR, mittels bildgebender Durchflusszytometrie (engl. „imaging flow cytometry“, IFCM) detektiert werden können. Analysiert werden soll, ob EV-Oberflächenmarker in der Gelenkflüssigkeit in signifikant unterschiedlichen Konzentrationen bei einer PPI im Vergleich zur aseptischen Prothesenlockerung messbar sind. Einerseits soll die Gesamtzahl an sEVs durch Nachweis der ubiquitären EV-Marker CD9 und CD63 zwischen beiden Gruppen verglichen werden. Andererseits sollen verschiedene sEV-Subpopulationen anhand der immunologisch wirksamen Markermoleküle CD66b, CD82 und HLA-DR betrachtet werden. Auf Grundlage der Ergebnisse sollen Rückschlüsse gezogen werden, ob die Untersuchung des Gelenkpunktats auf sEV-Präparate eine hinreichende Sensitivität und Spezifität in Hinblick auf die Diagnostik der PPI aufweist und ob sie den derzeitigen konventionellen Verfahren zur Diagnostik der implantatassoziierten Infektion ebenbürtig, unterlegen oder überlegen ist.

Die zentrale Arbeitshypothese ist, dass bei einem infektiösen Entzündungsgeschehen im Gelenk, verglichen mit der abriebbedingten Prothesenlockerung, die gewählten sEV-Markermoleküle im Synovialaspirat in signifikant erhöhter Konzentration nachweisbar seien.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte / Instrumente

Geräte und Instrumente zur Durchführung der Gelenkpunktion sind in Tab. 2 aufgeführt.

Gerät / Instrument	Hersteller
mobiles Röntgengerät mit mobilem Monitor	Ziehm Vision R; Nürnberg
Sterican sterile Einmalpunktionskanüle: 21G, Durchmesser 8mm, Länge 120mm	B. Braun; Melsungen
Sterican sterile Einmalpunktionskanüle: 20G, Durchmesser 9mm, Länge 70mm	B. Braun; Melsungen
sterile Punktionskanüle: individueller Durchmesser von 1,5mm, 2mm oder 2,5mm, Länge 80mm	Sieb Hüfte 1 / Knie 1; Storz; Tuttlingen

Tab. 2: Zur Gelenkpunktion verwendete Geräte und Instrumente

3.1.2 Laborausstattung und -material

Die Laborausstattung und die Materialien zur Probenaufbereitung und -analyse sind in Tab. 3 angegeben.

Laborausstattung / Material	Hersteller
Rotina 420 Zentrifuge	Hettich; Tuttlingen
Eppendorf 5424R Zentrifuge	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Reference Pipette; Volumen 100µl bis 1.000µl	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Research plus Pipette; Volumen 25µl	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Eppendorf-Cups 1,5ml unsteril	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Kryoröhrchen 1,8ml steril mit Deckel	Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA
U-Boden 96-Well Platte	Corning Falcon; Tewksbury, Massachusetts, USA
PBS (phosphate buffered saline; pH 7,4, Cat 10010023)	Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA
NP-40 2%-Lösung	CALBIOCHEM / Emanuel Merck
Amnis ImageStreamX MkII Durchflusszytometer	Luminex Corporation; Austin, Texas, USA

Tab. 3: Laborausstattung und Materialien zur Probenverarbeitung

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die zur Gelenkpunktion und Probenasservierung verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 4 aufgelistet.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Desderman pure Händedesinfektionsmittel	Schülke, Hamburg
MoliNea Abdecktücher normal	Hartmann, Heidenheim
Peha-profile Latex puderfreie sterile Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Kodan Tinktur forte; farbloses alkoholisches Hautantiseptikum	Schülke & Mayr, Hamburg
Einmal Lochtuch Foliordrape Protect 45 x 75 cm, Loch 7 cm, zweilagig, steril	Hartmann, Heidenheim
Braun Injekt sterile 20 ml Einmalspritze	B. Braun, Melsungen
Vliwasoft sterile Kompressen, 10 x 10cm	Lohmann und Rauscher, Rengsdorf
Curapor chirurgischer Wundverband, 10 x 8cm	Lohmann und Rauscher, Rengsdorf
Steriles Mehrfachröhrchen mit Deckel, Volumen 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
BD BACTEC™ Plus-Aerob/F-Medium: aerobe Blutkulturflaschen, Blutzugabe: 3-10 ml	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg
BD BACTEC™ Plus-Anaerob/F-Medium: anaerobe Blutkulturflaschen, Blutzugabe: 3-10 ml	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg
BD BACTEC™-PEDS-Plus/F-Medium: pädiatrische Blutkulturflaschen, speziell entwickelt für die Blutkulturdiagnostik bei Säuglingen u. Kleinkindern, Blutzugabe: 1-3ml	Becton, Dickinson and Company; Heidelberg
One + Step Urinteststreifen mit Referenzfarbkarte	DreamFutureInnovation, Korea
THERM BOX Styroporbox mit Deckel Größe 24x20x15,5cm; Volumen 2,39l	Broxon GmbH, Odenthal
Eis	

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Antikörper und Isotyp-Kontrollantikörper

Die fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Markierung der verschiedenen Oberflächenmoleküle in den sEV-Präparaten sowie die zugehörigen Isotyp-Kontrollantikörper sind in Tab. 5 und Tab. 6 dargestellt.

Antigen	Fluorchrom	Klon	Isotyp	Hersteller
CD9	PE	MEM-61	Maus IgG1	EXBIO, Prag, Tschechien
CD63	APC	MEM-259	Maus IgG1	EXBIO, Prag, Tschechien
CD66b	APC	6/40c	Maus IgG1	Leukocom, Essen
CD82	PE	ASL-24	Maus IgG1	BioLegend, San Diego, California, USA
HLA-DR	ECD	Immu-357	Maus IgG1	Beckman Coulter, Krefeld

Tab. 5: Fluoreszenzkonjugierte Antikörper

Isokontroll-Antikörper	Fluorchrom	Isotyp	Klon	Hersteller
Maus IgG1	PE	CD9, CD82	MOPC-21	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG1	APC	CD63, CD66b	MOPC-21	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG1	ECD	HLA-DR	679.1Mc7	Beckman Coulter, Krefeld

Tab. 6: Isotyp-Kontrollantikörper

3.1.5 Software

Software zur Datenverarbeitung, zur statistischen Auswertung, zur Bildbearbeitung und zur Erstellung dieses Dokumentes ist in Tab. 7 aufgeführt.

Software	Hersteller
Medico	Cerner, Idstein
IDEAS Software v6.2	Andritz Group; Graz, Österreich
Endnote X 8.0.2	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmont, Washington, USA
SPSS Statistics Version 25	International Business Machines, Ehningen
GraphPad Prism Version 8.3.1	GraphPad Company; San Diego, USA
GIMP 2.10 (GNU Image Manipulation Program)	The GIMP Team; Open Source

Tab. 7: Software

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign und Patienten

Für die Durchführung der prospektiven Studie lag die Genehmigung der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen vor (Nummer des Ethikvotums: 18–8042-BO). Die Deklaration von Helsinki wurde als ethische Standardrichtlinie angewandt. Die Probanden stellten sich zwischen September 2018 und September 2019 aufgrund von Beschwerden - in erster Linie anhaltende Schmerzen im Bereich ihrer Knie-, Hüft- oder Schulterendoprothese - in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universität Duisburg-Essen zur Planung und Durchführung einer Prothesenwechseloperation vor.

Alle eingeschlossenen Patienten erfüllten folgende Kriterien:

- Alter über 18 Jahre
- Vorhandensein einer osteolytisch bzw. atraumatisch bedingten Endoprothesenlockerung
- >3ml Synovialflüssigkeit bei prä- / intraoperativer Gelenkpunktion vorhanden
- Vorliegen aller benötigten klinischen Daten und laborchemischen Befunde

Als Ausschlusskriterien galten wie folgt:

- Alter unter 18 Jahren
- Punctio sicca
- Protheseninsuffizienz bedingt durch ein Trauma oder durch ossäre Metastasen
- periprothetischer Frühinfekt innerhalb von 8 Wochen postoperativ*
- Vorliegen einer Metallose*
- entzündliche Systemerkrankungen, z.B. rheumatoide Arthritis / chronisch-entzündliche Darmerkrankungen*
- vorherige (innerhalb von 14 Tagen) oder begleitende Antibiotikatherapie, um ein falsch negatives Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung zu vermeiden*

*Die Aussagekraft der synovialen und serologischen Entzündungsparameter kann hierdurch vermindert werden.

Vor Studienteilnahme wurden den Patienten die Hintergründe der Studie dargelegt. Die Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis, dass nach der standardmäßig vor jeder

Wechseloperation durchgeführten Gelenkpunktion zum Ausschluss einer PPI ggf. überschüssiges Punktat zu diesem Forschungszweck asserviert werden durfte und dass ihre Daten im Rahmen der Studie anonym ausgewertet werden durften.

3.2.2 Befunderhebung

Das Vorgehen bei der Erhebung der Befunde der Probanden entsprach dem übrigen prä- und intraoperativen Standardprocedere bei Prothesenwechseloperationen in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universität Duisburg-Essen. Es wurden patientenbezogenen Daten wie Geburtsdatum / Alter, Geschlecht, BMI und betroffenes Gelenk, Vorerkrankungen, die aktuelle Anamnese und die Vorgeschichte der Probanden erhoben. Außerdem wurden vom betroffenen Gelenk Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen sowie bei einliegenden Hüft-TEPs MRT-Aufnahmen mit metallartefaktreduzierten Sequenzen angefertigt. Es erfolgte eine klinische orthopädische Untersuchung. Dabei wurde explizit darauf geachtet, ob eine Fistel zum betroffenen Gelenk oder lokale Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Überwärmung bestanden.

Zum Ausschluss einer systemischen Entzündungsreaktion, z.B. durch eine PPI oder andere Infektionen, und zur Prüfung der Operations- und Narkosefähigkeit der Patienten wurden präoperativ Routine-Laboruntersuchungen durchgeführt: Es wurden Entzündungsparameter im Blut – u.a. CRP im Serum und Leukozyten im Rahmen eines kleinen Blutbildes – bei der Diagnostik der PPI berücksichtigt. Standardmäßig wurde präoperativ eine Punktion des jeweiligen Gelenks durchgeführt. Die Gelenkflüssigkeit wurde mikrobiologisch untersucht. Auch wurde in der Gelenkflüssigkeit die LE-Reaktion mittels Urinteststreifen erfasst. Die Bestimmung der synovialen Zellzahl wurde wegen der hohen Fehleranfälligkeit des Messverfahrens nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die Wahrscheinlichkeit, ob im individuellen Fall eine PPI bestand, wurde anhand der Majorkriterien der PPI (mindestens zweimaliger mikrobiologischer Nachweis desselben Pathogens in verschiedenen Proben und eine Fistel zum betroffenen Gelenk) bestimmt. Ist eins von beiden erfüllt, liegt per definitionem eine PPI vor (Parvizi et al., 2018). Auf die Anwendung der Minorkriterien wurde verzichtet, da diese nicht pathognomonisch für das Vorliegen einer PPI sind. Bei Verdacht auf eine aseptische Prothesenlockerung erfolgte ein einzeitiger Prothesenwechsel und bei Verdacht auf eine PPI ein zwei- oder

mehrzeitiger Prothesenwechsel mit Spacereinlage. Intraoperativ wurde bei jeder Prothesenwechseloperation erneut Gelenkflüssigkeit entnommen. Falls die präoperative Punktion des Gelenkes nicht genügend Material zur Untersuchung auf EV-Präparate ergab, wurde die intraoperativ gewonnene Gelenkflüssigkeit genutzt. Punktat und Gewebeproben wurden mikrobiologisch untersucht. Außerdem wurden jeweils 3 bis 6 Biopsate der periprotetischen Membran histopathologisch befundet.

3.2.3 Grundlagen der Gelenkpunktion

Die Gelenkpunktion (Einführen einer Nadel in die Gelenkhöhle) dient der Gewinnung von Synovialflüssigkeit zur Diagnostik, Druckentlastung und Schmerzlinderung (Zellner et al., 2013). Abb. 6 - Abb. 8 zeigen mögliche Punktionstechniken der im Rahmen der Studie untersuchten Gelenke.

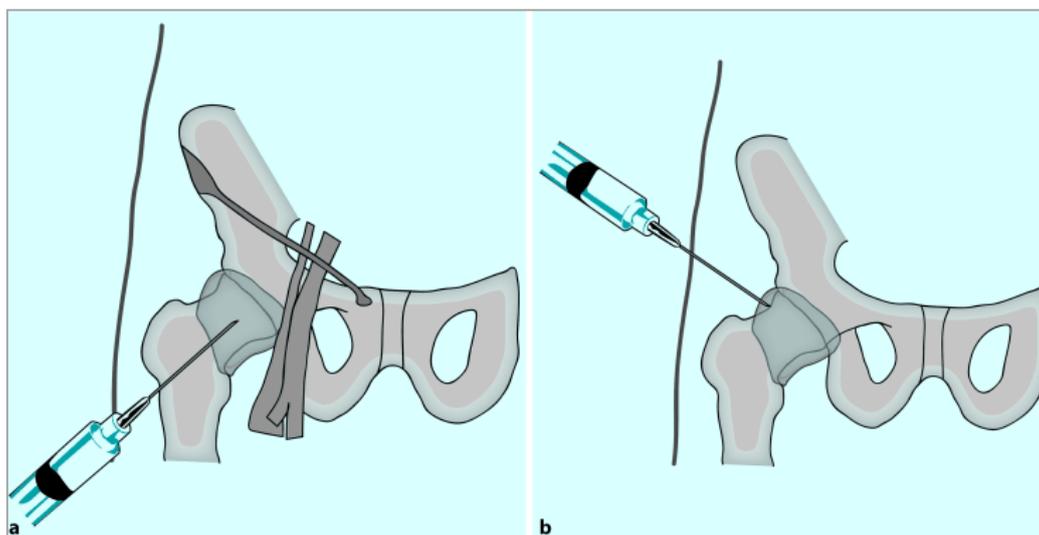


Abb. 6: Durchführung einer Hüftgelenkpunktion

Die Punktion des Hüftgelenkes wird unter Röntgenkontrolle durchgeführt, um die Position der Punktionskanüle in der Tiefe überprüfen zu können. Die Punktionskanüle folgt der Achse des Schenkelhalses, denn die Hüftgelenkkapsel erstreckt sich bis zur Linea intertrochanterica. Über den ventralen Zugang (Abb. 6a) wird die Punktionskanüle mittig auf der imaginären Linie zwischen Spina iliaca anterior superior und Symphyse und ca. 2 cm lateral des tastbaren Femoralispulses eingeführt. Die Hüftgelenkpunktion über den lateralen Zugang (Abb. 6b) erfolgt bei leicht abduziertem und innenrotiertem Oberschenkel ca. 2 cm proximal der Spitze des Trochanter major parallel zur Unterlage und senkrecht zur Körperlängsachse (Abb. modifiziert aus Chirurgie Basisweiterbildung, S. 331-336, Zellner et al., 2013).

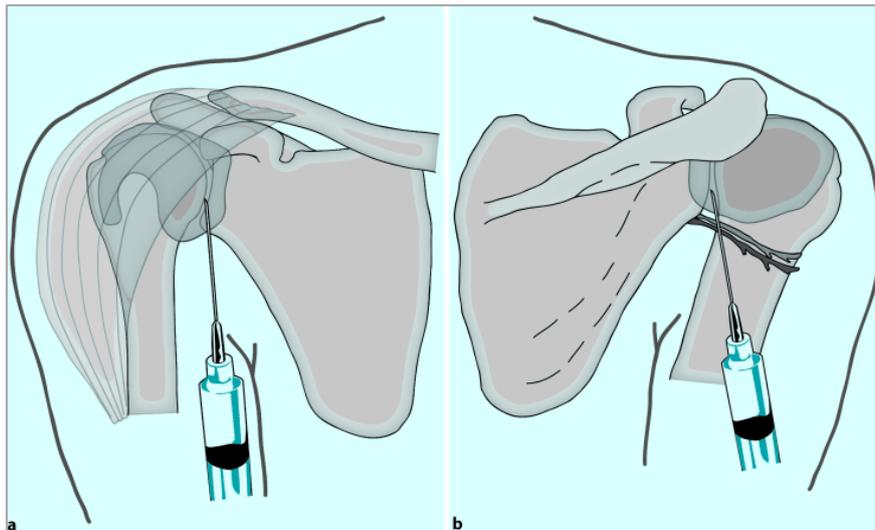


Abb. 7: Durchführung einer Schultergelenkspunktion

Abb. 7a zeigt den ventralen Zugang bei der Punktion des Glenohumeralgelenkes. Die Punktionskanüle wird bei abduziertem und leicht außenrotiertem Oberarm ca. 1 cm kaudal und lateral des Processus coracoideus in medialer Richtung in das Gelenk geführt. Für den dorsalen Zugang (Abb. 7b) sitzt der Patient mit leicht innenrotiertem und adduziertem Oberarm mit dem Rücken zum punktierenden Arzt gewandt. Dieser umgreift von oben die Schulter und legt den Zeigefinger zur Anzeige der Stichrichtung auf den Processus coracoideus. Die Punktionskanüle wird 2 cm distal und 2 cm medial der posterolateralen Acromiomecke eingestochen (Abb. modifiziert aus Chirurgie Basisweiterbildung, S. 331-336, Zellner et al., 2013).

Farbe und Beschaffenheit der Gelenkflüssigkeit können einen ersten Hinweis zur Differenzierung zwischen einem Reizerguss aseptischer Ursache (eher visköse, klare und bernsteinfarbene Flüssigkeit) und einem Gelenkerguss aufgrund einer PPI (eher trübes, gelbliches bis putrides Punktat) geben. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass die Definition von Eiter auf optischen Eindrücken beruht und daher subjektiv ausfallen kann. Alijanipour et al. wiesen für das Vorhandensein von Eiter bei der PPI eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 32% nach (Alijanipour et al., 2015). Eiter gilt als ein Indikator für den Zerfall von neutrophilen Granulozyten, die bei „low-grade“-PPI in lediglich geringer Anzahl aktiviert sein können. Blutbeimengungen vermögen das Vorhandensein von Eiter zu kaschieren. Dagegen entsteht Eiter ebenfalls bei einer Reihe von inflammatorischen Prozessen nicht-infektiöser Genese, bspw. als Reaktion auf Metallpartikel oder bei entzündlichen Gelenkerkrankungen (Alijanipour et al., 2015; McNally et al., 2021).

3.2.4 Durchführung der Gelenkpunktion

Bei den Gelenkpunktionen wurde die Leitlinie „Intraartikuläre Punktionen und Injektionen: Hygienemaßnahmen“ aus „Empfehlungen zur Hygiene in Klinik und Praxis“, entworfen von dem Arbeitskreis „Krankenhaus- & Praxishygiene“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Arbeitskreis "Krankenhaus- & Praxishygiene" der AWMF, 2015), beachtet. Da es sich um einen invasiven Eingriff handelt, wurde eine vorherige Aufklärung über das Vorgehen und mögliche Komplikationen der Punktion durchgeführt und dokumentiert. Die Patienten willigten schriftlich in den Eingriff ein. Die präoperative Punktion erfolgte unter strikt aseptischen Bedingungen, um eine iatrogene Gelenkinfektion sowie eine sekundäre Kontamination der entnommenen Proben zu verhindern (Abb. 8).

Zunächst wurde der Patient auf einer Liege gelagert. Das jeweilige Gelenk wurde vollständig entkleidet, um eine Kontamination durch Kleidungsstücke zu vermeiden. Es wurden wasserundurchlässige Unterlagen unter das Punktionsgebiet gelegt. Die Einstichstelle wurde dreimal großflächig mit alkoholischem Hautantiseptikum (Kodan Tinktur forte der Firma Schülke und Mayr) satt benetzt. Die Einwirkzeit des Desinfektionsmittels von mindestens einer Minute wurde beachtet. Auf eine Betäubung des Punktionsgebietes mit Lokalanästhetikum wurde verzichtet, da es bakterizid wirken und den Keimnachweis negativ verfälschen kann (Otto-Lambertz et al., 2017). Ein steriles Lochtuch wurde zum Schutz vor Kontamination durch den Patienten im Bereich der Einstichstelle aufgeklebt (Abb. 8). Zur Hüftpunktion wurden meist Kanülen mit einer Weite von 21G und einer Länge von 120mm, zur Kniepunktion Kanülen mit einer Weite von 20G und einer Länge von 70mm verwendet. Bei der Hüftpunktion wurde mit einem mobilen Bildwandler röntgenologisch mehrmals die Position der Nadel im Gelenk überprüft. Die Punktionskanüle wurde unter Aspiration ins Gelenk vorgeschoben und an eine sterile Einmalspritze adaptiert. Eine Vermengung der Synovialflüssigkeit mit Blut wurde bei der Punktion nach Möglichkeit verhindert.

Anschließend wurde der Patient darüber aufgeklärt, sich bei Beschwerden unverzüglich wieder vorzustellen, damit Komplikationen, z.B. eine Gelenkinfektion, Gefäß- oder Nervenschäden, nach der Punktion möglichst früh erkannt und behandelt werden konnten.

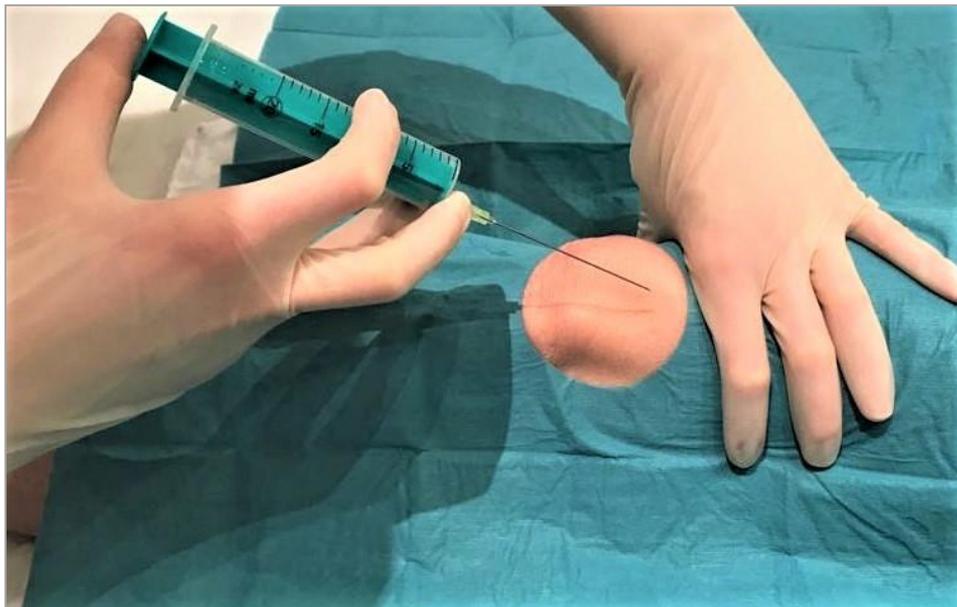


Abb. 8: Vorbereitung einer Kniegelenkspunktion

Die Patientin befindet sich in Rückenlage. Über der mehrmals desinfizierten Punktionsregion wurde ein steriles Lochtuch aufgeklebt. Bei der Punktion werden sterile Handschuhe getragen und eine sterile Einmalspritze mit einem Volumen von 20 ml sowie eine Punktionskanüle mit einer Weite von 20 G und einer Länge von 70 mm verwendet. Das Bein ist zur Entspannung des Extensionsapparates in Streck- oder leichter Beugstellung des Kniegelenkes gelagert. Der Recessus suprapatellaris kann ausgestrichen werden. Die Punktion kann oberhalb des lateralen Patellarandes über den lateralen Zugang oder durch den Recessus suprapatellaris über den lateral-proximalen Zugang 1,5 cm Querfinger kranial und lateral des Patellaoberrandes erfolgen (Zellner et al., 2013) (Abbildung aus eigener Quelle).

Die intraoperative Punktion erfolgte nach dem Hautschnitt und der Präparation der Muskulatur bei intakter Gelenkkapsel unmittelbar vor Eröffnung derselben. Auf diesem Wege konnte das Risiko für eine Kontamination der Proben mit Hautflora weiter minimiert werden, und es konnten größere Mengen an Gelenkflüssigkeit gewonnen werden. Die Probenasservierung erfolgte analog zum präoperativen Vorgehen (3.2.5).

3.2.5 Probenasservierung

Ein Teil des Punktats wurde zur mikrobiologischen Untersuchung asserviert. Mit einer jeweils neuen sterilen Kanüle wurde das Synovialaspirat in verschiedene Blutkulturflaschen mit angereicherter Casein-Soja-Pepton-Bouillon und Zusatz von Kunstharzen zur Inaktivierung von Antibiotika gefüllt, nachdem der Durchstich-Stopfen mit alkoholischem Hautantiseptikum (Kodan Tinktur forte der Firma Schülke und Mayr)

abgesprüht wurde. Konnten über 20ml Synovialflüssigkeit gewonnen werden, wurden eine aerobe und eine anaerobe Blutkulturflasche mit je 8-10ml beimpft. Konnte weniger Punktat entnommen werden, wurden 1-3ml in eine pädiatrische Blutkulturflasche gegeben. Die restliche Gelenkflüssigkeit wurde in ein steriles Röhrchen gefüllt und zur Analyse von sEV-Präparaten genutzt.

Das Material zur mikrobiologischen Untersuchung wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen 14 Tage lang inkubiert. So können auch langsam wachsende niedrig-virulente Erreger erfasst werden (Winkler et al., 2014). Menge und Beschaffenheit der Gelenkflüssigkeit wurden notiert. Punktat zur Analyse von sEV-Präparaten wurde in einem sterilen Röhrchen direkt nach der Entnahme für 10 Minuten bei 4°C und 2000g zentrifugiert, um Zellen von der Flüssigkeit mit den darin enthaltenen EV-Präparaten zu trennen. 1ml des Überstandes wurde in ein steriles Kryoröhrchen pipettiert. Zur Bestimmung der LE-Reaktion wurden ein Urinteststreifen mit Gelenkflüssigkeit benetzt, semiquantitativ die Reaktionsstärke der Leukozytenesterase durch visuelles Ablesen nach 90 Sekunden (Vorgabe des Herstellers) als Farbumschlag bestimmt und das Ergebnis vermerkt. Dazu wurde zentrifugiertes Gelenkpunktat verwendet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Blutkontamination zu vermeiden.

3.2.6 Prinzip der bildgebenden Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie erzeugen Zellen bzw. Partikel, die von einem Lichtstrahl getroffen werden, optische Signale. Diese werden als Lichtstreuung gemessen. So können die Zellen quantifiziert und ihre Größe und Granularität bestimmt werden (McKinnon, 2018). Die Partikel gelangen unter Überdruck in Suspension (z.B. PBS) zentriert und separiert durch eine schmale Messzelle einzeln in den Messkanal (Abb. 9). Sie werden durch orthogonal ausgerichtete Laser angestrahlt. Die Zellen streuen abhängig von ihrer Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit und ihrem Inhalt Lichtsignale, die von Detektoren aufgenommen werden. Man kann das Streulicht der Zellen in Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FCS; gibt v.a. Auskunft über die Zellgröße) und Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC; gibt v.a. Auskunft über die Granularität der Zelle) einteilen (McKinnon, 2018).

Färbt man bestimmte Zellstrukturen (z.B. Oberflächenmoleküle) mit spezifisch bindenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern an, werden sie vom Durchflusszytometer als Fluoreszenzsignale detektiert (Görgens et al., 2019). Die Familie der CD-Moleküle (englisch cluster of differentiation) umfasst eine Reihe von Oberflächenproteinen, die abhängig von Differenzierungsstatus und Funktion der jeweiligen Zelle exprimiert werden und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden können. So können Zellen nach verschiedenen Merkmalen differenziert werden (McKinnon, 2018).

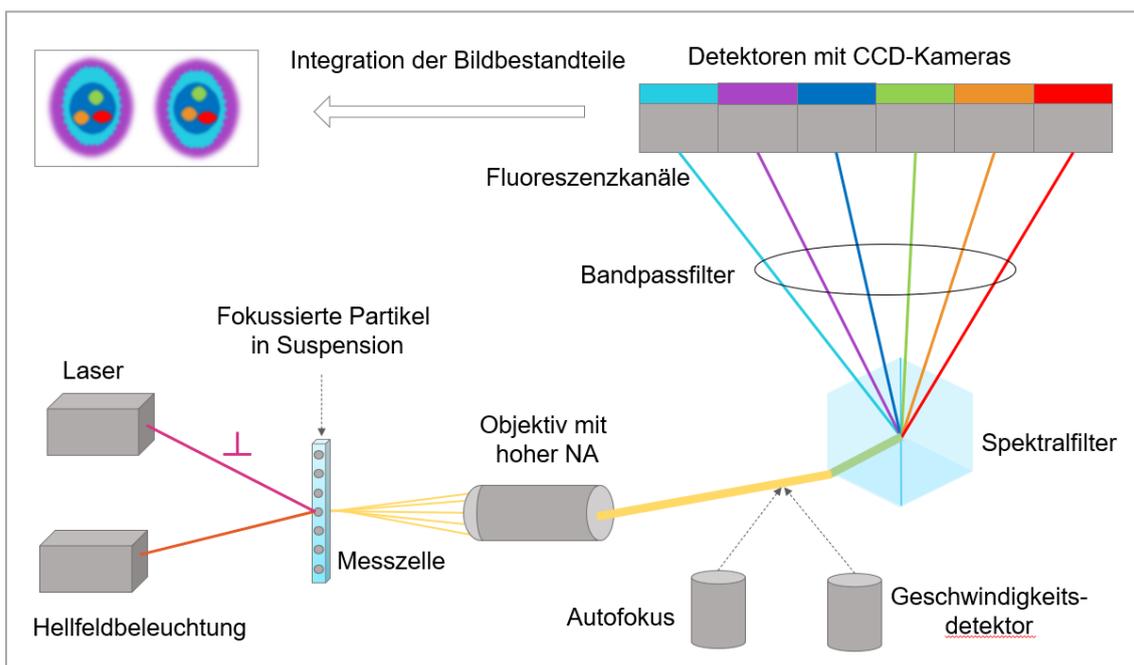


Abb. 9: Schema des Arbeitsvorganges im ImageStreamX-System

Die sich in Suspension befindenden fluoreszenzmarkierten Partikel passieren unter Druck einzeln die Messzelle und werden jeweils durch Hellfeldbeleuchtung und orthogonal auf die Partikel ausgerichtetes Laserlicht verschiedener Wellenlängen angestrahlt. Ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) bündelt das Fluoreszenz- und Streulicht der Partikel. Dieses passiert anschließend einen Spektralfilter und einen Bandpassfilter, wird entsprechend seiner Wellenlängen in verschiedene Spektralbanden aufgeteilt und sechs verschiedenen Fluoreszenzkanälen zugeführt. Bedingt durch den Auftreffwinkel der Banden werden Lichtsignale auf bestimmten Lokalisationen der CCD-Detektoren registriert und bildmorphologisch in Pixel umgewandelt. Mittels zwei CCD-Kameras werden pro Partikel 12 Bilder, bestehend aus 256 Pixeln, generiert. Der TDI-Modus ermöglicht eine synchrone Darstellung sich mit simultaner Geschwindigkeit bewogender Partikel sowie eine Integration verschiedener Bildbestandteile abhängig von den jeweiligen Farbkomponenten (Luminex Corporation, 2020) (Abb. aus eigener Quelle).

Bei der Markierung von Tetraspaninen, welche ebenfalls zu den CD-Molekülen gehören, binden die Antikörper an die äußere extrazelluläre Schleife. Die Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Die

angefärbten Partikel im Medium werden mit einem Epifluoreszenzmikroskop als Signale aufgezeichnet (Abb. 9). Die gemessene Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Anfärbung der detektierten Partikel.

Während mit der konventionellen Durchflusszytometrie Partikel $\leq 300\text{nm}$ detektiert werden können, ist es mit der IFCM möglich, Teilchen mit einer Größe von 100-200nm, bspw. auch sEV-Präparate, zu erfassen. Die Bildverarbeitung kann mittels Hellfeld-, Dunkelfeld- und Fluoreszenzmodus erfolgen (Luminex Corporation, 2020). Quantifizierte Signalintensitäten werden durch gekoppelte Gerätekameras bildlich verarbeitet (Abb. 9, Abb. 10).

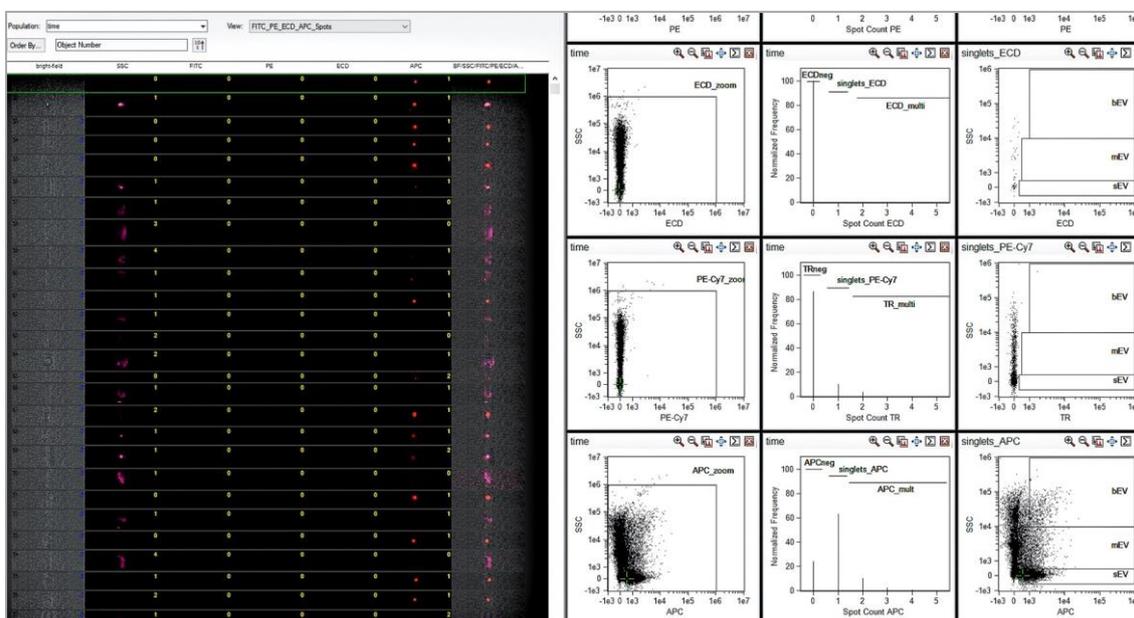


Abb. 10: Bildverarbeitung der EV-Analyse mittels der IDEAS v6.2 Software

Die Aufzeichnungen der detektierten, für einen Immunfluoreszenzfarbstoff positiven Ereignisse können mittels der IDEAS v6.2 Software in Diagrammen dargestellt werden, hier bspw. für den APC-Kanal (Abb. aus eigener Quelle).

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete bildgebende Durchflusszytometer Amnis ImageStreamX MkII ermöglicht eine multispektrale Bildverarbeitung (Abb. 9, Abb. 10) auf bis zu 12 Kanälen. Durch ein System mit zwei Kameras werden bis zu 12 Bilder pro Objekt erfasst. Die in das Objekt integrierte CCD-Kamera (Charge-coupled Device) arbeitet elektronisch im TDI-Modus (Time Delay Integration). Pixel, welche sich

synchron mit der Geschwindigkeit des fließenden Objekts (Zelle) bewegen, werden mit dem Geschwindigkeitserkennungssystem gemessen (Luminex Corporation, 2020).

Die Benutzeroberfläche ist in verschiedene Bereiche unterteilt: In der Bildergalerie werden Aufnahmen aus den Kanälen präsentiert, und im Arbeitsbereich können verschiedene Diagramme mit Auftragung der unterschiedlichen Zellpopulationen aufgezeichnet werden (Abb. 10). Ein Bereich mit Steuerelementen dient der Kontrolle der Gerätefunktion. Die Darstellungen können manuell modifiziert werden (Luminex Corporation, 2020).

3.2.7 Probenaufbereitung von sEV-Präparaten

Die Proben wurden auf Eis innerhalb einer Stunde in das Institut für Transfusionsmedizin der Universität Duisburg-Essen gebracht und dort bei -20C° eingefroren. Zur Probenanalyse wurden nach dem Auftauen $50\ \mu\text{l}$ pro Probe in ein Eppendorf-Cup pipettiert und zur Reinigung von größeren Partikeln und Zellbestandteilen bei 4°C und 10.000g für 10 Minuten erneut zentrifugiert. Folglich befanden sich frei in der Gelenkflüssigkeit lediglich Partikel, die circa $220\ \text{nm}$ oder kleiner im Durchmesser und somit mit erhöhter Wahrscheinlichkeit sEV-Präparate waren.

Anschließend wurden die sEV-Präparate in der Gelenkflüssigkeit mit murinen fluoreszenzmarkierten Antikörpern vom Typ IgG gegen die Tetraspanine CD9, CD63 und CD82 sowie gegen CD66b und HLA-DR angefärbt. Da sich in der Lösung Antikörperkonglomerate bilden und die Antikörper nicht mehr korrekt an ihr Zielantigen binden können, wurden die Antikörperlösungen vorher für 10 Minuten bei 17.000g zentrifugiert, so dass im verwendeten Überstand einzelne funktionsfähige Antikörperpartikel verblieben. Als Kontrolle, ob die detektierten Signale v.a. durch sEVs entstanden sind, wurde eine Negativkontrolle mit dem Detergenz NP-40 durchgeführt, welches EV-Präparate lysierte.

Um die Viskosität der Proben zu verringern und die Trennung einzelner Partikel voneinander zu ermöglichen, wurden die Proben nach dem Schema in Tab. 8 mit PBS verdünnt und mit der zentrifugierten Antikörperlösung versetzt.

Zur Anfärbung von CD9 wurde ein mit PE (Phycoerythrin) konjugierter Antihuman-Antikörper gegen CD9 verwendet, zur Anfärbung von CD63 und CD66b ein mit APC (Allophycocyanin) konjugierter Antihuman-Antikörper gegen CD63 und CD66b. Zur

Darstellung von CD82 und HLA-DR wurden ein PE-konjugierter Antihuman-CD82-Antikörper und ein mit ECD (Electron Coupled Dye, Phycoerythrin-Texas Red) konjugierter Antihumanantikörper gegen HLA-DR eingesetzt. Die Konzentrationen der Antikörper unterschieden sich je nach Zielstruktur, nämlich 10nM für CD9, 12nM für CD63, 20nM für CD66b, 13nM für CD82 und 1nM für HLA-DR. Außerdem erfolgten Isotypkontrollen mit murinen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IgG1 (gleicher Ig-Isotyp an denselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt), um zu überprüfen, in welchem Ausmaß die Primärantikörper unspezifisch an andere Strukturen als das jeweilige Antigen gebunden haben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 60 Minuten dunkel inkubiert und danach vierfach mit PBS verdünnt, um die Reaktion der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper mit ihrem Zielantigen abzustoppen. Folglich ergab sich für die Proben ein Verdünnungsfaktor von 1:50 für CD9 und 1:20 für CD63, CD66b, CD82 und HLA-DR (Tab. 8). Für jede Probe wurden jeweils zwei Ansätze pro Antikörper vorbereitet.

Reagenz	CD9	CD63, CD66b, CD82, HLA-DR	NP-40
Antikörperlösung in μl	1	1	
PBS in μl	22	19	
Probe in μl	2	5	
angefärbtes Volumen in μl	25	25	
PBS nach Inkubation in μl	+75	+75	+25
Endvolumen in μl	100	100	50
NP-40 2 in μl %			100

Tab. 8: Mischungsschema der Antikörperlösung und Gelenkflüssigkeit

Anschließend wurden die verdünnten Proben mit dem Vortexer durchmischt. Es wurden pro Probe je 100 μl auf Mikrotiterplatten mit U-Boden und jeweils 96 Wells gegeben (48 Mal 2 Ansätze für CD9, CD63, CD66b, HLA-DR und CD82). Die Platten wurden mit einer Schutzfolie abgeklebt. Zuletzt erfolgte die Probenanalyse mit Amnis ImageStreamX MkII.

3.2.8 Proben- und Datenanalyse mit Amnis ImageStreamX MkII

Aus dem im Amnis ImageStreamX MkII eingebauten Probengeber konnten alle Proben in den 96-Well-Platten analysiert werden. Die Erfassungszeit pro Probe betrug 5 (bis 30)

Minuten. Die Messungen erfolgten in 60-facher Vergrößerung mit niedriger Durchflussrate und unter maximaler Lasereinstellung (375nm: 70mW; 488nm: 100mW; 561nm: 200mW; 642nm: 150mW; 785nm: 70mW). Um die jeweiligen Fluorochrome bestmöglich anzuregen, wurden verschiedene Lasereinstellungen mit unterschiedlichen Wellenlängen und Filterspektren eingesetzt. PE wurde in Kanal 3 (Filter 560-595nm), ECD in Kanal 4 (Filter 592-642nm), SSC in Kanal 6 (Filter 756-780nm) und APC in Kanal 11 (Filter 642-745nm) erfasst.

Zur Datenanalyse wurde die IDEAS Software v6.2 genutzt. Die antikörperspezifischen Fluoreszenzsignale wurden für jeden registrierten Partikel aufgezeichnet (Abb. 10). Zur graphischen Darstellung wurde eine kombinierte Maskenfunktion angewandt. Auf der X-Achse wurde die Menge an erfassten fluoreszierenden Partikeln aufgetragen, auf der Y-Achse als side scatter (SSC) die Gesamtmenge an erfassten Partikeln. Mit der Nutzung der IDEAS Software stehen mehrere Maskenfunktionen zur Verfügung (Abb. 10), um die EV-Präparate genauer zu quantifizieren und deren detaillierte morphologische Eigenschaften zu erfassen (Görgens et al., 2019). Bei der Durchflusszytometrie können ab einer bestimmten Partikelkonzentration mehrere Teilchen, welche sich nah aneinander befinden, gleichzeitig als ein einziges Signal (als Schwarm) detektiert werden (Görgens et al., 2019). Es wurde die sog. Schwarmerkennung genutzt, um Signale mit einem starken “side-scatter“-Effekt auszuschließen.

3.2.9 Statistische Methoden

Die Daten wurden mithilfe der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2016 dokumentiert und mit dem Statistikprogramm SPSS Version 25 ausgewertet. Grafiken wurden mit SPSS und der Statistiksoftware GraphPadPrism Version 8.3.1. erstellt. Relative und absolute Häufigkeiten wurden für alle Parameter bestimmt und auf Basis der deskriptiven Statistik Mittelwert, Standardabweichung, Median, Perzentile, Interquartilbereich, Minimum, Maximum und Spannweite ermittelt (abhängig vom jeweiligen Skalenniveau). Genaue Angaben hierzu finden sich in Tab. 10-24.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots (von Minimum zu Maximum), Balkendiagrammen und Kreisdiagrammen. Für die Testverfahren Serum-

CRP, Leukozytenzahl im Blut und synoviale Leukozytenesterase wurden Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Grenzwerte ermittelt.

Für die Partikelzahl an CD9, CD63, CD66b, HLA-DR und CD82 in Korrelation mit dem Vorliegen einer PPI wurde eine ROC-Kurve erstellt. Zudem wurden unter Ermittlung des maximalen Youden-Index Grenzwerte der Partikelzahl zur Diskriminierung zwischen septischer und aseptischer Lockerung festgelegt und für diese jeweils Sensitivität und Spezifität bestimmt.

Hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und AUC der festgelegten Grenzwerte wurden 95%-Konfidenzintervalle (kurz 95%-KI) berechnet.

Die Grundgesamtheit wurde jeweils auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test für kleine Stichproben (Anzahl $n=48$) untersucht. Datensätze, die eine Normalverteilung zeigten, wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben auf Signifikanz geprüft. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben getestet. Für nominal- und ordinalskalierte Merkmale wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

Für die Angabe des Signifikanzniveaus wurden folgende p-Werte verwendet:

$p > 0,05$ nicht signifikant

$p < 0,05$ signifikant

$p < 0,01$ hoch signifikant

4 ERGEBNISSE

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Geschlechts- und Altersverteilung in beiden Gruppen

In die Diagnosestudie wurden insgesamt 48 Teilnehmer eingeschlossen. Um die Wertigkeit verschiedener EV-Marker bei der Diagnostik der PPI zu vergleichen, wurden die Probanden anhand der Majorkriterien der 2018 modifizierte Konsensusklassifikation in eine aseptische Gruppe und eine sog. septische Gruppe (in dieser Gruppe lag eine PPI vor) aufgeteilt. In der aseptischen Gruppe befanden sich 35 Patienten (72,9%), in der septischen Gruppe 13 Patienten (27,1%).

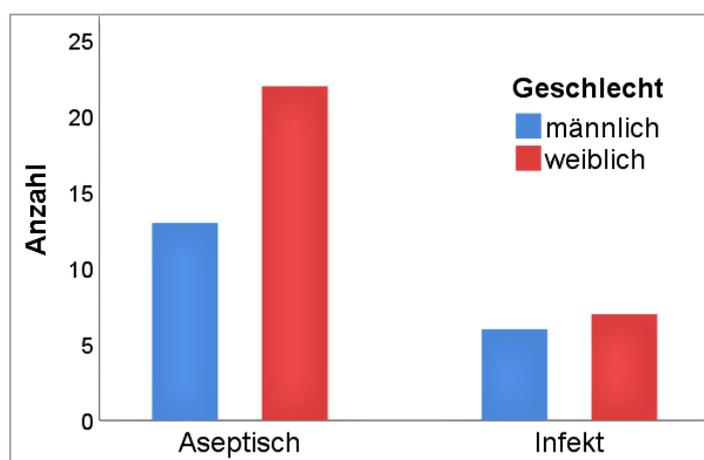


Abb. 11: Geschlechterverteilung in beiden Gruppen

Gruppe	Männlich	Weiblich
Gesamt (n=48)	19 (39,6%)	29 (60,4%)
Aseptisch (n=35)	13 (37,1%)	22 (62,9%)
Infekt (n=13)	6 (46,2%)	7 (53,8%)

Tab. 9: Absolute und relative Häufigkeiten der Geschlechterverteilung

Das Gesamtkollektiv der Studie bestand aus 29 Probandinnen (60,4%) und 19 Probanden (39,6%) (Abb. 11, Tab. 9). Die aseptische Gruppe umfasste 22 Teilnehmerinnen (62,9%) und 13 Teilnehmer (37,1%), die septische Gruppe 7 Patientinnen (53,8%) und 6 Patienten (46,2%). Die Geschlechterverteilung in beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p=0,571$).

Das Alter der Probanden zeigte sich im Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Das mediane Alter der Patienten im Gesamtkollektiv betrug 75,5 Jahre (IQR 17 Jahre, Spannweite 54 Jahre).

In der aseptischen Gruppe lag der Median bei 77 Jahren (IQR 16 Jahre). Der jüngste Patient war 45 Jahre alt, der älteste Patient 88 Jahre. In der septischen Gruppe erwies sich das mediane Alter mit 69 Jahren als geringer (IQR 25,5 Jahre, jüngster Patient 35 Jahre, ältester Patient 89 Jahre) (Abb. 12, Tab. 10).

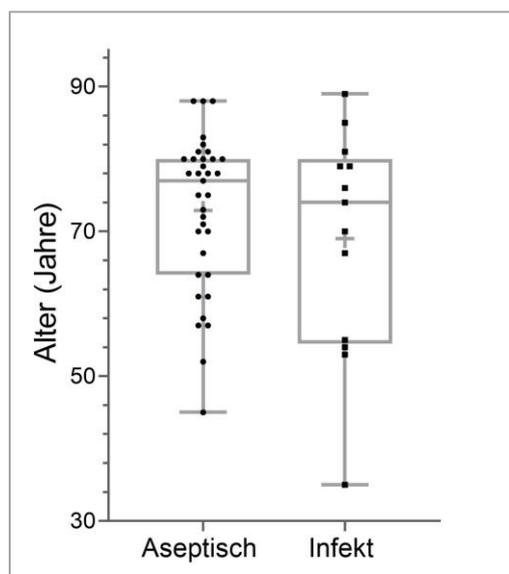


Abb. 12: Altersverteilung in beiden Gruppen

Gruppe	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Mittelwert	71,83	72,89	69
Std.-Abw.	12,13	77	15,58
Minimum	35	45	35
25%-Perzentile	64	64	54,50
Median	75,50	10,65	74
75%-Perzentile	80	80	80
IQR	16	16	25,50
Maximum	89	88	89
Spannweite	54	43	54

Tab. 10: Alter der Patienten in Jahren – Zusammenfassung

Es ließ sich eine rechtsschiefe Verteilung des Alters im Gesamtkollektiv sowie in beiden Gruppen beobachten. Die Mehrzahl der Patienten lag in der Altersgruppe von 70 bis 79 Jahren (18 Patienten), gefolgt von der Altersgruppe zwischen 80 und 89 Jahren (15

Probanden). Zur Signifikanztestung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und ergab, dass sich die Altersverteilung in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied ($p=0,515$).

4.1.2 BMI und Vorerkrankungen der Probanden

Die erfassten Werte zeigten sich anhand des Shapiro-Wilk-Tests nicht normalverteilt. Der mediane BMI des gesamten Patientenkollektivs betrug $28,4 \text{ kg/m}^2$ (IQR $10,3 \text{ kg/m}^2$, Spannweite $35,7 \text{ kg/m}^2$). In der aseptischen Gruppe lag der Median bei $28,1 \text{ kg/m}^2$ (IQR $10,3 \text{ kg/m}^2$, Minimum $21,4 \text{ kg/m}^2$, Maximum 52 kg/m^2). In der septischen Gruppe war der mediane BMI mit $30,6 \text{ kg/m}^2$ höher (IQR $10,3 \text{ kg/m}^2$, Minimum $20,2 \text{ kg/m}^2$, Maximum $55,9 \text{ kg/m}^2$) (Abb. 13, Tab. 11). Anhand des Mann-Whitney-U-Tests ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich des BMI feststellen ($p=0,232$).

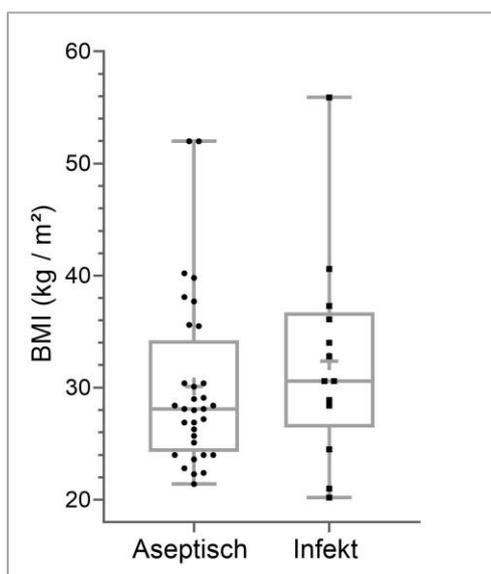


Abb. 13: Verteilung des BMI in beiden Gruppen

Eine Aufteilung der erhobenen BMI nach der Klassifikation der WHO in die Kategorien Untergewicht ($\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$), Normalgewicht ($\text{BMI} 18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$), Präadipositas / Übergewicht ($\text{BMI} 25,0\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$), Adipositas Grad 1 ($\text{BMI} 30,0\text{-}34,9 \text{ kg/m}^2$), Adipositas Grad 2 ($\text{BMI} 35,0\text{-}39,9 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas Grad 3 ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) findet sich in Tab. 12.

Gruppe	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Mittelwert	30,7	30,0	32,4
Std.-Abw.	8,0	7,5	9,3
Minimum	20,2	21,4	22,2
25%-Perzentile	25,3	25,1	26,4
Median	28,4	28,1	30,6
75%-Perzentile	35,6	35,4	36,7
IQR	10,3	10,3	10,3
Maximum	55,9	52,0	55,9
Spannweite	25,7	30,6	33,7

Tab. 11: BMI der Studienteilnehmer in kg/m² - Zusammenfassung

WHO-Klassifikation	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Normalgewicht BMI 18,5-24,9	11 (22,9%)	8 (22,9%)	3 (23,1%)
Präadipositas BMI 25,0-29,9	17 (35,4%)	15 (42,8%)	2 (15,3%)
Adipositas I BMI 30,0-34,9	7 (14,6%)	3 (8,6%)	4 (30,8%)
Adipositas II BMI 35,0-39,9	8 (16,7%)	6 (17,1%)	2 (15,4%)
Adipositas III BMI \geq 40	5 (10,4%)	3 (8,6%)	2 (15,4%)

Tab. 12: Häufigkeiten des BMI in kg/m² nach WHO-Klassifikation

Unter Berücksichtigung der uns bekannten Vorerkrankungen der Patienten stellten sich insgesamt 50% der Studienteilnehmer als multimorbide heraus. Das bedeutet, dass sie von 3 oder mehr chronischen Krankheiten betroffen waren (DEGAM, 2017). Dazu gehörten 45,7% der aseptischen und ein größerer Anteil der septischen Gruppe, nämlich 61,5% (Abb. 14). 75% der Patienten litten unter mindestens einer chronischen Krankheit (davon 68,4% der aseptischen und 92,3% der septischen Gruppe) (Tab. 13).

Am häufigsten, nämlich bei 33 Patienten insgesamt, davon bei 65,7% der aseptischen und bei 76,9% der septischen Gruppe, zeigten sich Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (v.a. arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz). An zweiter Stelle standen Stoffwechselerkrankungen wie Hypercholesterinämie, Hyperurikämie und Hypothyreose (Gesamtkollektiv: 35,4%; aseptische Gruppe 28,6%; septische Gruppe 53,8%). Es folgten darauf Diabetes mellitus Typ II als Stoffwechselerkrankung separat betrachtet (insgesamt. 20,8%, davon 25,7% der aseptischen und ein Patient bzw. 7,7% der septischen Gruppe) und mit denselben Häufigkeiten im Gesamtkollektiv die chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen COPD und Asthma bronchiale (bei 20% der aseptischen und 23,3% der septischen Gruppe) (Tab. 13).

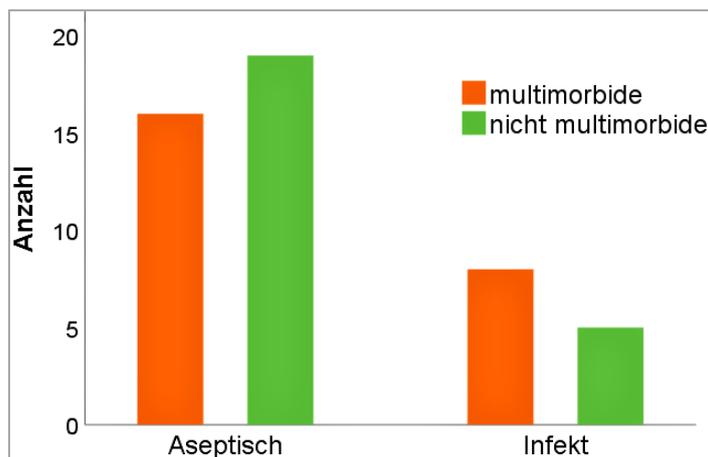


Abb. 14: Anteil der multimorbiden Patienten in beiden Gruppen

Erkrankung	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Septisch (n=13)
≥1 chronische Erkrankung	36 (75%)	24 (68,4%)	12 (92,3%)
Multimorbidität (3 o. mehr chron. Erkrankungen)	24 (50%)	16 (45,7%)	8 (61,5%)
Kardiovaskuläre Erkrankungen	33 (68,8%)	23 (65,7%)	10 (76,9%)
Stoffwechselerkrankungen (u.a. Hypothyreose, Hypercholesterinämie, Hyperurikämie)	17 (35,4%)	10 (28,6%)	7 (53,8%)
Diabetes mellitus Typ II	10 (20,8%)	9 (25,7%)	1 (7,7%)
COPD / Asthma	10 (20,8%)	7 (20%)	3 (23,1%)
maligne Erkrankungen	3 (6,3%)	2 (5,7%)	1 (7,7%)
Sonstige	21 (43,8%)	11 (31,4%)	10 (76,9%)

Tab. 13: Häufigkeiten der Vorerkrankungen der Patienten

Diverse seltener auftretende, heterogene Erkrankungen (z.B. chronische Niereninsuffizienz, Morbus Werlhoff, Hämophilie A, Faktor-V-Leiden-Mutation, Fibromyalgie, Z.n. Apoplex, Z. n. tiefer Beinvenenthrombose/Lungenarterienembolie und Abusus von Tetrahydrocannabinol) wurden unter dem Begriff „Sonstige“ zusammengefasst und lagen bei 21 Patienten im Gesamtkollektiv vor, davon bei 31,4% der aseptischen Gruppe und deutlich häufiger mit 76,9% in der septischen Gruppe. Tumorerkrankungen (jeweils einmal Mamma-, Prostata- und Analcarcinom) traten in der Vorgeschichte von 2 Patienten der aseptischen Gruppe und einer Patientin der septischen Gruppe auf (insgesamt 6,3%). Trotz tendenziell erhöhter Morbidität in der septischen Gruppe unterschieden sich beide Gruppen hinsichtlich der Häufigkeit der genannten Faktoren nicht statistisch signifikant voneinander (Ergebnisse des Chi-Quadrat Tests für

Multimorbidität $p=0,33$; Herzkreislauferkrankungen $p=0,457$;
 Stoffwechselerkrankungen $p=0,104$; Diabetes mellitus Typ II $p=0,172$; maligne
 Erkrankungen $p=0,801$; COPD/Asthma $p=0,816$; Sonstige $p=0,005$).

4.1.3 Gelenkbeteiligung der Patienten

In die Studie wurden 20 Patienten mit einer Hüft-TEP, 26 Probanden mit einer Knie-TEP und 2 Patienten mit einer Schulter-TEP (Abb. 15, Tab. 14) einbezogen. In der aseptischen Gruppe wurden 15 Hüftgelenke und 19 Kniegelenke untersucht, in der septischen Gruppe 5 Hüftgelenke und 7 Kniegelenke und in beiden Gruppen jeweils ein Schultergelenk. Die Verteilung der verschiedenen Gelenke in der aseptischen und der septischen Gruppe unterschied sich nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p=0,75$).

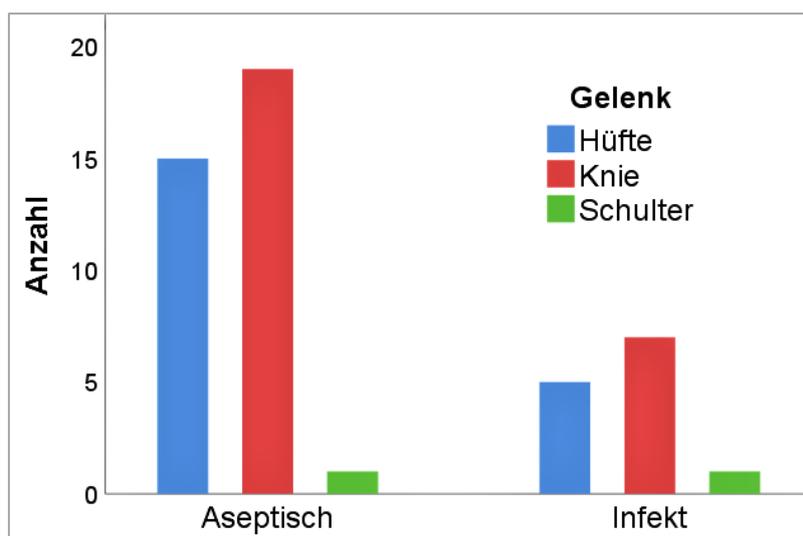


Abb. 15: Verteilung der betroffenen Gelenke in beiden Gruppen

Gruppe	Hüfte	Knie	Schulter
gesamt (n=48)	20 (41,7%)	26 (54,1%)	2 (4,2%)
aseptisch(n=35)	15 (42,8%)	19 (54,3%)	1 (2,9%)
Infekt (n=13)	5 (38,5%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)

Tab. 14: Häufigkeiten der betroffenen Gelenke

4.2 Standarddiagnostik der PPI

4.2.1 Erregerspektrum der PPI in der septischen Gruppe

Der mikrobiologische Nachweis eines Erregers in mindestens 2 verschiedenen Proben (Gewebeproben oder Synovialaspirat) gilt als Majorkriterium zur Diagnose der PPI. Bei der mikrobiologischen Untersuchung der Gelenkflüssigkeit aus der septischen Gruppe konnten ausschließlich bakterielle Erreger nachgewiesen werden (Abb. 16, Tab. 15).

Bei 53,84% lag eine Monoinfektion vor. Eine Mischinfektion mit koagulase negativen Staphylokokken und einem weiteren Erreger zeigte sich bei 2 Patienten. Bei 4 Probanden ergab die mikrobiologische Untersuchung des Gelenkpunktats ein negatives Ergebnis. Folglich beträgt die Sensitivität der Untersuchung 69,23% (95%-KI 42,4 – 87,3%). Der Mehrzahl der nachgewiesenen PPI (53,85%) lag ein Erregerbefall des betroffenen Gelenkes mit Staphylokokken zugrunde.

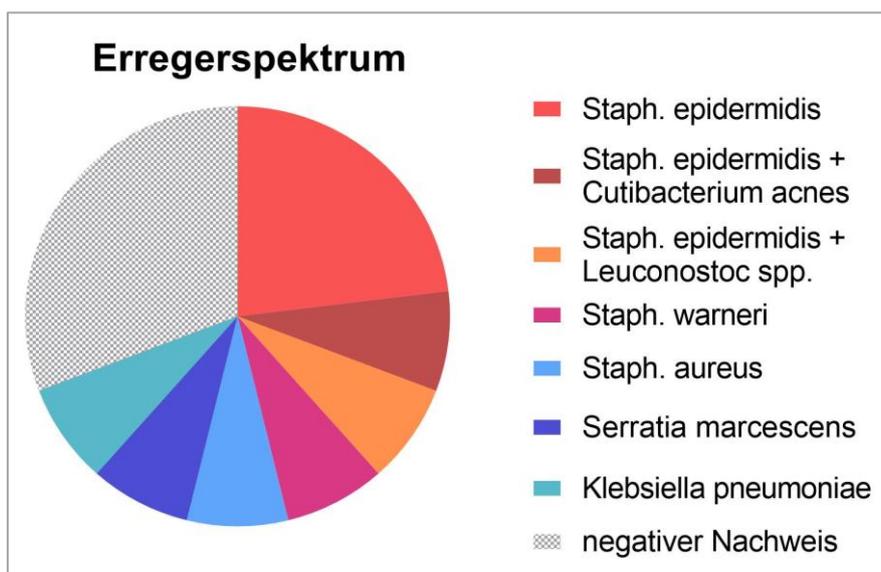


Abb. 16: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Gelenkflüssigkeit

Bei 3 Patienten handelte es sich um eine Monoinfektion mit Staph. epidermidis, bei einer Patientin um eine PPI durch Staph. warneri. Hinsichtlich der Mischinfektionen wurden bei jeweils einem Patienten Staph. epidermidis und Leuconostoc spp. sowie Staph. epidermidis und Cutibacterium acnes nachgewiesen. Folglich lag in der Mehrzahl der Fälle (66,7%) eine PPI durch niedrig-virulente Erreger vor.

Eine PPI des Hüftgelenkes durch die Erreger Staph. aureus, Klebsiella pneumoniae und Serratia marcescens erwies sich bei jeweils einer Patientin (Abb. 16). 2 dieser 3 Patientinnen stellten sich mit Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion (Unwohlsein, Fieber) und einer äußerlich deutlich sichtbaren Schwellung am Hüftgelenk vor, welche sich intraoperativ als ausgedehnter Abszess zeigte.

Erregernachweis	Häufigkeit absolut (relativ)
Staphylococcus epidermidis	3 (23,09)
Mischinfektionen	2 (15,38)
Staphylococcus epidermidis + Leuconostoc spp.	1 (7,69)
Staphylococcus epidermidis + Cutibacterium acnes	1(7,69)
Staphylococcus aureus	1 (7,69)
Staphylococcus warneri	1 (7,69)
Klebsiella pneumoniae	1 (7,69)
Serratia marcescens	1 (7,69)
Negativ	4 (30,77)

Tab. 15: Erregernachweis aus dem Gelenkpunktat in der septischen Gruppe

Besteht eine Fistel zum betroffenen Gelenk, gilt dies als weiteres diagnostisches Majorkriterium der PPI. Eine Fistel lag bei allen 4 Patienten mit negativem Keimnachweis und bei einem Probanden mit positivem Keimnachweis (Staph. epidermidis) vor. Bei 9 Patienten der septischen Gruppe war keine Fistel vorhanden. Das Vorliegen einer Fistel als ein diagnostisches Majorkriterium der PPI zeigt eine Sensitivität von 38,5% (95%-KI 12,7 – 57,6%).

Putrides Punktat wurde bei 7 Patienten der septischen Gruppe (53,8%) gewonnen. Dies betraf alle 3 PPI durch einen hoch-virulenten und 4 PPI durch einen niedrig-virulenten Erreger. Bei den übrigen 6 Probanden der septischen Gruppe (46,2%) und bei allen Patienten der aseptischen Gruppe zeigte sich die Gelenkflüssigkeit teils klar und bernsteinfarben, teils mit Blutbeimengungen tingiert und dadurch bedingt leicht trüb.

4.2.2 Entzündungsparameter im Blut

Die Leukozytenzahl im Blut wurde bei allen Patienten der septischen Gruppe und bei 30 von 35 Probanden der aseptischen Gruppe bestimmt (bei den verbleibenden Patienten entfiel die perioperative Blutentnahme; sie unterzogen sich im Zeitraum der Studie lediglich einer diagnostischen Gelenkpunktion). Anhand des Shapiro-Wilk-Tests zeigte

sich, dass die Werte der Leukozytenzahl im Blut in den Gruppen normalverteilt waren. Bezogen auf das Gesamtkollektiv betrug der Mittelwert $7,46 \pm 1,83$ Leukozyten/nl Blut. Der niedrigste erreichte Wert lag bei 3,58 Leukozyten/nl Blut, der höchste Wert bei 12,92 Leukozyten/nl Blut. Die Patienten der aseptischen Gruppe zeigten im Mittel $7,23 \pm 1,65$ Leukozyten/nl. In der septischen Gruppe befand sich der Mittelwert bei $8,02 \pm 2,17$ Leukozyten/nl (Abb. 17, Tab. 16).

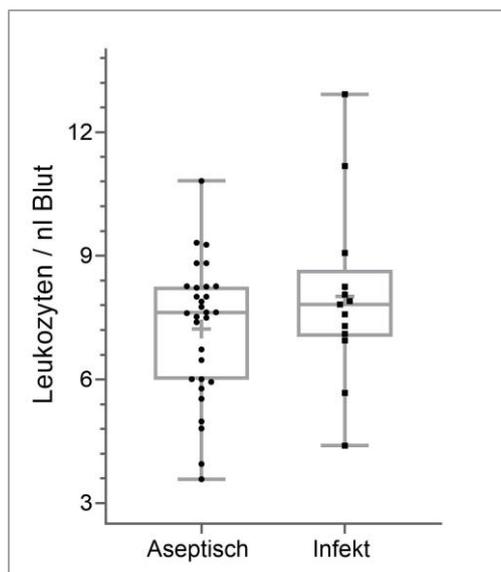


Abb. 17: Verteilung der Leukozytenzahl im Blut beider Gruppen

Gruppe	Gesamt (n=43)	aseptisch (n=30)	Infekt (n=13)
Mittelwert	7,46	7,23	8,02
Std.-Abw.	1,8317	1,65	2,17
Minimum	3,58	3,58	4,39
1. Quartil	6,01	5,99	7,03
Median	7,63	7,62	7,82
3. Quartil	8,25	8,25	8,66
IQR	2,24	2,26	1,63
Maximum	12,92	10,82	12,92
Spannweite	9,34	7,24	8,53

Tab. 16: Leukozytenzahl pro nl Blut – Zusammenfassung

Die Referenzwerte des Labors lagen bei 3,6 Leukozyten/nl Blut als Unter- und 9,2 Leukozyten/nl Blut als Obergrenze. Ein Proband der aseptischen Gruppe befand sich bzgl. der Leukozytenzahl im Blut unterhalb und 3 Probanden der aseptischen und 2

Patienten der septischen Gruppe befanden sich oberhalb der Referenzwerte. Eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut weist folglich eine Sensitivität von 15,4% (95%-KI 2,7 – 42,4%) und eine Spezifität von 10% (95%-KI 3,5 – 25,6%) auf.

Da die Werte der Leukozytenzahl im Blut in der Studienpopulation normalverteilt waren, wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben zur Signifikanztestung angewandt. Er ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Leukozytenzahl im Blut ($p=0,198$).

Als weiterer Entzündungsparameter wurde präoperativ bei 30 von 35 Patienten der aseptischen und bei allen 13 Patienten der septischen Gruppe das Serum-CRP bestimmt. In die Auswertung flossen lediglich definitionsgemäß erhöhte Werte oberhalb der Nachweisgrenze ($>0,5$ mg/dl) von 5 Patienten der aseptischen und 8 Probanden der septischen Gruppe (insgesamt 13 Probanden) mit ein. 25 Patienten der aseptischen und 5 Patienten der septischen Gruppe wiesen einen Serum-CRP-Wert unterhalb der Nachweisgrenze auf.

Der Shapiro-Wilk-Test zeigte keine Normalverteilung der Serum-CRP-Werte der Studienpopulation. Für das Gesamtkollektiv ergab sich ein Median von 2,4 mg/dl (IQR 4,35 mg/dl, Spannweite 26 mg/dl). In der aseptischen Gruppe betrug der Median 1,6 mg/dl (IQR 1,1 mg/dl, Minimum 0,7 mg/dl, Maximum 2,4 mg/dl). In der septischen Gruppe ergab sich ein Median von 5,75 mg/dl (IQR 12,7 mg/dl). Der niedrigste Wert betrug 0,8 mg/dl, der höchste Wert 26,7 mg/dl (vermutlich Ausreißer bei florider PPI) (Abb. 18, Tab. 17). Verwendet man einen CRP-Wert von 1mg/dl gemäß der 2013 modifizierten MSIS-Kriterien als Grenzwert, ergeben sich eine Sensitivität von 53,8% (95%-KI 29,1 – 76,8%) und eine Spezifität von 13,3% (95%-KI 5,3 – 29,7%) für das Vorliegen einer PPI.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied der Serum-CRP-Werte zwischen der aseptischen und der septischen Gruppe ($p=0,093$), wobei beachtet werden sollte, dass lediglich Werte oberhalb der Nachweisgrenze in die Berechnung miteinbezogen werden konnten.

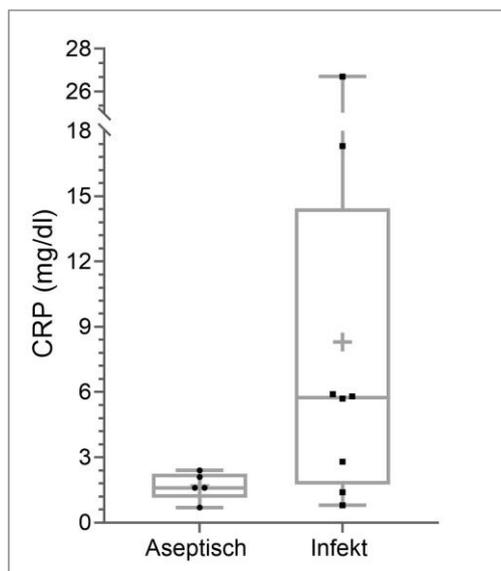


Abb. 18: Verteilung der Serum-CRP Werte >0,5 mg/dl beider Gruppen

Gruppe	Gesamt (n=13)	aseptisch (n=5)	Infekt (n=8)
Mittelwert	5,75	1,68	8,30
Std.-Abw.	7,69	0,65	9,04
Minimum	0,7	0,7	0,8
1. Quartil	1,5	1,15	1,75
Median	2,4	1,6	5,75
3. Quartil	5,85	2,25	14,45
IQR	4,35	1,1	12,7
Maximum	26,7	2,4	26,7
Spannweite	26	1,7	25,9

Tab. 17: Serum-CRP-Werte in mg/dl >0,5 mg/dl – Zusammenfassung

4.2.3 Leukozytenesterasereaktion in der Synovialflüssigkeit

Die Leukozytenesterasereaktion (im Folgenden LE-Reaktion) mittels Teststreifen i.d.R. für die Urinanalyse konnte bei allen 48 Patientenproben durchgeführt werden (Abb. 19, Tab. 18). Je nach Farbumschlag ließ sich auf die ungefähre Menge an Leukozyten in der untersuchten Flüssigkeit schließen. Diese Angaben können abhängig vom Hersteller der Tests variieren und beziehen sich auf die im Rahmen der Studie verwendeten Teststreifen. Ein fehlender Farbumschlag bedeutet ein negatives Ergebnis, ein leichter Farbumschlag (beige), dass lediglich eine Spur („trace“) des Enzyms nachweisbar ist. Verfärbt sich das Feld auf dem Teststreifen rosafarben, ist die Reaktion einfach (+) positiv, und man kann

eine Leukozytenkonzentration von ca. 70 Leukozyten/ μ l Flüssigkeit vermuten. Bei einem hellvioletten Farbumschlag geht man von einer zweifach positiven (++) Reaktion mit einer ungefähren Leukozytenkonzentration von 125 Leukozyten/ μ l und bei einem dunkelvioletten Farbumschlag von einer dreifach positiven (+++) Reaktion mit ca. 500 Leukozyten/ μ l aus. Eine zwei- oder dreifach positive LE-Reaktion gilt nach der 2018 modifizierten Konsensusklassifikation als Minorkriterium für eine PPI.

Insgesamt ergab sich bei 25 Probanden ein negatives Ergebnis; davon gehörten 22 Patienten der aseptischen Gruppe und 3 Patienten der septischen Gruppe an. Eine Spur an Leukozyten konnte in der Gelenkflüssigkeit von insgesamt 14 Probanden, nämlich von 28,6% der aseptischen und 30,8% der septischen Gruppe, nachgewiesen werden. Ein einfach positives Ergebnis zeigte sich bei 12,5% insgesamt, davon 8,6% der aseptischen und 23,1% der septischen Gruppe. Zweifach und dreifach positive Reaktionen konnten lediglich in der septischen Gruppe nachgewiesen werden, nämlich bei 2 Patienten ein zweifach positives Ergebnis und bei einem Probanden ein dreifach positives Ergebnis (Abb. 19).

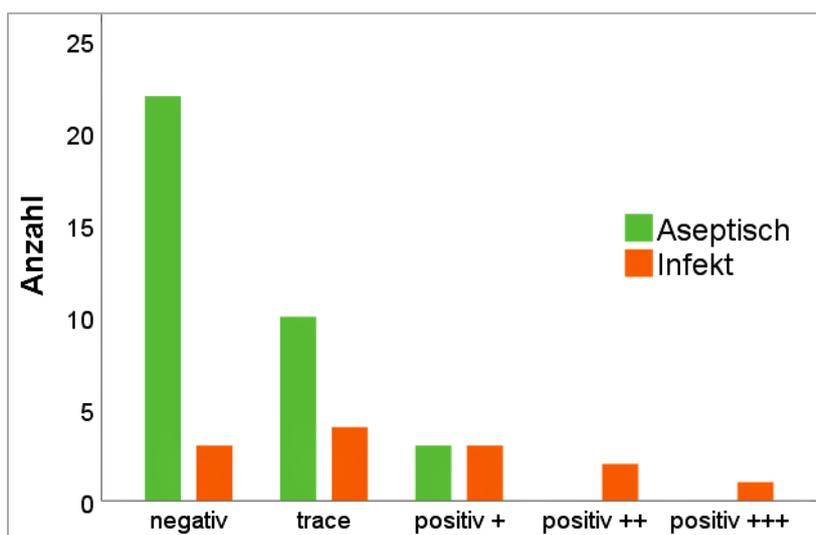


Abb. 19: Verteilung der LE-Reaktion im Gelenkpunktat beider Gruppen

Der Chi-Quadrat-Test zeigte, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Stärke der Leukozytenesterasereaktion in beiden Gruppen bestand ($p=0,014$). Betrachtet man eine einfach positive Reaktion (+) als bereits positives Ergebnis, ergeben sich für dieses Testverfahren eine Sensitivität von 38,5% (95%-KI 17,7 – 64,5%) und eine

Spezifität von 91,4% (95%-KI 77,6 – 97%). Definiert man eine zwei- und dreifach positive Reaktion für das Vorliegen einer PPI als positives Ergebnis, zeigen sich eine Sensitivität von 23,1% (95%-KI 8,2 – 50,3%) und eine Spezifität von 100% (95%-KI 90,1 – 100%).

LE-Reaktion	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Negativ	25 (52,1%)	22 (62,9%)	3 (23,1%)
Trace	14 (29,1%)	10 (28,6%)	4 (30,8%)
Positiv + (\approx 70 Leukozyten/ μ l)	6 (12,5%)	3 (8,5%)	3 (23,1%)
Positiv ++ (\approx 125 Leukozyten/ μ l)	2 (4,2%)	0	2 (15,4%)
Positiv +++ (\approx 500 Leukozyten/ μ l)	1 (2,1%)	0	1 (7,6%)

Tab. 18: Häufigkeiten der LE-Reaktion im Gelenkpunktat

4.3 Messergebnisse möglicher sEV-Marker

CD9, CD63 und CD66b wurden in allen 48 Proben detektiert und quantifiziert. CD82 und HLA-DR konnten in allen Proben der aseptischen Gruppe und in 12 von 13 Proben der septischen Gruppe (insgesamt n=47) untersucht werden, da sich das Probenmaterial einer Probandin zu viskös zeigte. Aus zwei Ansätzen wurde der Mittelwert der gemessenen Partikel berechnet und als Messwert verwendet. Daher erscheinen auch Ergebnisse wie Minimum, Maximum, Median und Interquartilbereich mit bis zu zwei Nachkommastellen, obgleich ganze Partikel detektiert wurden.

Der Shapiro-Wilk-Test ergab für alle untersuchten Marker keine Normalverteilung der Messergebnisse, so dass als zentrales Lagemaß der Median, als Streuungsmaß der Interquartilbereich (IQR) und zur Signifikanztestung der Mann-Whitney-U-Test gewählt wurden (Tab. 19-23). CD9 und CD63 als sog. „pan-EV“ Marker ließen sich in höheren Konzentrationen nachweisen als CD66b, CD82 und HLA-DR.

4.3.1 Deskriptive Statistik und Signifikanztestung der sEV-Marker

Für CD9 ergab sich im Gesamtkollektiv ein Median von 66.003.774,1 Partikeln/ml Synovialflüssigkeit (im Folgenden P/ml). In der aseptischen Gruppe zeigte sich mit 75.021.961,75 P/ml eine höhere mediane Partikelzahl pro ml als in der septischen Gruppe mit 47.955.248,33 P/ml (Abb. 20, Tab. 19).

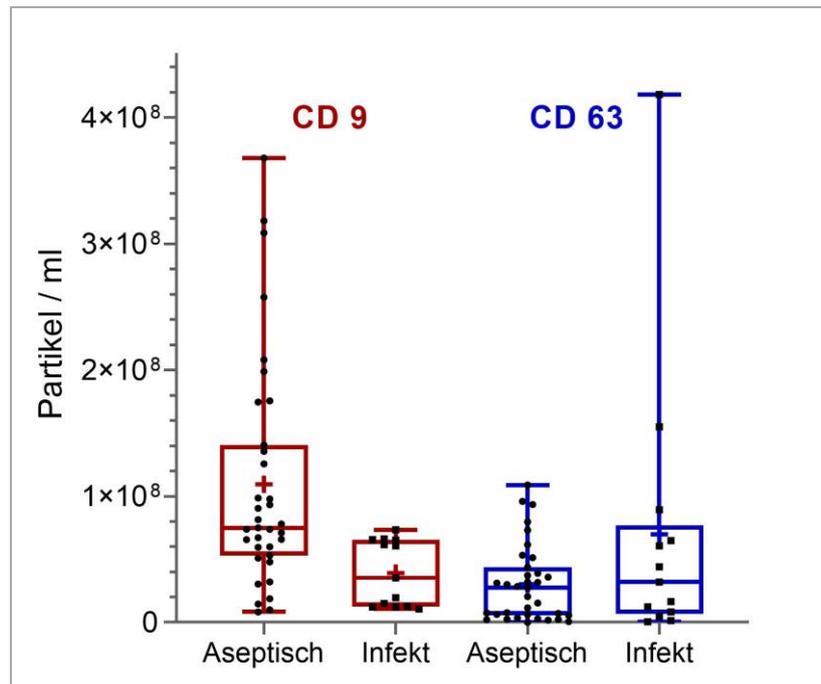


Abb. 20: Verteilung von CD9 und CD63 in der Gelenkflüssigkeit

Für die gemessene Konzentration an CD9 in der Gelenkflüssigkeit ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der septischen und der aseptischen Gruppe ($p=0,002$). Abb. 22 zeigt, dass CD9 bei der aseptischen Gruppe in höheren Konzentrationen als in der septischen Gruppe nachgewiesen wurde.

Gruppe	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Mittelwert	90.392.668,66	109.394.303,19	41.619.684,29
Std.-Abw.	84.243.446,51	90.532.180,55	25.836.147,30
Minimum	8.323.750,44	8.323.750,44	12.051.054,75
25%-Perzentile	32.841.199,39	53.140.675,00	12.413.173,28
Median	66.003.774,10	75.021.961,75	47.955.248,33
75%-Perzentile	98.420.009,40	140.511.211,50	65.506.406,10
IQR	65.578.810,01	87.370.536,50	52.316.574,41
Maximum	367.889.670,50	367.889.670,50	73.362.921,65
Spannweite	359.565.920,07	359.565.920,07	61.311.866,90

Tab. 19: CD9 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung

Für CD63 betrug die mediane Partikelzahl pro ml in Hinblick auf das gesamte Patientenkollektiv 27.928.609,6 P/ml. In der aseptischen Gruppe ergab sich ein Median von 27.375.714,5 P/ml, in der septischen Gruppe ein höherer Median von 31.844.050

P/ml (Tab. 20). Abb. 20 zeigt, dass das Maximum für CD63 in der septischen Gruppe höher liegt als in der aseptischen Gruppe, die zentrale Tendenz zwischen den Gruppen jedoch ähnlich ist. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied der Verteilung der Partikelkonzentration zwischen aseptischer und septischer Gruppe ($p=0,372$).

Gruppe	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Mittelwert	40.943.749,36	30.221.328,27	69.811.806,13
Std.-Abw.	65.428.703,24	30.409.373,87	113.616.493,80
Minimum	180.049,90	180.049,90	496.051,60
25%-Perzentile	5.854.387,98	5.314.0675,00	6.585.641,79
Median	27.928.609,60	27.375.714,50	31.844.050,00
75%-Perzentile	52.761.658,06	140.511.211,50	77.059.235,18
IQR	46.907.270,09	87.370.536,50	70.473.593,39
Maximum	418.258.919,00	367.889.670,50	418.258.919,00
Spannweite	418.078.869,10	359.565.920,07	417.762.867,40

Tab. 20: CD63 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung

Für CD66b lag im Gesamtkollektiv die mediane Partikelzahl bei 1.686.806,64. In der aseptischen Gruppe betrug der Median 1.656.181,23 P/ml. Der Median der aseptischen Gruppe lag bei 1.747.248,27 P/ml (Tab. 21). Abb. 21 deutet auf eine annähernd gleiche Werteverteilung mit höheren Messergebnissen oberhalb der 75. Perzentile in der aseptischen Gruppe hin. Die Konzentration von CD66b unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant ($p=0,634$).

Gruppe	Gesamt (n=48)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=13)
Mittelwert	2.611.958,19	2.528.606,34	2.836.367,01
Std.-Abw.	2.216.627,64	2.239.845,36	2.225.962,51
Minimum	595.891,56	595.891,56	655.280,23
25%-Perzentile	1.257.852,49	1.121.550,35	1.308.550,430
Median	1.686.806,64	1.656.181,23	1.747.248,27
75%-Perzentile	2.981.565,49	2.932.695,96	4.452.695,89
IQR	1.723.713,00	1.811.145,61	3.144.145,47
Maximum	9.179.546,32	9.179.546,32	7.157.818,86
Spannweite	8.583.654,76	8.583.654,76	6.502.538,63

Tab. 21: CD66b (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung

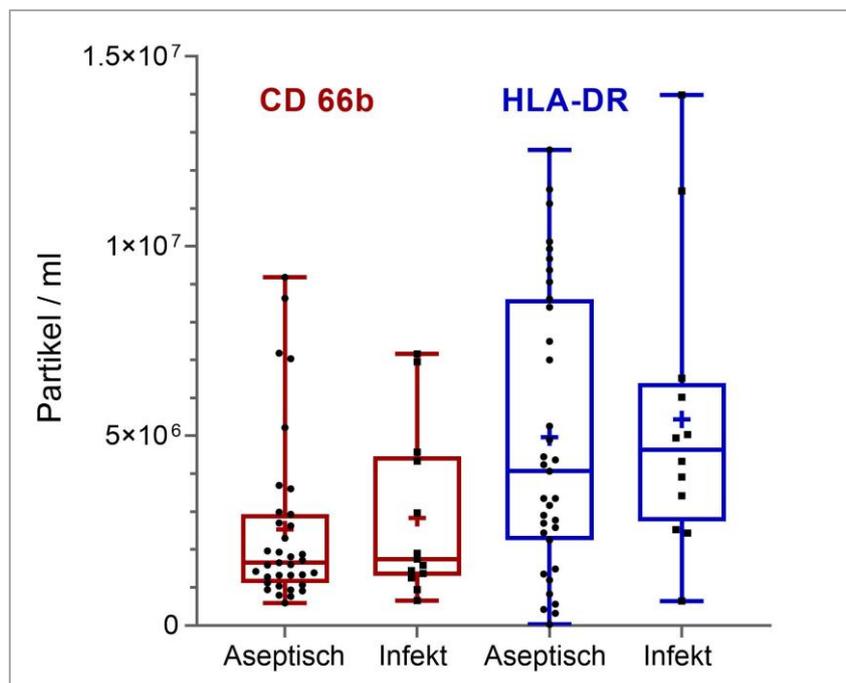


Abb. 21: Verteilung von CD66b und HLA-DR im Gelenkpunktat

Die mediane Partikelzahl pro ml lag für HLA-DR hinsichtlich des Gesamtkollektivs bei 4.241.829,41 P/ml. In der aseptischen Gruppe zeigte sich mit 4.065.777,07 P/ml ein niedrigerer Median als in der septischen Gruppe mit 4.634.517,31 P/ml (Tab. 22).

Gruppe	Gesamt (n=47)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=12)
Mittelwert	5.085.105,27	4.965.281,76	5.434.590,50
Std.-Abw.	3.703.004,07	3.716.146,48	3.805.062,22
Minimum	29.926,90	29.926,90	645.420,47
25%-Perzentile	2.442.687,10	2.251.533,40	2.748.860,06
Median	4.241.829,41	4.065.777,07	4.634.517,31
75%-Perzentile	8.392.444,03	8.610.250,49	6.394.160,04
IQR	5.949.756,93	6.358.717,09	3.645.299,98
Maximum	13.984.110,27	12.542.215,75	13.984.110,27
Spannweite	13.954.183,37	12.512.288,85	13.338.689,80

Tab. 22: HLA-DR (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit - Zusammenfassung

Abb. 21 zeigt keinen eindeutigen Unterschied der zentralen Lage der Werte zwischen den Gruppen, jedoch eine stärkere Streuung der Werte oberhalb der 75. Perzentile in der aseptischen Gruppe. Hinsichtlich der Konzentration von HLA-DR im Gelenkpunktat unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant ($p=0,558$).

Für CD82 ergab sich im Gesamtkollektiv ein Median von 4.241.829,41 P/ml (IQR 2.350.697,92 P/ml, Spannweite 53.045.578,1465 P/ml). Der Median in der aseptischen Gruppe lag mit 741.541,11 P/ml deutlich niedriger als in der septischen Gruppe mit 4.104.713,89 P/ml (Tab. 23, Abb. 22). CD82 war bei der septischen Gruppe in der Gelenkflüssigkeit in höherer Konzentration als bei der aseptischen Gruppe nachweisbar (Abb. 22). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$).

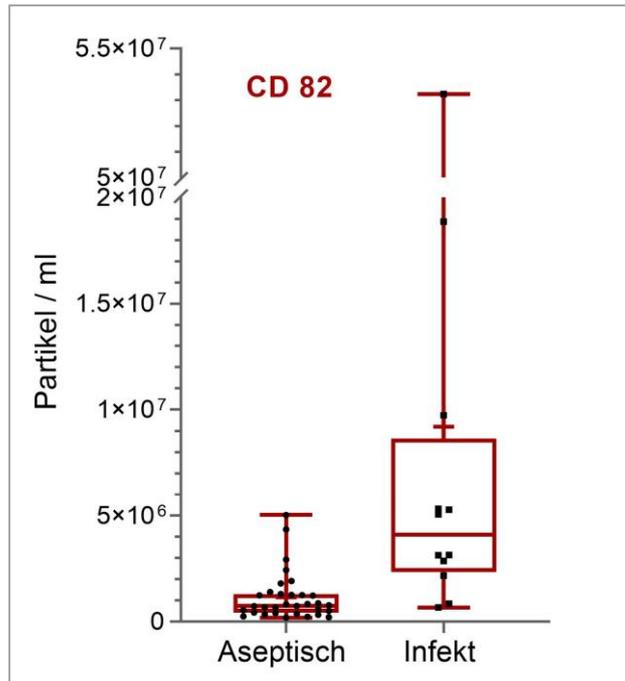


Abb. 22: Verteilung von CD82 in der Gelenkflüssigkeit

Gruppe	Gesamt (n=47)	Aseptisch (n=35)	Infekt (n=12)
Mittelwert	3.168.924,47	1.102.413,96	9.196.246,78
Std-Abw.	8.093.971,87	1.108.409,23	14.729.032,63
Minimum	195.331,92	195.331,91	666.944,10
25%-Perzentile	517.260,80	367.799,80	2.342.444,11
Median	4.241.829,41	741.541,11	4104713,89
75%-Perzentile	2.867.958,72	1.310.211,27	8.631.023,74
IQR	2.350.697,92	942.411,47	6.288.579,63
Maximum	53.240.910,06	5.036.395,83	53.240.910,06
Spannweite	53.045.578,15	4.841.063,92	666.944,10

Tab. 23: CD82 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung

4.3.2 ROC-Analyse der sEV-Marker als diagnostische Tools bei der PPI

Für die in der Synovialflüssigkeit in sEV-Präparaten nachgewiesenen Marker wurden eine Grenzwertoptimierungskurve (Abb. 23) erstellt und die AUC berechnet (Tab. 24). Die graue Diagonale stellt mit einer AUC von 0,5 ein zu erwartendes Ergebnis bei einem zufälligen Vorgang dar.

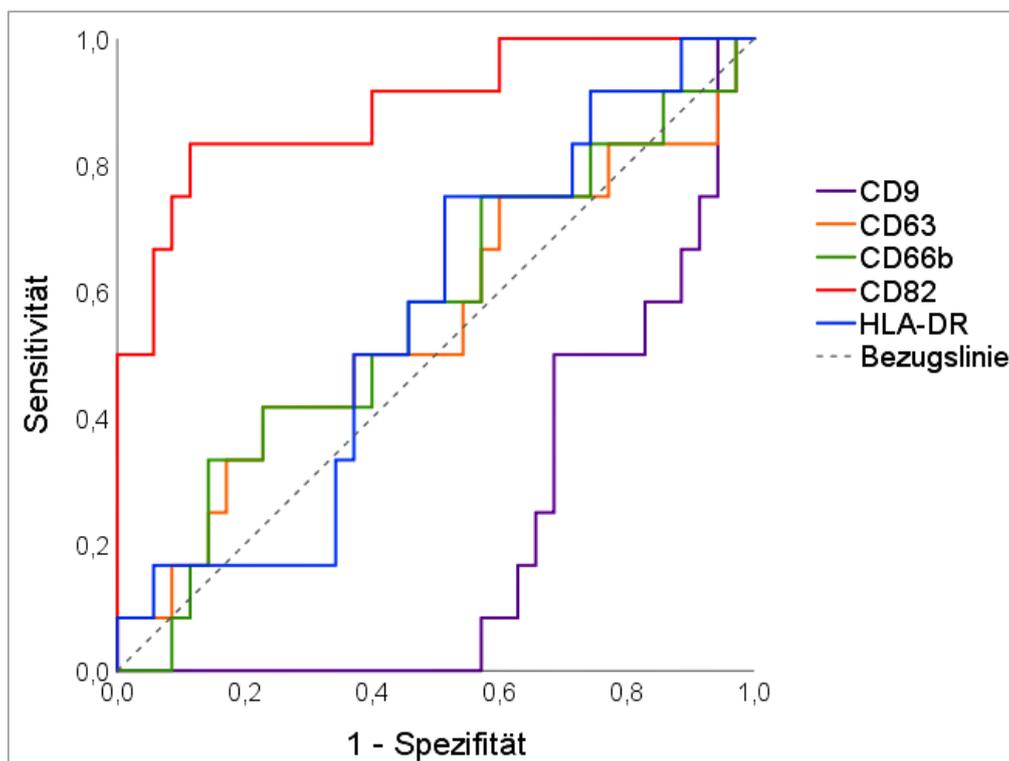


Abb. 23: ROC-Kurve für die verschiedenen sEV-Marker im Gelenkpunktat

Die ROC-Kurven beziehen sich auf die Annahme, dass die untersuchten Marker bei Patienten mit PPI in erhöhter Konzentration in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar seien als bei Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung. Die ROC-Kurve für CD82 (rot) umschließt die höchste AUC und spiegelt die bei PPI signifikant erhöhten Werte des Markers wider. Die ROC-Kurven von CD63 (orange), CD66 (grün) und HLA-DR (blau) befinden sich im Wesentlichen im Bereich der grauen Diagonalen, was bedeutet, dass kein signifikanter Konzentrationsunterschied der 3 Marker bei PPI und aseptischer Lockerung besteht und somit das Vorliegen einer PPI die Konzentrationen nicht maßgeblich beeinflusst. Für CD9 (violett) hingegen liegt die ROC-Kurve weit unterhalb der grauen Diagonalen und suggeriert statistisch signifikant veränderte Konzentrationen des Markers, jedoch entgegen der ursprünglichen Annahme erniedrigte Werte bei PPI.

Die AUC für CD82 (rot) liegt bei 0,89 und deutet darauf hin, dass CD82 in der septischen Gruppe in signifikant erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann. Für CD63

(orange) beträgt die AUC 0,55, für CD66b (grün) 0,56 und für HLA-DR (blau) 0,557. Folglich unterscheiden sich die Konzentrationen dieser drei Marker bei Patienten mit PPI und aseptischer Prothesenlockerung nicht signifikant. Die AUC für CD9 (violett) beträgt 0,219 und weist auf einen signifikanten Unterschied der synovialen CD9-Konzentrationen zwischen der aseptischen und der septischen Gruppe hin, nämlich auf signifikant niedrigere Werte bei Vorliegen einer PPI (Tab. 24).

sEV-Marker	p-Wert	AUC (95% KI) für Vorliegen einer PPI
CD9	0,002*	0,219 (0,089 – 0,349)
CD63	0,372	0,550 (0,348 – 0,752)
CD66b	0,634	0,560 (0,366 – 0,753)
CD82	<0,001**	0,890 (0,776 – 1,000)
HLA-DR	0,558	0,557 (0,377 – 0,737)

Tab. 24: Ergebnisse der ROC-Analyse für die 5 verwendeten sEV-Marker

*Die Messwerte von CD9 unterschieden sich zwischen beiden Gruppen hoch signifikant (p-Wert 0,002), jedoch lagen in der aseptischen Gruppe höhere Werte als in der septischen Gruppe vor (AUC 0,219).

**CD82 zeigte sich als einziger Marker in der septischen Gruppe gegenüber der aseptischen Gruppe im Gelenkpunktat statistisch hoch signifikant erhöht (p<0,01; AUC 0,89).

Ferner wurde für jeden sEV-Marker auf Grundlage des maximalen Youden-Index ein potentieller Grenzwert der Partikel / ml Synovialflüssigkeit zur Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Lockerung festgelegt und für denselben Sensitivität und Spezifität bestimmt. Diese sind in Tab. 25 dargestellt.

sEV-Marker	Grenzwert (P/ml)	Sensitivität (95%-KI)	Spezifität (95%-KI)
CD 9	10.270.654	5,7% (1,0 – 18,6%)	100,0% (72,2 – 100,0%)
CD 63	43.897.859	46,2% (23,2 – 70,9%)	77,1% (61,0 - 87,9%)
CD 66b	4.014.863	30,8% (12,7 – 57,6%)	85,7% (70,6 - 93,7%)
CD 82	2.042.626	83,3% (55,2 – 97,0%)	88,6% (74,0 – 95,5%)
HLA-DR	3.384.787	75,0% (46,8 – 91,1%)	48,6% (33,0 - 64,4%)

Tab. 25: Sensitivität und Spezifität der sEV-Marker

Bezogen auf die Annahme, dass CD9 bei aseptischer Lockerung gegenüber der septischen Gruppe signifikant erhöht sei, ergeben sich eine ebenfalls hohe Signifikanz (p=0,002) und eine AUC von 0,793, dargestellt in Abb. 24. Daraus lässt sich schließen,

dass CD9 in der aseptischen Gruppe in höherer Konzentration als in der septischen Gruppe messbar ist.

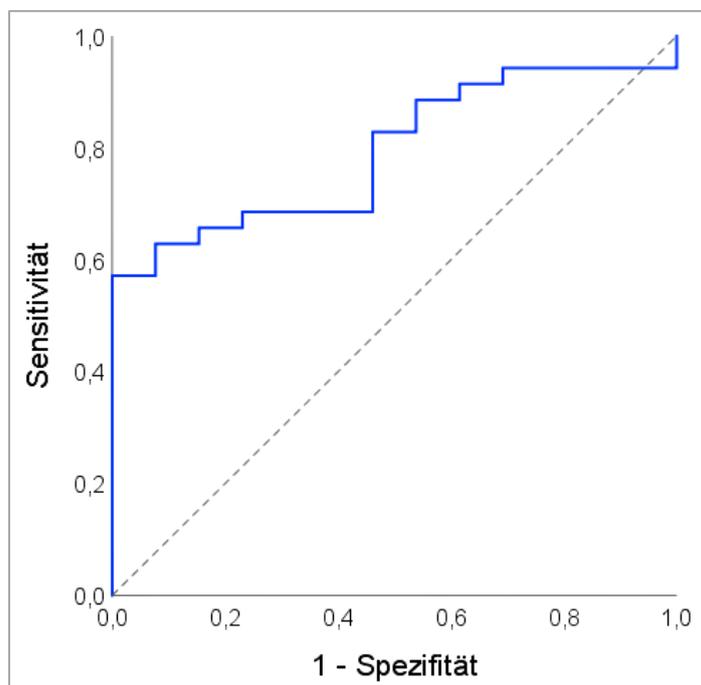


Abb. 24: ROC-Kurve für CD9 im Gelenkpunktat bei aseptischer Lockerung

Die abgebildete ROC-Kurve bezieht sich auf die Annahme, dass CD9 in der Gelenkflüssigkeit der Patienten mit aseptischer Lockerung verglichen mit Patienten mit PPI in signifikant erhöhter Konzentration nachweisbar sei. Der Verlauf der Kurve weit oberhalb der Zufallsdiagonalen bestätigt diese Hypothese.

4.3.3 Vergleich der Konzentrationen der sEV-Marker bei Hüft- und Kniegelenk

Die Konzentrationen der verschiedenen sEV-Marker wurden in der septischen und aseptischen Gruppe separat zwischen Hüft- und Kniegelenk verglichen. In der aseptischen Gruppe zeigten sich beim Hüftgelenk im Mann-Whitney-U-Test CD63 ($p=0,008$) und CD82 ($p<0,0001$) signifikant erhöht, HLA-DR ($p=0,023$) war signifikant erniedrigt. Ähnliche Tendenzen zeichneten sich in der septischen Gruppe ab, wobei hier als einziger Marker bei der Hüfte CD63 signifikant erhöht war ($p=0,048$).

5 DISKUSSION

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl antimikrobieller Moleküle und Zytokine auf ihre diagnostische Wertigkeit als Indikatoren einer Entzündungsreaktion infolge einer PPI in Serum und Gelenkflüssigkeit untersucht. Sie werden durch diverse Faktoren beeinflusst, so dass sie nur begrenzt zur Diagnostik der PPI beitragen können (Deirmengian et al., 2018; Lazic et al., 2022; Shahi and Parvizi, 2017). Ziel der vorliegenden Promotionsschrift ist, Biomarker zu identifizieren, die eine zuverlässige präoperative Diagnose der PPI ermöglichen. Hierzu wurden verschiedene sEV-Oberflächenmarker in der Gelenkflüssigkeit untersucht. sEVs sind widerstandsfähige Partikel und tragen zur Zell-Zell-Kommunikation bei Immunreaktionen bei (Wiklander et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015). Mittels IFCM wurden im Synovialaspirat von insgesamt 48 Patienten (13 mit PPI, 35 mit aseptischer Prothesenlockerung) die Oberflächenmarker CD9, CD63, CD66b, CD82 und HLA-DR nachgewiesen. Bei der PPI zeigten sich signifikant erhöhte Konzentrationen an CD82 und signifikant erniedrigte Konzentrationen an CD9. Die übrigen drei Marker unterschieden sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen Unterschieden und Gemeinsamkeiten immunologischer Prozesse bei PPI und aseptischer TEP-Lockerung und der Zusammensetzung der sEV-Subpopulationen in der Gelenkflüssigkeit.

Rüwald et al. wiesen in einer klinischen Studie mit derselben Fragestellung bei 23 Patienten, davon 12 mit PPI, verschiedene mit sEVs assoziierte Oberflächenmarker in der Gelenkflüssigkeit nach und zeigten ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen bestimmter EV-Marker bei der aseptischen TEP-Lockerung und der PPI und ähnliche Ergebnisse für CD9 und CD63 (Rüwald et al., 2020). Sallai et al. ermittelten unter Einbezug eines Teils ihres Patientenkollektivs von insgesamt 34 Probanden, davon 17 mit PPI und 17 mit aseptischer Prothesenlockerung, eine erhöhte Konzentration CD177-positiver und Annexin A5-bindender Nanopartikel in der Synovialflüssigkeit der Patienten mit PPI (Sallai et al., 2022). Weitere vergleichbare Studien zu diesem Thema fehlen bis dato.

5.1 Präoperativ erhobene Parameter

5.1.1 Patientenkollektiv der Studie

Das Studienkollektiv umfasste mehr Frauen als Männer. Bei der Mehrzahl der Patienten im Gesamtkollektiv handelte es sich um ältere und alte Menschen. Es stellten sich mehr Patienten mit einer Knie-TEP als mit einer Hüft-TEP vor. Die Ergebnisse von Rüwald et al. und aus Studien, in denen andere Biomarker in Serum und Synovialflüssigkeit hinsichtlich ihrer diagnostischen Wertigkeit untersucht wurden, zeigten ähnliche Tendenzen (Li et al., 2018a; Rüwald et al., 2020).

Ein Warnsignal ist die hohe Rate der multimorbiden Patienten, insbesondere in der septischen Gruppe (61,5%). Kardiovaskuläre Erkrankungen machten den größten Anteil der Komorbiditäten aus. Die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ II war in beiden Gruppen verglichen mit der Gesamtbevölkerung erhöht. Die Mehrzahl der Patienten in der aseptischen Gruppe war übergewichtig (BMI 25,0-29,9 kg/m²), in der septischen adipös (BMI ≥ 30 kg/m²). Die genannten Komorbiditäten und Adipositas gelten als wichtige Risikofaktoren der PPI und können den Verlauf der Therapie der PPI erheblich verschlechtern (Kildow et al., 2022; O'Toole et al., 2016; Siljander et al., 2018; Zmistowski et al., 2014).

5.1.2 Mikrobiologische Analyse: Erregerspektrum und diagnostische Lücke

Die präoperative mikrobiologische Untersuchung von Gelenkflüssigkeit, die bei allen Probanden durchgeführt wurde, gilt als Standardverfahren bei der Diagnostik der PPI (Ong et al., 2022; Otto-Lambertz et al., 2017; Winkler et al., 2014). Bei der Mehrzahl (66,7%) der nachgewiesenen Erreger handelte es sich um niedrig-virulente Bakterien. Die häufigsten Erreger waren Staphylokokken. In knapp einem Sechstel der Fälle konnte eine Mischinfektion nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse spiegeln sich in der Literatur wider (Karczewski et al., 2018; Otto-Lambertz et al., 2017; Renz et al., 2015; Winkler et al., 2014). Bei einer Patientin, die präoperativ als aseptisch klassifiziert wurde, zeigte sich intraoperativ ein positiver Erregernachweis. Eine Kontamination als Ursache blieb hier fraglich. Bei allen anderen Patienten bestätigte sich das jeweilige mikrobiologische Ergebnis nach intraoperativer Probenentnahme.

Die mikrobiologische Untersuchung des präoperativ gewonnenen Punktates ergab bei 9 der 13 Probanden mit PPI einen positiven Erregernachweis in mindestens zwei verschiedenen Proben und folglich eine Sensitivität von 69,23%, obgleich eine ausreichend lange Inkubationszeit von 14 Tagen berücksichtigt wurde und - wenn möglich - mehrere Blutkulturflaschen pro Patient mit Punktat beimpft wurden. Die übrigen Patienten wiesen eine Fistel zum betroffenen Gelenk auf (Sensitivität 38,5%; Fistel und positiver Erregernachweis bei einem Probanden). In der Literatur werden ähnliche Raten an präoperativ kultur-negativer PPI von 20-30% bzw. eine ähnliche Sensitivität der mikrobiologischen Untersuchung der Gelenkflüssigkeit von 60-80% angegeben (Goswami and Parvizi, 2019; Renz et al., 2015; Winkler et al., 2014).

Hauptursache für die geringe Sensitivität der mikrobiologischen Untersuchung präoperativ gewonnener Gelenkflüssigkeit ist, dass die Bakterien im Biofilm der Prothesenoberfläche und dem periprothetischen Gewebe irreversibel anhaften und sich bei „low-grade“-PPI nur zu einem geringen Anteil frei in der Gelenkflüssigkeit befinden. Tan et al. erhielten bei Patienten mit PPI in 22% einen präoperativ negativen Erregernachweis; bei 53,1% dieser Patienten zeigte im Nachhinein die mikrobiologische Untersuchung intraoperativ entnommener Gewebeproben ein positives Ergebnis (Tan et al., 2018). Da Bakterien im Biofilm eine deutlich reduzierte Stoffwechsellage aufweisen, ist die Anzüchtung in Kulturmedien oftmals problematisch (Bauer et al., 2018; Josse et al., 2019; Renz et al., 2015; Siljander et al., 2018).

Zunehmend an Interesse gewonnen haben bei der Diagnostik der PPI DNA-Sequenzierungsmethoden, darunter als bekanntes Beispiel die PCR („polymerase chain reaction“). Sie ermöglichen den Nachweis bakterieller Erbinformation, Erfassung von Resistenzgenen und die Identifikation der zugehörigen Spezies in verschiedenen Probenmaterialien innerhalb von Stunden. Dies gilt auch für niedrig-virulente Erreger und bei unmittelbarer Antibiotikagabe vor Probenentnahme (Goswami et al., 2018; Li et al., 2018a; Siljander et al., 2018). Es ist nicht unbedingt erforderlich, dass sich intakte Bakterien in der Gelenkflüssigkeit befinden. Die diagnostische Genauigkeit verschiedener PCR-Verfahren variiert in der Literatur. Sie erfordern zur korrekten Durchführung einen hohen Zeit- und Personalaufwand; dies ist im klinischen Alltag schwerlich umzusetzen. Kontamination von außen oder das Vorhandensein bereits abgetöteter Erreger in der Gelenkflüssigkeit, deren Detektion von fraglich klinischer

Relevanz ist, können bspw. die Spezifität der Methoden verringern. Die Wahl der falschen Primer bei der PCR kann deren Sensitivität vermindern (Gbejuade et al., 2015; Goswami and Parvizi, 2019; Hischebeth et al., 2017). Bisher wurde die PCR bei der präoperativen Diagnostik der PPI noch nicht als Standardverfahren etabliert.

5.1.3 Stellenwert der Blutuntersuchung bei der Diagnose PPI

Erhöhte Entzündungsparameter im Blut, z.B. CRP, BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) und Leukozytenzahl, weisen auf eine systemische Inflammationsreaktion hin und werden zum Screening einer PPI genutzt (McNally et al., 2021; Mühlhofer et al., 2015; Otto-Lambertz et al., 2017). Sie können bei nicht-infektiösen entzündlichen Erkrankungen sowie bei Infektionen unbekanntem Fokus (nicht PPI) erhöht sein und werden durch viele Faktoren (u.a. Antibiotikagabe, Adipositas, Rauchen) beeinflusst. Normwertige Ergebnisse schließen eine PPI nicht aus, da sich v.a. „low-grade“-PPI meist nicht als systemische Entzündungsreaktion äußern (Shahi and Parvizi, 2017; Vicenti et al., 2019; Winkler et al., 2014). Dasselbe Problem besteht auch bei neuartigen Serummarkern, z.B. IL-6, Procalcitonin und TNF- α (Busch et al., 2020; Goswami et al., 2018; Vicenti et al., 2019). Fink et al. zeigten für Serum-CRP-Werte $>1\text{mg/dl}$ eine Sensitivität von 57,2% und eine Spezifität von 79,0% (Fink et al., 2020). Karczewski et al. beobachteten erhöhte Serum-CRP-Werte bei 71,4% bzw. 63,8% ihrer Patienten mit PPI (Hüft- vs. Knie-TEP) (Karczewski et al., 2018).

Präoperativ wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsstudie das Serum-CRP und die Leukozytenzahl im Blut bestimmt. Bei 5 Patienten der aseptischen Gruppe wurde keine Blutuntersuchung durchgeführt, da sie sich keiner Operation unterzogen. Die BSG wurde wegen ihrer geringen diagnostischen Genauigkeit in verschiedenen Studien und Metaanalysen außer Acht gelassen (Li et al., 2018a; Otto-Lambertz et al., 2017; Vicenti et al., 2019). Die Ergebnisse dieser Studie spiegelten die in der Literatur beschriebene Problematik wider. Beide Parameter lagen bei „low-grade“-Infektionen oft im Normbereich und unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der aseptischen Gruppe. Bei PPI durch hoch-virulente Erreger wurden signifikant erhöhte Werte beobachtet. Für Serum-CRP $>1\text{mg/dl}$ ergaben sich eine Sensitivität von 53,8% und eine

auffallend geringe Spezifität von 13,3%. Dies könnte an der hohen Prävalenz chronisch-entzündlicher Systemerkrankungen der Probanden liegen.

5.1.4 LE-Reaktion als Bestätigungstest der PPI

In der Synovialflüssigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zur mikrobiologischen Untersuchung bei allen Patienten die LE-Reaktion als Minorkriterium der PPI durchgeführt. Ursprünglich sollten ebenfalls die synoviale Zellzahl und PMN% bei allen Probanden erfasst werden, was jedoch oft nicht möglich war, da nicht immer ausreichend Punktat gewonnen werden konnte und aufgrund der oft hohen Viskosität der Gelenkflüssigkeit die Messungen nicht durchgeführt werden konnten.

Die LE-Reaktion gilt ab einem zweifach positiven Farbumschlag als erfülltes Minorkriterium für die PPI (Parvizi et al., 2018). Eine einfach positive Reaktion kann bereits auf eine „low-grade“-PPI hindeuten (Koh et al., 2017; Shahi et al., 2017). Im Patientenkollektiv zeigte sich bei der LE-Reaktion ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, nämlich häufiger ein positiver Farbumschlag bei PPI. Durch Kontamination mit Blut können die Teststreifen unlesbar werden; das Problem kann jedoch minimiert werden, indem das Punktat vorher zentrifugiert wird (Shahi et al., 2017). Dies wurde im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bestätigt.

Deirmengian et al. zeigten eine mäßige Korrelation der LE-Reaktion mit einer synovialen Zellzahl $>3.000/\mu\text{l}$ (Grenzwert für PPI) verglichen mit Immunoassays der neutrophilen Elastase und einen Sensitivitätsunterschied zwischen Teststreifen zwei verschiedener Hersteller (Deirmengian et al., 2018). Wetters et al. dagegen beobachteten eine Sensitivität von 92,9% und Spezifität von 88,8% der LE-Reaktion für eine synoviale Zellzahl $>3.000/\mu\text{l}$ (Wetters et al., 2012). Die LE-Reaktion kann folglich zusätzlich und als Alternative zur Zellzahlbestimmung genutzt werden, wenn diese nicht möglich ist. In Hinblick auf die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Wetters et al. zeigte die LE-Reaktion bei positivem Erregernachweis eine Sensitivität und Spezifität von 93,3% und 77,0% und kombiniert mit intraoperativen Befunden von 100% und 86,6% für das Vorliegen einer PPI (Wetters et al., 2012). Koh et al. bewiesen in einer Multizenterstudie eine Sensitivität und Spezifität der LE-Reaktion von 84% und 100%

für ein zweifach- und von 90% und 73% für ein einfach-positives Testergebnis. Im Patientenkollektiv der vorliegenden Promotionsschrift erwies sich die LE-Reaktion als ähnlich spezifisch wie in den genannten Studien, jedoch als weniger sensitiv, was evtl. an einer höheren Rate an „low-grade“-PPI im Studienkollektiv gelegen haben könnte. Sensitivität und Spezifität betragen 38,5% und 91,4% für eine einfach positive Reaktion (+) als positives Ergebnis sowie 23,1%, und 100% für eine zwei- und dreifach positive Reaktion. Die LE-Reaktion eignet sich daher als prä- und intraoperativer Schnelltest, um bei Verdacht einer PPI diese zu bestätigen, nicht jedoch als Screeningtest, um eine PPI auszuschließen. Ein wesentlicher Vorteil des Tests ist, dass er in jedem Setting innerhalb von 2 Minuten mit nur einem Tropfen Punktat durchgeführt werden kann und kostengünstig ist (Deirmengian et al., 2018; Koh et al., 2017). Einschränkungen des Verfahrens bestehen u.a. darin, dass die Bestimmung des Farbumschlags untersucherabhängig subjektiv sein, die Reaktion herstellerabhängig unterschiedlich ausfallen und die semiquantitativen Angaben der Leukozytenzahl entsprechend des Farbumschlags variieren können (Deirmengian et al., 2018; Koh et al., 2017; Wetters et al., 2012).

5.2 Möglichkeiten und Herausforderungen der Analyse von sEV-Präparaten

Zur Probenpräparation und Analyse der biochemischen Eigenschaften verschiedener sEVs steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung (Tian et al., 2020; Yanez-Mo et al., 2015). Bis dato konnte kein einziger spezifischer EV-Oberflächenmarker für eine bestimmte sEV-Subpopulation identifiziert werden, was u.a. daran liegen kann, dass die Proteinzusammensetzung von sEV-Präparaten zu einem nicht unerheblichen Teil von der angewandten Präparations- bzw. Anreicherungs- und Analyseverfahren abhängig ist (Doyle and Wang, 2019; They et al., 2018; Wiklander et al., 2018). Ähnlich wie bei der Diagnostik der PPI fehlt auf dem Gebiet der EV-Forschung Konsens über standardisierte Verfahren, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen einschränkt (They et al., 2018; Witwer et al., 2013; Witwer et al., 2021).

5.2.1 Fallstricke bei der Untersuchung von sEVs

sEVs besitzen heterogene Eigenschaften und sind klein. Daher können sie aus biologischen Flüssigkeiten kaum vollständig von Kontaminanten wie Zellbestandteilen und Proteinen separiert werden (Thery et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015). Bspw. weisen verschiedene Lipoproteine im Plasma eine nahezu gleiche Dichte bzw. Größe wie manche sEVs auf (Pérez et al., 2019; Tian et al., 2020). Auch können Proben mit bakteriellen MVs kontaminiert sein. Jede biologische Flüssigkeit hat spezifische physikochemische Eigenschaften, die die Anreicherung von sEVs beeinflussen. Die Konzentration und Zusammensetzung von sEVs in Körperflüssigkeiten wie Plasma und Synovialflüssigkeit können durch viele patientenabhängige Faktoren (Vorerkrankungen, Infektionen, Alter, Geschlecht, Ernährung, BMI u.a.) und die Aufbewahrung und Behandlung der Proben beeinflusst werden (Konoshenko et al., 2018; Thery et al., 2018; Witwer et al., 2013).

5.2.2 Aufbereitung und Analyse von sEV-Präparaten – viele Methoden, viele Resultate

Bei der Präparation bzw. Anreicherung von sEVs werden Eigenschaften wie Größe, Dichte, Oberflächenladung u.a. genutzt (Konoshenko et al., 2018). Als bisheriger Goldstandard der EV-Anreicherung gilt die differentielle Ultrazentrifugation. Dabei werden verschiedene Zentrifugationsschritte mit einer Beschleunigung von bis zu 200.000g angewendet, so dass sich letztlich sEVs im Pellet befinden und in Lösung suspendiert und analysiert werden können. Es werden hierzu große Mengen an Probenmaterial und viel Zeit benötigt. Außerdem können durch die hohe Zentrifugalbeschleunigung sEVs beschädigt werden und im Pellet aggregieren (Doyle and Wang, 2019; Witwer et al., 2013). Daher wurde stattdessen die differentielle Zentrifugation als schonendes Verfahren zur Präparation der Proben genutzt, ohne die sEVs anzureichern. Aller Voraussicht nach befanden sich nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit einer maximalen Beschleunigung von 10.000g v.a. unbeschädigte sEVs mit einem Durchmesser von maximal ca. 220nm im Überstand. Zunehmend werden weniger zeitaufwändige Techniken wie Ultrafiltration, Größenausschlusschromatographie und Ausfällungsmethoden angewandt, die jedoch anfällig für Kontamination mit Lipoproteinen und anderen Partikeln und Schädigung der sEVs sind (Doyle and Wang, 2019; Konoshenko et al., 2018).

Hinsichtlich der EV-Analyse lassen sich zwei Prinzipien unterscheiden: die physikalische und die biochemische Analyse der EV-Zusammensetzung. Zur biochemischen Analyse steht eine Vielzahl an Methoden wie z.B. Immunoblotting zur Verfügung. Genutzt wird das Prinzip der Immunoaffinität, die Bindung eines Antikörpers an einen EV-Bestandteil. sEV-Oberflächenmoleküle können durch spezifische Antikörperbindung, z.B. mittels ELISA-Verfahren und Microarrays oder auf mikrofluidischen Chips, detektiert und quantifiziert werden (Doyle and Wang, 2019; Oliveira-Rodríguez et al., 2016; Panagopoulou et al., 2020; Witwer et al., 2013).

Die physikalische Analyse ermöglicht die Bestimmung der Partikelgröße und -konzentration in einer Flüssigkeit und beinhaltet u.a. die sog. „Nanoparticle Tracking Analysis“ (NTA), „tunable Resistive Pulse Sensing (tRPS)“ und die Elektronenmikroskopie (EM) (They et al., 2018; Witwer et al., 2013). Verschiedene Techniken der EM ermöglichen eine exakte Analyse der EV-Morphologie (Koliha et al., 2016). Sie eignet sich jedoch weniger zur Anwendung im klinischen Setting. Bei der NTA handelt es sich um eine Streulicht-basierte Methode mit gekoppelter Videokamera, die tRPS beruht auf der Detektion einer Spannungsänderung bei der Passage der Nanopartikel durch eine Membran. Eine Software analysiert die Anzahl, Größe und Konzentration der einzelnen Partikel in einer Probe (Doyle and Wang, 2019; Panagopoulou et al., 2020). Beide Verfahren können lediglich strukturell homogene Vesikel, nicht jedoch oft heterogene sEV-Populationen, in einem bestimmten Konzentrationsbereich detektieren und sEVs nicht von in der Probe evtl. enthaltenen Proteinaggregaten und Lipoproteinen differenzieren und stoßen so an ihre Grenzen (Lozano-Andrés et al., 2019; Tian et al., 2020).

Um u.a. letzteres Problem rein optischer Methoden zu umgehen, wurde in der vorliegenden Promotionsstudie die IFCM zur sEV-Analyse angewandt, denn sie kombiniert optische und biochemische Methoden: Fluoreszenzmarkierte EV-Oberflächenmoleküle werden mittels Streulichteffekt detektiert.

5.2.3 Möglichkeiten und Grenzen der IFCM

Die Durchflusszytometrie ist ein schnelles und im klinischen Alltag etabliertes Verfahren. Durch die IFCM können die Heterogenität der sEVs reproduzierbar analysiert, sEVs

quantifiziert und spezifische Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle untersucht werden. Bilder der einzelnen sEV-Populationen, welche den Messkanal passieren, werden erzeugt (Panagopoulou et al., 2020; They et al., 2018). Es können verschiedene Probenmaterialien analysiert werden, ohne dass es der Anreicherung der sEVs bedarf, die diese potentiell schädigen könnte. Eine Präparation der Probe genügt. Geringe Probenvolumina ($\leq 50\mu\text{l}$) reichen aus. Jedoch fehlen weitreichende Erfahrungsberichte in Hinblick auf variable Eigenschaften verschiedener Probenflüssigkeiten zur Analyse und Verdünnung von bspw. Gelenkflüssigkeit, die oft sehr viskös ist.

Ein wesentlicher Vorteil der IFCM verglichen mit NTA ist, dass Immunfluoreszenzmarkierung angewendet wird und so nicht nur beliebige Nanopartikel detektiert werden, sondern solche mit bestimmten Oberflächenmolekülen, so dass sEVs von Proteinbestandteilen wie Lipoproteinen abgegrenzt werden können (Panagopoulou et al., 2020; Pérez et al., 2019).

Je nach Antikörper und zu markierender Struktur stehen eine Reihe an Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung. Es ist derzeit Gegenstand der Forschung, zu ermöglichen, Proben mit verschiedenen Antikörpern zu inkubieren und mehrere Oberflächenmoleküle gleichzeitig zu detektieren (Görgens et al., 2019; Panagopoulou et al., 2020).

Die potentielle Aggregation von Antikörpern kann die Messergebnisse verfälschen. Dem kann durch vorherige Zentrifugation vorgebeugt werden. Es kann zu Koinzidenzen, Schwarmdetektion und Artefakten im Hintergrund kommen, welche jedoch durch Optimierung der Kamera- und Softwareeinstellungen (z.B. Maskenfunktion) verhältnismäßig genau von wahren Signalen unterschieden werden können. Aufgrund der genannten Vorteile wurde die IFCM als innovatives und spezifisches Verfahren für die Untersuchung von sEV-Präparaten angewandt.

Rüwald et al. haben differentielle Ultrazentrifugation zur Anreicherung von sEVs in der Gelenkflüssigkeit genutzt und diese mit NTA, EM und Durchflusszytometrie eines Analyse-Kits mit 37 verschiedenen Antikörpern analysiert. Sie beobachteten durch die NTA bei der PPI eine höhere Partikelkonzentration und Partikel (vermeintlich sEVs) mit kleinerem Durchmesser in der Gelenkflüssigkeit (Rüwald et al., 2020). Aufgrund der

erwähnten Fallstricke bei der Ultrazentrifugation und der NTA können die Ergebnisse lediglich unter Vorbehalt verglichen werden.

Sallai et al. wiesen bei Patienten mit PPI mittels NTA ebenfalls eine erhöhte synoviale Partikelkonzentration, im Gegensatz zu Rüwald et al. jedoch einen größeren Durchmesser der detektierten Nanopartikel nach. Durchflusszytometrisch ermittelten sie eine erhöhte Konzentration von CD177 als Oberflächenmarker aktivierter neutrophiler Granulozyten und eine höhere Bindungsrate von Annexin A5 sowie massenspektrometrisch eine erhöhte Konzentration an u.a. Myeloperoxidase, Lysozym C und Lactotransferrin in der Synovialflüssigkeit bei PPI mit der Schlussfolgerung, dass bei Patienten mit PPI signifikant vermehrt sEVs aus aktivierten PMN nachweisbar seien (Sallai et al., 2022). Jedoch kann auf Grundlage der in der Studie angewandten Aufbereitungs- und Analyseverfahren nicht sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Partikeln tatsächlich um sEVs gehandelt haben kann. Des Weiteren nutzten Sallai et al. aufgrund der Knappheit an gewonnenem Synovialaspirat für die jeweiligen Analyseverfahren teils unterschiedliche Proben (Sallai et al., 2022). Dies schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse bei insgesamt geringer Fallzahl ein.

5.3 Potential und Limitationen der sEVs als neuartige Biomarker

In den letzten Jahrzehnten hat das Interesse an sEVs in der biomedizinischen Forschung immens zugenommen und zu einer Vielzahl an Erkenntnissen über deren Struktur und Funktionen geführt. Dieses Feld ist jedoch so komplex, dass wir vermutlich noch ganz am Anfang stehen, einen ersten Einblick zu erlangen.

sEVs können in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden und folglich als nicht- bzw. minimalinvasiv gewinnbare Biomarker im Rahmen der „liquid biopsy“ zum Verständnis und zur Erkennung verschiedener Krankheitsprozesse genutzt werden (Boere et al., 2018; Konoshenko et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015; Zou et al., 2022). Da bestimmte Zellen spezifische sEVs produzieren und freisetzen, sind in biologischen Proben eine Mischung verschiedener Subpopulationen variablen Ursprungs vorhanden (Konoshenko et al., 2018; Witwer et al., 2013). Die sie umgebende Lipiddoppelschicht schützt ihren Inhalt vor Degradierung durch extrazelluläre Enzyme und trägt zu ihrer hohen Stabilität und zu ihrer langen Halbwertszeit bei (Yanez-Mo et al., 2015). Diese

Eigenschaften scheinen zu versprechen, dass sEVs als Biomarker in der Synovialflüssigkeit Aufschluss über die immunologischen Mechanismen bei der PPI und der aseptischen TEP-Lockerung geben können. Um bestimmte sEV-Subpopulationen in einer biologischen Probe zu untersuchen (hier CD66b, CD82 und HLA-DR), wurde die EV-Gesamtzahl anhand von ubiquitären „pan-EV“-Markern, z.B. der Tetraspanine CD9 und CD63, erfasst.

5.3.1 Nachweis von sEVs in der Gelenkflüssigkeit

Bei der Synovialflüssigkeit handelt es sich um ein Ultrafiltrat des Plasmas, das die vaskularisierte Synovialis als entscheidende Barriere passiert und folglich kleinere Plasmaproteine und Moleküle aus lokalen Zellen enthält (Hui et al., 2012). sEVs in der Synovialflüssigkeit erhalten die Gelenkhomöostase und spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese entzündlicher Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis. Sie können Barrieren wie Endothel und Synovialmembran passieren und sich zwischen systemischem Kreislauf und bestimmten Gewebekompartimenten bewegen (Boere et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion im Gelenk sind sEVs in erhöhter Konzentration in Synovialflüssigkeit und auch im Blut nachweisbar, denn die Gefäßmembranen der Kapillaren in der Synovialis werden durchlässiger (Boere et al., 2018; Hui et al., 2012; Li et al., 2018b).

Weitere Untersuchungen und Vergleiche der Konzentrationen von sEVs in der Gelenkflüssigkeit unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, in der Synovialflüssigkeit nativer Gelenke und bei einliegender TEP sowie im Blut sind erforderlich. Es liegt die Vermutung nahe, dass man bei den nachgewiesenen sEV-Präparaten nicht sicher davon ausgehen kann, dass sie primär aus lokalen Zellen stammen. sEVs sind bei chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen und Infektionen in veränderter Konzentration in der jeweiligen untersuchten Körperflüssigkeit nachweisbar (Saiz et al., 2018; They et al., 2018). Patienten mit rheumatoider Arthritis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bspw. wurden aus der Studie ausgeschlossen. Jedoch beeinflussen auch kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus und chronisch-entzündliche Lungenerkrankungen die EV-Konzentration im Blut (Hough et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015) und vermutlich bis zu einem unbekanntem

Grad auch in der Synovialflüssigkeit. Dies ist unvermeidbar, denn die erhöhte Prävalenz dieser Komorbiditäten als wichtige Risikofaktoren für eine PPI ist kennzeichnend für das jeweilige Patientenkollektiv (5.1.1).

Im Umkehrschluss können sEVs aus der Synovialflüssigkeit ins Blut diffundieren, und es könnten bestimmte sEV-Marker als (verglichen mit der Gelenkpunktion) nicht-invasive Indikatoren der PPI bestimmt werden. Zukünftig gilt es zu erforschen, ob die Anzahl an bestimmten sEV-Markermolekülen in der Gelenkflüssigkeit mit deren Konzentration im Blut korreliert.

5.3.2 Keine erhöhten Konzentrationen ubiquitärer EV-Marker bei der PPI

Im Rahmen einer bakteriellen Infektion setzen Abwehrzellen vermehrt sEVs frei (Saiz et al., 2018; Yanez-Mo et al., 2015; Zou et al., 2022). So ergab sich die Hypothese, dass bei einer lokalen bakteriellen Infektion wie der PPI erhöhte Konzentrationen der „pan-EV“-Marker CD9 und CD63 in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar seien. Diese wurde widerlegt: Die Konzentration von CD9 war bei der aseptischen Lockerung hoch signifikant erhöht, die Konzentration an CD63 unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Dieses Ergebnis zeigten auch Rüwald et al. (Rüwald et al., 2020). Beide Tetraspanine beeinflussen immunologische Funktionen (Abb. 25). CD63 orchestriert insbesondere die ILV- und EV-Bildung auf dem endosomalen Weg (Pols and Klumperman, 2009; Saiz et al., 2018). Eine verminderte Expression von CD9 auf Abwehrzellen wurde in mehreren Studien bspw. im Blut von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen verglichen mit gesunden Probanden beobachtet (Brosseau et al., 2018). Die genauen Vorgänge bleiben unklar.

Eine mögliche Erklärung für die erwähnten Ergebnisse wäre, dass eine vermehrte Makrophagenaktivierung durch Abriebpartikel zu einer erhöhten EV-Produktion bei der aseptischen Lockerung verglichen mit der PPI führen könnte. Evtl. waren bei Patienten mit einer aseptischen Lockerung vermehrt kleine apoptotische Körperchen (Sonderform der EVs) in der Gelenkflüssigkeit vorhanden und haben so zu einer höheren Konzentration an CD9 als ubiquitäres Membranprotein, nicht jedoch an CD63 als ILV-Marker geführt. Landgraeber et al. zeigten, dass bei der aseptischen Lockerung als Reaktion auf Abriebpartikel in großem Ausmaß verschiedene periprothetische Zellen,

insbesondere Makrophagen, in Apoptose gingen (Landgraeber et al., 2008). Prinzipiell wurde davon ausgegangen, dass sich durch die verschiedenen Zentrifugationsschritte Partikel im Probenmaterial befanden, die nicht größer als ca. 220nm waren. In der Literatur werden apoptotische Körperchen als eher größere EVs beschrieben (Konoshenko et al., 2018), können jedoch prinzipiell ca. 50nm-5µm im Durchmesser messen (Doyle and Wang, 2019). Dieser mögliche Zusammenhang könnte mit genaueren Detektionsmethoden (z.B. Elektronenmikroskopie) und immunhistochemischer Anfärbung von Markermolekülen der Apoptose untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CD9 als bei PPI erniedrigter Biomarker angewandt werden kann.

5.3.3 CD66b und HLA-DR – keine geeigneten Indikatoren für die PPI

CD66b gilt als ein spezifischer Marker aktivierter neutrophiler Granulozyten. Neutrophile sezernieren nach Aktivierung CD66b-positive sEVs (Danesh et al., 2018; Genschmer et al., 2019). Da bei der PPI vermehrt Neutrophile zur unspezifischen Abwehr bakterieller Infektionen involviert sind, wurden erhöhte Konzentrationen von CD66b in der Gelenkflüssigkeit erwartet. CD66b in sEV-Präparaten wurde bei beiden Gruppen in geringen Konzentrationen ohne signifikante Unterschiede detektiert. Dafür könnte es verschiedene Gründe geben. CD66b konnte ebenfalls auf sEVs aus neutrophilen Granulozyten in Körperflüssigkeiten von Patienten mit chronischen, nicht-infektiösen Systemerkrankungen nachgewiesen werden (Genschmer et al., 2019). Wie spezifisch CD66b auf bakterielle Infektionen hindeutet, ist daher unklar. Bei der Mehrzahl der Patienten mit PPI handelte es sich um eine chronische Infektion mit niedrig-virulenten Erregern und einer folglich geringeren lokalen Anzahl an Neutrophilen mit unbekanntem Aktivierungsstatus. Schmidt et al. berichteten nach Exposition neutrophiler Granulozyten mit *Staph. aureus* über eine vermehrte Expression von CD66b im Zusammenhang mit einer verstärkten Aggregation der Zellen im Blut; beides blieb jedoch in Zellkulturmedien aus (Schmidt et al., 2012). Möglicherweise aggregieren Neutrophile in der Synovialflüssigkeit aufgrund von unbekanntem Faktoren auch bei Vorliegen einer PPI schwächer und setzen folglich geringere Mengen an CD66b-positiven sEVs frei. Auf Grundlage der Ergebnisse eignet sich CD66b nicht als Marker für eine PPI.

EVs aus APZ tragen eine Vielzahl an HLA-DR-Molekülen auf ihrer Oberfläche und können Antigenfragmente zwischen den APZ transferieren oder direkt T-Zellen aktivieren (Gauvreau et al., 2009; Hough et al., 2018). Rüwald et al. zeigten erhöhte synoviale Konzentrationen an HLA-DR-positiven sEVs bei Patienten mit PPI (Rüwald et al., 2020). Im Patientenkollektiv der vorliegenden Promotionsschrift ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Eine Reihe von Faktoren könnten dieses Ergebnis moduliert haben: Auch Makrophagen können als Reaktion auf Phagozytose von Abriebpartikeln vermehrt HLA-DR im periprothetischen Gewebe exprimieren (Landgraeber et al., 2014). Inwiefern diese HLA-DR-positive sEVs sezernieren, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. HLA-DR kann ebenso auf sEVs in Körperflüssigkeiten bei einer Reihe nicht-infektiöser Krankheitsprozesse nachgewiesen werden, bspw. bei Asthma bronchiale (Hough et al., 2018). Begleiterkrankungen der Patienten könnten so die Konzentration von HLA-DR-positiven sEVs in der Gelenkflüssigkeit beeinflusst haben.

5.3.4 CD82 – der „indirekte Erregernachweis“

Die Konzentration von CD82 zeigte sich bei der PPI in der Synovialflüssigkeit hoch signifikant erhöht (AUC 0,89). CD82 vermittelt die Aktivierung des intrazellulären TLR-9 durch DNA von endozytierten Bakterien oder Pilzen und die Beladung von MHC-II-Molekülen mit pathogenen Peptiden und deren Transport an die Zelloberfläche. Es ist bei der Antigenpräsentation im Komplex mit MHC-II-Molekülen auf der Zellmembran von APZ vermehrt nachweisbar (Abb. 25) (Artavanis-Tsakonas et al., 2011; Khan et al., 2019; Saiz et al., 2018). Folglich kann es auch auf der Oberfläche von sEVs im Rahmen einer bakteriellen Infektion verstärkt exprimiert werden, denn APZ nutzen sEVs zur Antigenpräsentation (Schorey et al., 2015; Yanez-Mo et al., 2015). Die Rezeptoraktivierung von TLR-9 ist von CD82 abhängig und vermutlich ein spezifisches Zeichen für die Phagozytose mikrobieller Bestandteile in APZ (5.4.1) (Khan et al., 2019; Valladares et al., 2014).

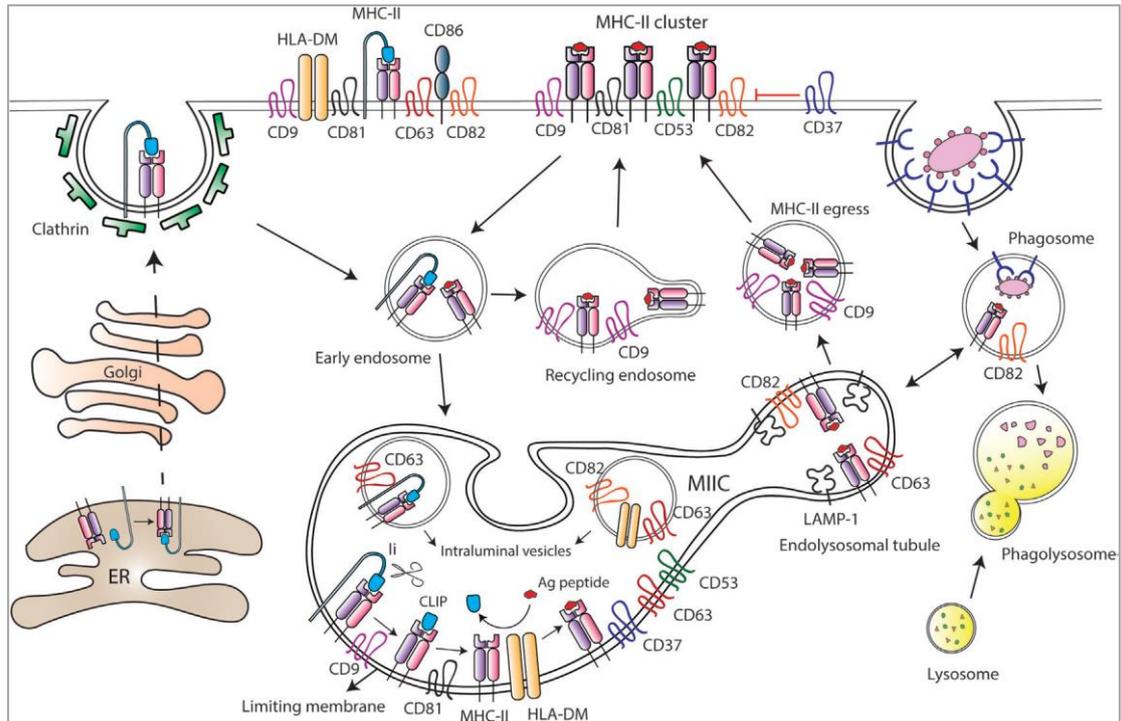


Abb. 25: Rolle von Tetraspaninen bei der Antigenpräsentation

Die Abbildung stellt zelluläre Vorgänge bei der Phagozytose eines Pathogens durch eine APZ und der folgenden Antigenpräsentation dar. CD82 moduliert den Phagozytosevorgang, insbesondere den Transport ins Endosom, wo sich u.a. TLR-9 befindet (nicht abgebildet), und ins Lysosom zur Aufspaltung der mikrobiellen Bestandteile in zur Antigenpräsentation geeignete Peptide. Diese werden im Komplex mit CD9, CD63, CD82 und anderen Tetraspaninen an MHC-II-Moleküle gebunden an der Zelloberfläche präsentiert. Da APZ ebenfalls sEVs zur Antigenpräsentation freisetzen, liegt die Vermutung nahe, dass diese im Rahmen einer bakteriellen Infektion in angereicherter Form CD82 an ihrer Oberfläche tragen. Tetraspanine wie CD9 und CD63 modulieren das Recycling verschiedener immunologisch relevanter Moleküle der APZ und deren Wiedereinbau in die Zellmembran (Abb. modifiziert nach Saiz et al. 2018).

5.3.5 Bakterielle Membranvesikel bei der PPI als zukünftige Alternative

Ähnlich wie Eukaryoten bilden Bakterien MVs und setzen sie frei (1.3.2). MVs könnten bei der Biofilmbildung und Antigenpräsentation beteiligt sein, einen erheblichen Beitrag zur Entstehung und Aufrechterhaltung der septischen Lockerung leisten und sich ebenfalls als Marker in der Gelenkflüssigkeit eignen. Zaborowska et al. isolierten bei 7 Patienten mit implantatassoziiertes Osteomyelitis *Staph. aureus* bzw. *Staph. epidermidis* als verursachende Erreger und wiesen für alle Stämme eine in-vitro Sekretion von MVs nach. Die Stimulation einer monozytären Zelllinie mit den gewonnen MVs steigerte deutlich u.a. die Expression der TLR2 und TLR3 sowie des NF- κ B und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Zaborowska et al., 2021). Problematisch ist jedoch, dass

auch für MVs bisher keine standardisierten Isolations- und Analysemethoden verfügbar sind und das jeweilige Ergebnis von der angewandten Methode abhängen kann (Dauros Singorenko et al., 2017). MVs verschiedener Spezies können sehr heterogen bzgl. Größe, Inhalt und Morphologie sein (Mehanny et al., 2020; Yanez-Mo et al., 2015). Bis dato fehlen zuverlässige Antikörper, um MVs mittels IFCM quantifizieren zu können. Auch muss bedacht werden, dass symbiotische Bakterien bspw. der Mund- und Darmflora MVs freisetzen (Fantappiè et al., 2014). Diese könnten ins Blut und darüber in die Synovialflüssigkeit gelangen und würden somit kein lokales Infektionsgeschehen widerspiegeln. In welchem Ausmaß MVs der Bakterien im Biofilm auf der Prothesenoberfläche frei in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar sind, sollte untersucht werden, wenn neue standardisierte Methoden verfügbar sind.

5.4 Problematik der Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Lockerung

Die aseptische und die septische Prothesenlockerung werden bzgl. ihrer Pathogenese voneinander abgegrenzt (Gibon et al., 2017; Landgraerber et al., 2014). Die aseptische Lockerung entsteht durch Mikrobewegungen und Abriebpartikel im Bereich der Knochen-Prothesen-Grenze, die septische Lockerung durch eine chronische Infektion des periprothetischen Gewebes (Josse et al., 2019; Pajarinen et al., 2014; Samelko et al., 2017). Das Ergebnis (Implantatversagen, mechanische Lockerung durch periimplantäre Osteolyse) beider Prozesse ist jedoch vergleichbar, ebenso die pathogenetische Endstrecke hinsichtlich der immunologischen Mechanismen (lokale Inflammation; Abb. 26). Auch können aseptische Prothesenlockerung und PPI parallel vorliegen. Es bleibt ungewiss, inwiefern diese Aspekte die diagnostische Wertigkeit von EV-Präparaten in der Gelenkflüssigkeit beeinträchtigen können.

5.4.1 Prothesenlockerung aus immunologischer Sicht

Schlüsselprozess der aseptischen und septischen Lockerung ist die Phagozytose von Abriebpartikeln bzw. Pathogenen durch Makrophagen und bei der PPI zusätzlich durch Neutrophile und andere APZ (Josse et al., 2019; Pajarinen et al., 2014). APZ exprimieren TLR auf ihrer Oberfläche, um Pathogene zu erkennen, zu binden und zu phagozytieren.

Die Interaktion spezifischer Liganden wie endogener, mit Zellschäden assoziierter Moleküle, Abriebpartikel oder PAMPs löst eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden u.a. über NF- κ B und daraufhin eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus (Abb. 26) (Gibon et al., 2017; Landgraeber et al., 2014).

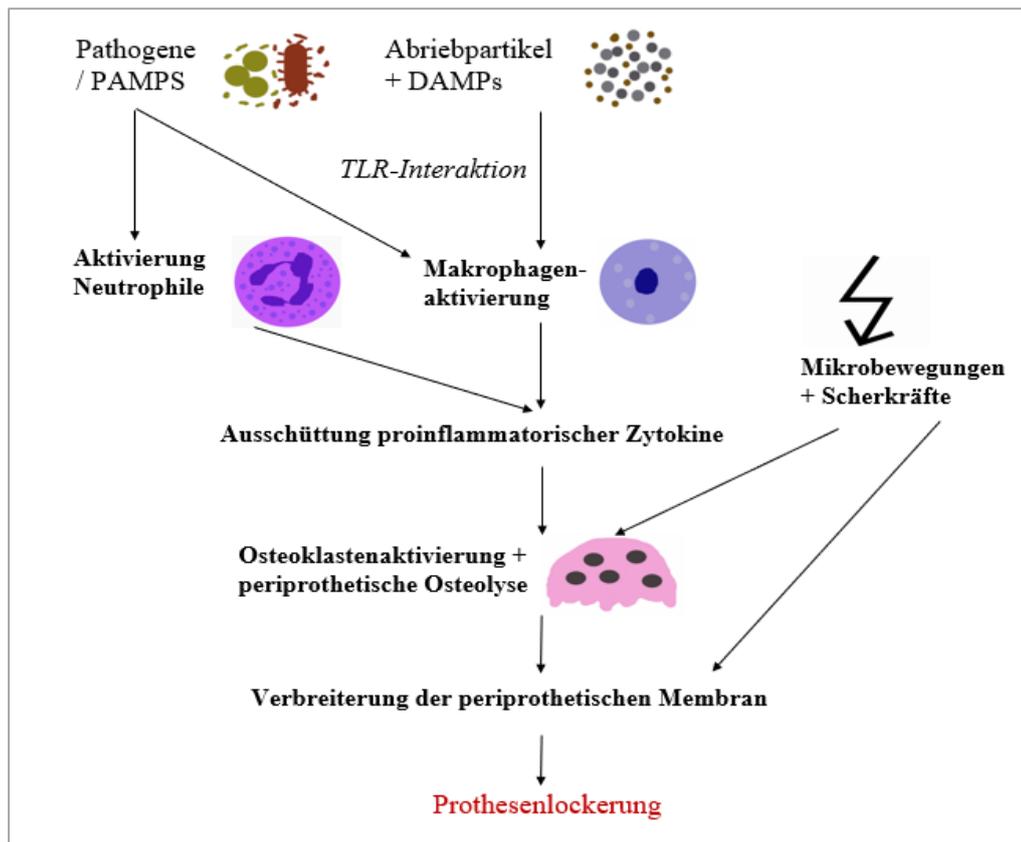


Abb. 26: Schema der Pathomechanismen bei aseptischer und septischer Prothesenlockerung

Die Mehrzahl der humanen TLR befindet sich auf der Plasmamembran; Einbau und Anordnung werden durch verschiedene Tetraspanine moduliert (Saiz et al., 2018). TLR-9 ist im endosomalen Kompartiment nachweisbar. Valladares et al. zeigten, dass TLR-2 und TLR-4, nicht jedoch TLR-9 von Makrophagen im murinen Calvariamodell als Reaktion auf Exposition mit Polyethylen-Partikeln vermehrt exprimiert wurden (Valladares et al., 2014). Neben Abriebpartikeln interagieren TLR-2 mit PAMPs grampositiver Bakterien, z. B. Lipoteichonsäure, und TLR-4 mit Lipopolysacchariden (LPS) als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Erreger, und können die

periprothetische Osteolyse verstärken (Samelko et al., 2017). Es kann angenommen werden, dass die von CD82 abhängige Aktivierung des TLR-9 hingegen über intrazelluläre mikrobielle DNA infektionsspezifisch ist. Jedoch führt diese ebenfalls zur Zytokinausschüttung und Osteolyse, der gemeinsamen, immunologisch kaum unterscheidbaren Endstrecke der septischen und aseptischen Lockerung.

Vermutet wird, dass ein durch Abriebpartikel induziertes proinflammatorisches Milieu die Manifestation einer PPI begünstigt. In der Literatur spiegelt sich wider, dass bei Hüft-TEPs mit Metall-Metall-Gleitpaarungen PPI häufiger auftreten als bei anderen Gleitpaarungen (Pitto and Sedel, 2016; Wyles et al., 2014). Auch bei Knie-TEPs können zytotoxisch wirkende Metallpartikel im periprothetischen Gewebe für eine PPI prädisponieren (Wyles et al., 2014). Pitto und Sedel beobachteten eine geringere Langzeit-Infektionsrate bei Keramik-Keramik-Gleitpaarungen verglichen mit anderen (Pitto and Sedel, 2016). Die Primärimplantationen der Studienprobanden wurden in unterschiedlichen Häusern durchgeführt, und die Standzeiten der Prothesen variierten stark. Informationen über die verwendeten Gleitpaarungen konnten daher in die Auswertung nicht miteinbezogen werden, und die immunologischen Reaktionen auf Abriebpartikel bei den Patienten konnten nicht beurteilt werden. Unterschiedliche Biomaterialien und individuelle Immunreaktionen können die Konzentrationen von sEV-Präparaten und die LE-Reaktion in der Synovialflüssigkeit beeinflusst haben. Ob ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der PPI und bestimmten Gleitpaarungen in der Studienpopulation bestand und ob sich dies auf die sEV-Marker-Konzentration in der Gelenkflüssigkeit auswirken könnte, blieb offen.

5.4.2 Die fragliche Existenz der „aseptischen“ Prothesenlockerung

Theoretisch kann jede implantierte TEP mit Bakterien besiedelt und mit einem Biofilm überzogen werden, ohne dass Symptome einer PPI auftreten. Unklar ist, ob die chronische periprothetische Entzündungsreaktion bei der aseptischen Lockerung im Individualfall einzig und allein durch Abriebpartikel oder auch durch PAMPs infolge einer subklinischen bakteriellen Besiedelung der Prothese aufgetreten ist. Unter Verwendung von antibiotikahaltigem Zement, verglichen mit antibiotikafreiem Zement, konnte bspw. eine geringere Rate aseptischer Lockerungen beobachtet werden (Pajarinen et al., 2014).

Es können jedoch auch PAMPs wie LPS von Bakterien aus anderen Foci freigesetzt werden und hämatogen zur Prothese gelangen, ohne dass eine PPI entsteht.

Auch können grampositive Erreger die Expression von TLR-2 auf Makrophagen im periprothetischen Gewebe und damit die Immunantwort supprimieren und somit persistieren (Samelko et al., 2017). Dies könnte sich ebenfalls auf die Konzentration der nachgewiesenen EV-Oberflächenmarker ausgewirkt haben. Inwiefern eine bakterielle Besiedelung einer TEP oder die Ansammlung mikrobieller Bestandteile im periprothetischen Gewebe den vermeintlich aseptischen Lockerungsprozess beeinflussen, ist unklar. Es ist möglich, dass auch bei den als „aseptisch“ klassifizierten Fällen in subklinischem Ausmaß verschiedene Bakterien der Prothese adhärirten, die mit den verfügbaren diagnostischen Methoden nicht detektiert werden konnten, jedoch eine Auswirkung auf die lokale Immunantwort und damit auf die Sekretion bestimmter EV-Subpopulationen hatten.

5.4.3 Potentielle Unterschiede immunologischer Prozesse an Hüfte und Knie

Lokale Abwehrzellinfiltrate spielen bei degenerativ-entzündlichen Gelenkerkrankungen mit heterogenem Verlauf wie Arthrose und bei periprothetischer Osteolyse eine zentrale Rolle (Grieshaber-Bouyer et al., 2019; Huss et al., 2010). In den meisten Studien zur Diagnostik der PPI werden einheitliche Schwellenwerte für bestimmte Biomarker bei Patienten mit Hüft- und Knie-TEPs verwendet. Inwiefern sich die Immunreaktionen bei der aseptischen und der septischen Lockerung in Hüfte und Knie voneinander unterscheiden, ist unklar. Grieshaber-Bouyer et al. beobachteten einen Unterschied der lokalen Zellzusammensetzung und Zytokinexpression in der Synovialmembran von Arthrosepatienten, nämlich eine höhere Anzahl CD14-positiver Makrophagen und CD8-positiver T-Zellen beim Kniegelenk und eine stärkere und vielfältigere Zytokinexpression beim Hüftgelenk (Grieshaber-Bouyer et al., 2019). Im Patientenkollektiv der vorliegenden Promotionsschrift zeigte sich in der aseptischen Gruppe ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von CD63, CD82 (beim Hüftgelenk höher) und HLA-DR (beim Kniegelenk höher) in der Gelenkflüssigkeit. Ob und inwiefern immunologische Prozesse in Hüft- und Kniegelenk sich bei der periprothetischen Entzündungsreaktion - insbesondere auf Abriebpartikel - unterscheiden und welchen Einfluss diese Prozesse auf

die Konzentrationen verschiedener EV-Marker in der Gelenkflüssigkeit haben, gilt zukünftig weiter zu erforschen.

5.5 Die PPI - eine häufige, schwerwiegende und lebensgefährliche Komplikation

Bei jeder Art der Prothesenlockerung ist eine Revisions-Operation indiziert, insofern der Allgemeinzustand des Patienten es zulässt (Landgraeber et al., 2014). Die häufig älteren Patienten sind oft multimorbide und tragen ein erhöhtes Risiko für intra- und postoperative Komplikationen – auch für die PPI, deren Inzidenz steigt (Kildow et al., 2022; Mühlhofer et al., 2015; O'Toole et al., 2016). Die PPI und die Therapie derselben kosten die Patienten die Lebensqualität, die sie sich von der TEP-Implantation versprochen haben. Sie sind oft mit starken Schmerzen, langen Krankenhausaufenthalten und Immobilität, multiplen OPs und einer erheblichen Funktionseinschränkung des Gelenkes verbunden und mit einer deutlich erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. Zudem verursacht die Standardtherapie hohe Kosten (Bauer et al., 2018; Goswami et al., 2018; Lazic et al., 2022). Dabei handelt es sich um eine Kombination aus chirurgischem Vorgehen und mehrwöchiger bis -monatiger systemischer Antibiotikagabe, die mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen kann (Li et al., 2018a; Winkler et al., 2014). Insbesondere bei chronischen Gelenkinfekten mit ausgebildetem Biofilm gilt der zweizeitige TEP-Wechsel mit prothesenfreiem Intervall von 6-8 Wochen als Goldstandard. Entscheidend für die Prognose und nicht immer möglich ist die radikale Entfernung jeglichen Fremdmaterials und potentiell infizierten Gewebes bei der TEP-Explantation (Gbejuade et al., 2015; Otto-Lambertz et al., 2017; Zaborowska et al., 2021). Kann die PPI nicht eradiziert werden, können den Patienten stark beeinträchtigende Maßnahmen bis hin zur dauerhaften Antibiotikasuppressionstherapie oder Amputation der betroffenen Gliedmaße in Erwägung gezogen werden (Mühlhofer et al., 2015; Zimmerli and Sendi, 2017). Je länger die PPI persistiert, desto höher sind die Rezidivraten (Koh et al., 2017; Siljander et al., 2018). Bei einer nicht unerheblichen Anzahl an Patienten mit PPI kann kein Erreger nachgewiesen werden, so dass rein empirisch chirurgisch und lokal sowie systemisch mit Antibiotika behandelt wird (Goswami and Parvizi, 2019). Tan et al. bezeichneten die infektfreien Überlebensraten von Patienten mit präoperativ Kultur-negativer PPI (81,1% nach einem Jahr, 65,3% nach 5 Jahren) als

inakzeptablen Therapieerfolg (Tan et al., 2018). Auch Karczewski et al. zeigten, dass die präoperative Detektion der Erreger bei der PPI wesentlich das Outcome der Therapie beeinflusst (Karczewski et al., 2018).

In der Literatur werden nach initialer Therapie der PPI 1-Jahres-Sterblichkeitsraten zwischen 8% und 25,9% beschrieben (Otto-Lambertz et al., 2017). Zmistowski et al. beobachteten eine signifikant erhöhte Mortalität von Patienten mit PPI gegenüber denen mit aseptischer Lockerung nach operativer Therapie (nach 1 Jahr 10,6% vs. 2%, nach 5 Jahren 25,9% vs. 12,9%) (Zmistowski et al., 2014). Toulson et al. berichteten bei Patienten mit einer PPI der Hüfte und zweizeitiger Revisionsoperation in einem 2-Jahres-Follow-up über eine Sterblichkeitsrate von 25,8% bei einer Infektionskontrolle von ca. 95% (Toulson et al., 2009). Folglich sollte die Mortalität der PPI nicht unterschätzt werden. Eine frühe und individuell an den Patienten angepasste Therapie ist unerlässlich.

5.6 Fazit

Weder der direkte Erregernachweis aus der Gelenkflüssigkeit noch die bisher in Studien untersuchten Biomarker eignen sich allein zum sicheren Ausschluss einer „low-grade“-PPI. Daher wurden in der Gelenkflüssigkeit Oberflächenmarker von sEVs untersucht, die indirekt auf das Vorliegen einer PPI hindeuten, indem sie die Immunreaktion im Gelenk widerspiegeln können. Die Zusammensetzung und Anzahl der sEVs verändern sich bei der Abwehr einer Infektion. Verschiedene sEV-Subpopulationen erlauben Rückschlüsse auf die Ursprungszellen (Pérez et al., 2019; Schorey et al., 2015). Als innovatives Analyseverfahren zur Bestimmung verschiedener EV-Subpopulationen wurde die IFCM genutzt. Die Untersuchung von sEVs und zukünftig auch von bakteriellen MVs in der Gelenkflüssigkeit mit der IFCM sollte weiter exploriert werden.

CD82 war bei der PPI in hoch signifikant erhöhter Konzentration in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar und kann als spezifischer Marker für eine bakterielle Infektion dienen. Dass CD63 („pan-EV“-Marker für ILV), HLA-DR (Indikator der Antigenpräsentation) und CD66b (spezifisch für aktivierte Neutrophile) bei der PPI in nicht signifikant veränderter Konzentration bzw. CD9 in erhöhter Konzentration bei der aseptischen Lockerung nachweisbar waren, kann u.a. damit zusammenhängen, dass eine Entzündungsreaktion auch bei der aseptischen Lockerung im Gelenk vorliegt und starke Ausmaße annehmen

kann (Landgraeber et al., 2014) und bei einer „low-grade“-PPI eine floride, von Neutrophilen dominierte lokale Inflammationsreaktion ausbleiben kann. Die Gleitpaarungen und Standzeiten der Prothesen der Patienten unterschieden sich maßgeblich und könnten unterschiedliche intraartikuläre Immunreaktionen hervorgerufen haben. Dies konnte nicht in die Auswertung miteinbezogen werden. Die Pathogenese der aseptischen und septischen Lockerung ähnelt sich erheblich (Pajarinen et al., 2014). Sie können miteinander einhergehen, und es ist unklar, wie hoch die Dunkelziffern an asymptomatisch besiedelten Implantaten tatsächlich ist bzw. inwieweit diese zur vermeintlich „aseptischen Lockerung“ beitragen und wann man tatsächlich von einer „Infektion“ sprechen kann. Dies vermindert die diagnostische Wertigkeit körpereigener Biomarker.

Die Marker CD9 und CD82 bei PPI und aseptischer Lockerung sollten zunächst an einer erweiterten Studienpopulation (500 – 1.000 Patienten) bestimmt werden. Dabei sollte analysiert werden, ob sich Konzentrationsunterschiede bei „high-“ und „low-grade“-PPI beobachten lassen. Bestätigt sich das Ergebnis, dass CD9 bei der PPI in geringerer und CD82 in erhöhter Konzentration in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar sind, könnte man eine im klinischen Alltag applikable Testmethode etablieren. Evtl. könnten für die genannten Marker Teststreifenverfahren ähnlich der LE-Reaktion entwickelt werden. Oliveira-Rodríguez et al. wiesen mit einem Teststreifen, welcher mit Antikörpern gegen verschiedene EV-Oberflächenmoleküle präpariert war, innerhalb von 15 Minuten nach Benetzung mit Probenflüssigkeit verschiedene EV-Marker nach (Oliveira-Rodríguez et al., 2016). Derartige Point-Of-Care-Systeme könnten einen erheblichen Beitrag zur Diagnostik der PPI leisten.

Nicht zu vernachlässigen ist der Anteil an Patienten, bei dem präoperativ kein Punktat gewonnen werden kann. Da sEVs die Synovialmembran passieren können, könnten CD82 und CD9 bei einer PPI auch im Blut in erhöhter bzw. erniedrigter Konzentration nachweisbar sein. Dies sollte in einer weiteren Studie überprüft werden. Evtl. könnte man bei einer Punctio sicca präoperativ durch eine Blutentnahme Hinweise auf eine PPI erlangen und ggf. in der Zukunft die invasive Gelenkpunktion vor Prothesenwechseloperation durch eine Blutentnahme, die „liquid biopsy“ der Synovia, ersetzen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die periprothetische Infektion (PPI) gilt als eine der gravierendsten und häufigsten Komplikationen nach Einbau einer Totalendoprothese. Bis heute fehlt ein einheitlicher diagnostischer Goldstandard. „Small extracellular vesicles“ (sEVs) werden von nahezu allen Zelltypen sezerniert und spielen u.a. im Rahmen einer Infektion bei der Immunreaktion des Wirtes eine Schlüsselrolle.

In der dieser vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden, prospektiven klinischen Studie wurde die diagnostische Wertigkeit von sEV-Präparaten in der Gelenkflüssigkeit bei der PPI an Knie-, Hüft- und Schultergelenk untersucht. Die Arbeitshypothese lautete, dass die Konzentrationen verschiedener Oberflächenmarker auf sEVs in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit einer PPI verglichen mit Synovialaspirat von Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung signifikant erhöht seien.

Es wurde Gelenkpunktat von 48 Patienten mittels Immunfluoreszenz und bildgebender Durchflusszytometrie auf die Oberflächenmoleküle „cluster of differentiation“ (CD) 9, CD63, CD66b, CD82 und „human leukocyte antigen“-DR (HLA-DR) sowie mikrobiologisch untersucht. Die Probanden unterzogen sich bei persistierenden Beschwerden zum Ausschluss einer PPI als Beschwerdeursache einer Gelenkpunktion. Die Aufteilung der Patienten in eine septische und eine aseptische Gruppe erfolgte gemäß der PPI-Majorkriterien der 2018 modifizierten Diagnosekriterien der Musculoskeletal Infection Society. Daraus ergab sich, dass 35 Patienten (72,9%) eine aseptische und 13 Patienten (27,1%) eine septische Prothesenlockerung aufwiesen. Die Konzentrationen an CD9 zeigten sich entgegen der Arbeitshypothese in der Gelenkflüssigkeit der septischen Gruppe statistisch signifikant erniedrigt ($p=0,002$). Folglich kann der Nachweis von CD9 zur Differenzierung zwischen septischer und aseptischer Prothesenlockerung beitragen. CD82 war im Synovialaspirat der septischen Gruppe in statistisch signifikant erhöhter Konzentration nachweisbar ($p<0,0001$). Die Konzentrationen der übrigen Marker unterschieden sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant (CD63: $p=0,372$; CD66b: $p=0,634$; HLA-DR: $p=0,558$). Die Bedeutung von sEVs für die Diagnostik der PPI ist bisher kaum erforscht worden. CD82 und CD9 könnten als zukünftige Marker in der Gelenkflüssigkeit genutzt werden und die Diagnosefindung der PPI verbessern. Dies sollte in Studien mit einem größeren Patientenkollektiv ($n=500 - 1000$) validiert werden.

Periprosthetic joint infection (PJI) is considered one of the most common and severest complications after total joint arthroplasty. Currently, a diagnostic “gold-standard” is missing. To address this knowledge gap, the prospective clinical trial which the present dissertation is based on focused on small extracellular vesicles (sEVs). These are secreted by almost all cell types and play a key role in the host’s immune response during an infection. The purpose of this thesis was to examine the diagnostic relevance of sEV preparations in the synovial joint fluid from knee, hip and shoulder arthroplasty upon PJI. The underlying research hypothesis was defined as follows: The concentrations of different sEV surface markers in joint fluid taken from patients with PJI could be significantly increased compared to synovial fluid obtained from probands with prosthetic failure due to aseptic loosening. To explore this, joint fluid was withdrawn from 48 patients with painful knee, hip and shoulder arthroplasty and underwent microbiological testing as well as imaging flow cytometry. Therefore, five potential sEV markers, cluster of differentiation (CD) 9, CD63, CD66b, CD82 and human leukocyte antigen-DR (HLA-DR), were labelled with fluorescence-tagged antibodies against these surface molecules. Joint aspiration was conducted in all patients to rule out PJI as one possible cause for persisting pain.

PJI was diagnosed based on the major criteria of 2018 'Definition of Periprosthetic Joint Infection' (modified criteria of the Musculoskeletal Infection Society). 35 patients (72.9%) were classified as the aseptic group and 13 patients (27.1%) as the PJI group. As it turned out, the results partly contradicted the initial research hypothesis. The detected levels of CD9 were significantly lower in the PJI group than those in the aseptic group ($p=0.002$). This finding does mean, however, that CD9 could function as a biomarker to distinguish aseptic loosening (statistically significantly higher concentrations) from PJI. Contrarily, the measured concentrations of synovial fluid CD82 were significantly higher in the PJI group than in the aseptic group ($p<0.0001$). There was no statistically significant difference between groups regarding the detected levels of CD63 ($p=0.372$), CD66b ($p=0.634$), and HLA-DR ($p=0.558$).

In conclusion, the importance of sEVs for diagnosis of PJI has rarely been researched yet. The results obtained point to the possibility that CD9 and CD82 could serve as potential sEV markers in synovial fluid to improve diagnostics regarding PJI. This should be examined in further studies that include a higher number of patients ($n=500 - 1,000$).

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alijanipour, P., Adeli, B., Hansen, E.N., Chen, A.F., and Parvizi, J. (2015). Intraoperative Purulence Is Not Reliable for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty* 30, 1403-1406.
2. Arbeitskreis "Krankenhaus- & Praxishygiene" der AWMF 2015. Intraartikuläre Punktionen und Injektionen: Hygienemaßnahmen. AWMF-Leitlinien-Register-Nr. 029/006, Online-Publikation; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/029-006l_S1_Hygiene_intraartikulaere_Punktionen_und_Injektionen_2015-08_01-abgelaufen.pdf; letztes Abrufdatum: 22.06.2022.
3. Artavanis-Tsakonas, K., Kasperkovitz, P.V., Papa, E., Cardenas, M.L., Khan, N.S., Van der Veen, A.G., Ploegh, H.L., and Vyas, J.M. (2011). The Tetraspanin CD82 Is Specifically Recruited to Fungal and Bacterial Phagosomes prior to Acidification. *Infection and Immunity* 79, 1098-1106.
4. Bauer, T., Roux, A.L., and Dinh, A. (2018). What's new in periprosthetic joint infection: Diagnosis and bacteria. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 104, 425-426.
5. Boere, J., Malda, J., van de Lest, C.H.A., van Weeren, P.R., and Wauben, M.H.M. (2018). Extracellular Vesicles in Joint Disease and Therapy. *Frontiers in Immunology* 9, 2575.
6. Böker, K.O., Lemus-Diaz, N., Rinaldi Ferreira, R., Schiller, L., Schneider, S., and Gruber, J. (2018). The Impact of the CD9 Tetraspanin on Lentivirus Infectivity and Exosome Secretion. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 634-647.
7. Boyle, K.K., Wood, S., and Tarity, T.D. (2018). Low-Virulence Organisms and Periprosthetic Joint Infection - Biofilm Considerations of These Organisms. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 11, 409-419.
8. Brosseau, C., Colas, L., Magnan, A., and Brouard, S. (2018). CD9 Tetraspanin: A New Pathway for the Regulation of Inflammation? *Frontiers in Immunology* 9, 2316.
9. Busch, A., Jäger, M., Engler, H., Haversath, M., Bielefeld, C., Landgraeber, S., and Wegner, A. (2020). Is Procalcitonin (PCT) a reliable biomarker for preoperative diagnosing of low grade periprosthetic joint infection? A prospective study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 21, 257.
10. Cashikar, A.G., and Hanson, P.I. (2019). A cell-based assay for CD63-containing extracellular vesicles. *PLoS One* 14, 0220007.
11. Danesh, A., Inglis, H.C., Abdel-Mohsen, M., Deng, X., Adelman, A., Schechtman, K.B., Heitman, J.W., Vilardi, R., Shah, A., Keating, S. M., Cohen, M. J., Jacobs, E. S., Pillai, S. K., Lacroix, J., Spinella, P. C., and Norris, P. J. (2018). Granulocyte-Derived

Extracellular Vesicles Activate Monocytes and Are Associated With Mortality in Intensive Care Unit Patients. *Frontiers in Immunology* 9, 956.

12. Dauros Singorenko, P., Chang, V., Whitcombe, A., Simonov, D., Hong, J., Phillips, A., Swift, S., and Blenkiron, C. (2017). Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity. *Journal of Extracellular Vesicles* 6, 1324731.

13. DEGAM (Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e.V.) 2017. S3-Leitlinie: Multimorbidität. AWMF-Leitlinien-Register-Nr. 053-047; DEGAM-Leitlinie Nr. 20, Online-Publikation; https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-S3-Leitlinien/053-047_Multimorbiditaet/053-0471_%20Multimorbiditaet_redakt_24-1-18.pdf; letztes Abrufdatum: 22.06.2022.

14. Deirmengian, C.A., Liang, L., Rosenberger, J.P., Joaquim, T.R., Gould, M.R., Citrano, P.A., and Kardos, K.W. (2018). The Leukocyte Esterase Test Strip Is a Poor Rule-Out Test for Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty* 33, 2571-2574.

15. Devhare, P., and Ray, R. (2017). Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Molecular Aspects of Medicine* 60, 115-122.

16. Doyle, L.M., and Wang, M.Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8, 727.

17. Fantappiè, L., de Santis, M., Chiarot, E., Carboni, F., Bensi, G., Jousson, O., Margarit, I., and Grandi, G. (2014). Antibody-mediated immunity induced by engineered *Escherichia coli* OMVs carrying heterologous antigens in their lumen. *Journal of Extracellular Vesicles* 3, 24015.

18. Fink, B., Schlumberger, M., Beyersdorff, J., and Schuster, P. (2020). C-reactive protein is not a screening tool for late periprosthetic joint infection. *Journal of Orthopaedics and Traumatology* 21, 2.

19. G, K., Fodor, S., and Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology* 17, 638-650.

20. Gauvreau, M.E., Côté, M.H., Bourgeois-Daigneault, M.C., Rivard, L.D., Xiu, F., Brunet, A., Shaw, A., Steimle, V., and Thibodeau, J. (2009). Sorting of MHC Class II Molecules into Exosomes through a Ubiquitin-Independent Pathway. *Traffic* 10, 1518-1527.

21. Gbejuade, H.O., Lovering, A.M., and Webb, J.C. (2015). The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopaedica* 86, 147-158.

22. Genschmer, K.R., Russell, D.W., Lal, C., Szul, T., Bratcher, P.E., Noerager, B.D., Abdul Roda, M., Xu, X., Rezonzew, G., Viera, L., Dobosh B.S., Margaroli C., Abdalla T.H., King R.W., McNicholas C.M., Wells J.M, Dransfield M.T., Tirouvanziam R.,

Gaggar A., and Blalock J.E. (2019). Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung. *Cell* 176, 113-126.

23. Gibon, E., Córdova, L.A., Lu, L., Lin, T.H., Yao, Z., Hamadouche, M., and Goodman, S.B. (2017). The biological response to orthopedic implants for joint replacement. II: Polyethylene, ceramics, PMMA, and the foreign body reaction. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B, Applied Biomaterials* 105, 1685-1691.

24. Görgens, A., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Murke, F., Tertel, T., Horn, P.A., Thalmann, S., Welsh, J.A., Probst, C., Guerin, C., Boulanger C.M., Jones J.C., Hanenberg H., Erdbrügger U., Lannigan J., Ricklefs F.L., El-Andalouss S., and Giebel B. (2019). Optimisation of imaging flow cytometry for the analysis of single extracellular vesicles by using fluorescence-tagged vesicles as biological reference material. *Journal of Extracellular Vesicles* 8, 1587567.

25. Goswami, K., and Parvizi, J. (2019). Culture-negative periprosthetic joint infection: is there a diagnostic role for next-generation sequencing? *Expert Review of Molecular Diagnostics* 20, 269-272.

26. Goswami, K., Parvizi, J., and Maxwell Courtney, P. (2018). Current Recommendations for the Diagnosis of Acute and Chronic PJI for Hip and Knee-Cell Counts, Alpha-Defensin, Leukocyte Esterase, Next-generation Sequencing. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 11, 428-438.

27. Grieshaber-Bouyer, R., Kämmerer, T., Rosshirt, N., Nees, T.A., Konieczke, P., Tripel, E., Schiltenswolf, M., Kirsch, J., Hagmann, S., and Moradi, B. (2019). Divergent Mononuclear Cell Participation and Cytokine Release Profiles Define Hip and Knee Osteoarthritis. *Journal of Clinical Medicine* 8, 1631.

28. Grifka, J., and Kuster, M. (2011). *Orthopädie und Unfallchirurgie* (Springer Berlin Heidelberg).

29. Haversath, M., Klebingat, S., die VITAS-Gruppe., and Jäger, M. (2018). Abriebanalyse mit virtuellen CAD-basierten Röntgenaufnahmen in der Endoprothetik. *Der Orthopäde* 47, 811-819.

30. Hischebeth, G.T.R., Gravius, S., Buhr, J.K., Molitor, E., Wimmer, M.D., Hoerauf, A., Bekeradjian-Ding, I., and Randau, T.M. (2017). Novel Diagnostics in Revision Arthroplasty: Implant Sonication and Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Journal of Visualized Experiments* 130, 55147.

31. Hough, K.P., Wilson, L.S., Trevor, J.L., Strenkowski, J.G., Maina, N., Kim, Y.I., Spell, M.L., Wang, Y., Chanda, D., Dager, J.R., Sharma N.S., Curtiss M, Antony V.B., Dransfield, M.T. Chaplin D.D., Steele C., Barnes S., Duncan S.R., Prasain J.K., Thannickal V.J., and Deshane J.S. (2018). Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Scientific Reports* 8, 10340.

32. Hui, A.Y., McCarty, W.J., Masuda, K., Firestein, G.S., and Sah, R.L. (2012). A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine* 4, 15-37.

33. Huss, R.S., Huddleston, J.I., Goodman, S.B., Butcher, E.C., and Zabel, B.A. (2010). Synovial tissue-infiltrating natural killer cells in osteoarthritis and periprosthetic inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 62, 3799-3805.
34. Josse, J., Valour, F., Maali, Y., Diot, A., Batailler, C., Ferry, T., and Laurent, F. (2019). Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Frontiers in Microbiology* 10, 1602.
35. Karczewski, D., Winkler, T., Perka, C., and Müller, M. (2018). The Preoperative Microbial Detection is No Prerequisite for the Indication of Septic Revision in Cases of Suspected Periprosthetic Joint Infection. *BioMed Research International* 2018, 1729605.
36. Khan, N.S., Lukason, D.P., Feliu, M., Ward, R.A., Lord, A.K., Reedy, J.L., Ramirez-Ortiz, Z.G., Tam, J.M., Kasperkovitz, P.V., Negoro, P.E., Vyas T.D., Xu S., Brinkmann M.M., Acharaya I., Artavanis-Tsakonas K., Frickel E.-M., Becker C.E., Dagher Z., Kim Y.-M., Latz E., Ploegh H.L., Mansour M.K., Miranti C.K., Levitz S.M., and Vyas J.M. (2019). CD82 controls CpG-dependent TLR9 signaling. *FASEB Journal* 33, 12500-12514.
37. Kildow, B.J., Springer, B.D., Brown, T.S., Lyden, E., Fehring, T.K., and Garvin, K.L. (2022). Long Term Results of Two-Stage Revision for Chronic Periprosthetic Hip Infection: A Multicenter Study. *Journal of Clinical Medicine* 11, 1657.
38. Koh, I.J., Han, S.B., In, Y., Oh, K.J., Lee, D.H., Kim, T.K., and Knee Multicenter Collaboration Team (2017). The Leukocyte Esterase Strip Test has Practical Value for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection After Total Knee Arthroplasty: A Multicenter Study. *The Journal of Arthroplasty* 32, 3519-3523.
39. Koliha, N., Wiencek, Y., Heider, U., Jüngst, C., Kladt, N., Krauthäuser, S., Johnston, I.C.D., Bosio, A., Schauss, A., and Wild, S. (2016). A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 5, 29975.
40. Konoshenko, M.Y., Lekchnov, E.A., Vlassov, A.V., and Laktionov, P.P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International* 2018, 8545347.
41. Landgraeber, S., Jäger, M., Jacobs, J.J., and Hallab, N.J. (2014). The Pathology of Orthopedic Implant Failure Is Mediated by Innate Immune System Cytokines. *Mediators of Inflammation* 2014, 185150.
42. Landgraeber, S., von Knoch, M., Löer, F., Wegner, A., Tsokos, M., Hussmann, B., and Totsch, M. (2008). Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 29, 3444-3450.
43. Lazic, I., Prodinger, P., Stephan, M., Haug, A.T., Pohlig, F., Langer, S., von Eisenhart-Rothe, R., and Suren, C. (2022). Synovial calprotectin is a reliable biomarker for periprosthetic joint infections in acute-phase inflammation - a prospective cohort study. *International Orthopaedics* 46, 1473-1479.

57. Pajarinen, J., Jansen, E., Konttinen, Y.T., and Goodman, S.B. (2014). Innate Immune Reactions in Septic and Aseptic osteolysis around Hip Implants. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 24, 283-296.
58. Panagopoulou, M.S., Wark, A.W., Birch, D.J.S., and Gregory, C.D. (2020). Phenotypic analysis of extracellular vesicles: a review on the applications of fluorescence. *Journal of Extracellular Vesicles* 9, 1710020.
59. Parvizi, J., Tan, T.L., Goswami, K., Higuera, C., Della Valle, C., Chen, A.F., and Shohat, N. (2018). The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *The Journal of Arthroplasty* 33, 1309-1314.
60. Pérez, P.S., Romaniuk, M.A., Duette, G.A., Zhao, Z., Huang, Y., Martin-Jaular, L., Witwer, K.W., Théry, C., and Ostrowski, M. (2019). Extracellular vesicles and chronic inflammation during HIV infection. *Journal of Extracellular Vesicles* 8, 1687275.
61. Pitto, R.P., and Sedel, L. (2016). Periprosthetic Joint Infection in Hip Arthroplasty: Is There an Association Between Infection and Bearing Surface Type? *Clinical Orthopaedics and Related Research* 474, 2213-2218.
62. Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 315, 1584-1592.
63. Renz, H., and Gierten, B. (2019). Major Histocompatibility Complex. Online-Version: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Gressner A.M., and Arndt T (2019). Springer Berlin Heidelberg, 1560-1561.
64. Renz, N., Cabric, S., Janz, V., and Trampuz, A. (2015). Sonikation in der Diagnostik periprotetischer Infektionen: Stellenwert und praktische Umsetzung. *Der Orthopäde* 44, 942-945.
65. Rüwald, J.M., Randau, T.M., Hilgers, C., Masson, W., Irsen, S., Eymael, R.L., Kohlhof, H., Gravius, S., Burger, C., Wirtz, D.C., and Schildberg, F.A. (2020). Extracellular Vesicle Isolation and Characterization from Periprosthetic Joint Synovial Fluid in Revision Total Joint Arthroplasty. *Journal of Clinical Medicine* 9, 516.
66. Saiz, M.L., Rocha-Perugini, V., and Sánchez-Madrid, F. (2018). Tetraspanins as Organizers of Antigen-Presenting Cell Function. *Frontiers in Immunology* 9, 1074.
67. Sallai, I., Marton, N., Szatmári, A., Kittel, Á., Nagy, G., Buzás, E.I., Khamari, D., Komlósi, Z., Kristóf, K., Drahos, L., Turiák L., Sugár, S., Sándor Veres, D., Kendoff, D., Zahár, Á, and Skaliczki, G. (2022). Activated polymorphonuclear derived extracellular vesicles are potential biomarkers of periprosthetic joint infection. *PLoS One* 17, 0268076.
68. Samelko, L., Landgraeber, S., McAllister, K., Jacobs, J., and Hallab, N.J. (2017). TLR4 (not TLR2) dominate cognate TLR activity associated with CoCrMo implant particles. *Journal of Orthopaedic Research* 35, 1007-1017.
69. Schmidt, T., Zundorf, J., Gruger, T., Brandenburg, K., Reiners, A.L., Zinserling, J., and Schnitzler, N. (2012). CD66b overexpression and homotypic aggregation of human

peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *Journal of Leukocyte Biology* 91, 791-802.

70. Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., and Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports* 16, 24-43.

71. Shahi, A., and Parvizi, J. (2017). The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *EFORT Open Reviews* 1, 275-278.

72. Shahi, A., Tan, T.L., Kheir, M.M., Tan, D.D., and Parvizi, J. (2017). Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: And the Winner Is? *The Journal of Arthroplasty* 32, 232-235.

73. Siljander, M.P., Sobh, A.H., Baker, K.C., Baker, E.A., and Kaplan, L.M. (2018). Multidrug-Resistant Organisms in the Setting of Periprosthetic Joint Infection-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *The Journal of Arthroplasty* 33, 185-194.

74. Statistisches Bundesamt (Destatis) - Wiesbaden. (2021a). Gesundheit - Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) - Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller) - 2020, S.21. Online-Publikation; https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/operationen-prozeduren-5231401207014.pdf?__blob=publicationFile; letztes Abrufdatum: 22.06.2022.

75. Statistisches Bundesamt (Destatis) - Wiesbaden (2021b). Krankenhäuser - Die 20 häufigsten Operationen insgesamt (OPS 5) - 2020. Online-Publikation; <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/drg-operationen-insgesamt.html>; letztes Abrufdatum: 22.06.2022.

76. Tan, T.L., Kheir, M.M., Shohat, N., Tan, D.D., Kheir, M., Chen, C., and Parvizi, J. (2018). Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection: An Update on What to Expect. *The Journal of Bone and Joint Surgery Open Access* 3, 0060.

77. They, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., Ayre, C., Bach, J., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F. E., Bosch, S., Boulanger, C. M., Breakefield, X., Breglio, A. M., Brennan, M. Á, Brigstock, D. R., Brisson, A., Broekman, M., Bromberg, J. F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A. H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E. I., Bryan Byrd, J., Camussi, G., Carter, D., Caruso, S., Chamley, L. W., Chang, Y., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A. R., Clayton, A., Clerici, S. P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R. J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F. A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M. F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., de Candia, P., De Santana, E. F., De Wever, O., Del Portillo, H. A., Tanguy Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L. C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A. P., Dominici, M., Dourado, M. R., Driedonks, A. P., Duarte, F. V., Duncan, H.

M., Eichenberger, R. M., Ekström, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fatima, F., Fish, J. E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Gho, Y. S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D. C., Görgens, A., Gorski, S. M., Greening, D. W., Gross, J. C., Gualerzi, A., Gupta, G. N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszti, R. A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A. F., Hochberg, F. H., Hoffmann, K. F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A. G., Ikezu, T., Inal, J. M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H. K., Jacobsen, Steven, M. J., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S. M., Jones, J. C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E. T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K. P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D. J., Kornek, M., Kosanović, M. M., Kovács, Á. F., Krämer-Albers, E. M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I. V., Kusuma, G. D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S. M., Lucia R Languino 202 , Joanne Lannigan 203 , Cecilia Lässer 84 , Louise C Laurent 204 , Gregory Lavieu Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M., Xin Fiona Lee, Y., Lemos, D. S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Ts Li, I., Liao, K., Libregets, S. F., Ligeti, E., Lim, R., Kiang Lim, S., Linē, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C. A., Lorenowicz, M. J., Lörincz, Á. M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M. C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T. R., Maas, S. L., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E. S., Martin-Jaular, L., Martinez, M. C., Martins, V. R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L. K., McVey, M. J., Meckes, D. G., Meehan, K. L., Mertens, I., Minciacchi, V. R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D. C., Myburgh, K. H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsun, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J. P., Nolte-'t Hoen, E. N., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loughlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L. A., Osteikoetxea, X., Østergaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, M. D., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M. W., Phinney, D. G., Pieters, B. C., Pink, R. C., Pisetsky, D. S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I. K., Powell, B. H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R. L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M. I., Raposo, G., Rayyan, M. S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F. L., Robbins, P. D., Roberts, D. D., Rodrigues, S. C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K. M., Rughetti, A., Russell, A. E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J. A., Saul, M. J., Schiffelers, R. M., Schneider, R., Schøyen, T. H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G. V., Shetty, A. K., Shiba, K., Siljander, P. R., Silva, A. M., Skowronek, A., Snyder, O. L., Soares, R. P., Sódar, B. W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P. D., Stoorvogel, W., Stott, S. L., Strasser, E. F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W. S., Tomasini, R., Torrecilhas, A. C., Tosar, J. P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B. W., van der Grein, S. G., Van Deun, J., van Herwijnen, M. J., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M. E., van Wijnen, A. J., Vasconcelos, M. H., Vechetti, I. J., Veit, T. D., Vella, L. J., Velot, É., Verweij, F. J., Vestad, B., Viñas, J. L., Visnovitz, T., Vukman, K. V., Wahlgren, J., Watson, D. C., Wauben, H. M.H., Weaver, A., Webber, J. P., Weber, W., Wehman, A. M., Weiss, D. J., Welsh, S. A., Wendt, S., Wheelock, A. M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, Y., Xiaomei, Y., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J., Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A. R. , Zickler, A. M., Zimmermann, P.,

Zivkovic, A. M., Zocco, D., and Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV 2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* 7, 1535750.

78. Tian, Y., Gong, M., Hu, Y., Liu, H., Zhang, W., Zhang, M., Hu, X., Aubert, D., Zhu, S., Wu, L., and Yan X. (2020). Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *Journal of Extracellular Vesicles* 9, 1697028.

79. Valladares, R.D., Nich, C., Zwingenberger, S., Li, C., Swank, K.R., Gibon, E., Rao, A.J., Yao, Z., and Goodman, S.B. (2014). Toll-like receptors-2 and 4 are overexpressed in an experimental model of particle-induced osteolysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102, 3004-3011.

80. Ventress, J.K., Partridge, L.J., Read, R.C., Cozens, D., MacNeil, S., and Monk, P.N. (2016). Peptides from Tetraspanin CD9 Are Potent Inhibitors of Staphylococcus Aureus Adherence to Keratinocytes. *PLoS One* 11, 0160387.

81. Vicenti, G., Bizzoca, D., Nappi, V., Pesce, V., Solarino, G., Carrozzo, M., Moretti, F., Dicuonzo, F., and Moretti, B. (2019). Serum biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection: consolidated evidence and recent developments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23, 43-50.

82. Wang, X., Zhong, W., Bu, J., Li, Y., Li, R., Nie, R., Xiao, C., Ma, K., Huang, X., and Li, Y. (2019). Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer. *Molecular Carcinogenesis* 58, 674-685.

83. Wetters, N.G., Berend, K.R., Lombardi, A.V., Morris, M.J., Tucker, T.L., and Della Valle, C.J. (2012). Leukocyte Esterase Reagent Strips for the Rapid Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty* 27, 8-11.

84. Wiklander, O.P.B., Bostancioglu, R.B., Welsh, J.A., Zickler, A.M., Murke, F., Corso, G., Felldin, U., Hagey, D.W., Evertsson, B., Liang, X.M., Felldin U., Hagey D.W., Evertsson B., Liang X.-M., Gustafsson M.O., Mohammad D.K., Wiek C., Hanenberg, Bremer M., Gupta D., Björnstedt M., Giebel B., Nordin J.Z., Jones J.C., El Andaloussi S., and Görgens A. (2018). Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. *Frontiers in Immunology* 9, 1326.

85. Winkler, T., Trampuz, A., Hardt, S., Janz, V., Kleber, C., and Perka, C. (2014). Periprotetische Infektion nach Hüftendoprothetik. *Der Orthopäde* 43, 70-78.

86. Witwer, K.W., Buzás, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-‘t Hoen, E.N., Piper, M.G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., and Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* 2, 20360.

87. Witwer, K.W., Goberdhan, D.C., O'Driscoll, L., Théry, C., Welsh, J.A., Blenkinsop, C., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J.M., Fu, Q., Hill, A. F.,

- Lenassi, M., Lötval, J., Nieuwland, R., Ochiya, T., Rome, S., Sahoo, S., and Zheng, L. (2021). Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 10, 12182.
88. Wyles, C.C., Van Demark, R.E., Sierra, R.J., and Trousdale, R.T. (2014). High Rate of Infection After Aseptic Revision of Failed Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 472, 509-516.
89. Yanez-Mo, M., Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borrás, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N. H. H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötval, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E. M. N., Nyman, T. A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., Portillo, H. A. D., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Stampe Ostenfeld, M., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S. G., Vasconcelos, M. H., Wauben, H. M. H., and Wever, O. D. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4, 27066.
90. Zellner, J., Nerlich, M., and Angele, P. (2013). Gelenkpunktionen. Online-Version: Chirurgie Basisweiterbildung: In 100 Schritten durch den Common Trunk. Jauch K.W., Mutschler W., Hoffmann J.N., and Kanz K.-G. (2013). Springer Berlin Heidelberg, 331-336.
91. Zhuang, Y., Peng, H., Chen, Y., Zhou, S., and Chen, Y. (2017). Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)* 22, 1344-1354.
92. Zimmerli, W., and Sendi, P. (2017). Orthopaedic biofilm infections. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 125, 353-364.
93. Zmistowski, B., Della Valle, C., Bauer, T.W., Malizos, K.N., Alavi, A., Bedair, H., Booth, R.E., Choong, P., Deirmengian, C., Ehrlich, G.D., Gambir, A., Huang, R., Kissin, Y., Kobayashi, H., Kobayashi, N., Krenn, V., Lorenzo, D., Marston, S. B., Meermans, G., Perez, J., Ploegmakers, J., Rosenberg, A., Simpfendorfer, C., Thomas P., Tohtz, S., Villafuerte, J. A., Wahl, P., Wagenaar, F., and Witzo, E. (2014). Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *Journal of Orthopaedic Research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 32 Suppl 1, 98-107.
94. Zaborowska, M., Vazirisani, F., Shah, F.A., Firdaus, R., Omar, O., Ekström, K., Trobos, M., and Thomsen, P. (2021). Immunomodulatory effects exerted by extracellular vesicles from *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from bone-anchored prostheses. *Biomaterials* 278, 121158.
95. Zou, C., Zhang, Y., Liu, H., Wu, Y., and Zhou, X. (2022). Extracellular Vesicles: Recent Insights Into the Interaction Between Host and Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Immunology* 13, 840550-840550.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: 2018 modifizierte Diagnosekriterien der PPI.....	14
Tab. 2: Zur Gelenkpunktion verwendete Geräte und Instrumente.....	24
Tab. 3: Laborausstattung und Materialien zur Probenverarbeitung.....	24
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.....	25
Tab. 5: Fluoreszenzkonjugierte Antikörper.....	26
Tab. 6: Isotyp-Kontrollantikörper.....	26
Tab. 7: Software.....	26
Tab. 8: Mischungsschema der Antikörperlösung und Gelenkflüssigkeit.....	37
Tab. 9: Absolute und relative Häufigkeiten der Geschlechterverteilung.....	40
Tab. 10: Alter der Patienten in Jahren – Zusammenfassung.....	41
Tab. 11: BMI der Studienteilnehmer in kg/m ² - Zusammenfassung.....	43
Tab. 12: Häufigkeiten des BMI in kg/m ² nach WHO-Klassifikation.....	43
Tab. 13: Häufigkeiten der Vorerkrankungen der Patienten.....	44
Tab. 14: Häufigkeiten der betroffenen Gelenke.....	45
Tab. 15: Erregernachweis aus dem Gelenkpunktat in der septischen Gruppe.....	47
Tab. 16: Leukozytenzahl pro nl Blut – Zusammenfassung.....	48
Tab. 17: Serum-CRP-Werte in mg/dl >0,5 mg/dl – Zusammenfassung.....	50
Tab. 18: Häufigkeiten der LE-Reaktion im Gelenkpunktat.....	52
Tab. 19: CD9 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung.....	53
Tab. 20: CD63 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung.....	54
Tab. 21: CD66b (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung.....	54
Tab. 22: HLA-DR (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung.....	55
Tab. 23: CD82 (Partikel/ml) in der Synovialflüssigkeit – Zusammenfassung.....	56
Tab. 24: Ergebnisse der ROC-Analyse für die 5 verwendeten sEV-Marker.....	58
Tab. 25: Sensitivität und Spezifität der sEV-Marker.....	58

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
α -Defensin	alpha-Defensin
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AUC	englisch Area Under the Curve
BMI	englisch Body Mass Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cat.	englisch category
CCD	englisch Charge-coupled Device
CD	englisch Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
COPD	englisch Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRP	C-reaktives Protein
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
d.F.	der Fälle
DFI	Dream Future Innovation care
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure; englisch Deoxyribonucleic Acid
EBJIS	European Bone and Joint Infection Society
ECD	Electron Coupled Dye (auch Phycoerythrin-Texas Red; Fluoreszenzfarbstoff)
ELISA	englisch Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie

ESCRT	englisch endosomal sorting complex required for transport
et al.	et alii (deutsch und andere)
EvK	Evangelisches Krankenhaus
EVs	extrazelluläre Vesikel (Plural); englisch extracellular vesicles
evtl.	eventuell
FCS	Vorwärtsstreulicht; englisch forward scatter
G	Gauge
g	Beschleunigungsangabe einer Zentrifuge (mittlere Erdbeschleunigung g)
ggf.	gegebenenfalls
GIMP	GNU Image Manipulation Program
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen DR; englisch Human Leukocyte Antigen-DR isotype
i.d.R.	in der Regel
IgG1	Immunglobulin G1
IFCM	Bildgebende Durchflusszytometrie; englisch imaging flow cytometry
IL	Interleukin
ILV	intraluminale Vesikel
IQR	Interquartilbereich; englisch interquartile range
l	Liter
LE	Leukozytenesterase
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; englisch Major Histocompatibility Complex
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
m/IEVs	englisch medium/large extracellular vesicles
mm	Millimeter

µm	Mikrometer
MRT	Magnetresonanztomographie
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
MV	Membranvesikel
NTA	englisch Nanoparticle Tracking Analysis
MVBs	englisch multivesicular bodies
mW	Milliwatt
NA	numerische Apertur
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol/l)
NF-κB	englisch nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NP-40	Nonoxinol 40 bzw. Nonylphenoethoxylat mit 40 Ethylenoxid-Einheiten (Lysepuffer)
P	Partikel
PCR	Polymerasekettenreaktion; englisch Polymerase Chain Reaction
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster; englisch Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung; englisch Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
pH	„Potentia hydrogenii“ (Maßzahl für die Stärke einer sauren bzw. alkalischen Reaktion einer Lösung)
PJI	engl. Periprosthetic Joint Infection
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPI / PPI _n	Periprothetische Infektion / Infektionen
PRR	englisch Pattern Recognition Receptor
ROC	englisch Receiver Operating Characteristic
S.	Seite

sEVs	englisch small extracellular vesicles
sog.	sogenannt(e,er,es)
spp.	Species pluralis
SSC	Seitwärtsstreulicht; englisch sideward scatter
Staph.	Staphylococcus
Std.-Abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TDI	englisch Time-delay integration
TEM	englisch tetraspanin-enriched microdomain
TEP	Totalendoprothese
TLR	englisch Toll-like-Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
tRPS	englisch tunable Resistive Pulse Sensing
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
95%-KI	95%-Konfidenzintervall

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Tendenz der Anzahl an Revisionsoperationen durch PPI über 25 Jahre.....	8
Abb. 2: Folgen der Biofilmbildung bei der PPI.....	11
Abb. 3: Verschiedene Entstehungswege von EVs.....	17
Abb. 4: Beispiel zur Regulation der Immunreaktion durch EVs.....	19
Abb. 5: Zusammensetzung und Oberflächenstruktur der EVs.....	21
Abb. 6: Durchführung einer Hüftgelenkspunktion.....	29
Abb. 7: Durchführung einer Schultergelenkspunktion.....	30
Abb. 8: Vorbereitung einer Kniegelenkspunktion.....	32
Abb. 9: Schema des Arbeitsvorganges im ImageStreamX-System.....	34
Abb. 10: Bildverarbeitung der EV-Analyse mittels der IDEAS v6.2 Software.....	35
Abb. 11: Geschlechterverteilung in beiden Gruppen.....	40
Abb. 12: Altersverteilung in beiden Gruppen.....	41
Abb. 13: Verteilung des BMI in beiden Gruppen.....	42
Abb. 14: Anteil der multimorbiden Patienten in beiden Gruppen.....	44
Abb. 15: Verteilung der betroffenen Gelenke in beiden Gruppen.....	45
Abb. 16: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Gelenkflüssigkeit.....	46
Abb. 17: Verteilung der Leukozytenzahl im Blut beider Gruppen.....	48
Abb. 18: Verteilung der Serum-CRP Werte >0,5 mg/dl beider Gruppen.....	50
Abb. 19: Verteilung der LE-Reaktion im Gelenkpunktat beider Gruppen.....	51
Abb. 20: Verteilung von CD9 und CD63 in der Gelenkflüssigkeit.....	53
Abb. 21: Verteilung von CD66b und HLA-DR im Gelenkpunktat.....	55
Abb. 22: Verteilung von CD82 in der Gelenkflüssigkeit.....	56
Abb. 23: ROC-Kurve für die verschiedenen sEV-Marker im Gelenkpunktat.....	57
Abb. 24: ROC-Kurve für CD9 im Gelenkpunktat bei aseptischer Lockerung.....	59
Abb. 25: Rolle von Tetraspaninen bei der Antigenpräsentation.....	74
Abb. 26: Schema der Pathomechanismen bei aseptischer und septischer Prothesenlockerung.....	76

11 DANKSAGUNG

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Jäger, für die Förderung und Unterstützung im Rahmen dieser Promotionsarbeit an der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Essen. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. André Busch herzlich für die ausgezeichnete Betreuung, die Förderung bei der orthopädischen Forschung und die vielen motivierenden Gespräche. Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer.-nat. Bernd Giebel und Herrn Tobias Tertel für die gute Zusammenarbeit und die vielen neuen interessanten Ideen und deren Umsetzungen bezüglich extrazellulärer Vesikel in der Gelenkflüssigkeit, welche wichtige Grundsteine für das Entstehen des Dissertationsthemas waren. Tobias Tertel danke ich ganz herzlich für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Messungen und für die stets geduldigen Antworten zu diversen Fragen.

Ein großer Dank gilt den Patientinnen und Patienten, die durch die Teilnahme an der Studie diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Wegner und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Landgraeber, da sie maßgeblich bei der Entstehung dieser Studie mitgewirkt haben und das Forschungsvorhaben stets unterstützt haben.

Dem gesamten Team der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, dort Proben asservieren zu können, und für die freundliche Aufnahme in die Abteilung. Besonders danke ich Christin Völker, Marina Braun, Nicole Gilles und dem gesamten OP-Team für die kollegiale Unterstützung.

Meiner Kommilitonin Katja Dannat danke ich für die vielen hilfreichen Tipps zur bildlichen Gestaltung.

Ein großer Dank von Herzen geht an meine Eltern, Dr. jur. Frederike Bielefeld und Thomas Makowka, sowie an meinen besten Freund Philipp Kurtz, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

12 LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.