

Univerzita Palackého v Olomouci

Ortopedická klinika LF a FN Olomouc



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci



FAKULTNÍ NEMOCNICE
OLOMOUC

Mgr. Jana Vaculová

PŘÍSPĚVEK HISTOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ K OBJASNĚNÍ
POVAHY KOMPLIKACÍ KLOUBNÍCH NÁHRAD

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Studijní program: Anatomie, histologie, embryologie

Olomouc, 2018

Palacky University in Olomouc

Department of Orthopaedics

Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital Olomouc



Faculty of Medicine
and Dentistry

Palacký University
Olomouc



UNIVERSITY HOSPITAL
OLOMOUC

Mgr. Jana Vaculová

CONTRIBUTION OF HISTOLOGICAL EXAMINATION TO ELUCIDATION OF COMPLICATIONS ASSOCIATED WITH TOTAL JOINT ARTHROPLASTY

DISSERTATION THESIS

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Study program: Anatomy, histology, embryology

Olomouc, 2018

Vznik dizertační práce byl podpořen těmito granty:

IGA 16-31852A

IGA MZ ČR NT/11049

MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892)

Tato práce vznikla v rámci studijního programu anatomie, histologie, embryologie. Její obsah a zaměření je však vzhledem ke zvolenému tématu především kombinací histologické techniky, histologie a histopatologie. Podstatná část textu se zabývá možnostmi využití základních i speciálních barvicích metod a imunohistochemie, které jsou významným diagnostickým nástrojem v oblasti aseptického uvolnění kloubních náhrad.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením prof. MUDr. Jiřího Gallo, Ph.D. a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Olomouci dne 12.3.2018

Mgr. Jana Vaculová

Identifikační záznam

VACULOVÁ, JANA *Příspěvek histologického vyšetření k objasnění povahy komplikací kloubních náhrad. [Contribution of histological examination to elucidation of complications associated with total joint arthroplasty].* Olomouc, 2018. Počet stran: 85, počet příloh: 4. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ortopedická klinika; Ústav patologie Fakultní nemocnice Ostrava, 2018. Školitel: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mě podporovali a bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji především svému školiteli, panu prof. MUDr. Jiřímu Gallo, Ph.D., za odborné vedení, inspiraci a pozitivní přístup a MUDr. Pavlu Hurníkovi za jeho trpělivost, desítky společných hodin u mikroskopu při histologickém hodnocení a přípravě mikrofotografií. Děkuji také MUDr. Dušanu Žiakovi, doc. MUDr. Jaroslavu Horáčkovi, CSc. a MUDr. Janu Nieslaníkovi za jejich cenné rady, připomínky a konzultace.

Zvláště děkuji svým kolegyním v laboratoři, které mi pomáhaly při zpracování vzorků. Velmi si vážím kolektivu Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava za jejich morální oporu a optimismus.

V neposlední řadě upřímně děkuji svému muži a své nejbližší rodině za jejich pochopení, trpělivost a poskytnuté zázemí.

Abstrakt

Revize totálních endoprotéz (TEP) kyčle a kolene jsou v současnosti poměrně častým operačním výkonem. Zkoumání příčin vedoucích až k revizní operaci je předmětem mnoha studií usilujících o přesné určení etiologie nepříznivých tkáňových reakcí. Významnou oblast výzkumu představuje histologické vyšetření periprotetických tkání, k jehož zpřesnění bývá využita celá řada speciálních barvicích a imunohistochemických metod.

Obsahem práce jsou dvě na sebe navazující studie, ve kterých byly vyšetřovány vzorky periprotetických tkání získané během 31 revizních operací TEP kyčle a kolene. Výběr použitých pracovních postupů a metod se opíral o publikované výsledky jiných autorů, ale také o vlastní znalosti a zkušenosti z praxe.

První studie vycházela z potřeby objasnit a stanovit míru vlivu odběrové lokality, typu fixace implantátu, věku a pohlaví na výsledky histologického vyšetření. V odborné literatuře chybí jasná definice podmínek topografie a počtu vzorků pro histologické vyšetření. K vyšetření lze odebrat periprotetickou membránu nebo pseudopouzdro, ale metodika odběru vzorků je spíše individualizovaná. Koncept studie byl založen na odběru vzorků ze tří anatomických oblastí z okolí asepticky uvolněných TEP a na následném porovnání výsledků histologického vyšetření. Ve vzorcích odebraných nejbližší kloubu byla sledována vyšší denzita venul s vysokým endotelem a u necementovaných TEP byla pozorována četnější přítomnost polyetylenových otěrových částic, ale ani v jednom případě nebyl vztah k odběrové lokalitě prokázán jako statisticky významný. Jediným signifikantním nálezem byla přítomnost hyperplazie pseudosynoviální vrstvy ve vzorcích odebraných nejbližší kloubu. Zásadním zjištěním bylo, že samotná odběrová lokalita nemá významný vliv na výsledky histologického vyšetření periprotetických tkání. To však za dodržení podmínek, že jsou tkáně odebrány v přibližně stejné vzdálenosti od implantátu a že jsou splněny všechny kroky preanalytické i analytické fáze.

Navazující studie byla zaměřena na aplikaci speciálních barvicích a imunohistochemických metod k průkazu mastocytů a dendritických buněk, o kterých je toho v souvislosti se selháním TEP známo dosud velmi málo. Cílem práce bylo kvantifikovat a charakterizovat distribuci mastocytů a dendritických buněk a sledovat případné statisticky významné vztahy. Také byl zhodnocen přínos použitých metod detekce těchto dvou buněčných populací. Speciální barvicí metody k průkazu mastocytů byly hodnoceny jako méně spolehlivé, nejspolehlivější se ukázala imunohistochemická metoda zaměřená na průkaz tryptázy. Z imunohistochemických metod k průkazu dendritických buněk přinesla lepší výsledky protilátka proti S100 proteinu. Zvýšená denzita mastocytů a dendritických buněk byla významně asociována s přítomností polypózně utvářené pseudosynoviální

membrány a s TEP fixovanými cementem. Denzita dendritických buněk byla výraznější než denzita mastocytů, ale obě buněčné populace byly ve vyšetřovaných vzorcích poměrně významně zastoupeny. Jejich přesná role v indukci aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy musí být ještě přesněji objasněna. Slibné výsledky by mohlo přinést podrobnější sledování jejich vztahu s dalšími buněčnými populacemi, mikroprostředím a ovlivňujícími receptory, zejm. s využitím simultánní imunohistochemie.

Klíčová slova: aseptické uvolnění, totální endoprotéza, variabilita, imunohistochemie, dendritické buňky, mastocyty

Abstract

Today, revisions of total hip and knee replacement (THA, TKA) are often-used surgery procedures. Many studies made a big effort to define etiology of adverse local tissue reactions connected to aseptic loosening and investigate all of the possible causes leading to revision surgery. Histology examination supported by special stains and immunohistochemistry plays a critical role in tissue-based diagnosis and research.

In this study, we examined periprosthetic tissues obtained during the revision of aseptically loosened THA and TKA from 31 patients. Laboratory protocols and stain methods were based on the data published in previous studies. We also used our own experience in their implementation to the practice.

At first, we have attempted to evaluate the extent of variability in tissue response in relation to location of tissue sampling, implant fixation, age and sex in total joint arthroplasties. Up to the present day, little is known about the most suitable location for tissue sampling. In our study, samples for histological examination were taken from 3 different anatomical sites around the joint. A higher density of high endothelial cell venules was seen in the samples from around the joint, and polyethylene particles were more abundant in noncemented total joint replacement but both findings did not show statistically significant association with the sampling site. Only the presence of a pseudosynovial hyperplasia showed a significant association with the particular sampling site. The main results showed a relatively small variance in histomorphological changes among tissue samples from the same patient. Histological findings indicate that tissue samples retrieved from similar distance from around the revised joint show comparable results.

Secondly, we used selected special and immunohistochemical staining methods for evidence of mast cells and dendritic cells in periprosthetic tissues. There is a lack of data about the potential relation between mast and dendritic cells and histomorphological signs of aseptic loosening. The objective of the study was to quantify and characterize the distribution of mast and dendritic cells and to study possible significant relations. Special histology stains for detection of mast cells was evaluated as low specific and low reliable. Using immunohistochemistry, an antibody against Tryptase demonstrated best results in detection of mast cells and an antibody against S-100 protein showed very good results during the identification of dendritic cells. The increased density of mast and dendritic cells was associated with polypously formed pseudosynovium and cement fixation of prostheses; this relation was statistically significant. Although we observed the higher density of mast cells, the presence both mast and dendritic cells indicate their probably important participation in the process of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis. Promising and

new results can bring detailed research using simultaneous immunohistochemistry aimed to relation in a cellular environment and biological mediators.

Key words: aseptic loosening, total arthroplasty, variability, immunohistochemistry, dendritic cells, mast cells

Obsah

1 Teoretická část	12
1.1 Úvod do problematiky.....	12
1.2 Historie TEP kyčle a kolene.....	12
1.3 Princip totální endoprotézy	13
1.4 Biomateriály používané k výrobě kloubních náhrad	14
1.5 Typy fixace endoprotéz.....	15
1.6 Dlouhodobé výsledky TEP kyčle a kolene	16
1.7 Stručný přehled příčin reoperací TEP kyčle a kolene.....	16
1.7.1 Aseptické uvolnění a tkáňové maladaptace.....	18
1.7.2 Alergické reakce.....	18
1.7.3 Infekce kloubních náhrad	19
1.8 Aseptické uvolnění (AU) a periprotetická osteolýza (PPOL).....	20
1.9 Stručná historie výzkumu periprotetické patologie.....	21
2 Vlastní práce	23
2.1 Aktuální stav histologického výzkumu.....	23
2.1.1 Patogeneze tvorby pseudopouzdra a periprotetické membrány	23
2.1.2 Dosavadní přínos histologického vyšetření k poznání procesů periprotetické patologie.....	28
2.1.2.1 Postupy k vyšetření periprotetických tkání a jejich výstupy.....	28
2.1.2.2 Speciální barvicí metody.....	28
2.1.2.3 Imunohistochemie	28
2.1.2.4 Molekulárně genetická vyšetření	29
2.1.3 Zásady histologického zpracování periprotetických tkání	29
2.1.4 Histologické vyšetření periprotetických tkání.....	30
2.1.4.1 Klasifikace periprotetických membrán (SLIM).....	30
2.1.4.2 Identifikace a typologie otěrových částic	33
2.1.5 Doporučení pro praxi.....	37
2.2 Charakteristika souboru	38
2.3 Zpracování histologického materiálu	40
2.4 Studie A: Posouzení homogenity tkáňové odpovědi na přítomnost degračních produktů z implantátu	42
2.4.1 Cíle	42
2.4.2 Teoretické poznámky	42
2.4.3 Hypotézy	43
2.4.4 Základní a speciální histologické metody	43
2.4.5 Histologické hodnocení	44
2.4.6 Výsledky.....	45
2.4.7 Diskuze.....	57
2.4.8 Závěr.....	58
2.4.9 Přínos pro praxi	59
2.5 Studie B: Distribuce mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních	60
2.5.1 Cíle	60
2.5.2 Teoretické poznámky	60
2.5.3 Hypotézy	61
2.5.4 Speciální barvicí metody k průkazu mastocytů.....	61
2.5.5 Speciální barvicí metody k průkazu DC.....	62

2.5.6	Imunohistochemické metody průkazu mastocytů a DC.....	62
2.5.7	Histologické hodnocení.....	64
2.5.8	Výsledky.....	64
2.5.9	Diskuze.....	69
2.5.10	Závěr.....	70
2.5.11	Přínos pro praxi.....	71
2.6	Shrnutí závěrů jednotlivých studií.....	72
2.7	Summary.....	73
2.8	Seznam použitých zkratk.....	74
2.9	Literatura.....	75
2.10	Elektronické zdroje.....	84
2.11	Seznam publikací spojených s dizertační prací.....	85
	Příloha 1	
	Příloha 2	
	Příloha 3	
	Příloha 4	

1 Teoretická část

1.1 Úvod do problematiky

Totální endoprotéza je efektivní a úspěšnou metodou chirurgické léčby degenerativních, nádorových a traumatických postižení axiálních i periferních kloubů. Nejčastěji je indikována z důvodu degenerativních onemocnění po vyčerpání konzervativní i operační terapie zachovávající původní kloub.

Díky zvládnutí operační techniky, vysoké spolehlivosti a životnosti implantátů se TEP staly standardním řešením u pacientů všech věkových skupin. Celosvětově i v České republice se proto počet kloubních náhrad stále zvyšuje a poptávka po rychlejší uspokojování potřeb pacientů se dostává do popředí pozornosti. Z dat Národního registru kloubních náhrad vyplývá, že na území České republiky je ročně provedeno více než 20 000 TEP kyčle a více než 16 000 TEP kolene. V USA je to asi 320 000 TEP kyčle a 640 000 TEP kolene (*Grigg 2016*). Se zvyšujícím se počtem provedených TEP se adekvátně tomu zvyšuje také počet revizních operací. Proto je nutné registrovat osud každé endoprotézy a analyzovat důvody jejího selhání.

1.2 Historie TEP kyčle a kolene

Historie TEP kyčelního kloubu sahá až k roku 1890, kdy byla k výrobě umělé hlavice i jamky použita slonovina. Významný pokrok v léčbě nefunkčního kyčelního kloubu uskutečnil v roce 1923 americký ortoped norského původu Marius Smith-Petersen, který použil speciální hřeb vložený do krčku femuru a později vynalezl vitaliovou (chrom-kobaltovou) čepičku na hlavici femuru, která je dodnes používána v různých modifikacích (*Santanapipatkul 2017*).

Revoluční změny do oblasti endoprotetiky přinesl Angličan sir John Charnley zavedením principu tzv. nízkého tření „Charnley low friction arthroplasty“ v roce 1960 tím, že navrhl a provedl cementovou fixaci polyetylenové jamky i kovového dřívku zavedeného do dřevnaté dutiny femuru. Následovala řada dalších vylepšení týkajících se konstrukčních, materiálových a tribologických vlastností moderních kloubních náhrad kyčle.

Na úspěchy s TEP kyčelního kloubu postupně navázalo provádění TEP kolenního kloubu. Za průkopníka v této oblasti je považován Börje Walius, jehož kloub pracoval na principu šarnýrového kloubu. Ten však dovolil pouze sagitální pohyb. V 70. letech 20. století se začaly používat tzv. kondylární náhrady, jejichž vývoj prošel několika změnami

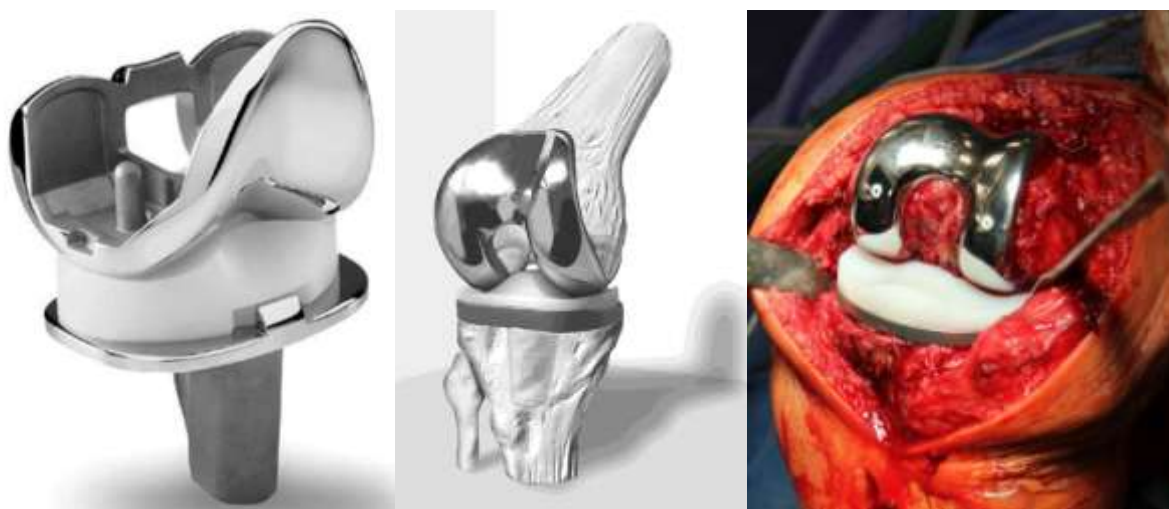
a dnes umožňují implantáty i částečný rotační pohyb kolene. Podobně jako v oblasti kyčle prošla náhrada kolene řadou inovací materiálu, kinematiky, kloubních povrchů či způsobu implantace.

1.3 Princip totální endoprotézy

Principem operace je odstranění poškozených kloubních povrchů a jejich nahrazení umělým kloubem. Pohyb se odehrává na tzv. artikulačním povrchu a energii mu dodávají svaly kolem kloubu.

Při TEP kolenního kloubu jsou používány tzv. kondylární náhrady. Femorální komponenta kopíruje tvar kondylů femuru a pokrývá celý artikulační povrch distálního femuru. Ventrálně je přizpůsobena k artikulaci s patelou. Tibiální komponenta pokrývá resekovanou kloubní plochu tibie. Tibiální komponenty mohou být vyrobeny jako jeden kus nebo jako stavebnice, kdy se do kotvící části fixuje artikulační komponenta (nejčastěji polyetylen). Tibiální komponenta má obvykle centrální kotvící trn, kterým je stabilizována v metafýze (Obr. 1).

Při TEP kyčelního kloubu se provádí výměna jamky acetabula a hlavičky stehenní kosti. Do kosti pánevní se usadí jamka, která může být z jednoho kusu materiálu anebo tzv. modulární, kdy se do kovové kotvící části fixuje artikulační vložka (polyetylenová, keramická, příp. kovová). Protěšek tvoří kovový dřík, který je fixován do lůžka v kosti stehenní (Obr. 2). Většina moderních endoprotéz kyčle je konstruována na stavebnicovém principu, který dovoluje volit minimálně velikost hlavičky a délku krčku.



Obr. 1 **TEP kolene.** (Ilustrační obrázky. Zdroje: staženo z internetu, prezentace firem, archiv Ortopedické kliniky FN Olomouc)



Obr. 2 **Cervikokapitální náhrada kyčle.** (Ilustrační obrázky. Zdroje: staženo z internetu, prezentace firem, archiv Ortopedické kliniky FN Olomouc)

1.4 Biomateriály používané k výrobě kloubních náhrad

Mezi hlavní požadavky na materiál k výrobě endoprotézy patří mechanická odolnost, biokompatibilita a dlouhá životnost. Pokračující vývoj nových materiálů a typů endoprotéz je odrazem zvyšujících se nároků na životnost i funkčnost endoprotéz a v dnešní době je jich na trhu obsáhlé množství. Mezi nejčastější materiály používané k výrobě kloubních náhrad patří kovy a jejich slitiny, vysokomolekulární polyetyleny a keramika.

V endoprotetice se používají nejčastěji titan a jeho slitiny, chrom-kobalt molybdenové slitiny a ušlechtilá ocel. Na kovový substrát bývají nanášeny další vrstvy vhodných korozivzdorných a antialergických materiálů (např. niob, zirkon). Pro fixaci cementem se používá dřík s hladkým povrchem, pro necementovanou fixaci je naopak povrch zdrsňen tryskáním či pískováním, příp. hydroxyapatitovým nástřikem.

Keramika je stabilní materiál s vynikajícími tribologickými vlastnostmi, používá se hlavně ke konstrukci kloubních párů, tj. hlaviček a artikulačních vložek u kyčlí. U kolen byly vytvořeny rovněž keramické páry, jejich používání v klinické praxi je zatím jen minimální. Vyznačuje se nejnížší mírou otěru a u poslední generace se riziko fraktury blíží k nule.

Nejrozšířenějším materiálem na výrobu artikulačních vložek je vysokomolekulární polyetylen (UHMWPE). V současné době jsou vyhodnocovány desetileté a delší zkušenosti s používáním polyetylenu s vysokým stupněm síťování, který má mnohem lepší odolnost vůči otěru ve srovnání s konvenčním UHMWPE.

1.5 Typy fixace endoprotéz

Obecně lze komponenty rozdělit podle použitého materiálu, povrchové úpravy, designu a fixace do kosti. Podle způsobu fixace implantátu lze rozlišit fixaci cementovanou, necementovanou a hybridní (Obr. 3, 4).

Cementovaná TEP znamená, že kotvící komponenty jsou ke kostnímu lůžku přichyceny pomocí kostního cementu. Používá se v oblasti TEP kyčle, spíše u starších pacientů a dominantně u TEP kolene. Pro podporu cementované kyčle jsou k dispozici dlouhodobé výsledky zejm. švédského registru. Avšak ani metaanalýzy studií neprokázaly horší dlouhodobé výsledky cementovaných kyčlí ve srovnání s bezcementovými.

Necementovaná TEP znamená, že primární fixace implantátu do kosti umožňuje makroporózní úprava dřívku, do které postupně vrůstá kost. V současné době jde o nejčastěji využívanou endoprotézu kyčle zejm. u pacientů vyžadujících aktivnější způsob života.

Hybridní TEP znamená, že jedna z kotvících komponent je ke kosti fixována cementem, zatímco druhá využívá principu bezcementové fixace.



Obr. 3 **Bez** cementový dřív (vlevo), **bez** cementová jamka (uprostřed nad sebou), tzv. **press-fit jamka** (vpravo). (Ilustrační obrázky. Zdroje: staženo z internetu)



Obr. 4 **Cementovaný dřík** (vlevo) a **cementovaná jamka** (vpravo). (Ilustrační obrázky. Zdroje: staženo z internetu)

1.6 Dlouhodobé výsledky TEP kyčle a kolene

Křivka přežití implantátu se obvykle prvních deset (někdy i patnáct) let drží hodně horizontálně, avšak po této době začíná různě rychle klesat. Podle agentury NICE musí deset let od operace přežít 90 % TEP kyčle a kolene určitého designu, aby mohl být prohlášen za dobrý. Je známo, že na úspěchu TEP se podílí nejen implantát, ale zejm. operatér (způsob a kvalita uložení) a pacient (úroveň zatěžování, váha apod.). Aby bylo možno zlepšovat výsledky přežití implantátu, musí být analyzovány příčiny, proč endoprotézy selhávají.

Statistiky udávají, že minimálně 80-90 % TEP kyčle funguje bez subjektivních potíží pacientů déle než deset let (*Verra 2016, Rajpura 2013*). V případě TEP kolene bývá spokojenost s výsledkem operace o něco variabilnější a také důvody selhání se poněkud liší.

Velmi zhruba lze odhadnout, že k reoperaci může během prvních deseti let od operace kyčle dospět přibližně 10 % pacientů, o něco více je to v případě pacientů s TEP kolene. Lze proto rozlišit předčasné selhání (do deseti let od operace, i když někteří autoři uvádějí kratší dobu) a pozdní selhání, kdy k reoperaci dojde obvykle po více než desetiletém používání implantátu.

1.7 Stručný přehled příčin reoperací TEP kyčle a kolene

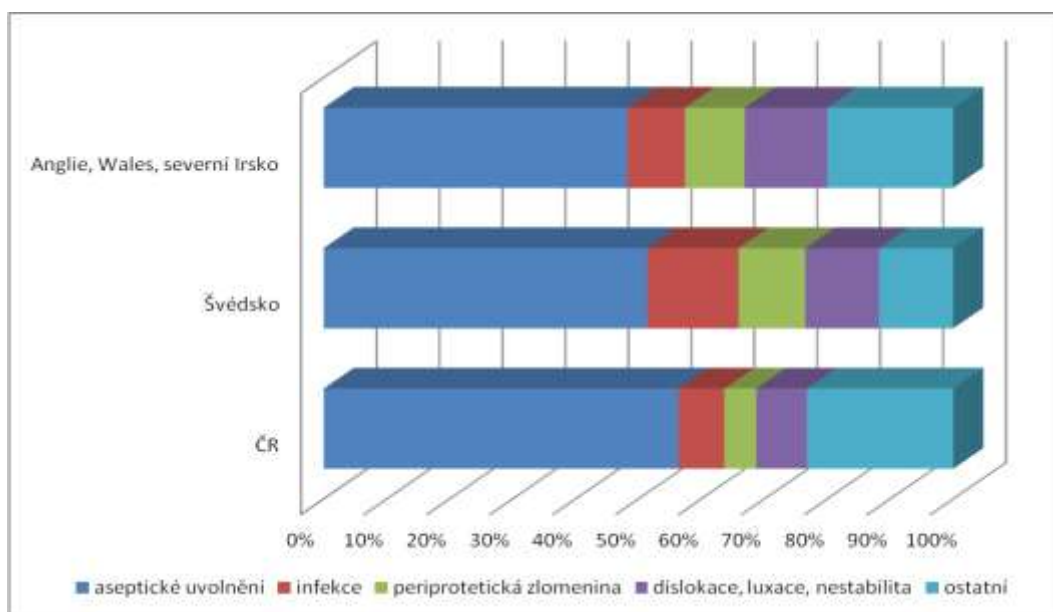
Komplikace vyskytující se v souvislosti s TEP lze z časového hlediska rozdělit na peroperační, časné pooperační a pozdní. Podle charakteru komplikace je lze také rozčlenit na

neortopedické a ortopedické (Rajpura 2013). V souvislosti se zlepšováním operační a pooperační péče se daří jejich četnost snižovat.

Mezi nejčastější komplikace patří hluboká žilní trombóza či poruchy hojení operační rány, lze mezi ně započítat i různá zarudnutí či okrajové nekrózy. Mezi další patří např. periprotetická zlomenina, luxace endoprotézy, infekce, krvácení či poranění nervů.

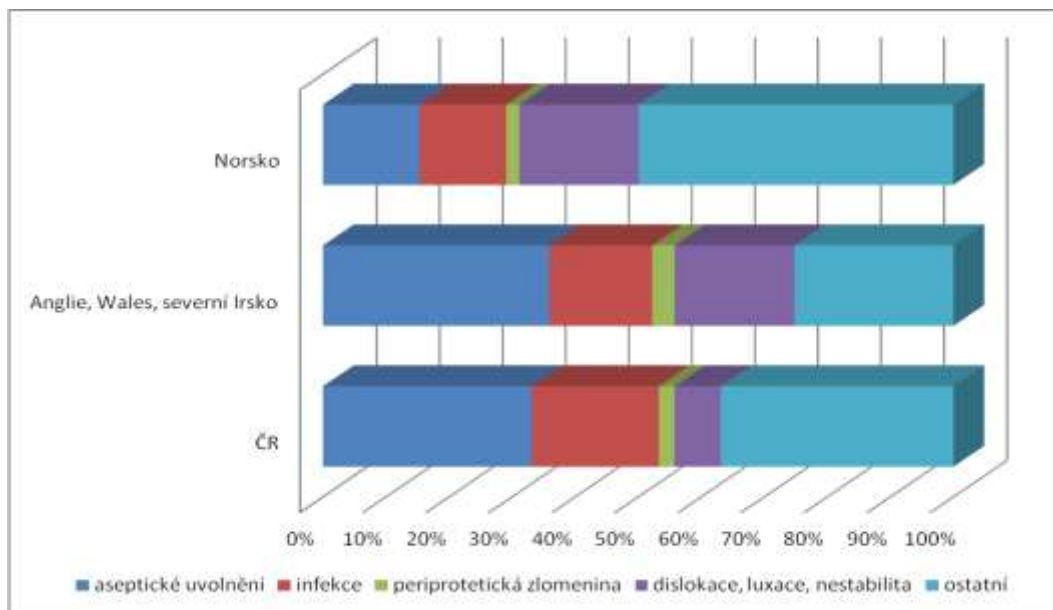
Samostatnou skupinu tvoří komplikace vyžadující reoperaci implantátu. Během prvních pěti let dominují statistikám infekce a nestability. Jak ukazují data z registrů, po deseti letech od operace je přehled příčin reoperací TEP kyčle a kolene odlišný (Grafy 1, 2). Tomuto období dříve dominovaly aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza, avšak u vynikajících endoprotéz se tyto stavy objevují až po dvacátém roce sledování.

V Evropě existuje 19 oficiálních národních registrů, které zpracovávají data o pacientech s implantacemi TEP kyčle a kolene, včetně informací o délce „nošení“ implantátů a příčinách jejich selhání.



Graf 1 Přehled nejčastějších důvodů k reoperaci TEP kyčle.

(Zdroje: <http://www.njrreports.org.uk/>, <https://shpr.registercentrum.se/shar-in-english/annual-reports-from-the-swedish-hip-arthroplasty-register/p/rkeyyeElz>, <http://www.uzis.cz/registry-nzis/nrkn>)



Graf 2 Přehled nejčastějších důvodů k reoperaci TEP kolene.

(Zdroje: <http://www.njrreports.org.uk/>, <http://nrlweb.ihelse.net/eng/>, <http://www.uzis.cz/registry-nzis/nrkn>)

1.7.1 Aseptické uvolnění a tkáňové maladaptace

Za základní předpoklad asymptomatického fungování protézy je považováno pevné držení implantátu v kosti a jeho přijetí okolními měkkými tkáněmi při zachované neuromotorice. Odloučení implantátu je označováno jako uvolnění. Pokud ke kosti drží pevně, ale dráždí lokální tkáň, jedná se o patologický stav.

Typickými představiteli jsou aseptické uvolnění, periprotetická osteolýza kolem stabilního implantátu, záněty pseudosynoviální výstelky či reakce pozdní přecitlivělosti. Obávanou komplikací je infekce kloubní náhrady, zde však hostitel, resp. jeho tkáň nereagují na endoprotézu, nýbrž na invazi bakterií (příp. hub). Bez ohledu na koncepci, která vysvětluje tu či onu poruchu, nikdo nepochybuje o přínosu vyšetření vzorků výpotku a tkání získaných v průběhu reoperace k vysvětlení etiopatogeneze selhání.

1.7.2 Alergické reakce

Přestože obecně je alergie na kov dosti častá, reoperace pro alergické reakce na kovové implantáty jsou zatím poměrně vzácné. V oblasti aloplastiky není mnoho kazuistik o reakci pozdního typu (reakce IV. typu přecitlivělosti) na kloubní implantát (*Bergschmidt 2011, Jäger 1979*). Přesto někteří autoři tvrdí, že kovové implantáty zvyšují riziko selhání TEP v souvislosti s adaptivní imunitní odpovědí (*Hallab 2001, Thomas 2009*). Histopatologické nálezy lymfocytárně-dominantní imunologické odpovědi směřují k

diagnóze reakce IV. typu přecitlivělosti na kovový implantát. Princip této reakce je založen na buněčné odpovědi zprostředkované T lymfocyty. Antigen prezentující buňky (makrofágy, dendritické buňky) vystaví na svém povrchu antigen s MHC II glykoproteinem a tento komplex je rozpoznán T lymfocyty. Stimulované T lymfocyty následně tvoří a uvolňují lymfokiny, které do okolí přitahují a aktivují makrofágy i další buňky, např. fibroblasty, osteoblasty a lymfocyty. Je-li tento stav chronický, dochází k silnému makrofagickému infiltrátu, někdy dokonce až k tvorbě granulomu, pseudotumoru. Kromě difuzního a perivaskulárního infiltrátu T lymfocyty je ve tkáních typická přítomnost venul s vysokým endotelem (HEV), masivní fibrinózní exudát, plazmocyty, četné eozinofily a nekrózy různého rozsahu (*Aroukatos 2010, Athanasou 2016, Lohman 2013, Lohman 2014, Willert 2005*). Přestože silné zánětlivé a nekrotické změny převažují spíše v periprotetických tkáních kolem kovových implantátů, příčinná souvislost aseptického uvolnění s cytotoxicitou či hypersenzitivní reakcí nebyla doposud jednoznačně potvrzena (*Athanasou 2016, Schuh 2008, Thyssen 2009*).

Spektrum výše popsaných histopatologických změn je v odborné literatuře označováno jako nepříznivá lokální tkáňová reakce (ALTR) nebo jako nepříznivá reakce na kovové částice (ARMD) (*Ricciardi 2016, Perino 2014*).

1.7.3 Infekce kloubních náhrad

Výskyt infekcí kloubních náhrad se pohybuje přibližně u 1-3 % operovaných pacientů, podle některých výzkumníků je však vyšší a problém se podceňuje. Za infekci je považována přítomnost bakterií na povrchu implantátu, resp. v jeho okolí (včetně intracelulární lokalizace) s doprovodnou tkáňovou odpovědí. Moderní zobrazovací technologie prokazují nejčastější lokalizaci bakteriálních kolonií (biofilmu) na povrchu endoprotézy.

Protože neexistuje zlatý standard pro laboratorní stanovení infekce kloubní náhrady, správná diagnostika by měla zahrnovat kombinace dostupných laboratorních vyšetření se správnou interpretací výsledků. K tomuto účelu je možno využít řadu vyšetření od stanovení zánětlivých markerů v periferní krvi až po cytologické, imunologické, mikrobiologické kultivační či molekulárně biologické vyšetření kloubního výpotku. Pro včasnou diagnostiku infekce kloubní náhrady se v České republice začala používat nová diagnostická metoda. Jedná se o rychlý chromatografický test založený na stanovení hladiny alfa-defensinu v synoviální tekutině, který je v případě infekce produkován leukocyty. Ačkoli je test vysoce specifický i senzitivní, neinformuje o původu, rozsahu a závažnosti infekce (*Fillerova 2017*).

Spolehlivý a rychlý výsledek poskytuje peroperační i konvenční histologické vyšetření. K určení diagnózy lze použít schéma dle Finka (*Fink 2013*), kde musí být pro vyslovení infekční diagnózy v jednom zorném poli 2 a více neutrofilních granulocytů při zvětšení 400x. Morawietzova klasifikace stanovuje limit 23 a více neutrofilních granulocytů v deseti zorných polích průměru 0,625 mm a zvětšení 20x. Při použití imunohistochemie je pro vyslovení infekce hraniční počet 50 neutrofilních granulocytů (CD15⁺) v jednom zorném poli při zvětšení 20x (*Krenn 2017*). V doplňujícím imunohistochemickém vyšetření vykazují infekční periprotetické tkáně převahu CD45⁺ lymfocytů, zatímco u aseptického uvolnění dominují CD68⁺ makrofágy.

Přestože septické uvolnění TEP vzniká na podkladě infekce mikroorganismy a aseptické uvolnění je způsobeno reakcí na otěrové částice, ukazuje se, že projevy tkáňové odpovědi jsou si v mnoha ohledech podobné. Tkáně s tzv. low-grade infekcí mohou být dokonce hodnoceny jako aseptické. Přesná hranice mezi septickým a aseptickým obrazem selhání TEP tedy není zcela zřetelná. V procesu septického i aseptického uvolnění hrají důležitou roli receptory TLR běžně rozpoznávající bakterie a bakteriální biofilm. Je tedy možné, že aseptické uvolnění není v mnoha případech vlastně aseptické, ale může jít o klinicky nízce virulentní infekci. Teorií o mechanismu aseptického uvolnění v souvislosti s mikrobiálními patogeny je několik. Bakteriální molekuly mohou osídlit otěrové částice, a způsobit tak odbourávání kostní tkáně, ale také mohou přímo narušit proces osteointegrace implantátu např. inhibicí diferenciací osteoblastů (*Pajarinen 2010, Takagi 2017, Wasko 2016*).

1.8 Aseptické uvolnění (AU) a periprotetická osteolýza (PPOL)

Podíl aseptického uvolnění jako důvodu k reoperaci TEP kyčle a kolene v posledních letech mírně klesá, stále je však nadpoloviční nebo těsně pod polovinou. (*Moerman 2016, Rajpura 2013*). Etiopatogeneze AU je multifaktoriální. Příčinou může být nesprávná počáteční fixace implantátu v kosti nebo mechanické uvolnění fixace. Druhou velkou skupinu důkazů tvoří studie popisující AU jako odloučení implantátu na podkladě chronického zánětu a periprotetické osteolýzy (*Gallo 2013*).

Počáteční fáze tkáňové odpovědi je zprostředkována vrozenou nespecifickou reakcí na cizí tělesa, kde hrají hlavní úlohu makrofágy. Ty mají dynamický fenotyp, který se mění v závislosti na lokálním mikroprostředí a aktuálních potřebách organismu. Makrofágy typu M1 podporují zánětlivou reakci fagocytózou a degradací zbytků odumřelých buněk, imunokomplexů či patogenních struktur. Produkují prozánětlivé cytokiny (např. IL-12), které podporují další rozvoj zánětlivé reakce stimulací T lymfocytů a NK buněk. Naopak aktivita

M2 makrofágů vede k reparativním procesům a sekreci protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β .

Uvolňováním řady biologických mediátorů se spouští kaskády reakcí s hlavním cílem zničit či rozpustit tyto cizorodé částice a výrazná zánětlivá reakce může být doprovázena osteolýzou. Rozvoj periprotetické osteolýzy a remodelace kosti má přímý vztah k přítomnosti všech typů otěrových částic s převahou polyetylenových (Gallo 2013, Goodman 1997, Goodman 2005, Goodman 2007, Goodman 2013, Harris 2001, Ollivere 2012, Purdue 2007, Willert 1977). Velmi malé otěrové částice stimulují makrofágy, osteoblasty, T lymfocyty a některé další buňky k expresi zánětlivých i osteoklastických cytokinů, zejm. faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF) a ligand pro receptor aktivující jaderný faktor κ B (RANKL). Tyto stimulující faktory umocňují formování, akumulaci, aktivitu a přežití osteoklastů a současně inhibují funkci osteoblastů, tedy osteogenezi (Willert 1977). Výsledkem je převaha odbourávání kosti nad její novotvorbou, čímž dochází k uvolnění implantátu. Denzita makrofágů, mnohjaderných buněk a velký výskyt reakcí kol cizích těles (KCT) odrážejí stupeň osteolýzy. Rychlost jejího rozvoje je však individuální a multifaktoriální (Goodman 1998, Jones 1999).

1.9 Stručná historie výzkumu periprotetické patologie

Výzkum v oblasti komplikací kloubních náhrad je založen na řadě experimentálních animálních studií a empirických šetření skupin i jednotlivých pacientů. Charakter publikovaných studií je různorodý v metodice i původu vyšetřovaných vzorků, kterými jsou nejčastěji periprotetické tkáně, synoviální tekutina, krev, buněčné suspenze a tkáňové kultury. Dřívější studie aseptického uvolnění nekladly na histologické vyšetření dostatečný důraz a v počátcích výzkumu byly využívány zejm. rentgenové zobrazovací metody, mikrobiologická a biochemická vyšetření. První domněnky o tom, že PPOL a AU mají vztah k přítomnosti otěrových částic, vznikly před více než čtyřiceti lety. Mezi průkopníky prací založených na histopatologické diagnostice patří Willert a kol., který v periprotetických tkáních prokázal dominanci makrofágů, přítomnost mnohjaderných buněk s reakcí KCT a také identifikoval ortopedický cement či kovové částice (Willert 1974). Willert navázal dalším významným zjištěním, že při překročení kapacity lymfatických cév pseudopouzdra nejsou částice transportovány lymfatickým systémem a dochází k jejich akumulaci v periartikulárních tkáních, zejm. v pseudopouzdru (Willert 1977). O několik let později Schmalzried a kol. definoval tzv. efektivní kloubní prostor, který obklopuje implantát. Zjistil, že obsahuje kloubní tekutinu s otěrovými částicemi a jeho rozsah je dán kvalitou osteointegrace (Schmalzried 1992a). Navazující práce ukázala, že mechanismus AU je zejm.

biologický a SLIM vzniká i v případě absence otěrových částic (*Schmalzried 1992b*). Už samotný histologický popis SLIM měl pro budoucí histologické studie velký přínos (*Goldring 1983*). S rozšiřujícím se počtem výzkumů ukazujících na různorodou histomorfologii vznikla potřeba jednotlivé typy SLIM odlišit a v roce 2006 bylo sestaveno první oficiální klasifikační schéma (*Morawietz 2006*).

Vzniklo mnoho prací zaměřených na tzv. částicovou nemoc a jejich výsledky dokazují zánětlivou a osteolytickou reakci tkání a buněk vystavených působení otěrových částic. Nejdříve byl vysloven koncept cementové nemoci (*Harris 1994*), protože cementové otěrové částice byly v preparátech popisovány nejčastěji. Až s příchodem implantátů fixovaných bez použití cementu došlo k rozpoznání PE částic s využitím polarizace či barvení olejovou červení. V té době byla také zveřejněna hypotéza o hypersenzitivní reakci pozdního typu na kovové implantáty (*Evans 1974*), která dodnes není jednoznačně potvrzena ani vyloučena.

S rozvojem imunohistochemie začaly vznikat první práce dokladující vztah přítomnosti makrofágů a dalších buněčných populací, cytokinů, prostaglandinů, interleukinů, degradativních enzymů, apoptotických markerů a dalších proteinů k rozvoji aseptického uvolnění (*All Saffar 1994, Hukkanen 1997, Chiba 1994, Jiranek 1993, Solovieva 1996*). Další autoři zase prokázali, že nadměrná osteolýza je způsobena aktivací signální dráhy RANKL/RANK/OPG (*Grimaud 2003, Gehrke 2003, Hercus 2001*). Výsledky prací, které u asepticky uvolněných TEP prokázaly přítomnost Toll-like receptorů, vyvolaly otázku, zda je aseptické uvolnění skutečně aseptické (*Lähdeoja 2010, Takagi 2017*).

V České republice se o rozvoj povědomí o AU a PPOL mimořádně zasloužil prof. A. Sosna a jeho spolupracovníci, vedle dalších např. prof. D. Pokorný, doc. M. Šlouf, doc. Z. Horák, Mgr. Zolotarevová či prof. G. Entlicher. Ve výzkumu se věnovali zejm. materiálovým analýzám polyetylenů (*Sosna 2003*), dále vyvinuli vlastní metodiku k detekci protetických částic v okolí implantátu (*Šlouf 2007*) a v neposlední řadě se zabývali i tkáňovou odpovědí na přítomnost částic (*Veigl 2007*). Druhým výzkumným centrem v České republice je Olomouc, kde se touto problematikou dlouhodobě zabývá skupina prof. J. Gallo, která se více věnuje biologickým aspektům AU a PPOL (*Gallo 2002, Gallo 2013, Gallo 2015, Tománková 2014*).

2 Vlastní práce

2.1 Aktuální stav histologického výzkumu

Prvním cílem práce bylo provést detailní přehled dosavadního výzkumu v oblasti tkáňových analýz periprotetických tkání (Příloha 1). Na základě získaných znalostí byly provedeny dvě na sebe navazující histologické studie (Kapitola 2.10, Příloha 2 a 3). Následující text obsahuje doplňující souvislosti a informace, které nejsou obsahem publikovaných výstupů.

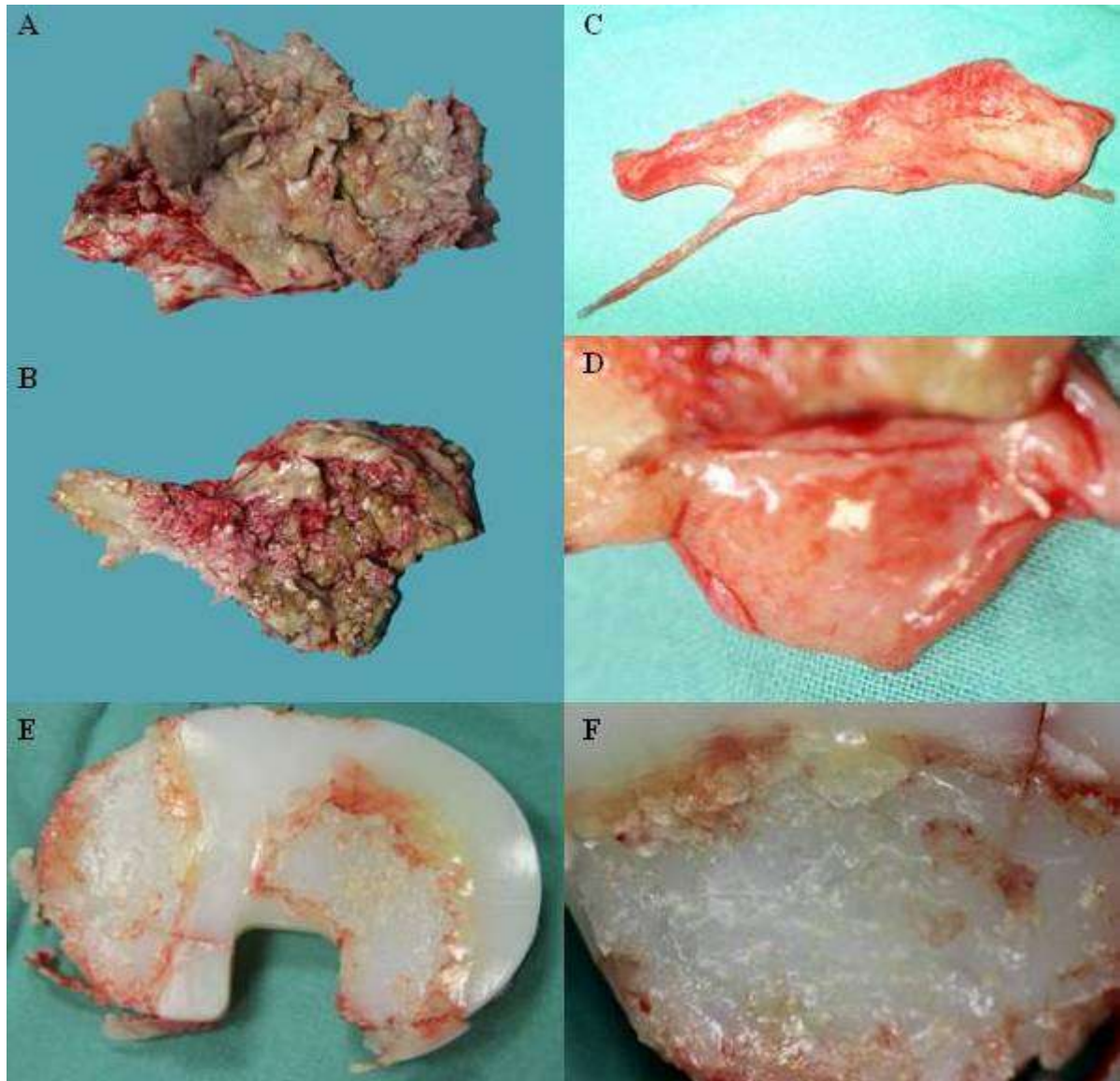
2.1.1 Patogeneze tvorby pseudopouzdra a periprotetické membrány

Za normálních okolností se kloubní pouzdro skládá ze zevní fibrózní vrstvy (membrana fibrosa) a z vnitřní synoviální membrány (membrana synovialis). Synoviální membránu pokrývá synoviální intima a hlubší subintima, což je řídké vazivo s krevními cévami. V oblasti synoviálních klků (plicae synoviales) se také nachází tuková tkáň. Synoviální intima je tvořena synovialocyty typu A a typu B, které jsou zabudované v mezibuněčné hmotě. Tzv. A-buňky představují vakuolizované makrofágy a B-buňky jsou specializované fibroblasty, které produkují synoviální tekutinu odpovědnou za výživu kloubní chrupavky, odstraňování metabolitů a distribuci buněk zajišťujících homeostázu kloubu.

Při výměně kloubu dochází k odstranění synoviální membrány a po implantaci vzniká kolem kloubní náhrady fibrózní pseudopouzdro z vnitřní strany pokryté pseudosynoviální membránou. V prostoru mezi implantátem a kostí dochází ke vzniku periprotetické membrány (SLIM, Obr. 5), která má obvykle fibrózně pojivovou strukturu s prokazatelnými retikulárními a kolagenními fibrilami různého stupně zralosti. Nově formované kolagenní fibrily se ve speciálních barvicích metodách barví slabě vzhledem k relativně malému množství kolagenu v amorfní hmotě, zatímco zralé kolagenní fibrily bývají znázorněny sytěji (Moerman 2016). Běžná je přítomnost makrofágů, fibroblastů, mnohояderných buněk s četnými reakcemi KCT a mikroskopicky zřetelnými otěrovými částicemi (Obr. 6-11). Protože se SLIM nachází v těsném kontaktu s implantátem, kde dochází k prvnímu kontaktu s částicemi, jejich distribuci a akumulaci, lze ji považovat za ideální zdroj informací o probíhající biologické odpovědi.

Podle některých autorů lze SLIM histologicky rozčlenit na 3 vrstvy: 1) 1-2 řady synovialocytů, bazální membrána chybí; 2) fibrovaskulární stroma s četnými makrofágy a mnohояdernými buňkami, včetně reakce KCT; 3) fibrovaskulární vrstva přiléhající ke kosti

s možnou přítomností kostního detritu. (*Goldring 1983, Goldring 1986, Jones 1999*). Jiní autoři se naopak přítomností tkáňových změn ve vztahu k zonalitě SLIM nebo pseudopouzdra vůbec nezabývají (*Browne 2010, Goodman 1998, Jansen 2014, Lennox 1987*).



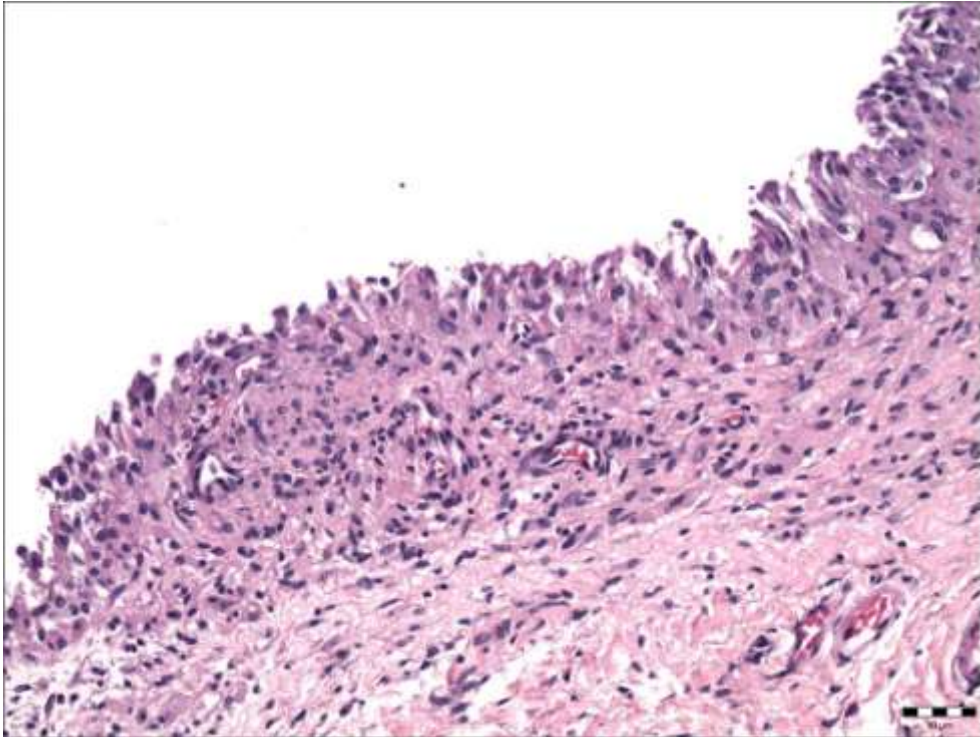
Obr. 5 Makrofotografie SLIM, synoviální membrány a poškozené PE komponenty implantátu.

(Zdroj: archiv prof. Gallo)

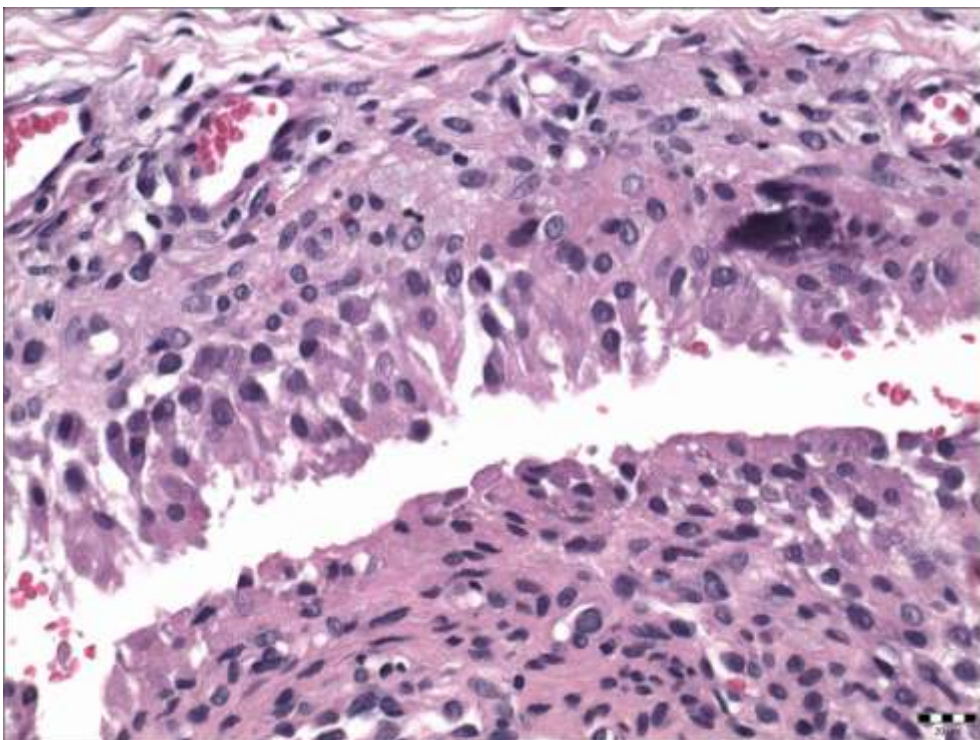
A, B SLIM (asi 20 let od primoinplantace TEP kolene).

C, D Synoviální membrána při artróze kolene.

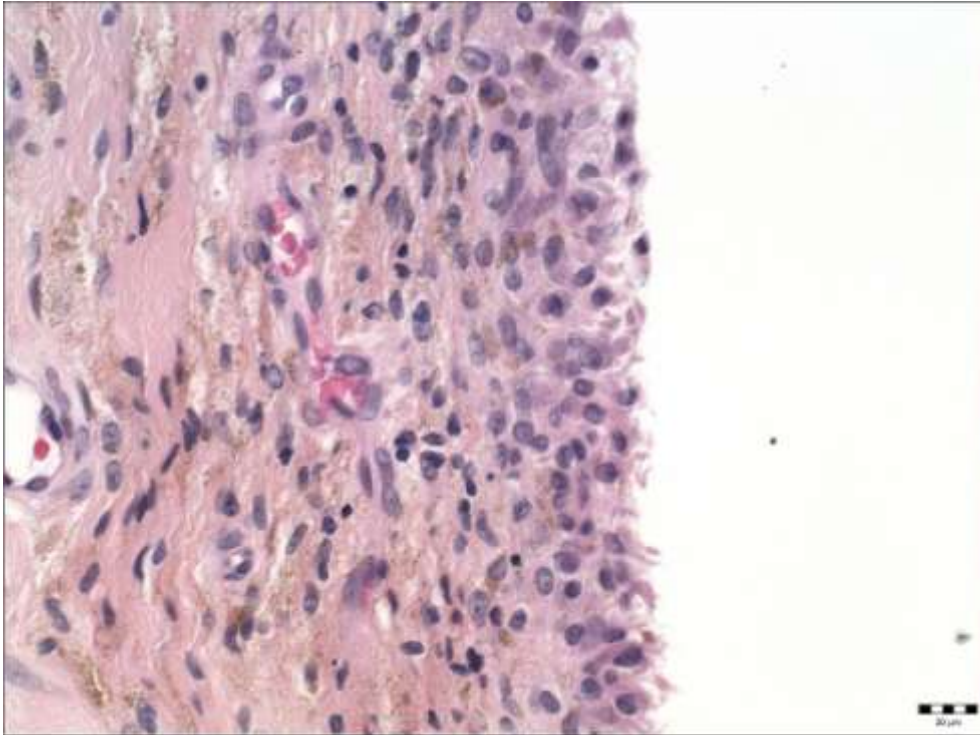
E, F Poškozený PE u TEP kolene.



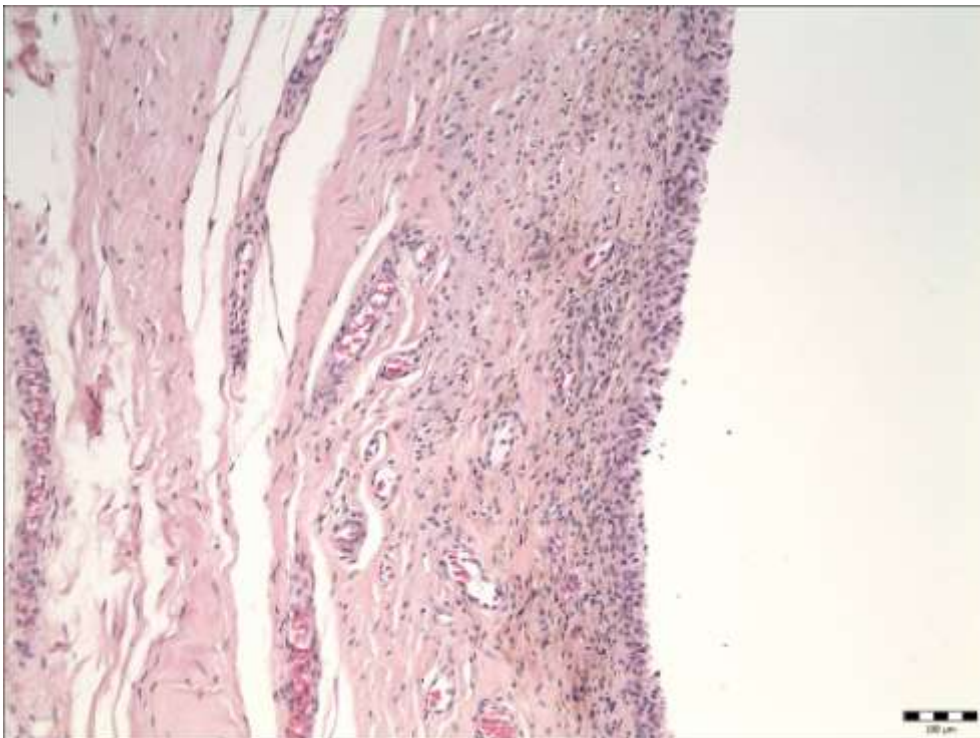
Obr. 6 **Hyperplazie** superficiální vrstvy SLIM, pacient č. 6, HE 200x.



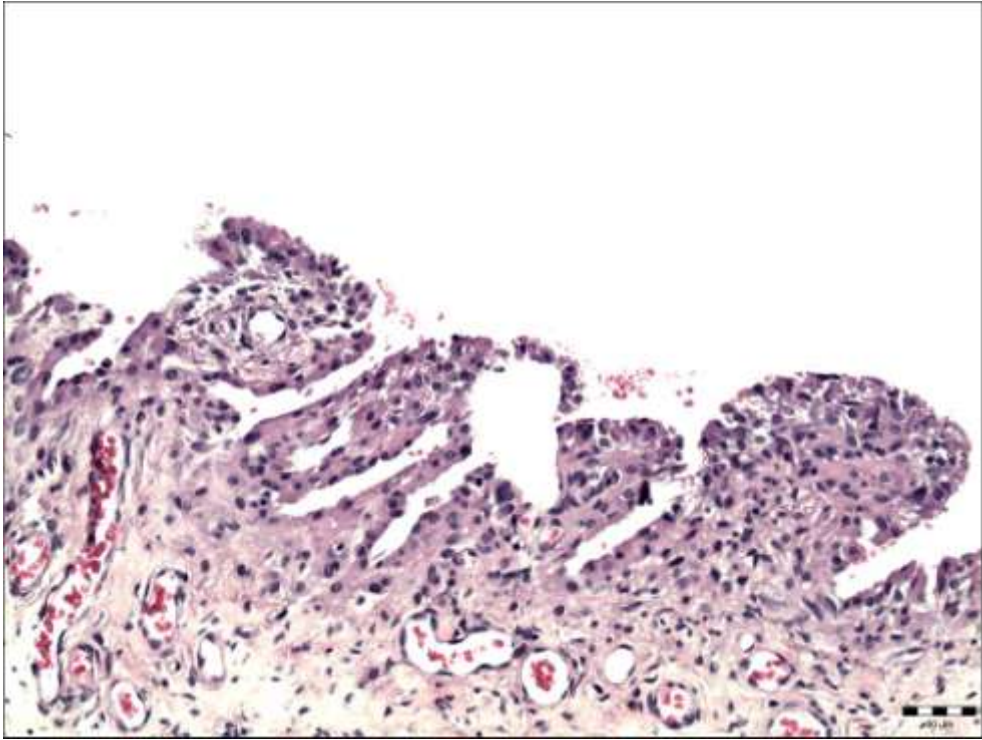
Obr. 7 **Hyperplazie** superficiální vrstvy SLIM, protáhlé synovialocyty, pacient č. 6, HE 400x.



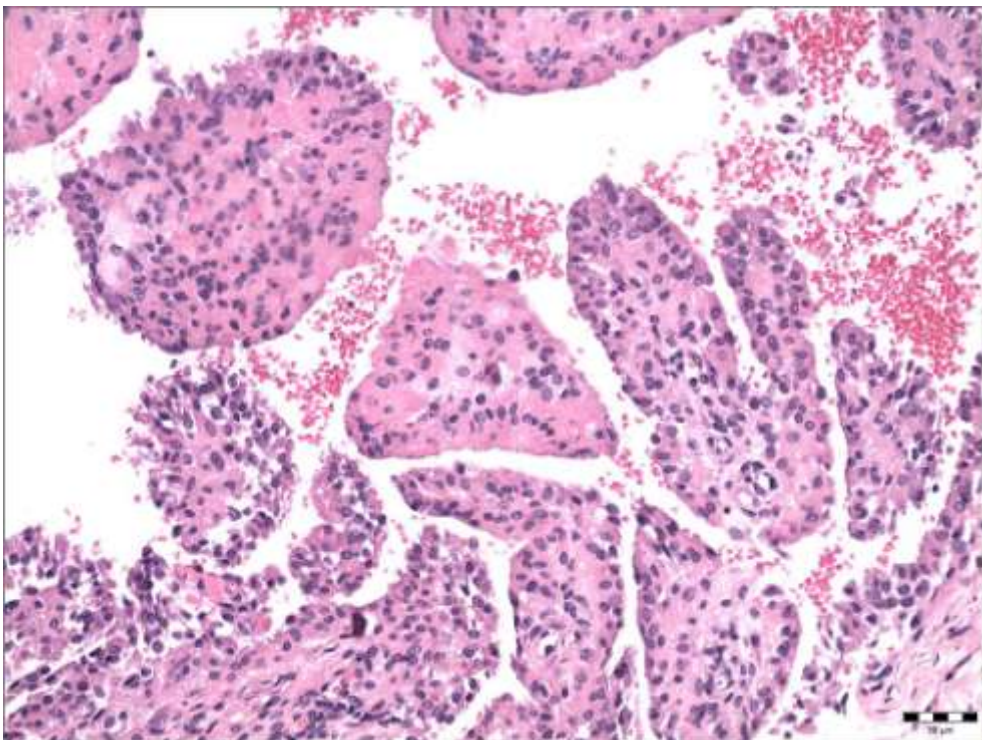
Obr. 8 Normální tloušťka superficiální vrstvy SLIM, pacient č. 20, HE 400x.



Obr. 9 Ploché utváření SLIM, pacient č. 17, HE 100x.



Obr. 10 **Mikrovilózní utváření SLIM**, pacient č. 14, HE 200x.



Obr. 11 **Polypoidní utváření SLIM**, pacient č. 10, HE 200x.

2.1.2 Dosavadní přínos histologického vyšetření k poznání procesů periprotetické patologie

2.1.2.1 Postupy k vyšetření periprotetických tkání a jejich výstupy

Výsledky výzkumných prací značně přispívají k popisu buněčných elementů, mediátorů i signálních drah účastnících se procesu uvolnění TEP. Byla identifikována celá řada cytokinů, chemokinů, metaloproteináz, růstových a inhibičních faktorů a dalších proteinů, které se podílejí na biologické odpovědi hostitele (Příloha 1). Publikované výstupy jsou ale limitovány např. heterogenitou skupin pacientů, nemožností odebírat tkáň postupně v různých obdobích po náhradě kloubu, chybějícím standardizovaným protokolem odběru vzorků či nedostatkem skutečných kontrolních vzorků (tkáň odebrané „bezproblémovým“ pacientům po implantaci).

2.1.2.2 Speciální barvicí metody

K průkazu tkáňových a buněčných struktur, endogenních i exogenních elementů slouží speciální barvicí a impregnační metody. Ty jsou obecně založeny na chemických reakcích, jejichž výsledkem jsou barevné nerozpustné produkty hodnotitelné v optickém či fluorescenčním mikroskopu. Řada těchto metod byla opakovaně použita při hodnocení struktury, denzity i charakteru stavby periprotetických tkání (Příloha 1).

2.1.2.3 Imunohistochemie

Imunohistochemické metody jsou založeny na kombinaci biochemických, histologických a imunologických principů s cílem znázornit složky tkání či buněk aplikací protilátek se specifickou vazbou na požadovaný cíl. Ve výzkumu selhání TEP byla testována celá řada markerů (Tab. 1, Příloha 1). K detekci mnohých molekul v parafinových řezech doposud neexistují dostupné protilátky a musí být využity jiné diagnostické postupy.

Cíl detekce	Použitá protilátka
Markery osteoklastů	RANK (<i>Mandelin 2003</i>)
Chemokiny	CXCR4 (<i>Drynda 2015</i>)
Metaloproteinázy	TACE (<i>Horiki 2004</i>) ADAM-8 (<i>Mandelin 2003</i>)
Markery buněčné proliferace	Ki-67 (<i>Söder 2016</i>)
Růstové faktory	TgFB1 (<i>Tománková 2015</i>)
Ostatní proteiny a buněčné produkty	HMG-B1 (<i>Steinbeck 2014</i>) 4-hydroxynonenal (<i>Steinbeck 2014</i>) Endoglin (<i>Jansen 2014</i>) HSP60 (<i>Gallo 2015</i>) NLRP3 inflamazom (<i>Naganuma 2016</i>)

Tab. 1 Další protilátky použité ve výzkumu periprotetických tkání (nepublikováno v Příloze 1).

2.1.2.4 Molekulárně genetická vyšetření

Molekulárně genetická vyšetření lze provádět na zmrazených i fixovaných parafinových řezech, v živých buňkách a tkáních. Tyto metody umožňují spolehlivě detekovat i velmi málo zastoupené znaky či slabé signály, proto jsou ve výzkumu periprotetických tkání využívány stále častěji. I přes stále se rozšiřující možnosti molekulárně genetických vyšetření však zůstává histologické vyšetření s využitím speciálních barvicích a imunohistochemických metod hlavním nástrojem k hodnocení morfologie tkání. Jeho významným benefitem je možnost zhodnotit distribuci sledovaných znaků ve vztahu ke struktuře buňky či tkáně.

2.1.3 Zásady histologického zpracování periprotetických tkání

Pro histologické zpracování periprotetických tkání platí všeobecné zásady pro odběr reprezentativního tkáňového vzorku, adekvátní fixaci a laboratorní postupy. Za ideální fixační tekutinu je považován 10% formalín (pH 7,2-7,6), do kterého musí být odebrané tkáně vloženy neprodleně po odběru, aby se zabránilo autolýze buněk. Rychlost penetrace formalínu tkáněmi je cca 0,5 mm/hod. a může být ovlivněna několika faktory, např. teplotou, pH a koncentrací formalínu nebo velikostí vzorku. Mnohem pomaleji dochází k upevnění vazeb na buněčné proteiny, které jsou u tkáňového bloku s maximálním rozměrem 2x2 cm úplné až po 24-48 hodinách při pokojové teplotě (*Fox 1985, Thavarajah 2012*). Moderní tkáňové procesory pracující ve vakuu urychlují penetraci formalínu i dokončení potřebných vazeb, a dobu fixace je tak možno významně zkrátit (*Chesnick 2010*). Akceptovatelná doba fixace zachovávající morfologické vlastnosti tkáně a reaktivitu proteinů je minimálně 6 a maximálně 24 hodin (*Nenutil 2013, Puchtler 1985, Srinivasan 2002*). Některé antigeny však zůstávají dobře detekovatelné i po několikátýdenní fixaci ve formalínu (*Battifora 1986, Varma 1999*). V případě, že tkáň vyžaduje odvápnění, je klíčová správná volba dekalcificačního prostředku, který musí co nejlépe zachovávat antigenicitu tkáně.

Každý tkáňový vzorek musí být před vlastním histologickým zpracováním přikrojen do tkáňových bloků (ideálně velikosti 1x1x0,3 cm). Vždy je žádoucí detailní makroskopický popis, makrofotodokumentace a značení histologickými barvivy pro snazší orientaci. Ve tkáňovém odvodňovacím automatu dochází k důkladné dehydrataci tkáně ve vztupné řadě alkoholových lázní, projasnění v několika lázních xylenu a prosycení rozpuštěným parafinem. Po přenesení tkáňových bloků do zalévacích komůrek jsou připraveny parafinové bloky, ze kterých se na mikrotomu připravují řezy. Jejich ideální tloušťka pro základní, speciální barvicí a imunohistochemické metody činí 3-5 μm .

2.1.4 Histologické vyšetření periprotetických tkání

Standardní histologické vyšetření periprotetických tkání by mělo vždy probíhat v optickém mikroskopu s polarizací. V České republice není stanoveno oficiální doporučení pro makroskopické a mikroskopické vyšetření periprotetických tkání. Této problematice je však v posledních letech věnována velká pozornost a bylo vydáno několik velmi užitečných publikací (*Krenn 2014, Krenn 2017, Perino 2018*).

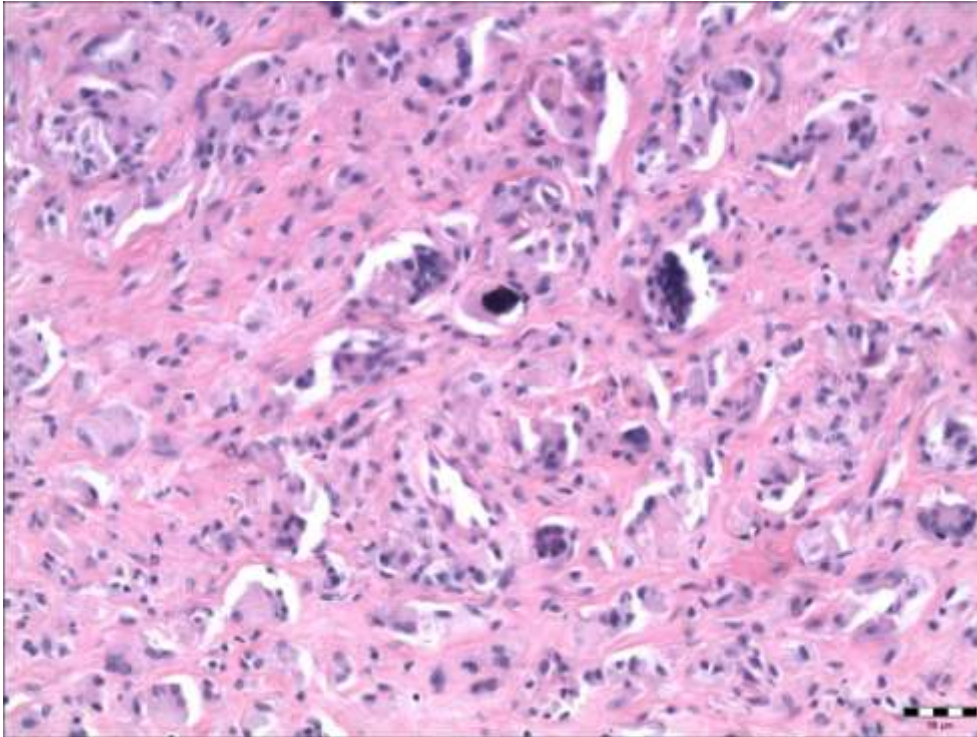
Během mikroskopického vyšetření je všeobecně doporučeno zvětšení 40x a 100x pro přehledné prohlížení preparátů, pro detailní pozorování zvětšení 200x a 400x. Důležitá je dostupnost přesných klinických a technických informací, např. složení a typ použitých komponent, makroskopické nálezy při revizní operaci. Pro optimální klinicko-patologický výstup by měla být naplněna kritéria uvedená v Tab. 2.

Makropopis	Mikroskopický popis
<ul style="list-style-type: none">▪ utváření▪ konzistence▪ barva▪ rozměr (trojrozměrné měření)▪ váha nefixovaného vzorku▪ přítomnost kosti, zbytků implantátu, stehů▪ viditelné otěrové částice▪ fotodokumentace	<p>Morfologie tkáně</p> <ul style="list-style-type: none">▪ nekróza (rozsah)▪ apoptotické změny (mírné, střední, výrazné) <p>Částice</p> <ul style="list-style-type: none">▪ otěrové▪ endogenní pigmenty a krystaly▪ exogenní (zbytky fixačních materiálů) <p>Buněčná populace a zánětlivé změny</p> <ul style="list-style-type: none">▪ makrofágy, fibroblasty▪ neutrofilny, lymfocyty, plazmocyty, eozinofily, mastocyty▪ endoteliální buňky (ploché, vysoké) <p>Klasifikace SLIM (viz dále)</p>

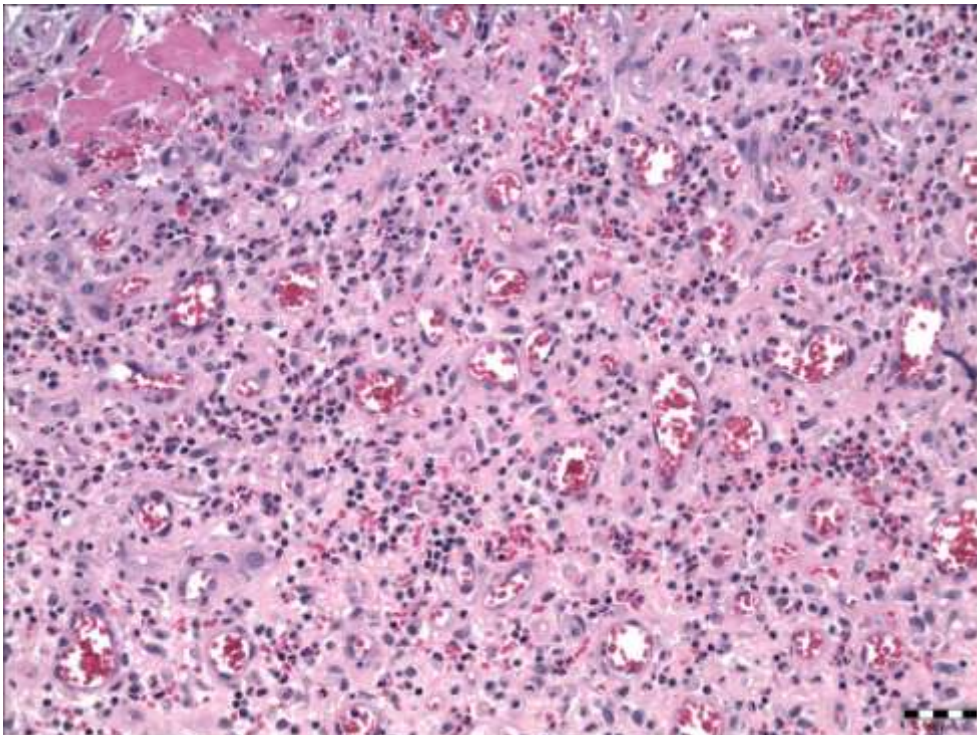
Tab. 2 Doporučený postup histologického vyšetření periprotetických tkání.

2.1.4.1 Klasifikace periprotetických membrán (SLIM)

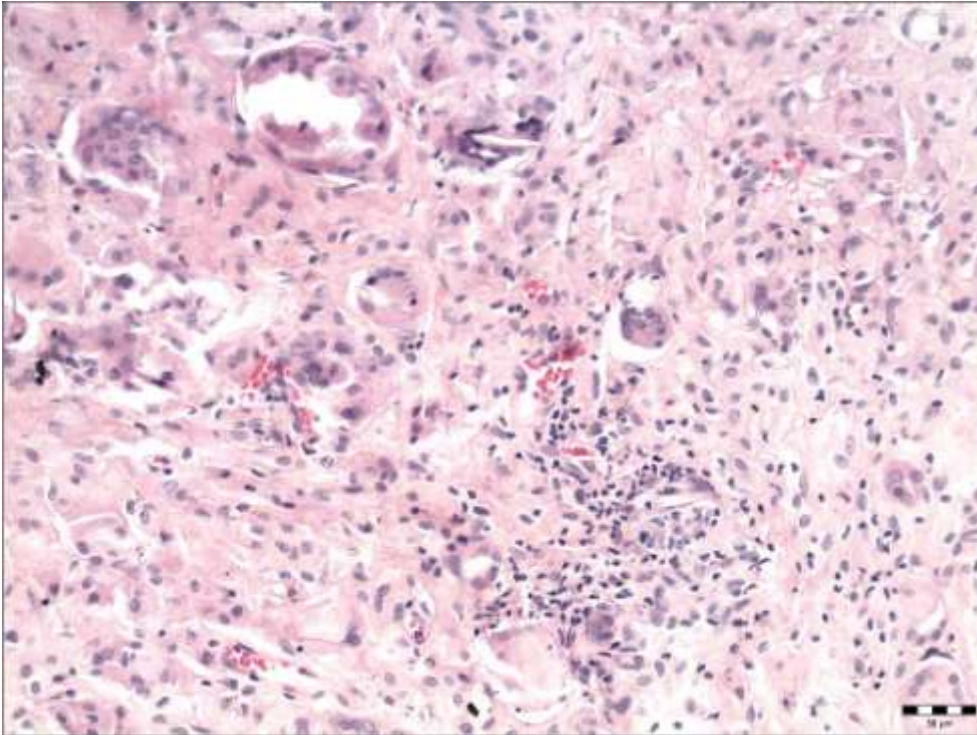
Morawietz a kol. sestavil v roce 2006 klasifikační schéma založené na charakteristických histopatologických obrazech, které bylo v roce 2014 doplněno o hodnocení patologických kostních nálezů a o změny asociované s pozdní reakcí přecitlivělosti (*Krenn 2014*). Periprotetické tkáně se při revizních operacích standardně nevyšetřují, ale v případě požadavku klinika na histologické vyšetření je uplatňována modifikace z roku 2014. Hodnocení je rutinně prováděno z histologického preparátu barveného hematoxylin-eozinem (HE, Obr. 12-15). K přesnější identifikaci buněčných typů či diferenciaci exogenních/endogenních částic ve tkáni lze použít celou škálu speciálních barvicích a imunohistochemických metod.



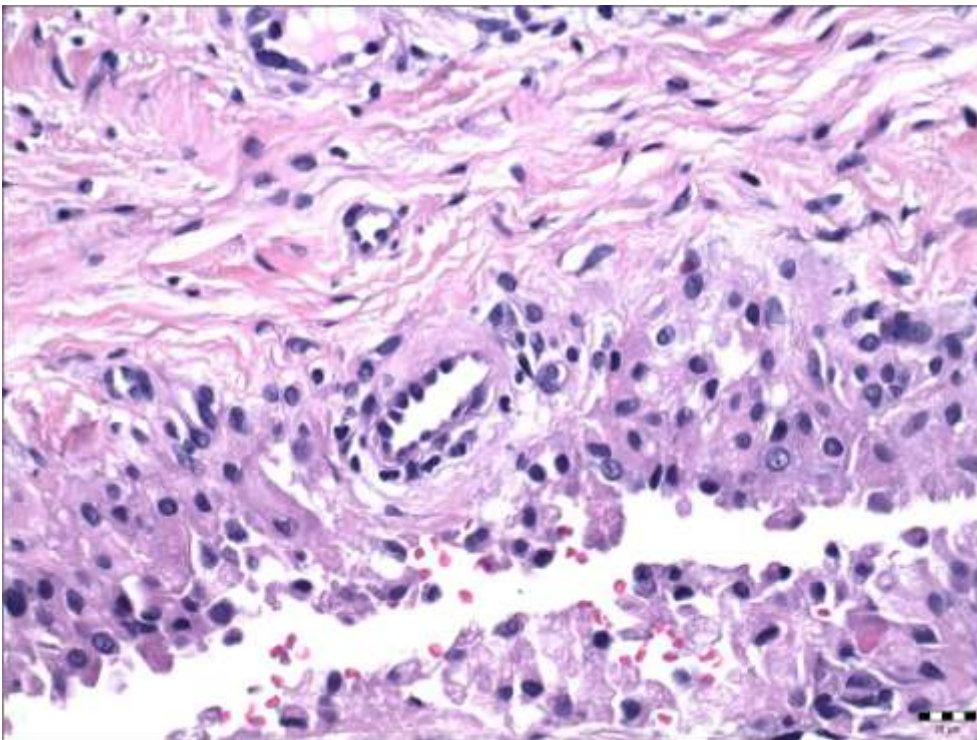
Obr. 12 **SLIM typ I indukovaný otěrovými částicemi**: KCT reakce, makrofágy a otěrové částice, pacient č. 5, HE 200x.



Obr. 13 **SLIM typ II infekční**: převaha neutrofilních granulocytů a plazmocyťů, zvýšená vaskularizace jako doprovodná reakce na chronický zánět, v levém horním rohu fibrinózní exsudát, pacient č. 7 (vyřazen ze studie), HE 200x.



Obr. 14 **SLIM typ III smíšený**: obrovskobuněčné KCT reakce, makrofágy, lymfocyty, otěrové částice, pacient č. 2, HE 200x.



Obr. 15 **SLIM typ IV indiferentní**: pruhy kolagenního vaziva s přítomností reaktivních synovialocytů, hyperplastické cévní endotelie (HEV), pacient č. 6, HE 400x.

2.1.4.2 Identifikace a typologie otěrových částic

Během používání endoprotézy vždy dochází k určitému stupni opotřebení artikulačních vložek, které je nejčastěji způsobené mechanickými faktory (abrazí, erozí, adhezí, opotřebením povrchu) nebo mechanickými i chemickými faktory společně (oxidace, koroze). Množství a akumulaci otěrových částic v periprotetické tkáni ovlivňuje druh použitého materiálu, tvar, typ a párování implantátu nebo také množství a charakter synoviální tekutiny. Polyetylenové implantáty mohou uvolnit až 500 miliard PE částic ročně s opotřebením plochy až o 0,1 mm, zatímco opotřebením keramických nebo kovových implantátů je minimální.

Koncentrace, morfologie a distribuce částic má vliv na probíhající tkáňové reakce. Proto je jejich přesná identifikace, charakteristika a diferenciací (otěrové vs. částice jiného původu) velmi důležitá při určení příčiny selhání TEP. Velikost otěrových částic se pohybuje od nanočástic po makroskopicky viditelné částice, které jsou dobře detekovatelné v optickém mikroskopu. Nanočástice a mikročástice se nacházejí převážně intracelulárně a vzhledem ke schopnostem vyvolat tkáňovou odpověď se považují za biologicky aktivní. Nanočástice (do 300 nm) se do buňky dostávají pinocytózou, zatímco mikročástice (do 10 μm) jsou fagocytovány. Velké částice (nad 10 μm) bývají obklopeny makrofágy a vzniká reakce KCT.

Polyetylenové částice jsou v histologických preparátech nebarvitelné, ale jsou dobře detekovatelné v polarizaci, protože díky svému uspořádání otáčí rovinu polarizovaného světla. Při hodnocení mohou být zaměněny s vlákny šicího materiálu nebo kolagenu, které mohou připomínat struktury PE částic (Obr. 16). Velikost i množství otěrových PE částic ovlivňuje např. způsob sterilizace použitého PE, obalový materiál, tvrdost materiálu komponent, individuální rezistence vůči částicím. Při nálezů supramakročástic by měla být provedena biomechanická analýza pro detailní zjištění příčiny selhání.

Keramické částice se mikroskopicky jeví jako světle zelenohnědá (zirkon), hnědá, hnědozelená nebo černá (hliník) granula do 5 μm v průměru s velmi slabou periferní polarizací. Může být obtížné odlišit je od kovové debris a korozičních produktů, které mohou být také přítomny v cytoplazmě makrofágů.

Silikonové částice (křemičitý polymer) jsou obvykle distribuovány synoviálně nebo kapsulárně jako následek fraktury protézy s fragmentací a rozvojem reakce KCT. Jsou bílé barvy a během histologického zpracování mohou být částečně rozpuštěny. V polarizačním mikroskopu světélkují.

Uhlíková vlákna se v periprotetických tkáních vyskytují při selhání rekonstrukce křížových vazů, na jejichž výrobu jsou používána. Mikroskopicky jsou to černá, různě dlouhá, vlákna cylindrovitého tvaru bez makrofagické reakce.



Obr. 16. Šicí materiál v polarizaci, pacient č. 17, 100x.

Kovové částice mají v optickém mikroskopu charakter tmavě hnědých až černých granul nebo drobných jehliček, které v polarizaci obklopuje lehce dvojlomné halo. Konvenční kovové částice jsou uvolňovány abrazí nebo adhezí z povrchu implantátu a v optickém mikroskopu ani v polarizaci nemusí být vždy detekovatelné. Korodované částice bývají generované elektrochemickými reakcemi, např. tribokorozí povrchu kovových implantátů nebo mechanicky způsobenými oděrkami a trhlinami. Bývají přítomny intracelulárně v makrofázích jako tzv. kapénkové cytoplazmatické inkluze otěrových částic nejasného složení. Mohou se shlukovat do agregátů s okolními složkami tkáně a krevními produkty a dávat pozitivní reakci v Perlsově barvení. Pokud má pacient kovové součásti implantátu, je třeba se vždy zaměřit na možnou přítomnost otěrových kovových částic.

Ortopedický cement je tvořen polymethylmetakrylátem s aditivou a po histologickém zpracování je cement rozpuštěný. V mikroskopu se jeví jako prázdné prostory obsahující jemný granulární materiál, což jsou nerozpustné kontrastní radiografické látky. Síran barnatý i oxid zirkoničitý je formován do intenzivně černých acinárních agregátů na periferii prázdných prostorů, často obklopených mnohoadernými buňkami.

Hydroxyapatit se běžně nanáší na povrch kloubních implantátů k zajištění osteointegrace. V histologických preparátech jsou to polygonální částice zelených odstínů o rozměrech cca 5-120 μm . Musí být odlišen od demineralizované kostní matrix nebo rozpustných vápenatých granul.

Endogenní částice jsou mikroskopické částice produkované obvykle sekundárně při poruchách metabolismu nebo jako krevní produkty. Většinou jsou krystalické struktury a lze

je detekovat v synoviální tekutině i periartikulárních měkkých tkáních. Jsou dobře viditelné v optickém mikroskopu. Pokud mají krystalickou strukturu, otáčí rovinu polarizovaného světla.

Kalciumpyrofosfát se vyskytuje ve formě romboidních, kuboidních, rovnoběžných nebo jehlicovitých krystalů velikosti do 1 μm . V polarizačním mikroskopu vykazuje světle žlutý nebo světle modrý dvojlom (podle typu použitého kompenzátoru) s lemem načervenalé homogenní matrix a bývá přítomen v blízkosti makrofagické reakce KCT.

Urátové krystaly mají charakter nahodile roztroušených krátkých svazků jehlicovitých krystalů obklopených amorfni šedivou hmotou a makrofagickou reakcí KCT. Během zpracování dochází k jejich rozpuštění ve vodě, proto je jejich průkaz možný pouze v nativních preparátech za použití polarizace (světle modrý nebo jasně žlutý dvojlom podle použitého kompenzátoru).

Cholesterolové krystaly se během histologického zpracování také rozpouští a jejich známkou ve tkáni jsou volně roztroušené prázdné štěrbiny po vypadlých krystalech. V periprotetických tkáních se objevují až po dlouhé době od implantace.

Granula hemosiderinu jsou v periprotetických tkáních obvykle přítomna sekundárně jako následek proběhlého krvácení (periprotetická fraktura, nestabilita, dislokace). V barvení HE tvoří zlatavě hnědá granulární depozita v cytoplazmě makrofágů, a mohou tak připomínat keramické nebo kovové částice. K jejich diferenciaci pomáhá Perlsova reakce, kde je hemosiderin zbarven modře.

Gammova-Gandyho tělíška jsou žlutohnědé sférické útvary různé velikosti tvořené denzní fibrózní tkání a kolagenními fibrilami pokryté železitým pigmentem a solemi vápníku.

Formalínový pigment představují rezavě hnědé granulární sraženiny vznikající z hemoglobinu při fixaci formalínem s nízkým pH. Může se vyskytovat intracelulárně i extracelulárně a z tkáňových řezů lze odstranit vypíráním např. v roztoku kyseliny pikrové.

Depozita vápníku se nejčastěji vyskytují jako bazofilní depozita v pojivové tkáni bohaté na fibrily s makrofagickou reakcí KCT a jejich přítomnost může souviset se zánětlivým procesem nebo nekrózou tkáně.

Fragmenty kostní tkáně se do SLIM dostávají následkem fragmentace kosti pro osteolýzu, frakturu nebo během frézování kosti při operaci. Kostní detritus obklopují makrofágy a osteoklastům podobné obrovské buňky.

Exogenní cizorodý materiál představují např. zbytky složek léků a podpůrných kloubních přípravků, které se aplikují přímo do kloubu. Tento typ materiálu není možné přesně morfologicky specifikovat, ale je pro něj typická reakce KCT s palisádovitým uspořádáním makrofágů a příměsí mnohоядерných buněk (*Perino 2018*).

K přesné analýze otěrových částic lze použít fyzikální metody, např. energiově disperzní spektroskopii nebo infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací. Rozšiřuje se také výzkum v oblasti nanočástic, který využívá skenovací elektronovou mikroskopii nebo kombinaci výše uvedených. Přesné mapování otěrových částic umožňuje např. transmisní elektronová mikroskopie či rentgenová prášková difrakce (Krenn 2017).

Otěrové částice

Polyetylenové

- bílé, šedě opaleskující
- nanočástice < 1 µm, nepozorovatelné
- mikročástice 1-10 µm, Olejová červeň⁺, polarizace⁺
- makročástice 10-100 µm, Olejová červeň⁺, polarizace⁺
- supramakročástice 100-1 000 µm, Olejová červeň⁺, polarizace⁺

Keramické

Oxid hlinitý
Oxid niobičný
Oxid zirkoničný
Oxid yttritý

Nitrid titanu
Nitrid křemičitý
Hydroxyapatit

- hnědé/šedé/zelenavé
- nanočástice < 1 µm, nepozorovatelné
- mikročástice 1-10 µm
- makročástice 10-100 µm
- supramakročástice > 100 µm

Polymethylmetakrylát (ortopedický cement)

Polymethylmetakrylát
Síran barnatý
Oxid zirkoničitý

- rozpustí se během zpracovávání
- radiograficky kontrastní látky, aditiva cementu

Kovové částice (neobsahující železo)

K o n v e n ě n í

Kobalt ▪ šedivé až intenzivně černé
Niob ▪ nanočástice < 1 µm
Chrom ▪ mikročástice 1-10 µm
Molybden ▪ makročástice 10-100 µm
Nikl
Tantal ▪ kulaté Ø 1-1,5 µm
Titan ▪ oválné/nepravidelné Ø 1,5-2,5 µm
Vanad ▪ jehlicovité, tyčinkovité Ø > 2,5 µm
Zirkon

K o r o d o v a n é

Kobalt ▪ zelenkavé, žlutavé
Chrom ▪ vrstvené černé-červené-žlutavé
Molybden ▪ precipitáty: oxidy, chloridy, fosfáty
Titan
Vanad ▪ kulaté shluky nanočástic < 5 µm
Další ▪ nepravidelné shluky nanočástic < 10 µm
 ▪ agregáty tvořící pláty > 10 µm až 0,5 mm
 ▪ železo/ocel < 1 µm až 0,5 mm, Perls⁺

Částice nesouvisející s implantátem

Endogenní částice

Depozita krystalů
Kalcium pyrofosfát: Ø 0,1 µm, polarizace⁺
Urátové krystaly: 5-25 µm, polarizace⁺
Oxalátové krystaly: polarizace⁺
Cholesterol
Hydroxyapatit

Produkty hemosiderinu, depozita vápníku a kostí
Hemosiderinová granula: 1 µm-5mm, Perls⁺
Gammova-Gandyho tělíska: Ø 0,3-2mm, Perls⁺
Formalínový pigment: Ø 1 µm, Perls⁻
Vápník (hydroxyapatit, dystrofická kalcifikace)
Kostní detritus

Cizorodé částice, úlomky kostí

Zbytky stehů
Zbytky fixace, pomocných materiálů (např. kov, plast)
Kloubní vložky
Viskosupplementační prostředky
Nosiče léků
Substituční materiály (např. kostní štěpy)

Tab. 3 Algoritmus hodnocení částic ve SLIM (Krenn 2017).

2.1.5 Doporučení pro praxi

Zmíněná klasifikace SLIM a popisná charakteristika morfoloické heterogenity částic včetně návrhu postupu při jejich klasifikaci (Tab. 3) by mohly sloužit jako praktický průvodce konvenčního histologického vyšetření (*Perino 2018*). Nedílnou součástí histologického vyšetření periprotetických tkání však zůstává podrobný mikroskopický popis: hyperplazie superficiální vrstvy, přítomnost makrofágů, mnohjaderných buněk, eozinofilů, perivaskulárních a intersticiálních lymfocytů, plazmocytů, neutrofilních granulocytů a dalších imunitních buněk, fibroproliferace stromatu, aseptická nekróza (apoptóza vs. nekróza).

2.2 Charakteristika souboru

Během reoperací asepticky uvolněných TEP kyčle a kolene byly v průběhu 11/2013-10/2014 odebrány periprotetické tkáně 34 pacientům. 3 pacienti byli následně vyřazeni z důvodu nesplnění kritérií pro zjištěnou infekci a neadekvátní počet či kvalitu vzorků. Dle možností byla k histologickému vyšetření odebírána SLIM a/nebo pseudopouzdro, výjimečně měkké tkáně z nejbližšího okolí. Odběr tkání probíhal dle stanoveného schématu ze tří lokalit kolem kloubu: I) povrchový list pseudosynoviální membrány obrácené k implantátu; II) rozhraní mezi proximální komponentou implantátu a kostí; III) rozhraní mezi distální komponentou implantátu a kostí. Všechny odebrané tkáně byly ihned po odběru na straně přiléhající ke kosti značeny barevnou tuší (Davidson Marking System, Bradley Products, Inc.) a po krátkém osušení gázou fixovány v 10% formalínu.

Kontrolní skupinu tvořilo 10 poprvé operovaných pacientů a jejich tkáně byly zpracovány stejnými protokoly jako tkáně odebrané revidovaným pacientům. Údaje charakterizující pacienty vyšetřovaného i kontrolního souboru jsou uvedeny v Tab. 4 a 5. Všechny odběry provedl shodný operatér na Ortopedické klinice FN Olomouc a design obou studií byl schválen Etickou komisí FN Olomouc.

Pořadové číslo pacienta	Pohlaví	Kloub	Věk	BMI	Důvod operace
1	ž	koleno	73,7	23,3	primární artróza
2	ž	koleno	70,0	31,6	primární artróza
3	m	kyčel	72,5	27,1	primární artróza
4	m	kyčel	61,0	29,7	primární artróza
5	ž	koleno	78,0	34,2	primární artróza
6	m	koleno	74,4	31,4	primární artróza
7	ž	kyčel	49,4	33,2	postdysplastická kyčel
8	ž	koleno	79,3	27,7	primární artróza
9	ž	kyčel	57,4	24,4	postdysplastická kyčel
10	ž	kyčel	60,3	27,2	avaskulární nekróza

Tab. 4 Kontrolní skupina pacientů.

Pořadí	Pacient (vyšetřovací číslo)	Pohlaví	Kloub	Délka „nošení“ implantátu (v letech)	Věk	BMI	Typ fixace	Kloubní pár	Metaloza makroskopicky
1.	1	ž	koleno	12,1	89,8	22,5	C	MoP	ne
2.	2	ž	kyčel	19,1	51,1	22,0	NC	MoP	ne
3.	3	m	koleno	14,2	78,5	22,7	C	MoP	ne
4.	4	ž	koleno	16,1	65,5	30,8	C	MoP	ne
5.	5	ž	koleno	16,5	77,6	34,9	C	MoP	ano
6.	6	m	koleno	1,2	69,1	39,6	C	MoP	ne
7.	7	m	kyčel	4,2	74,7	22,6	C	MoP	ne
8.	8	ž	koleno	16,8	64,5	36,5	C	MoP	ano
9.	10	m	koleno	2,3	66,7	35,9	C	MoP	ne
10.	11	m	kyčel	18,2	68,9	34,1	NC	CoP	ne
11.	14	m	kyčel	17,0	59,3	32,8	NC	MoP	ne
12.	15	ž	kyčel	16,1	67,6	21,5	NC	MoP	ne
13.	16	ž	koleno	10,8	67,5	29,7	C	MoP	ne
14.	17	m	koleno	16,7	78,4	27,8	C	MoP	ne
15.	18	m	kyčel	11,6	74,5	30,3	NC	MoP	ne
16.	19	ž	kyčel	21,4	73,1	29,5	NC	MoP	ne
17.	20	ž	kyčel	13,5	60,0	34,1	H	CoP	ne
18.	21	ž	kyčel	12,5	67,4	30,9	NC	CoP	ne
19.	22	m	kyčel	14,0	52,8	26,2	NC	MoP	ne
20.	23	ž	koleno	16,8	85,4	25,0	C	MoP	ne
21.	24	ž	kyčel	20,0	74,5	24,1	NC	MoP	ne
22.	25	ž	kyčel	18,7	81,3	20,4	H	MoP	ne
23.	26	m	koleno	14,7	74,1	25,4	C	MoP	ne
24.	27	m	kyčel	11,5	60,1	26,6	NC	MoP	ne
25.	28	m	kyčel	10,3	81,9	26,3	H	MoP	ano
26.	29	ž	kyčel	19,8	69,5	27,9	NC	MoP	ne
27.	30	m	koleno	15,6	71,4	30,6	C	MoP	ne
28.	31	ž	koleno	18,6	85,1	31,6	C	MoP	ne
29.	32	m	koleno	4,8	58,0	35,9	C	MoP	ne
30.	40	m	kyčel	12,6	81,2	27,1	C	MoP	ano
31.	41	ž	kyčel	18,3	71,7	38,2	NC	MoP	ne

Vysvětlivky: ž = žena, m = muž, C = cementovaná, NC = necementovaná, H = hybridní, MoP = kov-polyetylen, CoP = keramika-polyetylen.

Tab. 5 Vyšetřovaný soubor pacientů.

2.3 Zpracování histologického materiálu

Zpracování histologického materiálu probíhalo na Ústavu patologie FN Ostrava. Všechny tkáňové vzorky byly po 24-72 hodinové fixaci makroskopicky posouzeny (Obr. 17), přikrojeny a zpracovány standardní histologickou technikou se zalitím do parafinových bloků (Tab. 6). Pro zřetelnou přítomnost kostního detritu byly některé bloky před vlastním zpracováním odvápněny v roztoku Löwy nebo MicrodecFast. Z parafinových bloků byly připraveny 3-5 μm silné řezy určené pro základní histologické barvení hematoxylin-eozin (HE) i následná barvení. Z reprezentativních parafinových bloků byly provedeny speciální barvicí a imunohistochemické metody.



Obr. 17 Ukázka makrofotodokumentace při přikrojení tkáňové částice, strana přiléhající ke kosti je značena modrou barvou.

Pacient	Odběrová lokalita I.		Odběrová lokalita II.		Odběrová lokalita III.		Celkový počet bloků	Počet odvápněných bloků
	Počet tkáňových částic	Počet bloků	Počet tkáňových částic	Počet bloků	Počet tkáňových částic	Počet bloků		
1	3	17	6	15	3	7	39	0
2	2	5	6	9	10	12	26	0
3	2	5	4	10	6	15	30	0
4	4	11	3	8	6	13	32	0
5	3	11	5	16	5	9	36	5
6	2	5	3	5	3	7	17	0
7	2	5	5	9	3	6	20	0
8	4	7	7	14	11	8	29	3
10	4	9	4	6	3	5	20	0
11	2	5	3	6	3	9	20	0
14	2	9	5	6	6	8	23	10
15	3	4	5	8	4	5	17	0
16	2	7	9	18	4	8	33	5
17	2	4	3	6	5	15	25	2
18	3	6	0	0	4	12	18	0
19	2	15	0	0	2	3	18	0
20	2	5	4	15	3	10	30	6
21	2	5	3	8	2	6	19	0
22	2	9	4	6	4	9	24	0
23	3	15	3	11	4	19	45	0
24	2	7	1	4	0	0	11	0
25	2	5	3	9	0	0	14	0
26	2	5	1	2	0	0	7	0
27	2	4	3	9	0	0	13	0
28	2	6	2	5	0	0	11	0
29	2	5	3	7	0	0	12	0
30	3	5	1	4	0	0	9	0
31	2	7	2	3	0	0	10	0
32	2	5	1	3	0	0	8	0
40	2	4	1	3	0	0	7	0
41	2	4	1	3	0	0	7	0
celkem							630	31

Vysvětlivky: odběrová lokalita I. = kolem kloubu, II. = proximální část komponenty, III. = distální část komponenty.

Tab. 6 Počty odebraných tkáňových vzorků a parafinových bloků ve vyšetřovaném souboru.

2.4 Studie A: Posouzení homogenity tkáňové odpovědi na přítomnost degračních produktů z implantátu

2.4.1 Cíle

- Extenzivně zpracovat a vyšetřit periprotetické tkáně získané během reoperací asepticky uvolněných TEP kolene a kyčle. Zhodnotit přínos histologického vyšetření při zpracování tkání standardním způsobem do parafinových bloků.
- Aplikovat vybrané speciální barvicí a imunohistochemické metody na periprotetické tkáně. Vyhodnotit jejich přínos k charakteristice tkáňové odpovědi v rámci aseptického uvolnění.
- Porovnat výsledky mezi: 1) třemi odběrovými lokalitami kolem implantátu; 2) skupinami TEP kolene a TEP kyčle. Zjistit, zda existuje inter- a intrapersonální variabilita tkáňové odpovědi a distribuce ošetrovacích částic.
- Formulovat vhodná a reálná hodnotící kritéria pro histologické vyšetření periprotetických tkání.

2.4.2 Teoretické poznámky

Spolehlivé výstupy histologického vyšetření závisí na typu a kvalitě odebraných tkání. SLIM a pseudopouzdro jsou v těsném kontaktu s implantátem, a proto jsou považovány za vzorky s nejlepší výpovědní hodnotou pro diagnostiku septického (*Bori 2011, Pandey 1999*) i aseptického uvolnění. Dobrou výpovědní hodnotu může mít také periprotetická tkáň makroskopicky připomínající pseudotumor (*Whitehouse 2015*). Méně je už známo o tom, jaká je výtěžnost ostatních tkání kolem implantátu.

S pokračujícím výzkumem periprotetických tkání se postupně rozvíjí a upřesňuje tkáňová diagnostika i související nomenklatura. Někteří autoři popisují rozdíly tkáňové odpovědi ve vztahu k pohlaví a časnému selhání TEP (*Haughom 2015, Ollivere 2009*). Jiní zase upozorňují na výrazné rozdíly v histologických nálezech napříč vzorky jednoho pacienta nebo dokonce v po sobě jdoucích tkáňových řezech z jednoho parafinového bloku (*Goodman 1996, Jones 1999, Pazzagli 1985*). Příčinou rozdílných nálezů by mohla být různá odběrová místa, typ a způsob fixace implantátu, stupeň degradace povrchu implantátu, příp. patologické nálezy vedoucí k revizi TEP. Doposud neexistuje oficiální doporučený postup managementu odběru tkáňových vzorků pro konkrétní typy revizních operací TEP. Na jedné straně by mohlo platit obecné pravidlo, že vyšší počet vzorků zvyšuje diagnostickou přesnost. Na druhé straně však tento přístup zvyšuje technickou, finanční

i časovou náročnost vyšetření. Proto vzniká otázka, zda a jakým způsobem standardizovat odběr periprotetických tkání pro dostatečné a rychle dostupné výsledky histologického vyšetření.

2.4.3 Hypotézy

- Tkáňová odpověď se u pacientů s TEP kyčle a kolene liší.
- Stupeň a rozsah tkáňové odpovědi u jednoho pacienta závisí na lokalitě odběru kolem TEP. Tkáně vzdálenější od povrchu implantátu obsahují méně reaktivních změn a menší množství otěrových částic.
- Způsob odběru, počet a zpracování tkáňových vzorků má vliv na variabilitu výsledků histologického vyšetření.

2.4.4 Základní a speciální histologické metody

Kromě základního barvení HE byla z vybraných parafinových bloků provedena speciální barvení k průkazu hemosiderinu, vápníku, kolagenních a elastických vláken, dále byla použita barvicí metoda k lepšímu znázornění PE částic.

Průkaz hemosiderinu dle Perlse je založen na působení roztoku 1% kyseliny chlorovodíkové a 2% ferrokyanidu draselného, který vytváří s trojmocným železem ve tkáni tzv. berlínskou modř. Přítomnost hemosiderinu je znázorněna sytě modře.

Průkaz vápníku dle Kossy je impregnační metoda založená na redukci stříbra se znázorněním vápenatých solí (nerozpustných fosforečnanů a uhličitanů), které jsou v optickém mikroskopu pozorovány jako černá ložiska.

Průkaz kolagenního vaziva patří mezi přehledné barvicí metody v histologii. Kolagenní vlákna mají eozinofilní charakter a jsou dobře znázornitelná barvivy s kyselým pH (světlá zeleň, anilinová modř, saturnová červeň). Barví se v odstínech dle tónu použitého barvicího roztoku.

Barvení dle Verhoeffa slouží k průkazu elastických vláken, která jsou po hodinové inkubaci s železitým hematoxylinem znázorněna modročerně až černě. Použitá saturnová červeň zbarvuje kolagenní vlákna do červených odstínů.

Barvení olejovou červení lze uplatnit ke znázornění PE otěrových částic, které jsou v optickém mikroskopu znázorněny světle červeně.

Na vybrané tkáňové řezy bylo také aplikováno několik vybraných protilátek pro zmapování zastoupení buněčných populací ve vyšetřovaných tkáních (Tab. 7) a ověření

výstupů jiných autorů. Pouze výsledky hodnocení mastocytů byly dále statisticky analyzovány a publikovány (Příloha 2).

Primární protilátka	Výrobce, klon	Cíl detekce	Ředění	Inkubace	Pozitivní exprese
CD3	Novocastra LN 10	T lymfocyty, NK buňky	1 : 200	60 minut	C, M
CD4	DAKO 4B12	pomocné T lymfocyty	RTU	32 minut	M
CD8	DAKO C8/144B	cytotoxické T lymfocyty	RTU	60 minut	M
CD20	DAKO L26	B lymfocyty	1 : 500	32 minut	M
CD31	DAKO JC70A	endoteliální buňky	1 : 20	32 minut	M
CD34	DAKO QBEnd 10	hemopoetické kmenové buňky, kapilární endotelie	1 : 50	32 minut	M
CD45 LCA	DAKO 2B11+ PD7/26	T a B buňky, dendritické buňky	1 : 100	32 minut	M
CD68	DAKO KP1	makrofágy	1 : 100	32 minut	M
CD138	DAKO MII5	fibroblasty, epitelie, B lymfocyty	1 : 50	32 minut	M
Mast Cell Tryptase	DAKO klon AA1	mastocyty	1 : 400	32 minut	granula v cytoplazmě
Podoplanin	DAKO D2-40	lymfatické endotelie	1 : 50	60 minut	C, M

Vysvětlivky: RTU = k přímému použití; M = buněčná membrána; C = cytoplazma.

Tab. 7 Specifikace použitých protilátek.

2.4.5 Histologické hodnocení

Hodnocení bylo prováděno v optickém mikroskopu s polarizací, typ Olympus BX45 při zvětšení 20x-400x (objektiv UPLFFLN40X-UIS2, UPlanFLN, 40x/0,75, oo/0,17/FN26,5). Kvantifikace byla vyjádřena absolutním počtem buněk v 1-20 HPF. Pro detailní histologické vyšetření byl formulován protokol, který vycházel z předchozích publikovaných studií (Příloha 2).

2.4.6 Výsledky

Popis hlavních zjištění je uveden v Příloze 2. Ve vzorcích byly také identifikovány cementové zbytky, formolový pigment a granula hemosiderinu odkazující na proběhlé krvácení. Různě intenzivní akumulace kovové debris byla významně častěji pozorována u starších pacientů (Tab. 8).

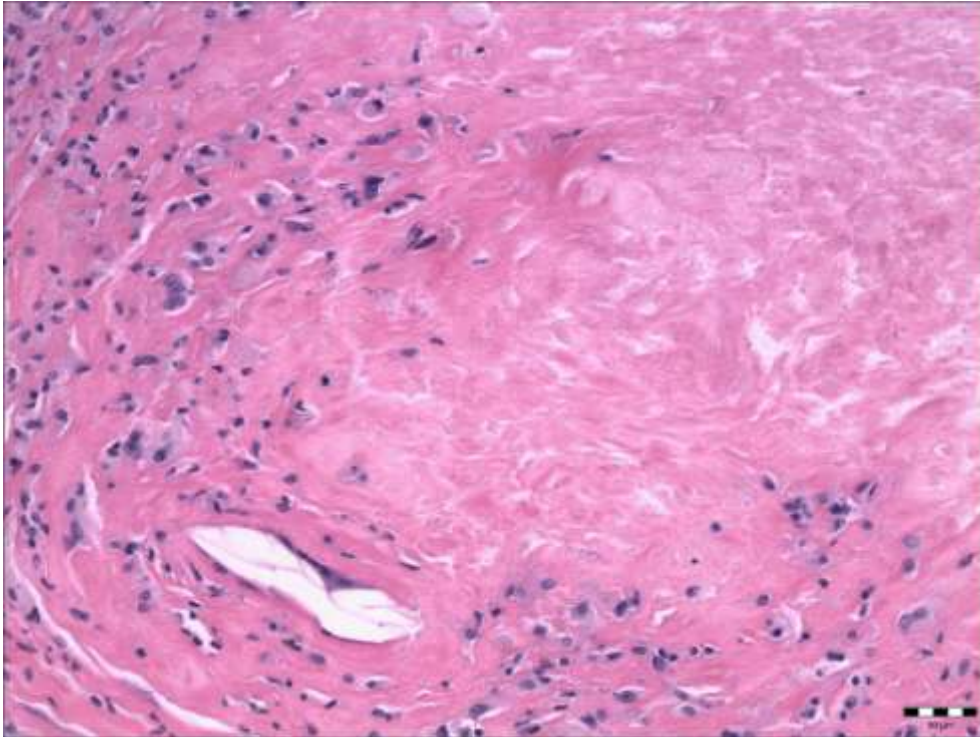
V metodách „modrý trichrom“ a „Van Gieson“ byla v převážné většině tkáňových vzorků prokázána kolagenní vlákna. Vyšší hustota paralelně uspořádaných kolagenních vláken byla doprovázena nižší buněčností a naopak. Metoda „Van Gieson“ byla navíc využita k odlišení fibrinózního exsudátu od nekrózy (nebarvila se). Barvení olejovou červení umožnilo zvýraznění PE částic v optickém mikroskopu, avšak k jejich přesné identifikaci bylo spolehlivější prohlížet je v polarizaci.

Imunohistochemické metody k průkazu plazmocytů, T a B lymfocytů potvrdily jejich přítomnost ve všech vzorcích, avšak jejich denzita nebyla výrazná. Mírně dominovaly T lymfocyty (CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺), které byly roztroušeny ve tkáni disperzně nebo tvořily lymfocytární perivaskulární infiltráty. Makrofágy velmi silně exprimovaly CD68. Endoteliální exprese CD31 potvrdila zvýšenou vaskularizaci SLIM. Na vzorky s vícečetnými cévami byly aplikovány protilátky proti podoplaninu a proti CD34, které prokázaly pouze přítomnost krevních cév (CD34), nikoli lymfatik (podoplanin). Reprezentativní mikroskopické nálezy představují Obr. 18-36.

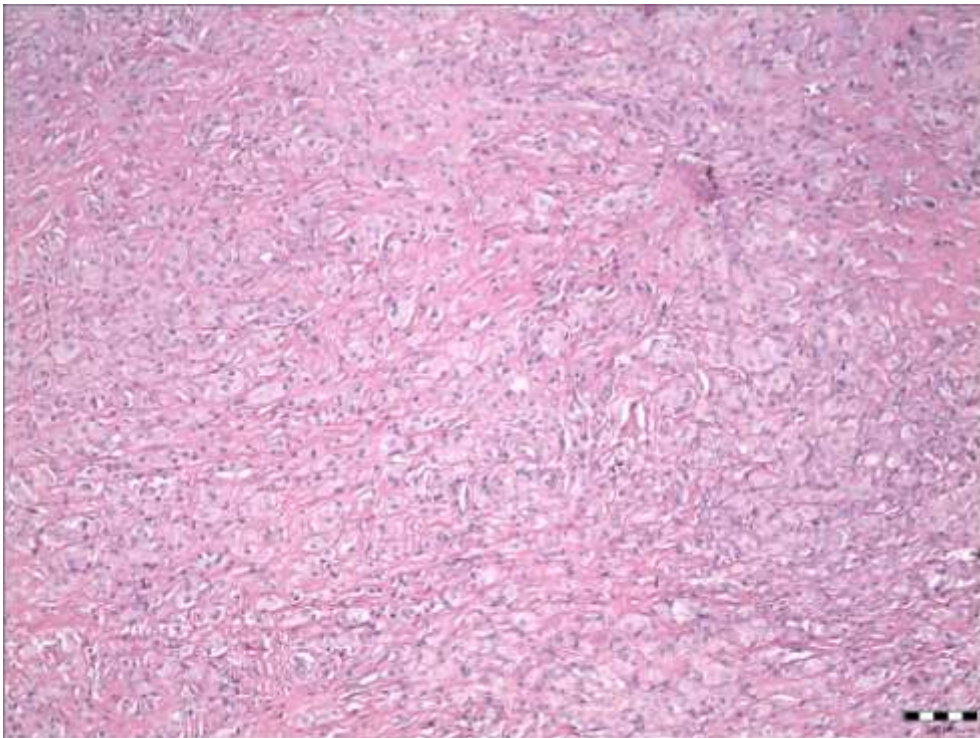
Ve vzorcích kontrolního souboru nebyly sledovány diagnosticky významné obrazy, pouze nevýrazný perivaskulární lymfocytární infiltrát a ojedinělé nekrotické okrsky.

Pacient	Odběrová lokalita	Počet preparátů	Pacient	Odběrová lokalita	Počet preparátů	Pacient	Odběrová lokalita	Počet preparátů
3	I., II., III.	2, 2, 2	7	I., II., III.	2, 2, 1	40	I., II.	1, 1
5	I., II., III.	2, 2, 2	16	I., II., III.	2, 2, 2	17	I., II., III.	1, 2, 2
6	II.	2	21	I., II.	1, 2	41	I., II.	2, 2

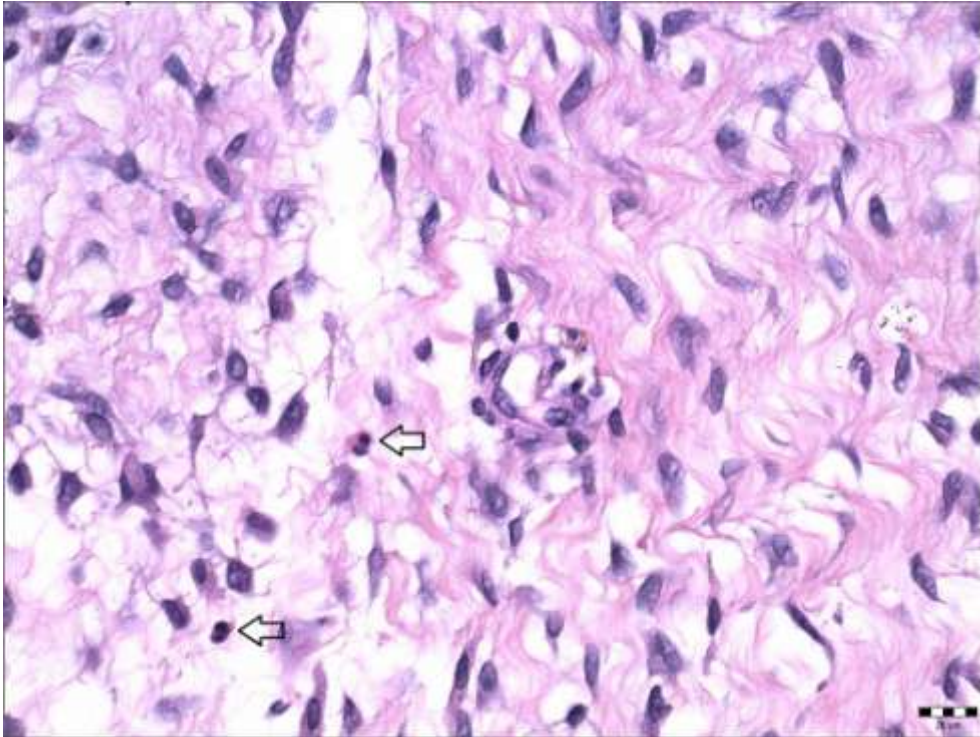
Tab. 8 **Přítomnost kovových otěrových částic** ve vyšetřovaném souboru.



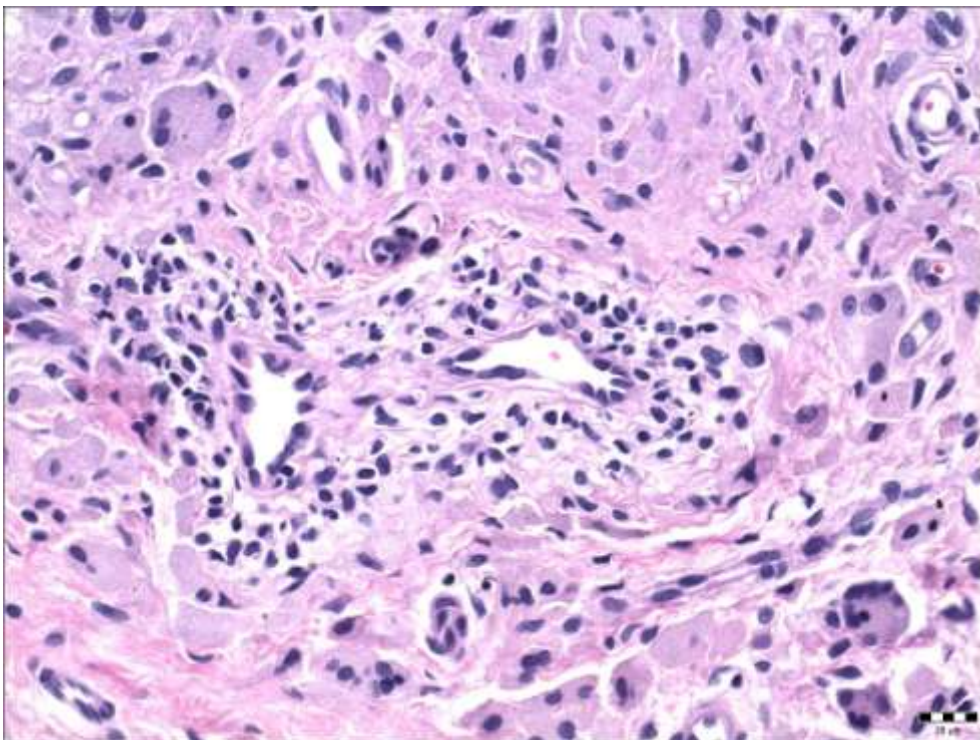
Obr. 18 **Tkáň s fibrinoidní nekrózou** a okolní makrofagickou reakcí, mnohojadernými buňkami, pacient č. 4, HE 200x.



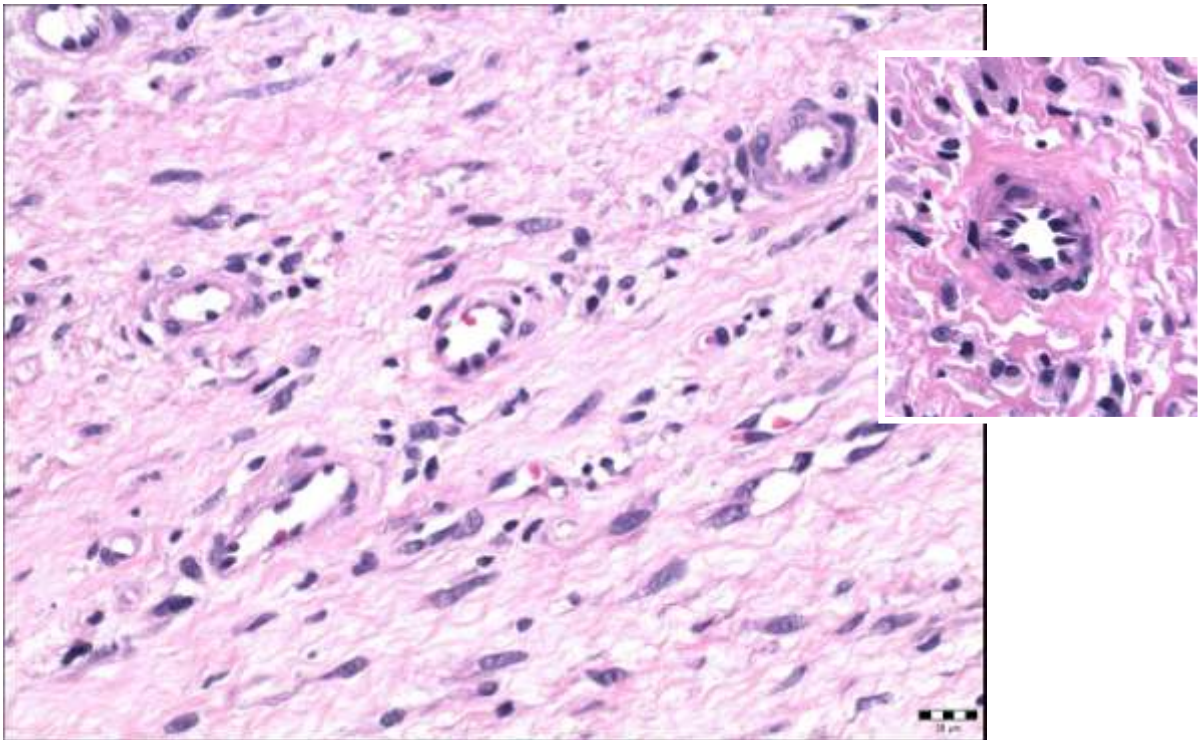
Obr. 19 **Záplava makrofágů**, pacient č. 11, HE 100x.



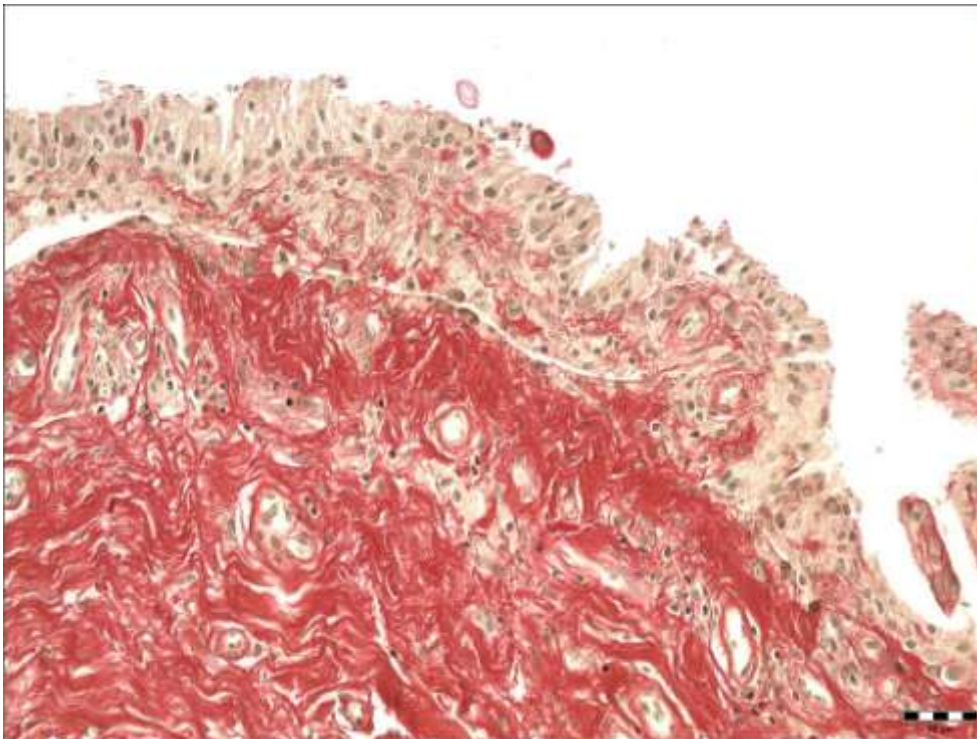
Obr. 20 **Eozinofily** (šipky), pacient č. 1, HE 400x.



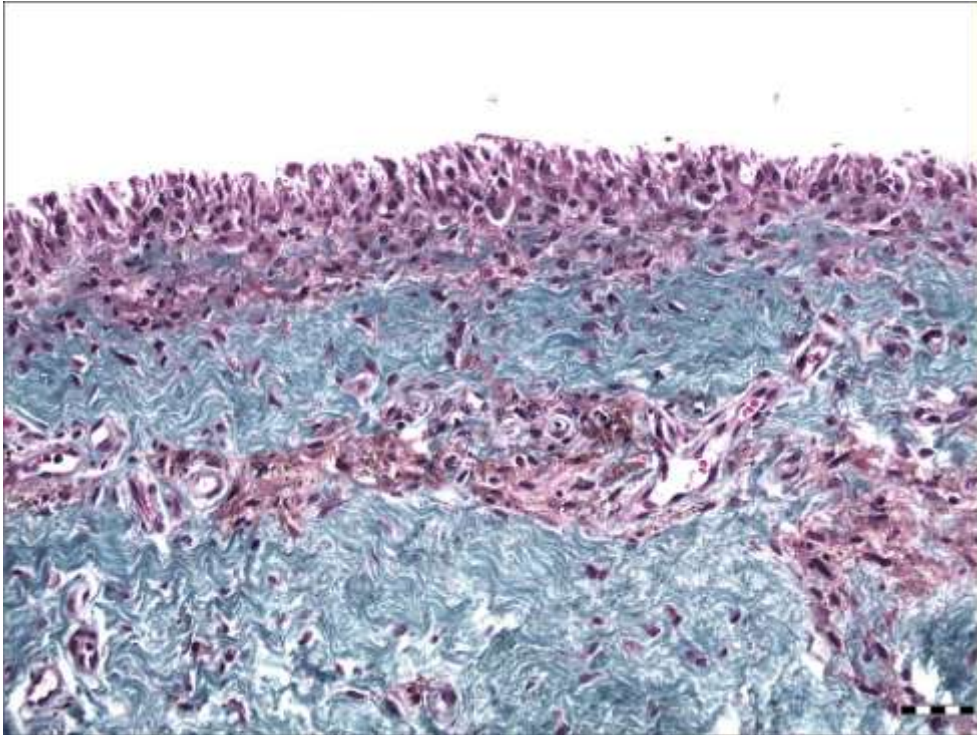
Obr. 21 **Perivaskulární lymfocytární infiltrát**, makrofagická reakce s vícejadernými makrofágy, pacient č. 10, HE 400x.



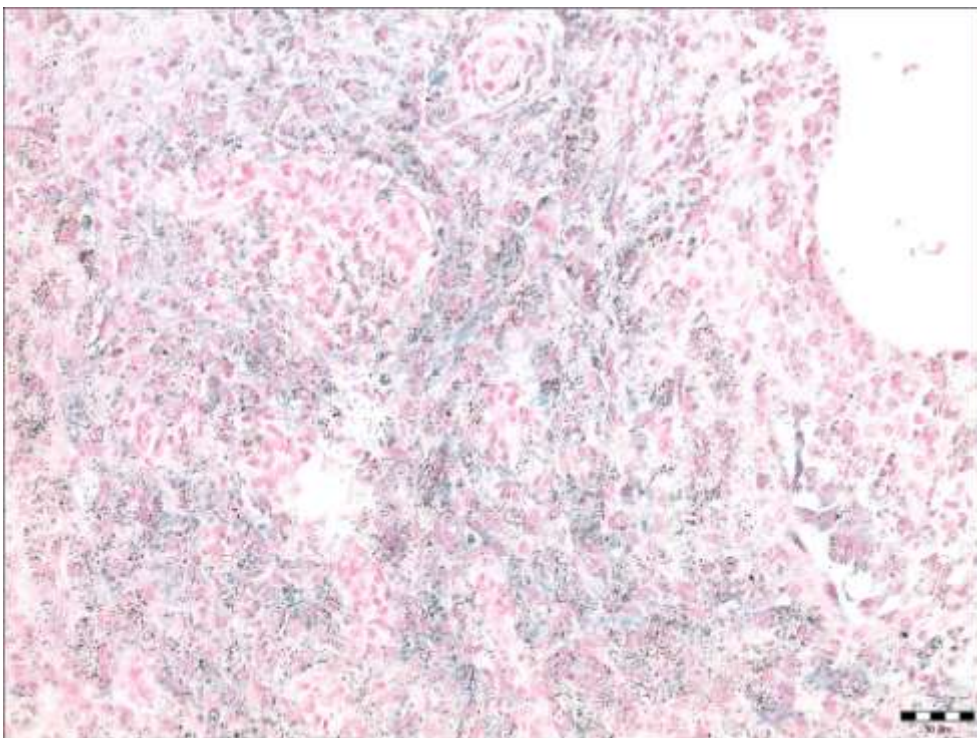
Obr. 22 **Zvýšená angiogeneze v terénu kolagenního vaziva s fibroblasty**, pacient č. 6, HE 200x.
 Inside obrázek demonstruje aktivní endotelie (HEV), HE 400x.



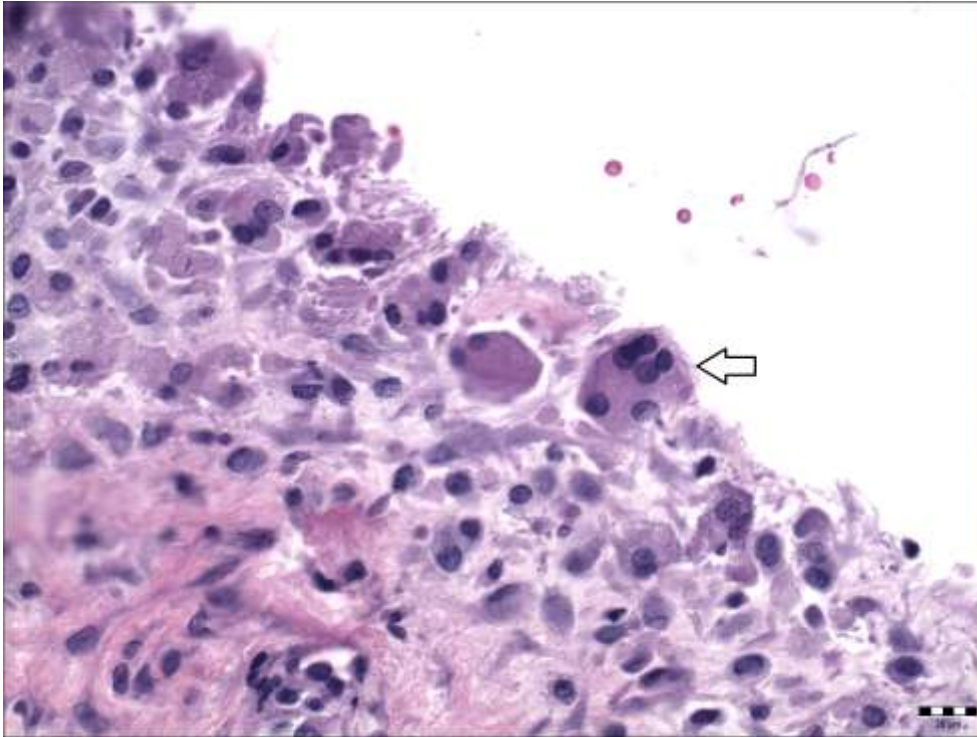
Obr. 23 **Protáhlé synovialocyty, zvýšená vaskularizace a kolagenizace**, červeně znázorněno kolagenní vazivo, pacient č. 18, VG 200x.



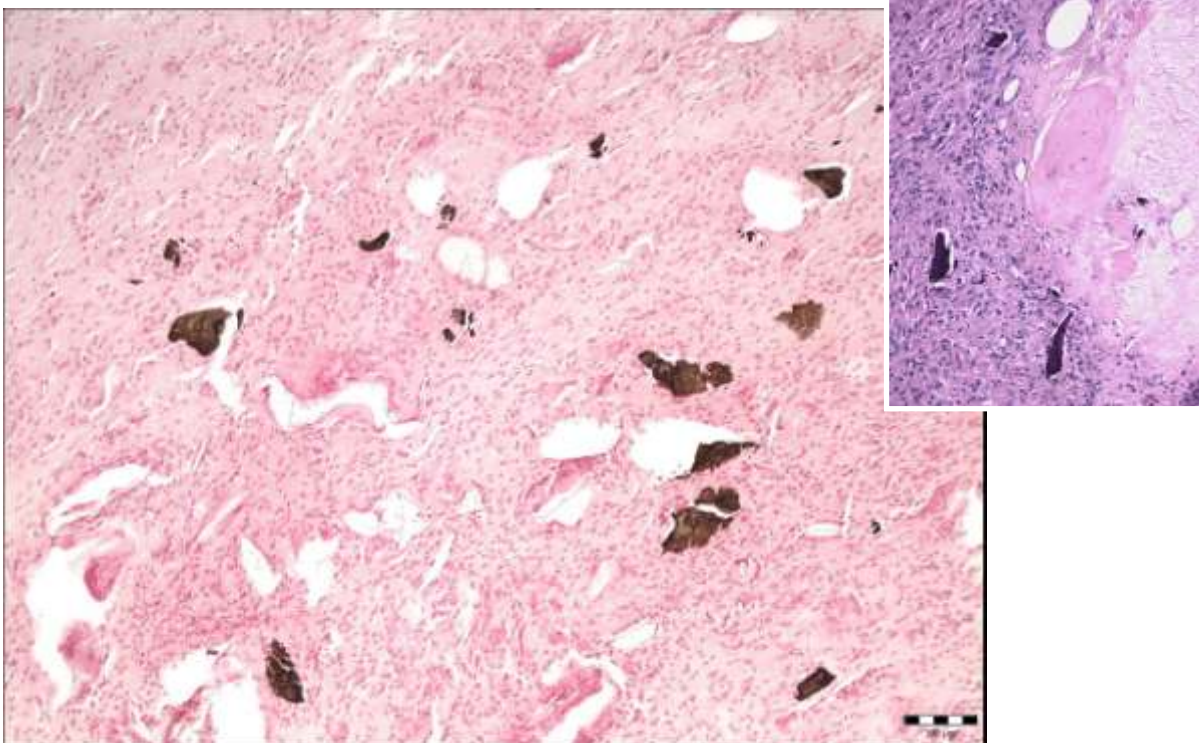
Obr. 24 **Protáhlé synovialocyty**, modře znázorněno kolagenní vazivo, tmavě fialově jádra buněk, pacient č. 16, modrý trichrom 200x.



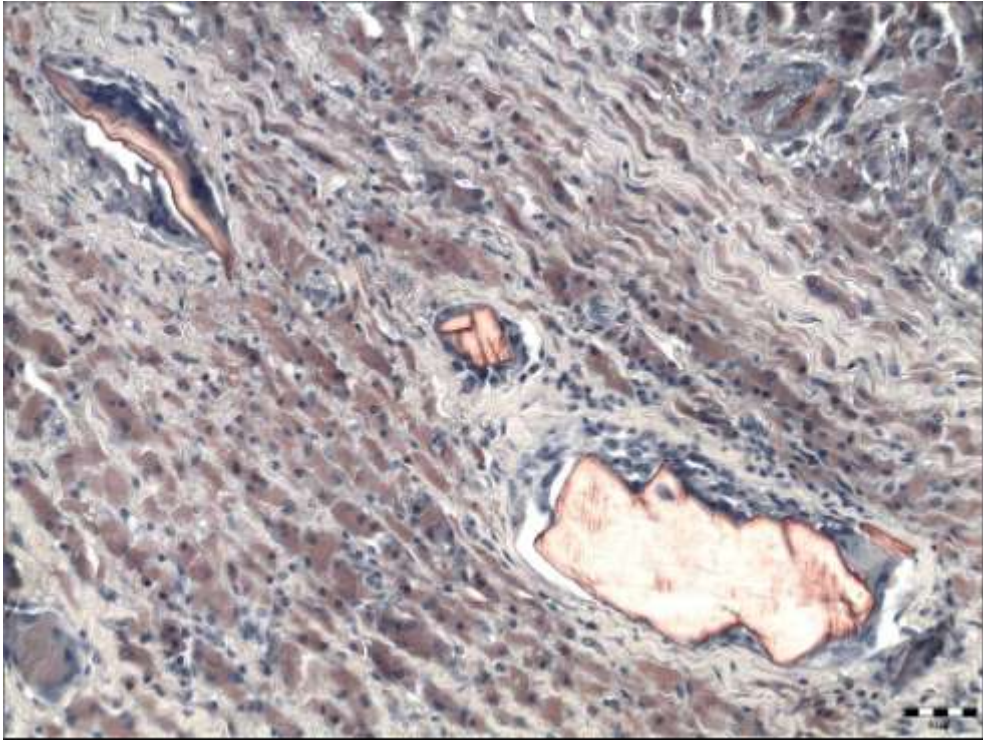
Obr. 25 **Makrofágy s intracelulární přítomností kovové debris (černá granula) a hemosiderinu** (tzv. siderofágy obsahující modrá granula) v barvení dle Perlse, pacient č. 21, Perls 200x.



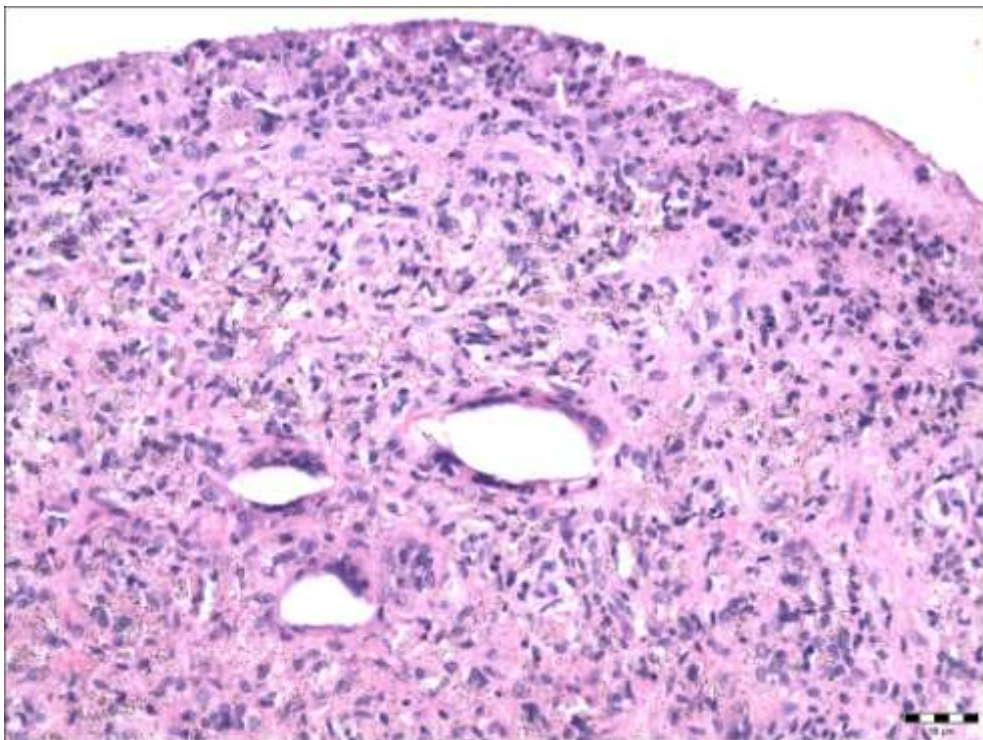
Obr. 26 **Mnohojaderná buňka** (šipka) v superficiální vrstvě SLIM, pacient č. 6, HE 400x.



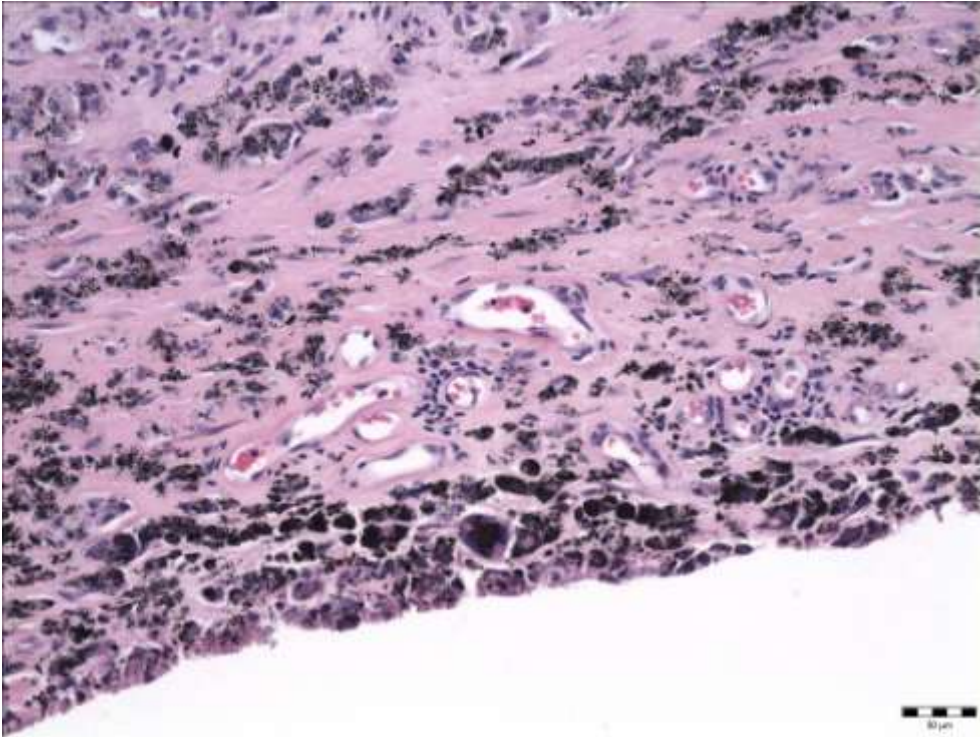
Obr. 27 **Kostní detritus** (načernalá depozita), pacient č. 23, Kossa 100x.
 Inside obrázek - tentýž preparát v barvení HE, 100x.



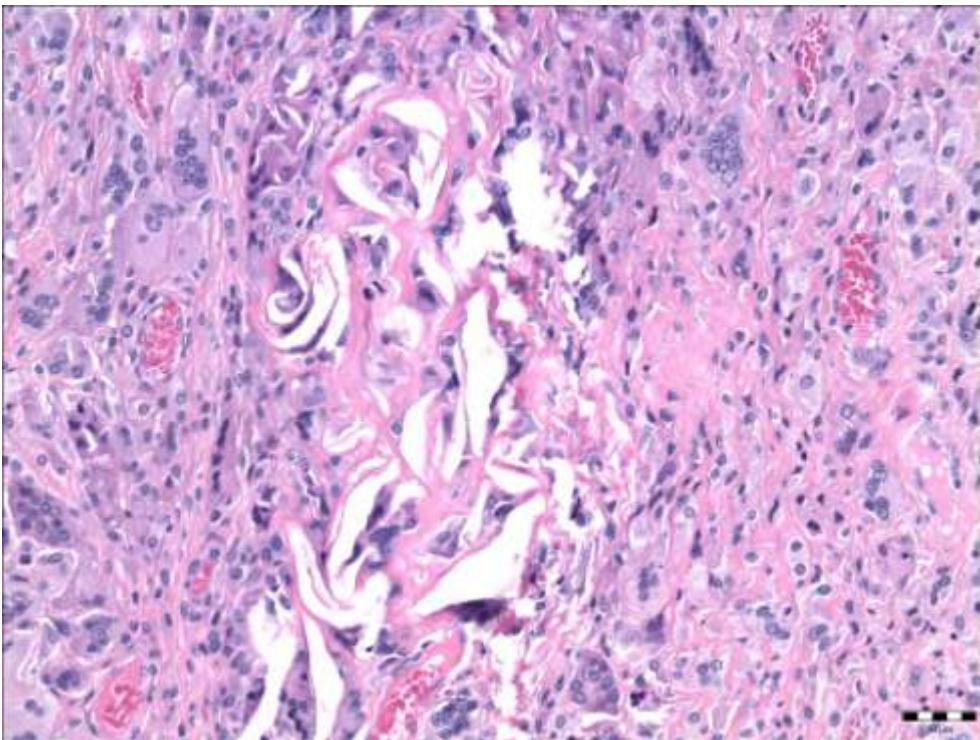
Obr. 28 **Polyetylenové supramakročástice**, přibarvená cytoplazma makrofágů, pacient č. 19, olejová červeň 200x.



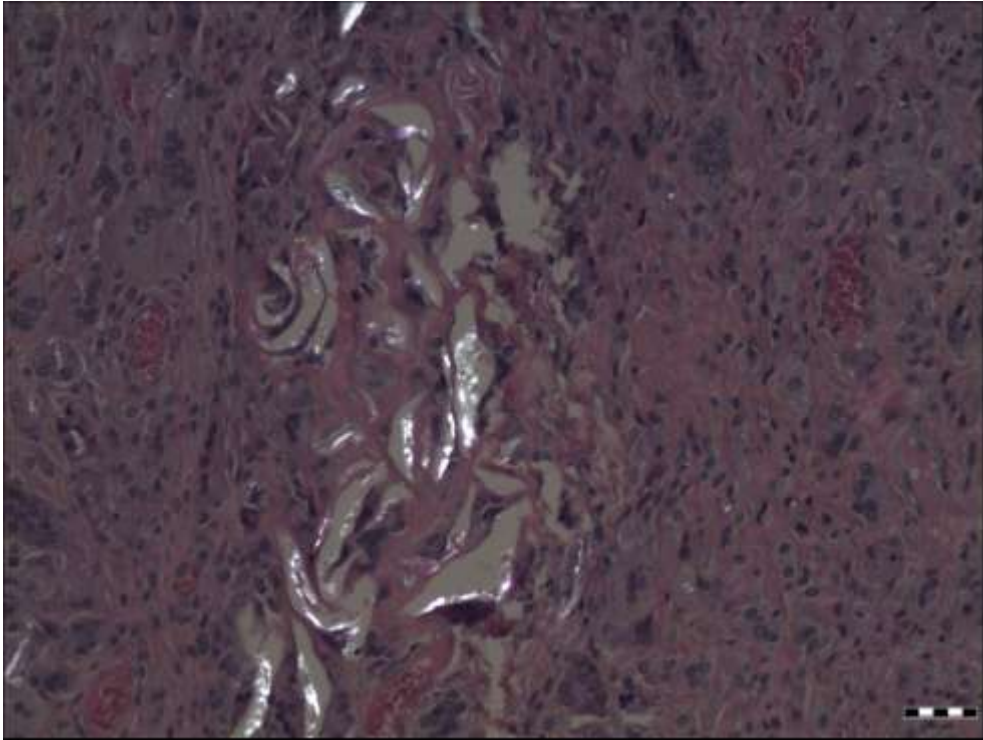
Obr. 29 **Kovová debris** lehce roztroušená v periprotetické tkáni, pacient č. 16, HE 200x.



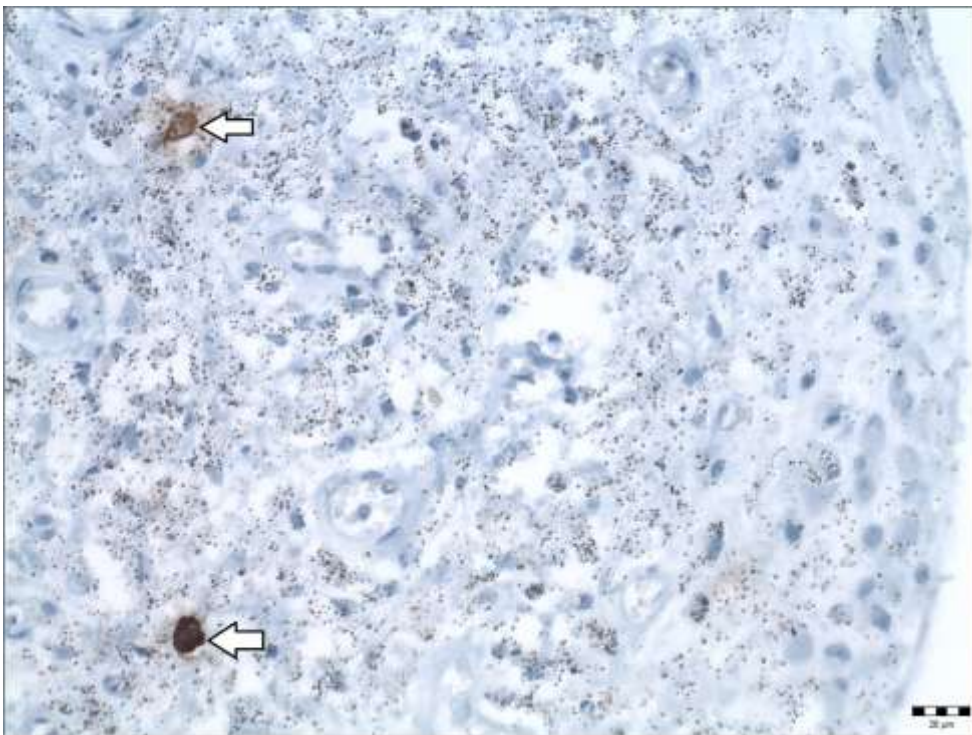
Obr. 30 **Silná denzita kovové debris**, pacient č. 5, HE 200x.



Obr. 31 **Polyetylenové částice** jako opticky prázdné prostory v centru obrázku, výrazná přítomnost makrofágů a mnohojaderných buněk, pacient č. 8, HE 200x.



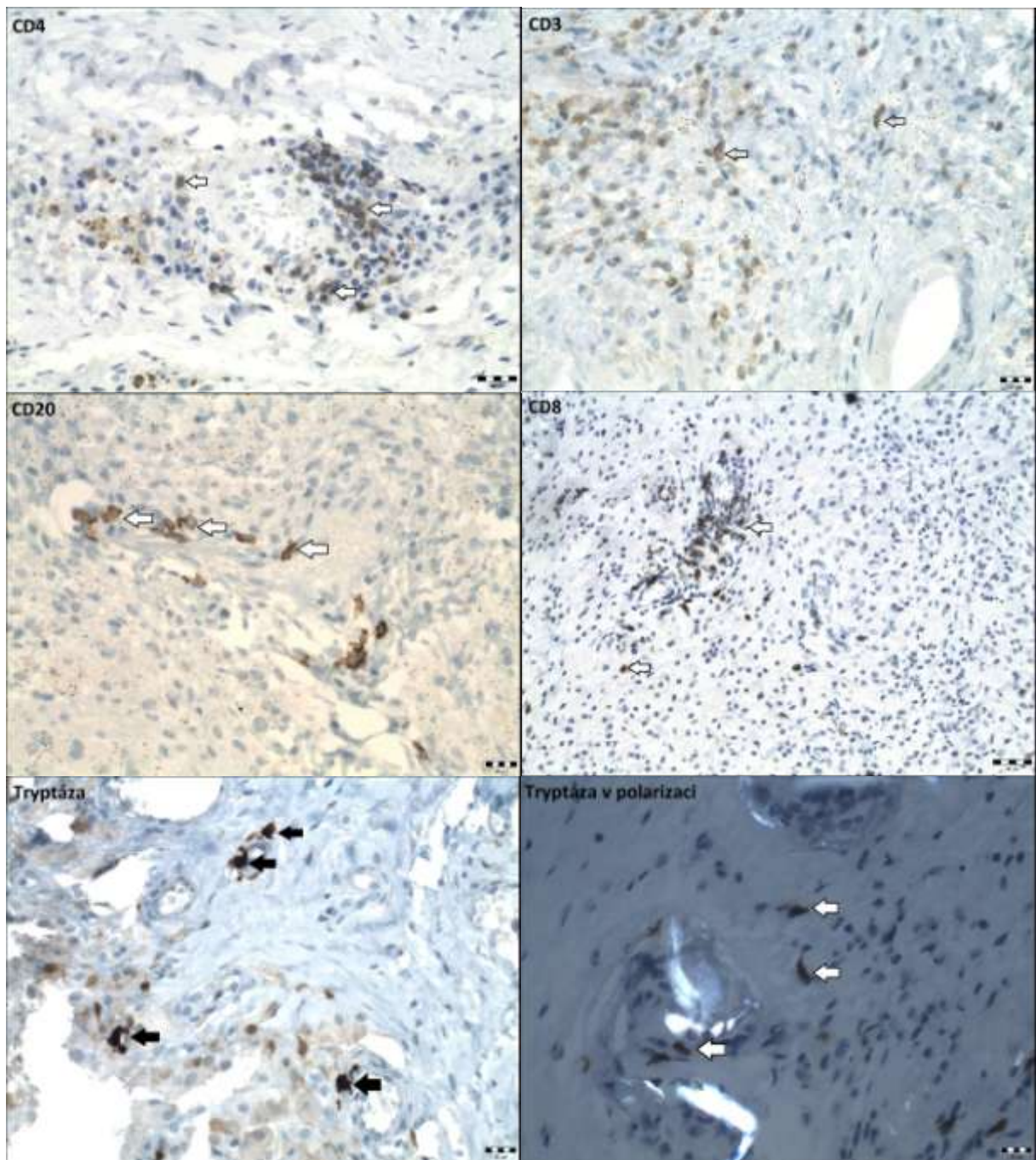
Obr. 32 **Polyetylenové částice** otáčející rovinu polarizovaného světla, pacient č. 8, HE 200x.



Obr. 33 **Cytoplazma mastocytů** různě intenzivně hnědého zbarvení, ve tkáni přítomny zbytky cementových částic, pacient č. 40, Tryptáza 400x.



Obr. 34 **Formolpigment** jako hnědá granula v cytoplazmě makrofágů, pacient č. 4, CD68 400x.



Obr. 35 **Přehled dalších použitých imunohistochemických metod:**

CD4 Pozitivita pomocných T lymfocytů, pacient č. 28, CD4 400x.

CD3 Pozitivní T lymfocyty a roztroušené kovové částice, pacient č. 41, CD3 400x.

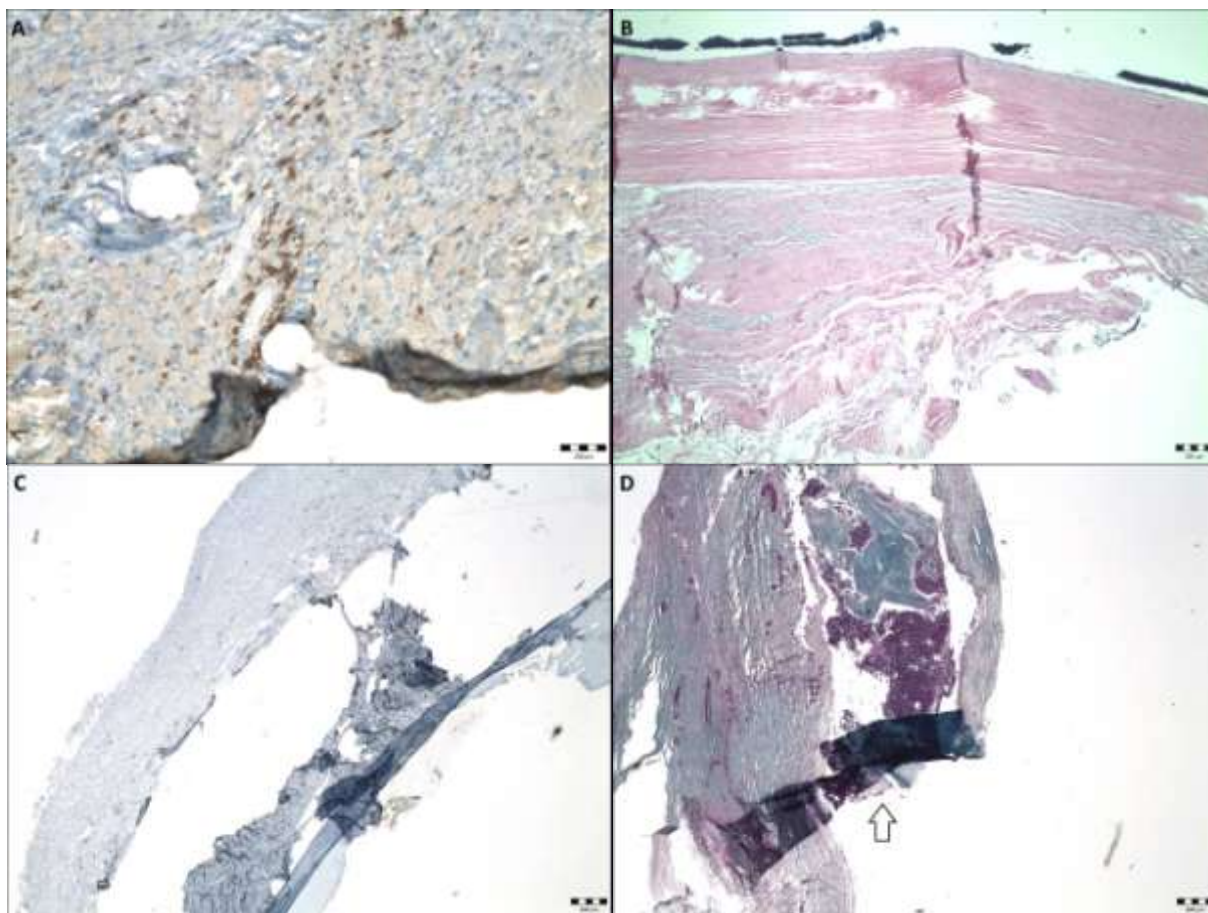
CD20 Nečetné B lymfocyty ve tkáni s distribucí kovové debris, pacient č. 41, CD20 400x.

CD8 Šipky ukazují na pozitivní cytotoxické T lymfocyty, pacient č. 29, CD8 200x.

Tryptáza Perivaskulární přítomnost mastocytů (černé šipky), pacient č. 11, Tryptáza 400x.

Tryptáza v polarizaci Polyetylenové částice v polarizaci, bílé šipky ukazují na mastocyty, pacient č. 11, Tryptáza 400x.

Během barvení některé řezy nedržely na podložních sklech a metody bylo nutné opakovat (Obr. 36). Nejčastější příčinou byly zbytky kostního detritu, kalcifikace, nedostatečné odvápnění tkání či přítomnosti velkých částic. Nově připravené řezy byly ponechány déle v termostatu při teplotě 37–58 °C, příp. byla snížena síla řezu na 3 µm. I přes opakované pokusy s různými typy elektrostatických skel (TOMO, Süssefrost plus, Superfrost plus, Superfrost plus Gold, Starfrost) některé řezy nepřilnuly na podložní sklo a u několika pacientů musely být použity jiné parafínové bloky.



Obr. 36 Ukázky problematických vzorků, neudržení řezu na podložním skle:

A Přeložená tkáň v dolní části preparátu, pacient č. 10, CD68 100x.

B Sklady a ztráta superficiální vrstvy, pacient č. 16, HE 40x.

C Potrhaný řez, ztráta řezu během imunohistochemického barvení, pacient č. 20, S100 40x.

D Slabá adheze řezu na skle, část řezu překrývá okolní tkáň, pacient č. 12, modrý trichrom 40x.

2.4.7 Diskuze

Hlavním zjištěním byla nízká variabilita výsledků histologického vyšetření tkání jednoho pacienta, které byly odebrané z různých lokalit kolem TEP. Statisticky významná byla pouze častější přítomnost synoviální hyperplazie ve vzorcích odebraných nejbližě kloubu (odběrová lokalita I.). Nabízí se vysvětlení, že utváření pseudosynoviální tkáně ovlivňují uvolňované částice z povrchu implantátu, objem synoviální tekutiny nebo velikost volného kloubního prostoru. Ojediné rozdíly v histopatologických obrazech mezi třemi lokalitami mohly být ovlivněny řadou činitelů v preanalytické a analytické fázi, počínaje fixací, příkrojením tkáně a orientací. Odlišnosti mohly být způsobeny také v důsledku vícečetného prokrajování parafinových bloků, kdy se konkrétní tkáňový okrsek tzv. vykrájel.

V několika parafinových blocích byla větší akumulace kovové debris se silným perivaskulárním lymfocytárním infiltrátem a nekrotickými okrsky až rozsáhlými nekrózami tkáně s fibrózou. Přestože byl soubor sestaven téměř výhradně z MoP implantátů, histopatologické změny byly podobné obrazům popisovaným ve studiích MoM implantátů. Jejich výsledky poukazují na pozitivní korelaci přítomnosti kovové debris s rozsahem poškození tkáně, častějším výskytem nekróz s fibrinózním exsudátem a perivaskulárním lymfocytárním infiltrátem (*Aroukatos 2010, Browne 2010, Davies 2005, Fujishiro 2011, Gramatopoulos 2013*). Podobnosti ve tkáňové odpovědi na otěrové částice u MoP a MoM implantátů publikoval již Topolovec a kol. (*Topolovec 2014*). Imunohistochemický průkaz makrofágů, T a B lymfocytů, krevních a lymfatických endotelií přispěl k přesnějšímu popisu struktury periprotetických tkání. Přítomnost lymfatických cév ve SLIM ve vyšetřovaných vzorcích nebyla prokázána (*Edwards 2008*).

S maximálním využitím dostupných vyšetřovacích metod lze z odebraných tkání získat informace o tom, jaké intravitální děje se odehrávaly v buňkách a tkáních těsně před jejich fixací. Okamžitá a správná fixace odebrané tkáně je z tohoto hlediska naprosto zásadní pro výslednou kvalitu použitých metod a správnou interpretaci nálezů. Je však nezbytné brát v úvahu, že i v případě okamžitého zastavení probíhajících dějů lze získat pouze informace z tohoto časového období, nikoli o prvopočáteční iniciaci procesů vedoucích k aseptickému uvolnění. Na druhou stranu je třeba si uvědomit, že tkáňové reakce probíhají kontinuálně a mnohastupňově a ve tkáních tak lze zastihnout různé fáze probíhajících reakcí.

Zpracování periprotetických tkání přineslo nové poznatky, ale i problémy. Byla řešena otázka správné orientace tkáně, kterou po fixaci nebylo možno stranově určit. Z toho důvodu byly barveny resekční plochy přímo na operačním sále ihned po odběru. Další překážkou mikroskopického hodnocení byla kvalita samotných histologických preparátů. Mnohé tkáňové vzorky obsahovaly velké otěrové částice, které mechanicky poškozovaly

žiletkové nože při řezání na mikrotomu a komplikovaly přípravu kvalitních řezů. K podobným zkušenostem došlo u tkání, které obsahovaly kostní detritus. Důležitým aspektem při hodnocení byla identifikace typů otěrových částic. Ve tkáních se objevovaly artefakty, formolový pigment a hemosiderin. Při analýze otěrových částic bylo použito barvení dle Perlse k průkazu hemosiderinu a barvení dle Kossy pro průkaz vápenatých solí a kostního detritu, které se ukázaly jako velmi užitečné. Naopak barvení olejovou červení nelze při detekci a identifikaci PE částic považovat za příliš výtěžné a spolehlivé.

Ačkoli je téma aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy TEP hojně publikováno, histologické studie s podrobnými protokoly, výsledky a názornými mikrofotografiemi nejsou časté. Pro spolehlivé výstupy vyšetření bylo nutno získat dostatečné znalosti o parametrech hodnocení periprotetických tkání a klasifikaci otěrových částic.

2.4.8 Závěr

- Tkáňová odpověď se u pacientů s TEP kyčle a kolene významně neliší.
- Tkáňová odpověď v případě jednoho pacienta je podobná ve všech vzorcích odebraných z různých lokalit kolem kloubu. Jinými slovy, při vyšetření mnohočetných vzorků odebraných v podobné vzdálenosti od kloubu byly histologické nálezy obdobné. Nelze tedy potvrdit, že tkáň vzdálenější od povrchu implantátu obsahuje méně reaktivních změn s menším množstvím otěrových částic. Byla prokázána pouze jediná statisticky významná asociace, a sice četnější přítomnost synoviální hyperplazie ve vzorcích z odběrové lokality I.
- Způsob odběru a dalšího zpracování tkáňových vzorků má vliv na variabilitu výsledků histologického vyšetření. Jde zejm. o správnou orientaci tkáně a dostatečnou fixaci, neboť autolyzované tkáň nelze hodnotit.
- I přes poměrně velké množství hodnocených preparátů se histologické nálezy mezi jednotlivými pacienty a odběrovými lokalitami lišily pouze v ojedinělých znacích. Počet vzorků tedy nemá vliv na reprodukovatelnost výsledků histologického vyšetření. Vyšší počet vzorků však dává dostatečný objem dat a umožňuje zachování statistické významnosti studie. Pro histologické vyšetření periprotetických tkání je vhodné odebírat minimálně 3 tkáňové vzorky.

2.4.9 Přínos pro praxi

Pro maximální výtěžnost histologického vyšetření je důležitá standardizace odběrové techniky a podrobný popis všech histopatologických změn včetně přítomných intracelulárních i extracelulárních částic. Odběr všech vzorků pseudopouzdra by měl probíhat v podobné vzdálenosti od kloubu.

V návaznosti na tuto studii přišla nabídka ke spolupráci na článku prof. G. Perina (Příloha 4), jehož cílem bylo vypracovat přehledný a kompletní algoritmus pro hodnocení otěrových částic v okolí kloubních náhrad (*Perino 2018*). Stručné shrnutí výstupů je uvedeno v kapitole 2.1.4.2 Identifikace a typologie částic.

2.5 Studie B: Distribuce mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních

2.5.1 Cíle

- Vyhodnotit možnosti a využití speciálních barvicích a imunohistochemických metod k průkazu dendritických buněk a mastocytů. Porovnat výsledky použitých speciálních metod s výsledky imunohistochemických metod.
- Optimalizovat imunohistochemické protokoly k průkazu dendritických buněk a mastocytů. Vyhodnotit detekční schopnosti použitých protilátek, rizika falešně pozitivních i falešně negativních výsledků, senzitivitu a specifitu metody.
- Zhodnotit přínos imunohistochemických metod k detekci konkrétních buněčných populací v diagnostice tkáňových procesů spojených s aseptickým uvolněním.
- Popsat distribuci a denzitu dendritických buněk a mastocytů v periprotetických tkáních.

2.5.2 Teoretické poznámky

Mastocyty pocházejí z hemopoetických prekurzorů kostní dřeně a jejich vývoj i přežití reguluje receptor CD117, který exprimují na svém povrchu. Obsahují 50-200 různých velkých silně bazofilních granul ohraničených membránou, které obsahují heparin, chondroitinsulfát, histamin, hydrolytické enzymy či neutrální proteázy. Pro všechny mastocyty je specifická proteáza tryptáza (*Bot 2015, Krystel-Whittemore 2016, Marichal 2013*). Mastocyty syntetizují cytokiny, růstové faktory a deriváty kyseliny arachidonové, jež se podílejí na rozvoji časně i pozdní tkáňové odpovědi. Stávají se funkčními hned po přestupu do tkání. Jejich aktivace a degranulace je způsobena např. vazbou s antigeny nebo fyzikálními a chemickými vlivy (*Firestein 2016*). Po degranulaci jsou schopny opětovné regranulace a další dlouhodobé existence (*Dahlin 2015*).

Mastocyty patří mezi nejvýznamější efektorové buňky reakce přecitlivělosti časného typu, hrají zásadní roli při zánětlivých onemocněních, při angiogenezi či komunikaci mezi nervovým a imunitním systémem (*Galdiero 2017*). Patologická akumulace mastocytů bývá přítomna u celé řady onemocnění včetně nádorů (*Gurish 2012*) a patrně je i typickou součástí tkáňové odpovědi na přítomnost kloubních náhrad (*Lennox 1987, Solovieva 1996*).

Dendritické buňky (dále jen DC) reprezentují heterogenní subpopulaci profesionálních antigen prezentujících buněk a nacházejí se téměř ve všech tkáních a orgánech lidského těla. DC vycházejí z kostní dřeně z pluripotentní kmenové buňky a

vyskytují se v několika funkčních a morfologických stádiích. V nezralém stavu jsou DC spíše oválné s hladkým buněčným povrchem a kratšími pseudopodiemi, mají nepravidelné jádro a malá jadérka. Zralé DC mají nepravidelný tvar a dlouhé membránové výběžky, které umožňují dobrou pohyblivost a schopnost migrace.

Ve tkáních jsou DC v nezralé formě a mají vysokou schopnost fagocytózy i makropinocytózy. Na svém povrchu vystavují antigeny s MHC komplexy, které při absenci kostimulačních molekul neaktivují T lymfocyty. Tzv. semimaturované DC jsou schopné prezentovat antigen a fenotypicky jsou podobné zralým DC, avšak bez schopnosti aktivace T lymfocytů (*e Sousa 2006*). K maturaci DC dochází po vazbě antigenů na vlastní receptory, DC ztrácejí schopnost pohlcovat částice a během 48 hodin dosahují zralosti. Po 2-3 dnech zahynou apoptózou a kontinuálně jsou doplňovány z prekursorů v kostní dřeni, příp. z monocytů. Zralé DC syntetizují MHC proteiny, prozánětlivé cytokiny, kostimulační a adhezivní molekuly, které ovlivňují migraci, proliferaci a diferenciaci imunitních buněk, fibroproliferaci i proteolýzu, sterilní zánět, aseptickou nekrózu či apoptózu (*Firestein 2016*). Vyšší četnost zralých DC v periprotetických tkáních by mohla znamenat jejich aktivaci a zapojení do procesu aseptického uvolnění.

2.5.3 Hypotézy

- Více než 24hodinová fixace v 10% formalínu a odvápnění tkání nebrání reprezentativnímu imunohistochemickému barvení periprotetických tkání.
- Standardní laboratorní postupy jsou dostatečné pro spolehlivou identifikaci DC a mastocytů.
- K optimálnímu průkazu mastocytů jsou vhodnější imunohistochemické než speciální barvicí metody.
- K imunohistochemickému průkazu DC postačí aplikace dvou zvolených protilátek.
- Denzita mastocytů a DC je vyšší u pacientů s asepticky uvolněnými TEP než u kontrolní skupiny.

2.5.4 Speciální barvicí metody k průkazu mastocytů

Při rutinním barvení HE mastocyty splývají s pozadím a nejsou dobře pozorovatelné. K průkazu mastocytů lze použít metachromatická barviva, nejčastěji thiazinová, např. toluidinová modř při nízkém pH (fialová granula) nebo thionin (purpurová granula). Při metachromatickém barvení je výsledný odstín prokazovaných složek tkáně odlišný od odstínu použitého barviva. Granula jsou znázornitelná také ortochromaticky (tón v tónu)

kresylvioletí nebo Giemsovým barvením a v obou případech jsou granula fialová. Mohou však reagovat i s aldehydovým fuchsinem nebo alcianovou modří. V této studii byla použita metachromatická barvení: 1) metoda s použitím toluidinové modři (TM); 2) modifikovaná metoda Thionin-Luna (**Luna**).

Pracovní postup barvení toluidinovou modří:

1. Odparafinování a oplach destilovanou vodou.
 2. Barvicí roztok toluidinové modři 30 minut.
 3. Oplach destilovanou vodou, odvodnění, projasnění a zamontování.
- Výsledek barvení: granula mastocytů fialová, ostatní struktury modré.

Pracovní postup metodou Thionin-Luna:

1. Odparafinování a oplach destilovanou vodou.
 2. 0,6% vodný roztok thioninu 30 minut, oplach destilovanou vodou.
 3. 0,2% vodný roztok kyseliny octové, diferenciací, kontrola v mikroskopu.
 4. Odvodnění, projasnění a zamontování.
- Výsledek barvení: granula mastocytů purpurová, pozadí čisté.

2.5.5 Speciální barvicí metody k průkazu DC

DC mohou v barvení HE morfologicky připomínat makrofágy velkým oválným jádrem. Někdy vykazují tzv. perinukleární halo, které je způsobeno sražením cytoplazmy během histologického zpracování tkáně. V základním barvení HE však není možné DC spolehlivě odlišit od jiných buněčných populací. Ani impregnační ani histochemické metody nejsou pro DC dostatečně specifické, protože značí také např. melanocyty či makrofágy. Jedinou vhodnou volbou jejich průkazu ve tkáňových řezech je proto imunohistochemie.

2.5.6 Imunohistochemické metody průkazu mastocytů a DC

Podstatou imunohistochemických metod k průkazu mastocytů je znázornění jejich receptorů či granulárních mediátorů. Lze použít protilátky proti proteázám (tryptáza, chymáza) nebo proti exprimovaným antigenům (např. CD117, CD203c). Ve studii byla aplikována polyklonální protilátka Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 neboli c-kit (dále jen **CD117**) a Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase (dále jen **tryptáza**). CD117 je známá také jako tyrozin kinázový receptor, který lze detekovat v hemopoetických kmenových buňkách, mastocytech, melanocytech, Cajalových buňkách, bazálních buňkách

kůže a epitelu prsních ductů. Tryptáza je enzymatickou výbavou všech lidských mastocytů, a je proto vysoce specifická (<http://www.agilent.com/en/dako-products>).

Výběr vhodné protilátky pro identifikaci DC nebyl jednoduchý, protože řada protilátek není vhodná na imunohistochemii v parafinových řezech nebo není specifická pouze pro DC, které sdílí některé znaky s ostatními imunitními buňkami. Na základě zkušeností z praxe byla zvolena protilátka Polyclonal Rabbit Anti-S100 (dále jen **S100**) a Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a (dále jen **CD1a**). CD1a exprimují nezralé dendritické a Langerhansovy buňky. S100 protein exprimují Langerhansovy a dendritické buňky, ale také např. fibroblasty.

Na 3-4 μm silných parafinových řezech byla prováděna metoda nepřímé dvoustupňové imunohistochemie (automat Ventana Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Inc.). Protilátky byly naředěny pomocí Antibody Diluent (DAKO, S2022) a pro každou z nich byl optimalizován barvicí protokol (viz protokoly barvení a Tab. 9). Výsledná exprese byla ve všech případech znázorněna hnědým zbarvením prokazovaného antigenu (reakce s 3,3'-diaminobenzidinem). Poté byly preparáty zamontovány v lepicím automatu Tissue-Tek[®] Film[®] Coverslipper (Sakura Finetek Europe B.V.).

Manuální protokol imunohistochemického barvení:

1. Odparafinování a oplach destilovanou vodou.
2. Blokování endogenní peroxidázy v 3% peroxidu vodíku 10 minut.
3. Oplach destilovanou vodou 3x5 minut.
4. Odmaskování v pufru o pH 9 (DAKO S2367), 40 minut při 99 °C a vychladnutí 20 minut při pokojové teplotě.
5. Oplach puftrem PBS (pH 7,2-7,4) 3x5 minut.
6. Aplikace primární protilátky, inkubace při pokojové teplotě.
7. Oplach puftrem PBS (pH 7,2-7,4) 3x5 minut.
8. Inkubace s N-Histofine Simple Stain MAX PO (Exbio 414154F) 30 minut při pokojové teplotě.
9. Oplach puftrem PBS (pH 7,2-7,4) 3x5 minut.
10. Vizualizace chromogenem Histofine DAB 3Skit (Exbio 415194F) max. 10 minut, kontrola v mikroskopu.
11. Oplach destilovanou vodou 5 minut.
12. Barvení jader v Gillově hematoxylinu 1 minutu.
13. Zmodrání jader v pramenité teplé vodě 10 minut.
14. Odvodnění, projasnění a zamontování.

Pracovní protokol použitý v automatu Ventana BenchMark XT s detekční soupravou iView DAB Detection Kit:

1. Uložení osušených parafinových řezů do přístroje.
2. Odparafinování v EZ 75 °C 8 minut.
3. Odmaskování antigenu CC1 standardní.
4. Aplikace primární protilátky při 22 °C, délka inkubace individuální.
5. Barvení jader Hematoxylinem II 8 minut.
6. Inkubace s Bluing reagent 4 minuty.

Primární protilátka	Výrobce, klon	Cíl detekce	Ředění	Inkubace	Pozitivní exprese
Mast Cell Tryptase	DAKO klon AA1	mastocyty	1:400	32 minut	hnědé zbarvení cytoplazmatických granul
CD117	DAKO polyklon	mastocyty	1:100	32 minut	hnědé zbarvení cytoplazmy/buněčné membrány
S100	DAKO polyklon	DC	1:600	16 minut	hnědé zbarvení jader a cytoplazmy
CD1a	DAKO klon 010	DC	RTU	32 minut	hnědé zbarvení cytoplazmy/buněčné membrány

Vysvětlivky: RTU = ready-to-use, k přímému použití. Pozn.: jako pozitivní kontrola byla u těchto protilátek použita kůže.

Tab. 9 Specifikace použitých protilátek.

2.5.7 Histologické hodnocení

Identifikace DC byla založena na pozitivní expresi specifických antigenů a dále na jejich nezaměnitelných cytomorfolozických znacích. Přítomnost mastocytů byla potvrzena v případech pozitivních granul ve speciálních barvicích i imunohistochemických metodách.

2.5.8 Výsledky

Speciální metody TM i Luna znázornily granula mastocytů (Obr. 37-38), ale jejich pozorování v optickém mikroskopu bylo náročné na čas. Celkové počty mastocytů byly výrazně nižší ve speciálních než v imunohistochemických metodách (Obr. 39-40). Zajímavým zjištěním byla rozdílná exprese tryptázy a antigenu CD117 u mastocytů, kde výrazně dominovala tryptáza (Tab. 10-11).

Expres S100 byla vyjádřena různě intenzivním hnědým zbarvením jader a cytoplazmy DC (Obr. 41). I přes optimalizaci barvicího protokolu se v této metodě slabě přibarvovala cytoplazma některých makrofágů (Obr. 42). Pozitivní exprese CD1a byla

interpretována v případě hnědě zbarvené cytoplazmy a/nebo buněčné membrány DC (Obr. 43) a byla nižší než exprese S100 proteinu.

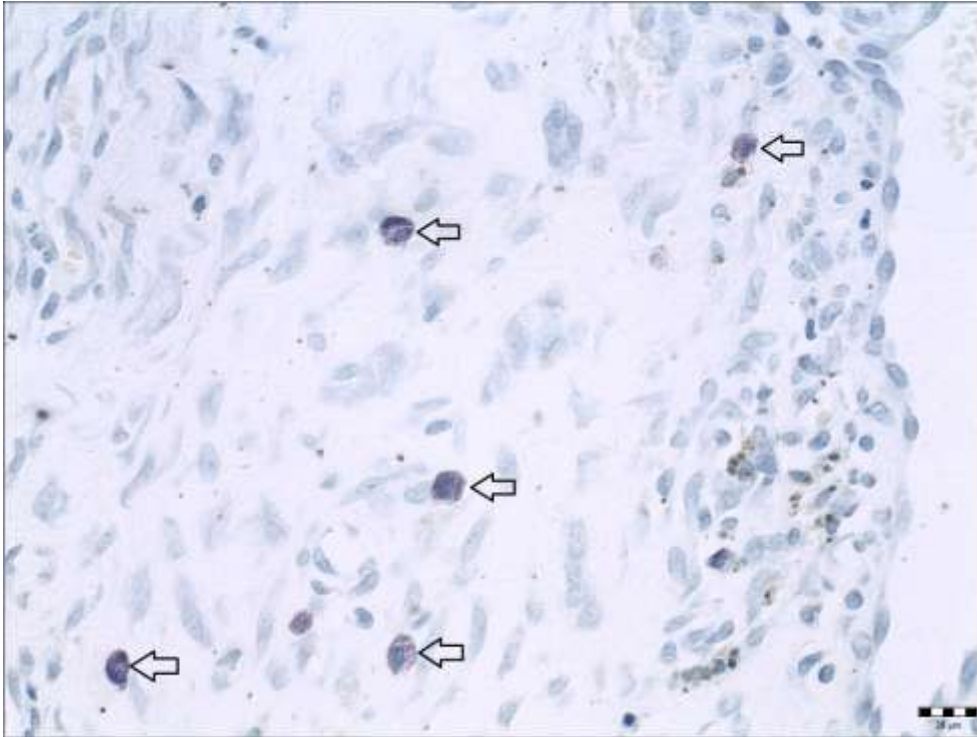
Vztah přítomnosti otěrových částic, polypózně utvářené SLIM a denzity tkáňových mastocytů byl shledán jako statisticky významný. V případě denzity DC byl stejný vztah na hranici signifikance. Dále se ukázala slabá pozitivní korelace mezi přítomností DC (S100⁺) a mastocytů (tryptáza⁺). Záplava pozitivních DC i mastocytů doprovázela nekrotické okrsky s nakupením mastocytů kolem cév. Žádné další významné asociace prokázány nebyly. Více uvedeno v Příloze 3.

pacient	Tryptáza	CD117	S100	CD1a	pacient	Tryptáza	CD117	S100	CD1a
1	61	5	74	10	20	38	14	22	0
2	75	13	47	11	21	63	34	18	0
3	62	8	36	1	22	37	49	31	0
4	8	1	196	190	23	140	63	120	0
5	43	19	20	7	24	106	73	13	0
6	141	21	48	0	25	38	5	53	0
7	165	26	110	1	26	75	63	53	0
8	98	22	65	15	27	32	17	9	0
10	152	19	42	1	28	37	11	71	0
11	37	11	16	0	29	53	40	140	0
14	37	0	41	0	30	39	19	25	0
15	21	17	27	0	31	42	13	60	10
16	49	7	69	12	32	41	25	39	0
17	32	46	39	0	40	12	1	6	0
18	58	37	34	0	41	40	2	8	0
19	40	22	31	0					

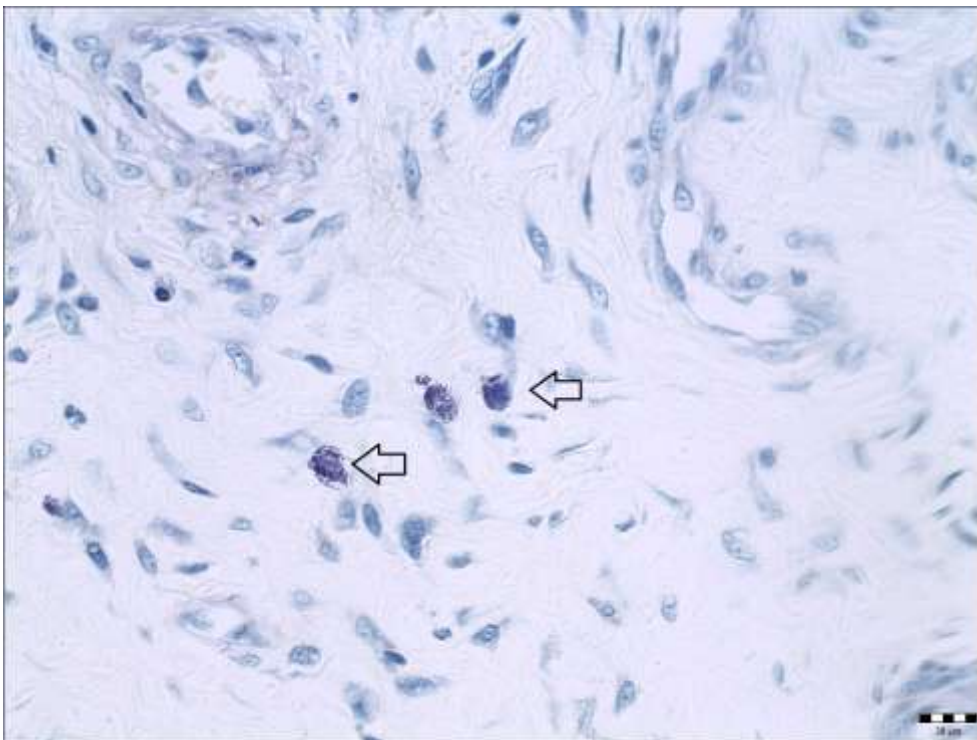
Tab. 10 **Kvantifikace buněčných populací v imunohistochemických metodách.** V tabulce jsou vyjádřeny průměrné hodnoty absolutního počtu buněk ve 20 HPF u jednoho pacienta, kde byly vždy provedeny a hodnoceny 2-3 preparáty z každé metody.

Prokazovaný marker	Průměrný počet buněk ve vzorcích jednoho pacienta		Nejvyšší počet buněk v jednom preparátu		Nejnižší počet buněk v jednom preparátu	
	Vyšetřování pacienti	Kontrolní skupina	Vyšetřování pacienti	Kontrolní skupina	Vyšetřování pacienti	Kontrolní skupina
Tryptáza	60	124	195	183	5	74
CD117	22	106	85	170	1	61
S100	50	3	327	10	1	2
CD1a	8	-	420	2	0	0

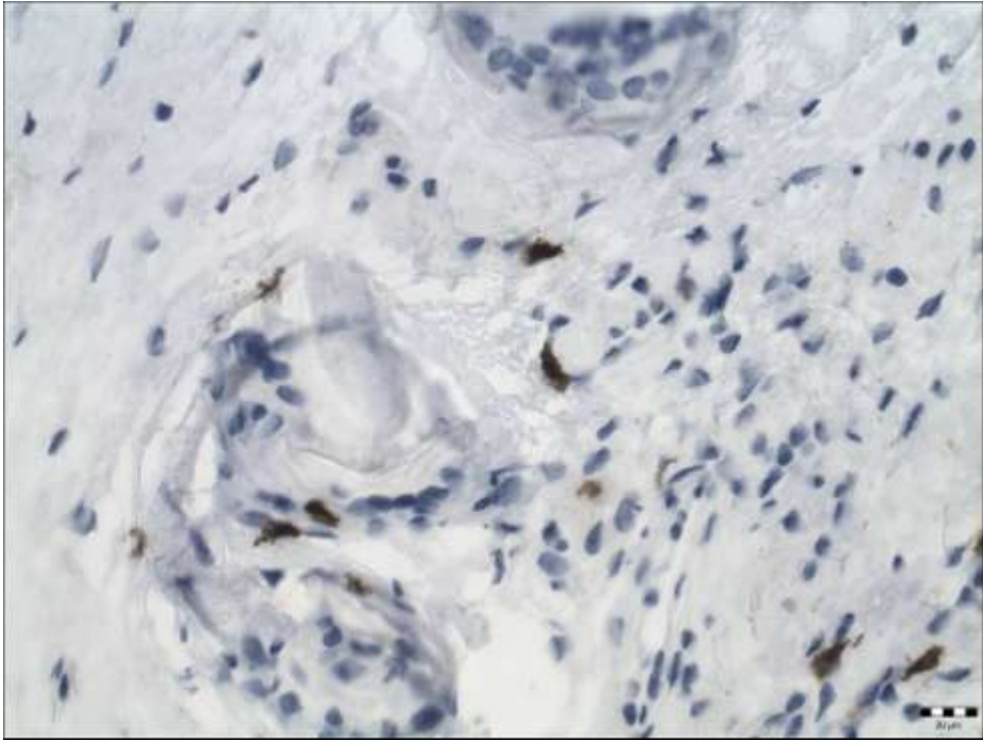
Tab. 11 **Zastoupení buněčných populací ve vyšetřovaném a kontrolním souboru.**



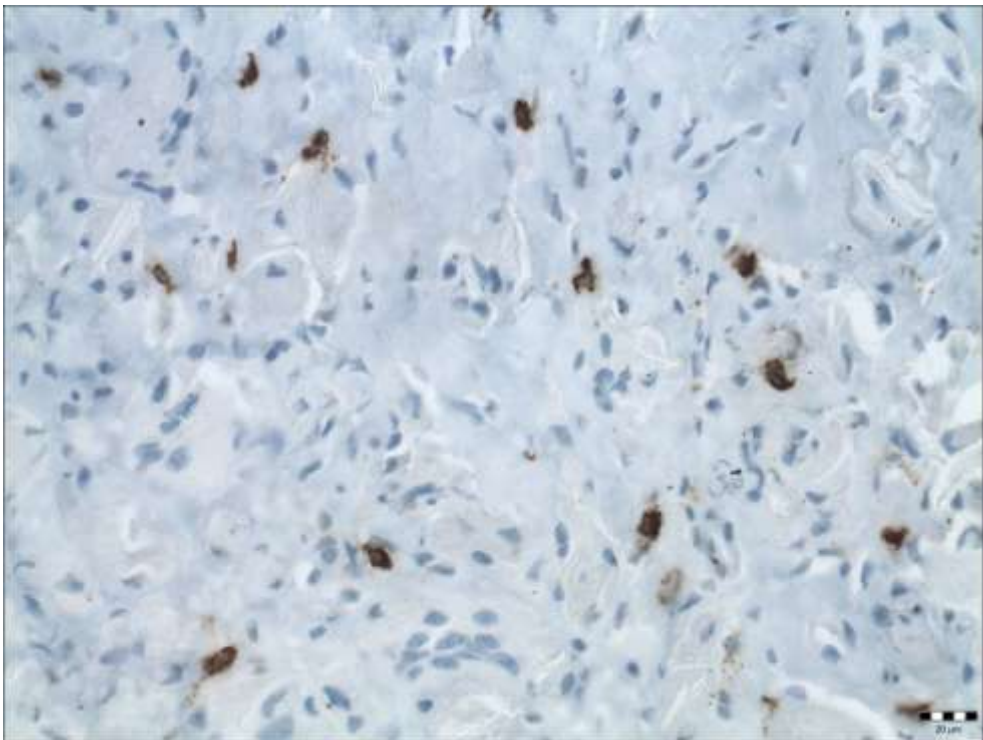
Obr. 37 **Granula mastocytů** modrofialově zbarvená v metodě LUNA, pacient č. 4, 400x.



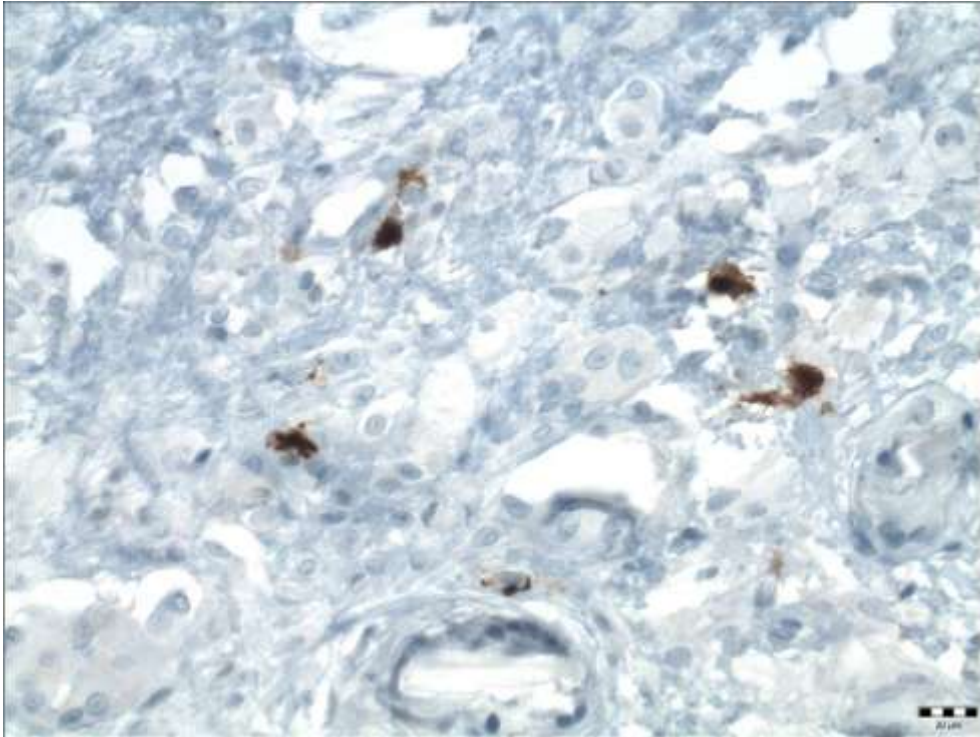
Obr. 38 **Granula mastocytů** fialově zbarvená v metodě TM, pacient č. 4, 400x.



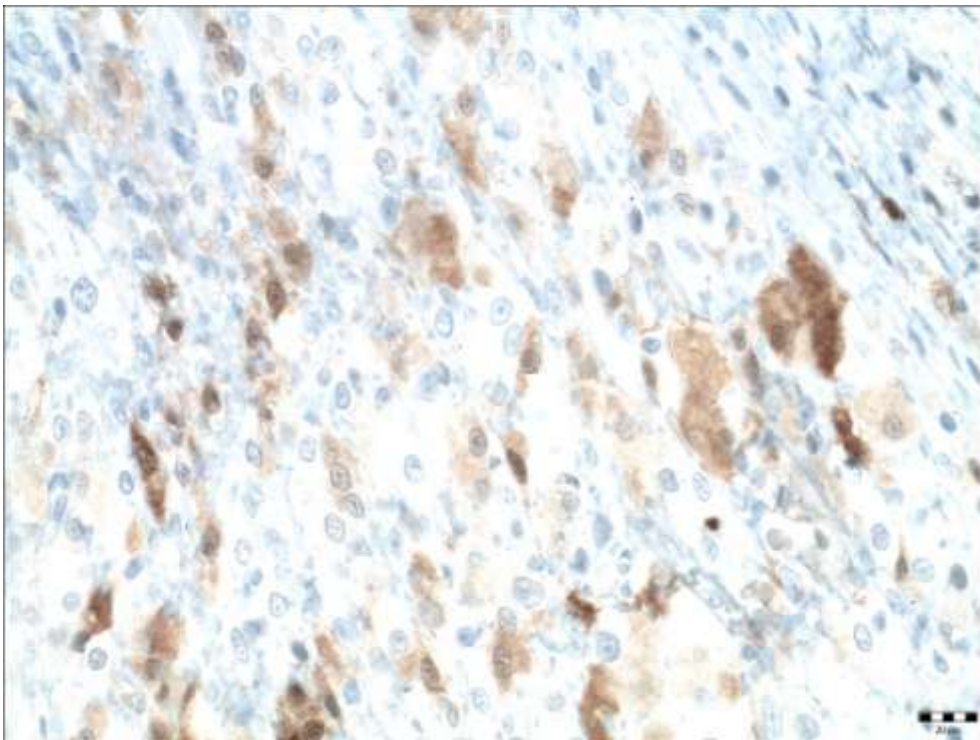
Obr. 39 **Průkaz mastocytů** (hnědé zbarvení cytoplazmy), pacient č. 5, CD117 400x.



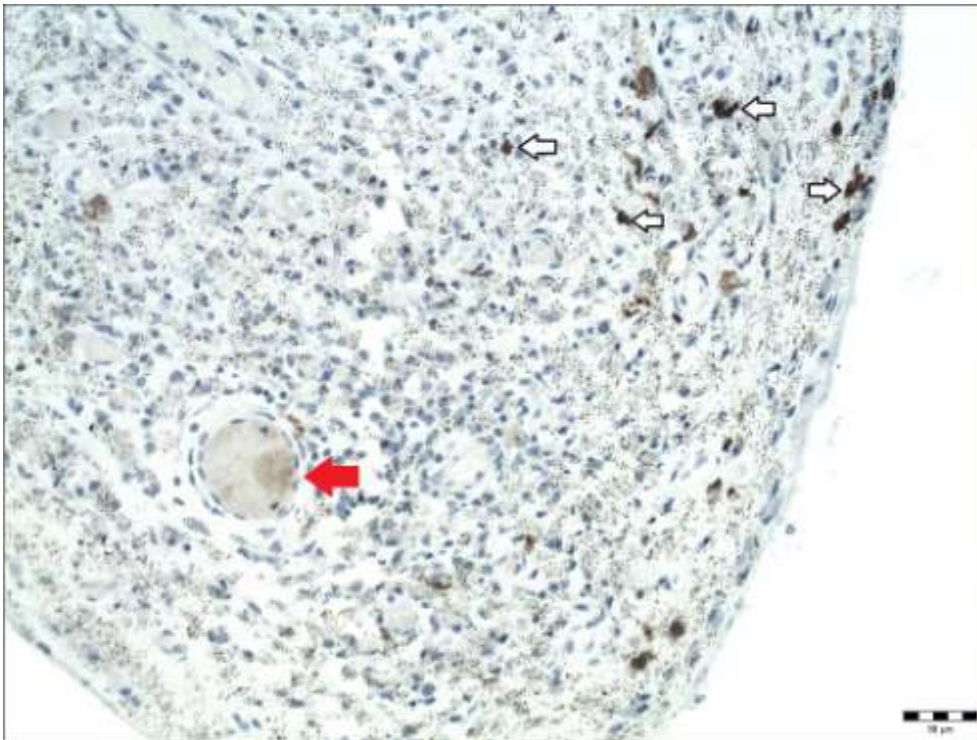
Obr. 40 **Pozitivita mastocytů** (hnědé zbarvení cytoplazmy), zřetelná uvolněná granula v blízkosti mastocytů (degranulace), pacient č. 8, Tryptáza 400x.



Obr. 41 **Pozitivní exprese proteinu S100 dendritickými buňkami** (hnědé zbarvení cytoplazmy), pacient č. 23, S100 400x.



Obr. 42 **Přibarvená cytoplazma makrofágů** v imunohistochemické metodě S100 k průkazu dendritických buněk, pacient č. 31, S100 400x.



Obr. 43 **Pozitivní exprese CD1a v dendritických buňkách** (bílé šipky), drobná černá granula představují kovovou debris. Obrovskobuněčná reakce KCT (červená šipka), pacient č. 16, CD1a 200x.

2.5.9 Diskuze

Speciální barvicí metody k průkazu mastocytů jsou přínosné a použitelné, ale pro kvantifikaci v optickém mikroskopu se ukázaly jako méně výhodné. Z výsledků imunohistochemie vyplývá, že k identifikaci mastocytů je nejlepší volbou protilátka proti tryptáze. Ta byla k detekci mastocytů v periprotetických tkáních použita společně s chymázou už v minulosti (*Solovieva 1996*). Ačkoli Qu (*Qu 1995*) poukázal na to, že tryptáza je lépe detekovatelná in situ hybridizací než imunohistochemicky, lze imunohistochemické vyšetření považovat za nejlepší nástroj pro srovnání histomorfologického obrazu, distribuce a denzity konkrétních buněk v periprotetických tkáních.

Pro identifikaci DC neexistuje konkrétní imunohistochemický marker, protože jejich fenotyp se s rostoucí zralostí mění. Mikroskopicky jsou DC charakterizovány na základě klíčových cytomorfologických znaků a přítomnosti či absence celého spektra molekul. K detekci DC lze využít protilátky zaměřené na povrchové, sekreční, kostimulační molekuly, růstové faktory nebo jejich receptory. Pro reprodukovatelné výsledky imunohistochemického vyšetření je však naprosto zásadní správný výběr protilátky. Ve

vyšetřovaném souboru vykazovaly DC pozitivní expresi proteinu S100 i antigenu CD1a, avšak protilátka proti S100 proteinu se ukázala jako mnohem spolehlivější.

Během hodnocení některých řezů byla intenzita exprese sledovaných antigenů rozdílná v manuálním a automatizovaném barvení. Přebarvené pozadí a přibarvování makrofágů bylo možné sledovat převážně u manuálně zpracovaných vzorků s přítomností aseptické nekrózy a okolní záplavou makrofágů a DC. To mohlo být také způsobeno např. delší inkubací v některém z kroků barvicího protokolu nebo odchylkami v manuálním a automatizovaném barvení. Pouze zřídka se objevila intenzivnější barevná reakce a lepší čistota pozadí ve prospěch automatizovaného způsobu provedení metody. Tento fakt však neměl vliv na výsledné hodnocení a kvantifikaci buněčných populací a obecně lze výsledky manuálních i automatizovaných protokolů hodnotit jako srovnatelné. Pokud to tedy dovolí technické a finanční možnosti pracoviště, je ideální provádět imunohistochemii v automatu optimalizovaným protokolem pro konkrétní typ tkáně i použité protilátky.

Nepodkročitelnou podmínkou dobrých výstupů imunohistochemie je dodržení preanalytické fáze, zejm. okamžitá fixace a zastavení autolytických procesů. Fixace a její vliv na imunohistochemii jsou dlouhodobě diskutovány a názory autorů se liší. Optimální doba fixace by měla trvat 6-24, příp. 36 hodin v závislosti na velikosti a typu vzorku (*Grizzle 2001, Leong 1989, Nenutil 2013, Sathyanarayana 2015*). Fixace kratší než 6 hodin a delší než 72 hodin může snižovat intenzitu exprese prokazovaných znaků. Delší doba fixace může zhoršovat viditelnost detailů, ale nemusí být natolik ovlivňující, pokud se při optimalizaci protokolu podaří nastavit adekvátní odmaskování a další přípravu před inkubací s primární protilátkou. Podle některých autorů fixace v rozsahu 24-72 hodin neovlivňuje kvalitu výsledků imunohistochemie (*Goldstein 2003, Sathyanarayana 2015*), což se potvrdilo i v této studii. Hlavní a negativní vliv na kvalitu výsledku má především autolýza způsobená nesprávnou nebo nedostatečnou fixací tkáně.

2.5.10 Závěr

- Z výsledků vyplývá, že 24-72 hodinová fixace v 10% formalínu nebrání provedení ani neovlivňuje kvalitu imunohistochemických metod. I při odvápnění tkání jsou výsledky imunohistochemie velmi dobré, avšak připravit reprezentativní řezy a zajistit jejich adhezi na podložních sklech může být v některých případech značně obtížné. Pro účely imunohistochemie je žádoucí vybrat tkáňové bloky bez kalcifikací a větších otěrových částic, které jsou během zpracování kritickým faktorem pro zachování celistvosti řezů.

- Správně označené a fixované periprotetické tkáně splňují kritéria pro histologické vyšetření. Rutinní laboratorní postupy zpracování tkání na Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava jsou vyhovující pro aplikaci speciálních barvicích a imunohistochemických metod.
- Při hodnocení mastocytů v preparátech nabarvených speciálními metodami Luna a TM se ukázalo, že výsledky těchto metod nejsou pro identifikaci a přesnou kvantifikaci mastocytů v parafínových řezech natolik uspokojivé jako výsledky imunohistochemického barvení. Spolehlivou detekci mastocytů umožňuje imunohistochemický průkaz tryptázy.
- Obě vybrané protilátky k imunohistochemickému průkazu DC byly zhodnoceny jako užitečné. K detekci DC v periprotetických tkáních je více specifická protilátka proti S100 proteinu. Průkaz CD1a nelze považovat pro další zkoumání v této oblasti za přínosné. Pro hlubší objasnění úlohy DC v procesu aseptického uvolnění je třeba se zaměřit nejen na další povrchové, sekreční a kostimulační molekuly, ale také na syntetizované produkty, např. růstové faktory nebo cytokiny. Zajímavé výsledky by mohlo přinést barvení zaměřené na vzájemné vztahy DC a jiných buněčných populací.
- Denzita mastocytů byla mnohem vyšší u kontrolního souboru než u souboru pacientů. Toto zjištění ukazuje na to, že mastocyty zastávají významnější roli při rozvoji a průběhu artrózy než u aseptického uvolnění. Naopak denzita DC byla významně vyšší ve vyšetřovaném souboru, což by mohlo znamenat jejich zapojení v procesu aseptického uvolnění. U mastocytů i DC je zapotřebí použití širšího spektra imunohistochemických metod v rámci běžné i simultánní imunohistochemie pro získání přehledu o denzitě, distribuci a vzájemných vztazích buněk zapojených do tkáňové reakce provázející aseptické uvolnění.

2.5.11 Přínos pro praxi

K rutinnímu imunohistochemickému průkazu DC v periprotetických tkáních je nejvhodnější použít protilátku proti S100 proteinu a k průkazu mastocytů protilátku proti tryptáze. V dalším výzkumu by bylo žádoucí zaměřit se na vzájemný vztah buněk imunitního systému a patomorfológických projevů tkáňové odpovědi. Ten bude vhodné sledovat pomocí simultánní imunohistochemie založené na postupné aplikaci dvou nebo tří protilátek na jeden tkáňový řez.

2.6 Shrnutí závěrů jednotlivých studií

- Ačkoli je všeobecně známo, že otěrové částice indukují aseptický zánět a osteolýzu aktivací celé řady buněk, histologické vyšetření včetně imunohistochemie je jednou z nejdůležitějších metod v posuzování příčin selhání TEP a má výzkumu aseptického uvolnění stále co nabídnout. Identifikace dalších doposud nepopsaných markerů v histologických řezech může přispět k hlubšímu rozpoznání vzniku a vývoje aseptického uvolnění. Pro pochopení a osvětlení imunitních dějů v rámci aseptického uvolnění je žádoucí aplikace simultánní imunohistochemie s využitím nových protilátek zaměřených nejen na buněčné markery, ale i na další specifické proteiny imunitních buněk a signálních drah.
- Studium variability tkáňové odpovědi ukazuje, že topografie tkáňové odpovědi se sice může v některých parametrech lišit, avšak statistické analýzy neobjevily významné rozdíly. Při extenzivním vyšetření vzorků jednoho pacienta může být heterogenita histopatologických změn ovlivněna způsobem odběru, fixací, postupy během laboratorního zpracování i subjektivními odchylkami při hodnocení. Během histologického vyšetření periprotetických tkání bylo dále potvrzeno, že tkáňová odpověď mezi pacienty s asepticky uvolněnou TEP má v širším měřítku obdobný charakter.
- Pro standardní detekci mastocytů je nejvhodnější imunohistochemická metoda založená na průkazu tryptázy. K identifikaci dendritických buněk v periprotetických tkáních lze doporučit aplikaci protilátky proti S100.
- Denzita mastocytů i DC v periprotetických tkáních byla dostatečně vysoká na to, aby se stala námětem dalších a rozsáhlejších histologických studií.

2.7 Summary

- Although it is widely known that wear particles induce aseptic loosening and periprosthetic osteolysis by activating a wide range of cells, histological examination including immunohistochemistry, is one of the most important diagnostics methods in evaluation of the causes of total joint replacement failure, and has aseptic release research still to offer. Identification of other previously unrepresented markers in histological sections may contribute to a deeper recognition of the origin and development of aseptic loosening. In order to understand and illuminate immune events as part of aseptic loosening, it is desirable to apply simultaneous immunohistochemistry using new antibodies directed not only to cell markers but also to other specific immune cell proteins and signaling pathways.
- Tissue response variability study shows that tissue response topography may differ in some parameters, but statistical analyzes did not reveal significant differences. In the extensive examination of single patient samples, the heterogeneity of histomorphological changes can be influenced by the way of retrieving, fixation, laboratory procedures, and subjective differences in the microscopic evaluation. During histological examination of periprotective tissues it was further confirmed that the tissue response between patients with the aseptic loosened implants has a similar character.
- For the standard detection of mast cells, the most suitable immunohistochemistry method is based on tryptase detection. To identify dendritic cells, S100 antibody has proven to be more effective and reliable.
- The density of mast cells and DC in periprosthetic tissues was high enough to become an subject of larger histological studies.

2.8 Seznam použitých zkratk

ALTR	nepříznivá lokální tkáňová reakce (Adverse Local Tissue Reaction)
ARMD	reakce na kovové částice (Adverse Reaction to Metal Debris)
AU	aseptické uvolnění
DC	dendritická buňka (Dendritic Cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HE	hematoxylin-eozin
HEV	venuly s vysokým endotelem (High Endothelial Venules)
HPF	zorné pole s vysokým zvětšením (High Power Field)
IL	interleukin
KCT	reakce kol cizích těles
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů (Macrophage Colony Stimulating Factor)
MoM	implantát párovaný kov-kov (Metal on Metal)
MoP	implantát párovaný kov-polyetylen (Metal on Polyethylen)
OPG	osteoprotegerin
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PE	polyetylen
PPOL	periprotetická osteolýza
RANKL	ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru κ B (Receptor Activator for Nuclear factor Kappa B Ligand)
RNA	ribonukleová kyselina
SLIM	membrána vytvářející se kolem endoprotézy připomínající synovialis (Synovial-Like Interface Membrane)
TEP	totální endoprotéza
TGF- β	transformující růstový faktor beta
THA	totální endoprotéza kyčle (Total Hip Arthroplasty)
TKA	totální endoprotéza kolene (Total Knee Arthroplasty)
TLR	Toll-like receptor
TM	toluidinová modř
UHMWPE	vysokomolekulární polyetylen (UltraHigh Molecular Weight PolyEthylene)

2.9 Literatura

1. **Al Saffar**, N., Revell, P. A. (1994). Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. *Rheumatology*, 33(4), 309-316.
2. **Aroukatos**, P., Repanti, M., Repantis, T., Bravou, V., Korovessis, P. (2010). Immunologic adverse reaction associated with low-carbide metal-on-metal bearings in total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 468(8), 2135-2142.
3. **Athanasou**, N. A. (2016). The pathobiology and pathology of aseptic implant failure. *Bone and Joint Research*, 5(5), 162-168.
4. **Battifora**, H., Kopinski, M. (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34(8), 1095-1100.
5. **Bergschmidt**, P., Bader, R., Finze, S., Schulze, C., Kundt, G., Mittelmeier, W. (2011). Comparative study of clinical and radiological outcomes of unconstrained bicondylar total knee endoprostheses with anti-allergic coating. *The open orthopaedics journal*, 5, 354.
6. **Bergschmidt**, P., Bader, R., Mittelmeier, W. (2012). Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: revision surgery using a ceramic femoral component - a case report. *The Knee*, 19(2), 144-147.
7. **Bori**, G., Muñoz-Mahamud, E., Garcia, S., Mallofre, C., Gallart, X., Bosch, J., Garcia, E., Riba, J., Mensa, J., Soriano, A. (2011). Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Modern Pathology*, 24(4), 579.
8. **Bot**, I., Shi, G. P., Kovanen, P. T. (2015). Mast Cells as Effectors in AtherosclerosisSignificance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(2), 265-271.
9. **Browne**, J. A., Bechtold, C. D., Berry, D. J., Hanssen, A. D., Lewallen, D. G. (2010). Failed metal-on-metal hip arthroplasties: a spectrum of clinical presentations and operative findings. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 468(9), 2313-2320.
10. **Dahlin**, J. S., Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Molecular immunology*, 63(1), 9-17.
11. **Davies**, A. P., Willert, H. G., Campbell, P. A., Learmonth, I. D., Case, C. P. (2005). An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. *JBJS*, 87(1), 18-27.

12. **Drynda, A.**, Singh, G., Buchhorn, G. H., Awiszus, F., Ruetschi, M., Feuerstein, B., Kliche, S., Lohmann, C. H. (2015). Metallic wear debris may regulate CXCR4 expression in vitro and in vivo. *Journal of biomedical materials research Part A*, 103(6), 1940-1948.
13. **Edwards, J.**, Schulze, E., Sabokbar, A., Gordon-Andrews, H., Jackson, D., Athanasou, N. A. (2008). Absence of lymphatics at the bone-implant interface: implications for periprosthetic osteolysis. *Acta orthopaedica*, 79(2), 289-294.
14. **Evans, E. M.**, Freeman, M. A. R., Miller, A. J., Vernon-Roberts, B. (1974). Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *Bone & Joint Journal*, 56(4), 626-642.
15. **e Sousa, C. R.** (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476.
16. **Fillerova R**, Gallo J, Radvansky M, Kraiczova V, Kudelka M, Kriegova E. Excellent diagnostic characteristics for ultrafast gene profiling of DEFA1-IL1B-LTF in detection of prosthetic joint infections. *J Clin Microbiol.* 2017 Sep;55(9):2686-2697. doi: 10.1128/JCM.00558-17. Epub 2017 Jun 21.
17. **Fink, B.**, Gebhard, A., Fuerst, M., Berger, I., Schäfer, P. (2013). High diagnostic value of synovial biopsy in periprosthetic joint infection of the hip. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 471(3), 956-964.
18. **Firestein, G. S.**, Budd, R., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., O'Dell, J. R. (2016). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
19. **Fox, C. H.**, Johnson, F. B., Whiting, J., Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8), 845-853.
20. **Fujishiro, T.**, Moojen, D. J. F., Kobayashi, N., Dhert, W. J., Bauer, T. W. (2011). Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 469(4), 1127-1133.
21. **Galdiero, M. R.**, Varricchi, G., Seaf, M., Marone, G., Levi-Schaffer, F., Marone, G. (2017). Bidirectional Mast Cell-eosinophil interactions in inflammatory Disorders and Cancer. *Frontiers in medicine*, 4, 103.
22. **Gallo, J.**, Kaminek, P., Ticha, V., Rihakova, P., Rudolf, D. (2002). Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review. *Biomedical papers*, 146(2), 21-28.
23. **Gallo, J.**, Goodman, S. B., Konttinen, Y. T., Raska, M. (2013). Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate immunity*, 19(2), 213-224.

24. **Gallo, J., Luzna, P., Holinka, M., Ehrmann, J., Zapletalova, J., Lostak, J. (2015).** Validity of the Morawietz classification for evaluation of periprosthetic tissue. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 82(2), 126-134.
25. **Gehrke, T., Sers, C., Morawietz, L., Fernahl, G., Neidel, J., Frommelt, L., Krenn, V. (2003).** Receptor activator of nuclear factor κ B ligand is expressed in resident and inflammatory cells in aseptic and septic prosthesis loosening. *Scandinavian journal of rheumatology*, 32(5), 287-294.
26. **Goldring, S. R., Schiller, A. L., Roelke, M., Rourke, C. M., O'neil, D. A., Harris, W. H. (1983).** The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *JBJS*, 65(5), 575-584.
27. **Goldring, S. R., Jasty, M., Roelke, M. S., Rourke, C. M., Bringhurst, F. R., Harris, W. H. (1986).** Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface: Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis & Rheumatology*, 29(7), 836-842.
28. **Goldstein, N. S., Ferkowicz, M., Odish, E., Mani, A., Hastah, F. (2003).** Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *American journal of clinical pathology*, 120(1), 86-92.
29. **Goodman, S. B., Knoblich, G. M. O. C., O'Connor, M., Song, Y., Huie, P., Sibley, R. (1996).** Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 31(3), 421-428.
30. **Goodman, S. B., Huie, P., Song, Y., Lee, K., Doshi, A., Rushdieh, B., Woolson, S., Maloney, W., Schurman, D., Sibley, R. (1997).** Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties: a biologic spectrum. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 337, 149-163.
31. **Goodman, S. B., Huie, P., Song, Y., Schurman, D., Maloney, W., Woolson, S., Sibley, R. (1998).** Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces: study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br*, 80(3), 531-539.
32. **Goodman, S. B., Trindade, M., Ma, T., Genovese, M., Smith, R. L. (2005).** Pharmacologic modulation of periprosthetic osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 430, 39-45.
33. **Goodman, S. B. (2007).** Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials*, 28(34), 5044-5048.
34. **Goodman, S. B., Gibon, E., Yao, Z. (2013).** The basic science of periprosthetic osteolysis. *Instructional course lectures*, 62, 201.

35. **Grammatopoulos, G., Pandit, H., Kamali, A., Maggiani, F., Glyn-Jones, S., Gill, H. S., Murray, D. V., Athanasou, N. (2013).** The correlation of wear with histological features after failed hip resurfacing arthroplasty. *JBJS*, 95(12), e81.
36. **Grigg, C., Baggs, J., Slayton, R. (2016, December).** Association Between Surgical Antimicrobial Prophylaxis Regimen and Risk of Periprosthetic Joint Infection Following Total Hip and Knee Arthroplasty. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 3, No. suppl_1). Oxford University Press.
37. **Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F., Heymann, D. (2003).** Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *The American journal of pathology*, 163(5), 2021-2031.
38. **Grizzle, W. E., Stockard, C. R., Billings, P. E. (2001).** The effects of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 213-219.
39. **Gurish, M. F., Austen, K. F. (2012).** Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*, 37(1), 25-33.
40. **Hallab, N., Merritt, K., Jacobs, J. J. (2001).** Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *JBJS*, 83(3), 428.
41. **Harris, W. H. (1994).** Osteolysis and particle disease in hip replacement: a review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65(1), 113-123.
42. **Harris, W. H. (2001).** Wear and periprosthetic osteolysis: the problem. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 393, 66-70.
43. **Haughom, B. D., Erickson, B. J., Hellman, M. D., Jacobs, J. J. (2015).** Do complication rates differ by gender after metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty? A systematic review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 473(8), 2521-2529.
44. **Hercus, B., Revell, P. A. (2001).** Phenotypic characteristics of T lymphocytes in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(10-12), 1063-1067.
45. **Horiki, M., Nakase, T., Myoui, A., Sugano, N., Nishii, T., Tomita, T., Miyaji, T., Yoshikawa, H. (2004).** Localization of RANKL in osteolytic tissue around a loosened joint prosthesis. *Journal of bone and mineral metabolism*, 22(4), 346-351.
46. **Hukkanen, M., Corbett, S. A., Batten, J., Konttinen, Y. T., McCarthy, I. D., Maclouf, J., Santavirta, S., Hughes, S.P.F, Polak, J. M. (1997).** Aseptic loosening of total hip replacement: macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-

- oxygenase-2, together with peroxy-nitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure. *J Bone Joint Surg Br*, 79(3), 467-474.
47. **Chesnick**, I. E., Mason, J. T., O'Leary, T. J., Fowler, C. B. (2010). Elevated pressure improves the rate of formalin penetration while preserving tissue morphology. *Journal of cancer*, 1, 178.
 48. **Chiba**, J., Rubash, H. E., Kang Jung, K. I. M., Iwaki, Y. (1994). The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 300, 304-312.
 49. **Jansen**, P., Mumme, T., Randau, T., Gravius, S., Hermanns-Sachweh, B. (2014). Endoglin (CD105) expression differentiates between aseptic loosening and periprosthetic joint infection after total joint arthroplasty. *SpringerPlus*, 3(1), 561.
 50. **Jäger**, M., Balda, B. R. (1979). Loosening of a total hip prosthesis at contact allergy due to benzoyl peroxide. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery*, 94(3), 175-178.
 51. **Jiranek**, W. A., Machado, M., Jasty, M., Jevsevar, D., Wolfe, H. J., Goldring, S. R., Goldberg, M.J., Harris, W. H. (1993). Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *JBJS*, 75(6), 863-879.
 52. **Jones**, L. C., Frondoza, C., Hungerford, D. S. (1999). Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 48(6), 889-898.
 53. **Krenn**, V., Morawietz, L., Perino, G., Kienapfel, H., Ascherl, R., Hassenpflug, G. J., Thomsen, M., Thomas, M, Huber, D., Fendoff., D., Baumhoer, M. G., Krukemeyer, M. G., Natu, S., Boettner, F., Zustin, J., Kölbl, B., R"ther, W., Kretzer, J.P, Gehrke, T. (2014). Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathology-Research and Practice*, 210(12), 779-786.
 54. **Krenn**, V., Perino, G. (2017). Histological diagnosis of implant-associated pathologies. In *Histological Diagnosis of Implant-Associated Pathologies* (pp. 1-44). Springer, Berlin, Heidelberg.
 55. **Krystel-Whittemore**, M., Dileepan, K. N., Wood, J. G. (2016). Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in immunology*, 6, 620.
 56. **Lähdeoja**, T., Pajarinen, J., Kouri, V. P., Sillat, T., Salo, J., Konttinen, Y. T. (2010). Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis - a potential to respond against danger signals?. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(2), 184-190.

57. **Lennox**, D. W., Schofield, B. H., McDonald, D. F., Riley, J. L. (1987). A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit, and biologic ingrowth prostheses. *Clinical orthopaedics and related research*, (225), 171-191.
58. **Leong**, A. S., Gilham, P. N. (1989). The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology*, 21(4), 266-268.
59. **Lohmann**, C. H., Meyer, H., Nuechtern, J. V., Singh, G., Junk-Jantsch, S., Schmotzer, H., Morlock, M. M., Pflüger, G. (2013). Periprosthetic tissue metal content but not serum metal content predicts the type of tissue response in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. *JBJS*, 95(17), 1561-1568.
60. **Lohmann**, C. H., Singh, G., Willert, H. G., Buchhorn, G. H. (2014). Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World journal of orthopedics*, 5(5), 660.
61. **Mandelin**, J., Li, T. F., Liljeström, M., Kroon, M. E., Hanemaaijer, R., Santavirta, S., Konttinen, Y. T. (2003). Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *Bone & Joint Journal*, 85(8), 1196-1201.
62. **Marichal**, T., Tsai, M., Galli, S. J. (2013). Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunology Research*, 1(5), 269-279.
63. **Moerman**, A., Zadpoor, A. A., Oostlander, A., Schoeman, M., Moshtagh, P. R., Pouran, B., Valstar, E. (2016). Structural and mechanical characterisation of the periprosthetic tissue surrounding loosened hip prostheses. An explorative study. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 62, 456-467.
64. **Morawietz**, L., Classen, R. A., Schröder, J. H., Dynybil, C., Perka, C., Skwara, A., Neidel, J., Gehrke, T., Frommelt, L., Hansen, T., Otto, M., Barden, B., Aigner, T., Stiehl, P., Schubert, T., Meyer-Scholten, C., König, A., Ströbel, P., Rader, C. P., Kirschner, S., Lintner, F., Rütger, W., Bos, I., Hendrich, C., Kriegsmann, J., Krenn, V. (2006). Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *Journal of clinical pathology*, 59(6), 591-597.
65. **Naganuma**, Y., Takakubo, Y., Hirayama, T., Tamaki, Y., Oki, H., Yang, S., Takagi, M. (2016). Analyses on immunohistochemical localisation of TLR2 and NLRP3 in aseptic periprosthetic tissues around loose hip joints and their response to foreign body particles. *Bone Joint J*, 98(SUPP 3), 73-73.
66. **Nenutil**, R., Ryška, A., Kolář, Z. (2013). Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu. *Guideline, Společnost českých patologů*.
67. **Ollivere**, B., Darrah, C., Barker, T., Nolan, J., Porteous, M. J. (2009). Early clinical failure of the Birmingham metal-on-metal hip resurfacing is associated with metallosis and soft-tissue necrosis. *Bone & Joint Journal*, 91(8), 1025-1030.

68. **Ollivere**, B., Wimhurst, J. A., Clark, I. M., Donell, S. T. (2012). Current concepts in osteolysis. *J Bone Joint Surg Br*, 94(1), 10-15.
69. **Pajarinen**, J., Cenni, E., Savarino, L., Gomez-Barrena, E., Tamaki, Y., Takagi, M., Salo, J., Konttinen, Y. T. (2010). Profile of toll-like receptor – positive cells in septic and aseptic loosening of total hip arthroplasty implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(1), 84-92.
70. **Pandey**, R., Drakoulakis, E., Athanasou, N. A. (1999). An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *Journal of clinical pathology*, 52(2), 118-123.
71. **Pazzagli**, U. E., Ceciliani, L., Wilkinson, M. J., Dell'Orboz, C. (1985). Involvement of metal particles in loosening of metal-plastic total hip prostheses. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery*, 104(3), 164-174.
72. **Perino**, G., Ricciardi, B. F., Jerabek, S. A., Martignoni, G., Wilner, G., Maass, D., Goldring, S. R., Purdue, P. E. (2014). Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. *BMC clinical pathology*, 14(1), 39.
73. **Perino**, G., Sunitsch, S., Huber, M., Ramirez, D., Gallo, J., **Vaculova**, J., Natu, S., Kretzer, J. P., Müller, S., Thomas, P., Thomsen, M., Krukemeyer, M. G., Resch, H., Huegle, T., Waldstein, W., Boettner, F., Gehrke, T., Sesselmann, S., Ruther, W., Xia, Z., Purdue, E., Krenn, V. (2018) A Diagnostic Approach for the Histological Particle Algorithm in Periprosthetic Neo-synovial Tissue. *BMC Clin Pathol* (zatím nepublikované)
74. **Puchtler**, H., Meloan, S. N. (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*, 82(3), 201-204.
75. Purdue, P. E., Koulouvaris, P., Potter, H. G., Nestor, B. J., Sculco, T. P. (2007). The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 454, 251-261.
76. **Qu**, Z., Liebler, J. M., Powers, M. R., Galey, T., Ahmadi, P., Huang, X. N., Ansel, J. C., Butterfield, J. H., Planck, S. R., Rosenbaum, J. T. (1995). Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *The American journal of pathology*, 147(3), 564.
77. **Rajpura**, A., Board, T. (2013). Complications following total hip arthroplasty. In *Arthroplasty-Update*. InTech.
78. **Ricciardi**, B. F., Nocon, A. A., Jerabek, S. A., Wilner, G., Kaplowitz, E., Goldring, S. R., Purdue, P. E., Perino, G. (2016). Histopathological characterization of corrosion

- product associated adverse local tissue reaction in hip implants: a study of 285 cases. *BMC clinical pathology*, 16(1), 3.
79. **Santanapipatkul**, P., Udomkiat, P. (2017). Smith-petersen mould arthroplasty: a 48-year follow-up. *Siriraj Medical Journal*, 64(4), 127-128.
 80. **Sathyanarayana**, U. G., Birch, C., Nagle, R. B., Tomlins, S. A., Palanisamy, N., Zhang, W., Hubbard, A., Brunhoeber, P., Wang, Y., Tang, L. (2015). Determination of optimum formalin fixation duration for prostate needle biopsies for immunohistochemistry and quantum dot FISH analysis. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*, 23(5), 364-373.
 81. **Schmalzried**, T. P., Jasty, M., Harris, W. H. (1992a). Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 74(6), 849-863.
 82. **Schmalzried**, T. P., Kwong, L. M., Jasty, M., Sedlacek, R. C., Haire, T. C., O'connor, D. O., Brangdon, C. R., Kabo, J. M., Malcolm, A. J., Harris, W. H. (1992b). The mechanism of loosening of cemented acetabular components in total hip arthroplasty. Analysis of specimens retrieved at autopsy. *Clinical orthopaedics and related research*, (274), 60-78.
 83. **Schuh**, A., Lill, C., Hönle, W., Effenberger, H. (2008). Prevalence of allergic reactions to implant materials in total hip and knee arthroplasty. *Zentralblatt für Chirurgie*, 133(3), 292-296.
 84. **Solovieva**, S. A., Ceponis, A., Konttinen, Y. T., Takagi, M., Suda, A., Eklund, K. K., Sorsa, T., Santavirta, S. (1996). Mast cells in loosening of totally replaced hips. *Clinical orthopaedics and related research*, (322), 158-165.
 85. **Sosna**, A., Radonský, T., Pokorný, D., Veigl, D., Horák, Z., Jahoda, D. (2003). Polyetylenová choroba. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 6-16.
 86. **Söder**, S., Sesselmann, S., Aigner, T., Oehler, S., Agaimy, A. (2016). Tenosynovial giant cell tumour (pigmented villonodular synovitis-)-like changes in periprosthetic interface membranes. *Virchows Archiv*, 468(2), 231-238.
 87. **Srinivasan**, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American journal of pathology*, 161(6), 1961-1971.
 88. **Steinbeck**, M. J., Jablonowski, L. J., Parvizi, J., Freeman, T. A. (2014). The role of oxidative stress in aseptic loosening of total hip arthroplasties. *The Journal of arthroplasty*, 29(4), 843-849.

89. **Slouf, M.,** Eklova, S., Kumstatova, J., Berger, S., Synkova, H., Sosna, A., Pokorny, D., Spundova, M., Entlicher, G. (2007). Isolation, characterization and quantification of polyethylene wear debris from periprosthetic tissues around total joint replacements. *Wear*, 262(9-10), 1171-1181.
90. **Takagi, M.,** Takakubo, Y., Pajarinen, J., Naganuma, Y., Oki, H., Maruyama, M., Goodman, S. B. (2017). Danger of frustrated sensors: Role of Toll-like receptors and NOD-like receptors in aseptic and septic inflammations around total hip replacements. *Journal of orthopaedic translation*, 10, 68-85.
91. **Thavarajah, R.,** Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 16(3), 400.
92. **Thomas, P.,** Braathen, L. R., Dörig, M., Auböck, J., Nestle, F., Werfel, T., Willert, H. G. (2009). Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy*, 64(8), 1157-1165.
93. **Thyssen, J. P.,** Jakobsen, S. S., Engkilde, K., Johansen, J. D., Søballe, K., Menné, T. (2009). The association between metal allergy, total hip arthroplasty, and revision: A case-control study. *Acta Orthopaedica*, 80(6), 646-652.
94. **Tomankova, T.,** Kriegova, E., Fillerova, R., Luzna, P., Ehrmann, J., Gallo, J. (2014). Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in primary knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 22(11), 1851-1860.
95. **Tomankova, T.,** Kriegova, E., Fillerova, R., Luzna, P., Ehrmann, J., Gallo, J. (2015). Low expression of Tlr-1,-2,-4 a il-2,-2r,-10,-10r and TgFb1 in pseudosynovial tissue collected at revision total knee arthroplasty for aseptic loosening. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 82(1), 67-75.
96. **Topolovec, M.,** Cör, A., Milošev, I. (2014). Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 34, 243-252.
97. **Varma, M.,** Linden, M. D., Amin, M. B. (1999). Effect of formalin fixation and epitope retrieval techniques on antibody 34betaE12 immunostaining of prostatic tissues. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12(5), 472-478.
98. **Veigl, D.,** Niederlova, J., Krystufkova, O. (2007). Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiological research*, 56(4), 455.

99. **Verra, W., Kernkamp, W., van Hilten, J., van de Watering, L., Chander, B., Bloem, R. M., Pöll, R. G., Nelissen, R. G. H. H.** (2016). Patient satisfaction and quality of life at least 10 years after total hip or knee arthroplasty. *Int J Orthop*, 2(2), 05.
100. **Wasko, M. K., Goodman, S. B.** (2016). Emperor's new clothes: Is particle disease really infected particle disease? *Journal of Orthopaedic Research*, 34(9), 1497-1504.
101. **Whitehouse, M. R., Endo, M., Zachara, S., Nielsen, T. O., Greidanus, N. V., Masri, B. A., Garbuz, D. S., Duncan, C. P.** (2015). Adverse local tissue reactions in metal-on-polyethylene total hip arthroplasty due to trunnion corrosion: the risk of misdiagnosis. *Bone Joint J*, 97(8), 1024-1030.
102. **Willert, H. G., Ludwig, J., Semlitsch, M.** (1974). Reaction of bone to methacrylate after hip arthroplasty: a long-term gross, light microscopic, and scanning electron microscopic study. *JBJS*, 56(7), 1368-1382.
103. **Willert, H. G., Semlitsch, M.** (1977). Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 11(2), 157-164.
104. **Willert, H. G., Buchhorn, G. H., Fayyazi, A., Flury, R., Windler, M., Köster, G., Lohmann, C. H.** (2005). Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: a clinical and histomorphological study. *JBJS*, 87(1), 28-36.

2.10 Elektronické zdroje

1. <http://www.agilent.com/en/dako-products>
2. <http://www.njrreports.org.uk/>
3. <http://nrlweb.ihelse.net/eng/>
4. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowmastcells.html>
5. <https://shpr.registercentrum.se/shar-in-english/annual-reports-from-the-swedish-hip-arthroplasty-register/p/rkeyyeElz>
6. <http://www.uzis.cz/registry-nzis/nrkn>

2.11 Seznam publikací spojených s dizertační prací

Přehledový článek v časopise s IF

- Gallo, J., **Vaculova, J.**, Goodman, S. B., Kontinen, Y. T., Thyssen, J. P. (2014). Contributions of human tissue analysis to understanding the mechanisms of loosening and osteolysis in total hip replacement. *Acta biomaterialia*, 10(6), 2354-2366. (IF 2014: 6.025)

Původní práce v časopise s IF

- **Vaculova, J.**, Gallo, J., Hurník, P., Motyka, O., Goodman, S. B., Dvorackova, J. (2017). Low inpatient variability of histomorphological findings in periprosthetic tissues from revised metal/ceramic on polyethylene joint arthroplasties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, přijato k tisku. (IF 2016:3.189)
- **Vaculová, J.**, Hurník, P., Gallo, J., Žiak, D., Motyka, O. (2018). Imunohistochemický průkaz mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních asepticky uvolněných endoprotéz. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, přijato k tisku. (IF 2016: 0.560)

Přehledná vědecká práce v ostatních recenzovaných časopisech

- Perino, G., Sunitsch, S., Huber, M., Ramirez, D., Gallo, J., **Vaculova, J.**, Natu, S., Kretzer, J. P., Müller, S., Thomas, P., Thomsen, M., Krukemeyer, M. G., Resch, H., Huegle, T., Waldstein, W., Boettner, F., Gehrke, T., Sesselmann, S., Ruther, W., Xia, Z., Purdue, E., Krenn, V. (2018). A Diagnostic Approach for the Histological Particle Algorithm in Periprosthetic Neo-synovial Tissue. *BMC Clin Pathol* (zatím nepublikováno).

Prezentace a články ve sbornících

- **Vaculová, J.**, Hurník, P., Žiak, D., Gallo, J., Horáček, J., Dvořáčková, J. (2015). Morfologická charakteristika a klasifikace tkáňové odpovědi aseptického uvolnění totálních endoprotéz kyčle a kolene. Cyto-morfologický den LF OU Ostrava 9.10.2015, Sborník ISBN 978-80-7464-771-0.
- **Vaculová, J.**, Hurník, P., Motyka, O., Gallo, J., Žiak, D., Dvořáčková, J. (2016). Morfologická variabilita periprotetických tkání. III. Klinicko-morfologický den, Ostrava 31.5.2016. Sborník Morfologie v Čechách a na Slovensku, Sborník ISBN 978-80-7464-813-7.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat

Review

Contributions of human tissue analysis to understanding the mechanisms of loosening and osteolysis in total hip replacement

Jiri Gallo^{a,*}, Jana Vaculova^b, Stuart B. Goodman^c, Yrjö T. Konttinen^{d,e,f}, Jacob P. Thyssen^g^a Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital, Palacky University Olomouc, Czech Republic^b Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Czech Republic^c Department of Orthopaedic Surgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA^d Institute of Clinical Medicine, Department of Medicine, HN-00029 HUS, Finland^e ORION Orthopaedic Hospital of the Invalid Foundation, Helsinki, Finland^f COXA Hospital for Joint Replacement, Tampere, Finland^g Department of Dermatology and Allergy, Copenhagen University, Hospital Gentofte, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2013

Received in revised form 1 February 2014

Accepted 3 February 2014

Available online 10 February 2014

Keywords:

Aseptic loosening

Osteolysis

Total hip

Tissue analysis

Immunostaining

ABSTRACT

Aseptic loosening and osteolysis are the most frequent late complications of total hip arthroplasty (THA) leading to revision of the prosthesis. This review aims to demonstrate how histopathological studies contribute to our understanding of the mechanisms of aseptic loosening/osteolysis development. Only studies analysing periprosthetic tissues retrieved from failed implants in humans were included. Data from 101 studies (5532 patients with failure of THA implants) published in English or German between 1974 and 2013 were included. "Control" samples were reported in 45 of the 101 studies. The most frequently examined tissues were the bone-implant interface membrane and pseudosynovial tissues. Histopathological studies contribute importantly to determination of key cell populations underlying the biological mechanisms of aseptic loosening and osteolysis. The studies demonstrated the key molecules of the host response at the protein level (chemokines, cytokines, nitric oxide metabolites, metalloproteinases). However, these studies also have important limitations. Tissues harvested at revision surgery reflect specifically end-stage failure and may not adequately reveal the evolution of pathophysiological events that lead to prosthetic loosening and osteolysis. One possible solution is to examine tissues harvested from stable total hip arthroplasties that have been revised at various time periods due to dislocation or periprosthetic fracture in multicenter studies.

© 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is estimated that about two million total hip arthroplasties (THAs) are performed worldwide each year and projections of rising demand are reported at least for the USA [1]. However, some THAs fail during the period of service and require revision surgery, which is more expensive than the primary operation and brings less satisfactory outcomes and increased risk for complications [2,3]. This causes a significant economic impact on the health care system. Therefore, understanding current failure mechanisms of primary THAs and especially the potential for prevention are crucial.

Although instability, infection, pain and periprosthetic bone fractures prevail as reasons for reoperation in the first five years after an index surgery, the most frequent cause of late failure is

aseptic loosening accompanied by osteolysis [4]. Since the pioneering work of Willert et al. [5,6], there has been a tendency to associate these late complications with a local tissue response to large numbers of tiny particles generated from bone cement and articulating/non-articulating surfaces of THA. Small particles are phagocytosed by macrophages or stimulate cells in a non-phagocytic manner. These cells then release pro-inflammatory molecules that trigger pathways influencing the osteoclast-osteoblast coupling in bone multicellular units [7,8]. Particle-associated dysregulation of osteoclast-osteoblast coupling in favor of osteoclasts over-weight leads eventually to net bone resorption at the bone-implant interface. In support of this concept, studies have demonstrated inflammatory and osteolytic responses after cell/organ culture stimulation by polymethylmethacrylate, polyethylene and titanium particles [9–15].

Immediately after the surgery, mechanical factors influence the development of the bone-implant interface. These are associated with intermittent loading of the artificial hip during daily living

* Corresponding author. Tel.: +420 588 443548; fax: +420 588 44548.

E-mail address: jiri.gallo@volny.cz (J. Gallo).

activities, and later with hydrodynamics of the artificial joint fluid creating significant pressures in the adjacent tissues. From some time postoperatively, biological and mechanical pathways interact together, creating conditions appropriate to periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. We have previously described these processes in detail [16,17]. Here, we summarize current evidence derived from analyses of tissues retrieved during the reoperation of THA performed due to aseptic loosening and periprosthetic osteolysis.

2. Search strategy and rules for evaluation

We included all research studies that examined human periprosthetic tissues retrieved either during the THA surgery or post-mortem using histopathological examination and immunostaining. Further, we used articles and resources focusing on this issue. One of the authors (J.V.) searched for potentially relevant studies in the PubMed database. Articles published between January 1974 and June 2013 were identified with the keywords and medical subject heading terms “aseptic loosening” and “periprosthetic osteolysis” and “total hip arthroplasty” and “bone loss” or “immunohistochemistry” or “cytokines” or “RANKL” or “hypersensitivity” or “apoptosis” or “interleukin” or “infection”. We reviewed all of the retrieved articles and extracted relevant data, which we incorporated in tables in the Excel 2010 software package (Microsoft). Although 223 articles were identified, 82 were excluded (Table 1, Fig. 1) because they lacked data about histopathological examination of retrieved tissues. In agreement with recent requirements for research in biomedicine, data should be considered preliminary until replicated by a different center. Therefore, all molecules, pathways and cell groups reported only in an initial histopathological study were stated as being preliminary, while those also featuring in a replication study were considered as proven.

3. Results

Data from 101 studies (5532 patients with failure of THA implants) published between 1974 and 2013 were included. “Control” samples were reported in 45 of the 101 studies.

3.1. Methods used for investigation of periprosthetic tissues

The retrieved tissues (or derived cell/organ cultures) were studied histologically and histochemically, especially using immunostaining or molecular biology methods. Another set of methods aimed to detect the prosthetic particles. The aims of all of these investigations were: (i) to distinguish between septic and aseptic THA failures; (ii) to detect prosthetic by-products in periprosthetic tissues; (iii) to analyze cell/tissue structure; and (iv) to detect the signaling proteins and proteolytic enzymes in the periprosthetic tissues.

Table 1
The sample size of studies.

No. of patients	No. of studies
<20	55
21–50	20
51–100	9
101–150	5
151–200	5
201–300	2
301–551	3

3.2. Protocols for tissue processing

Some authors examined results from cell/organ cultures derived from periprosthetic tissues [18–22], but their results were excluded because we focused on direct histopathologic examinations of the periprosthetic tissues. These were processed post-operatively using approximately 5–6 μ m thick frozen tissue sections (41 of 101 studies) or 3–10 μ m thick paraffin-embedded tissue sections (45/101), or both methods (10/101). Methylmethacrylate-embedded sections were used in seven studies [5,23–28], and a further two studies did not report the methodology [29,30]. Mostly, the sections were cut from periprosthetic tissues fixed immediately after harvesting in 10% buffered formalin and then embedded in paraffin (formalin fixed, paraffin embedded; FFPE), or were prepared as freshly frozen sections in the cryostat. The sections were stained for comprehensive microscopic evaluation after hematoxylin–eosin staining. For precise demonstration of the specific molecular components within the cells and in the proper tissue context, special histological stains (Table 2) and immunostains were used (Figs. 2 and 3).

Different staining methods and molecular and cellular biology techniques were used. The most frequently used methods capable of identifying specific RNA or DNA molecules are polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization (ISH). Some authors also used PCR to detect bacterial DNA, or inflammatory cytokines and other mediators. In most cases, the results from the molecular biology methods were compared to immunostaining of the same tissue samples [31,32].

Immunostaining can specifically identify categories of cell lineage and their regulatory molecules (proteins), and detect the presence of specific antigens in cells with high sensitivity. The immunostains used were based on the reaction between antigen and primary and secondary antibodies, with one of them being labeled with an enzyme (horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, biotin), the fluorophore fluorescein isothiocyanate [33,34] or tetramethylrhodamine isothiocyanate [34].

Immunoenzyme protocols with many different principles were applied for antibody-aided detection, including: (i) the avidin–biotin complex method [19,25,35–51]; (ii) the labeled streptavidin–biotin method [32,33,52–59]; and (iii) the polymer-based detection method [60–67]. The presence of antigen was most often visualized by chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride, which produces a brown reaction that can be seen with a light microscope. Occasionally, a fast red TR salt [35], aminoethylcarbazole [38] or fuchsin [39,52], giving a red stain, or chromogen, with the blue-colored precipitate nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate [41], was used. Finally, sections were counterstained with hematoxylin prior to mounting.

In some cases, double immunostains were used, which can identify two sets of antigens in the same section when the antibodies are applied in sequence or at the same time. Some authors followed an immunofluorescence staining protocol [38,40,50,61,68], while others preferred antigens labeled by enzymes [38,48,50,61,68,69].

Histological analysis was mostly carried out at 2–500 \times magnification, using a light or fluorescence microscope. Polarized light, electron or transmission electron microscopy was used to identify various sizes of wear particles and the intracellular pathology induced by prosthetic by-products [70]. Polyethylene wear debris is strongly birefringent in polarized light, unlike ceramic or metal particles.

3.3. Distinction between aseptic and septic failure

This analysis is based on the detection of the number of polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PMNs) in the examined

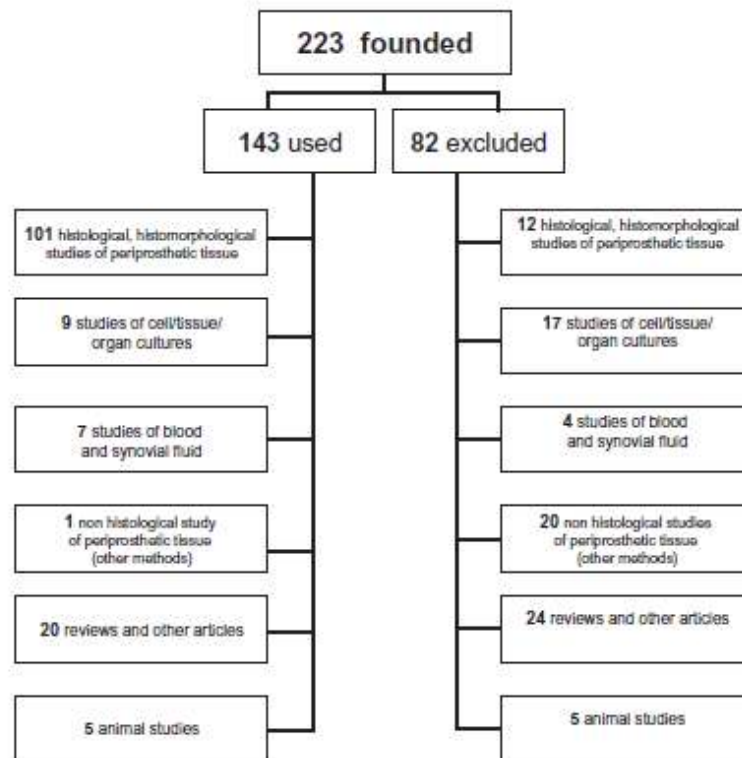


Fig. 1. Flowchart of the methodology of the study.

Table 2
Special histological stains.

Special stain	To demonstrate
Fite	microorganisms [30]
Gram	microorganisms [74,77–80]
Gomori	fungi [30]
Giemsa	mast cells, parasites, fungi, wear particles [122,127,128]
Grocott	microorganisms [70]
Masson's trichrome	collagen [24]
Oil red O	lipid and wear particles [90]
PAS reaction	mucin, basement membrane, fungi, inclusions [70,72,92,127,134]
Pearl's reaction	hemosiderin, wear particles [30,92,112,122,127,134]
Sudan III	lipid and wear particles [5,90]
Toluidin blue	mast cells [74,90]
Van Gieson	elastic fibers and collagen [5,92,113,122,127]
Ziehl–Neelsen	mycobacteria [70]

tissues. The higher the number of PMNs observed, the higher the probability that the examined tissue is affected by infection. Generally, the minimum criterion for infection is more than five PMNs in five separate high-power fields, using 400 or 500 \times magnification [71]. Others have proposed a criterion of 23 PMNs in 10 high-power fields [72]. In fact, the key prerequisite for accurate interpretation is a very experienced pathologist, ideally blinded.

To identify PMNs, routine hematoxylin–eosin staining (of polymorphic nuclei) and immunostains using CD15 are performed on FFPE or frozen sections. Using the classification system of Morawietz et al. (Table 3) [56], analysis of frozen sections has a high correlation to results from FFPE specimens [73]. Hence, the

intraoperative histological analysis of frozen sections is recommended as a valid diagnostic tool for the prompt confirmation of infection [74–76]. Although sensitivity of frozen sections can vary, the specificity of intraoperative examination is excellent [73,75,76]. In addition, a number of studies examined the contribution of Gram staining to the diagnosis of prosthetic joint infection [77,78]. However, the evidence for the routine use of this method is limited [79,80].

Some investigators have shown that “particle disease” is more likely when bacterial molecules are absorbed on the prosthetic particles [81]. Participation of bacterial substances in the processes of aseptic loosening can be demonstrated either by finding these products (e.g. teichoic acids, endotoxins, protein A) or signs of a bacteria-specific host response in periprosthetic tissues. In favor of this hypothesis, several studies have shown bacterial by-products, including bacterial DNA, in periprosthetic tissue homogenates [82]. Additionally, septic membranes have a significantly higher number of CD45+ leukocytes, while aseptic membranes show a preponderance of CD68+ macrophages and histiocytes [57,69]. However, tissues with low-grade infection can appear like tissues retrieved from patients with aseptic loosening.

Bacteria and bacterial products have been found to cause up-regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK-M), which regulates toll-like receptor (TLR) signaling [51]. Several studies show that TLRs, sensors for detection of bacteria, are activated in periprosthetic tissues [57,83]. However, microbe-oriented sensors like TLRs, nucleotide-binding oligomerization-domain protein-like receptors, RIG-like receptors and AIM-2-like receptors are stimulated not only by exogenous pathogens, but also by intrinsic signals of tissue/cell damage serving generally as inducers of

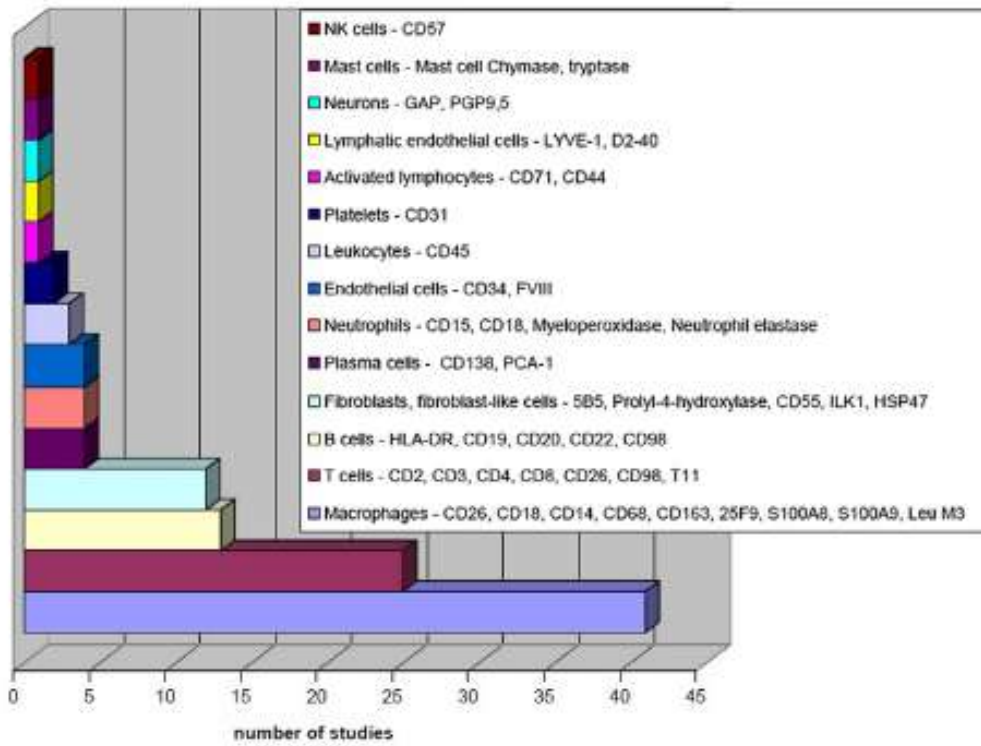


Fig. 2. Cell types identified by immunostains.

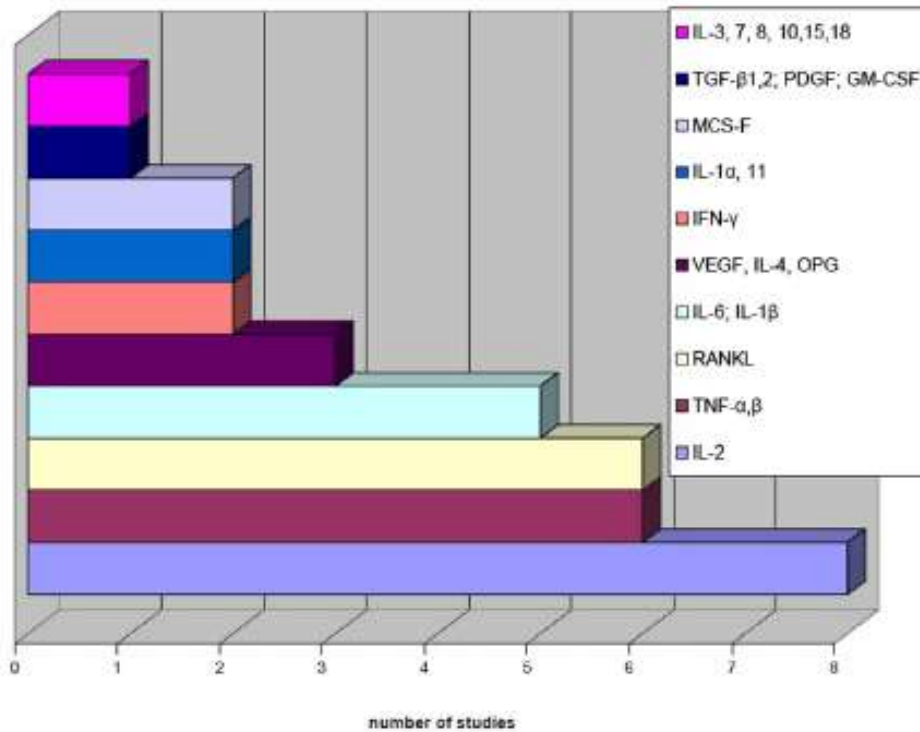


Fig. 3. Studies focused on cytokines produced by harvested tissues.

Table 3
Histopathological classification of synovial-like interface membrane.

Moravietz et al. [56]		Krenn et al. [108]: the revised classification with the additional pathologies	
Type I Wear particle induced	<ul style="list-style-type: none"> - abundance of macrophages and multinuclear giant cells - rarely lymphocytes 	Allergic alteration	<ul style="list-style-type: none"> - lymphocytic infiltration - positive allergy tests
Type II Infectious type	<ul style="list-style-type: none"> - activated fibroblasts, proliferation of small blood vessels, oedema - abundance of neutrophilic granulocytes - plasma cells 	Type I Wear particle induced	<ul style="list-style-type: none"> - abundance of macrophages and multinuclear giant cells - rarely lymphocytes - wear debris, metal on metal implant
Type III Combined type	<ul style="list-style-type: none"> - combination of the histomorphological changes in types I and II 	+Necrosis	<ul style="list-style-type: none"> - activated fibroblasts, proliferation of small blood vessels, oedema - abundance of neutrophilic granulocytes - plasma cells
Type IV Indeterminate type	<ul style="list-style-type: none"> - connective tissue rich in collagen fibers - fibrin or fibroblasts and macrophages sometimes on the membrane surface 	Type II Infectious type	<ul style="list-style-type: none"> - combination of the histomorphological changes in types I and II - connective tissue rich in collagen fibers - fibrin or fibroblasts and macrophages sometimes on the membrane surface
		Type III Combined type	
		Type IV Indeterminate type	<ul style="list-style-type: none"> - fibrosis and β-catenin positivity
		Implant-associated arthrofibrosis	
		Osseous pathologies	<ul style="list-style-type: none"> - osteomyelitis, osteonecrosis, ossification, osteopenia

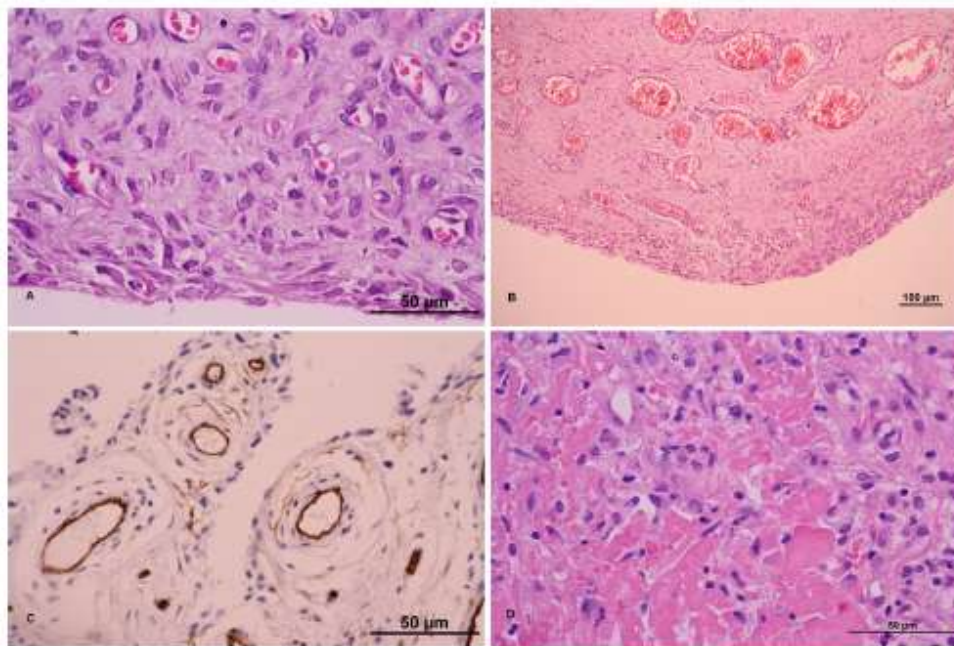


Fig. 4. (A) Hyperplasia of synovial membrane, fibroproliferative changes in subsynovial stroma, reactive neovascularization; hematoxylin and eosin (H&E); $\times 1000$. (B) "Neovascularization" in the synovial membrane; H&E; $\times 200$. (C) Highly vascularized synovial membrane; CD34-positive vessels; $\times 1000$. (D) Fibroproliferative changes with fibrinoid degeneration of connective tissue; H&E; $\times 1000$. (E) Synovial-like cells containing metallic debris; H&E; $\times 1000$. (F) Nodular hyperplasia with reactive changes; vimentin-positive mesenchymal cells; $\times 200$. (G) Reactive changes with macrophages containing granules of exogenous material; CD68; $\times 600$. (H) Lymphocytic infiltration typical for chronic inflammatory changes around an implant; H&E; $\times 1000$. (I) Bone covered by osteoblasts and osteoclasts with multiple nuclei; HE; $\times 200$. A scale bar of 50 or 100 μm is included in each particular figure. Sources of figures: (A–H) Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Czech Republic; (I) Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital, Palacky University Olomouc, Czech Republic.

inflammation [84]. The detection of specific antibacterial proteins secreted by innate immunity cells after contact with bacteria seems to be a promising approach [85,86].

However, to date, no one study has analyzed the microbe-specific responses in aseptic periprosthetic tissues in detail. As a result, the histological evidence of the participation of bacteria in aseptic loosening and periprosthetic osteolysis is still considered insufficient.

3.4. Evidence for aseptic inflammatory response

Local tissue resident cells orchestrate the tissue response to prosthetic by-products via regulation of macrophage polarization into an M1 or M2 phenotype, and balance between fibrocytes and fibroblasts [16,87]. The foreign body response to wear debris and the abundance of macrophages and giant cells show a direct relationship to the degree of bone resorption [37,42,88].

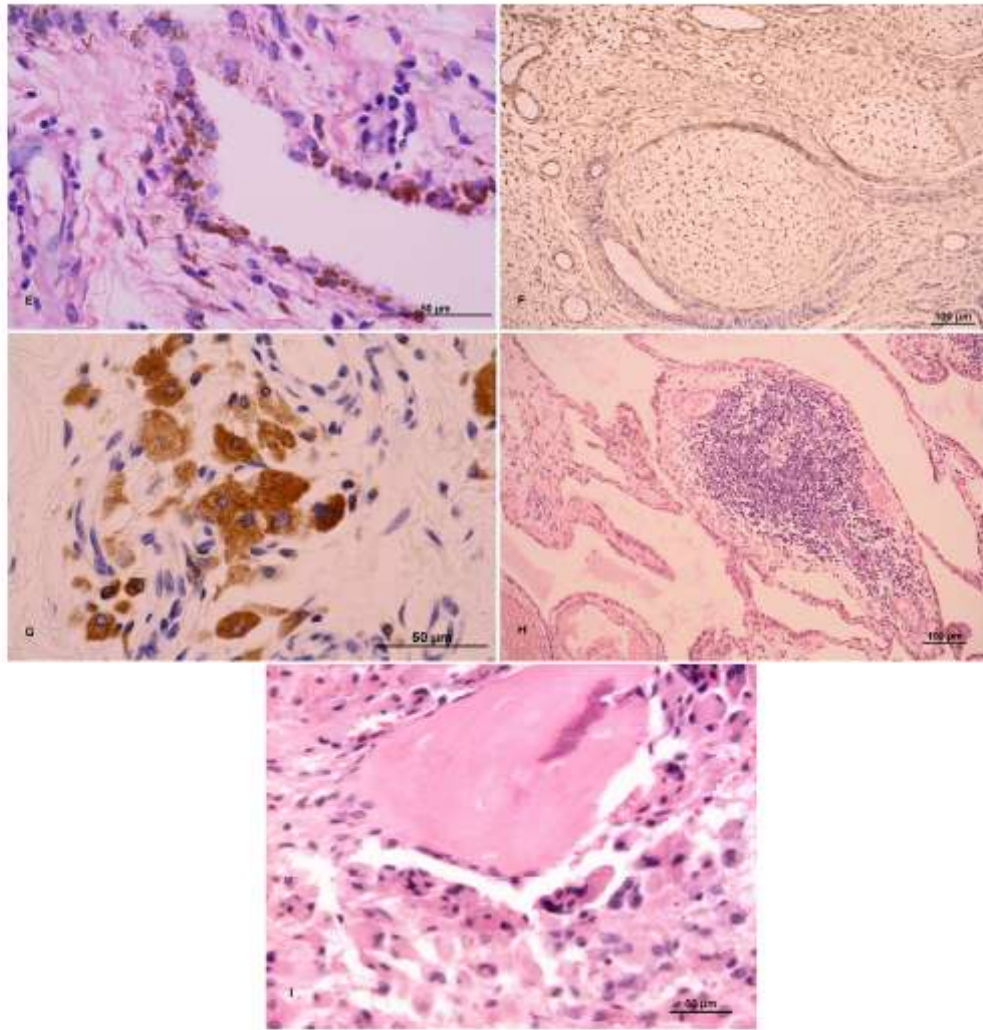


Fig. 4 (continued)

Polyethylene particles smaller than 5–7 μm can be observed within macrophages [42,47], while larger particles induce a foreign body giant cell reaction – with the amount of particles correlating with the number of foreign body giant cells [19,32]. Generally, tissues with increased numbers of wear particles have the appearance of foreign body granuloma [19,66,69,88,89].

Samples from osteolytic tissue show higher proliferative cellular responses, including predominantly macrophages, fibroblasts, highly vascularized fibrous tissue with rare occurrence of PMNs (Fig. 4) and high expression of inflammatory cytokines [37,43,88,90,91]. Histological findings show various differences in the profiles of cell populations and biological mediators dependent on the type of fixation and articulation bearings (Table 4), which may reflect different mechanisms of aseptic loosening and osteolysis [92–95]. The amount and distribution of T cells, and their specific role in aseptic loosening, were explained by the cytokines which they produce, the most important ones being interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-17. However, the former can also be

produced by other cells, such as natural killer T cells [39], and IL-17A and IL-17F are also produced, for instance, by mast cells [96]. Much less is known about the other important cell types, such as fibroblasts [97], mast cells [44,90], eosinophils, platelets, adipocytes, vascular endothelial cells [98], lymphatics [60] and neurons [99]. Several histological studies show that fibroblasts release similar factors as macrophages [32,41,42,48,50,63,100,101].

Periprosthetic tissue was found to express increased levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [18,42,88,102]. The most commonly observed cytokines expressed in periprosthetic tissue are IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Some studies showed high levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and other mediators of inflammation in periprosthetic tissues [40,66]. Also investigated were regulators of tissue homeostasis participating potentially in development of osteolysis and aseptic loosening, such as vascular endothelial factors, IL-10 or transforming growth factor (TGF)- β [95,103–106].

Table 4
Histopathological differences associated with type of prosthesis.

Type of fixation	Articulation surface	
cemented [18,24,35,41,42,48,50,52,62,74,77,82,90,91,100,106,120]		– abundance of macrophages, greater histiocytic reaction – well-developed synovial-like interface membrane – wear debris – organized fibroblastic tissue – fibroblasts forming bundles or sheets associated with collagen fibrils
cementless [28,40–42,47,52,61,62,66,74,82,88]		– more ulcerated, granulomatous pseudotumors and connective tissue necrosis – perivascular and diffuse lymphocytic infiltration – predominantly T lymphocytes – macrophages phagocytosing metallic wear-debris particles – predominantly histiocytic inflammation, loose connective tissue, fibrous and synovial cells
metal-on-metal [29,30,47,70,92,93,89,104,111,113,122,127,128,130–132,134]		– necrosis, abundance of macrophages, neutrophils and lymphocytes – particles in agglomerates – lower degree of diffuse perivascular lymphocytic infiltration than in metal on metal bearing – extensive necrosis
metal-on-polyethylene [38,63,93,94,133,135]		
ceramic-on-ceramic [58,94,112]		
ceramic-on-polyethylene [92,132]		

Importantly, it was shown how wear debris up-regulates IRAK-M, which plays a critical role in innate immunity and the down-regulation of foreign body reactions [51].

In aseptic loosening, a periprosthetic membrane develops at the interface between the implant and the bone bed. A wide variation was observed in the macroscopic appearance of this membrane. Many authors use the term “synovial-like interface membrane” (SIJM), while others prefer the term “granulomatous tissue” [18,107,108]. The term “synovial-like” simply refers to the presence of synovial lining on the interface membrane as a result of the expansion of the “effective joint space” [26]. Hyaluronan-containing synovial fluid induces a connective tissue synovial lining composed of macrophage-like type A cells and fibroblast-like type B cells [25]. The synovial-like membrane has a villous architecture and contains three distinct zones: first, a layer adjacent to the implant consisting of synovial-like cells supported by fibrovascular tissue; second, a vascular layer composed of dense fibrous tissue with sheets of activated macrophages, foreign body giant cells, polymorphonuclear leukocytes and a large accumulation of wear debris; and third, the poorly vascularized fibrous layer adjacent to the bone, in part covered by osteoclasts and osteoblasts, and showing signs of accelerated bone remodeling [42,90,109,110].

Together, these observations provide strong evidence that macrophages and fibroblasts orchestrate inflammatory, immunomodulatory and osteolytic pathways, leading to the formation of chronic fibrosis and periprosthetic osteolysis in aseptically loosened THA. Histopathological studies have demonstrated a number of factors typical of chronic inflammation and fibrosis, including chemokines, cytokines, nitric oxide metabolites and metalloproteinases.

3.5. Influence of biomaterial combinations on histology of periprosthetic tissues

A number of studies investigated the specific biomaterial-dependent variability in the periprosthetic tissues trying to clarify how the type of prosthetic particles or ions (in the case of metal components) influences the structure of periprosthetic membranes [18,24,93,94,109,111–114]. However, the answer to this question is not straightforward because the status of periprosthetic tissues at the time of revision is not simply a function of the prosthetic particles [16]. There is some evidence for the difference between polyethylene-on-zirconia-, CoCr-on-CoCr- and ceramic-on-ceramic-bearing materials not being substantial 1 year after surgery [67]. However, with the amount of particles and tissue damage growing with time after surgery, a slightly wider spectrum of histological findings has been observed even with identical implants and in different areas of individual patients [100,115].

Undoubtedly, the “non-material” characteristics of the particles (their size, number, shape, charge, etc.) play a key role in the development of histological findings, together with other factors not related to biomaterial particles, like the stability of an implant, parameters of the effective joint space, the volume of joint fluid and its pressure patterns [116,117]. In relation to the latter, the synovial lining layer develops at the sites in contact with fluid and/or relative motion. Taken together, tissues retrieved during revision arthroplasty exhibit a relatively limited macroscopic variability, at least in terms of tissue color (basically metallic vs. non-metallic), tissue consistency (ranging from rigid firm fibrotic to soft fragile tissue) and volume (atrophy vs. abundant hypertrophic periprosthetic tissues). In this line, histopathological studies have revealed a trend suggesting that there could be differences associated with particular biomaterial combinations in terms of inflammatory response (in relation to the presence of specific cell populations, mediators, etc.), type of fibrosis, extent of tissue necrosis or presence of apoptotic events (Table 4). For example peri-implant tissues from cemented THA (a polyethylene cup and a stainless steel or CoCr alloy stem) often consist of a dense fibrotic tissue with variable areas of necrosis. With regard to the cellular profile, macrophages predominate, together with fibroblasts and myofibroblasts, followed by the scattered to frequent presence of foreign body multinuclear cells and perivascular infiltrates of lymphocytes [5,110]. Membranes retrieved from uncemented CoCr or titanium alloy femoral components are very similar. Both types of membrane were composed of a dense fibrous tissue stroma with a moderate to large number of macrophages and fibroblasts [90,109]. This is due at least in part to very similar bearing materials (here metal on polyethylene). Ceramic-on-ceramic THAs exhibit very low wear rates, and ceramic wear particles also have much lower specific and functional biological activity than polyethylene particles [118]. Therefore, under normal conditions (i.e. without gross surface damage or fracture of ceramic components associated with metallosis), membranes taken from loosened ceramic-on-ceramic THA are generally hypotrophic in comparison to the former ones and contain decreased numbers of macrophages and lymphoplasmacytic cells, with the scattered presence of foreign body multinuclear cells [94,112]. Adverse reaction to metal particles/ions is described elsewhere in this review.

3.6. Significance of necrosis/apoptosis ratio around aseptically failed THA

Apoptosis can contribute to the resolution of inflammation, the normalization of tissue turnover and the processes of cell renewal accompanying tissue proliferation [69,84]. In contrast, insufficient

and eventually in implant loosening is currently unclear. Metal ions, or haptens such as acrylates, primarily form covalent bonds between the electrophilic components of the hapten and the amino acid nucleophilic side chains of the target proteins. This complex then binds to the surface of dendritic cells, which migrate to the draining local lymph nodes via the lymphatic vessels and present the antigen to T cells, leading to sensitization [125]. Memory T cells then migrate back to the site of the implant and cause an immune reaction, in particular with (antigen-responsive) lymphocyte infiltrates in the deep fibrous tissue and high endothelial venules for lymphocyte recruitment from the circulation [39,111,122,126–128]. Pertinently, direct non-peptide-dependent activation of TLRs can also occur with some metals [129]. If this lymphocyte-mediated hypersensitivity response occurs in peri-implant tissues, which are already affected by a chronic foreign body reaction, multinuclear foreign body giant cells or granulomas can also be seen [123]. The typical histopathological picture in metal-on-metal arthroplasties demonstrates a layer of fibrin on the synovial lining, granulomatous inflammation and connective tissue necrosis [111,130,131]. The widespread infiltration in areas of tissue necrosis has been described as adverse reactions to metal debris – metallosis participating at least partially in the development of pseudotumors [30,132].

Key cell populations associated with hypersensitivity include lymphocytes and dendritic cells. The presence of large numbers of lymphocytes forming perivascular cuffs and synovial ulceration is called lymphocytic vasculitis-associated lesion (ALVAL), and demonstrates a lymphocyte-dominant delayed-hypersensitivity-type immunopathological reaction. The highest ALVAL score is found in association with suspected metal hypersensitivity [29,111,132]. The diffuse perivascular lymphocytic infiltration is associated with the presence of visible metal particles and aseptic loosening [89,133]. Importantly, cell-mediated immune responses have not been confirmed to be involved in aseptic loosening in metal-on-polyethylene THAs [59,91]. Other cell groups participating in tissue hypersensitivity are mast cells and eosinophils. The former were detected in periprosthetic tissues less frequently compared to in control knee synovium, despite their being more often degranulated in aseptic loosening [44]. However, mast cells play a role in immediate type I hypersensitivity reactions, which are characterized by Th2 skewing of the immune system, as seen in the atopic disorders.

In summary, the concept of local hypersensitivity remains to be proved in prospective studies with greater numbers of patients with aseptic loosening of different implants. In addition, rigorous standardized rules for tissue processing and interpretation of immunostainings have to be established [108]. Notably, metal hypersensitivity can be a secondary phenomenon due to inflammation-based corrosion of the metal alloys.

3.9. Limitations of histopathological studies of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis

The obvious limitations include the origin and location of tissue samples, the size of the observed groups, their homogeneity, at least in terms of age, gender, primary diagnosis, type of implant and type of samples (pseudosynovial, interface membrane, osteolytic tissue, etc.), and the lack of appropriate control groups. The control samples involved in almost all studies are synovial tissues from primary osteoarthritis taken before THA/total knee arthroplasty surgery, rarely synovial tissue from around a well-fixed THA, tissues from mandibular or maxilla fractures or biological ingrowth membranes [27,31,38,40,41,48,50,52,53,66,68,88,90–92,101,106,134]. The periprosthetic tissue from deceased patients with THA was also used [5,23,24,61–63,130].

One important factor potentially influencing the results from tissue analysis is the location of the harvested specimen [115]. Some studies report an increased cellular response in synovial-like membrane of periprosthetic tissue and suggest that SLIM is the best material available for histopathological analysis [50,73]. However, some studies show that there is a large variability within the sampled tissues even when the same kind of retrieved tissue is sampled [42,115,135]. Discrepancies may be even in the single sample [42]. This points to the vast diversity in the process of aseptic loosening even in a single patient, at least in terms of the cell types and numbers present and the different levels of activation among cells, which may represent different stages of loosening in different topological areas.

The process of harvesting tissue and the type of fixation play crucial roles in the results of the diagnostic methods involved [136–138]. The samples used for immunostaining may be frozen and paraffin-embedded sections harvested right at the time of surgery. Although FFPE sections are suitable for immunohistochemical analysis of most antigens, many authors prefer snap-frozen cryostat sections [25,33,35,37–44,48,50,54,64,88,91,98,100,101,106,115,126,139]. The preparation of fresh-frozen sections takes less time than FFPE sections; moreover, the technique of processing is simpler and the activity and epitope of antigens is better preserved. However, the use of frozen sections also has disadvantages: (i) the tissue morphology is not as clear as it is in the FFPE section; (ii) the fresh tissue for other diagnostic purposes must be stored, preferably at $-70/80^{\circ}\text{C}$; and (iii) freezing must be done very rapidly to minimize the formation of ice crystals. Immunostaining of FFPE samples after defrosting may show incorrect results and is of low histomorphological value. The tissue to be processed as an FFPE sample must be fixed in buffered formalin immediately after harvesting. The advantages of FFPE sections are: (i) applicability to routinely processed material, even if it is stored for long period; (ii) possibility of correlation with the morphologic parameters; and (iii) workability even in decalcified material (bone).

The critical factor for the interpretation of the results of immunostaining is their validity and verification of antibody specificity and sensitivity [136,137,140]. Despite the high popularity of immunostaining, there are also potential limitations with respect to limited availability of some sensitive or specific antibodies to the required antigens [136,137]. These may be demonstrable by PCR or ISH. Therefore, molecular techniques can provide superior diagnostic information and should be used together with immunostaining.

The results of immunohistochemical staining are mostly reported qualitatively, though some specific antibodies and numerous regulatory molecules require quantitative analysis [141,142]. Even though well-established criteria often exist for characterization of individual cells under light microscopy, inter-individual variation is also of concern. Computer-assisted analysis of digital images might prove to be more reliable [141–143].

3.10. Directions of future research

On the basis of the above limitations, one may speculate that further models of the bone-implant interface and periprosthetic tissues may be more descriptive of the mechanical and biological processes responsible for integration and loosening of THA in humans.

The clinical criteria for inclusion and exclusion of surgical cases and specimens need to be further defined. Other factors contributing to aseptic loosening, such as mechanical factors and/or implant deficiencies, must be elucidated. The key problem lies in the complexity of THA because a number of patient-, surgery- and implant-related variables could potentially influence the stability of the

THA, making the interpretation of the cause of failure difficult in an individual case.

Further progress in developing valid control groups is needed. Samples from all patients with functional and stable THA could be collected and offered for research, for instance, via international collaboration (analogous to a tissue bank). If possible, samples should be collected from both capsular and interface membranes. Perhaps the optimal method for archiving of periprosthetic tissues is deep-freezing, for future distribution to specialized centers of excellence.

Research in fields related to material science, biochemistry, physiology, and cellular and molecular immunology could stimulate further investigation of periprosthetic tissues in terms of target cells, pathways and proteins. For instance, there is a lack of information on the role of fibroblasts, mast cells, dendritic cells and osteocytes, as well as lining cells of pseudosynovial membrane in periprosthetic tissue homeostasis and aseptic loosening.

The role of hypersensitivity and adverse tissue reactions to metal debris in aseptic loosening needs further investigation. First, it is necessary to identify the mechanisms of tolerance to metallic implants induced in most patients with THA. Secondly, the evaluation of hypersensitivity reactions should be based on more specific morphologic criteria, using immunostaining and the analysis of lymphocyte donality and specificity and their cytokines. There is a need to clarify the role and presence of lymphocytes, their subsets and products. The relationship between delayed lymphocyte-mediated hypersensitivity reactions and *in vivo* and *in vitro* allergy tests, such as cutaneous skin patch tests (eliciting skin induration/lymphocyte infiltrates and erythema) or the ELISPOT test of peripheral blood lymphocytes (production of IFN- γ or other relevant cytokines), upon exposure to specific metals is extremely controversial. More definitive proof would require the demonstration of an oligoclonal (antigen- or allergen-driven) lymphocyte activation pattern locally in peri-implant tissues without any *in vitro* cellular expansion. This could be used to demonstrate discriminative antigen-driven local expansion of antigen-specific T cells *in situ*.

4. Conclusion

Histology and immunostaining of periprosthetic tissue have contributed significantly to the knowledge of the mechanisms of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis. The key role of innate immunity sentinel cells and their receptors has emphasized the host response to prosthetic by-products and subsequent tissue damage. Histology and immunostaining also contribute to the understanding of the mechanisms of prosthetic integration vs. the adverse outcomes associated with chronic inflammation, fibrosis and allergy in the processes of periprosthetic tissue maladaptation.

Limitations of histological analysis of retrieved periprosthetic tissues include: (i) the heterogeneity in patient, surgeon and implant characteristics; (ii) the inability to harvest tissues at different stages of tissue maladaptation before aseptic loosening; (iii) the lack of standardized sampling and processing methodologies; and (iv) the absence of true control tissues (tissues loaded by implant-related signals but without even early signs of tissue maladaptation). Further research in multiple specialized collaborative centers could address these issues more effectively.

Conflict of interest statement

The work has not been supported by commercial sources and we are not aware of any potential conflict of interests.

Acknowledgements

We apologize to many authors whose important works could not be cited owing to space limitations. Funding was obtained from the Czech Ministry of Health (IGA MZ CR NT/11049).

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Figs. 2–4, are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.003>

References

- [1] Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat E, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* Vol 2007;89:780–5.
- [2] Vanhegan IS, Malik AK, Jayakumar P, Ul Islam S, Haddad JS. A financial analysis of revision hip arthroplasty: the economic burden in relation to the national tariff. *J Bone Joint Surg Am Br* Vol 2012;94:619–23.
- [3] Patel S, Garbuz DS, Greidanus NV, Masri BA, Duncan CP. Quality of life outcomes in revision vs primary total hip arthroplasty: a prospective cohort study. *J Arthroplasty* 2008;23:550–3.
- [4] Inacio MC, Ake CE, Paxton EW, Khatod M, Wang C, Gross JP, et al. Sex and risk of hip implant failure: assessing total hip arthroplasty outcomes in the United States. *JAMA Intern Med* 2013;173:435–41.
- [5] Willert HG, Ludwig J, Semlitsch M. Reaction of bone to methacrylate after hip arthroplasty: a long-term gross, light microscopic, and scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* Vol 1974;56:1368–82.
- [6] Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1977;11:157–64.
- [7] Gallo J, Raska M, Mracek F, Petrek M. Bone remodelling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. *Physiol Res* 2008;57:329–49.
- [8] Chen X, Bai C, Xie L, Zhang Y, Wang K. Inflammatory response to orthopedic biomaterials after total hip replacement. *J Orthop Sci* 2012;17:407–12.
- [9] Yang SY, Yu H, Gong W, Wu B, Maydon L, Costello K, et al. Murine model of prosthesis failure for the long-term study of aseptic loosening. *J Orthop Sci* 2007;25:603–11.
- [10] Green TR, Fisher J, Matthews JB, Stone MH, Ingham E. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by *in vitro* clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res* 2000;53:490–7.
- [11] Huang Z, Ma T, Ren PG, Smith RL, Goodman SB. Effects of orthopedic polymer particles on chemotaxis of macrophages and mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res, Part A* 2010;94:1264–9.
- [12] Ingham E, Green TR, Stone MH, Kowalski R, Watkins N, Fisher J. Production of TNF- α and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials* 2000;21:1005–13.
- [13] Ma GK, Chiu R, Huang Z, Pearl J, Ma T, Smith RL, et al. Polymethylmethacrylate particle exposure causes changes in p38 MAPK and TGF- β signaling in differentiating MC3T3-E1 cells. *J Biomed Mater Res, Part A* 2010;94:2344–40.
- [14] Rao AJ, Nich C, Dhulipala LS, Gibon E, Valladares R, Zwingerberger S, et al. Local effect of Ti-4 delivery on polyethylene particle induced osteolysis in the murine calvarium. *J Biomed Mater Res, Part A* 2013;101:1926–34.
- [15] Jiang Y, Jia T, Gong W, Wooley PH, Yang SY. Titanium particle-challenged osteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of periprosthetic osteolysis. *Acta Biomater* 2013;9:7564–72.
- [16] Gallo J, Goodman SB, Kontinen YT, Raska M. Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun* 2013;19:213–24.
- [17] Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, et al. Macrophages—Key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J Biomed Mater Res, Part A* 2013;101:3033–45.
- [18] Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O’Neil DA, Harris WH. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* Vol 1983;65:575–84.
- [19] Ito S, Matsumoto T, Enomoto H, Shindo H. Histological analysis and biological effects of granulation tissue around loosened hip prostheses in the development of osteolysis. *J Orthop Sci* 2004;9:478–87.
- [20] Meinecke I, Pap G, Mendoza H, Drange S, Ender S, Strietholt S, et al. Small ubiquitin-like modifier 1 [corrected] mediates the resistance of prosthesis-loosening fibroblast-like synoviocytes against Fas-induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2065–70.
- [21] Koreny T, Tunyogi-Gaspó M, Gal I, Vermes C, Jacobs JJ, Glant TT. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3221–32.
- [22] Shi Q, Lajeunesse D, Reiboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Delmas P, et al. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed

- total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol* 2002;29:1437–45.
- [23] Ingh CA, Hooten Jr JP, Zentl-Schaffer KP, Ghaffarpour M, McGovern TF, Bobyn JD. Evaluation of bone ingrowth in proximally and extensively porous-coated anatomic medullary locking prostheses retrieved at autopsy. *J Bone Joint Surg Am* Vol 1995;77:903–10.
- [24] Jasty M, Maloney WJ, Bragdon CR, Haire T, Harris WH. Histomorphological studies of the long-term skeletal responses to well fixed cemented femoral components. *J Bone Joint Surg Am* Vol 1990;72:1220–9.
- [25] Kontinen YT, Li TP, Xu JW, Tagaki M, Pirila I, Silvennoinen T, et al. Expression of laminins and their integrin receptors in different conditions of synovial membrane and synovial membrane-like interface tissue. *Ann Rheum Dis* 1999;58:683–90.
- [26] Schmalzried TP, Kwong LM, Jasty M, Sedlacek RC, Haire TC, O'Connor DO, et al. The mechanism of loosening of cemented acetabular components in total hip arthroplasty. Analysis of specimens retrieved at autopsy. *Clin Orthop Relat Res* 1992;30:78.
- [27] Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Takei I, Niissalo S, et al. High-turnover periprosthetic bone remodeling and immature bone formation around loose cemented total hip joints. *J Bone Miner Res* 2001;16:79–88.
- [28] Boehler M, Knahr K, Plenk Jr H, Walter A, Salzer M, Schreiber V. Long-term results of uncemented alumina acetabular implants. *J Bone Joint Surg Br* 1994;76:53–9.
- [29] Browne JA, Bedtold CD, Berry DJ, Hanssen AD, Lewallen DG. Failed metal-on-metal hip arthroplasties: a spectrum of clinical presentations and operative findings. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:2313–20.
- [30] Singh C, Kaplan A, Pamboukian SE. Necrotic granulomatous pseudotumor following metal-on-metal hip arthroplasty: a potential mimic of sarcoma on fine needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2012;40(Suppl 2):E104–8.
- [31] Clarke MT, Roberts CP, Lee TP, Gray J, Keene GS, Kushton N. Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 2004;413:2–7.
- [32] Horiki M, Nakase T, Myoui A, Sugano N, Nishii T, Tomita T, et al. Localization of RANKL in osteolytic tissue around a loosened joint prosthesis. *J Bone Miner Metab* 2004;22:346–51.
- [33] Kontinen YT, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainala M, et al. Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *J Bone Miner Res* 2001;16:1780–6.
- [34] Mandelin J, Li TP, Liljestrom M, Kroon ME, Hanemaaijer R, Santavirta S, et al. Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* Br 2003;85:1196–201.
- [35] Al Saffar N, Revell PA. Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. *Br J Rheumatol* 1994;33:309–16.
- [36] Baxter RM, Iamuzzi A, Freeman TA, Kurtz SM, Steinbeck MJ. Distinct immunohistomorphologic changes in periprosthetic hip tissues from historical and highly crosslinked UHMWPE implant retrievals. *J Biomed Mater Res, Part A* 2010;95:68–78.
- [37] Oriha J, Rukash HE, Kim KJ, Iwaki Y. The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;304:1–12.
- [38] Crotti TN, Smith MD, Pindlay DM, Zreiqat H, Ahern MJ, Weedon H, et al. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to periprosthetic bone loss: expression of receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* 2004;25:565–73.
- [39] Hercus B, Revell PA. Phenotypic characteristics of T lymphocytes in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:1063–7.
- [40] Hukkanen M, Corbett SA, Ilaten J, Kontinen YT, McCarthy ID, MacLough J, et al. Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure. *J Bone Joint Surg Am* Br 1997;79:467–74.
- [41] Imai S, Kontinen YT, Junttanen M, Lindy O, Ceponis A, Kemppinen P, et al. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J Bone Joint Surg Am* Br 1998;80:701–10.
- [42] Jones LC, Prondota C, Hungerford DS. Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components. *J Biomed Mater Res* 1999;48:889–98.
- [43] Santavirta S, Huikka V, Eskola A, Kontinen YT, Paavilainen T, Talroth K. Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* Br 1990;72:980–4.
- [44] Solovieva SA, Ceponis A, Kontinen YT, Takagi M, Suda A, Eldund KK, et al. Mast cells in loosening of totally replaced hips. *Clin Orthop Relat Res* 1996;158:65.
- [45] Shen Z, Crotti TN, McHugh KP, Matsuzaki K, Gravalles EM, Bierbaum BE, et al. The role played by cell-substrate interactions in the pathogenesis of osteoclast-mediated peri-implant osteolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R70.
- [46] Takagi M, Kontinen YT, Santavirta S, Sorsa T, Eisen AZ, Nordstrom L, et al. Extracellular matrix metalloproteinases around loose total hip prostheses. *Acta Orthop Scand* 1994;65:281–6.
- [47] Witzleb WC, Hanisch U, Kolar N, Krummenauer F, Guenther KP. Neo-capsule tissue reactions in metal-on-metal hip arthroplasty. *Acta Orthop* 2007;78:211–20.
- [48] Xu JW, Li TP, Partsch G, Ceponis A, Santavirta S, Kontinen YT. Interleukin-11 (IL-11) in aseptic loosening of total hip replacement (THR). *Scand J Rheumatol* 1998;27:363–7.
- [49] Xu JW, Kontinen YT, Li TP, Warris V, Lassus J, Maticci-Gerinić M, et al. Production of platelet-derived growth factor in aseptic loosening of total hip replacement. *Rheumatol Int* 1998;17:215–21.
- [50] Xu JW, Kontinen YT, Warris V, Patiala H, Sorsa T, Santavirta S. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is increased in the synovial-like membrane of the periprosthetic tissues in the aseptic loosening of total hip replacement (THR). *Clin Rheumatol* 1997;16:243–8.
- [51] Zhang Y, Hou C, Yu S, Xiao J, Zhang Z, Zhai Q, et al. BAK-M in macrophages around septic and aseptically loosened hip implants. *J Biomed Mater Res, Part A* 2012;100:261–8.
- [52] Gehrke T, Sers C, Morawietz L, Fernahli G, Neidel J, Prommelt L, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand is expressed in resident and inflammatory cells in aseptic and septic prosthesis loosening. *Scand J Rheumatol* 2003;32:287–94.
- [53] Grimaud E, Soubigou L, Coullaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 2003;163:2021–31.
- [54] Ma GF, Ali A, Verzijl N, Hanemaaijer R, TeKoppele J, Kontinen YT, et al. Increased collagen degradation around loosened total hip replacement implants. *Arthritis Rheum* 2006;54:2928–33.
- [55] Mandelin J, Li TP, Hukkanen MV, Liljestrom M, Chen ZK, Santavirta S, et al. Increased expression of a novel osteoclast-stimulating factor, ADAM8, in interface tissue around loosened hip prostheses. *J Rheumatol* 2003;30:2033–8.
- [56] Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, Dymytil C, Perka C, Skowara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 2006;59:591–7.
- [57] Pajarinen J, Cenni E, Savarino L, Gomez-Barrera E, Tamaki Y, Takagi M, et al. Profile of toll-like receptor-positive cells in septic and aseptic loosening of total hip arthroplasty implants. *J Biomed Mater Res, Part A* 2010;94:84–92.
- [58] Park YS, Moon YW, Lim SJ, Yang JM, Ahn G, Choi YL. Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* Vol 2005;87:1515–21.
- [59] Revell PA, Jellie SE. Interleukin 15 production by macrophages in the implant interface membrane of aseptically loosened joint replacements. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:727–30.
- [60] Edwards J, Schulze E, Sabokbar A, Gordon-Andrews H, Jackson D, Athanasou NA. Absence of lymphatics at the bone-implant interface: implications for periprosthetic osteolysis. *Acta Orthop* 2008;79:289–94.
- [61] Landgraaber S, von Knoch M, Loer F, Brankamp J, Tsokos M, Grabelius F, et al. Association between apoptosis and CD4(+)/CD8(+) T-lymphocyte ratio in aseptic loosening after total hip replacement. *Int J Biol Sci* 2009;5:182–91.
- [62] Landgraaber S, Toetsch M, Wiedemeyer C, Saxler G, Tsokos M, von Knoch F, et al. Over-expression of p53/BAK in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 2006;27:3010–20.
- [63] Landgraaber S, von Knoch M, Loer F, Wegner A, Tsokos M, Hussmann B, et al. Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 2008;29:3444–50.
- [64] Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, et al. Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J Bone Joint Surg Am* Br 1999;81:155–62.
- [65] Veigl D, Niederlova J, Krystufkova O. Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiol Res* 2007;56:455–62.
- [66] Yang F, Wu W, Cao L, Huang Y, Zhu Z, Yang T, et al. Pathways of macrophage apoptosis within the interface membrane in aseptic loosening of prostheses. *Biomaterials* 2011;32:9159–67.
- [67] Nygaard M, Elling P, Bastholm I, Soballe K, Borgwardt A. No difference in early cellular response of the pseudo-synovial membrane after total hip arthroplasty: comparison of 3 combinations of bearing materials. *Acta Orthop* 2006;77:402–12.
- [68] Santavirta S, Xu JW, Hietanen J, Ceponis A, Sorsa T, Kontio R, et al. Activation of periprosthetic connective tissue in aseptic loosening of total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res* 1998;16–24.
- [69] Sabharwal M, Piffanelli V, Boccafocchi F, Gatti S, Reno P, Bonetti M, et al. Different apoptosis modalities in periprosthetic membranes. *J Biomed Mater Res, Part A* 2010;92:175–84.
- [70] Kwon YM, Ostlere SJ, McLardy-Smith P, Athanasou NA, Gill HS, Murray DW. "Asymptomatic" pseudotumors after metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: prevalence and metal ion study. *J Arthroplasty* 2011;26:511–8.
- [71] Mirra JM, Amstutz HC, Matos M, Gold R. The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin Orthop Relat Res* 1976:221–40.
- [72] Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Ganssikh T, Schroeder JH, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology* 2009;54:847–53.
- [73] Bori G, Munoz-Mahamad E, Garcia S, Mallofre C, Gallart X, Bosch J, et al. Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Modern Pathol* 2011;24:579–84.
- [74] Athanasou NA, Pandey R, de Steiger R, Crook D, Smith PM. Diagnosis of infection by frozen section during revision arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* Br 1995;77:28–33.

- [75] Tohtz SW, Muller M, Morawietz L, Winkler T, Perka C. Validity of frozen sections for analysis of periprosthetic loosening membranes. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:762–8.
- [76] Musso AD, Mohanty K, Spencer-Jones R. Role of frozen section histology in diagnosis of infection during revision arthroplasty. *Postgrad Med J* 2003;79:590–3.
- [77] Della Valle CJ, Scher DM, Kim YH, Oxley CM, Desai P, Zuckerman JD, et al. The role of intraoperative Gram stain in revision total joint arthroplasty. *J Arthroplasty* 1999;14:500–4.
- [78] Spanghel MJ, Masterson E, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. The role of intraoperative gram stain in the diagnosis of infection during revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 1999;14:552–6.
- [79] Ghanem E, Ketonis C, Restrepo C, Joshi A, Barrack R, Farvizi J. Periprosthetic infection: where do we stand with regard to Gram stain? *Acta Orthop* 2009;80:37–40.
- [80] Johnson AJ, Zywielski MG, Stroth DA, Marker DR, Mont MA. Should gram stains have a role in diagnosing hip arthroplasty infections? *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:2387–91.
- [81] Bi Y, Collier TO, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM. Adherent endotoxin mediates biological responses of titanium particles without stimulating their phagocytosis. *J Orthop Sci* 2002;20:696–703.
- [82] Moojen DJ, van Hellemond G, Vogely HC, Burger BJ, Walenkamp GH, Tulp NJ, et al. Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta Orthop* 2010;81:667–73.
- [83] Lohdeja T, Pajarinen J, Kouri VP, Sillat T, Salo J, Kontinen YT. Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *J Orthop Sci* 2010;28:184–90.
- [84] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:278–305.
- [85] Youn NY, Yeaman MR. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann NY Acad Sci* 2013;1277:127–38.
- [86] Golwitzer H, Dombrowski Y, Proding PM, Peric M, Summer B, Hapfelmeier A, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95:644–51.
- [87] Pajarinen J, Kouri VP, Jansen E, Li TF, Mandelin J, Kontinen YT. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater* 2013;9:9229–40.
- [88] Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, et al. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:531–9.
- [89] Fujishiro T, Moojen DJ, Kobayashi N, Dhert WJ, Bauer TW. Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:1127–33.
- [90] Lennox DW, Schofield IH, McDonald DE, Riley Jr LH. A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit, and biologic ingrowth prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 1987;171–91.
- [91] Li TF, Santavirta S, Waris V, Lassus J, Lindroos L, Xu JW, et al. No lymphokines in T cells around loosened hip prostheses. *Acta Orthop Scand* 2001;72:241–7.
- [92] Aroukatos P, Repanti M, Repantis T, Bravou V, Korovessis P. Immunologic adverse reaction associated with low-carbide metal-on-metal bearings in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:2125–42.
- [93] Davies AP, Willett HG, Campbell PA, Ivarsson ID, Case CP. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:18–27.
- [94] Hutton A, Nevelos JE, Nevelos AA, Banks RL, Fisher J, Ingham E. Alumina-alumina artificial hip joints. Part 1. A histological analysis and characterisation of wear debris by laser capture microdissection of tissues retrieved at revision. *Biomaterials* 2002;23:3429–40.
- [95] Miyazaki K, Trindade MC, Ma T, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Periprosthetic osteolysis: induction of vascular endothelial growth factor from human monocyte/macrophages by orthopaedic biomaterial particles. *J Bone Miner Res* 2003;18:1573–83.
- [96] Kenna TJ, Brown MA. The role of IL-17-secreting mast cells in inflammatory joint disease. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:375–9.
- [97] Santavirta S, Pajamaki J, Eskola A, Kontinen YT, Lindholm T. Proliferative cell response to loosening of total hip replacements: a cytofluorographic cell cycle analysis. *Arch Orthop Trauma Surg* 1991;111:43–6.
- [98] Santavirta S, Ceponis A, Solovieva SA, Hurri H, Jin J, Takagi M, et al. Periprosthetic microvasculature in loosening of total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 1996;115:286–9.
- [99] Niissalo S, Li TF, Santavirta S, Takagi M, Hatanen J, Kontinen YT. Dense innervation in pseudocapsular tissue compared to aneurial interface tissue in loose initially replaced hips. *J Rheumatol* 2002;29:796–803.
- [100] Goodman SB, Huie P, Song Y, Lee K, Doshi A, Rushdieh B, et al. Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties. A biologic spectrum. *Clin Orthop Relat Res* 1997;149–63.
- [101] Li TF, Mandelin J, Hukkanen M, Liljestrom M, Santavirta S, Westerlund J, et al. Expression of caspase-1 in synovial membrane-like interface tissue around loosened hip prostheses. *Rheumatol Int* 2002;22:97–102.
- [102] Neale SD, Athanasou NA. Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. *Acta Orthop Scand* 1999;70:452–8.
- [103] Kontinen YT, Waris V, Xu JW, Jiranek WA, Sorsa T, Virtanen J, et al. Transforming growth factor-beta 1 and 2 in the synovial-like interface membrane between implant and bone in loosening of total hip arthroplasty. *J Rheumatol* 1997;24:694–701.
- [104] Waris V, Sillat T, Waris E, Virkki L, Mandelin J, Takagi M, et al. Role and regulation of VEGF and its receptors 1 and 2 in the aseptic loosening of total hip implants. *J Orthop Sci* 2012;30:1830–6.
- [105] Spanogle JP, Miyazaki K, Ma T, Epstein NJ, Smith RL, Goodman SB. Comparison of VEGF-producing cells in periprosthetic osteolysis. *Biomaterials* 2006;27:3882–7.
- [106] Arora A, Song Y, Chun L, Huie P, Trindade M, Smith RL, et al. The role of the TH1 and TH2 immune responses in loosening and osteolysis of cemented total hip replacements. *J Biomed Mater Res, Part A* 2003;64:693–7.
- [107] Li TF, Xu JW, Santavirta S, Takagi M, Virtanen I, Pirila L, et al. Expression of vitronectin and its integrin receptors in the synovial membrane-like interface tissue from aseptic loosening of total hip replacement. *J Rheumatol* 2000;27:727–34.
- [108] Krenn V, Morawietz L, Kienappel H, Ascherl R, Matziasch G, Hassenpflug J, et al. Revised consensus classification. Histopathological classification of diseases associated with joint endoprostheses. *J Rheumatol* 2013;72:383–92.
- [109] Kim KJ, Chiba J, Rulash HE. In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. *J Bone Joint Surg Am* 1984;76:172–80.
- [110] Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, Schurman DJ, Woolson ST, Masada MP. A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 1989;182–2.
- [111] Campbell P, Ebrahimpour E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz HC. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:2321–7.
- [112] Esposito C, Maclean F, Campbell P, Walter WL, Walter WK, Bonar SF. Periprosthetic tissues from third generation alumina-on-alumina total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 2013;28:860–6.
- [113] von Dornum C, Rosenberg JP, Ruther W, Zustin J. Necrobiosis and T-lymphocyte infiltration in retrieved aseptically loosened metal-on-polyethylene arthroplasties. *Acta Orthop* 2011;82:596–601.
- [114] Carl A, Reuven A, Zukor DJ, Antoniou J. Adverse soft-tissue reactions around non-metal-on-metal total hip arthroplasty – a systematic review of the literature. *Bull NYU Hospital Joint Dis* 2011;69(Suppl 1):S47–51.
- [115] Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Huie P, Sibley R. Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J Biomed Mater Res* 1996;31:421–8.
- [116] Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, Thomsen P, Gretzer C. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop* 2006;77:177–92.
- [117] Aspenberg P, Van der Vliet H. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1988;75–90.
- [118] Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hospital Joint Dis* 2009;67:182–8.
- [119] Reno F, Sabbatini M, Masse A, Bosetti M, Cannas M. Fibroblast apoptosis and caspase-8 activation in aseptic loosening. *Biomaterials* 2003;24:3941–6.
- [120] Li TF, Santavirta S, Virtanen I, Kononen M, Takagi M, Kontinen YT. Increased expression of EMMPRIN in the tissue around loosened hip prostheses. *Acta Orthop Scand* 1999;70:446–51.
- [121] Takei I, Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Ogino T, et al. Messenger ribonucleic acid expression of 16 matrix metalloproteinases in bone-implant interface tissues of loose artificial hip joints. *J Biomed Mater Res* 2000;52:613–20.
- [122] Thomas P, Braathen LR, Dorig M, Auebock J, Nestle F, Werfel T, et al. Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy* 2009;64:1157–65.
- [123] Lohmann CH, Meyer H, Nuechtern JV, Singh G, Junk-Jantsch S, Schnotzer H, et al. Periprosthetic tissue metal content but not serum metal content predicts the type of tissue response in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95:1561–8.
- [124] Thyssen JP, Jakobsen SS, Engkilde K, Johansen JD, Soballe K, Meme T. The association between metal allergy, total hip arthroplasty, and revision. *Acta Orthop* 2009;80:646–52.
- [125] Martin SF. Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp Dermatol* 2012;21:382–9.
- [126] Atila I, Atila P, Tokgozlu AM, Cakar AN, Alpaslan AM. Immunohistochemical evaluation of periprosthetic membrane from loose cemented and uncemented total hip arthroplasty. *Saudi Med J* 2005;26:429–33.
- [127] Willett HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:28–36.
- [128] Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS, Athanasou N. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta Orthop* 2009;80:653–9.
- [129] Kontinen YT, Pajarinen J. Adverse reactions to metal-on-metal implants. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:5–6.
- [130] Evans EM, Freeman MA, Miller AJ, Vernon-Roberts B. Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am* 1974;56-B:626–42.

- [131] Kirovessis P, Petsinis G, Repanti M, Repantis T. Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty. Five to nine-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:1183–91.
- [132] Langton DJ, Jameson SS, Joyce TJ, Hallab NJ, Nam S, Nargol AV. Early failure of metal-on-metal bearings in hip resurfacing and large-diameter total hip replacement: a consequence of excess wear. *J Bone Joint Surg Am Br* 2010;92:38–46.
- [133] Ng VY, Lombardi Jr AV, Berend KR, Skeels MD, Adams JB. Perivascular lymphocytic infiltration is not limited to metal-on-metal bearings. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:523–9.
- [134] Mikšev I, Trešić R, Kovac S, Cor A, Piset V. Survivorship and retrieval analysis of Sikromet metal-on-metal total hip replacements at a mean of seven years. *J Bone Joint Surg Am Vol* 2006;88:1173–82.
- [135] Baxter RM, Freeman TA, Kurtz SM, Steinbeck MJ. Do tissues from THA revision of highly crosslinked UHMWPE liners contain wear debris and associated inflammation? *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:2308–17.
- [136] Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry: therapeutic and genomic applications*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010.
- [137] Bury RW. *Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research*. New York: Springer; 2010.
- [138] Farm AJ, Stead RH. Fixation and processing. In: Kumar GL, Rudbeck L, editors. *Education guide: immunohistochemical staining methods*, 5th ed. Carpinteria, CA: DAKO North America; 2009. p. 29–35.
- [139] Kim YH, Kim VE. Early migration of uncemented porous coated anatomic femoral component related to aseptic loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1993;146–55.
- [140] Lukas Z, Feit J. *Immunohistochemical methods in biology and surgical pathology*. Brno: Masaryk University, Medical faculty; 1997.
- [141] Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1026–30.
- [142] Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics* 2006;61:417–24.
- [143] Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol* 2012;7:42.

Low inpatient variability of histomorphological findings in periprosthetic tissues from revised metal/ceramic on polyethylene joint arthroplasties

Jana Vaculova,^{1,2} Jiri Gallo,¹ Pavel Hurnik,^{2,3} Oldrich Motyka,⁴ Stuart B. Goodman,⁵
Jana Dvorackova^{2,3}

¹Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Faculty Hospital Olomouc, Olomouc, 775 20, Czech Republic

²Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Ostrava-Poruba, 708 52, Czech Republic

³CBG Laboratory a. s., Ostrava 3, 703 00, Czech Republic

⁴Nanotechnology Centre, VŠB – Technical University of Ostrava, Ostrava-Poruba, 708 33, Czech Republic

⁵Department of Orthopaedic Surgery, Stanford Medical Center Outpatient Clinic, Redwood City, CA 94063

Received 15 October 2016; revised 25 July 2017; accepted 30 August 2017

Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.33990

Abstract: The type of tissue response to implant by-products can be determined by examination of periprosthetic tissues. However, little is known about the most suitable location for tissue sampling. The main goal of this study was to evaluate the extent of variability in tissue response in relation to location of tissue sampling, implant fixation, age and sex in total joint arthroplasties with metal-on-polyethylene or ceramic-on-polyethylene bearing pairs. We processed 236 histology slides from 21 patients and focused on the association between the location of tissue samples and histological features. The presence of the synovial hyperplasia showed a significant association with the particular sampling site. A higher density of high endothelial cell venules was seen in

the samples from around the joint, and polyethylene particles were more abundant in noncemented TJA but both findings did not show statistically significant association with the sampling site. The results showed a relatively small variance in the tissue response to prosthetic by-products among tissues sampled from the same patient. Our findings indicate that tissue samples retrieved from similar distance from around the TJA during the revision operation show comparable results of histological analysis. © 2017 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B: 000–000, 2017.

Key Words: total joint replacement, aseptic loosening, intraindividual variability, interindividual variability, histology

How to cite this article: Vaculova, J, Gallo, J, Hurnik, P, Motyka, O, Goodman, SB, Dvorackova, J 2017. Low inpatient variability of histomorphological findings in periprosthetic tissues from revised metal/ceramic on polyethylene joint arthroplasties. *J Biomed Mater Res Part B* 2017;00B:000–000.

INTRODUCTION

Aseptic loosening is considered the most common late reason for revision of total hip arthroplasty (THA) and total knee arthroplasty (TKA).^{1,2} The etiology of aseptic loosening is complex and includes biological and mechanical factors. One of the principal contributors to late total joint arthroplasty (TJA) failure is chronic inflammatory reaction to wear particles.³ In addition, the type and extent of tissue response depends not only on the amount, origin, size, and type of wear particles but also modified by individual genetic factors.⁴

Reliable histological analysis depends on the type and quality of the examined tissues as well as on the anatomical site of tissue sampling. The tissue obtained from the inner surface of the pseudocapsule and synovial-like interface membrane (SLIM) seems to be appropriate for the diagnosis of prosthetic joint infection (PJI)^{5,6} as well as for the examination of the aseptic loosening features.^{7–9} In addition, the

periprosthetic neo-synovial mass resembling a tumor can be employed as an adequate tissue for histological analysis.¹⁰

The typical histomorphological changes in periprosthetic tissues include a predominance of diffuse macrophage infiltrates in a fibrous stroma, interrupted with areas of lymphocytic accumulation, multinucleated giant cell formation, tissue necrosis, and highly vascular tissue. There are several classifications of the histomorphological changes in the periprosthetic tissue including adverse local tissue reactions (ALTR) or adverse reaction to metallic debris (ARMD) in case of aseptic failure. A specific variant of tissue response is called aseptic lymphocyte dominated vasculitis associated lesion (ALVAL).¹¹ The recent literature on this subject suggests a more diverse nomenclature rather than that developed historically.^{12,13}

Currently, there is a general consensus that mapping of tissue samples is important for the outcome of histological

Correspondence to: Jiri Gallo; e-mail: jiri.gallo@volny.cz

Contract grant sponsor: Ministry of Health of the Czech Republic; contract grant number: IGA 16-31852A

Contract grant sponsor: Ministerstvo Zdravotnictví České Republiky

examination. Various locations of sampling can deliver different data depending on the material of the implant, extension/type of implant surface degradation, or reason for revision. However, no guideline exists addressing the quality and management efficacy of the sampling in a particular reoperation. On one side, it seems clear that the wider is the range of samples taken from around a failed TJA, the more accurate is the result of histological analysis. On the other hand, such an extensive approach is time- and money-consuming and thus precluding a wide-range implementation in clinical practice. In addition, the result of histopathological examination can be influenced by regional tissue variations occurring in a particular patient.

The aim of our study was to describe the degree of variability of tissue reaction of samples retrieved from different sites around an aseptically failed TJA in one patient and compare intraindividual histopathological changes in terms of the joint fixation method, age and sex.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Periprosthetic tissues were obtained from 21 patients reoperated for aseptic failure of TKA ($n = 9$) and THA ($n = 12$). Sampling was performed according to a standardized plan: 2 samples were taken from the inner part of a periprosthetic capsule ("site 1"), 3 from tissues around the proximal implant (that is, femoral component in the case of TKA; acetabular cup in the case of THA; "site 2") and 3 samples were obtained from around the distal component (that is, tibial component in the case of TKA; femoral component in the case of THA; "site 3"). In seven patients both THA and TKA components were reimplanted while the original components were left in two TKAs and in one THA. The implants had metal on polyethylene or ceramic on polyethylene (PE) bearings. Infected cases were excluded in all the subjects according to a previously published algorithm.¹⁴ The summary of the patients is presented in Table I.

The study included Czech Caucasian patients operated between November 2013 and November 2014 by a single surgeon (JG). A written informed consent about the usage of periprosthetic tissues for the purpose of this study was obtained from each subject (Ethical Committee; reference number 168/09).

Tissue samples processing

Immediately after the incision of the knee/hip joint capsule, a thin surface layer of the tissue covering the inner side of the joint capsule was collected. Additional samples were taken from an interface membrane between the implant and bone depending on the locations described above. The sample side that was not in touch with an implant was covered with the Davidson Marking System using the blue tissue dye (Bradley Products, Inc.).

Tissue preparation and histology stains

The retrieved tissues ranged from tiny to large samples. Large tissue samples were cut during the gross description, and the number of tissue blocks ranged between 7 and 39

per case (Table II). The tissues were formalin-fixed, paraffin embedded, and 3 μm sections were stained by means of the hematoxylin and eosin method (H&E). All the H&E sections were analysed at light microscopy, and 2 representative paraffin blocks retrieved from each sampling site ($n = 118$) were selected for subsequent analysis. The selection criteria included the correct orientation of the tissue, adequate cellularity and no extensive necrosis in the sample. If all the blocks fulfilled our criteria, the blocks for further examination were selected randomly.

Immunohistochemistry

The 3 μm thick paraffin sections of selected paraffin blocks ($n = 118$) were used for immunohistochemical staining. Immunohistochemistry was performed in the automated tissue staining system Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). To detect mast cells, primary antibody Monoclonal-Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase (DAKO, Clone AA1, dilution 1:100) was applied and the positivity was manifested by brown color granules in the cytoplasm of the mast cells.

Histomorphological evaluation

To determine the type of tissue response, the criteria by al. in their later modification were used (Table III).¹⁵ Furthermore, the sections were examined using a modified system adopted from others.^{16,17} The protocol for the evaluation of the histomorphological parameters in the periprosthetic tissue samples is showed in Table IV.

Pathologists evaluated the presence of synovial hyperplasia, type of the synovial formation, extent of necrosis and fibrosis, calcifications, highly vascular areas, multinucleated giant cells and distribution of lymphocytes. The presence of macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, plasma and mast cells was assessed semi-quantitatively by grading using a specific scale (Table IV). The distribution, type and size of particles were observed at conventional light microscopy. PE birefringent particles were detected under polarized light; the others were distinguishable in H&E stain. Particle size analysis was performed using a 3-grade scale ("small": from 1 to 5 micrometers; "medium-size": from 5 to 50 micrometers; "large": more than 50 micrometers). The metallic (Ti, Co, Cr, Mo), cement, or ceramic (Al_2O_3) debris was identified without grading. Histomorphological changes of SLIM were evaluated in three distinct histological zones separately: (1) in the synovial-like lining; (2) in the cellular subintima containing sheets of macrophages and multinucleated giant cells; (3) in the fibrous layer with collagen fibers around the surface.

Each slide was observed using an Olympus BX45 microscope under high power field (HPF). Particular histological parameters were analyzed semi-quantitatively in 20 HPF (mast cells, eosinophils).

Statistical analysis

General trends explaining the variability of the categorical variables of the data were assessed using the Multiple

TABLE I. Data Related to the Patients Enrolled into the Study

Case number	Age	Gender	BMI	Time to Revision (years)	Joint	Type of the Implant	Manufacturer	Type of Fixation	Type of Bearing Pair	Stability of the Implant	Femoral Component (Knee)	Tibial Component (Knee)	Acetabular Cup (Hip)	Femoral Shaft Composition (Hip)	Size of the Head in THA (mm)	Type of Polyethylene
1	89.8	F	22.5	12.1	Knee	PFC	J&J	C	MoP	OCL	Co-Cr-Mo	Ti alloy	-	-	-	GUR 4120
2	51.1	F	22	19.1	Hip	ABG	Howmedica	NC	MoP	OCL	-	-	Ti-6Al-4V	-	28	GUR 4150
3	78.5	M	22.7	14.2	Knee	Search Evolution	BBraun	C	MoP	Loosened	Co-Cr-Mo	Co-Cr-Mo	-	-	-	Chinulen
4	65.5	F	30.8	16.1	Knee	Kiermax plus	Howmedica	C	MoP	OCL	Co-Cr	Ti alloy	-	-	-	GUR 4150
5	77.6	F	34.9	15.8	Knee	PFC	J&J	C	MoP	Stable	Co-Cr-Mo	Ti alloy	-	-	-	GUR 4120
6	69.1	M	36.6	1.2	Knee	Evolution	BBraun	C	MoP	Stable	Co-Cr-Mo	Co-Cr-Mo	-	-	-	Chinulen
7	74.7	M	22.6	4.2	Hip	ZCA-MSS30	Zimmer	C	MoP	OCL	-	-	PE	stainless steel	28	GUR 1020
8	64.5	F	36.5	16.8	Knee	Kiermax plus	Howmedica	C	MoP	Loosened	Co-Cr	Ti alloy	-	-	-	GUR 4150
10	66.7	M	35.9	2.3	Knee	Search Evolution	BBraun	C	MoP	Stable	Co-Cr-Mo	Co-Cr-Mo	-	-	-	Chinulen
11	68.9	M	34.1	18.2	Hip	Bicon-SL stem (Zweymüller)	S&N	NC	CoP	Stable	-	-	Ti	Ti6-Al7-Nb	32	GUR 1020
14	59.3	M	32.8	17	Hip	ABG	Howmedica	NC	MoP	Stable	-	-	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	28	GUR 4150
15	67.6	F	21.5	16.1	Hip	ABG	Howmedica	NC	MoP	Stable	-	-	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	28	GUR 4150
16	67.5	F	29.7	10.8	Knee	NexGen	Zimmer	C	MoP	Loosened	Co-Cr-Mo	Co-Cr-Mo	-	-	-	GUR 1020
17	78.4	M	27.8	16.7	Knee	Evolution PS	BBraun	C	MoP	OCL	Co-Cr-Mo	Co-Cr-Mo	-	-	-	Chinulen
18	74.5	M	30.3	11.6	Hip	Bicon-SL stem (Zweymüller)	S&N	NC	MoP	Stable	-	-	Ti	Ti6-Al7-Nb	28	GUR 1020
19	73.1	F	29.5	21.4	Hip	Spotorno-WM	Zimmer-WM	NC	MoP	OCL	-	-	Ti-6Al-7Nb	Ti-6Al-4V	32	GUR 1020
20	60.0	F	34.1	13.5	Hip	Chirulen-SL stem (Zweymüller)	BBraun-S&N	H	CoP	Stable	-	-	PE	Ti6-Al7-Nb	28	Chinulen
21	67.4	F	30.9	12.5	Hip	Balgrist-SL stem (Zweymüller)	Sulzer-S&N	NC	CoP	Stable	-	-	Ti	Ti6-Al7-Nb	28	GUR 1020
22	52.8	M	26.2	14.0	Hip	Plasma cup-ABG	BBraun-Howmedica	NC	MoP	Stable	-	-	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	28	Chinulen
40	81.2	M	27.1	12.6	Hip	Chirulen-Centrarm	BBraun	C	MoP	OCL	-	-	PE	FeCrNiMoMnNbN	28	Chinulen
41	71.7	F	36.2	18.3	Hip	Balgrist-ABG	Sulzer-Howmedica	NC	MoP	OCL	-	-	Ti	Ti-6Al-4V	28	GUR 1020

Legend: OCL = one component loosened; GUR = the designation for ultra-high-molecular polyethylene grades; Chinulen = registered trademark of Poly Hi Solidur; PE = polyethylene; all the polyethylenes used in the study were conventional; all the total hips were modular; however, no metallic adapter sleeve was used; C = cemented; NC = noncemented; H = hybrid; MoP = metal on polyethylene; CoP = ceramic on polyethylene; S&N = Smith&Nephew; J&J = Johnson&Johnson; WM = Walter-Motordid.

TABLE II. Gross Description of the Tissue Samples and the Number of Examined Slides

The Case Number	I. The Tissue Obtained from Site 1 (cm)			II. The Tissue Obtained from Site 2 (cm)			III. The Tissue Obtained from Site 3 (cm)			Total Number of FFPE Blocks and H&E Stained Slides	The Number of Representative FFPE Blocks
1	3.5 × 2.0 × 0.1	4.5 × 3.0 × 2.2	2.5 × 1.0 × 0.1	3.0 × 1.5 × 1.0	4.5 × 2.4 × 1.8	2.0 × 0.8 × 0.5	2.5 × 2 × 0.4	1.3 × 0.7 × 0.5	1.5 × 0.9 × 0.4	39	6
2	2.0 × 0.8 × 1.3	3.0 × 1.0 × 0.5		5.0 × 2.5 × 0.5	2.0 × 1.5 × 1.0	3.0 × 1.0 × 0.5				26	6
3	3.0 × 1.2 × 0.2	4.7 × 0.9 × 0.3		2.0 × 0.9 × 0.3	0.5 × 0.3 × 0.2	3.0 × 1.2 × 0.3	2.5 × 0.7 × 0.4	6 × ∅ 0.7	1.6 × 1.4 × 0.3	30	6
4	2.5 × 1.3 × 0.6	3.5 × 1.3 × 0.5	3.0 × 1.3 × 0.2	2.0 × 0.6 × 0.2	0.5 × 0.3 × 0.2	2.2 × 1.2 × 1.0	2.5 × 1.0 × 0.4	2 × ∅ 0.5	4.0 × 3.0 × 0.5	32	6
5	3.0 × 2.2 × 0.9			2.5 × 1.5 × 0.5	3 × 1.5 × 0.4	2.3 × 2.2 × 1.3	2.0 × 1.0 × 0.5	2 × 1.3 × 0.4		36	6
6	0.9 × 0.8 × 0.5	4.0 × 2.0 × 1.8	3.0 × 1.0 × 0.3	2.0 × 1.2 × 0.5	2.5 × 2 × 0.3	∅ 0.2	2.0 × 0.6 × 0.2	1.3 × 0.2 × 0.1	2.5 × 1.2 × 0.3	17	6
7	2.0 × 0.6 × 0.4	2.8 × 1.3 × 1.2		6.0 × 1.0 × 1.0	1.5 × 1.0 × 0.6	1.0 × 0.9 × 0.5	1.8 × 0.5 × 0.3	2.0 × 0.9 × 0.8		20	6
8	3.3 × 2.8 × 0.5	3.0 × 0.5 × 0.2	2.5 × 1.5 × 0.3	1.3 × 1.0 × 0.5	2.5 × 1.0 × 0.9		2.0 × 1.5 × 0.3	2 × 1.8 × 0.5		29	6
10	2.5 × 1.3 × 0.3			3.5 × 1.3 × 0.2	3.5 × 1.3 × 0.5		2.0 × 0.6 × 0.2	0.7 × 0.3 × 0.2	1.3 × 0.4 × 0.2	20	6
11	3.0 × 1.0 × 0.3	5.0 × 0.6 × 0.1	2.5 × 0.8 × 0.2	5.0 × 1.0 × 0.4	1.3 × 0.7 × 1.3	4.0 × 1.5 × 1.0	3.0 × 1.3 × 0.5	4.0 × 1.0 × 0.4	2.0 × 1.0 × 0.6	20	6
14	4.3 × 2.0 × 1.8	2.2 × 1.5 × 0.8		2.5 × 1.0 × 0.5	3.0 × 1.0 × 0.6	3.5 × 1.5 × 0.6	5 × ∅ 0.7	4.0 × 3.0 × 0.5	3.0 × 1.7 × 0.3	23	6
15	2.6 × 0.9 × 0.5	2.0 × 0.6 × 0.3	2.1 × 1.1 × 0.2	2.0 × 1.2 × 0.6	4.5 × 3.0 × 0.3	4.3 × 2.0 × 0.5	2.0 × 2.0 × 1.0	2.0 × 0.6	2 × ∅ 0.6	17	6
16	1.4 × 1.5 × 1.0	1.7 × 1.2 × 1.1		3.0 × 1.5 × 0.5	2.5 × 0.3 × 0.1	3.0 × 0.4 × 0.2	3.0 × 0.3 × 0.1	1.5 × 1.0 × 0.2	2.0 × 0.4 × 0.2	20	6
17	2.2 × 1.0 × 0.4	2.4 × 1.2 × 0.4		1.0 × 0.5 × 0.2	1.8 × 0.7 × 0.5	3.0 × 1.0 × 2.0	2.0 × 0.9 × 0.2	2.5 × 0.6 × 0.5	2.9 × 1.0 × 0.3	20	6
18	2.0 × 2.2 × 0.5	2.5 × 1.5 × 0.3	3.0 × 1.5 × 0.4	2.5 × 0.8 × 0.2	2.0 × 2.0 × 0.9	3.0 × 1.5 × 0.6	1.5 × 0.4 × 0.1	4 × 0.6 × 0.1	2.0 × 0.8 × 0.3	25	6
19	3.0 × 1.5 × 0.4	5.0 × 4.0 × 1.0		4.0 × 1.0 × 0.2	2.0 × 2.0 × 0.9	3.0 × 1.5 × 0.6	2.0 × 1.6 × 0.1	2.5 × 0.6 × 0.4	0.7 × 0.6 × 0.1	18	4
20	2.6 × 1.5 × 0.1	3.2 × 0.6 × 0.2		1.5 × 0.5 × 0.3	4.5 × 1.0 × 0.2	2.0 × 1.5 × 0.2	2.0 × 0.9 × 0.1	1.5 × 0.5 × 0.2	1.0 × 0.5 × 0.1	18	4
21	2.2 × 1.0 × 0.3	2.1 × 0.6 × 0.2		1.5 × 0.5 × 0.3	2.2 × 1.0 × 0.2	5 × ∅ 0.5	2.0 × 1.5 × 0.3	1.9 × 1.2 × 0.3	2.0 × 1.5 × 0.4	30	6
22	2.3 × 0.3 × 0.4	3.0 × 1.5 × 0.4		1.5 × 1.0 × 7.0	2.0 × 1.5 × 4.0		2.0 × 1.2 × 0.8	1.9 × 1.2 × 0.3	2.0 × 1.5 × 0.4	19	6
40	3.0 × 2.0 × 0.4	2.5 × 1.3 × 0.2		2.0 × 5.0 × 6.0	2.6 × 1.8 × 0.4	3.0 × 1.0 × 3.0	1.5 × 1.2 × 0.2	2.0 × 2.2 × 0.4	3.4 × 1.7 × 0.4	24	6
41	3.5 × 1.5 × 0.3	3.5 × 1.0 × 0.3		2.8 × 0.9 × 0.2	1.8 × 0.9 × 0.6		2.5 × 1.4 × 0.4	2.0 × 1.4 × 0.2	2.6 × 1.5 × 0.2	7	4
				3.0 × 1.5 × 0.5	1.8 × 0.9 × 0.2		4.0 × 1.0 × 0.4	4.2 × 3.2 × 0.5	2.3 × 0.4	7	4
				3.5 × 1.4 × 0.3	5.7 × 2.0 × 0.2	2.5 × 1.8 × 0.2	1.5 × 1.5 × 0.3	4.0 × 1.8 × 0.3	1.4 × 1.5 × 0.2	490	118
				2.3 × 1.5 × 0.3	4.0 × 0.6 × 0.2	3.0 × 1.0 × 0.2	2.0 × 1.0 × 0.1	4.0 × 1.8 × 0.3	1.4 × 1.5 × 0.2		
				3.5 × 1.0 × 0.5	2.5 × 0.5 × 0.2	3.0 × 0.5 × 0.2	3.0 × 1.0 × 0.2	3.0 × 1.6 × 0.3	2.8 × 1 × 0.3		
				3.0 × 0.5 × 0.2	3.0 × 0.5 × 0.2	3.0 × 0.5 × 0.2	2.0 × 1.0 × 0.2	2.5 × 0.5 × 0.4			
				1.6 × 1.2 × 0.2							
				5.0 × 1.3 × 0.6							

Legend: FFPE = formalin-fixed, paraffin embedded; H&E = hematoxylin and eosin.

TABLE III. Histopathological Classification of the Synovial-Like Interface Membrane

The Revised Classification with Additional Pathologies (Krenn 2014)	
Allergic alteration	Lymphocytic infiltrate, positive allergy tests
Type I Wear particle induced	Abundance of macrophages and multinuclear giant cells Wear particles Occasional small lymphocytes
+ Necrosis	Wear debris (metal-on-metal implant)
Type II Infectious type	Abundance of neutrophil granulocytes Activated fibroblasts, proliferation of small blood vessels, oedema Plasma cells
Type III Combined type	Combination of the histomorphological changes in type I and II
Type IV Indifferent type	Connective tissue rich in collagen fibers Fibrin or fibroblasts and macrophages sometimes on the membrane surface
Implant-associated arthrofibrosis	Fibrosis and β -catenin positive fibroblasts
Osseous pathologies	Osteomyelitis, osteonecrosis, ossification, osteopenia

Correspondence Analysis (MCA) in the statistical software R¹⁸ and package FactoMineR.¹⁹

RESULTS

Based on our evaluation protocol, we found a wide spectrum of histopathological findings which were consistent with the response to wear debris in three sampling localities. Histomorphological evaluation of the samples showed similar changes of the tissue.

A majority of SLIM were classified as the "wear particle induced membrane" according to Krenn.¹⁵ In case of "indifferent" SLIM, samples originated mainly from site 1 (the inner part of the pseudocapsule). However, the association between the sampling site and the Krenn classification was not found significant.

The hypertrophic synovial-like layer was seen in 58% SLIM samples with a significant association to the tissues harvested from site 1 (Figure 2C). The synovial-like layer was classified as flat (35%), villous (5%), polypoid (24%) or villous and polypoid (36%).

The majority of the tissue samples displayed a typical histopathological reaction: a predominance of diffuse macrophage infiltrates, foreign body reactions, varying grades of coagulative necrosis, and reactive fibrosis. Representative photomicrographs are shown in Figure 1. The zonality and extent of necrotic changes were similar in all the three sampling sites. Extensive necrotic areas of the collagen tissue and diffuse macrophage infiltrates were associated with numerous smaller sized wear particles distributed in macrophages or extracellularly.

The significant finding was observed in PE particles which were proportionally more present in the samples from cementless TJA than in cemented TJA. Nevertheless, the sampling site did not influence on the quantity of PE particles. Metal debris was presented mainly intracellularly as small black particles in 33% of the samples, without a significant association to the type of fixation or the sampling site. The higher occurrence of the metal particles was

TABLE IV. Histomorphological Evaluation Protocol

Parameter	Evaluation
Synovial hyperplasia	Yes/no
Synovium	Flat Villous Polypoid
Krenn classification	1-4
Fibrosis	Yes/no
Necrosis	Synovium Second zone Third zone
Calcification	Yes/no
High endothelial venules	Yes/no
Stromal lymphocytes	Yes/no
Perivascular lymphocytes	Yes/no
Foreign body reaction	Yes/no
Macrophages	Not present Rare Clusters Diffuse
Neutrophils	Not present Rare 1-5/HPF Moderate 6-49/HPF Frequent ≥ 50 /HPF
Eosinophils	Not present Rare 1-6/20 HPFs Moderate 7-13/20 HPFs Frequent ≥ 14 /20 HPFs
Mast cells	Not present Rare 1-49/20 HPFs Moderate 50-99/20 HPFs Frequent ≥ 100 /20 HPFs
Metal particles	Yes/no
Cement particles	Yes/no
PE particles	Small Medium-size Large
Distribution of PE particles	Intracellular Extracellular

Legend: HPF = high power field; PE = polyethylene.

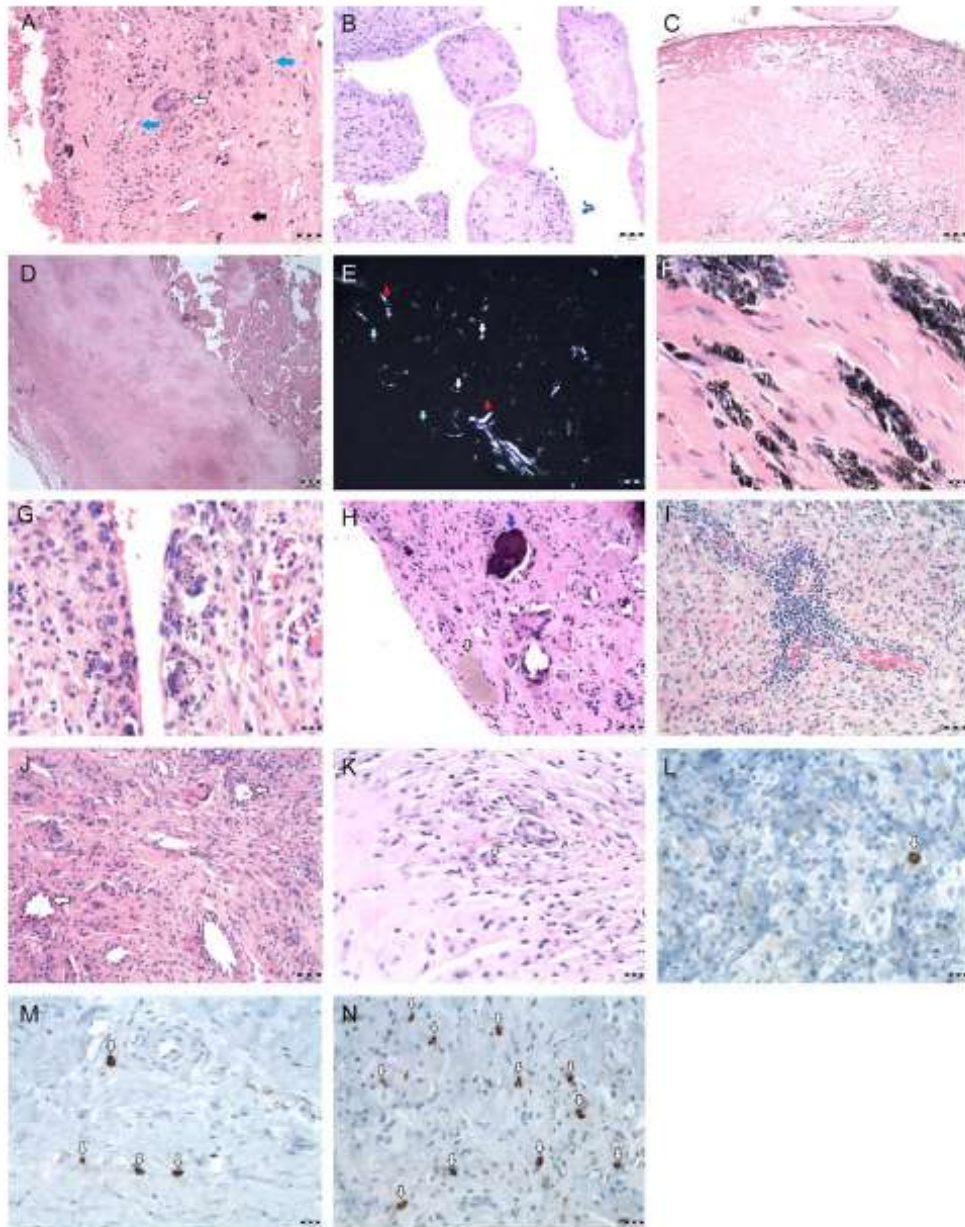


FIGURE 1. (A) Synovial hyperplasia of SLIM with multinucleated giant cell phagocytosing PE particle (white arrow) and spaces with elongated particles (blue arrow), some tissue region with necrosis (black arrow). Sample retrieved from around the joint. Case No. 8, H&E, $\times 200$. (B) The polypoid formation and necrosis of synovial line. Sampling site around the proximal component of the joint. Case No. 18, H&E, $\times 200$. (C) Histological grading for tissue necrosis of the sub-intima of SLIM. The tissue sample harvested from around the joint. Case No. 4, H&E, $\times 100$. (D) Complete necrosis of the tissue sample harvested from around the joint. Case No. 4, H&E, $\times 100$. (this paraffin block was not included in the statistical analysis). (E) Grading of size of PE particles in the section. This tissue sample originated from around the joint. Case No. 1, polarization $\times 400$. Small particles are indicated by blue arrows, medium-size PE particles by white arrow and large particles by red arrow. (F) Tissue from site 1 (pseudosynovial tissue) with the massive accumulation of metal debris. Case No. 3, H&E, $\times 400$. (G) Macrophages with phagocytized metal debris represented by black crumbled particles. The tissue sample originates from around the distal component of TKA. Case No. 5, H&E, $\times 400$. (H) The tissue sample from around the proximal component of cemented TKA with cement remnants or fragments of osseous debris (white arrow). Case No. 16, H&E, $\times 400$. (I) Perivascular lymphocytic infiltrate and small black particles in surrounding tissue. Case No. 5, H&E, $\times 200$. (J) Tall endothelial cells (white arrows) with scarce distribution of lymphocytes around the venule. The sample from around the proximal component, case No. 5, H&E, $\times 200$. (K) The eosinophil in the one high-power field (white arrow). The presence of eosinophils in the tissue sample from around the proximal component of the THA was scored as rare. Case No. 14, H&E, $\times 400$. (L) Mast cells were detected with Tryptase cytoplasmic positivity using immunohistochemistry and are indicated by white arrows. This sample retrieved from around the joint was scored as rare. Case No. 14, $\times 400$. (M) Mast cells in tissue sample scored as moderate. Case No. 18, $\times 400$. (N) Mast cells in tissue sample scored as frequent. Case No. 8, $\times 400$.

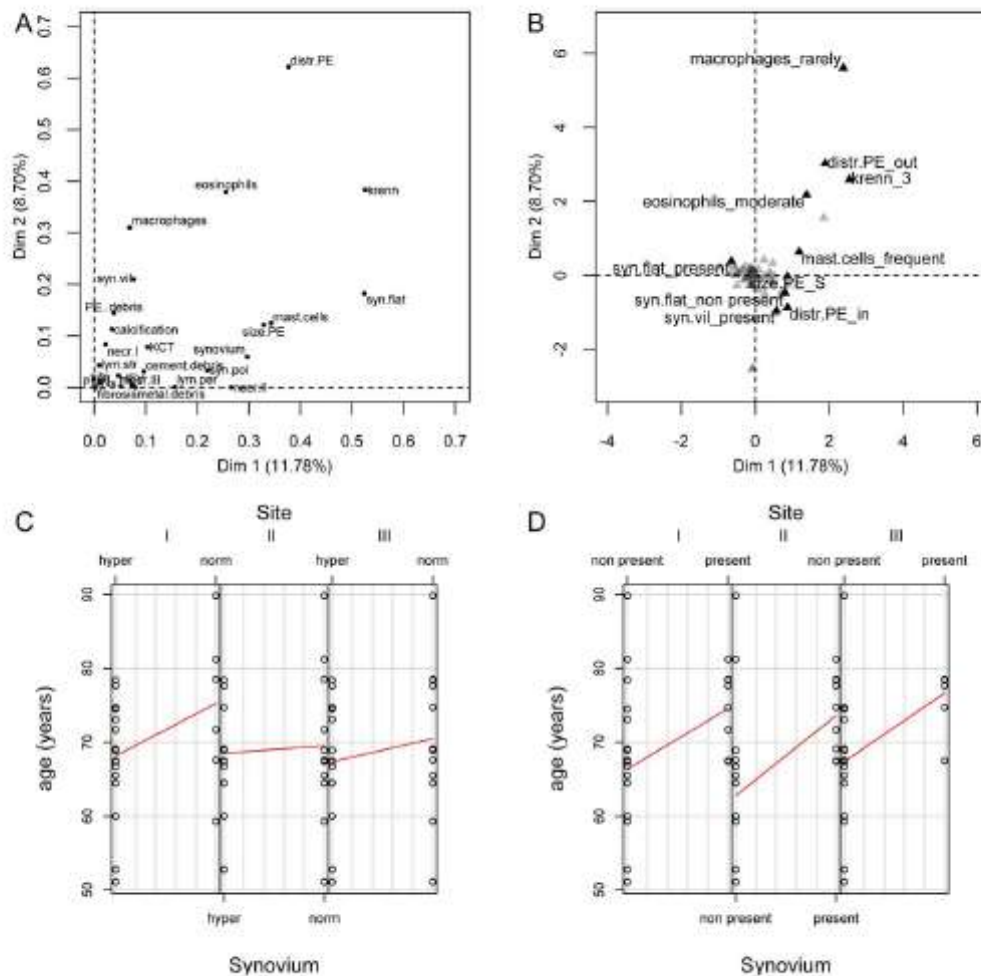


FIGURE 2. (A, B) Multiple correspondence analysis: projection of the multi-dimensional space into the 2D alongside the axes describing the highest percentage of variability with 10 categories (variable levels) most contributing to the construction of the model highlighted. Categories with similar scores on the main axes tend to be associated, categories with dissimilar scores indicate that the individuals form distinct groups according to the particular category of the variable. (C) Association of the synovial hyperplasia with the sampling site. As is apparent, the synovial hyperplasia is highlighted in samples from site 1 (pseudosynovial tissue). (D) Association of the age of patients and presence of metal debris with the individual sites. The tissue samples from older patients contained higher amounts of metal particles.

relevant to older patients (Figures 1E,G and 2D). With use of cemented implants, remnants of the bone cement particles (contrast agents such as barium sulphate, zirconium dioxide) that were not dissolved during tissue processing were observed as very small black debris or by black-bordered particles resembling empty granules (Figure 1H). All of the tissue samples showed similar presence of morphology and distributions of artificial particles. Wear particles were observed mostly in the sub-intima and their quantity decreased with the distance from the tissue surface.

No differences between the three sampling sites were also verified for lymphocytes, eosinophils and mast cells. Eosinophils were distributed mostly rarely (1–6 eosinophils in 20 HPFs, Figure 1K) while mast cells were found more

frequently (the range 5–195/20 HPFs, Figures 1L–N) and were distributed evenly, not in association with the zonal organization within the tissue. The significant higher density of tall endothelial venules was present in tissues from around the cemented TJA, but there was no association with the sampling sites.

Multi-variate analysis

Plot 2A represents the two-dimensional projection of the multi-dimensional space defined by the variables; the percentages adjacent to the resulting two dimensions describe the percentage of the variability explained by the particular axis. The variables with the highest scores on the axes are the variables most represented by the model—as is

TABLE V. Frequencies of Particular Morphological Features and Their Association (Evaluated by $\chi^2 d$ Test) with the Sampling Site

Parameter/Site	Site 1	Site 2	Site 3	Chi-squared <i>p</i>
KRENN				0.657
Krenn_1	71.429	76.316	84.211	-
Krenn_3	4.762	5.2632	5.263	-
Krenn_4	23.810	18.421	10.526	-
SYNOVIUM				0.038*
Hyper	73.810	47.368	52.632	-
Norm	26.191	52.632	47.368	-
SYNOVIUM FLAT				0.622
Non present	47.620	36.842	42.105	-
Present	52.381	63.158	57.895	-
SYNOVIUM VILLOUS				0.683
Non present	80.952	76.316	84.211	-
Present	19.048	23.684	15.789	-
SYNOVIUM POLYPOID				0.693
Non present	40.476	44.737	50	-
Present	59.524	55.263	50	-
NECROSIS I				0.567
Non present	28.571	18.421	23.684	-
Present	71.429	81.579	76.316	-
NECROSIS II				0.343
Non present	45.238	47.368	60.526	-
Present	54.762	52.632	39.474	-
NECROSIS III				0.124
Non present	88.095	97.368	97.368	-
Present	11.905	2.632	2.632	-
CALCIFICATION				0.346
Non present	40.476	36.842	36.842	-
Present	59.524	63.158	63.158	-
HIGH ENDOTHELIAL VENULES				0.927
Non present	57.143	76.316	63.158	-
Present	42.857	23.684	36.842	-
FOREIGN BODY REACTION				0.188
Non present	14.286	28.947	26.316	-
Present	85.714	71.053	73.684	-
LYMPH. STROMAL				0.246
Non present	45.238	44.737	31.579	-
Present	54.762	55.263	68.421	-
LYMPH. PERIVAS				0.205
Non present	16.667	31.579	36.842	-
Present	83.333	68.421	63.158	-
MACROPHAGES				0.359
Clusters	28.571	34.211	18.421	-
Diffuse	71.429	65.789	78.947	-
Rare	0	0	2.632	-
EOSINOPHILS				0.781
Frequent	2.381	5.263	2.632	-
Moderate	9.524	2.632	5.263	-
Non present	30.952	34.210	42.105	-
Rare	57.143	57.895	50	-
MAST CELLS				0.839
Frequent	14.286	18.421	15.789	-
Moderate	40.476	34.210	28.947	-
Rare	45.238	47.368	55.263	-
PMNs				0.925
Non present	78.571	81.579	81.579	-
Rare	21.429	18.421	18.421	-
METAL DEBRIS				0.14
Non present	69.048	55.263	76.316	-
Present	30.952	44.737	23.684	-
CEMENT DEBRIS				0.536
Non present	80.952	89.474	86.842	-
Present	19.048	10.526	13.158	-

TABLE V. Continued

Parameter/Site	Site 1	Site 2	Site 3	Chi-squared p
PE DEBRIS				0.992
Non present	16.667	15.789	15.789	-
Present	83.333	84.211	84.211	-
SIZE OF PE DEBRIS				0.778
Non present	4.762	5.263	10.526	-
S	30.952	28.947	26.316	-
SM	4.762	0	2.632	-
SML	59.524	65.789	60.526	-
DISTRIBUTION PE				0.704
In	21.429	21.053	18.421	-
In-out	73.810	65.789	68.421	-
Non present	4.762	5.263	10.526	-
Out	0	7.895	2.632	-
FIBROSIS				0.346
Non present	0	0	2.632	-
Present	100	100	97.368	-

Legend: PMN= polymorphonuclear neutrophils; PE = polyethylene; S = small; SM = small, medium; SML = small, medium, large; Necrosis I = necrosis of the synovium; Necrosis II = necrotic areas in the second zone; Necrosis III = necrotic areas in the third zone; *Statistically significant at $p < 0.05$ for synovial hyperplasia in the tissue samples harvested from site 1 (pseudosynovial tissue).

apparent that the variable *site* is one of the least represented, hence, the overall variability of the data can be easily explained without taking this variable into account. The most well-represented variables have no association with the factor *site*, as confirmed by the series of χ^2 goodness-of-fit tests, the only variable associated with this factor is *synovium*. Figure 2B describes a similar situation; however, this one is not focused on variables but on their most contributing categories in particular; for the sake of clarity, only ten most contributing categories were plotted. As is apparent again, none of the categories of the *site* factor ranks among the most contributing ones nor is it in any association with the most contributing categories. High scores of the most contributing categories are explainable by their association with other categories—for example, Krenn's classification was strongly associated with PE distribution, however, none of these variables showed any difference concerning the three sites of sampling. Table V shows frequencies of the particular categories according to the three sampling sites—as is apparent, no other variable showed any significant association with this variable, apart from the mentioned case of *synovium* ($p = 0.038$).

DISCUSSION

This study shows relatively small variances in the periprosthetic tissues retrieved from a single patient with an aseptically loosened TJA. The intraindividual similarity was consistent in terms of the sampling site, cell profile, and tissue structure except the synovial hyperplasia. Further, we found interindividual differences in periprosthetic tissues related to the type of implant fixation (cemented vs. cementless) and patient age.

The histomorphologic classification of periprosthetic tissues is influenced by the quality and the size of the tissue sample and perhaps also by the location of tissue sampling. We and some others^{20,21} have observed significant similarities

among the tissues retrieved from different places in the same patients. The finding of low variability in the periprosthetic tissues harvested from the same joint is not surprising because these tissues face the same particle load, joint fluid waves and/or physical forces. These tissues also have identical genetic and epigenetic background shaping the host immune response. On the other hand, at least one study reports uneven distribution of prosthetic by-products around a joint.²⁰ In addition, there may be intraindividual variations in joint fluid waves/physical stress distribution depending on a particular tissue location around an implant. As a result, some diversity in tissue responses among samples from one patient has been reported by others previously.^{22–24} Further research is needed to examine this question on a larger group of patients with identical implants and bearing pairs.

We examined the joint pseudocapsules and SLIM from different anatomical sites. Our observations of SLIM are in agreement with the histological descriptions in a recent consensus statement.¹⁵ Taken together, this tissue is suitable for the histological examination of aseptically loosened implants as well as septic failed implants.⁶ In the samples from the site 1 (the inner part of the pseudocapsule), we observed a higher incidence of the synovial hyperplasia. The explanation might be associated with the way in which the pseudosynovial tissue reacts to prosthetic by-products and joint fluid waves compared to an interface tissue from other locations. This only variability may be also affected by other factors, including BMI or/and the duration of implant service but we were unable to confirm this in our small group of patients. On the other hand, hyperplasia of the synovial lining cells did not show additional associations with other observed histological findings.

We observed a scarce distribution of eosinophils and a slightly more frequent distribution of mast cells which were dispersed quite evenly in all the tissue samples. Similarly, Solovieva et al.²⁵ found mast cells predominantly within the

cell-rich areas of SLIM while Qui et al.²⁶ described mast cells mainly on the bone surface. The occurrence of mast cells could suggest a type of delayed metal hypersensitivity reaction.²⁷⁻²⁹ Some of the observed histomorphological changes of the tissue samples (e.g. accumulation of macrophages, fibrinous or necrotic exudate, perivascular inflammatory infiltrate) appear to be similar to the adverse tissue reactions reported in some patients with metal-on-metal TJA.^{30,31} At least one study suggests that the particle size and load might be more important than the wear particle composition in aseptic loosening and periprosthetic osteolysis.⁸ However, this work did not focus on the association of morphological patterns with reaction to metallic ions/debris. In our cases, metal particles were found in 33% of tissue samples contrary to other study with the absence of metal particles in the surrounding tissues in metal-on-polyethylene implants.³² Metal spreading from non-metal-on-metal TJA could be associated with head-neck modularity in our cases at least partly which was identified as an important source of metallic debris/ions.¹⁰ We observed a substantial number of samples with strong presence of metal debris (14/39) but we did not find a corresponding tissue response in terms of increased presence of lymphocytes^{29,33} even with other observed parameters. The metal debris did not influence the occurrence of eosinophils, mast cells or lymphocytes. However, as we observed metal particles at light microscopy we cannot exclude the possibility that the very small undetectable metal particles were present in the analyzed tissues.³⁴ These can be detected using special identifying techniques as mass spectrometry, X-ray spectroscopy or scanning electron microscopy.^{8,32,34,35}

Our study has several limitations. The main limitation was the small number of the patients included, and the variable size of tissue samples which in addition were relatively often at least partially necrotic. Despite this, all the tissue samples were processed and histologically examined. Finally, two representative paraffin blocks from each sample were selected for statistical analysis to guarantee even conditions. We did not determine the particle characteristics to be able to correlate them with the observed histological findings. This could make interpretation of the tissue response to prosthetic by-products more accurate and appropriate.³⁴ However, as the main goal of the study was to evaluate the intraindividual variability of the periprosthetic tissues, we assumed that the sampled tissues were burdened with a similar or identical particle load; this was in contrast to studies examining interindividual variability. We collected the samples during reoperations without any imaging navigation using the map of tissue sampling from three sampling places as described above. We tried to reduce the differences related to the sampling technique by employing the same surgeon who retrieved all the examined tissues. In the case of metal-on-metal arthroplasties, sampling with magnetic resonance imaging guidance could be more suitable for precise histological analysis as it could help with the tissue identification of corrosion products.^{12,13} However, that was not the point of our study.

CONCLUSION

Histopathological variability observed in the tissues from three various sampling sites retrieved from a single patient is relatively low. Our data indicate that the particular sampling site does not influence the results of examination, and two tissue samples from any anatomical site around the joint could be sufficient for the precise histomorphological analysis.

The only association with the sampling site found was the presence of synovial hyperplasia in tissue samples from around the joint. We also found some associations but without connection to the sampling site: (a) higher density of the tall endothelial cell venules in patients with cemented TJA; (b) older patients displayed an association with higher content of metal debris; (c) tissues from around the TJA with higher wear rate contains an abundance of PE particles.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martin Hobza, MD for his contribution to the collection of clinical and implant data.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any competing interests related to the manuscript.

AUTHORS CONTRIBUTION

JV performed tissue processing of all the samples, collected all the histopathological data, and contributed importantly to the writing of the manuscript. JG gave the ideas, sampled tissues, obtained clinical and operative data; he also contributed importantly to the writing of the manuscript and edited final version. PH, JD performed histopathological evaluation/interpretation, and contributed to the writing of relevant parts of the manuscript. OM performed the entire statistical analysis. SBG helped in formulating the study and in manuscript writing. All the authors read the manuscript and gave final approval for publication.

REFERENCES

1. Khan M, Osman K, Green G, Haddad FS. The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: Avoiding your next revision. *Bone Joint J* 2016;98-B(1 Suppl A):105-112.
2. Bozic KJ, Kamath AF, Ong K, Lau E, Kurtz S, Chan V, Vail TP, Rubash H, Berry DJ. Comparative epidemiology of revision arthroplasty: Failed the poses greater clinical and economic burdens than failed TKA. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473(6):2131-2138.
3. Gallo J, Goodman SB, Kontinen YT, Raska M. Particle disease: Biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun* 2013;19(2):213-224.
4. Greenfield EM. Do genetic susceptibility, toll-like receptors, and pathogen-associated molecular patterns modulate the effects of wear? *Clin Orthop Relat Res* 2014;472(12):3709-3717.
5. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol* 1999;52(2):118-123.
6. Bori G, Munoz-Mahamad E, Garcia S, Mallofre C, Gallart X, Bosch J, Garcia E, Riba J, Mensa J, Soriano A. Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Mod Pathol* 2011;24(4):579-584.
7. Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O'Neil DA, Harris WH. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in

- loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65(5):575-584.
8. Grosse S, Haugland HK, Lillemor P, Ellison P, Hallan G, Hol PJ. Wear particles and ions from cemented and uncemented titanium-based hip prostheses—a histological and chemical analysis of retrieval material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015;103(3):709–17.
 9. Bos I, Willmann G. Morphologic characteristics of periprosthetic tissues from hip prostheses with ceramic-ceramic couples: A comparative histologic investigation of 18 revision and 30 autopsy cases. *Acta Orthop Scand* 2001;72(4):335–42.
 10. Whitehouse MR, Endo M, Zachara S, Nielsen TO, Greidanus NV, Maas BA, Garbuz DS, Duncan CP. Adverse local tissue reactions in metal-on-polyethylene total hip arthroplasty due to trunnion corrosion: The risk of misdiagnosis. *Bone Joint J* 2015;97-B(8):1024–30.
 11. Watters TS, Cardona DM, Menon KS, Vinson EN, Bolognesi MP, Dodd LG. Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion: A clinicopathologic review of an underrecognized cause of prosthetic failure. *Am J Clin Pathol* 2010;134(6):886–893.
 12. Perino G, Ricciardi BF, Jarabek SA, Martignoni G, Wilner G, Maass D, Goldring SR, Purdue PE. Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: A morphological and immunohistochemical study. *BMC Clin Pathol* 2014;14:39.
 13. Ricciardi BF, Nocon AA, Jarabek SA, Wilner G, Kaplowitz E, Goldring SR, Purdue PE, Perino G. Histopathological characterization of corrosion product associated adverse local tissue reaction in hip implants: A study of 285 cases. *BMC Clin Pathol* 2016;16:3.
 14. Gallo J, Kolar M, Dendis M, Loveckova Y, Sauer P, Zapletalova J, Koukalova D. Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol* 2008;31(1):97–104.
 15. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Haszenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 2014;210(12):779–786.
 16. Esposito C, Maclean F, Campbell P, Walter WL, Walter WK, Bonar SF. Periprosthetic tissues from third generation alumina-on-alumina total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 2013;28(5):860–866.
 17. Campbell P, Ebrahmdadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz HC. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(9):2321–2327.
 18. Team RDC. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: <http://www.r-project.org/>; 2014.
 19. Huxson JJ, Le S, Mazet J. FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining. R package version 1.29. <http://cran.r-project.org/package=FactoMineR> 2015.
 20. Pokorny D, Slouf M, Vesely F, Fulin P, Jahoda D, Sosna A. Distribution of UHMWPE wear particles in periprosthetic tissues of total hip replacements. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2010;77(2):87–92.
 21. Zolotarevova E, Entlicher G, Pavlova E, Slouf M, Pokorny D, Vesely F, Gallo J, Sosna A. Distribution of polyethylene wear particles and bone fragments in periprosthetic tissue around total hip joint replacements. *Acta Biomater* 2010;6(9):3695–3600.
 22. Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Huie P, Sibley R. Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J Biomed Mater Res* 1996;31(3):421–428.
 23. Jones LC, Frondoza C, Hungerford DS. Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components. *J Biomed Mater Res* 1999;48(6):889–898.
 24. Pazzaglia UE, Cociliani L, Wilkinson MJ, Dell'Orbo C. Involvement of metal particles in loosening of metal-plastic total hip prostheses. *Arch Orthop Trauma Surg* 1986;104(3):164–174.
 25. Solovieva SA, Ceponis A, Korhonen YT, Takagi M, Suda A, Eklund KK, Sorsa T, Santavirta S. Mast cells in loosening of totally replaced hips. *Clin Orthop Relat Res* 1998(322):158–165.
 26. Qiu J, Beckman MJ, Qian J, Jiranek W. Simultaneous labeling of mast cell proteases and protease mRNAs at the bone-implant interface of aseptically loosened hip implants. *J Orthop Res* 2005;23(4):942–948.
 27. Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Luqmani R, Ostlere S, Murray DW, Athanasou NA. Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: Evidence for a type IV immune response. *Virchows Arch* 2008;453(5):629–634.
 28. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, Lohmann CH. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 2006;87(1):28–36.
 29. Gontarewicz A, Niggemeyer O, Tharun L, Grancicova L, Ruther W, Zustin J. Morphological study of synovial changes in two-stage reconstructions of the infected hip and knee arthroplasties. *BMJ Open* 2012;2(4):e001467.
 30. Ebrahmdadeh E, Campbell P, Tan TL, Nelson SD, Sangiorgio SN. Can wear explain the histological variation around metal-on-metal total hips? *Clin Orthop Relat Res* 2015;473(2):487–494.
 31. Burkhardt A, Katzer A, Thaler K, Von Baehr V, Friedrich RE, Ruther W, Amling M, Zustin J. Proliferation of the synovial lining cell layer in suggested metal hypersensitivity. *In Vivo* 2011;25(4):679–686.
 32. Lindgren JU, Brismar BH, Wikstrom AC. Adverse reaction to metal release from a modular metal-on-polyethylene hip prosthesis. *J Bone Joint Surg Br* 2011;93(10):1427–1430.
 33. Berstock JR, Baker RP, Bannister GC, Case CP. Histology of failed metal-on-metal hip arthroplasty; three distinct sub-types. *Hip Int* 2014;24(3):243–248.
 34. Xia Z, Ricciardi BF, Liu Z, von Ruhland C, Ward M, Lord A, Hughes L, Goldring SR, Purdue E, Murray D, Perino G. Nano-analyses of wear particles from metal-on-metal and non-metal-on-metal dual modular neck hip arthroplasty. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2017;13(3):1206–1217.
 35. Cooper HJ, Della Valle CJ, Berger RA, Tetreault M, Paprosky WG, Sporer SM, Jacobs JJ. Corrosion at the head-neck taper as a cause for adverse local tissue reactions after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94(18):1655–1661.

Příloha 3



ACTA CHIRURGIAE ORTHOPAEDICAE ET TRAUMATOLOGIAE ČECHOSLOVACA

Vážený pan

Prof. MUDr. Jiří GALLO, PH.D.
Ortopedická klinika LF UP a FNOL
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc

Práce autorů : Vaculová J., Hurník P., Gallo J., Žiak D., Motyka O.

s názvem : **Imunohistochemický průkaz mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních asepticky uvolněných endoprotéz**

byla podrobena recenznímu řízení s tímto výsledkem :

Práce byla přijata k uveřejnění bez dalších úprav. Redakce si vyhrazuje právo k redakčním úpravám rukopisu dle norem platných pro časopis Acta.

Děkuji za spolupráci, s pozdravem

Prof. MUDr. Martin Krbec, CSc.
vedoucí redaktor

V Praze dne 12. 2. 2018.

Manuscript

Imunohistochemický průkaz mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních asepticky uvolněných endoprotéz

Jana Vaculová¹, Pavel Hurník¹, Jiří Gallo², Dušan Žiak³, Oldřich Motyka⁴

Pracoviště:

¹ Ústav patologie Lékařské fakulty OU a Fakultní nemocnice Ostrava, přednosta: doc. MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.

² Ortopedická klinika LF UP v Olomouci, Fakultní nemocnice Olomouc, přednosta: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

³ CGB laboratoř, a.s., primář: MUDr. Dušan Žiak

⁴ Oddělení anorganické analýzy, Centrum nanotechnologií, Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, vedoucí pracoviště: prof. Ing. Jana Seidlerová, CSc.

Korespondující autor:

Korespondující autor:

Prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Ortopedická klinika LF UP v Olomouci, Fakultní nemocnice Olomouc

I. P. Pavlova 6

Olomouc 779 00

jjiri.gallo@volny.cz

ABSTRAKT

Cíl studie

Tato práce se zabývá možnostmi a využitím imunohistochemických metod k průkazu mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních u pacientů s asepticky uvolněnými totálními endoprotézami kolen a kyčlí. Cílem práce bylo kvantifikovat a charakterizovat distribuci mastocytů a dendritických buněk ve vyšetřovaných vzorcích a sledovat statisticky významné vztahy mezi zmíněnými buněčnými populacemi a vybranými parametry charakterizujícími pacienta, implantát či tkáňovou odpověď. Na základě prokázaných zjištění byl zhodnocen možný vztah mastocytů i dendritických buněk k histomorfologickým známkám aseptického uvolnění a přínos použitých imunohistochemických metod.

Materiál a metodika

Byly vyšetřeny periprotetické tkáně od celkem 31 pacientů (17 pacientů s reoperací endoprotézy kyčle, 14 pacientů pro reoperaci endoprotézy kolene). Odebrané vzorky byly pro účely histologického a imunohistochemického vyšetření zpracovány standardním protokolem. K imunohistochemickému průkazu mastocytů byly použity protilátky proti tryptáze a CD117. Dendritické buňky byly detekovány pomocí protilátek S100 a CD1a. Kvantifikace obou buněčných populací byla prováděna ve 20 zorných polích při zvětšení 400x v optickém mikroskopu. Z použitých metod jsme pro statistické hodnocení vybrali metodu senzitivnější. V případě mastocytů se jednalo o tryptázu a u dendritických buněk protilátku proti S100.

Výsledky

Mastocyty i dendritické buňky byly v periprotetických tkáních distribuovány převážně disperzně, ale objevovaly se i ve skupinkách perivazálně nebo v blízkosti nekrotických okrsků. V jednom vyšetřovaném vzorku bylo přítomno průměrně 60 mastocytů a 50 dendritických buněk. Zvýšená denzita mastocytů a dendritických buněk byla asociována s přítomností polypózně utvářené pseudosynoviální membrány a cementovou fixací protéz, tento vztah byl statisticky významný. Korelaci mezi kvantitou sledovaných buněčných populací a charakterem a množstvím sledovaných částic nebylo možno prokázat, protože otěrové částice byly přítomny disperzně ve všech vzorcích. Další statisticky významné vztahy vzhledem k typu materiálu či fixace implantátu, ani ostatním sledovaným histomorfologickým znakům nebyly prokázány. V kontrolní skupině pacientů byla sledována silná denzita mastocytů s minimálním zastoupením dendritických buněk.

Diskuze

Příčinou rozdílů v denzitě S100 pozitivních dendritických buněk mezi kontrolní a vyšetřovanou skupinou pacientů může být aktivace dendritických buněk exogenními či endogenními drahami imunitních procesů probíhajících po implantaci endoprotézy. Statisticky významný vzájemný vztah mastocytů, polypózně utvářené pseudosynoviální membrány a cementových otěrových částic lze vysvětlit jako tkáňovou reakci indukovanou cementovými částicemi.

Závěr

Z uvedených nálezů vyvozujeme závěr o významné funkční spoluúčasti mastocytů a dendritických buněk v patogenezi aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy.

Key words: dendritic cell, mast cell, aseptic loosening, total joint arthroplasty, immune response, adverse reaction

ÚVOD

Aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza patří mezi nejčastější komplikace kloubních náhrad vyžadujících reoperaci. Histologické analýzy periprotetických tkání odebraných během revizí totálních endoprotéz (TEP) potvrzují přítomnost otěrových částic s dominantním obrazem záplavy makrofágů, reakcí kol cizích těles a fibrózou tkáně. Problematikou histomorfologických změn v periprotetických tkáních včetně kvantifikace a distribuce buněčných populací (např. makrofágů, lymfocytů, fibroblastů, osteoblastů) a stanovení biologických mediátorů (např. cytokinů, chemokinů, růstových faktorů) se zabývá řada prací [5, 7, 12-15, 21, 24, 28, 30, 31]. Jejich výsledky ukazují na dominantní roli (lymfocyto-) monocyto-makrofagického systému, receptorů nespecifické imunity a prozánětlivé signalizace. Překvapivě malá pozornost byla dosud věnována tak významným buňkám, jakými jsou mastocyty a dendritické buňky.

Mastocyty jsou unikátní sekretorické buňky o průměru až 20 μm obsahující různé množství intracytoplazmatických granul ohraničených membránou [18]. Hrají zásadní roli při alergických a zánětlivých onemocněních a uplatňují se také při angiogenezi či komunikaci mezi nervovým a imunitním systémem [4]. Patologická akumulace mastocytů bývá přítomna u celé řady onemocnění včetně nádorů [10, 33] a patrně je i rutinní součástí tkáňové odpovědi na přítomnost kloubních náhrad [16, 26]. Aktivací mastocytů dochází k produkci celé škály cytokinů, hydrolytických enzymů, proteoglykanů a biogenních aminů, které se mohou podílet na časně i pozdní tkáňové odpovědi, případně na pozdní alergické odpovědi. Iniciace a následná degranulace mastocytů je možná prostřednictvím vazby antigenu na vysokoafinitní Fc receptory pro IgE, působením anafylatoxinů nebo jejich přímým poškozením např. léčivů [2]. Nezralé mastocyty mají mnohobáňové jádro a granula, čímž připomínají bazofilní granulocyty. Mají však odlišné morfologické vlastnosti a obsahují jiné mediátory (histamin, tryptáza, chymáza, katepsin G, karboxypeptidáza), které regulují imunitní odpověď [9]. Pro přesnou identifikaci mastocytů lze použít speciální histologické a imunohistochemické metody zaměřené na granulární mediátory či exprimované receptory.

Dendritické buňky (DC) jsou nejvýznamnější skupinou antigen-prezentujících buněk. Regulují jak nespecifickou, tak specifickou imunitní odpověď a spoluodpovídají za udržení tkáňové homeostázy [32]. Jsou heterogenní ve smyslu původu, místa výskytu, morfologie a funkce. Mohou být aktivovány endogenními i exogenními podněty přes receptory nacházející se na jejich povrchu či intracelulárně [6]. Po vazbě stimulu na receptory dochází ke zrání DC, které ve zvýšené míře produkují MHC proteiny, kostimulační molekuly (např. CD80, CD86), adhezivní molekuly ale i řadu chemokinů a cytokinů [27]. Vzhledem ke svým „reaktivním vlastnostem“ musí být DC velmi přísně regulovány.

Cílem naší práce bylo vyšetřit periprotetické tkáně a popsat: 1) četnost a charakter distribuce mastocytů; 2) četnost a charakter distribuce dendritických buněk; resp. 3) najít statisticky významné vztahy mezi denzitou sledovaných buněčných populací a vybranými parametry charakterizujícími pacienta, implantát či tkáňovou odpověď (pohlaví, věk, délka nošení implantátu, BMI, typ kloubu, typ fixace, reakce kol cizích těles, polypózní SLIM, nekróza, vysoké cévní endotelie, otěrové částice).

MATERIÁL A METODIKA

Během reoperací asepticky uvolněných TEP kyčle (n=17, 9 žen, 8 mužů) a kolena (n=14, 7 žen, 7 mužů) byly pacientům odebrány periprotetické tkáně, obvykle šlo o membránu nacházející se kolem endoprotézy (tzv. SLIM) a vnitřní list pseudopouzdra. Údaje charakterizující pacienty jsou uvedeny v tabulce 1. Kontrolní skupinu tvořilo 10 poprvé operovaných pacientů a jejich vzorky byly zpracovány stejným protokolem jako tkáně odebrané revidovaným pacientům (viz Tabulka 2). Odběry provedl jeden operatér. Design studie byl schválen lokální EK.

Zpracování vzorků

Vzorky 31 pacientů byly ihned po odběru fixovány 10% formalínem a po makroskopickém posouzení zorientovány, přikrojeny a zpracovány standardní histologickou technikou se zalitím do parafínových bloků. Po základním barvení hematoxylin - eozin byly z každého případu vybrány 2 - 3 reprezentativní bloky a na připravené řezy o síle 3 - 4 μm byly aplikovány imunohistochemické metody.

Imunohistochemické vyšetření

Pro účely imunohistochemie byla aplikována polyklonální protilátka Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 (DAKO, polyklon, synonymum c-kit, tyrozin kinázový receptor) a Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase (DAKO, klon AA1), která je enzymatickou výbavou všech lidských mastocytů.

K detekci dendritických buněk byly použity protilátky Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a (DAKO, klon 010) a Polyclonal Rabbit Anti-S100 (DAKO, polyklon). CD1a patří do povrchových glykoproteinů příbuzných MHC třídě I a s různou intenzitou značí nezralé dendritické a Langerhansovy buňky a kortikální lymfocyty. S100 protein značí Langerhansovy a dendritické buňky, ale také adipocyty, chondrocyty, melanocyty a gliové buňky nervové tkáně. Imunohistochemie byla prováděna optimalizovaným protokolem v automatu Ventana Benchmark XT za výsledného hnědého zbarvení jader/cytoplazmy a/nebo membrány pozitivních buněk, viz Tabulka 2.

Histopatologické hodnocení

Všechny preparáty byly hodnoceny v optickém mikroskopu Olympus BX45 při zvětšení 20x - 400x (Objektiv UPLFFLN40X - UIS2, UPlanFLN, 40x/0,75, oo/0,17/FN26,5). Kvantifikace jednotlivých buněčných typů exprimovaných specifický antigen byla vyjádřena absolutním počtem ve 20 polích při zvětšení 400x (HPF, high power field).

Statistická analýza

K analýze obecných trendů a vztahů mezi proměnnými v souboru dat byla použita Faktorová analýza smíšených dat (FAMD) ve statistickém balíčku pro mnohorozměrnou analýzu dat FactoMineR (Sebastien Le, Julie Josse, Francois Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01). Tato metoda byla

použita z důvodů kombinovaného charakteru datového souboru, který zahrnoval jak kvalitativní, tak kvantitativní proměnné. Pro hodnocení vztahů mezi jednotlivými proměnnými byla užitá analýza variance (ANOVA), případně Studentův t-test v případě analýzy vztahu mezi kvantitativní a kvalitativní proměnnou a Pearsonův korelační koeficient pro analýzu vztahů mezi proměnnými kvantitativními. Všechny analýzy a grafické zpracování výsledků byly provedeny v prostředí statistického programu R (R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.)

VÝSLEDKY

1. Četnost a charakter distribuce mastocytů

Přítomnost mastocytů byla prokázána ve všech vyšetřovaných řezech. Mastocyty byly ve tkáni distribuovány převážně disperzně, pouze v některých preparátech byly nakupeny v blízkosti cév. Intenzita zbarvení cytoplazmy mastocytů byla rovnoměrná, cytoplazmatická exprese byla granulární nebo difuzní a umožňovala přehledné hodnocení. V celém souboru byla sledována výraznější exprese tryptázy než exprese CD117 antigenu, viz Tabulka 3.

2. Četnost a charakter distribuce dendritických buněk

Ve všech vyšetřovaných případech byla sledována výrazná jaderná i cytoplazmatická exprese S100 proteinu a cytoplazmatická a/nebo membránová exprese CD1a u dendritických buněk. Výsledky imunohistochemického vyšetření však ukázaly rozdíly mezi expresí S100 proteinu a antigenu CD1a. Přítomnost CD1a⁺ DC byla prokázána pouze u 10 vyšetřovaných pacientů. V kontrolních vzorcích byla detekována minimální přítomnost DC v obou metodách. Blíže jsou výsledky imunohistochemického vyšetření shrnuty v Tabulce 3. U jednoho pacienta (č. 4) byla pozorována záplava S100⁺ a CD1a⁺ DC nahromaděných v blízkosti aseptické nekrózy. Distribuce S100⁺ DC byla převážně disperzní, pouze ojediněle byly DC shromážděny v izolovaných skupinkách. Vztah denzity S100⁺ DC k přítomnosti polypózně utvářené pseudosynoviální membráně a cementované fixaci TEP se pohyboval na hranici významnosti (Graf 1,2).

3. Vztah mezi denzitou sledovaných buněčných populací a vybranými parametry charakterizujícími pacienta, implantát či tkáňovou odpověď

U TEP fixovaných cementem byla nápadně nižší tkáňová reakce typu kolem cizích těles s nižším počtem mnohojaderných buněk. Mezi denzitou mastocytů a vysokými cévními endoteliemi (HEV, high endothelial venules) ani ložisky nekrózy nebyla prokázána žádná významná asociace. V kontrolní skupině byla exprese tryptázy i CD 117 lehce zvýšená oproti vyšetřované skupině, avšak počet buněk detekovaných ve 20 HPF byl podobný u obou těchto imunohistochemických markerů, viz Tabulka 3. Expresí tryptázy nijak nekorelovala s expresí CD117 antigenu, ale byla signifikantně vyšší u vzorků s polypózně utvářenou pseudosynoviální membránou a u TEP fixovaných cementem (Graf 3,4).

Statistická analýza neprokázala žádný významný vztah dendritických buněk k dalším sledovaným znakům (pohlaví, věk, délka nošení implantátu, BMI, typ kloubu, reakce kol cizích těles, nekróza,

vysoké cévní endotelie, otěrové částice). Mezi densitou S100⁺ DC a tryptáza⁺ mastocytů byla zjištěna slabá, ale signifikantní pozitivní korelace (Graf 5). Neboli, čím více bylo ve vyšetřovaném souboru mastocytů, tím více bylo také DC, což ukazuje na možnou podobnost aktivity těchto buněčných populací. Reprezentativní mikrofotografie znázorňují obrázky 1-8.

DISKUZE

V naší studii jsme zjistili přítomnost mastocytů ve všech vyšetřovaných vzorcích periprotetických tkání. Celkově byla jejich denzita variabilní, mastocyty byly hodnoceny v rozsahu od velmi řídké převážně rovnoměrné distribuce až po velmi výrazné zastoupení 195 buněk ve 20 HPF. V kontrolní skupině byla exprese znaků mastocytů vyšší nežli u případů. Neprokázali jsme vztah mezi densitou mastocytů a typem implantátu či charakteristikami tkáňové odpovědi. Zjistili jsme ale významné rozdíly mezi dvěma imunohistochemickými metodami k průkazu mastocytů (tryptáza x CD117). V případě dendritických buněk byly rozdíly mezi případy a kontrolami výraznější, i když denzita byla v periprotetických tkáních převážně disperzní a neprokázali jsme žádnou významnou asociaci mezi sledovanými parametry a zastoupením dendritických buněk v periprotetických tkáních. Přestože není možné z prostého výskytu mastocytů a dendritických buněk činit závěry pro jejich funkci, je nepochybné, že tyto buňky se spolupodílí na procesech nežádoucí tkáňové odpovědi na přítomnost implantátu.

Klíčovou rolí mastocytů a dendritických buněk jsou startovací a imunomodulační funkce v rámci vrozené i adaptivní imunitní odpovědi. Za fyziologických stavů jsou ve tkáni strategicky rozmístěny jako strážci v neaktivovaném, nezralém stavu a jejich aktivace a zvýšená přítomnost ve tkáni bývá odrazem probíhajících patologických změn [18, 33]. K jejich detekci lze použít speciální histologické nebo imunohistochemické metody. V naší práci byla zvolena protilátka k průkazu tryptázy, která je přítomna ve všech lidských mastocytech, a proto je považována za vysoce specifický a senzitivní marker mastocytů. Protilátka proti antigenu CD117 je rutinně používána k detekci mastocytů, ale i jiných buněčných populací. Naše výsledky ukázaly pozoruhodné rozdíly mezi těmito dvěma imunohistochemickými metodami k průkazu mastocytů (tryptáza x CD117). V souboru případů byla výrazně vyšší exprese tryptázy než CD117, zatímco v kontrolním souboru výsledky obou metod poměrně dobře korelovaly. Vyšší denzitu tryptáza⁺ mastocytů v kontrolních vzorcích oproti vyšetřovanému souboru potvrzuje i předchozí studie [26]. Tryptáza modifikuje řadu koagulačních proteinů a je schopna vyvolat proteolýzu, kolagenolýzu. Slabší než v kontrolním souboru, ale stále dostatečně výrazná distribuce tryptáza⁺ mastocytů ve vyšetřovaném souboru by mohla odpovídat aktivaci a následné degranulaci, tedy uvolnění cytokinů a dalších mediátorů ovlivňujících proces aseptického uvolnění. Někteří výzkumníci dokonce hovoří o burn-out v době odběru tkání k imunohistopatologickému vyšetření [25, 28].

Imunohistochemicky bylo již dříve prokázáno, že tryptáza⁺ mastocyty jsou hlavním zdrojem růstového faktoru fibroblastů (bFGF, basic fibroblast growth factor) u chronických zánětů doprovázených fibrózou, hyperplazií a novotvorbou cév ve tkáni [22]. Zvýšená angiogeneze periprotetických tkání byla v našem souboru také pozorována, avšak její rozsah neměl vztah

k popisovaným buňkám. Naopak, zjistili jsme významnou asociaci mezi denzitou mastocytů a polypózně utvářenou pseudosynoviální membránou.

DC byly rozptýleny ve tkáni náhodně a nebyla prokázána jejich asociace k přítomnosti otěrových částic dokonce ani kovových, které jsou stále diskutovaným iniciátorem pozdní imunitní reakce a v níž mají mastocyty důležitou úlohu.

Zatímco tryptáza je výhradním markerem všech aktivovaných mastocytů, CD117 může být produkována hematopoetickými kmenovými buňkami, melanocyty, Cajalovými buňkami, zárodečnými buňkami, buňkami bazálních vrstev kůže a duktálními epitelii prsu [10, 18]. Schopnost slabě exprimovat CD117 byla nedávno dokázána i u některých populací dendritických buněk [23]. Nízkou expresí CD117 v našem souboru lze vysvětlit tím, že CD117 značí zralé mastocyty, které se v tomto typu tkáni téměř nevyskytují. Ačkoli je denzita mastocytů v periprotetických tkáních vysoká, nemusí být zrovna ve fázi detekovatelné protilátkou CD117. Průkaz mastocytů se ukazuje spolehlivější s použitím protilátky proti tryptáze, což je znázorněno v tabulce 3, kde je vyjádřen absolutní průměrný počet pozitivních buněk.

Vzhledem k několika typům a stádiím DC je obtížné určit jeden charakteristický marker pro jejich identifikaci. DC jsou funkčně, vývojově i fenotypicky jedinečné buňky, k jejichž aktivaci dochází přes řadu receptorů, nejčastěji TLR. V aseptických periprotetických tkáních byly aktivované TLR popsány u DC, makrofágů, lymfocytů, fibroblastů, osteoblastů a osteoklastů [8, 14, 20]. TLR1/2 a TLR6 dendritických buněk jsou aktivovány strukturami polyetylenových částic, ale i vnitřními drahami fagocytózou poškozené buňky a slouží jako induktory zánětu produkující zejména interleukiny [8, 17, 19]. K rozpoznání cizorodého biomateriálu však mohou DC použít i jiné receptory (např. CLR, FcR, CR, integriny a další), z nichž některé nejsou specifické výhradně pro DC. Jedná se například o receptor CCR4 (TH2 lymfocyty, NK lymfocyty, monocyty), CCR6 (T lymfocyty, B lymfocyty), CX3R1 (TH1 lymfocyty, Th17 lymfocyty, NK lymfocyty, monocyty) a CCR2 (T lymfocyty, B lymfocyty, NK lymfocyty, fibroblasty). Stimulace těchto receptorů indukuje tvorbu zánětlivých cytokinů a chemokinů [3, 6, 11]. Mnohé z výše uvedených markerů lze detekovat jedinečně průtokovou cytometrií, imunofluorescencí či PCR metodami [1]. Pro účely imunohistochemie nejsou doposud mnohé markery stále dostupné. Přesto je imunohistochemický průkaz DC nejlepší volbou pro možnost srovnání cytomorfologického obrazu, jejich distribuce a tkáňové denzity. K imunohistochemické detekci DC byly pro naše účely vybrány protilátky S100 a CD1a, jejichž hodnocení bylo založené nejen na pozitivní expresi konkrétních antigenů, ale také na jejich nezaměnitelných cytomorfologických znacích.

Histopatologické hodnocení ukázalo rozdíly mezi výsledky použitých metod s dominantní expresí S100 proteinu, který značil všechny dendritické buňky. Nepoměr mezi denzitou S100⁺ a CD1a⁺ DC lze vysvětlit tím, že zralá stadia DC neexprimují antigen CD1a, jsou tedy CD1a⁻. Vyšší přítomnost zralých DC by mohla znamenat aktivaci DC některým z výše popsaných mechanismů. Při hodnocení denzity S100⁺ a CD1a⁺ DC ve vyšetřovaném souboru nebyla prokázána vzájemná závislost. Imunohistochemické studie zaměřené na DC ukazují, že obecně je denzita DC vyšší v patologicky změněných tkáních [29], což je v souladu s našimi nálezy. V kontrolním souboru byly S100⁺ a CD1a⁺ DC zastoupeny minimálně.

Vzhledem ke slabé pozitivní korelaci S100⁺ DC a tryptáza⁺ mastocytů lze usuzovat na jejich vzájemnou součinnost v procesu aseptického uvolnění. Vyšší přítomnost mastocytů v kontrolní skupině lze vysvětlit jiným typem zánětlivé reakce, která doprovází terminální stadium osteoartrózy. Vedle hlavní role vrozené imunitní reakce se mohou zralé DC jako antigen prezentující buňky účastnit společně s mastocyty také pozdní reakce přecitlivělosti, zejména v případě tkáňové reakce na kovové částice [19][16]. V naší studii se statisticky významná asociace dendritických buněk s kovovými částicemi nepotvrdila, zřejmě pro nízkou zátěž tkání kovovými částicemi/ionty. Vztah k přítomnosti cementových částic byl pouze na hranici signifikance.

Naše studie má několik omezení. Měli jsme k dispozici omezené množství případů a kontrol. Ačkoliv má většina podobných studií stejný nebo dokonce nižší počet případů, je evidentní, že pro multivariační analýzy by byl výhodnější větší počet pacientů. Dále by bylo nesporně přínosem, kdybychom měli homogennější skupiny případů nejméně z pohledu typu implantátu, resp. rozložení případů z pohledu délky protézy in situ. U pozdních selhání se do procesů nežádoucích tkáňové odpovědi promítají také senescenční buněčné děje, jako např. aktivace signálních drah směřujících k apoptóze buňky či aseptická nekróza, které mohou významně omezovat validitu imunohistochemického průkazu konkrétních antigenů. Výsledky imunohistochemie přímo závisí na důsledném dodržování postupů preanalytické i analytické fáze. Zde jsme se snažili eliminovat rizika okamžitou a správnou fixací tkáně, dostatečnou optimalizací antigenů a použitím senzitivních detekčních systémů. Interpretace výsledků by dále mohla být ovlivněna výběrem protilátek a jejich klonů. Pro optimální výsledky je proto důležité dál hledat protilátky s maximální možnou senzitivitou a specifitou. V neposlední řadě by bylo možno získat kombinací simultánního imunohistochemického barvení (2 nebo 3 protilátky současně) přehled o distribuci a vzájemném vztahu buněk či jejich mediátorů v jednom tkáňovém řezu.

ZÁVĚR

Tato práce popisuje distribuci a denzitu mastocytů a dendritických buněk v periprotetických tkáních získaných při revizi asepticky uvolněných endoprotéz kolena a kyčle. Nejvýraznějším zjištěním bylo nalezení statisticky významného vztahu mezi denzitou mastocytů a polypózním utvářením pseudosynoviální tkáně a cementovanou endoprotézou. Výsledky použitých imunohistochemických metod ukázaly, že k průkazu mastocytů v periprotetických tkáních je spolehlivější a vhodnější použití tryptázy než CD117. Stejně tak v průkazu DC je lepší použití protilátky S100. Nález imunologicky významných populací v okolí implantátu je nespornou známkou jejich funkčního postavení. To však bude nutné studovat jiným způsobem a jinými metodami.

Poděkování: Studie byla podpořena z prostředků MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

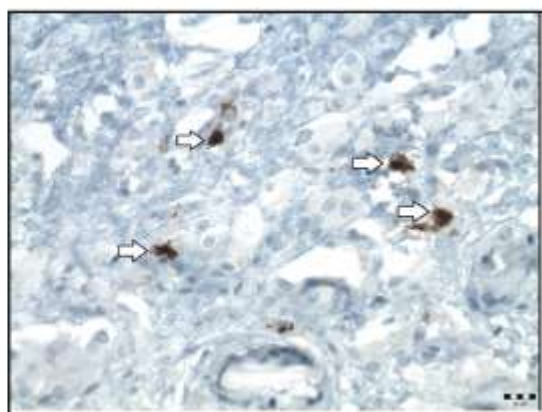
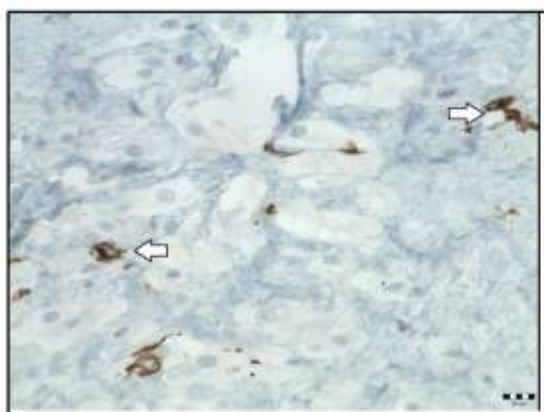
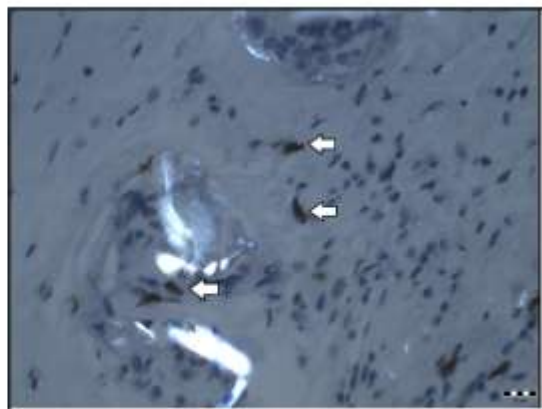
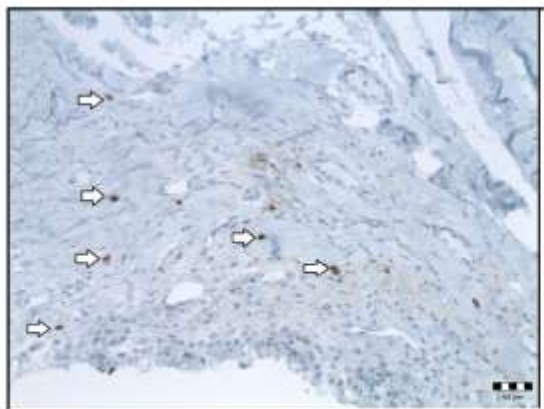
LITERATURA

1. Breton G, Lee J, Liu K, Nussenzweig MC. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat Protoc.* 2015;10:1407-1422.
2. Cildir G, Pant H, Lopez AF, Tergaonkar V. The transcriptional program, functional heterogeneity, and clinical targeting of mast cells. *The Journal of experimental medicine.* 2017;214:2491-2506.

3. Dyskova T, Gallo J, Kriegova E. The Role of the Chemokine System in Tissue Response to Prosthetic By-products Leading to Periprosthetic Osteolysis and Aseptic Loosening. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1026.
4. Galdiero MR, Varricchi G, Seaf M, Marone G, Levi-Schaffer F, Marone G. Bidirectional Mast Cell-Eosinophil Interactions in Inflammatory Disorders and Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:103.
5. Gallo J, Luzna P, Holinka M, Ehrmann J, Zapletalova J, Lostak J. [Validity of the Morawietz classification for evaluation of periprosthetic tissue]. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2015;82:126-134.
6. Gallo J, Raska M, Kriegova E, Goodman SB. Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. *J Orthop Translat*. 2017;10:52-67.
7. Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, Sibley R. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1998;80:531-539.
8. Gu Q, Shi Q, Yang H. The role of TLR and chemokine in wear particle-induced aseptic loosening. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:596870.
9. Guilarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The Mast Cell, Contact, and Coagulation System Connection in Anaphylaxis. *Frontiers in immunology*. 2017;8:846.
10. Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*. 2012;37:25-33.
11. Hallab NJ, Jacobs JJ. Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:5.
12. Imai S, Konttinen YT, Jumppanen M, Lindy O, Ceponis A, Kempainen P, Sorsa T, Santavirta S, Xu JW, Lopez-Otin C. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1998;80:701-710.
13. Konttinen YT, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainola M, Li TF, Virtanen I, Liljestrom M, Sakai H, Kobayashi Y, Sorsa T, Lappalainen R, Demulder A, Santavirta S. Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16:1780-1786.
14. Lahdeoja T, Pajarinen J, Kouri VP, Sillat T, Salo J, Konttinen YT. Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28:184-190.
15. Landgraeber S, Loer F, Heep H, Classen T, Grabellus F, Totsch M, von Knoch M. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b and C-terminal telopeptides of type I collagen as markers for diagnosis of aseptic loosening after total hip replacement. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2010;130:441-445.
16. Lennox DW, Schofield BH, McDonald DF, Riley LH, Jr. A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit, and biologic ingrowth prostheses. *Clinical orthopaedics and related research*. 1987:171-191.
17. Maitra R, Clement CC, Scharf B, Crisi GM, Chitta S, Paget D, Purdue PE, Cobelli N, Santambrogio L. Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis. *Molecular immunology*. 2009;47:175-184.
18. Marichal T, Tsai M, Galli SJ. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res*. 2013;1:269-279.

19. Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao AJ, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen YT, Goodman SB, Gallo J. Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. *Journal of biomedical materials research. Part A.* 2013;101:3033-3045.
20. Pajarinen J, Jansen E, Konttinen YT, Goodman SB. Innate immune reactions in septic and aseptic osteolysis around hip implants. *Journal of long-term effects of medical implants.* 2014;24:283-296.
21. Perino G, Ricciardi BF, Jerabek SA, Martignoni G, Wilner G, Maass D, Goldring SR, Purdue PE. Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. *BMC Clin Pathol.* 2014;14:39.
22. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *The American journal of pathology.* 1995;147:564-573.
23. Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;1183:104-122.
24. Ricciardi BF, Nocon AA, Jerabek SA, Wilner G, Kaplowitz E, Goldring SR, Purdue PE, Perino G. Histopathological characterization of corrosion product associated adverse local tissue reaction in hip implants: a study of 285 cases. *BMC Clin Pathol.* 2016;16:3.
25. Shanbhag AS, Kaufman AM, Hayata K, Rubash HE. Assessing osteolysis with use of high-throughput protein chips. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* 2007;89:1081-1089.
26. Solovieva SA, Ceponis A, Konttinen YT, Takagi M, Suda A, Eklund KK, Sorsa T, Santavirta S. Mast cells in loosening of totally replaced hips. *Clinical orthopaedics and related research.* 1996:158-165.
27. Thwe PM, Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Lett.* 2017;412:236-242.
28. Tomankova T, Kriegova E, Fillerova R, Luzna P, Ehrmann J, Gallo J. Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in primary knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2014;22:1851-1860.
29. Vitte F, Fabiani B, Benet C, Dalac S, Balme B, Delattre C, Vergier B, Beylot-Barry M, Vignon-Pennamen D, Ortonne N, Algros MP, Carlotti A, Samaleire D, Frouin E, Levy A, Laroche L, Theate I, Monnier F, Mugneret F, Petrella T. Specific skin lesions in chronic myelomonocytic leukemia: a spectrum of myelomonocytic and dendritic cell proliferations: a study of 42 cases. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:1302-1316.
30. Whitehouse MR, Endo M, Zachara S, Nielsen TO, Greidanus NV, Masri BA, Garbus DS, Duncan CP. Adverse local tissue reactions in metal-on-polyethylene total hip arthroplasty due to trunnion corrosion: the risk of misdiagnosis. *The bone & joint journal.* 2015;97-B:1024-1030.
31. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, Lohmann CH. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* 2005;87:28-36.
32. Wu DD, Li T, Ji XY. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *Journal of immunology research.* 2017;2017:3591248.
33. Zhan HX, Zhou B, Cheng YG, Xu JW, Wang L, Zhang GY, Hu SY. Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett.* 2017;392:83-93.

Obrázky 1 – 4 (zleva doprava):



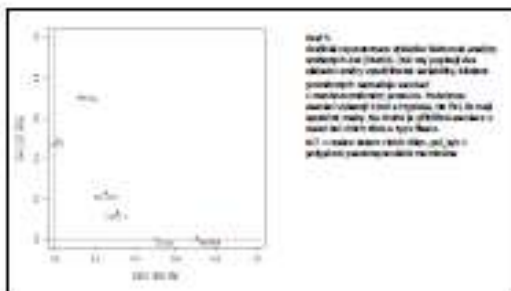
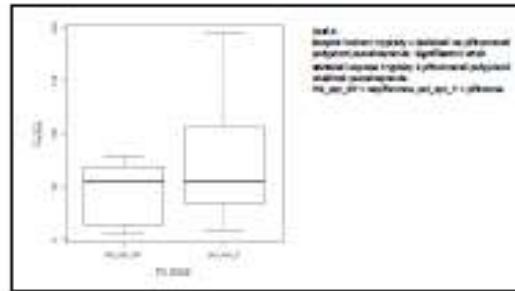
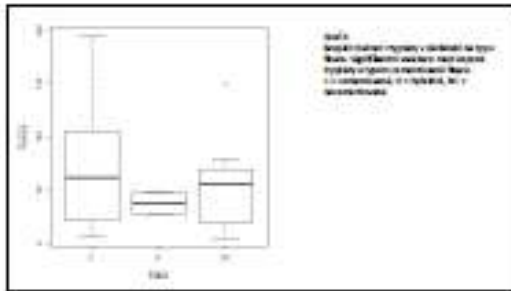
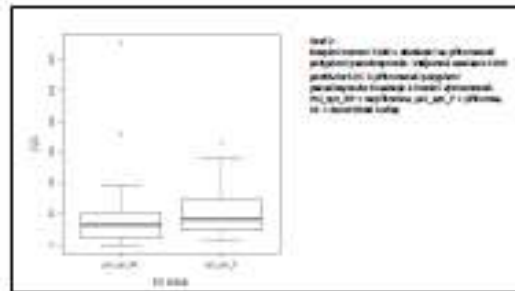
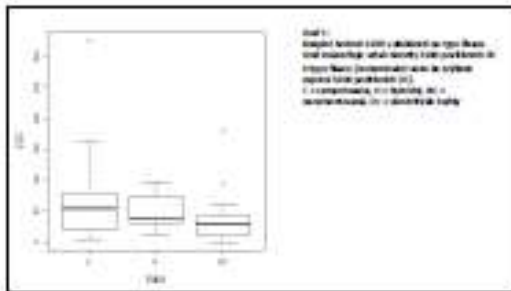
Obrázek 1: Pozitivní exprese tryptázy v cytoplasmě mastocytů (šipky). Ve spodní části obrázku superficiální pseudosynoviální vrstva. Pacient č. 3, tryptáza, 200x

Obrázek 2: Cytoplazmatická a membránová pozitivita CD117 v mastocytech (hnědé zbarvení, šipky) a obrovské světlé polyetylenové částice. Pacient č. 5, CD117, polarizace 400x.

Obrázek 3: Průkaz dendritických buněk exprimujících CD1a (šipky), ve tkáni volně roztroušeny makrofágy s výraznými jádry. Pacient č. 8, CD1a, 400x.

Obrázek 4: Dendritické buňky (šipky) v terénu velkých polyetylenových částic a okolní makrofagickou reakcí. Pacient č. 24, S100, 400x.

Grafy:



Tabulky 1 – 3:

Tabulka 1 Seznam pacientů

Pořadové číslo pacienta	Pohlaví	Kloub	Délka nošení implantátu (roků)	Věk	BMI	Typ fixace	Kloubní pár	Metalóza makroskopicky
1	ž	koleno	12,1	89,8	22,5	C	MoP	ne
2	ž	kyčel	19,1	51,1	22	NC	MoP	ne
3	m	koleno	14,2	78,5	22,7	C	MoP	ne
4	ž	koleno	16,1	65,5	30,8	C	MoP	ne
5	ž	koleno	16,5	77,6	34,9	C	MoP	ano
6	m	koleno	1,2	69,1	39,6	C	MoP	ne
7	m	kyčel	4,2	74,7	22,6	C	MoP	ne
8	ž	koleno	16,8	64,5	36,5	C	MoP	ano
10	m	koleno	2,3	66,7	35,9	C	MoP	ne
11	m	kyčel	18,2	68,9	34,1	NC	CoP	ne
14	m	kyčel	17,0	59,3	32,8	NC	MoP	ne
15	ž	kyčel	16,1	67,6	21,5	NC	MoP	ne
16	ž	koleno	10,8	67,5	29,7	C	MoP	ne
17	m	koleno	16,7	78,4	27,8	C	MoP	ne
18	m	kyčel	11,6	74,5	30,3	NC	MoP	ne
19	ž	kyčel	21,4	73,1	29,5	NC	MoP	ne
20	ž	kyčel	13,5	60,0	34,1	H	CoP	ne
21	ž	kyčel	12,5	67,4	30,9	NC	CoP	ne
22	m	kyčel	14,0	52,8	26,2	NC	MoP	ne
23	ž	koleno	16,8	85,4	25,0	C	MoP	ne
24	ž	kyčel	20,0	74,5	24,1	NC	MoP	ne
25	ž	kyčel	18,7	81,3	20,4	H	MoP	ne
26	m	koleno	14,7	74,1	25,4	C	MoP	ne
27	m	kyčel	11,5	60,1	26,6	NC	MoP	ne
28	m	kyčel	10,3	81,9	26,3	H	MoP	ano
29	ž	kyčel	19,8	69,5	27,9	NC	MoP	ne
30	m	koleno	15,6	71,4	30,6	C	MoP	ne
31	ž	koleno	18,6	85,1	31,6	C	MoP	ne
32	m	koleno	4,8	58,0	35,9	C	MoP	ne
60	m	kyčel	12,6	81,2	27,1	C	MoP	ano
61	ž	kyčel	18,3	71,7	38,2	NC	MoP	ne

Vysvětlivky: ž = žena, m = muž, C = cementovaná, NC = necementovaná, H = hybridní, MoP = kov-polyetylen, CoP = keramika-polyetylen

Tabulka 2 Použití protilátek a protokol ve Ventana Benchmark XT

Primární protilátka	Detekce	Ředění	Inkubace	Protokol, provedení
CD117	Mastocyty	1:400	30 min, pokojová teplota	CC1 standard
				iVIEW DAB Detection Kit
Tryptase	Mastocyty	1:100	30 min, pokojová teplota	CC1 standard
				iVIEW DAB Detection Kit
S100	Dendritické buňky	1:600	15 min, pokojová teplota	CC1 standard
				iVIEW DAB Detection Kit
CD1a	Dendritické buňky	ready-to-use	30 min, pokojová teplota	CC1 standard
				iVIEW DAB Detection Kit

Tabulka 3 Počet pozitivních buněk ve 20 HPF

Kvantifikace		Nejnižší počet buněk v jednom preparátu	Nejvyšší počet buněk v jednom preparátu	Průměrný počet buněk u jednoho pacienta
Protilátka				
Revidovaní pacienti	Tryptase +	5	195	60
	CD117 +	1	85	22
	S100 +	1	327	50
	CD1a +	0	420	8
Kontrolní skupina	Tryptase +	74	183	124
	CD117 +	61	170	106
	S100 +	2	10	3
	CD1a +	0	2	-

Příloha 4

Notification to co-authors of submission to BMC Clinical Pathology CPAT-D-17-00042

em.cpat.0.57268b.4a55196e@editorialmanager.com za uživatele BMC Clinical Pathology - Editorial Office [em@editorialmanager.com]

Odesláno: 10. listopadu 2017 23:09

Komu: Vaculová Jana, Mgr.

CPAT-D-17-00042

A Diagnostic Approach for the Histological Particle Algorithm in Periprosthetic Neo-synovial Tissue

Giorgio Perino; Sandra Sunitsch; Monika Huber; Daniel Ramirez; Jiri Gallo; Jana Vaculova; Shonali Natu; Jan Philippe Kretzer; S Müller; Peter Thomas; Marc Thomsen; Manfred Georg Krukemeyer; Herbert Resch; Thomas Huegle; Wenzel Waldstein; Friedrich Boettner; Thorsten Gehrke; Stefan Sesselmann; Wolfgang Ruther; Zhidao Xia; Edward Purdue; Veit Krenn

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to BMC Clinical Pathology. The manuscript details are below.

Title: A Diagnostic Approach for the Histological Particle Algorithm in Periprosthetic Neo-synovial Tissue

Authors: Giorgio Perino; Sandra Sunitsch; Monika Huber; Daniel Ramirez; Jiri Gallo; Jana Vaculova; Shonali Natu; Jan Philippe Kretzer; S Müller; Peter Thomas; Marc Thomsen; Manfred Georg Krukemeyer; Herbert Resch; Thomas Huegle; Wenzel Waldstein; Friedrich Boettner; Thorsten Gehrke; Stefan Sesselmann; Wolfgang Ruther; Zhidao Xia; Edward Purdue; Veit Krenn

Corresponding author: Dr. Giorgio Perino

If you are not aware of the submission, or if you should not be listed as contributing author, please notify the Editorial Office. Contact details for the Editorial Office are available under "Contact Us" on the journal website.

Kind regards,

Editorial Office
BMC Clinical Pathology
<https://bmclinpathol.biomedcentral.com/>

A Diagnostic Approach for the Histological Particle Algorithm in Periprosthetic Neo-synovial Tissue

G. Perino¹, S. Sunitsch², M. Huber³, D. Ramirez¹, J. Gallo⁴, **J. Vaculova**⁵, S. Natu⁶, J.P. Kretzer⁷, S. Müller⁸, P. Thomas⁹, M. Thomsen¹⁰, M.G. Krukemeyer¹¹, H. Resch¹², T. Hügler¹³, W. Waldstein¹⁴, F. Böettner¹⁵, T. Gehrke¹⁶, S. Sesselmann¹⁷, W. Rüter¹⁸, Z. Xia¹⁹, Purdue E²⁰, V. Krenn⁸

1- Department of Pathology and Laboratory Medicine, Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA

2- Medizinische Universität Graz, Institut für Pathologie, Graz, AUT

3- Pathologisch-bakteriologisches Institut, Otto Wagner Spital, Wien, AUT

4- Department of Orthopaedics, Faculty of medicine and Dentistry, University Hospital, Palacky University Olomouc, Czech Republic

5- Fakultni Nemocnice Ostrava, Department of Pathology, Czech Republic

6- Department of Pathology, University hospital of North Tees and Hartlepool NHS Foundation Trust, UK

7- Labor für Biomechanik und Implantat-Forschung, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg, GER

8- MVZ-Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier, GER

9- LMU Klinik, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, München, GER

10- Baden-Baden Klinik, Baden-Baden, GER

11- Paracelsus-Kliniken Deutschland GmbH, Osnabrück, GER

12- Universitätsklinik für Unfallchirurgie und Sporttraumatologie, Salzburg, AUT

13- Hôpital Orthopédique, Lausanne, CH

14- Medizinische Universität Wien, AKH-Wien, Universitätsklinik für Orthopädie, Wien, AUT

15- Adult Reconstruction and Joint Replacement Division, Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA

16- Helios Endo-Klinik, Hamburg, GER

17- Orthopädische Universitätsklinik Erlangen, GER

18- Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, GER

19- Centre for Nanohealth, Swansea University Medical School, Singleton Park, Swansea, UK

20- Hospital for Special Surgery, Research Institute, New York, NY, USA

Corresponding author:

Giorgio Perino, MD

Hospital for Special Surgery

Department of Pathology and Laboratory Medicine

535 E 70th Street

New York, NY, USA 10023

Telephone: +0012126061313

Fax: +0012126061940

Email: perinog@hss.edu

Abstract:**Background**

Wear related and non-wear related particle identification and the characterization of the inflammatory responses in the periprosthetic soft tissue, bone, and SLIM (synovial-like interface membrane) play an important role in the identification of biological pathways contributing to implant failures in joint arthroplasty. The diagnosis of the morphological and chemical characteristics of the wear particles is a challenging task in orthopaedic pathology because of the variation of the composition and combination of the wear particles, and the addition of endogenous crystals, blood by-products, and other foreign particles. The purpose of this study is to present a comprehensive histological particle algorithm (HPA) as a practical guide to particle identification by conventional histological examination.

Methods

The cases used for particle analysis were selected retrospectively from the archives of two institutions and were representative of the wear and non-wear related particle spectrum. All particle categories were described according to their size, shape, colour, and properties observed at conventional light microscopy, under polarized light, and after histochemical stains when necessary.

Results

All implant wear related and non-implant related particles were described and illustrated in detail by category. A particle scoring system for the periprosthetic tissue/SLIM is recommended and structured with the following principles: 1) Wear particle identification at light microscopy with a two-step analysis at low (40x and 100x) and high magnification (200x and 400x); 2) Identification of the predominant wear particle type with size determination as nano-particle aggregates, micro-, macro-, and supramacro-particles; 3) The presence of non-implant related endogenous and/or foreign particles.

Conclusions

The HPA should be considered a standard for the histological analysis. It provides a basic, useful tool for wear and non-wear particle identification at routine light microscopy examination and aims to be non-technically burdensome, reproducible, and user friendly. The HPA can also be used to reduce intra-observer and inter-observer variability to provide a common platform for multicentric implant retrieval/radiological/histological studies and valuable data for the risk assessment of implant performance to regional and national implant registries and government agencies.

Key words:

arthroplasty, histological particle algorithm, orthopaedic implant wear particles, periprosthetic tissue, synovial-like interface membrane, wear particle identification.

Background

The identification of particulate wear material and its differential diagnosis with endogenous crystalline and non-crystalline materials in the synovial-like interface membrane (SLIM) and the periprosthetic neo-synovial membrane of orthopaedic implants is important for the evaluation of clinical outcome, radiological and biomechanical analysis correlation, biological mechanisms of implant failure, and medico-legal purposes. The role of wear particles in bone resorption leading to aseptic loosening/osteolysis, one of the most important causes of orthopaedic implant failure up to the present time, was first described by Willert and Semlitsch in 1977 [1].

Wear particles in orthopaedic implants are generated by different wear mechanisms divided into two major categories: 1. Mechanical, subdivided in abrasion, erosion, adhesion, and surface fatigue; 2. Mechanical with an additional element of active chemistry, oxidation and/or corrosion [2]. They can originate from the prosthetic implant contact surfaces, either bearing surface or component's junctions such as acetabular cup/liner, head/neck, neck/stem, body sleeve/stem, stem/acetabular

cup, and others. The majority of the particles are generated mechanically by abrasion/adhesion between two surfaces although recently the mechanism of corrosion has emerged as the leading factor in the occurrence of adverse local tissue reactions to implant wear/adverse reaction to metal debris (ALTR/ARMD).

In the histological examination of the neo-synovial membrane or the SLIM, any wear particle is defined as a microscopic particle of any size, shape, contour, colour, and chemical composition. Wear particles, however, can also represent aggregates of smaller particles, especially of nano-size and also admixed to or coated with adherent organic substance, such as blood-derived products or synovial fluid proteins forming a protein corona [3-5].

In the past forty years, histological classifications of wear particles released from orthopaedic implants and observed at conventional light microscopy examination with and without polarized light have been published and used for clinical diagnoses and research studies, usually modifications of the classification reported by Mirra et al [6]. In the last two decades, a progressive change and evolution of implant materials has made the original classification not suitable to address all the diagnostic challenges provided by these new materials. Moreover, the identification of wear particles and the measurement of their total burden has become more difficult or impossible to be determined with accuracy by conventional light microscopy due to the size of the particulate material, well below the resolution limit of the optic microscope, the morphological similarities of some of the materials, and the presence of a mixture of particles from different materials present in the cytoplasm of the macrophages.

The histological analysis of periprosthetic tissue removed during implant revisions, although still not mandatory in many countries, has been considered of paramount importance in the classification of the biological reactions to implant wear particles and the identification of new types with possible vast medical and economic consequences for public health, as exemplified by the increasing number and type of joints replaced (hip, knee, shoulder, elbow, wrist, ankle), the projected increased number of orthopaedic implant revisions in the future [7]. A recent example has come from the introduction of the metal-on-metal (MoM) bearing surface either in hip resurfacing arthroplasty (HRA) or total hip arthroplasty (THA) with or without cobalt-chromium (CoCr) metallic adapter sleeve (MAS) and in Non-MoM THA implants with CoCr dual modular neck (DMN) followed by the unintended occurrence of adverse local tissue reactions causing a higher rate of revision operations and need of long-term follow-up [8].

The first analysis of the implant wear material and of the host reaction is almost always performed by conventional light microscopy on paraffin embedded tissue and usually by a general surgical pathologist. Therefore, a classification of the materials which is reproducible and accurate within the limits of the optic microscope resolution and also of limited methodological complexity is necessary for providing a standardized and comparable diagnostic tool which can be expanded further with the use of additional, sophisticated analytical techniques when necessary.

A Histological Particle Algorithm (HPA) is presented here in detail with the intent of providing a useful and reproducible guide for the identification of wear particulate material and also for the differential diagnosis with non-prosthetic endogenous materials such as crystal deposits and degradation products of organic substances, especially blood-derived and foreign particles/grafts from different sources (Figure 1 and 2). It has been reported before in a condensed version [9, 10] and more recently in a manual for the histological diagnosis of pathologies associated with orthopedic implants [11].

Methods

The HPA is fully described with illustrated examples of each category of implant wear particles and endogenous/foreign particles generated in different implanted joints. The cases were selected retrospectively from the pathology archives of the Hospital for Special Surgery, NY, NY, USA and the Centre with Focus on Orthopaedic Pathology, Trier, Germany and examined by three orthopaedic pathologists (GP, SS, VK) with consensus histological diagnosis. Approval for the use of the periprosthetic tissue was obtained by the Institutional Review Board, Hospital for Special Surgery (Protocol Number 26085) and the Ethics Commission of the Medical Board of Rheinland-Pfalz; Mainz, Germany [Case Number 837.230.15 (9998)]. All particle categories were described according to their size, shape, colour, and properties observed at conventional light microscopy, under polarized light, and after histochemical stains when necessary. The criteria used in the HPA for particle identification are based on the ones previously described in the scientific literature.

Implant data

All cases described were culled from archival material. The prosthesis and its time of implantation were known in each case and each implant was available for inspection at gross examination. The material composition of the joint prostheses covered the full range of the implant material spectrum (polyethylene, metals, ceramics, silicone, hydroxyapatite, polymethyl methacrylate orthopaedic cement).

Macroscopic examination and processing of tissue samples

The macroscopic examination, fixation in 10% buffered formaldehyde and processing of the tissue collected at surgery were performed according to a standard protocol. Depending on the wet tissue sample size/weight and/or tissue mapping locations, up to 10 tissue blocks (1-2 sections/block) were selected per case and routinely processed, embedded, cut at 4 to 5 μm and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and additional histochemical stains when necessary. In selected cases, 0.35 μm thick sections were stained with 0.1% toluidine blue in borax buffer after fixation in 2.5% glutaraldehyde for 24 hours and trimming with preservation of tissue orientation transferred to sodium cacodylate buffer, processed through a standard cycle and embedded in epoxy resin. We retain that location mapping of periprosthetic tissue retrieval has value and also provides more accurate information of the wear distribution. This method has been previously described in detail [11] and has been used for the quantitative and qualitative assessment of ALTR inflammatory infiltrate and the identification of large aggregates of corrosion products [12-14]. However, it can be time consuming with a higher technical and professional cost to be applied routinely to all specimens and its benefits have also been recently investigated on non-MoM total hip and knee arthroplasty specimens showing comparable results without the use of a mapping chart [15].

Histological analysis

The hematoxylin and eosin (H&E) staining and Prussian blue reaction (PBR) were carried out using the Leica ST 4040 staining module; nuclear staining was undertaken with Harris hematoxylin (Harris hematoxylin, Surgipath, Richmond, Illinois, USA), the background staining was performed using eosin (eosin Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). PBR reaction was performed according to the Mallory's method and Oil-red-O staining manually following a standard protocol [16].

Particle analysis

Implant wear particles are derived from polyethylene, metallic debris (conventional and corrosion), ceramics, and polymethyl methacrylate orthopaedic cement (PMMA). The great majority of these particles are generated by the *two-body* adherence/abrasion wear when material is removed or displaced from the softer surface by irregularities of the harder surface or by the *three-body* abrasion wear when some form of other particles generated by materials used to fasten the implant to the bone (PMMA) or particles generated by the wear of a primary implant components which remain

after the implant revision (i.e. ceramic particles after a fracture of a ceramic femoral head or liner). Wear particles with an additional element of active chemistry, oxidation and/or corrosion can be prominent in some implant tribological configurations [2].

Non-implant related particles present in the periprosthetic tissue are divided in two main categories: endogenous particles and foreign particles/bone grafts. *Endogenous particles*

The endogenous particles are those microscopic particles which have been produced by the body in the synovium/SLIM, frequently secondary to metabolic diseases, disturbances or blood-derived products, and degenerative processes. The majority of them are of crystalline nature and are detected either in the synovial fluid or in deposits into the articular soft tissues (synovium, meniscus/labrum, capsule). For the analysis of endogenous particles, a light microscope fitted with polarized filters and a first order red compensator is sufficient [17]. Crystals are detected because of their birefringence which is evident with the use of compensated polarized light microscopy (CPLM).

Foreign particles and bone grafts

Foreign particles are derived from absorbable and non-absorbable surgical sutures, fixation devices/scaffolding materials (metal, plastic, composite materials), joint spacers, skeletal substitute materials, visco-supplements, and drug carriers.

Definitions of particle size and shape

The most difficult issue of the classification of wear and prosthetic material particles generated by orthopaedic implants is to translate the size range of the particles into equivalent words to provide a practical and easily reproducible classification. This issue is not trivial because different morphological features of the particles and in particular their size can signify an increase in the macrophage inflammasome activation with subsequent cytokine release and therefore have an important clinical significance, at least for metallic particles [18]. We propose the following subdivision for the most common wear materials observed at conventional histological examination:

a. *Polyethylene*: nanoparticles, non-detectable ($<1\ \mu\text{m}$), microparticles (1 to $<10\ \mu\text{m}$), macroparticles ($\geq 10\ \mu\text{m}$ up to $100\ \mu\text{m}$) and supra-macroparticles ($>100\ \mu\text{m}$). For an approximate determination of particle size, nano-aggregates and microparticles are usually identified in macrophages, macroparticles in giant cells, and supra-macroparticles are surrounded by giant cells or free in the neo-synovial stroma/bone marrow;

b. *Conventional metallic debris*: they are predominantly of micro-size (1 to $<10\ \mu\text{m}$) and occasionally of nano-size ($<1\ \mu\text{m}$) and macro-size ($\geq 10\ \mu\text{m}$). Their shape can be defined by the ratio (r) between the length and the width of the particles: round ($1 < r < 1.5$), oval/irregular ($1.5 < r < 2.5$), needle/rod shaped ($r > 2.5$);

c. *Corrosion metallic debris*: round/globular nanoparticle aggregates (tribocorrosion) $<5\ \mu\text{m}$; irregular, small nanoparticle aggregates (mechanically assisted crevice/fretting corrosion) $<10\ \mu\text{m}$ usually as break-down fragments of larger aggregates; large nanoparticle aggregates $>10\ \mu\text{m}$ (mechanically assisted crevice/fretting corrosion). Round/globular and irregular nanoparticle aggregates are identified in macrophages; large nanoparticle aggregates are identified in multinucleated giant cells and when very large, they are surrounded by giant cells or embedded free in the neo-synovial stroma;

d. *Ceramic*: nanoparticles ($<1\ \mu\text{m}$), microparticles (1 to $10\ \mu\text{m}$), macroparticles ($>10\ \mu\text{m}$ up to $100\ \mu\text{m}$) and supra-macroparticles ($>100\ \mu\text{m}$). Nano and microparticles are present in the macrophages and macroparticles in giant cells where supra-macroparticles are surrounded by giant cells or free in the tissue stroma;

e. *PMMA*: Large particles surrounded by giant cells dissolved during tissue processing cycle and appearing as empty lacunae with small aggregates of radiographic contrast agent present; medium and small size particles engulfed in giant cells and dissolved as well; particles of radiographic contrast agent in macrophages (barium sulphate, zirconium dioxide) especially numerous in cases of third body wear failure.

In this analysis, the particle sizes were determined using computer-aided interactive morphometric analysis, Leica DM 2005, microsystems framework 2007.

Results

Implant wear particles

Wear particle characterization of orthopaedic implant wear is the most challenging component of the histological examination of the periprosthetic tissue and it is often time consuming, especially when multiple specimens/case and several cases have to be examined in a single session. The most frequent combinations of wear materials occur according to the implant bearing surface: metal-on-polyethylene (MoP), ceramic on polyethylene (CoP), metal-on-metal (MoM), and ceramic-on-ceramic (CoC); a MAS, either of CoCr or Ti can be added to metallic/ceramic heads and cement can be present around the femoral and/or the acetabular component.

Polyethylene (PE)

The term polyethylene usually refers today to its ultra-high molecular weight type (UHMWPE) with an exceptionally high molecular mass, defined by the American Society for testing and materials as a molecular weight higher than 3.1 million g/mol [19]. Today, the most common subtypes analyzed at the time of revision according to the year of implantation and type of prosthetic device are the first and second generation of highly cross-linked polyethylene subject to different regimens of radiation for sterilization and remelting/thermal heating for oxidation stability and in the future also with the addition of an anti-oxidant stabilizer, such as vitamin E [20]. The use of highly cross-linked polyethylene is not homogeneous among the different joint implants and the detailed information of the dose of radiation and of the use of remelting or thermal heating is usually not known. Therefore, caution needs to be exercised to attempt defining modalities of implant failure when analyzing PE particulate wear at light microscopy examination because its chemical state cannot be determined at light microscopy examination and requires examination of the implant PE component with use of specific analytical methods.

PE particles of variable size are detected at light microscopy examination under polarized light:

Microparticles:

PE microparticles are usually located in the cytoplasm of the macrophages; they measure between 1 and 10µm and are predominantly needle-shaped showing granular, slightly eosinophilic cytoplasm reactivity (Figure 3A).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis has shown that particles of UHMWPE are round or elongated and that the former are in large majority submicron in size and therefore non-detectable at polarized light microscopy examination with predominance of the latter often around to 10 µm in length [21, 22]. They are visible at x400 and x200 under polarized light. The detectable number of particles is also dependent on the polarizer and analyzer components used for the analysis. Oil red O staining provides positive staining of cytoplasmic, micro-particulate PE (Figure 3B1, although it is non-specific and stains also phagosome membranes filled with metallic nanoparticles generated by tribocorrosion in MoM bearing surface implants (Figure 3B2).

Macroparticles:

PE macro-particles measure between > 10 µm and <100 µm; they are clasp-shaped and usually located in the cytoplasm of multinucleated giant cells (Figure 3C). They are detected at x100 and x40 magnification.

Supra-macroparticles:

These particles are detectable at x25 magnification, especially under polarized light. Their shape is variable and frequently curved and they are surrounded by multinucleated giant cells or free in the stromal tissue with size ranging from 100 µm up to >2000 µm (Figure 3D). Particles larger than 1000 µm may be also detected at macroscopic examination.

Non-ferrous metallic particles

Conventional metallic particles

Non-ferrous metals and their alloys are used predominantly in joint endoprosthesis, where ferrous metals (i.e. steel) are used considerably less at the present time [23]. The most used non-ferrous metals in joint prosthesis are: aluminum, cobalt, chromium, molybdenum, nickel, niobium, tantalum, titanium, vanadium, zirconium. These metals are used in various combinations and alloys. Conventional metallic wear particles are predominantly very small particles and have an average diameter ranging from 0.05 μm to $<5 \mu\text{m}$ and occasionally $>5 \mu\text{m}$ especially in cases of component displacement or massive abrasion by third body wear. The shape is predominantly rod/needle-like, but can vary from round to polygonal, sharp-edged. Their colour varies from grey to jet black. Conventional metallic debris can be admixed with either polyethylene (Figure 4A) or ceramic debris and appear in micro and macroparticulate form in cases of marked edge loading of the acetabular rim (Figure 4B). It is important to emphasize that CoCr particles, either generated by tribocorrosion or even by edge loading can be completely oxidized during H&E staining and can appear pale green/yellowish or brownish at light microscopy examination, in contrast with the charcoal-grey/black appearance of non-oxidized conventional metallic particles at surgery and macroscopic examination (Figure 4C). Conventional metallic particles cannot be distinguished at light microscopy examination from wear debris from ceramic implants of surface oxidation by thermal diffusion type.

Corrosion metallic particles

After having been determined as a potential cause for hip implant failure in the late nineties [24], a renewed attention has been recently devoted to implant corrosion products because of the adverse local tissue reactions/adverse reaction to metallic debris (ALTR/ARMD) associated with MoM HRA and THA [25] and MoM large head THA implants with or without CoCr MAS [26-27] or without metallic adapter sleeve and also non-MoM THA implants with CoCr DMN [28-30] or with other MoP THA configurations [31, 32]. They are mainly produced either by tribocorrosion at the MoM bearing surface or by mechanically assisted fretting/crevice corrosion at the two above mentioned junctions [33]. They can be associated with a variable amount of conventional metallic particles generated by abrasion through implant edge loading and/or impingement. Their shape varies from round/globular to irregular or rod/needle-like and they usually appear characteristically greenish/yellowish and when in large aggregates of nanoparticles or macroparticles of variable size (1 μm to 500 μm) and associated with black/reddish streaks (Figure 4 D). Their metal composition varies according to the type of implant and of the wear pattern [34]. Semithin sections prepared for electron microscopy analysis show nanoparticles present in the cytoplasm of macrophages in MoM HRA (Figure 4E), in MoM THA with CoCr MAS with a giant cell containing a large aggregate (Figure 4F), and Non-MoM THA with CoCr DMN (Figure 4G). Corrosion particles can be generated also at MoM interface of fixation device components, as shown in Figure 4H.

Ceramic particles

Ceramics are generally employed in joint replacement arthroplasty as combinations of CoP bearing surface in hip, knee, shoulder, elbow, and ankle implants or CoC bearing surfaces in hip implants. They are classified as: 1. Oxidized ceramics, composed of aluminum oxide ceramic (Al_2O_3), zirconium dioxide ceramic (ZrO_2), or alumina matrix composite (mixed oxide ceramic) with components such as yttrium oxide (Y_2O_3), strontium oxide (SrO), and chromium oxide (Cr_2O_3); 2. Non-oxide ceramics such as silicon nitride (Si_3N_4); 3. Hard coating on metals, such as titanium nitride (TiN); 4. Surface modifications of metals such as a zirconium alloy with 2.5% of niobium through surface oxidation by thermal diffusion; 5. Calcium phosphate ceramics such as hydroxyapatite and tri-calcium phosphate [35, 36]. Wear-induced ceramic particles usually occur in the size range of 20-100 nm up to several μm , as shown in Figure 5A. In the case of oxidized ceramic component fracture (Figure 5B) so-called supra-macroparticles with a size up to a few mm can also be detected. The birefringence of the microparticles varies from absent to weak, and they

exhibit variable shape from globular to irregular-polygonal with sharp edge and colour, from clear to yellowish/greenish and grey/black according to the type of ceramic of the implant component(s) [37].

Hydroxyapatite (HA)

The HA surface coating often used especially in metal materials (mostly in metallic surfaces) facilitates the osteointegration process of the prosthesis. HA is usually completely replaced by the periprosthetic bone formation and can only be detected by hard grinding techniques in the early phase following implantation and very infrequently as a particulate material in the SLIM. Hydroxyapatite presents as pale grey to greenish, polygonal amorphous extracellular particle with a size ≥ 5 up to $120\mu\text{m}$ which can also be associated with calcium deposits (Figure 5C).

Polymethyl methacrylate particles (PMMA)

In the conventional histological tissue preparation, PMMA particles are chemically dissolved during tissue processing. They are identified at light microscopy as empty, multivacuolated cavities of variable size lined or engulfed by multinucleated giant cells (Figure 5D).

Radiographic contrast agent (zirconium dioxide and barium sulfate)

In the vacuoles of the PMMA, which has been dissolved during tissue processing, only the additive, radiological contrast agent zirconium dioxide or barium sulphate is identifiable (Figure 5D). They are detectable as small, aciniform aggregates of round, slightly birefringent particles with a dark border and a clear center. They can be numerous in the cytoplasm of macrophages, especially in cases of third body-wear and be an indicator of this mode of implant failure (Figure 5E). Differentiation of zirconium dioxide from barium sulfate is not possible with certainty at light microscopy examination.

Non-implant related particles

The non-implant related particles present in the periprosthetic soft tissue and/or SLIM are represented by endogenous particles, for the large majority crystals and material related to blood products and foreign particles, derived from surgical sutures, fixation/reconstruction devices, joint spacers, skeletal substitute materials, visco-supplements, and drug carriers.

Endogenous particles

Endogenous particles are identified by the use of polarized light for the identification of crystals and PBR for the identification of hemosiderin/blood products.

Calcium pyrophosphate

Calcium pyrophosphate (CPP) exists in the form of characteristically rhomboid shaped crystals admixed to cuboid, parallelepiped, and also needle-shaped forms, approximately $\leq 1\ \mu\text{m}$ to $1\ \mu\text{m}$ in size [17]. CPP deposits exhibit a weak positive birefringence under compensated polarized light (pale yellow with the long axis perpendicular to the compensator and pale blue when parallel) and are characteristically embedded into a reddish, homogeneous matrix (Figure 6A). In the periprosthetic soft tissue and/or the SLIM, deposits of calcium pyrophosphate crystals can also be detected in proximity to the macrophagic/giant cell reaction to wear debris.

Urate

Sodium urate crystals are present in the H&E section in the form of haphazardly arranged short fascicles of needle-shaped, empty spaces corresponding to dissolved urate crystals, embedded into an amorphous, greyish matrix and surrounded by a macrophagic/giant cell reaction (Figure 6B). Since urate crystals are water-soluble, negatively birefringent urate crystals (bright blue with the long axis perpendicular to the compensator and bright yellow when parallel) may only be detected directly in the native preparation or in histological section before paraffin removal [17], although some residual crystal fascicles can be present after staining in large tophi. The particle size can range between 5 and $25\ \mu\text{m}$.

Oxalate

Deposits of calcium oxalate in bone and other tissues is known as oxalosis and it is a secondary to the occurrence of primary hyperoxaluria (PH) due to an autosomal recessive hereditary disorder of the metabolism of glyoxylate, most frequently caused by an enzyme deficit of alanine-glyoxylate aminotransferase (PH type I) located in the hepatic peroxisomes which causes excessive oxalate production with involvement of the kidney, the excretory organ [38]. The crystals appear as pale green or pale yellow arranged in clusters of broken plates or radial rosettes embedded in a fibrous stroma and are birefringent under polarized light (Figure 6C).

Cholesterol

Cholesterol crystals are dissolved during tissue processing and typically appear as haphazardly arranged small fascicles of empty clefts (Figure 6D). The formation of the crystals in the periprosthetic neo-synovium occurs in arthroplasty after a relative long time of implantation and often in long-standing chronic bursitis with a marked particle-laden macrophagic infiltrate with abundant necrotic cell debris.

Hydroxyapatite (calcinosis)

Soft tissue deposition of hydroxyapatite can occur in a single or multiple locations and can be related to a number of systemic disorders such as familial or idiopathic tumoral calcinosis, associated with autoimmune rheumatologic disorders and in particular scleroderma, and metabolic conditions such as renal failure with dialysis, hypervitaminosis D, and other disorders of the calcium/phosphorus homeostasis. Although almost any joint can be affected by calcinosis, the shoulder is the most commonly involved region where calcific tendinitis and/or bursitis can occur [39]. The crystals appear spherical and targetoid and are lined by a macrophagic/giant cell reaction (Figure 5E). Deposits with stromal reaction in the bone marrow associated with brisk osteoblastic activity and thick osteoid seam can also be observed in cases of periarticular tumoral calcinosis associated with scleroderma (Figure 6F).

Hemosiderin

Hemosiderin deposits, usually secondary to chronic bleeding in the periprosthetic soft tissue or traumatic events such as implant dislocation or periprosthetic fracture, appear as coarse, granular golden brown deposits in the macrophagic cytoplasm (Figure 7A). In the Prussian blue reaction, hemosiderin deposits stain intensely dark blue (Figure 7A, inset). Hemosiderin deposits in macrophages of the SLIM may also be present combined in conjunction with prosthesis material wear particles and might be difficult to differentiate without the PBR stain from ceramic and/or metallic corrosion particles especially if they have a granular size.

Gamna-Gandy bodies

Gamna-Gandy (G-G) bodies are defined as small, spheroidal or irregular yellow-brown foci, consisting of dense fibrous tissue and collagenous fibers encrusted with iron pigments and calcium salts (Figure 7B1 and 7B2). They were first described in the spleen early in the twentieth century and were erroneously considered to be caused by fungal infection. Now G-G bodies are considered to result from organization of small hemorrhages and have been characterized by scanning electron microscopy and x-ray fluorescence spectroscopy with demonstration of their crystalline nature and chemical structure of $\text{CaPO}_4 \cdot \text{FeOH}$ [40]. G-G bodies are a well-recognized finding in atrial myxomas where they form linear arrays of mineral-encrusted fibers, often at the edge of resolving hemorrhages. Their definition has been expanded to include all the formations of connective tissue fibers admixed to iron pigments and calcium salts, irrespective of size or form.

Formalin pigment

This pigment is produced by acid acting upon hemoglobin and is known as formalin pigment or acid hematin. The appearance is black to brown with amorphous to microcrystalline granules (Figure 7C). Formalin pigment granules can be present in the H&E stained histological sections of periprosthetic tissues fixed in formalin having a low pH [41].

Lime (calcium carbonate)

Calcium carbonate, as one of the most important forms of lime, appears in the form of basophilic, non-birefringent coagulative deposits (Figure 7D). Calcium carbonate is present mostly embedded in a fiber-rich connective tissue with scant macrophagic/multinucleated giant cell reaction and can be a consequence of an inflammatory process and/or tissue necrosis. The particle size is usually larger than 1mm.

Bone tissue detritus

The bone tissue fragments are often surrounded by macrophages and osteoclast-like giant cells, particularly in detritus synovitis as a consequence of osteoarthritis, necrosis, and especially rapidly progressive osteoarthritis. In SLIM, the cause can be bone fragmentation secondary to osteolysis with or without fracture and also bone milling during surgery, the so-called cutting-grinding effect, as a by-product of the surgical operation. The particle size usually ranges from 5 to >300 μm (Figure 7E).

Foreign particles

Foreign particles are predominantly generated by fixation/reconstruction devices and by materials or substances used as fillers or carriers to alleviate the symptoms or complications of joint arthritis and arthrosis.

Surgical sutures (absorbable and non-absorbable)

Surgical sutures are usually easy to identify because of their high birefringence and tubular structure in longitudinal, oblique, and cross section or even filamentous structure. Absorbable surgical sutures, however, can be more challenging especially when broken in small fragments because of their heterogeneous birefringence and appearance (Figure 8A).

Fixation/Reconstruction devices/materials

Fixation devices which can break down and can represent a differential diagnosis with supra-macroparticulate PE are fixation plastic screws and/or anchors, although they differ for birefringence properties and shape (Figure 8B).

Debris released by broken metallic devices, such as metallic plates or acetabular screws cannot be distinguished from metallic wear debris and a clinical history and examination of the explanted hardware is essential for the correct histological diagnosis.

Among the reconstruction materials, an interesting example is represented by the ABC (Active Biosynthetic Composite Ligament), introduced as a scaffold class ligament in 1985 for primary reconstruction of the human anterior cruciate ligament, composed of interwoven carbon and polyester unit material. The artificial ligament failure usually occurs because of stretching and breaking of the fibers secondary to mechanical or fatigue factors [42]. At histological examination carbon fibers appear jet black with a cylinder-like shape and do not polarize. The diameter is approximately 5-8 μm and the length of the fibers is variable; in the non-fragmented state, it can be up to several mm. They are embedded in a fibrous matrix, without presence of a macrophagic response (Figure 8C). A distinct granulomatous foreign body reaction has been described in a single case report [43]; however, examination of the histological picture provided shows only fibrous reaction around the carbon fibers without cellular response.

Joint spacers

Silicone elastomer is the most common joint spacer and has been used for decades as an inert spacer for small and medium-size joints, such as fingers, toes, metatarsal-phalangeal, thumb, wrist and elbow [44]. In the so-called silicone synovitis polycyclic, irregular and rectangular macroparticles up to several mm are present in synovial or capsular location, usually resulting from a fracture of the prosthesis with fragmentation and subsequent development of a foreign body giant cell reaction. These fragments are pale white and can be partially dissolved through tissue processing and histologic section staining. They exhibit a variable degree of birefringence under polarized light (Figure 8D). Other materials have also been used as spacers causing a similar reaction, such as porous polyurethaneurea [45], shown in Figure 8E.

Injected foreign materials (visco-supplements and drug carriers)

Foreign body-induced cases of synovitis are typically observed following applications of intra-articular substances/drugs. Histologically, the specification of the material (in most cases the drug substrate) is not possible unless a detailed clinical history is available, although certain materials, such as visco-supplements, provide a distinctive foreign body reaction of palisading macrophages admixed to multinucleated giant cells (Figure 8F).

Skeletal substitute materials

Although strictly not part of the particle algorithm, skeletal substitute materials are also used to fill voids around failed joint prostheses and/or increase osteointegration and their recognition at histological examination is important to interpret correctly the pathological findings of the specimen [46]. Among those frequently used are demineralized bone matrix (Fig 8G) and soluble calcium-based granules (Fig 8H).

Differential diagnosis of particle laden macrophages and other macrophagic diseases in bone

A challenging differential diagnosis can occur in presence of bone marrow macrophagic infiltrates which are characteristic of other conditions, such as lysosomal storage diseases [47] and other macrophagic disorders, such as Erdheim-Chester disease (polyostotic sclerosing histiocytosis) [48], especially when limited tissue is available or in consultation practice without a detailed clinical history.

Although the diagnosis should be known clinically before the occurrence of a joint prosthetic revision, exceptions can occur because of mild forms of the storage diseases with adulthood onset or misdiagnosis because of their rare occurrence. However, careful examination of the macrophagic infiltrate provides clues to differentiate these conditions at light microscopy. The particle laden macrophagic infiltrate is usually composed of packed, polygonal macrophages with abundant cytoplasm infiltrating the bone marrow with an easily identifiable particle loading of PE, metal, orthopaedic cement, complex mixed wear (Figure 9A, PE particles and Figure 9B, conventional and corrosion metallic particles). The macrophages in the lysosomal storage diseases contain the substance which cannot be digested because of the enzymatic defect, such as in Gaucher's disease, in which they show characteristic crumpled [tissue paper-like cytoplasm](#) (Figure 9C). In polyostotic sclerosing histiocytosis, the macrophages are lipid laden with abundant foamy cytoplasm and admixed to an inflammatory infiltrate predominantly composed of lymphocytes and plasma cells (Figure 9D) and if present, the cancellous bone is sclerotic with evident osteoblastic rimming (Figure 9D, inset).

Discussion

In general, an algorithm is a logical sequence of actions to be performed for solving a diagnostic or therapeutic problem and is widely used in guideline-oriented medical practice. What is proposed here is a "histopathological particle algorithm" based on already known, particle-defining criteria which provide a guide to implant wear as well as non-implant related endogenous and foreign particle identification in the periprosthetic tissue and SLIM using conventional histology examined at light microscopy with the aid of simple histochemical stains when necessary. This simple, although comprehensive flow chart aims at providing complementary information to the diagnostic classification of the neo-synovial and SLIM reaction to implant wear. The characterization of these particles is defined in accordance with a classification based on staining characteristics, properties under polarized light, and size. The particle algorithm is also designed to assist non-specialized surgical pathologists, orthopaedic surgeons and the material scientists in the identification of particulate material in the periprosthetic tissue and SLIM with minimal methodical complexity.

It needs to be emphasized that the particle algorithm constitutes only a guide to identification of implant by-products on a descriptive level by conventional histological examination. Particularly for

metallic and ceramic materials but also for the different types of UHMWPE, the definitive material identification, chemical composition and oxidative status is only possible through the use of physical, high-resolution procedures, for example energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [32] or synchrotron micro X-ray absorption spectroscopy (XAS) and X-ray absorption near edge structure (XANES) [49]. For detection of low concentration elements in nano-size wear particles, even more sensitive analytical techniques need to be used, such as transmission electron microscopy (TEM) and TEM-EDX element mapping, scanning electron microscopy (SEM), backscatter scanning electron microscopy (BSEM) and BSEM-energy-dispersive X-Ray spectroscopy (EDS) element mapping examination, X-Ray diffraction spectrometry (XRD) examination and single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS), as recently reported [39]. The use of analytical nano-technology is also advocated for complex cases in which several revisions have occurred with different bearing coupling and/or use of materials for implant adherence [50]. It needs also to be taken into account that wear particles are tridimensional objects and that for a correct interpretation of their shape and volume, SEM stereoscopy has been shown to provide the most reliable results [51]. The use of these techniques is particularly important for research purposes and also for the determination of different toxicity/immunogenicity of the particles generated by *in vitro* wear simulation or *in vivo* for clinical and/or legal purposes. It is also important to highlight that wear particles generated by new implant configurations can be missed or misdiagnosed at light microscopy examination. One recent, noteworthy example is represented by the metallic nanoparticles generated by MoM implants which were originally described in 2005 as “cytoplasmic pseudo-inclusions which did not resemble wear debris” [52] and therefore were not counted as metallic wear particles or considered as possible cause of the adverse reaction named aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion (ALVAL). The first study that correctly characterized the cytoplasmic pseudo-inclusions as metallic wear nanoparticles analysed by TEM and SEM was published six years later in 2011[53].

The evaluation of the tissue response pattern(s) is also performed in addition to the wear and non-wear particle identification for a comprehensive pathological report. The correlation between type of particulate wear and inflammatory response can be important for the choice of the most host-compatible materials and tribological pairings [54]. Due to rapidly advancing developments in prosthesis materials and prosthesis design, new types of wear particles and associated inflammatory response patterns can be detected in the periprosthetic tissue and SLIM by histological examination. These response patterns are determined by biomechanical factors (prosthesis design, loading mode, positioning of implant components, and joint fluid waves), particle properties (composition, size, surface, total burden), and host factors (genetic, immunological, protein corona of particles). For the tissue response classification which goes beyond the scopes of this report, we refer to our previous publications which described it in detail [6, 7].

A particle scoring system is advisable to summarize the most important information for the material scientist and the orthopaedic surgeon: 1) Predominant prosthetic particle material; 2) Minor wear/non-wear components; 3) Non-implant related particle material type, if present. A semi-quantitative scale of four grades is suggested for the analysis of the particle burden following the microscope magnification set: 0, no identifiable particles; 1 at x400, 2 at x200, 3 at x100, 4 at x40 and x25. It is important to consider that the particle score can be affected by the uneven particle distribution in the periprosthetic tissue, the amount of tissue retrieved at surgery, and the extent of tissue sampling at macroscopic examination. A “web-based particle algorithm” would be desirable for assuring the constant updating of particle identification associated to the inflammatory response patterns. This tool would be particularly useful to provide information on potential new alternative bearing materials in different stages of pre-clinical examination/use, such as polyetheretherketone

which has been recently described in animal/human retrieval studies [55]. The proposed particle algorithm will also need further studies for the assessment of its internal and external validity.

The differences in crystalline deposits in the SLIM, the wide variety of prosthesis materials and the diversity of material combinations and particle pathogenesis mechanisms explain the high level of morphological particle heterogeneity in the periprosthetic tissue/SLIM which makes the process of particle identification for diagnostic purposes challenging, especially when the particle burden is below the resolution power of the optic microscope. The pathology report, issued primarily for the clinical practice and management of the patient and also in consultation practice for diagnostic and/or legal purposes should include the following sections. *Macroscopic description*: a. Neo-synovial and capsular tissue configuration, consistency, colour, three dimensional measurements, optional weight of the wet specimen, bone tissue sampling if present; b. Description of the removed implant components if available with specification of manufacturer and type (basic prosthetic alloy, bearing pair, modularity, and component serial number optional when available) and according to the expertise of the examiner or with the assistance of a biomechanical engineer, a description of basic wear analysis at naked eye or with the use of a dissecting microscope. The terminology used for the implant description should be as precise as possible, using the technical documentation provided by each manufacturer. Consultation of the operative report can also provide confirmation or additional information on the implant components not removed at surgery; *Microscopic description*: a. Tissue morphology with presence/absence of tissue necrosis/infarction (thickness measurement) and apoptotic cell necrosis with semi-quantitative assessment (slight, moderate, marked); b. The description of the wear particulate and non-wear particulate material, according to the criteria previously described and mention of the dominant and secondary implant wear material(s); c. The description of all cell types present with semi-quantitative analysis and relation to the particle wear, including macrophages, fibroblasts, endothelial cells (flat, tall) and the inflammatory cells of the white series: neutrophils, lymphocytes, plasma cells, eosinophils, mast cells. Immunohistochemical and immunofluorescence studies can provide additional, more specific information when necessary; *Diagnosis*: The diagnosis is centered on the type of periprosthetic tissue/SLIM present according to the classification previously reported [6] with the optional addition of the particulate material(s) as described microscopically. A case comment can be added to highlight a discrepancy with the clinical diagnosis, special features, and indications for a specific clinical follow-up.

Conclusions

Due to the continuous developments of new materials and combinations in orthopaedic prostheses, we believe that a web-based particle algorithm would be the ideal set up to assure the constant updating of the materials used for accurate particle identification in the periprosthetic tissue/SLIM.

The histological particle algorithm for detection and identification of wear and non-wear particulate material in joint arthroplasty should be considered a standard for the histological analysis. It provides a basic, useful tool for wear and non-wear particle identification at routine light microscopy examination and it is time-saving and low-cost.

The algorithm can also be used to reduce intra-observer and inter-observer variability in order to provide a common platform for multicentric implant retrieval/radiological/histological studies and valuable data for the risk assessment of implant performance to regional and national implant registries and government agencies.

References

1. Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1977, 11: 157-64.
2. Williams JA. Wear and wear particles-some fundamentals. *Tribology Int* 2005,38:863-70.
3. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson K. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 2012, 7:779-86.

4. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Rouven H, Schlenk F, Fischer D, Klytaimnistra K, Reihardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK, Stauber RH. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* 2013, 8:772-81.
5. Fleischer CC, Payne CK. Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc Chem Res* 2014, 47:2651-659.
6. Mirra JM, Amstutz HC, Matos M, Gold R. The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin Orthop Rel Res* 1976, 117: 221-40.
7. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ. Impact of the economic downturn on total joint replacement demand in the United States: updated projections to 2021. *J Bone Joint Surg Am* 2016, 96 (8): 624-30.
8. Matharu GS, Mellon SJ, Murray DW. Follow-up of metal-on-metal hip arthroplasty patients is currently not evidence based or cost effective. 2015, 30(8):1317-323. doi: 10.1016/j.arth.2015.03.009.
9. Krenn V, Thomas P, Thomsen M, Kretzer JP, Usbeck S, Scheuber L, Perino G, Rütter W, vWelsler R, Hopf F, Huber M. Histopathological particle algorithm. Particle identification in the synovium and the SLIM. *Z Rheumatol* 2014, 73(7):639-49.
10. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfeld H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Natu S, Boettner F, Zustin J, Kölbl B, Rütter W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow R, Söder S, Müller S, Parvizi J, Illgner U, Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 2014, 210 (12):779-86.
11. Krenn V, Perino G. *Histological diagnosis of implant-associated pathologies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany 2017. ISBN 978-3-662-54203-3.
12. Fujishiro T, Moojen DJ, Kobayashi N, Dhert WJ, Bauer TW. Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clin Orthop Relat Res* 2011, 469:1127-133.
13. Perino G, Ricciardi BF, Jerabek SA, Martignoni G, Wilner G, Maass D, Goldring SR, Purdue PE. Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. *BMC Clin Pathol* 2014, 14:39. doi: 10.1186/1472-6890-14-39.
14. Ricciardi BF, Nocon AA, Jerabek SA, Wilner G, Kaplowitz E, Goldring SR, Purdue PE, Perino G. Histopathological characterization of corrosion product associated adverse local tissue reaction in hip implants: a study of 285 cases. *BMC Clin Pathol* 2016, 16:3. doi: 10.1186/s12907-016-0025-9.
15. Vaculova J, Gallo J, Hurnik P, Motyka, O, Goodman S, Dvorackova J. Low intra-patient variability of histomorphological findings in periprosthetic tissues from revised joint arthroplasties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017, DOI: 10.1002/jbm.b.33990.
16. Hansen T, Otto M, Buchhorn GH, Schamweber D, Gaumann A, Delank KS, Eckardt A, Willert HG, Kriegsmann J, Kirkpatrick CJ. New aspects in the histological examination of polyethylene wear particles in failed total joint replacements. *Acta Histochem* 2002, 104: 263-69.
17. Pascual E, Vega J. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Cl Rh* 2005, 19: 371-86.
18. Caicedo MS, Samelko L, McAllister K, Jacobs JJ, Hallab NJ. Increasing both CoCrMo-alloy particle size and surface irregularity induces increased macrophage inflammasome activation in vitro potentially through lysosomal destabilization mechanisms. *J Orthop Res* 2013, 31:1633-642.
19. Sobieraj MC, Rimnac CM. Ultra-high molecular weight polyethylene: mechanics, morphology, and clinical behavior. *J Mech Behav Biomed Mater* 2009, 2: 433-43.
19. Bracco P, Bellare A, Bistolfi A, Affatato S. Ultra-high molecular weight polyethylene: influence of the chemical, physical, and mechanical properties on the wear behavior. A review. *Materials* 2017, 10:791 doi:10.3390/ma10070791.
20. Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TP, Amstutz HC. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* 1995, 29: 127-31.
21. Wolfarth DL, Han G, Bushar DW. Separation and characterization of polyethylene wear debris from synovial fluid and tissue samples of revised knee replacements. *J Biomed Mater Res* 1997, 34: 57-61.
22. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* 2007, 370:1508-519.
23. Jacobs J, Gilbert JL, Urban RM. Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 1998, 80:268-82.

24. Huber M, Reinisch G, Trettenhahn G, Zweymüller K, Lintner F. Presence of corrosion products and hypersensitivity-associated reactions in periprosthetic tissue after aseptic loosening of total hip replacements with metal bearing surfaces. *Acta Biomater* 2009, 5:172-80.
25. Langton DJ, Sidaginamale R, Lord JK, Nargol AV, Joyce TJ. Taper junction failure in large-diameter metal-on-metal bearings. *Bone Joint Res* 2012, 1: 56-63.
26. Meyer H, Mueller T, Goldau G, Chamaon K, Ruetschi M, Lohmann CH. Corrosion at the Cone/Taper Interface Leads to Failure of Large-diameter Metal-on-metal Total Hip Arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 2012, 470: 3101–108.
27. Cooper HJ, Urban RM, Wixson RL, Meneghini RM, Jacobs JJ. Adverse local tissue reaction arising from corrosion at the femoral neck-body junction in a dual-taper stem with a cobalt-chromium modular neck. *J Bone Joint Surg Am* 2013, 95: 865-72.
28. DeMartino I, Assini JB, Elpers ME, Wright TM, Westrich GH. Corrosion and fretting of a modular hip system: a retrieval analysis of 60 Rejuvenate stems. *J Arthroplasty* 2015, 30:1470-475. 36.
29. Buente D, Huber G, Bishop N, Morlock M. Quantification of material loss from the neck piece taper junctions of a bimodular primary hip prosthesis. A retrieval study from 27 failed Rejuvenate bimodular hip arthroplasties. *Bone Joint J Br* 2015, 97:1350-357.
30. Whitehouse MR, Endo M, Zachara S, Nielsen TO, Greidanus NV, Masri BA, Garbuz DS, Duncan CP. Adverse local tissue reactions in metal-on-polyethylene total hip arthroplasty due to trunnion corrosion. *Bone Joint J Br* 2015, 97: 1024-030.
31. Pourzal R, Hall DJ, Ehrich J, McCarthy SM, Mathew MT, Jacobs JJ, Urban RM. Alloy microstructure dictates corrosion modes in THA modular junctions. *Clin Orthop Relat Res* 2017, DOI 10.1007/s11999-017-5486-3.
32. Catelas I, Wimmer MA. New insights into wear and biological effects of metal-on-metal bearings. *J Bone Joint Surg Am* 2011, 93 Suppl 2: 76-83.
33. Xia Z, Ricciardi BF, Liu Z, von Ruhland C, Ward M, Lord A, Hughes L, Goldring SR, Purdue E, Murray D, Perino G. Nano-analyses of wear particles from metal-on-metal and non-metal-on-metal dual modular neck hip arthroplasty. *Nanomedicine* 2017, 13: 1205-217.
34. Bal SB, Garino J, Ries M, Rahaman MN. Ceramic materials in total joint arthroplasty. *Semin Arthro* 2006, 17:94-101
35. Macdonald N, Bankes M. Ceramic on ceramic hip prostheses: a review of past and modern materials. *Arch Orthop Trauma Surg* 2014, 134:1325-335.
36. Esposito C, Maclean F, Campbell P, Walter WL, Walter WK, Bonar FS. Periprosthetic tissues from third generation alumina-on-alumina total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 2013, 28:860-66.
37. Lorenzo V, Torres A, Salido E. Primary hyperoxaluria. *Nefrologia* 2014, 34(3):398-412.
38. Pereira BPG, Chang EY, Resnick DL, Pathria MN. Intramuscular migration of calcium hydroxyapatite crystal deposits involving the rotator cuff tendons of the shoulder: report of 11 patients. *Skeletal Radiol* 2016, 45:97-103.
39. Piccin A, Rizkalla H, Smith O, McMahon C, Furlan C, Murphy C, Negri G, Mc Dermott M. Composition and significance of splenic Gamna-Gandy bodies in sickle cell anemia. *Human Pathol* 2012, 43: 1028-036.
40. Pizzolato P. Formalin pigment (acid hematin) and related pigments. *Am J Med Technol* 1976, 42(11):436-40.
41. Jadeja H, Yeoh D, Lal M, Mowbray M. Patterns of failure with time of an artificial scaffold class ligament used for reconstruction of the human anterior cruciate ligament. *The Knee* 2007, 14:439-42.
42. Mortier J, Engelhardt M. Foreign body reaction in carbon fiber prosthesis implantation in the knee joint - case report and review of the literature. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000, 138(5): 390-94.
43. Pugliese D, Bush D, Harrington T. Silicone synovitis. Longer term outcome data and review of the literature. *J Clin Rheumatol* 2009, 15: 8-11.
44. Giuffrida AY, Gyuricza C, Perino G, Weiland AJ. Foreign body reaction to Artelon spacer: case report. *J Hand Surg Am* 2009, 34(8):1388-392.
45. Bauer TW. An overview of the histology of skeletal substitute materials. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131:217-24.
46. James RA, Singh-Grewal D, Lee, SJ, McGill J, Adib N. Lysosomal storage disorders: A review of the musculoskeletal features. *J Paediatr Child Health* 2016, 52: 262-71.
47. Campochiaro C, Tomelleri A, Cavalli G, Berti A, Dagna L. Erdheim-Chester disease. *Eur J Intern Med* 2015, 26:223-29.

48. Di Laura A, Quinn PD, Panagiotopoulou VC, Hothi HS, Henckel J, Powell JJ, Berisha F, Amary F, Mosselmans JFW, Skinner JA, Hart AJ. The chemical form of metal species released from corroded taper junctions of hip implants: synchrotron analysis of patient tissue. *Sci Rep* 2017, 7:10952 DOI:10.1038/s41598-017-11225-w.
49. Schoon J, Geißler S, Traeger J, Luch A, Tentschert J, Perino G, Schulze F, Duda GN, Perka C, Rakow A. Multi-elemental nanoparticle exposure after tantalum component failure in hip arthroplasty: In-depth analysis of a single case. *Nanomedicine* 2017, 13: 2415-423.
50. Stachowiak GW, Pdsiadlo P. Characterization of wear particles and surfaces. *Wear* 2001, 249:194-200.
51. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, Lohmann CH. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. *J Bone Joint Surg Am* 2005, 87(1): 28-36.
52. Xia Z, Kwon YM, Mehmood S, Downing C, Jurkschat K, Murray DW. Characterization of metal-wear nanoparticles in pseudotumor following metal-on-metal hip resurfacing. *Nanomedicine* 2011, 7:674-81.
53. Hopf F, Thomas P, Sesselmann S, Thomsen, MN, Hopf M, Hopf J, Krukemeyer MG, Resch H, Krenn V. CD3+ lymphocytosis in the peri-implant membrane of 222 loosened joint endoprostheses depends on the tribological pairing. *Acta Orthopaedica* 2017, DOI: 10.1080/17453674.2017.1362774.
54. Stratton-Powell AA, Pasko KM, Brockett CL, Tipper JL. The biologic response to Polyetheretherketone (PEEK) wear particles in total joint replacement: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* (2016), 474:2394-404.

Figure legends

Figure 1 Histological particle algorithm: Implant wear particles. These particles are identified in the periprosthetic tissue/SLIM by type, color and size.

Figure 2 Histological particle algorithm: Non-implant related particles. These particles in the periprosthetic tissue/SLIM are of endogenous and/or foreign origin.

Figure 3 Polyethylene (PE) particles. A) Osteolysis with diffuse macrophagic infiltrate containing PE micro-particles (x200), birefringent PE micro-particles under polarized light, upper right inset (x400), total ankle replacement implant, lower right inset; B) 1. Oil red O positivity for PE particles in MoP TKA implant (x200); 2. Oil red O positivity for tribocorrosion metallic particles in MoM HRA implant (x200); C) Macroparticulate PE (black arrows) in multinucleated giant cells (x200); birefringent particles under polarized light, upper right inset (x200); left unicompartmental knee implant with large area of abrasion/delamination (blue arrow), lower right inset; D) Supra-macroparticulate PE particle lined by multinucleated giant cells in a case of failed total elbow prosthesis (x200); birefringent particle under polarized light, inset (x200).

Figure 4 Metallic non-ferrous particles. A) Conventional black metallic particulate debris (white arrows) in MoP implant x400; birefringent PE debris is evident as blue, needle-shaped particles under polarized light, inset (x400); B) Macrophagic and giant cell reaction to conventional particulate metallic debris with irregular macroparticles in multinucleated giant cells (blue arrows) with empty lacunae of methyl methacrylate orthopedic cement (black arrow) (x200); femoral head with a large band of abrasion (white arrow) secondary to impingement on the distorted and cemented acetabular rim (green arrow), inset; C) Oxidized metallic particulate debris in MoM HRA implant macrophages filled with tribocorrosion nanoparticles and rod/needle-shaped edge loading larger particles (black arrows) (x400); femoral head with osteolytic cavity (white arrow) and neo-synovium with charcoal-gray color, indicative of metallic debris from edge loading, inset; D) Deposits of large aggregates of greenish corrosion products in enlarged trochanteric bursa of a MoM THA implant with MAS generated at head/neck junction by mechanically assisted fretting/crevice corrosion x100; details of particles with green (CoCr), red (blood-derived) and black (titanium) layers, inset (x400); E) Macrophagic infiltrate containing predominantly tribocorrosion metallic nanoparticles in MoM HRA implant, semithin section, toluidine blue (x400); macrophagic infiltrate, H&E stain, inset (x400); F) Macrophagic infiltrate containing predominantly tribocorrosion metallic nanoparticles (white arrow) and crevice/fretting corrosion large particle aggregate in a multinucleated giant cell (black arrow) in a MoM THA implant with MAS, semithin section, toluidine blue (x 400); macrophagic infiltrate, H&E stain, inset (x400); G) Macrophagic infiltrate containing crevice/fretting corrosion, irregular metallic

nanoparticles in a non-MoM THA with CoCr DMN, semithin section, toluidine blue (x400); giant cell with a large aggregate of nanoparticles (white arrow), semithin section, toluidine blue, upper right inset (x400); macrophagic infiltrate H&E stain, lower right inset (x400); H) Corrosion products generated by fixation device (x100). Metallic plate and metallic screws with corrosion observed at the screw head/threaded body junction (white arrow), inset.

Figure 5 Ceramic/ Polymethyl methacrylate (PMMA) orthopedic cement particles. A) Ceramic particulate debris, small and large (black arrows) particles (x400); fractured alumina ceramic liner in a ceramic-on-ceramic hip implant, inset; B) Ceramic particulate debris and scattered black particles of conventional metallic debris (white arrows) (x400). Edge loading of the ceramic liner (white arrow) in a zirconia toughened alumina ceramic-on-ceramic hip implant with Ti metallic adapter sleeve, inset; C) Hydroxyapatite. Macrophagic/giant cell reaction to deposits of hydroxyapatite (black arrow) with calcification (white arrow) (x400); D) PMMA orthopedic cement. Large vacuoles of orthopedic cement dissolved in tissue processing and containing residual particles of radiographic contrast agent (blue arrow) are lined by multinucleated giant cells (x200) and a smaller vacuole is engulfed by a multinucleated giant cell (black arrow) (x400); E) Macrophagic infiltrate containing numerous particles of radiographic contrast agent, indicative of third body wear implant failure (x400).

Figure 6 Crystal Deposits. A) Calcium pyrophosphate (CPP). Synovial sclerosis with large amount of CPP (x100); CPP positive birefringent crystals with rhomboid shape under polarized light, inset (x200); B) Monosodium urate. Macrophagic and giant cell reaction to fascicles of dissolved urate crystals (black arrow) (x200); residual negative birefringent crystals under polarized light, inset (x400); C) Oxalate. Deposition of oxalate crystals in bone marrow in a case of primary oxaluria (x200). Positive birefringent crystals under polarized light, inset (x400); D) Cholesterol. Clefts of cholesterol crystals in long-standing chronic bursitis with macrophagic reaction with numerous foamy forms to particulate wear debris of MoM THA implant (x200); E) Hydroxyapatite (calcinosis). Spherical and targetoid deposits of calcium hydroxyapatite in calcific bursitis of shoulder joint (x200); F) Hydroxyapatite (calcinosis). Bone marrow stromal reaction to deposits of calcium hydroxyapatite (black arrow) with brisk osteoblastic activity and thick osteoid seam (white arrow) in a femoral head with periarticular tumoral calcinosis in a case of long-standing scleroderma. Undecalcified bone section, Goldner's Masson trichrome stain (x200) with black calcium hydroxyapatite deposits evident in the inset (blue arrow), Von Kossa stain (x200).

Figure 7 Hemorrhage byproducts and calcific/osseous deposits. A) Hemosiderin pigment in neo-synovium (x100); hemosiderin deposits positive for PBR, PBR stain, inset (x100); B) Gamna-Gandy bodies in failed MoP THA with hemorrhage secondary to multiple dislocations (x400). Positivity to PBR reaction, PBR stain, inset (x400); C) Formalin pigment artifact, negative for PBR reaction, PBR stain (x100); D) Lime (dystrophic calcification) in periprosthetic neo-synovium of a case of hip implant failure (x200); E) Neo-synovium of a failed MoP THA implant for aseptic loosening/osteolysis with abundant osseous detritus embedded in the superficial layer (x100).

Figure 8 Non-implant wear, foreign particles/bone graft. A) Absorbable surgical suture. Macrophagic/giant cell reaction to deposits of absorbable suture material (x200). Birefringent suture under polarized light, inset (x200); B) Fixation Device (interference plastic poly-DL-lactide screw). Macrophagic/giant cell reaction with palisading macrophages to plastic screw material implanted for anterior cruciate ligament reconstruction (x200). Focal birefringence under polarized light, inset (x200); C) Scaffold composite material (carbon and polyester). Reactive fibrous tissue with embedded fragments of carbon fibers from a scaffold class anterior cruciate ligament (x200); D) Joint spacer material. Macrophagic reaction to silicone elastomer particles from a finger prosthetic implant (x200); particles are non-reactive under polarized light, inset (x400); E) Joint spacer material. Florid giant cell reaction to particles of porous polyurethaneurea (x200). Particles are reactive under polarized light, inset (x400); F) Visco-supplement reaction. Palisading macrophages and giant cell (black arrows) reaction to hyaluronan deposits (white arrow) (x100); G) Skeletal substitute material.

Demineralized bone matrix of allograft implant with intervening fibrous tissue (x200); H) Skeletal substitute material. Porous tricalcium phosphate bone substitute (x200).

Figure 9 Differential diagnosis between particle laden macrophagic infiltrate and other macrophagic diseases in bone. A) Implant aseptic loosening (osteolysis). Dense macrophagic infiltrate in the bone marrow in a MoP THA implant (x200). Birefringent PE microparticles under polarized light, inset (x400); B) Implant aseptic loosening (osteolysis). Diffuse macrophagic infiltrate containing conventional and corrosion metallic particles in a femoral head of a MoM HRA implant (x200); C) Gaucher's disease. Macrophagic infiltrate in the bone marrow of a femoral head (x200). Details of the macrophagic crumpled cytoplasm, inset (x400); D) Erdheim-Chester disease. Bone marrow from proximal tibia with foamy macrophages and mixed chronic inflammatory infiltrate (x200). Mixed chronic inflammatory infiltrate and adjacent sclerotic cancellous bone with osteoblastic rimming, inset (x400).

Abbreviations

ALTR: Adverse local tissue reaction; ALVAL: Aseptic lymphocytic vasculitis associated lesion; ARMD, Adverse reaction to metallic debris; BSEM: Backscatter scanning electron microscopy; CoC: ceramic-on-ceramic; CoP: Ceramic-on-plastic; CoCr: Cobalt-chromium; CPLM: Compensated polarized light microscopy; CPP: Calcium pyrophosphate; DMN: Dual modular neck; EDS: Energy-dispersive X-ray spectroscopy; FITR: Fourier infrared transmission spectroscopy; H&E: Hematoxylin and eosin; HPA: Histological particle algorithm; HRA: Hip resurfacing arthroplasty; LHTHA: Large head total hip arthroplasty; MAS, Metallic adapter sleeve; MoP: Metal-on-plastic; Non-MoM DMNTHA, Non-metal-on-metal hip dual modular neck total hip arthroplasty; PH, Primary oxalosis; PMMA, Polymethyl methacrylate orthopedic cement; SDD, silicon drift detector; SEM: Scanning electron microscopy; SLIM, Synovial-like interface membrane; SP-ICP-MS: Single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry; TEM, transmission electron microscopy; THA, total hip arthroplasty; TKA, total knee arthroplasty; UHMWPE, Ultra-high molecular weight polyethylene; XANES: X-ray absorption near edge structure; XAS: Synchrotron micro X-ray absorption spectroscopy; XRD: X-ray diffraction spectrometry.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

GP– study conception, data collection, pathological analysis, data interpretation, manuscript preparation. SS – study conception, data collection, pathological analysis, data interpretation, manuscript preparation. MH – pathological analysis, data interpretation; DR – data collection, pathological analysis; JG, VJ, NS – critical review of the manuscript; KJP, MS, PT, MT, MGK, RH, TH – data interpretation for multidisciplinary assessment of HPA; WW, FB – data collection and interpretation; TG, SS, WR – clinical assessment of data interpretation; ZX – data preparation and particle nanoanalysis; EP- data collection, data interpretation; VK – study conception, pathological analysis, data interpretation, manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Simone Giak for her expert secretarial and editorial skills; Irina Shuleshko and Yana Bronfman for technical assistance in histology preparations; Philip Rusli for preparation of the illustrations.