

Univerzita Palackého v Olomouci

Ortopedická klinika LF a FN Olomouc



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

MUDr. Martin Hobza

VYBRANÉ ASPEKTY PATOLOGIE KLOUBNÍCH NÁHRAD
VYPLÝVAJÍCÍ Z JEJICH MATERIÁLOVÉHO SLOŽENÍ

DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Studijní program: Chirurgie

Olomouc, 2020

Palacký University Olomouc

Faculty of Medicine and Dentistry



Faculty of Medicine
and Dentistry

MUDr. Martin Hobza

SELECTED ASPECTS OF JOINT REPLACEMENT
PATHOLOGY ORIGINATING FROM THE IMPLANT
MATERIALS

DISSERTATION THESIS

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

Study program: Surgery

Olomouc, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod odborným vedením prof. MUDr. Jiřího Gallo, Ph.D. a že jsem řádně uvedl a citoval 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 4.5.2020

MUDr. Martin Hobza

Identifikační záznam

HOBZA, MARTIN *Vybrané aspekty patologie kloubních náhrad vyplývající z jejich materiálového složení. [Selected aspects of joint replacement pathology originating from the implant materials]*. Olomouc, 2020. Počet stran: 105, počet příloh: 7.

Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ortopedická klinika, 2020. Školitel: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval všem, díky kterým tato práce mohla vzniknout. Především svému školiteli, prof. MUDr. Jiřímu Gallo, Ph.D., za odborné vedení, tematické nápady, získané kontakty, pomoc při tvorbě publikací i za vyžadovanou disciplínu, bez které člověk jen těžko dosahuje výsledku. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Martinu Kubovi, doc. Ing. Davidu Mildemu, Ph.D., a RNDr. Tomáši Pluháčkovi Ph.D. z Přírodovědecké fakulty UP za jejich spolupráci při analýze kovů v peroperačních vzorcích, Ing. Matúši Ranušovi, Ph.D. a týmu prof. Ing. Ivana Křupky, Ph.D. a doc. Ing. Martina Vrbky Ph.D. z Fakulty strojního inženýrství, VUT Brno za spolupráci na tribologické analýze polyetylenů a MUDr. Zuzaně Slobodové, Ph.D. z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP za histologickou analýzu periprotetických tkání, stejně jako všem dalším spolupracovníkům, kteří se podíleli na vzniklých publikacích. Dále bych chtěl poděkovat všem pacientům, kteří se s důvěrou svěřili do naší péče a souhlasili s účastí na výzkumné činnosti.

Chtěl bych také poděkovat své partnerce, blízkým a přátelům, kteří mě podporovali při mé práci a také svým zesnulým rodičům, kteří mi vždy byli vzorem a oporou.

Abstrakt

Materiálové složení totální endoprotézy určuje nejen její mechanické vlastnosti a odolnost vůči námaze, ale podněcuje i spektrum reakcí lidského těla na daný implantát. Zánětlivá reakce na produkty endoprotézy vedoucí k jejímu uvolnění z kostního lůžka je nejčastější příčinou pozdního selhání. Na reakci se podílí jak složky vrozené imunity, které dominují ve formě granulárního zánětu kolem částic polyetylenů, tak i složky získané imunity, zejména zprostředkované T-lymfocyty kolem částic kovů. Snahou ortopeda i výrobců je poskytnout pacientovi implantát s co nejdélejší životností, tedy takový, který by co nejméně produkoval otěrové a korozivní částice a indukoval tak minimální zánětlivé změny.

Tato práce je rozdělena na experimentální část, která popisuje vývoj bezkontaktního měření otěru polyetylenové jamky a na klinickou část obsahující dvě na sebe navazující studie. V první jsme nejprve měřili koncentrace kovů v periprotetických tkáních, výpotku a periferní krvi pacientů, kterým byla prováděna revize endoprotézy. V navazující studii byla v souběhu se stanovením koncentrace kovů v periprotetických tkáních provedena jejich histopatologická analýza.

V experimentální části jsme vyvinuli a otestovali novou metodu měření otěru polyetylenové jamky pomocí 3D optického skeneru na souboru 13 extrahovaných jamek Bicon. V klinické praxi je známý vztah rychlosti otěru polyetylenů k riziku aseptického uvolnění a snahou je tedy tento otěr minimalizovat. Optické skenování poskytuje rychlé měření a možnost následné práce s digitálním modelem jamky v rámci postprocessingu. Díky digitalizaci je možné během jednoho skenování zhodnotit jak vektor a míru lineární decentrace, tak i objemový otěr jamky. Metoda byla validována srovnáním s gravimetrií u 3 nových jamek, na kterých byl laboratorně proveden zátěžový otěr v kyvadlovém simulátoru, opakovatelnost měření přitom dosáhla hodnoty 0,005 mm.

V první studii klinické části jsme měřili koncentrace kovů v periprotetických tkáních, výpotku a periferní krvi v souboru 117 pacientů odebraných při revizi TEP kyčle nebo kolene s artikulačními páry kov-polyetylen a keramika-polyetylen. Periprotetické tkáně byly odebírány ve 2 vrstvách, první těsně naléhající na endoprotézu a druhé vzdálenější od implantátu. Koncentrace kovů byla stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Nejvyšších koncentrací dosahovaly kovy v periprotetických tkáních ve vrstvě blíže implantátu, naopak v krvi k akumulaci nedocházelo. Koncentrace kovů vzrůstala s délkou nošení endoprotézy v těle a nejvyšší byla u uvolněných implantátů. Tkáně se tedy postupně

nasycují kovy z endoprotézy v závislosti na délce expozice a vzdálenosti od implantátu. Ty, které naléhají na implantát, představují jakousi ochrannou bariéru, která chrání pacienta před zvýšenou systémovou zátěží těžkými kovy.

Ve druhé studii byla provedena histopatologická analýza periprotetických tkání souběžně s určením koncentrací jednotlivých kovů ve stejných tkáních. Soubor tvořilo 24 pacientů s revidovanou TEP kyčle nebo kolene s artikulačními páry kov-polyetylen nebo keramika-polyetylen. Součástí hodnocení bylo i určení typu periprotetické membrány dle Krenna ve vztahu k typu implantátu, indikace revize a délce expozice. U časných revizí byla naměřena nízká koncentrace kovů v periprotetických tkáních a převažovala membrána IV. typu dle Krenna s nízkým buněčným zastoupením, naopak po delším pobytu implantátu v těle byly naměřeny vyšší koncentrace kovů a typ membrány dle Krenna nebyl určující, stejně jako rozdíly v typu implantátu. Souběžně s koncentrací kovů a délkou expozice narůstal počet lymfocytů v periprotetické membráně, z čehož můžeme usuzovat na zvyšující se podíl specifické imunitní reakce. Tato práce upozorňuje na skutečnost, že problém kovů se netýká jen endoprotéz typu kov-kov, ale i ostatních artikulačních párů. Z našich výsledků vyplývá, že i při studiu aseptického uvolnění bude nutné zaměřit pozornost na reakci tkání na kovy. Porovnáním tkáňové exprese mediátorů zánětu s tkáňovými koncentracemi kovů a polyetylenu bude možné odlišit skutečný podíl obou složek na patologii selhání.

Klíčová slova: totální endoprotéza, aseptické uvolnění, otěr, polyetylen, kovy, lymfocyty, histopatologie

Abstract

Material composition of total joint replacement determines not only its mechanical stress resistance but the spectre of human body response as well. Inflammatory reaction to prosthetic byproducts leading to its loosening from bone bed is the most common reason for late failure. The reaction is mediated by innate immunity, dominated by granulation around polyethylene particles and adaptive immunity, mediated by T-lymphocyte reaction around metal particles. Both orthopaedic surgeon and manufacturer try to offer an implant with best longevity, i.e. which would produce least amount of wear and corrosive particles that induce inflammatory changes.

This thesis is divided into experimental part, which describes a development of contactless wear measurement of polyethylene cup and a clinical part consisting of two following studies. In the first study, we measured metal concentration in periprosthetic tissues, joint fluid and peripheral blood of patients undergoing endoprosthesis revision. In the following study, a histopathological examination of periprosthetic tissues was made in addition to their metal content measurement.

In the experimental study, we developed and tested a new method of polyethylene cup wear measurement by 3D optical scanner on a group of 13 extracted Bicon cups. Accelerated wear of polyethylene is known to increase the risk of aseptic loosening and there is therefore a tendency to minimize it. Optical scanning provides a fast measurement and gives us opportunity of further postprocessing work with the digital model. Through digitisation, it is possible to assess vector and distance of linear wear as well as volumetric wear during one scanning session. The method was validated by comparison with gravimetric method on 3 new cups, on which a laboratory wear has been induced by a pendulum simulator. Repeatability of the method was 0.005 mm.

In the first clinical study, we measured metal concentration in periprosthetic tissues, joint fluid and peripheral blood in group of 117 patients during revision of total hip or knee replacement with metal-on-polyethylene or ceramic-on-polyethylene bearings. Periprosthetic tissues were divided in two layers, one in direct contact with the implant and the second further apart. Metal content was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry. Tissues adjacent to endoprosthesis achieved the highest metal concentrations, whereas peripheral blood did not accumulate metals. Concentration has been rising with time from implantation and the highest levels were measured around loosened implants. The accumulation of tissue metals is therefore

dependent on length of exposition and distance from the implant. In our group these tissues acted as a barrier for prevention from further systemic dissemination of metals.

In the second study, concentration of different metals has been compared to histopathological findings in group of 24 patients during revision of total hip or knee replacement with metal-on-polyethylene or ceramic-on-polyethylene bearings. A membrane type according to Krenn in relation to implant type, revision indication and length of exposition has been included in the analysis. In early revisions a low metal concentration in periprosthetic tissues and a low cellular count was found with mostly type IV membrane according to Krenn. A higher concentration of metals was found in late revisions, but the type of membrane was not determining. Type of tissue reaction did not correlate with specific implant type. Along with rising metal concentrations in longer exposition a rising tissue lymphocyte count was found, which is indicating of specific immunity participation. This thesis draws attention to the fact, that the issue of metals is not restricted only to metal-on-metal endoprosthesis and other bearing types are involved. When studying the aseptic loosening, a reaction to metals and its inflammatory mediators examination should be considered as well as its proportion against polyethylene and other debris reaction.

Keywords: total joint replacement, aseptic loosening, wear, polyethylene, metal, lymphocytes, histopathology

OBSAH

I. Úvod.....	13
Totální endoprotéza kyčle a kolene.....	13
Typy endoprotéz, biomateriály a artikulační povrchy.....	15
Stručný přehled historie endoprotetiky	16
Český rozvoj endoprotetiky	21
Materiálový vývoj polyetylenu	23
Příčiny selhání endoprotézy váhonosných kloubů	24
Periprotetická osteolýza a aseptické uvolnění.....	25
Kovy	27
Běžně používané kovy v endoprotetice.....	27
Mechanismy degradace kovových povrchů <i>in vivo</i>	28
Endoprotézy typu kov-kov	29
Biologické působení kovů na buněčné úrovni	30
Alergie na kovy	31
Patofyziologie.....	31
Incidence.	31
Symptomatologie.	32
Diagnostika.....	32
Terapie.....	34
Podíl na osteolýze.....	34
Metalóza	36
ALVAL a pseudotumory.....	38
Systémová toxicita	39
Riziko karcinogeneze	40
II. Vlastní práce	41

A. Experimentální část: Vývoj metodiky k přesnému stanovení opotřebení PE vložky u TEP kyčle a její použití u extrahovaných PE vložek	41
Úvod	42
Cíle	42
Metodika a soubor pacientů	43
Využití nové metody k měření otěru	43
Validace metody	47
Klinické měření lineárního otěru podle Dorra	48
Soubor pacientů	48
Jamka Bicon	51
Výsledky	52
Validace 3D skenování pomocí gravimetrie	52
Analýza extrahovaných jamek	53
Porovnání metod měření lineárního otěru	54
Diskuze	55
Závěr	55
B. Klinická část	56
Studie 1.: Hodnocení koncentrace a distribuce kovů v periprotetických tkáních, výpotku a krvi u pacientů se selhávající endoprotézou kyčle nebo kolene.	57
Cíle	57
Úvod	58
Metodika a soubor pacientů	59
Pacienti	59
Odběr vzorků	60
Příprava vzorků	60
Stanovení hladiny kovů	60
Reagencia, standardy a certifikované referenční materiály	61
Statistická analýza	61

Výsledky.....	61
Zjištěné koncentrace kovů ve vzorcích	61
Porovnání sledované skupiny a kontrol	62
Porovnání koncentrace kovů kolem TEP kyčle a TEP kolena.....	63
Porovnání vrstev periprotetické tkáně.....	63
Korelační analýza	63
Doba od implantace.....	64
Indikace k revizi	64
Diskuze.....	65
Závěr.....	67
Studie 2.: Stanovení vztahu mezi koncentracemi kovů v periprotetických tkáních a histologickým nálezem v těchto tkáních.	68
Cíl práce	68
Úvod	68
Metodika a soubor pacientů	70
Soubor pacientů.....	70
Odběr vzorků.....	70
Histopatologické vyšetření.....	70
Histopatologické hodnocení	72
Stanovení koncentrace kovů.....	72
Statistická analýza	72
Výsledky.....	73
Délka expozice implantátu	73
Stanovení hladiny kovů v periprotetických tkáních.....	73
Histopatologické hodnocení periprotetických tkání.....	74
Korelační analýza	78
Analýza hlavních komponent.....	78

Diskuse	78
Závěr.....	80
III. Shrnutí závěrů jednotlivých studií.....	81
IV. Summary	82
V. Seznam použitých zkratk.....	83
VI. Seznam obrázků, grafů, schémat a tabulek	85
VII. Doplnující obrázky	87
VIII. Seznam použité literatury	90
IX. Elektronické zdroje	104
X. Seznam příloh – publikace autora disertační práce	105

I. ÚVOD

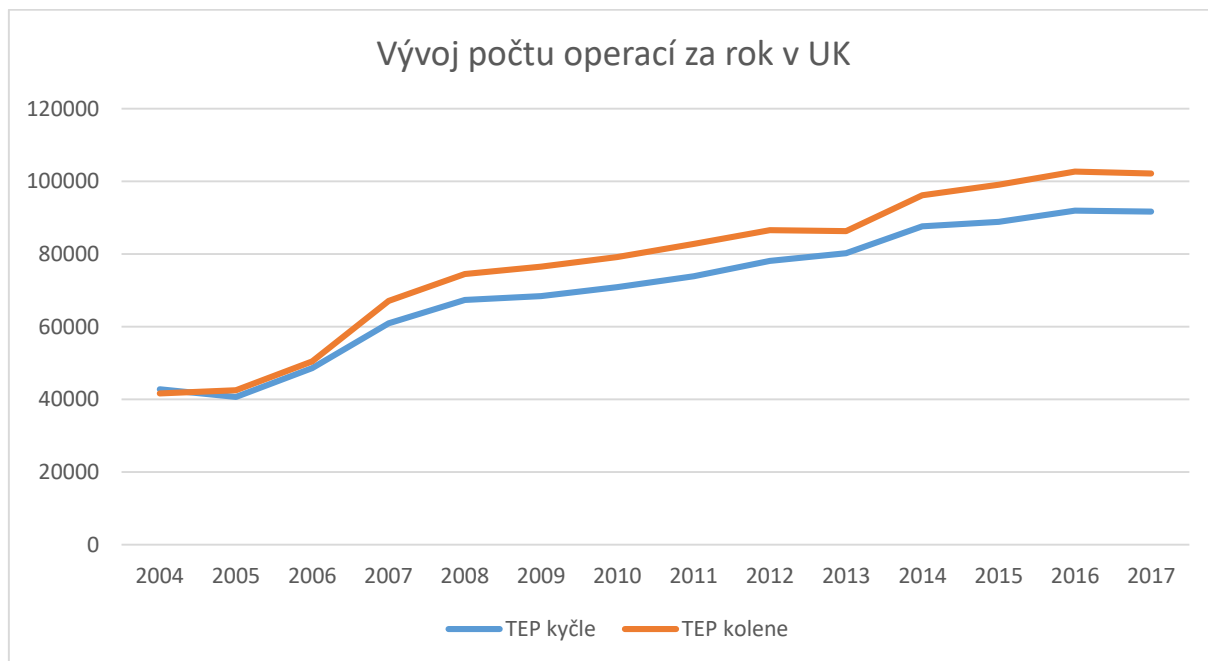
Totální endoprotéza kyčle a kolene

Totální endoprotéza (TEP) kyčelního kloubu, jejíž implantací je nahrazen poškozený kloub, bývá označována jako příklad nejúspěšnější operace dvacátého století. Tvrzení vyplývá z velikosti a výdrže léčebného efektu a četnosti jeho dosahování – spokojenost s výsledkem operace udává kolem 90 % pacientů (Schaal 2016) a více než 95 % moderních endoprotéz kyčle vydrží fungovat déle, než 10 let (Ferguson 2018). Totální endoprotéza kolenního kloubu rovněž dosahuje vysoké úspěšnosti, pro komplexnost kolenního kloubu a technické řešení jeho náhrady je však udávána spokojenost pacientů o něco nižší, obvykle pod 90 % (Conner-Spady 2020). V klinické praxi máme na výběr z několika typů artikulačních povrchů, mezi nimiž je nejčastěji používaný polyetylen (PE) v kombinaci s kovem či keramikou, nosné části implantátu jsou většinou vyrobeny z kovového materiálu.

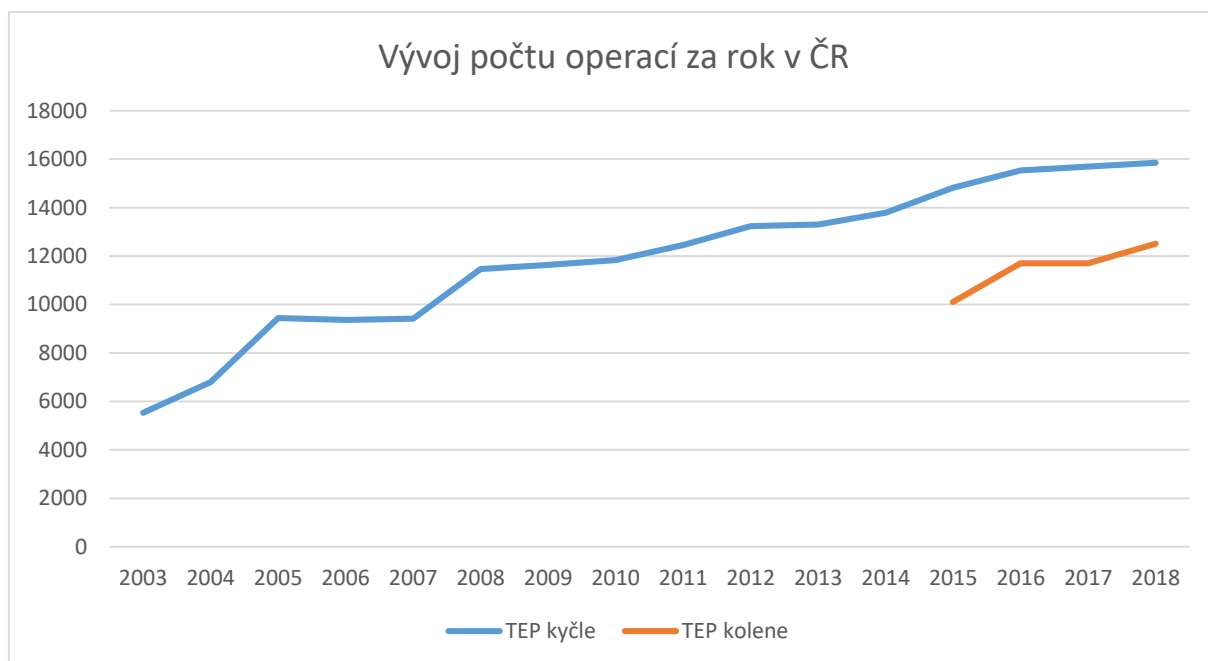
Navzdory jejich klinickému úspěchu mají endoprotézy celou řadu možných komplikací a jako nejčastější příčina pozdního selhání se obvykle uvádí aseptické uvolnění. Jedná se o zánětlivou reakci periprotetických tkání indukující osteolýzu, která nakonec vede k uvolnění endoprotézy z kostního lůžka. Tato zánětlivá reakce bývá také označována jako „částicová nemoc“ (Harris 1994). Jejím iniciátorem je imunitní reakce na částice uvolněné z endoprotézy, nejčastěji právě částice polyetylenu, který je běžně používán v rámci artikulačního páru, nicméně tento problém se nevyhýbá ani jiným materiálům. Z tohoto důvodu je jednou z hlavních motivací výrobců zkvalitnit tribologické vlastnosti artikulačních povrchů. V rámci experimentální části této práce byla proto testována nová metoda hodnocení opotřebením povrchu polyetylenové jamky, která by umožnila ortopedům i výrobcům jednodušší a přesnější měření. Další etiopatogeneze částicové nemoci je popsána podrobně jinde (Gallo 2013).

Ne zcela vyjasněnou patogenetickou roli však mají dosud kovy. Přes veškerý pokrok v metalurgii je zřejmé, že neexistuje implantát, který by neuvolňoval do svého okolí alespoň minimální množství kovů, z nichž je vyroben. Řada studií prokazuje přítomnost kovů uvolněných z kloubních náhrad v periprotetických tkáních a výpotku (Dobbs 1980, Kuba 2019) a v některých případech i ve vzdálených lokalitách (Jacobs 1998). Současně je známo, že trvalá přítomnost zejména těžkých kovů v těle může vyvolávat nežádoucí účinky. Počet endoprotéz implantovaných na celém světě se pohybuje v řádech několika milionů a stále stoupá (grafy 1 a 2). Proto je nutné potenciálně škodlivé účinky kovů uvolňujících se z povrchu endoprotéz ve formě iontů či částic studovat a následně referovat.

Klinická část této práce se zabývá studiem uvolňování kovů endoprotézy do lidského těla a následnou tkáňovou odpovědí na jejich přítomnost.



Graf 1: Vývoj počtu primoimplantací TEP kyčle a kolene za rok dle Britského národního registru kloubních náhrad (National Joint Registry for England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man, 15th Annual Report, 2018; staženo z internetu).



Graf 2: Vývoj počtu primoimplantací TEP kyčle a kolene za rok dle Národního registru kloubních náhrad České republiky v letech 2003 až 2018. TEP kolen začaly být registrovány od roku 2015.

Typy endoprotéz, biomateriály a artikulační povrchy

Implantáty váhonosných kloubů jsou fixovány buď kostním cementem, tedy polymetylmakrylátem, nebo jsou tzv. necementované, tedy fixovány mechanicky, kdy do povrchu implantátu postupně vrostle kost (osteointegrace). Kombinaci dvou komponent s různou fixací označujeme jako hybridní fixaci.

Totální endoprotéza kyčle se skládá z acetabulární komponenty, femorálního dřívku a hlavičky. Cementovaná TEP kyčle má polyetylenovou acetabulární komponentu přímo fixovanou do kostního lůžka a obvykle leštěný chromkobaltový dřív. Necementovaná TEP kyčle má acetabulární komponentu vyrobenou z čistého titanu nebo jeho slitiny, do níž je upevněna artikulační vložka, femorální komponenta je rovněž z titanové slitiny. Kotvící povrchy necementovaného implantátu mají zdrsňenou mikrostrukturu obvykle opracovanou tryskáním, někdy ještě obohacenou o vrstvu hydroxyapatitu za účelem podpory osteointegrace.

Stykové plochy endoprotézy, které po sobě vzájemně kloužou a umožňují tak pohyb, se nazývají artikulačními povrchy. Interakcemi vzájemně proti sobě se pohybujících povrchů (tj. tření) i způsoby, jak tření omezit mazáním studuje biotribologie. Základní informace o biotribologii TEP kyčle jsou uvedeny v článku (Gallo 2013). V praxi se nejvíce prosadily kombinace kovové hlavičky a polyetylenové jamky (MoP, metal-on-polyethylene), dále keramické hlavičky v kombinaci s polyetylenovou nebo keramickou vložkou (CoP, ceramic-on-polyethylene nebo CoC, ceramic-on-ceramic). V minulosti se na některých pracovištích, resp. v některých zemích často používaly tvrdé páry (kov-kov), které se však – právě v souvislosti s nepředvídatelným zatížením pacientů těžkými kovy – musely stáhnout z klinické praxe.

Endoprotéza kolenního kloubu se skládá z femorální a tibiální komponenty, mezi nimiž je polyetylenová vložka. Jiné materiály pro artikulační vložku nejsou běžně používané. Naprostá většina endoprotéz kolene je fixovaná cementem a jedná se o chromkobaltové slitiny. Existují však i keramické náhrady kolena. Stejně jako u kyčle se v praxi používá značné množství typů (designů) kolenních náhrad, které se navíc třídí podle řady klinických či biomechanických kritérií (zachování nebo obětování zadního zkříženého vazů, podle kinematiky, stability apod.). Tibiální komponenta je tvaru oválné plochy, ze které vychází krátký fixační dřív směřující k tibiální dřevné dutině. Endoprotézu je možno doplnit o náhradu povrchu česky. TEP kyčle a kolene mají kromě primárního implantátu ještě celou řadu modifikací pro zvláštní účely včetně implantátů revizních. Provedení je v těchto případech složitější. Tyto implantáty mají

často robustnější konstrukce, to však s sebou může nést větší biologickou zátěž vyplývající z rozšíření plochy či přidání spojů.

Stručný přehled historie endoprotetiky

Kyčelní kloub. První zaznamenaný pokus nahradit kyčelní kloub je z Německa z roku 1891, kdy prof. Themistocles Glück prezentoval použití slonoviny jako náhradu u pacientů, kteří měli destruovanou femorální hlavici při onemocnění tuberkulózou (Brand 2011). Na přelomu 19. a 20. století bylo zkoušeno několik forem interpoziční artroplastiky mezi poškozené kloubní povrchy s využitím různých tkání – fascia lata, kůže atd. V roce 1925 Americký chirurg Marius Smith-Petersen vytvořil první „mold arthroplasty“ vyrobenou ze skla. Jednalo se o dutou polokouli, která byla nasazena na hlavici femuru a fungovala jako interpozitum, které umožňovalo hladké klouzání artikulačních povrchů. Ačkoli byl skleněný materiál biokompatibilní, nevydržel velkou zátěž v oblasti kyčelního kloubu a často mechanicky selhával. Následně vyzkoušel celou řadu materiálů včetně bakelitu a konečnou variantou bylo Vitallium, tedy kovová slitina kobaltu, chromu a molybdenu. Dle svého tvaru a funkce je tato náhrada v České literatuře známá pod pojmem Smith-Petersenova čepička. V roce 1946 bratři Judetové uvedli endoprotézu nahrazující femorální hlavici kotvenou transfemorálně hřebem do intertrochanterické oblasti, vyrobenou z akrylátu, později v modifikaci z chromkobaltu. Tato protéza neměla adekvátně vyřešené rozložení sil v oblasti kostního lůžka a často selhávala (Coventry 1987).

Řešení tohoto problému uvedl v roce 1950 Moore, kdy implantoval první nitrodřeňově kotvený dřík. Moorova endoprotéza měla límec a zahnutý tvar, aby kopírovala anatomii proximálního femuru a měla fenestrace pro odlehčení, ale stále neměla vyřešenou kostní fixaci a uvolňovala se.



Obrázek 1: Moorův dřík (zdroj: staženo z internetu).

Podobný dřík vyvinul Frederick Thompson, byl však bez fenestrací, což umožňuje jeho cementování a podobný design je využíván dodnes jako hemiartroplastika pro cervikokapitální náhradu (Danielsson 1965).



Obrázek 2: Thompsonův dřík (zdroj: staženo z internetu).

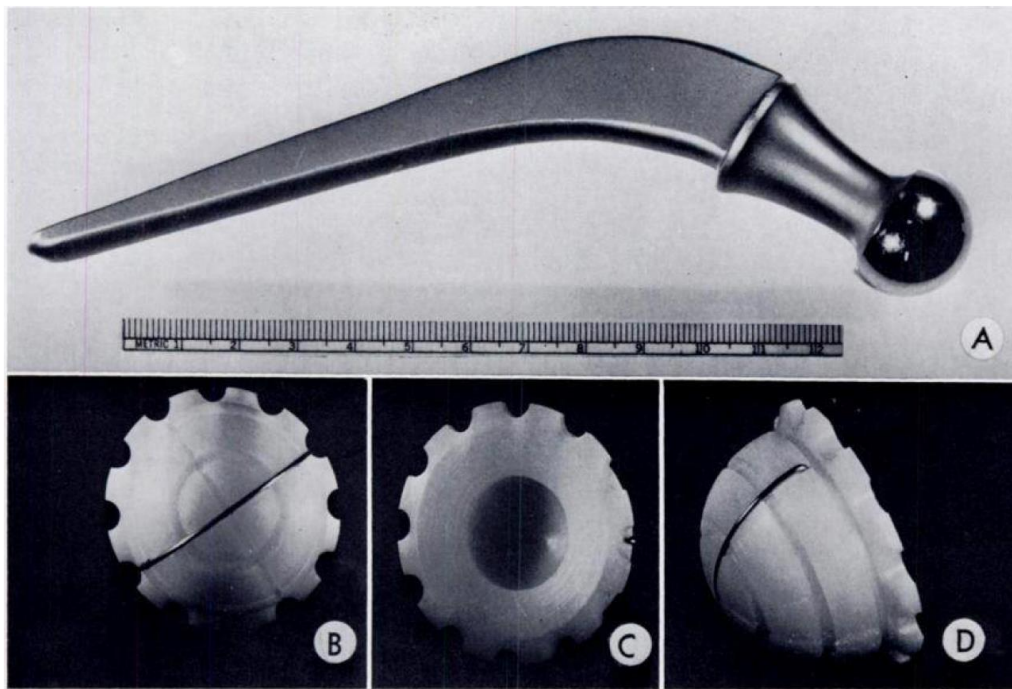
První běžně používanou endoprotézou typu kov-kov (MoM, metal-on-metal) implantoval George McKee, který v roce 1956 použil Thompsonův dřík v kombinaci s kobalt-chromovou jamkou, nejprve šroubovanou do acetabula, později posetou ostny. Tato endoprotéza už měla velmi dobré klinické výsledky, kdy podle některých studií měla 28leté přežití u 74 % pacientů (Brown 2002). Od tohoto designu bylo však ustoupeno pro četné lokální reakce na částice uvolněné z implantátu. Endoprotézy typu kov-kov poté v devadesátých letech 20. století zažily návrat do klinické praxe, což je dále popsáno v samostatné kapitole této práce.



Obrázek 3: McKee-Farrarova endoprotéza typu kov-kov (Dowson 2008).

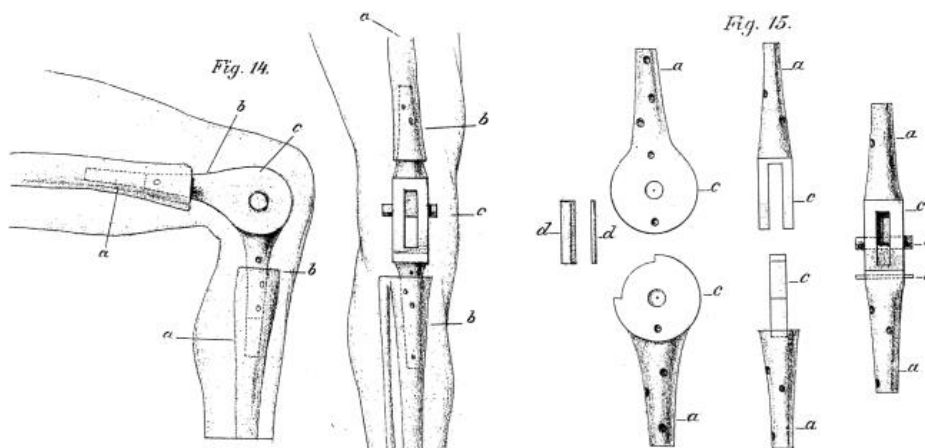
Dalším významným krokem v historii endoprotetiky bylo použití polymetylmetakrylátu, tedy kostního cementu, k fixaci náhrady. První pokusy byly zaznamenány od Kaiera a Jansena v Copenhagenu a Haboushe v New Yorku v roce 1951 a první cílenou fixaci totální endoprotézy cementem pak popisuje sir John Charnley ve své publikaci z roku 1960 (Charnley 1960).

Charnleyho druhým velkým příspěvkem k vývoji moderní endoprotézy byl vývoj artikulačního páru s nízkým třením. Prvně použil teflon, který ale katastroficky selhal z důvodu masivní tkáňové reakce na otěrové částice. V roce 1961 uvedl polyetylen jako ideální materiál pro jamku v kombinaci s kovovým dříkem opatřeným 22mm hlavičkou, obě komponenty byly fixovány kostním cementem a celý koncept nazval jako „*Low friction arthroplasty*“, tedy kloubní náhrada s nízkým třením (Charnley 1961). Tento koncept TEP kyčle je s úpravami dodnes platný.



Obrázek 4: Charnleyho endoprotéza s polyetylenovou jamkou (Campbell 1971).

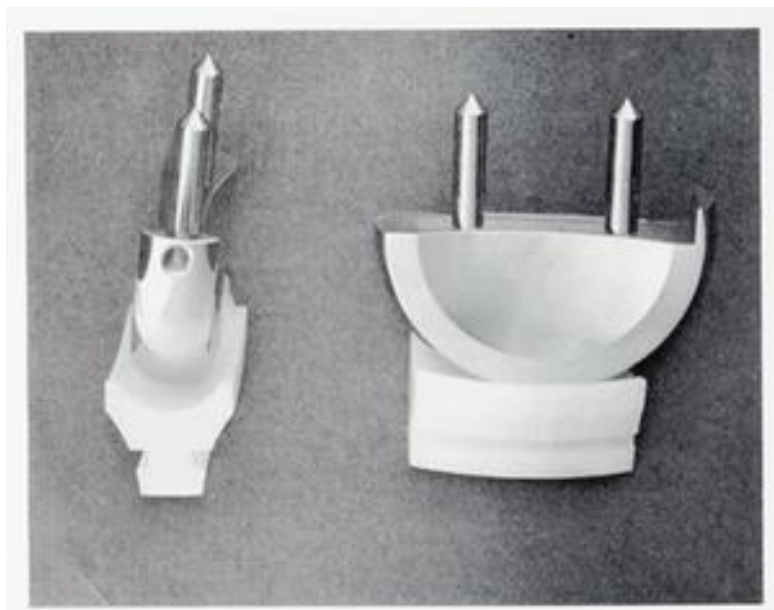
Kolenní kloub. Na počátku vývoje náhrady kolenního kloubu stál rovněž Themistocles Glück, který v 90. letech 19. století implantoval kladkový kloub vyrobený ze slonoviny (Brand 2011). V době, kdy ještě nebyly vyřešeny adekvátní podmínky aseptické operativy, není divu, že jeho implantát často selhával z důvodu infekce. Problém měl ale i s nedostatečnou fixací implantátu a přenosem sil. Waldius poté závěsný implantát vyrobil v roce 1951 z akrylátu a následně v roce 1958 z kobalt-chromové slitiny.



Obrázek 5: Implantát prof. Glücka vyrobený ze slonoviny (Brand 2011).

Intenzivní vývoj moderní endoprotézy kolenního kloubu pak proběhl v 70. letech 20. století, kdy několik skupin souběžně vyvíjelo tzv. kondylární design, který známe v současné době. Kanadský ortoped Frank Gunston v roce 1968 uvedl polycentrický implantát, který sestával

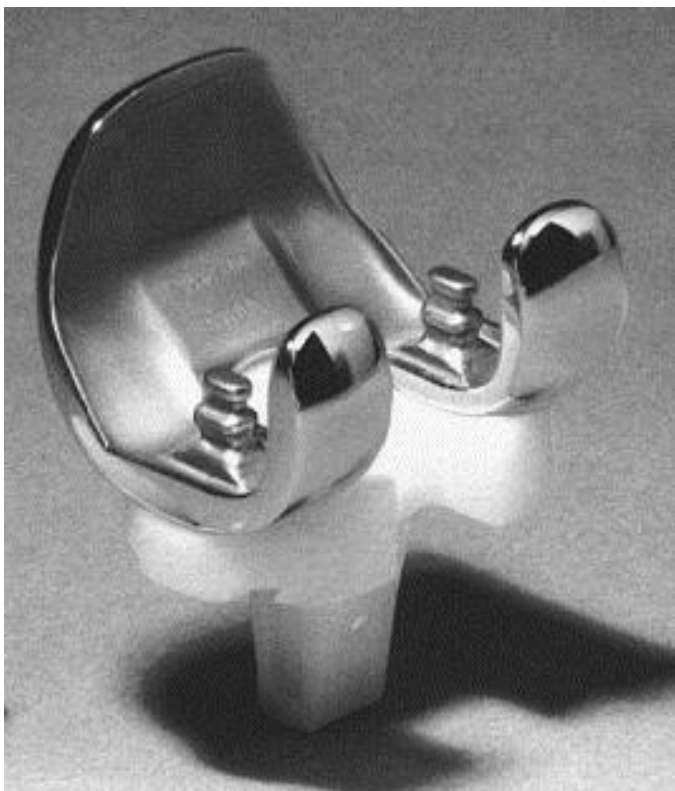
ze dvou unikondylárních náhrad v kombinaci s PE tibiálními komponentami a současně zachováním obou zkřížených vazů (Gunston 1971).



Obrázek 6: Gunstonův polycentrický implantát (Gunston 1971).

Michael Freeman a Sav Swanson uvedli v Imperial College of Science and Technology v Londýnské nemocnici (ICLH) svůj bikondylární implantát, který byl nazýván Freemanův-Swansonův implantát, nebo také „ICLH knee“ dle místa původu. Freeman se spolu s J. Insallem také začali zabývat balancováním flekčních a extenčních gapů a uvolňováním měkkých tkání k vybalancování kolene. V Americké Hospital for Special Surgery vyvinuli společně v týmu Chitranjan S. Ranawat, Allan Inglis, John Insall, and Peter Walker v roce 1971 tzv. duokondylární protézu. Tato endoprotéza ještě neřešila femoropatelní kloub a ani plně nenahrazovala kondyly na ventrální ploše. Tyto problémy řešila modifikace v roce 1974, nazvaná jako Duopatella, která měla femorální komponentu prakticky odpovídající dnešnímu implantátu (Robinson 2005).

V témže roce také Walker a Ranawat uvedli tzv. „Total condylar knee“ mající krátký tibiální dřík a povrchovou náhradu patelly a jednalo se o první celosvětově úspěšný implantát. V roce 1978 John Insall a Al Burstein vyrobili implantát, který zlepšil rozložení sil tibiální komponenty tím, že použili kovovou tibiální komponentu s PE vložkou a současně nahradili zadní zkřížený vaz zvýšenou stísněností komponent. Tím byly položeny základy moderního primárního implantátu TEP kolene (Ranawat 2002).



Obrázek 7: Endoprotéza s názvem Duopatella (Robinson 2005).

Český rozvoj endoprotetiky

Kyčelní kloub. O rozvoj české endoprotetiky kyčelního kloubu se zásadním způsobem zasloužil prof. Oldřich Čech. Působil jako asistent na I. ortopedické klinice pod vedením prof. Zahradníčka, kde již v padesátých letech minulého století byly používány Thompsonovy a Moorovy cervikokapitální náhrady k léčbě zlomeniny krčku femuru, stejně jako Judetovy osakrylové náhrady. Prof. Čech absolvoval v roce 1966 tříměsíční stáž u prof. M. E. Müllera, zúčastnil se kongresu SICOT, kde J. Charnley, G. K. McKee a M. E. Müller prezentovali TEP kyčle jako standardní metodu, a následně absolvoval dvouměsíční stáž v Paříži u prof. Judeta. Po návratu domů začali spolu s prof. Stryhalem intenzivně pracovat na vytvoření podmínek pro endoprotetiku na domácí klinice. Od února 1969 začaly být na I. ortopedické klinice implantovány první endoprotézy sestávající z „banánového“ dřívku a PE jamky fixované cementem Palacos. Vzhledem k nedostatku zahraničních implantátů se tým kolem prof. Čecha začal intenzivně věnovat vývoji vlastní endoprotézy ve spolupráci s ocelárnou Poldi Kladno. První prototypy vycházející z Thompsonova a Moorova dřívku se objevily už v roce 1970 a v roce 1974 byla zahájena sériová výroba dřívku typu Poldi-Čech jak pro TEP, tak i jako cervikokapitální náhrada (Čech 1974). Od roku 1983 pak začala česká výroba keramické

hlavice pro tento dřík. Polyetylen byl tehdy sterilizován parami formaldehydu, což poskytlo větší trvanlivost, než po ozáření. Tato endoprotéza je s některými úpravami dodnes používána na mnoha českých klinikách. Postupně vznikala tým věnující se endoprotetice ve složení Čech, Stryhal, Sosna, Landor a Vavřík. V tradici výroby Poldi pokračuje firma Beznoska, s. r. o., dalším aktuálním českým výrobcem TEP kyčle je společnost Medin a Prospan.

Kolenní kloub. Na rozvoji endoprotetiky kolenního kloubu v ČSSR se podíleli prof. Rybka, prof. Sosna, prof. Vavřík a prof. Landor, přičemž zpočátku byla klinická praxe závislá na dovozu zahraničních implantátů. Často byl implantován typ Townley (Dungl 1982, Rybka 1983). Vzhledem k nedostatku a ceně zahraničních implantátů byl stimulován vývoj domácích implantátů. Jako první se vývoje TEP kolene ujali prof. Vavřík a prof. Rybka na I. ortopedické klinice Univerzity Karlovy ve spolupráci s firmou Motorlet národní podnik a nový implantát zavedený do praxe v roce 1984 byl pojmenován Walter-Motorlet (Denk 1988, Rybka 1988). Konstrukčně tento implantát co nejlépe kopíruje anatomii femorálních kondylů a materiálově je shodný se zahraničními implantáty, tedy kovové části z Co-Cr-Mo slitiny a vložka z vysokomolekulárního polyetyleny. Ve vývoji následoval model Walter-Univerzal a poté ještě Walter-Modular, po změně vlastníka jako Medin-Modular. Tato endoprotéza byla poprvé implantována v Praze v roce 1999 (Vavřík 2009).

Souběžně další česká endoprotéza kolenního kloubu s názvem SVL byla vyvinuta ve spolupráci tří autorů, jejichž iniciály udávají název systému: Sosna-Vavřík-Landor, která vznikla na I. ortopedické klinice v Praze ve spolupráci s firmou Beznoska, dřívější Poldi, v roce 1996. Tato endoprotéza byla poprvé implantována v červnu roku 1997 (Jahoda 2005). Dále byla vyvíjena necementovaná varianta tohoto implantátu. Totální náhrady kolena se v Česku nadále vyrábí, kromě již zmiňované firmy Beznoska má své portfolio i uskupení Medin-Prospan.

Materiálový vývoj polyetylenu

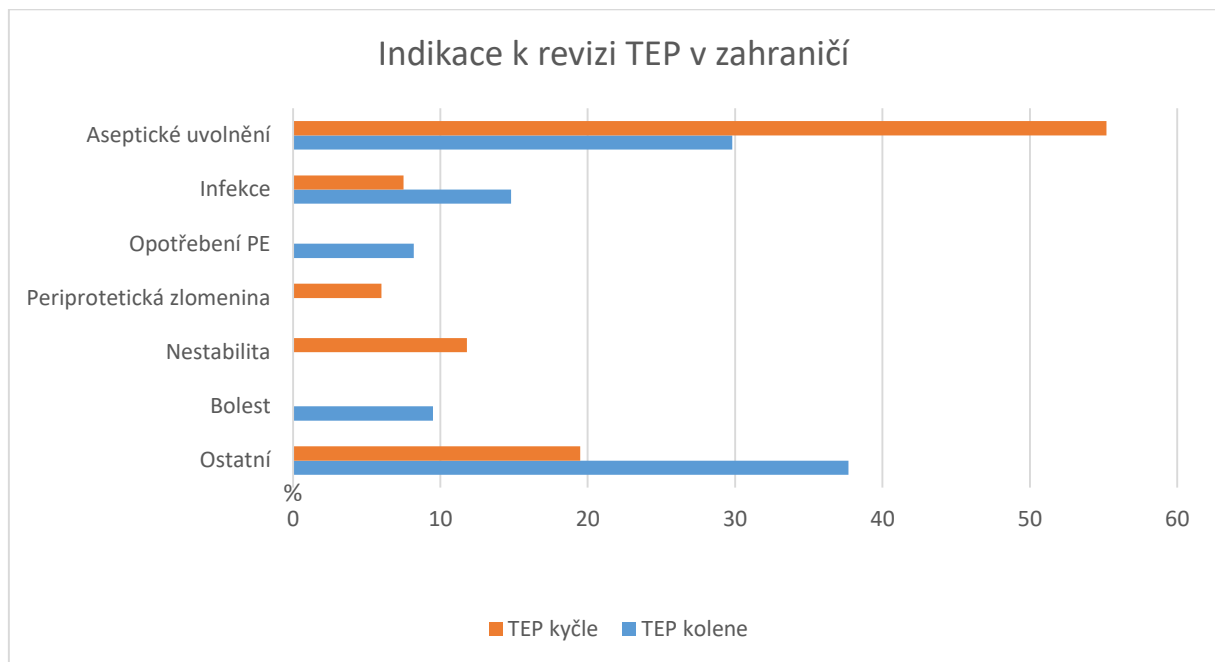
Vysokomolekulární polyetylen (UHMWPE; dále pouze jako PE) do praxe poprvé uvedl Charnley v roce 1962 jako náhradu za selhávající teflon. Jedná se o polymer etylenu mající molekulovou hmotnost alespoň 10^6 g/mol. Charnley následně odoperoval velký počet TEP kyčlí, výsledky si sledoval a popsal první periprotetické osteolýzy, resp. uvědomil si problém infekce (Charnley 1969). K hodnocení otěru navrhl první radiologickou metodu (Charnley 1975).

V návaznosti na Charnleyho práce postupovali Willert se Semlitschem, kteří poprvé koncipovali patogenetický vztah mezi otěrem PE a aseptickým uvolněním (Willert 1977). Během 80. a zejména 90. let se obava z PE tak rozšířila, že mu dokonce Amis v roce 1996 (Amis 1996) předpovídal možný zánik v používání u TEP kyčlí (především pod tlakem studií prezentujících vysoké četnosti aseptických uvolnění a perioprotetických osteolýz). To naštěstí vyprovokovalo rozsáhlý klinický i materiálový výzkum (Pokorný 2012, Fulín 2014, Fulín 2014). Cílem bylo především zlepšit odolnost vůči otěru a zredukovat dopad oxidace na vlastnosti PE. Velcí výrobci implantátů si postupně vypracovali „vlastní kuchařky“ s odlišnými dávkami gama záření (50-105 kGy) a rozdílnými tepelnými procedurami (annealing a remelting – ovlivňují odlišně krystalinitu a materiálové vlastnosti PE). První generace vysoce síťovaných a termálně upravovaných PE (HXLPE) se začaly šířeji dostávat do klinické praxe už po roce 1998. Dlouhodobé výsledky a spektrum komplikací spojených s použitím první generace HXLPE publikovali Kurtz et al (Kurtz 2011).

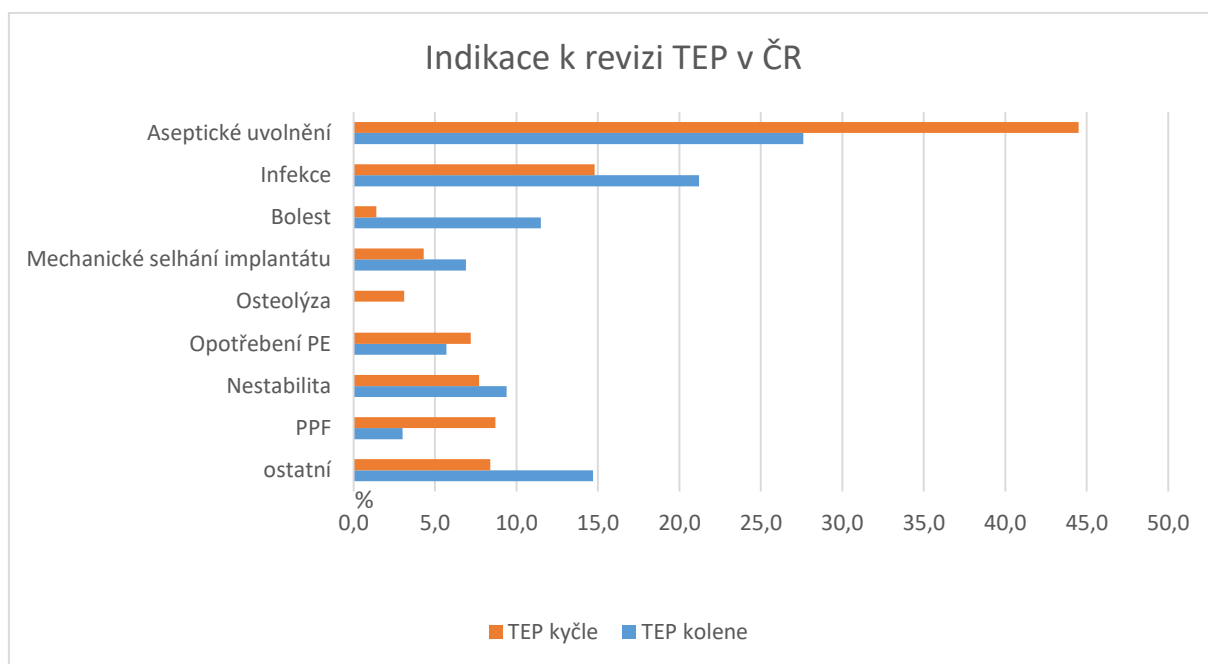
S motivací udržet vysokou odolnost vůči otěru a odstranit „nevýhody“ první generace přišli výrobci s druhou generací HXLPE, kterou opět tvoří heterogenní skupina materiálů. Podstatný rozdíl oproti první generaci tvoří propracovanější technologické postupy, jak ve smyslu ozařování (primárně neslouží k zvýšení odolnosti vůči otěru), tak ve smyslu termálních úprav (Singh 2018, Fulín 2019). Následně se objevily další typy HXLPE s obsahem anti-oxidačních látek, přičemž v praxi se prosadily pouze PE s příměsí vitamínu E. Výzkumně se testovaly rovněž další materiálové a povrchové úpravy PE (kompozity, povrchy s fosfolipidy apod.) (Moro 2019).

Příčiny selhání endoprotézy váhonosných kloubů

Aseptické uvolnění a periprotetická infekce tvoří většinu příčin selhání endoprotézy kyčle a kolena. Infekce kloubních náhrad je jedním z nosných témat ortopedie, není však zájmovou oblastí této práce a v literatuře existuje celá řada prací, které se jí zabývají (Jahoda 2000, Gallo 2006, Jahoda 2006, Gallo 2011, Kapadia 2016, Musil 2017, Parvizi 2018). Mezi další komplikace vyžadující revizi patří nestabilita, periprotetická zlomenina, mechanické selhání komponent či potíže vyplývající z jejich špatné orientace. Podíl daných komplikací ve vztahu k indikaci revize v ČR a v zahraničí je uveden v grafech 3 a 4. Poměrné zastoupení jednotlivých komplikací je odlišné nejen pro skupiny TEP kolene a kyčle, ale také v závislosti na jejich typu fixace, materiálovém složení a zvoleném artikulačním páru (Makela 2014).



Graf 3: Procentuální zastoupení nejčastějších indikací k revizi TEP kyčle a kolene dle dat ze světových ortopedických registrů (Švédský, Norský, Finský, Dánský, Australský a Novozélandský) (Sadoghi 2013).



Graf 4: Poměrné zastoupení nejčastějších indikací k revizi TEP kyčle a kolene dle dat z Národního registru kloubních náhrad České republiky za rok 2019. PPF – periprotetická fraktura.

Periprotetická osteolýza a aseptické uvolnění

Po implantaci endoprotézy probíhají v operaci poraněných tkáních zánětlivé reparativní změny a dochází k postupné novotvorbě kloubního pouzdra s pseudosynoviální membránou a v místě kontaktu implantátu s kostí se tvoří tenká vrstva membrány, tzv. SLIM (synovial-like interface membrane). Během pobytu a zátěže endoprotézy dochází k uvolňování otěrových, a korozivních částic, které pak stimulují reakci okolních tkání, přičemž hlavní roli v indukci osteolýzy hrají otěrové částice polyetyleny. Tyto částice velikosti kolem 1 μm jsou uvolněny do efektivního kloubního prostoru a dostávají se do kontaktu s okolními tkáněmi, jejich akumulace je popisována ve SLIM (Perino 2018). Reakce na deponované částice je zpočátku dominována charakterem vrozené imunitní reakce s následným variabilním rozvojem adaptivní imunitní reakce. Na částice polyetyleny ve tkáních reagují buňky monocyto-makrofágového systému, které je svými receptory rozeznávají jako cizí částice, a vzniká typicky granulomatózní zánětlivá reakce. Menší částice jsou fagocytovány makrofágy, kolem větších částic se tvoří obrovskobuněčný infiltrát. Makrofágy dále secernují chemokiny (např. MCP-1) atrahující další imunitní buňky, a prozánětlivé cytokiny jako IL-1, IL-6 a TNF- α , které aktivují fibroblasty, lymfocyty a osteoklasty. Rovněž makrofágy, které fagocitovaly PE částice, jsou

schopny přeměny v osteoklasty (Xing 2002). Cytokinová kaskáda tedy způsobuje inhibici a apoptózu osteoblastů a dochází k převaze aktivity osteoklastů. Osteoklastická aktivita je rovněž stimulována přímo cestou RANK ligandu (Athanasou, 2016). Důsledkem převahy osteoklastické aktivity nad kostní novotvorbou dochází k rozvoji periprotetické osteolýzy (PPOŁ). Ta má za následek úbytek kostní tkáně kolem implantátu a odpovídající symptomy, avšak může být dlouho i asymptomatická. Pokud dojde k významnému porušení kostní fixace implantátu, projeví se jako aseptické uvolnění. Na symptomatologii způsobené otěrovými částicemi se nepodílí jen osteolýza, ale i procesy v měkkých tkáních. Při analýze periprotetických tkání byla nalezena vyšší koncentrace PE částic v oblastech s nekrózou (Krenn 2014). Skutečná patofyziologie periprotetické osteolýzy je však mnohem komplexnější a nepochybně v ní hrají určitou roli i kovy uvolňující se z implantátu, což je diskutováno v samostatné stati této práce.

KOVY

Běžně používané kovy v endoprotetice

Nejčastěji se setkáme se třemi skupinami materiálů: chirurgická ocel (obvykle 316L, vyrobeno dle standardu ASTM F138/F139), chromkobaltová slitina (CoCr) vč. modifikací, nebo čistý titan (CP Ti, commercially pure titanium) či jeho slitiny s hliníkem, vanadem, niobem a ostatními kovy. Nověji se prosazují zejména v revizní endoprotetice jako výplňové i fixační implantáty z tantalu. Cementované implantáty jsou obvykle CoCr, případně z oceli, necementované bývají spíše z titanu či titanové slitiny. CoCr slitina poskytuje dobrou abrazivní odolnost, proto z ní bývá vyrobena i artikulační hlavička pro TEP kyčle nebo femorální komponenta TEP kolene (Sonntag 2012). Naopak titan a jeho slitiny vykazují špatnou tribologickou odolnost (Witt 1991), avšak poskytují dobré podmínky pro osteointegraci a mají elasticitu podobnou spongiosní kosti (Zhang 2013).

Slitina*	Ni	N	Co	Cr	Ti	Mo	Al	Fe	Mn	Cu	W	C	Si	V
Nerez ocel														
(ASTM F138)	10,0 - 15,5	<0,5	†	17,0 - 19,0	†	2,0- 4,0	†	61,0- 68,0	†	<0,5	<2,0	<0,06	<1,0	†
CoCrMo slitiny														
(ASTM F75)	<2,0	†	61,0 - 66,0	27,0 - 30,0	†	4,5- 7,0	†	<1,5	<1,0	†	†	<0,35	<1,0	†
(ASTM F90)	9,0- 11,0	†	46,0 - 51,0	19,0 - 20,0	†	†	†	<3,0	<2,5	†	14,0 - 16,0	<0,15	<1,0	†
Ti slitiny														
CP Ti (ASTM F67)	†	†	†	†	99,0	†	†	0,2- 0,5	†	†	†	<0,1	†	†
Ti-6Al-4V (ASTM F136)	†	†	†	†	89,0 - 91,0	†	5,5- 6,5	†	†	†	†	<0,08	†	3,5- 4,5

Tabulka 1: Nejčastěji používané slitiny v ortopedii a váhové zastoupení jejich složek dle standardů American Society for Testing and Materials (ASTM vol. 13.01.) (Keegan 2007). * Ni – nikl, N – dusík, Co – kobalt, Cr – chrom, Ti – titan, Mo – molybden, Al – aluminium, Fe – železo, Mn – mangan, Cu – měď, W – wolfram, C – uhlík, Si – křemík, V – vanad; † představuje < 0,05%.

Mechanismy degradace kovových povrchů *in vivo*

Dosud bylo popsáno několik mechanismů uvolňování kovů z endoprotézy, dominující jsou koroze a otěr (Gibon 2017). *In vivo* je implantát obklopen tkáněmi, které spolu s tkáňovým mokem mohou působit jako elektrolyt, a dále na něj působí buňky imunitního systému, které ještě mohou alterovat pH a tvořit volné radikály. Tím jsou podporovány korozivní procesy, kterými jsou do okolí uvolňovány kovové ionty (Hallab 2009). Kromě ušlechtilých kovů je každá slitina na povrchu pokryta vrstvičkou svých oxidů (tzv. pasivace), která ji chrání před další korozi. Pasivační vrstva může být mechanicky poškozena, což vede k obnažení povrchu a progresi koroze. Právě rychlost repasivace určuje odolnost daného materiálu vůči korozi – titanové slitiny mají mnohem rychlejší repasivaci, než nerezavějící ocel, a jsou tedy mnohem odolnější vůči korozi (Karov 2002). Dle elektrochemických testů je nejodolnější vůči korozi titan, niob a tantal, následují Ti-Al-V slitiny, Co-Cr slitiny, nerezavějící ocel a zlato. Toto pořadí je v korelaci s jejich *in vivo* biokompatibilitou (Zitter 1987). Ve vztahu k implantovaným kovům rozlišujeme několik různých typů koroze. Obecná koroze popisuje samovolné uvolňování iontů daného kovu do svého okolí vlivem oxidace jeho povrchu, bodová koroze (pitting corrosion) je tvorba důlků a prasklinek, ve kterých je akcentovaná koroze. Štěrbínová koroze (crevice corrosion) představuje korozi v oblasti malých dutin, kde dochází ke stagnaci tekutiny a alteraci jejího chemického složení, obvykle pokles pH a snížení zastoupení kyslíku. Otěrová koroze (fretting corrosion) probíhá v místě pohybu styčných ploch, kde dochází opakovaně k rozrušování pasivační vrstvy mechanickou abrazí, a tedy k akcelerované korozi. Galvanická koroze je popisována v místě styku dvou různých kovů, z nichž méně ušlechtilý kov působí jako anoda a ušlechtilejší kov působí jako katoda. Anoda koroduje rychleji, zatímco katoda (ušlechtilejší kov) koroduje pomaleji než obvykle. Míra galvanické koroze je závislá na vzniklém rozdílu napětí. Dále dochází k tvorbě mikročástic cestou tribologického otěru v oblasti artikulačních povrchů. Tento jev je znám zejména u endoprotéz typu kov-kov, avšak je prokázán i u kombinace kov-polyetylen (De Villiers 2015). Tyto částice dosahují většinou velikosti do 0,05 μm , detaily jsou popsány jinde (Amanatullah 2016). Zvláštním případem je trunionóza, což je kombinace mechanického otěru a několika mechanismů koroze v oblasti modulárních spojů, nejčastěji rozhraní dřík-hlavička u TEP kyčle (Mistry 2016). Jednak zde dochází k mikropohybům v oblasti spoje, což abraduje povrch a rozrušuje pasivační vrstvu, dále je zde hypoxické prostředí, alterované pH a lokální elektrochemické rozdíly podporují galvanickou korozi (Fehring 2015, Gibon 2017).

Endoprotézy typu kov-kov

Metal-on-metal endoprotézu kyčle s kovovými artikulačními povrchy poprvé použil v roce 1953 anglický chirurg George McKee. Byla vyrobena z chrom-kobaltové slitiny a v literatuře je známá jako McKee-Farrar total hip replacement. Tento typ endoprotézy často selhával, i když některé sloužily i přes 20 let (Brown 2002). Pod vlivem Charnleyho MoP endoprotézy bylo v sedmdesátých létech ustoupeno od použití MoM pro vyšší incidenci selhání. K jejich návratu přispěl v roce 1988 Bernard G. Weber (Švýcarsko) s použitím ořevzdorného Metasulu, což je slitina Co-Cr-Mo s vysokým obsahem uhlíku. Druhá generace MoM endoprotézy pak byla zpropagována Heinzem Wagnerem (Německo) a Derekem McMinnem (Anglie) v roce 1991.

V roce 2006 bylo v USA 35 % ze všech primárních TEP kyčle použito právě MoM a dle odhadu bylo celosvětově implantováno přes 1 milion těchto endoprotéz (Bozic 2009). V České republice byl naštěstí tento trend zastížen jen okrajově.

Ukazuje se totiž, že ačkoli tento typ artikulačních povrchů vykazuje výrazně nižší lineární otěr, než konvenční MoP protéza (Cuckler 2005), je zatížen specifickými problémy, a nakonec i vyšší incidencí komplikací – dle Voletioho metaanalýzy s průměrnou dobou sledování 5,7 let měli pacienti 3,37x vyšší incidenci komplikací než u MoP (Voleti 2012). Jiná publikace rovněž prokázala v souboru 288 tis. pacientů vyšší četnost revize u MoM implantátů (5,28 %) v porovnání s MoP (4,28 %) a CoP (3,52 %) (Kleeman 2018). Problém spočívá v tom, že i při menším lineárním otěru dochází k tvorbě většího množství částic o menších rozměrech, tedy výsledná kontaktní plocha uvolněných kovů je mnohem větší a dochází k uvolnění solubilních iontů, které mohou difundovat do okolí implantátu i systémově (Hasegawa 2012).

Míra deliberace kovů z MoM endoprotézy je ovlivněna mnoha faktory. Mimo jiné zřejmě souvisí i s pohlavím. Protože se ukazuje, že ženy mají většinou vyšší sérové koncentrace, než muži (Moroni 2011). Dalším faktorem je inklinace implantované jamky – pacienti s abdukčním úhlem nad 55° mají významně vyšší sérové hladiny chromu a kobaltu (De Haan 2008) z toho tedy vyplývá, že jamku je lépe orientovat mírně horizontálně, protože vertikální jamka se hůř maže a dochází zde ke kontaktu v menší ploše, tzv. „edge-loading“, což přináší větší otěr (Angadji 2009, Meng 2013, Tauriainen 2017).

Biologické působení kovů na buněčné úrovni

Kovové částice a ionty mohou působit cytotoxicky, indukovat oxidativní stres, poškozovat DNA a vyvolávat imunologickou odpověď (Hallab 2009). Uvolněné ionty jsou vázány na proteiny, s nimiž tvoří antigenní komplex, který vyvolává imunitní odpověď na lokální nebo i systémové úrovni (Hallab 2016). Tato imunitní reakce je jak specifická, zaměřená přímo na antigen organometalického komplexu daného kovu, tak i nespecifická, reagující na kovové částice jako na cizí těleso. Oba typy reakce na kovy se do jisté míry podílí na indukcii periprotetické osteolýzy (Magone 2015). V *in vitro* studiích je prokázána zvýšená sekrece IL-6 a IL-8 osteoblastů po expozici kovovými částicemi (Lochner 2011). Ostatní jevy jako cytotoxicita, systémová toxicita či genotoxicita jsou přímým důsledkem fyzikálně-chemického působení uvolněných kovů, detaily těchto reakcí jsou popsány jinde (Gibon 2017). Jedním z přímých následků lokální cytotoxicity kolem implantátu s pravděpodobným podílem hypersensitivity je nekróza (Mahendra 2009). Přehled biologických účinků kovů na buněčné úrovni a jejich relevantních klinických projevů je popsán v recentní review (Hobza 2020) a shrnut ve schématu 1.

V souvislosti s reakcí na kovy se objevilo několik termínů: ARMD (Adverse Reaction to Metal Debris), která všeobecně popisuje celé spektrum výše popsanych dějů a jeho podskupinou jsou ALTR (Adverse Local Tissue Reaction), popisující pouze lokální reakci na kovy přítomné ve tkáních. V této skupině je tradičně veden pseudotumor, osteolýza s aseptickým uvolněním a ALVAL (Aseptic Lymphocyte-dominated Vasculitis-Associated Lesion).

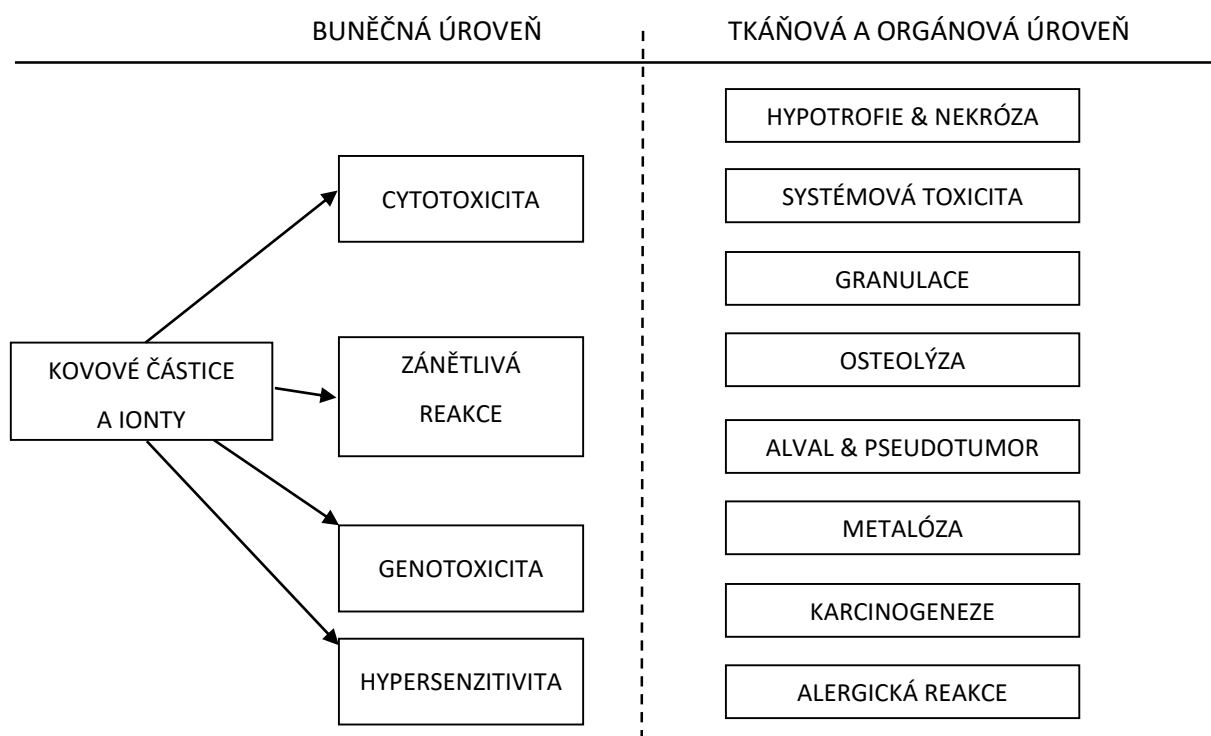


Schéma 1: Biologické efekty kovů na buněčné úrovni a indukované klinické projevy (Hobza 2020).

Alergie na kovy

Okolnosti a význam alergické reakce na endoprotézu jsou poměrně recentním tématem a jedná se o stále neuzavřenou oblast. Jako první však již v roce 1974 upozornil na možnost alergické reakce na kovy implantátu E. Evans, který si všiml případů selhání endoprotézy bez jiné vysvětlitelné příčiny (Evans 1974).

Alergie má řadu svých zastánců, avšak aktuálně je spíše zpochybňována pro nedostatek důkazů a jasného patofyziologického mechanismu (Middleton 2016).

Patofyziologie. Existuje totiž rozdíl v patofyziologii kožní alergické reakce, jak ji známe, která je zprostředkována Langerhansovými buňkami jakožto kožními antigen-prezentujícími buňkami (APC, Antigen-presenting cell), a tkáňové reakci na antigenní komplex kov-protein, kterou zprostředkovávají lokální APC (makrofágy, dendritické a epiteloidní buňky) (Thomas 2015). Jednotlivé APC následně prezentují antigen CD4+ T-lymfocytům, které spouštějí další průběh reakce (Akil 2018). V tomto případě se jedná o tzv. hypersensitivitu IV. typu.

Incidence. Ačkoli je v běžné populaci poměrně vysoká prevalence kontaktní alergie na kovy a dle epikutánních a sérologických testů se vyskytuje reakce na Ni v 13 %, Co ve 2 % a Cr

v 1 % populace (Schafer 2001), prokázané selhání endoprotézy z důvodu alergické reakce je poměrně vzácná komplikace a příčinnou souvislost je těžké dokázat (Thomas 2017). Kromě niklu, kobaltu a chromu je v poslední době diskutován ještě význam zlata, palladia a aluminia (Thyssen 2010). Po implantaci endoprotézy či osteosyntetického materiálu může dojít k senzitivizaci, což dokládá i fakt, že v běžné populaci se vyskytuje alergie na kovy v cca 10-15 %, u pacientů s kovovým implantátem až 25 % a u pacientů se selhávající protézou až 60 % (Hallab 2001). Symptomatická hypersenzitivita na kovy predisponuje svého nositele až k čtyřnásobně vyššímu riziku aseptického selhání endoprotézy po její implantaci (Granchi 2008). Naopak u některých pacientů byla pozorována desenzitizace a následná negativita epikutánních testů s odstupem po implantaci endoprotézy, zde je však diskutabilní spolehlivost daného testování (Rooker 1980). Je pozorována vyšší prevalence hypersenzitivity na kovy při selhávající endoprotéze, avšak není zcela jasná příčinná souvislost, zda se hypersenzitivita podílí na selhání nebo zda vzniká jako následek zvýšené expozice organismu uvolněnými kovovými částicemi a ionty ze selhávající endoprotézy. Nicméně je popsáno kratší přežití endoprotézy u pacientů s pozitivními epikutánními testy na kovy (Granchi 2006). Uvedená diskrepance logicky snižuje relevanci alergických kožních testů v endoprotetice, a to z důvodu rozdílného mechanismu spuštění reakce (Thomas 2015).

Symptomatologie. Klinicky se alergie může projevit jako lokalizovaná, vzácněji celotělová vyrážka, porucha hojení rány, setrvalé bolesti, otok, synovialitida s recidivujícími výpotky, ztuhlost operovaného kloubu, jeho nestabilita nebo uvolnění TEP. Tyto symptomy se většinou vyvinou během prvního roku po implantaci. Radiologický nálezn je nespecifický a může se projevovat jako radiolucenční linie či progresivní osteolýza (Lohmann 2017). Lokalizovaná vyrážka je častěji popisována u TEP kolene, zatímco u TEP kyčle nebývá obvyklá (Akil 2018), což může být vysvětleno hlubším tkáňovým uložením.

Diagnostika. Protože stále nemáme k dispozici diagnostický test, který by uměl jednoznačně určit, zda se jedná o alergickou reakci, zůstává tato diagnóza postavena jako *per exclusionem*, tzn. po vyloučení infekce, aseptického uvolnění a dalších komplikací TEP (Lachiewicz 2016). Často je k diagnostice doporučován epikutánní test, ačkoli přesně nereflektuje hlubokou tkáňovou situaci kolem implantátu. Tento test vychází z kožní reakce na testovaný kov, prokazuje senzitivitu 77 % a specificitu 71 % (Dickel 2011). Bývá součástí klinických doporučení, viz schéma 2 (Christensen 2017), ale pro zmíněnou diskrepanci a nízkou senzitivitu i specificitu by neměl být používán pro rutinní předoperační screening (Lohmann 2017). Existují ještě další imunologické testy jako je lymfocytární transformační test (LTT),

modifikovaný lymfocytární stimulační test (mLST) nebo test na leukocytární inhibiční faktor (LIF) (Granchi 2012). LTT testuje *in vitro* reakci pacientovy krve na daný alergen dle míry proliferace lymfocytů a ačkoli nabízí vyšší sensitivitu než epikutánní testy, nevykazuje dostatečnou specifitu a žádný z těchto testů není spolehlivý v predikci vzniku alergické reakce po implantaci TEP. Jediným jasným důkazem zůstává úleva pacientových potíží po reimplantaci hypoalergenního implantátu, tedy *ex post*.

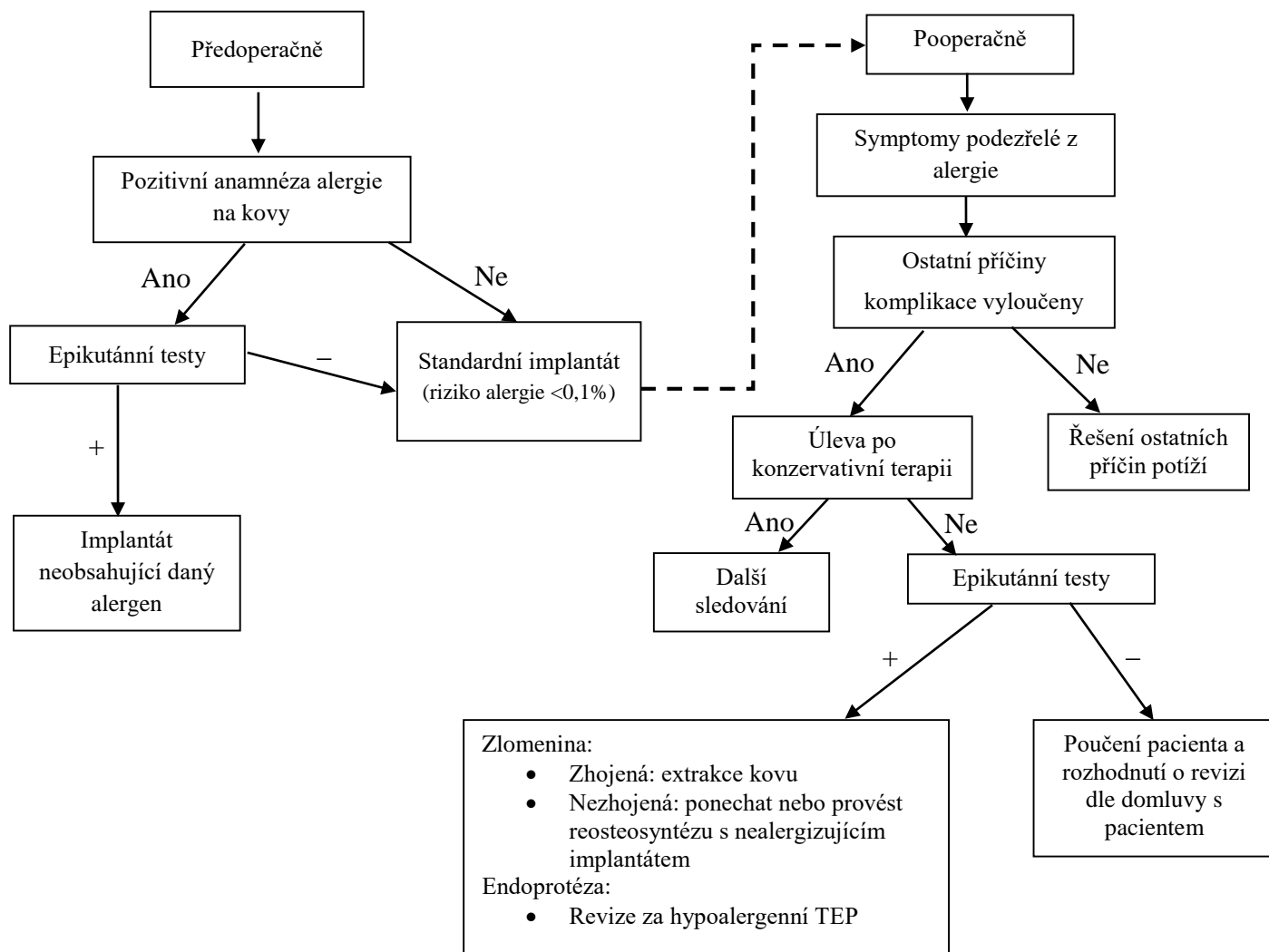


Schéma 2: Algoritmus řešení alergie na kovy v ortopedii dle Christensena (Christensen 2017).

Terapie. Zřejmá alergická reakce po implantaci TEP je po pečlivém zvážení a vyloučení ostatních příčin selhání indikována k reimplantaci hypoalergenního implantátu. Revize by však měla být pokládána za poslední možnost a pacient by měl být informován, že stále nemáme k dispozici klinické doporučení řešení této komplikace, které by vycházelo z evidence-based medicine. U TEP kyčle volíme jamku a dřík z titanové slitiny, hlavičku keramickou nebo oxiniovou, u TEP kolene rovněž Ti slitinu či oxiniovou povrchovou úpravu (Lachiewicz 2016, Akil 2018). K dispozici jsou i náhrady kolene keramickým implantátem. V případě diagnostické nejistoty, nebo pokud nemůžeme provést reimplantaci, můžeme kožní vyrážku léčit topickými kortikosteroidy, které jsou v některých případech efektivní (Gao 2011). Jeden z doporučených postupů je ilustrován ve schématu 2. Při konzervativně neléčitelné alergické reakci na osteosyntetický materiál bychom měli v případě zhojené zlomeniny materiál extrahovat, v případě nezhojené zlomeniny provést reosteosyntézu s použitím titanové slitiny (Christensen 2017). Mahmood doporučil postup, kdy při hypersenzitivitě na nikl volíme CoCr slitinu nebo titanovou slitinu, při hypersenzitivitě na kobalt volíme nerezovou ocel či titanovou slitinu, při hypersenzitivitě na chrom je nejlepší volbou titanová slitina a při alergii na titan pak nerezovou ocel či CoCr slitinu, viz tabulka 2 (Mahmood 2015).

Alergie	Nikl	Kobalt	Chrom	Titan
Doporučený materiál	Ti slitiny	Ti slitiny	Ti slitiny	Co-Cr slitiny
	Co-Cr slitiny	Nerez ocel		Nerez ocel

Tabulka 2: Doporučené použití materiálů dle jednotlivých příčin alergie dle Mahmooda (Mahmood 2015).

Podíl na osteolýze

Periprotetická osteolýza je chápána jako důsledek zánětlivé reakce na částice kostního cementu, otěrových částic povrchu implantátu a v neposlední řadě také na částice a ionty kovů endoprotézy, které nejsou efektivně odstraněny imunitním systémem (Gustafson 2014). Protože za tuto reakci jsou nejvíce zodpovědné otěrové částice (Gallo 2013), byla vyvinuta celá řada opatření zlepšujících tribologické vlastnosti endoprotézy. Jen připomínám, že znovuzavedení MoM endoprotéz kyčle (viz výše) bylo motivováno právě nízkým otěrem a předpokládalo se, že MoM bude „lékem“ na aseptické uvolnění a osteolýzu. Pro nás byla tato zkušenost stejně

jako některé další preventivní intervence velkým zdrojem poučení, ovšem pro pacienty představovaly vždy komplikaci a nadbytečné utrpení. Podobně se i na selhání TEP s keramickým párem mohou podílet kovy, zde jsou zdrojem kovů neartikulační části protézy (Magone 2015).

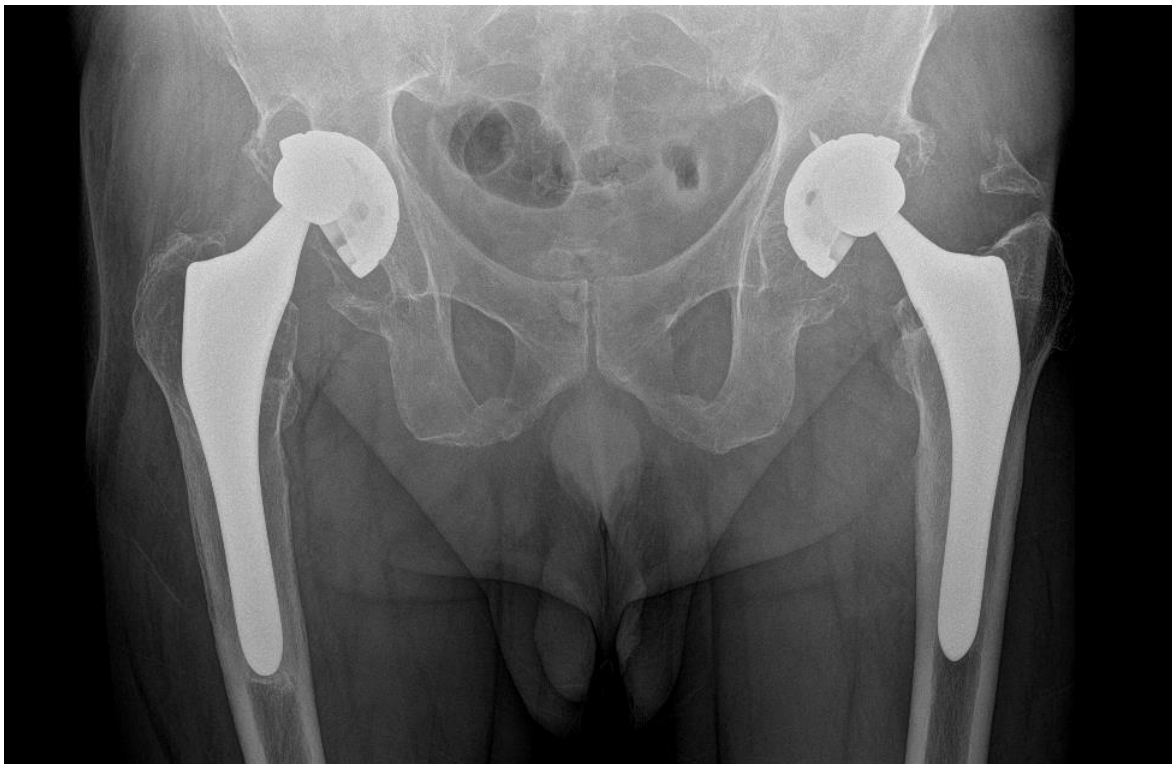
Na rozdíl od makrofágy dominované reakce na PE částice, v reakci na kovy kromě makrofágové reakce převažuje *lymfocytární infiltrát*, přičemž klíčovou roli hrají T-lymfocyty (Natu 2012). Reakce zprostředkovaná T-lymfocyty je projev specifické imunity a v tomto případě označována jako imunopatologická reakce IV. typu. Kovy obvykle používaných slitin, tedy Ti, Co, Cr, Mo, Mn, Ni, Cu a Fe stimulují aktivitu RANK-ligandu buď přímo nebo vyvoláním sekrece prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α , IL-6 a PGE2. Takto jsou aktivovány osteoklasty a je iniciována osteolýza. U iontů Co, Cr a Mo je popsána i aktivace inflamatomů (Magone 2015). Kovy také zhoršují kostní metabolismus – nejvíce toxicky na osteoblasty působí V, Mn, Fe a Ni, naopak nejméně toxické jsou pro ně Co a Cr (Hallab 2002). Cytotoxický potenciál jednotlivých kovů je uveden v tabulce 3. V rámci snahy o konzervativní terapii osteolýzy byla testována protizánětlivá léčba jako např. Ethanercept (anti- TNF- α) (Vasudevan 2012) či RANKL inhibitor (Skoldenberg 2016), avšak zatím jedinou efektivní metodou zůstává revize a reimplantace uvolněné endoprotézy.

Koncentrace chloridu daného kovu potřebná k vyvolání toxicity (mM)							
Test	Al	Cr	Co	Fe	Mo	Ni	V
Osteoblast							
Viabilita	5	>10	1	0,3	7	0,5	0,05
Proliferace	10	10	1	5	10	1,0	0,1
Morfologie	10	10	0,5	10	10	0,5	0,1
Průměr \pm SD	8,3 \pm 2,9	10 \pm 0	0,8 \pm 0,3	5,1 \pm 4,9	9,0 \pm 1,7	0,7 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1
Fibroblast							
Viabilita	2	10	2	1	10	2	1
Proliferace	50	10	0,01	10	10	2	0,05
Morfologie	5	5	0,5	5	1	0,5	0,05
Průměr \pm SD	19 \pm 26	8,3 \pm 2,9	0,8 \pm 1,0	5,3 \pm 4,5	7 \pm 5,2	1,5 \pm 0,9	0,3 \pm 0,5

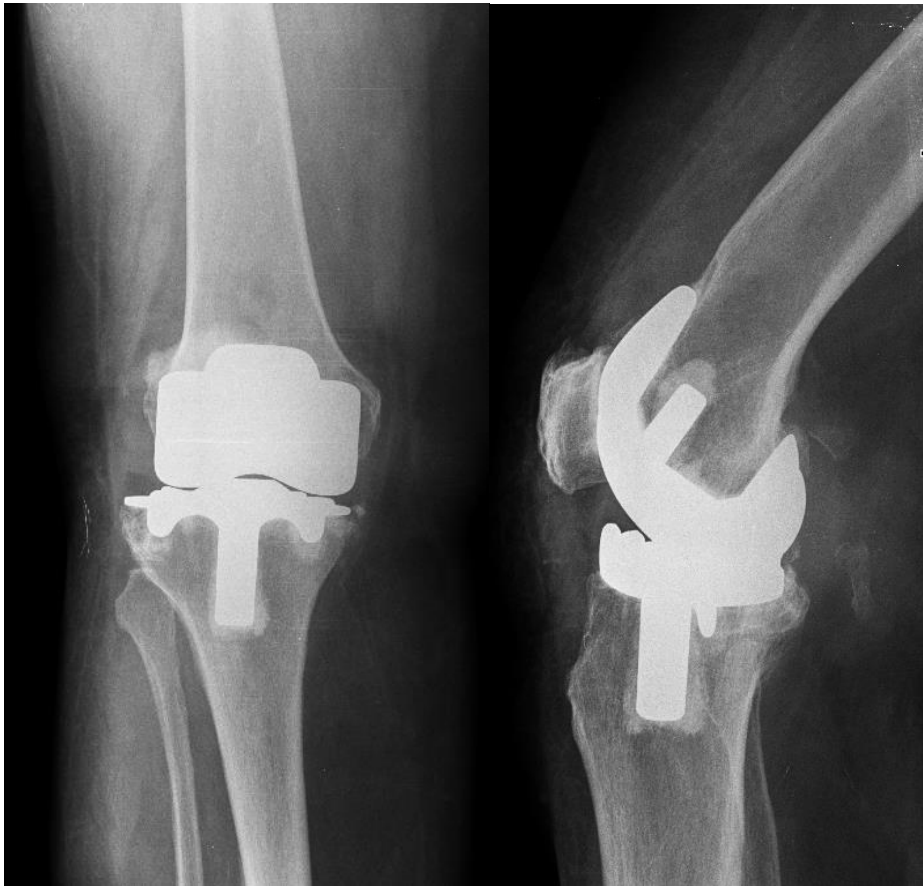
Tabulka 3: Stanovení koncentrace chloridu daného kovu potřebné k vyvolání toxicity s kritériem 50% poklesu viability nebo proliferace daných buněk dle Hallaba, zkráceno (Hallab 2005).

Metalóza

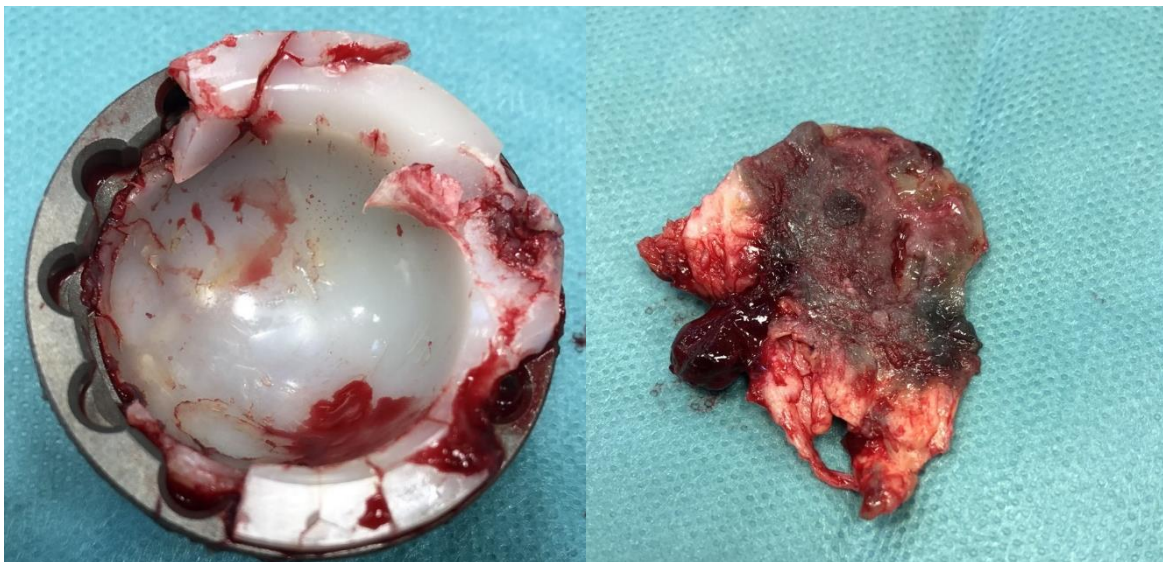
Metalóza popisuje tkáň masivně infiltrovanou kovovými částicemi, které spolu s nekrózami zapříčiňují její tmavé zbarvení. Zdrojem metalózy může být koroze, otěr a trunionóza, nejvýrazněji a nejčastěji však při masivním otěru polyetylenové vložky TEP, kdy dojde ke kontaktu kovové hlavičky a jamky u kyčle, resp. obou komponent u kolene, jak je uvedeno v obrázku 8, 9 a 10. Částice indukují reakci IV. typu a makrofágy se přeměňují v mnohojaderné Langhansovy buňky a tvoří granulace. Metalóza se může projevit jako bolestivá oblast, někdy dokonce i s tmavou pigmentací kůže kolem postiženého kloubu (Pritchett 2012), v pokročilých případech i s tvorbou pseudotumoru. V takových případech bychom měli monitorovat sérové hladiny relevantních kovů z důvodu jejich rizika intoxikace a případně protézu včas revidovat (Gogna 2016).



Obrázek 8: Pokročilý otěr PE vložky TEP obou kyčlí, vpravo již dochází ke kontaktu kov-kov s produkcí otěrových kovových částic. RTG snímek z archivu Ortopedické kliniky FNOL.



Obrázek 9: Opotřebená a prasklá PE vložka TEP kolene umožňuje vzájemný otěr kovových komponent s následnou tvorbou metalózy. RTG snímky z archivu Ortopedické kliniky FNOL.



Obrázek 10: Peroperační vzorky z revize TEP kyčle pro aseptické uvolnění jamky. Masivní otěr polyetylenové vložky, kdy došlo ke kontaktu hlavičky s kovovou jamkou. Granulace odebrané z okolí jamky s masivní metalózou.

ALVAL a pseudotumory

Tyto jednotky jsou klasicky popisovány u MoM endoprotéz, avšak mohou se vyskytnout i u ostatních artikulačních párů. Typicky jsou spojeny s bolestivými projevy kolem TEP (Pivec 2014).

ALVAL popisuje periprotetickou zánětlivou reakci podobnou hypersenzitivní reakci IV. typu probíhající kolem MoM implantátu (Kolatat 2015). Histologicky je charakterizována difuzní perivaskulární lymfocytární infiltrací, doprovázenou plasmatickými buňkami, eosinofilními granulomy, venulami s vysokým endotelem, krvácením, fibrinovou exsudací, nekrózou a makrofágy s kapkovitými inkluzemi (Willert 2005).

Pseudotumor je rozsáhlá cystická formace, mající podobný imunologický podklad jako ALVAL, avšak s výraznější lymfocytární infiltrací a nekrózou. Kromě bolesti se může projevit palpovatelnou rezistencí, parézou nervu či spontánní luxací (Gibon 2017).

Incidence. Incidence pseudotumorů u MoM implantátů je udávána 0,3 %, ALVAL 0,6 % a ALVAL a/nebo pseudotumorů 0,6 % (Wiley 2013).

Diagnostika. Při stanovení ALTR bychom vždy měli projít standardním diagnostickým protokolem v endoprotetice, tedy vyloučit především infekci kloubní náhrady. Kromě klinického vyšetření a zobrazovacích metod jsou zásadní krevní testy (krevní obraz, CRP, IL-6) a kloubní punkce s analýzou aspirátu. Na rozdíl od MoP implantátů jsou hladiny CRP a sedimentace erytrocytů méně specifické, protože mohou být elevované jak u infekce, tak i u ALTR. Rovněž automatická cytologie z punktátu může mít zkreslené hodnoty leukocytů a podíl polymorfonukleárů vlivem započítání kovového detritu, proto je vhodnější manuální odpočet (Fehring 2015). Ze zobrazovacích metod pro ALTR je za zlatý standard považována magnetická resonance s tzv. MARS sekvencí (Metal Artifact Reduction Sequence), která zvládne zobrazit i periprotetické tkáně jinak znehodnocené artefakty implantátu (Fritz 2016, Lindgren 2016). Toto vyšetření je však vzhledem ke své nákladnosti a horší dostupnosti nepoužitelné pro rutinní screening, proto bylo navrženo ultrazvukové vyšetření, jako levnější screeningová metoda se 100% sensitivitou záchytu pseudotumorů (Garbuz 2014).

Terapie. Symptomatický pseudotumor či ALVAL jsou indikací k revizi, v případě MoM s výměnou za jiný artikulační pár (Harrington 2016).

Systémová toxicita

U pacientů se selhávající, ale i dobře fungující endoprotézou můžeme najít zvýšené sérové hladiny kovů. Tyto se pak akumulují zejména v myokardu, ledvinách, játrech, slezině a v lymfatických uzlinách (Hallab 2002). Vysoké sérové hladiny kovů najdeme typicky u selhávající MoM endoprotézy, avšak paradoxně ještě vyšší hladiny byly popsány po revizi selhané keramické endoprotézy s použitím kovové hlavičky (Bradberry 2014), kde je její otěr akcelerován zbylými keramickými částicemi (Peters 2017).

Za systémovou toxicitu je nejvíce zodpovědný kobalt, konkrétně jeho dvojmocný iont (Co^{2+}) (Leysens 2017). Naopak titanové slitiny jsou velmi málo toxické a indukují pouze mírnou zánětlivou reakci (Gibon 2017). Mechanismus toxicity kobaltu vysvětlujeme cestou tvorby volných radikálů, peroxidací lipidů, poruchou mitochondriální funkce, poruchou homeostázy vápníku a železa, interakcí s erythropoézou, poruchou transportu jódu do štítné žlázy a genotoxicitou (Paustenbach 2013). Klinicky se tedy intoxikace projevuje kardiomyopatií, hypotyreózní strumou, neurotoxicitou s poruchou sluchu, zraku a poruchami centrální a periferní nervové soustavy (Catalani 2012). Jsou popsány případy kobaltem indukované polycytémie a vzácně hepatotoxicita (Cheung 2016). Sérové koncentrace kobaltu jsou v běžné populaci do 0,6 $\mu\text{g/l}$, u většiny pacientů s dobře fungující MoM endoprotézou v rozsahu 0,2-10 $\mu\text{g/l}$. Prahem pro lokální komplikace (viz ARMD) je dle různých zdrojů 4-7 $\mu\text{g/l}$ a rizikové hladiny pro intoxikaci začínají nad 20 $\mu\text{g/l}$, avšak tato hodnota není užitečná pro klinickou praxi a klinické relevance toxicity dosahují až mnohem vyšší hladiny (Leysens 2017). Proto je doporučeno klinicky sledovat pacienty s hladinami nad 100 $\mu\text{g/l}$ (Paustenbach 2013) a při projevech intoxikace včas protézu revidovat. Je nutno podotknout, že systémová intoxikace kovy z totální endoprotézy je vzácným jevem. Do roku 2014 bylo v systematickém přehledu studií popsáno pouze 8 případů (Bradberry 2014).

Toxický může být ve vysokých koncentracích také chrom. Ten se v těle může vyskytovat pouze jako trojmocný, protože šestimocná verze je velmi reaktivní, a proto je okamžitě převáděná na bezpečnější Cr^{3+} . Ovšem i tato forma, pokud se vyskytuje ve vyšších koncentracích, může vést k systémovým škodám (Grammatopoulos 2017, Pechancová 2018).

Riziko karcinogeneze

Částice a ionty Cr, Co, Ti, Al a V indukují *in vitro* tvorbu volných radikálů, které poškozují vlákna DNA a způsobují mutace, aneuploidii a chromozomální aberace v závislosti na jejich koncentraci (Daley 2004). Povaha iontů chromu závisí na jejich valenci: korozivními procesy se z implantátu uvolňuje šestimocný chrom, který je klasifikován jako karcinogen skupiny 1 dle IARC (International Agency for Research on Cancer) a způsobuje karcinom plic, avšak je rychle v erythrocytech redukován na třímocný chrom, který je méně škodlivý (Scharf 2014), (Gibon 2017). Systematické přehledy klinických studií (Visuri 2010), ani data z ortopedických registrů (Onega 2006, Christian 2014) neprokazují celkově zvýšené riziko karcinogeneze u konvenčních endoprotéz z CoCr či Ti slitin. U MoM endoprotéz nejsou data jednohlasná, a ačkoli Britský a Finský registr kloubních náhrad neprokazují jejich celkově zvýšené riziko karcinogeneze (Ekman 2018, Hunt 2018), některé studie u nich větší riziko nacházejí v porovnání s konvenčními endoprotézami (Levasic 2018). Při identifikaci jednotlivých diagnóz bylo nalezeno vyšší riziko karcinomu prostaty a maligního melanomu u non-MoM endoprotéz (Standardized incidence ratio (SIR) 1,12 resp. 1,43 s 95%CI; 1,08-1,16 resp. 1,13-1,79), (Onega 2006) a karcinom prostaty byl ve vyšší míře nalezen u pacientů s MoM endoprotézou (SIR=1,35), necementovanou protézou (SIR=1,40) a Ti slitinou (SIR=1,41), (Levasic 2018). Z uvedeného tedy vyplývá, že endoprotézy nejsou spjaty se zvýšeným celkovým rizikem karcinogeneze, ale existuje mírně vyšší riziko karcinomu prostaty, který je nejčastěji zmiňován u MoM endoprotéz, kterým je vhodné se vyhnout nejen z tohoto důvodu.

II. VLASTNÍ PRÁCE

A. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST: VÝVOJ METODIKY K PŘESNÉMU STANOVENÍ OPOTŘEBENÍ PE VLOŽKY U TEP KYČLE A JEJÍ POUŽITÍ U EXTRAHOVANÝCH PE VLOŽEK

Cíle

Cílem experimentální části bylo vyvinutí nové metodiky laboratorního měření otěru PE vložky TEP kyčle, její validace a následné zhodnocení volumetrického otěru souboru extrahovaných TEP.

Výsledky této části práce byly uveřejněny ve dvou publikacích, viz **příloha č. 1**: *Ranuša, M., Gallo, J., Hobza, M., Vrbka, M., Nečas, D., Hartl, M.: Opotřebení a drsnost artikulačního povrchu u extrahovaných polyetylenů jamky Bicon. Acta Chir orthop Traum čech, 84(3): 159-167, 2017* a **příloha č. 2**: *Ranuša, M., Gallo, J., Vrbka, M., Hobza, M., Palousek, D., Krupka, I., Hartl, M.: Wear analysis of extracted polyethylene acetabular cups using a 3D optical scanner. Tribology Transactions, 60(3): 437-447, 2017.*

Autor disertační práce zpracoval literární rešerši, dále se podílel na sestavení klinického souboru, výběru a makroskopickém popisu extrahovaných implantátů, změřil radiologicky otěr jamek zařazených do studie a přispěl také k sepsání publikací.

Úvod

Hodnocení opotřebení komponent endoprotézy je nedílnou součástí nejen klinické praxe, ale především i výrobního procesu a vývoje implantátů. Je totiž prokázáno, že právě otěr polyetylenové vložky TEP kyčle je přímo kauzálně spjat s předčasným selháním endoprotézy, zejména pokud otěr probíhá rychleji. Lineární otěr dle RTG hodnocení rychlejší než 1 mm/rok je považován za rizikovější pro aseptické uvolnění (Dumbleton 2002). Otěr polyetylenu můžeme hodnotit z kvalitativního a kvantitativního hlediska. Z hlediska kvality otěru rozlišujeme čtyři typy původu otěru, a to 1) kontakt artikulačních ploch, 2) kontakt artikulační a neartikulační plochy, 3) přítomnost cizího tělesa a 4) kontakt dvou neartikulačních ploch. Mechanismus otěru může být adhezivní, abrazivní a únavový (McKellop 2007). Při kvantitativním hodnocení otěru je nutné zohlednit tzv. tok za studena (angl. cold flow), což je plastická deformace PE vložky v prvních měsících po implantaci, která je spojena s minimálním částicovým otěrem v poměru ke změně svého objemu (Zeman 2018).

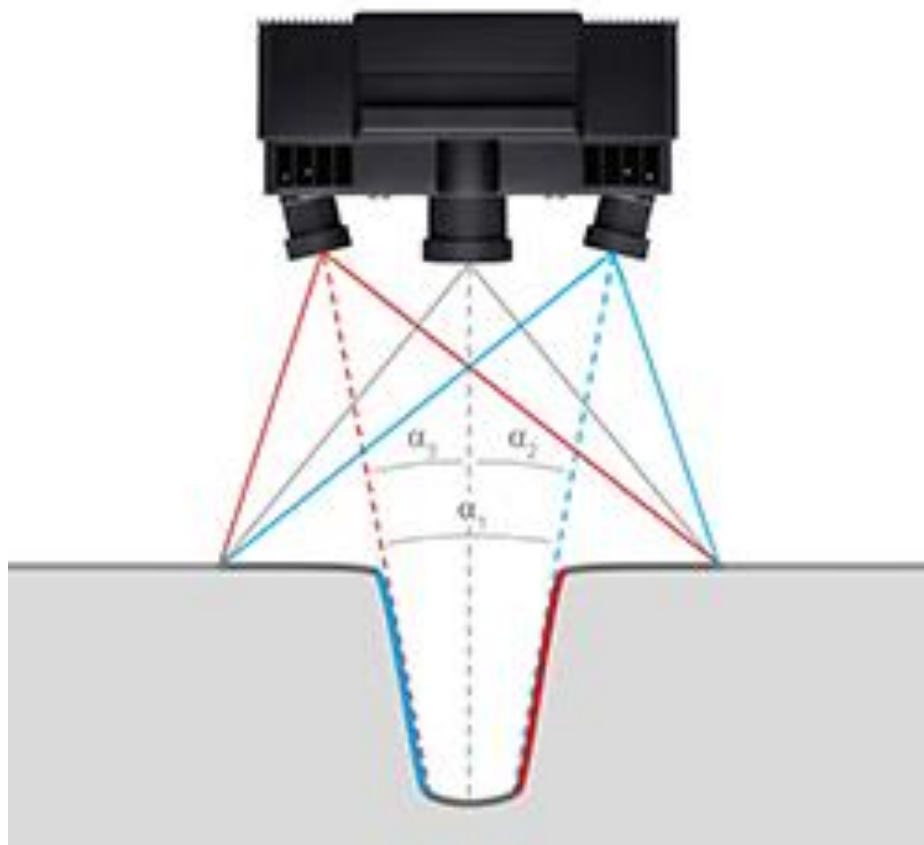
Možnosti klinického hodnocení otěru jsou samozřejmě omezeny povahou uložení implantátu v těle a všechny metody *in vivo* využívají rentgenového zobrazení. Nejjednodušší a historicky nejstarší metoda je dle Charnleyho (později modifikace dle Dorra) (McCalden 2005), která popisuje posun hlavičky vůči okrajům jamky na prostém předozadním rentgenovém snímku

pánve, hodnotí tedy pouze lineární otěr v jednom směru. Pro potřeby orientačního zhodnocení během ambulantního vyšetření je však obvykle dostačující. S rozvojem počítačové techniky začaly být k dispozici dvourozměrné a později i trojrozměrné počítačem asistované metody, které jsou ve druhém případě schopny zhodnotit i objemový otěr. Laboratorní měření má méně omezené možnosti a byly vyvinuty metody hodnotící objemový otěr pomocí rozdílu hmotnosti oproti neopotřebené jamce (gravimetrie), metody výplňové či měřicí mikroskop (Gallo 2006). Za standard laboratorního hodnocení otěru při testování implantátů je stále považována analýza povrchového tvaru jamky pomocí CMM přístroje (coordinate measuring machine), který skenuje povrch mechanickou či bezkontaktní sondou (Bills 2007). Novějším trendem je optické bezkontaktní měření, jako je Fourierova (Rossler 2009) či skenovací profilometrie (Pochmon 2007), nebo využití 3D skeneru. Optické skenovací metody poskytují větší množství dat, která je navíc možno následně upravovat v rámci postprocessingu.

Metodika a soubor pacientů

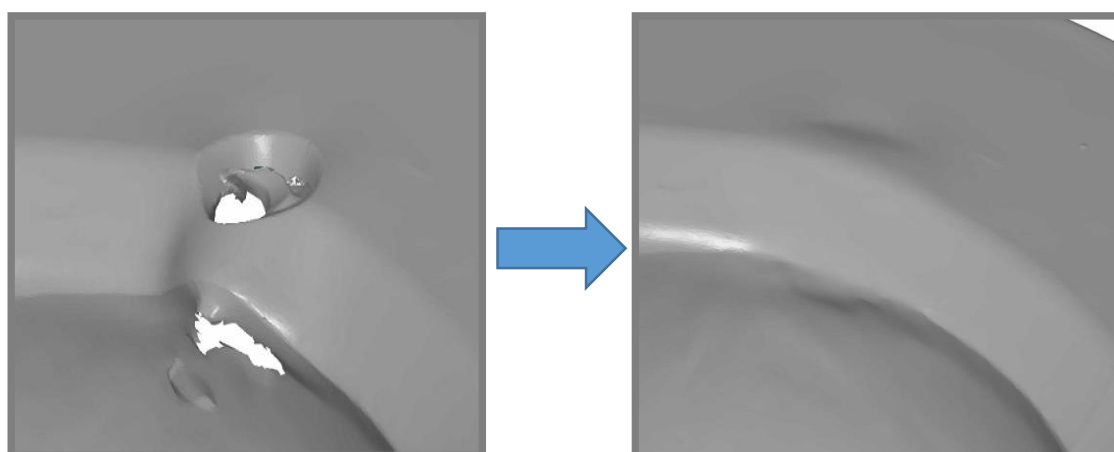
Využití nové metody k měření otěru

K měření lineárního a objemového otěru polyetylenu a jeho charakteru byl využit 3D optický skener ATOS Triple Scan (GOM, Německo), jehož metoda funguje na principu aktivní triangulace. Analyzovaný objekt je nasvícen úzkopásmovým modrým světlem s proužkovou projekcí, tzv. „blue light technology“, která není závislá na okolních světelných podmínkách. Takto nasvícený objekt je pak snímán párovými kamerami přístroje a triangulačním propočtem jsou při znalosti úhlu mezi snímacími kamerami získány prostorové souřadnice. Takto je získáno u jamky s průměrem 28 mm přibližně 200 000 bodů, což umožňuje přesnější zobrazení skenovaného povrchu. Kvůli přílišné transparentci PE vložky byl na její povrch proveden nástřík mikrofilmu TiO_2 o tloušťce cca 3 μm (Palousek 2015), který je pro skener lépe čitelný. Na okraj jamky mimo skenovanou oblast byly položeny referenční body velikosti 0,8 mm. Skenovaná jamka byla položena doprostřed otočného stolku a skener byl zaostřen na střed jamky ve vzdálenosti 490 mm. K získání konečného obrazu bylo provedeno šest měření u každé jamky.

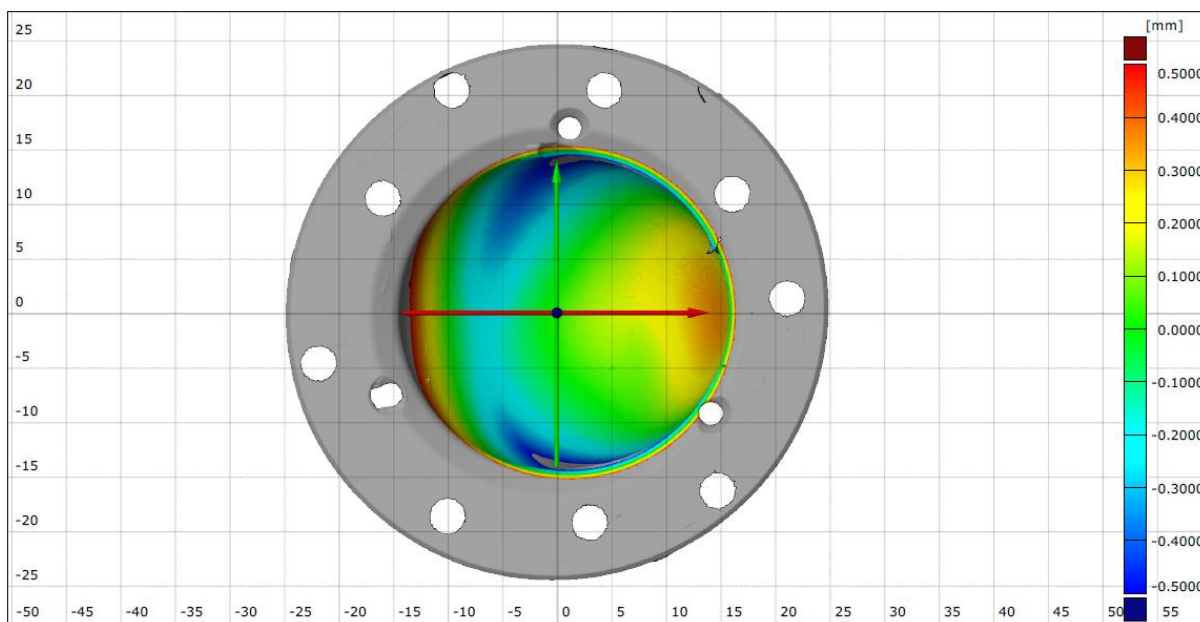


Obrázek 11: 3D optický skener ATOS Triple Scan a princip jeho měření (zdroj: prezentace výrobce, staženo z internetu).

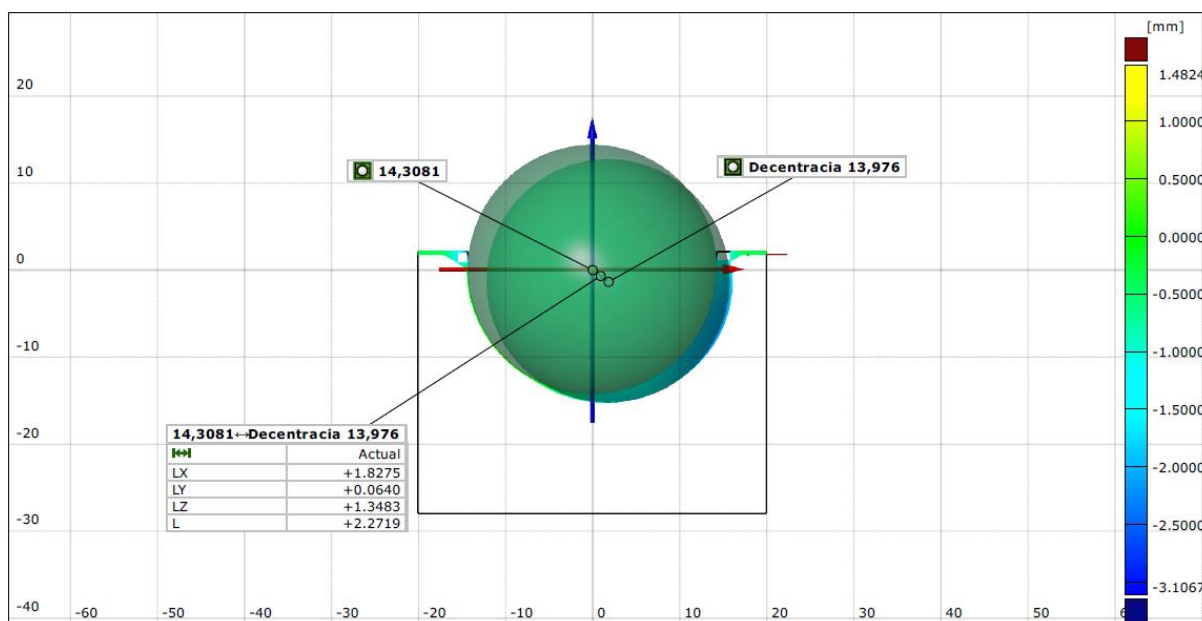
Takto získaná data byla digitálně zpracována polygonizací pomocí programu GOM Inspect, který vytvořil geometrii povrchu jamky. Získaný model byl softwarově očištěn o poškození vzniklé během extrakce jamky a byla odstraněna nadbytečná data z okolí jamky. Následně byla do objemového modelu jamky promítnuta ideální koule o nominálním průměru neopotřebované jamky, která ukázala defektní oblasti. Pomocí tohoto postupu bylo možno získat směr, ve kterém docházelo k otěru jamky, a naopak i zrekonstruovat geometrii původní jamky. Porovnáním geometrie naměřené jamky s geometrií původní tak bylo možno získat objemový otěr, směrový vektor opotřebení a lineární decentraci hlavičky. K vytvoření objemového modelu a následného měření objemového otěru byl využit program Geomagic Design X (3D Systems GmbH).



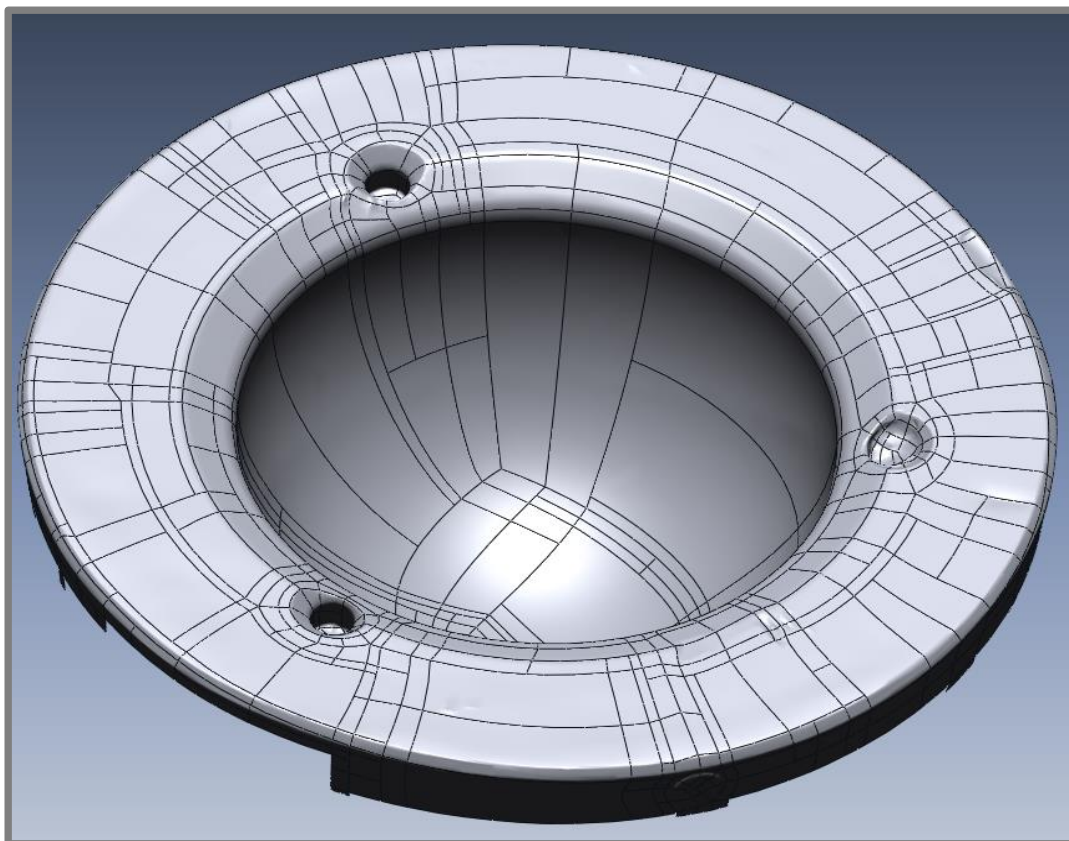
Obrázek 12: Digitální rekonstrukce povrchu poškozeného při extrakci PE vložky (obrázek poskytl ing. Matúš Ranuša, VUT Brno).



Obrázek 13: Určení směru opotřebení jamky (obrázek poskytl ing. Matúš Ranuša, VUT Brno).



Obrázek 14: Určení lineárního otěru v jednotlivých osách (obrázek poskytl ing. Matúš Ranuša, VUT Brno).



Obrázek 15: Vytvoření prostorového modelu k hodnocení objemového otěru (obrázek poskytl ing. Matúš Ranuša, VUT Brno).

Validace metody

Validace optického měření byla provedena pomocí gravimetrického srovnání dle standardu ISO 14242-2. K tomuto účelu byly využity tři nové PE vložky z vysokomolekulárního polyetyleny, na kterých bylo laboratorně vytvořeno opotřebení pomocí kyvadlového simulátoru, ve kterém se proti jamce pohybovala CoCrMo hlavička zatížená na 2080 N kmitající s frekvencí 0,48 Hz v šesti patnáctiminutových cyklech, celkem po dobu 1,5 hodiny. Na podrobnosti simulátoru odkazuje předchozí literatura (Vrbka 2015). Validací vzorky byly váženy před a po simulovaném otěru na analyzační váze Kern ABS 320-4 N. Vzorky byly váženy po každém cyklu pětkrát za účelem omezení chybovosti, jako výsledná hodnota byl využit průměr všech pěti měření. Takto získané hodnoty byly porovnány s měřením pomocí optického 3D skeneru. Průměrný úbytek hmotnosti vzniklý celkovým otěrem byl 0,075 g, což při přepočtu pomocí hustoty daného polyetyleny 0.940 g/cm^3 odpovídalo 80 mm^3 .



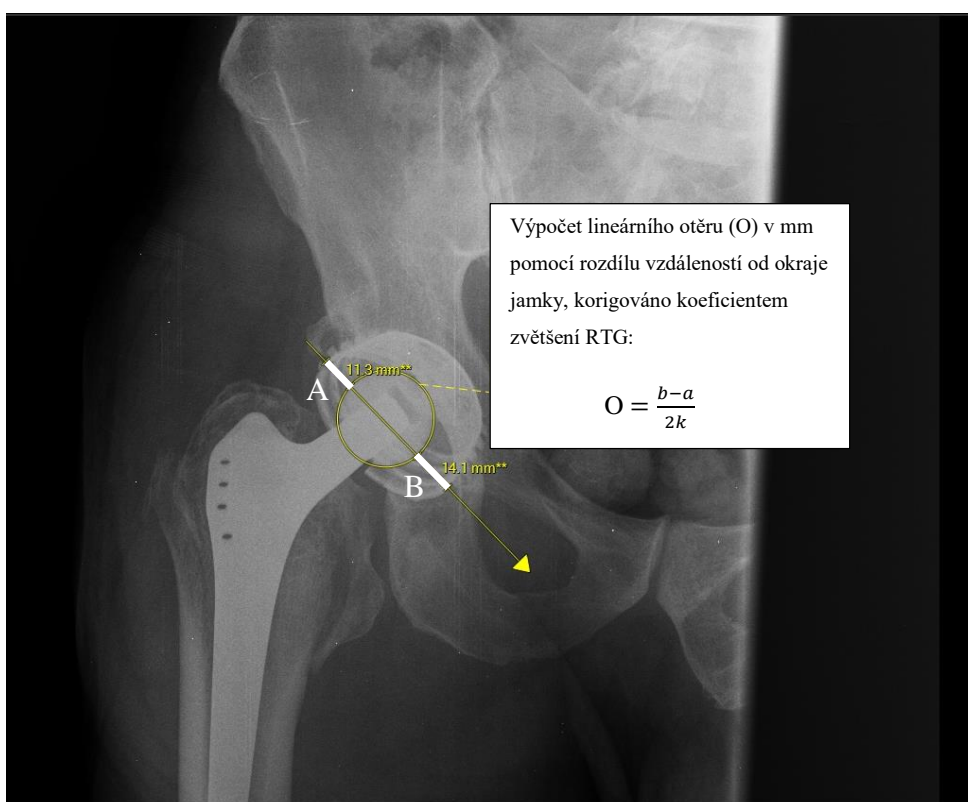
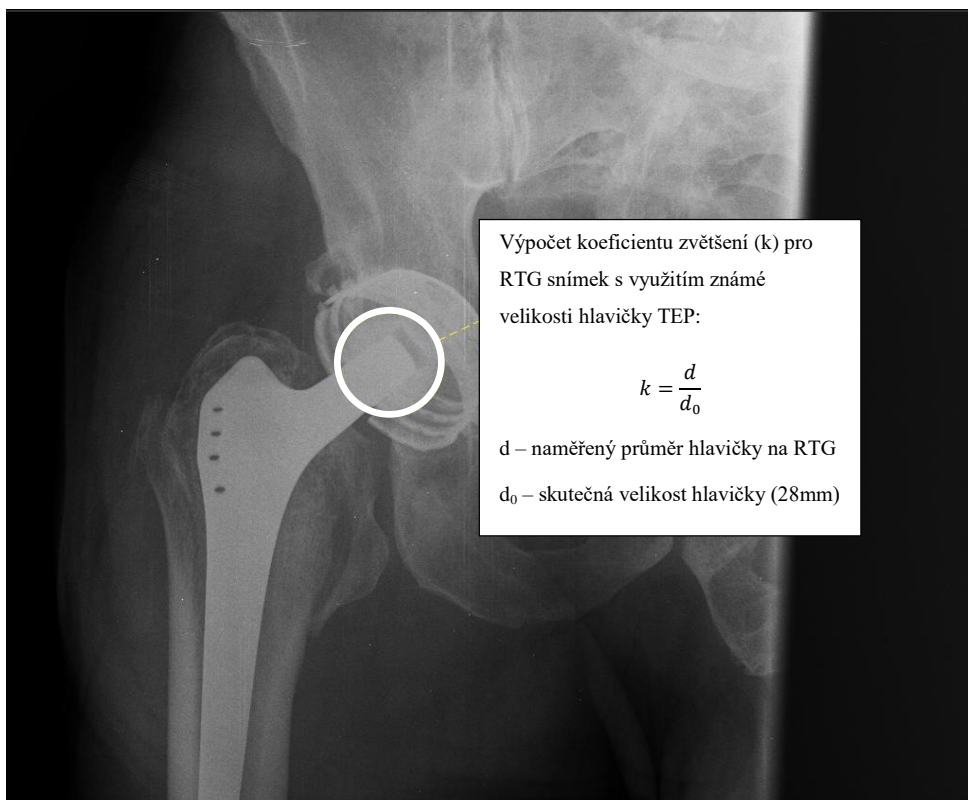
Obrázek 16: Kyvadlový simulátor otěru PE jamky (Ranuša 2016).

Klinické měření lineárního otěru podle Dorra

K porovnání klinické a laboratorní metody měření lineárního otěru byla použita metoda dle Dorra (Dorr 1995). Měření bylo provedeno vždy na RTG snímku z posledního vyšetření před revizí dané endoprotézy a spočívalo v měření posunu hlavičky v kovové jamce. Detaily postupu měření jsou popsány na obrázku 17.

Soubor pacientů

Nově vyvinutou metodu jsme testovali na souboru 13 extrahovaných implantátů od pacientů, kterým byla v letech 2010 - 2015 při operační revizi extrahována TEP kyčle, jejíž součástí byla jamka Bicon-plus a získána tak PE vložka k analýze jejího opotřebení. Z indikací k revizi převažovalo aseptické uvolnění endoprotézy (10 pacientů), klinicky se projevující jako bolesti daného kloubu, dalšími indikacemi byla periprotetická zlomenina, bolesti neznámého původu a zlomená acetabulární komponenta. Klinické informace o pacientech v souboru jsou uvedeny v tabulce 4.



Obrázek 17: Výpočet lineárního otěru na RTG snímku. RTG snímek z archivu Ortopedické kliniky FNOL.

Pacient	Pohlaví	Hmotnost (kg)	BMI	Věk (roky)	Strana	<i>In situ</i> ^a (měsíce)	Typ pacienta ^b	Důvod revize
1	M	66	24,24	67	Pravá	145	B	Periprotetická zlomenina
2	F	48	19,23	48	Pravá	126	B	Aseptické uvolnění
3	F	75	27,55	55	Levá	120	B	Aseptické uvolnění
4	F	63	24,01	61,5	Pravá	131,5	B	Aseptické uvolnění
5	M	103	32,51	52	Pravá	75	A	Bolestivá kyčel
6	F	88	34,38	77	Pravá	48,5	B	Aseptické uvolnění
7	M	100	30,86	73	Levá	89,5	A	Aseptické uvolnění
8	F	58	21,05	43	Levá	92,2	B	Fraktura jamky
9	F	56	23,31	63	Pravá	164	B	Aseptické uvolnění
10	F	72	26,77	53	Pravá	53,6	A	Aseptické uvolnění
11	F	77	26,96	69	Levá	61,9	A	Aseptické uvolnění
12	F	60	22,04	77	Pravá	43	B	Aseptické uvolnění
13	F	68	29,05	59	Levá	114,6	B	Aseptické uvolnění

Tabulka 4: Charakteristika souboru pacientů. ^a Doba pobytu implantátu v těle pacienta. ^b Typ pacienta dle Charnleyho klasifikace: Typ A – jednostranná TEP kyčle, druhostranná kyčel bez postižení, Typ B - jednostranná TEP kyčle, druhostranná kyčel postižena osteoartrózou, Typ C – postiženo více kloubů.

Jamka Bicon

U všech pacientů v souboru byla pro TEP kyčle použita jamka Bicon-plus (Smith and Nephew), titanová jamka bikonického tvaru, implantovaná jako závitořezná necementovaná acetabulární komponenta. Její součástí je studovaná polyetylenová vložka z vysokomolekulárního polyetylenu GUR 1020 (Ticona), vyrobená technologií „compression molded“ podle normy ISO 5834-2. Sterilizace probíhala gama zářením (2,5 Mrad; 1 rad = 0,01 Gy) v inertním prostředí dusíku. Během revize byla PE vložka po extrakci mechanicky očištěna, sterilizována, zabalena a odeslána k laboratorní analýze.



Obrázek 18: RTG snímek asepticky uvolněné jamky Bicon s její proximální migrací v pánvi. RTG snímek z archivu Ortopedické kliniky FNOL.



Obrázek 19: Fotografie extrahované jamky, na níž je vidět následky adhezivního a abrazivního otěru s posunem centra rotace.

Výsledky

Validace 3D skenování pomocí gravimetrie

Po porovnání výsledků měření skenerem a vážením byly střední hodnoty rozdílu metod $-0,0040$ g ($0,0352 - 0,0089$ g) u první jamky, $-0,0021$ g ($0,0159 - 0,0051$ g) u druhé jamky a $-0,0029$ g ($0,0286 - 0,0067$ g) u třetí jamky. Signifikantní rozdíl v měření byl nalezen po prvním otěrovém cyklu v simulátoru. Tato diskrepance je pravděpodobně dána plastickou deformací polyetyleny, tzv. „cold flow“, která je popisována během prvních měsíců po implantaci a zatížení endoprotézy. Opakovatelnost měření přitom dosáhla hodnoty $0,005$ mm.

Analýza extrahovaných jamek

V souboru bylo analyzováno 13 jamek pomocí 3D optického skeneru s aktivní triangulací ATOS III Triple scan s vytvořením digitálního modelu jejich artikulačního povrchu. Každé měření bylo provedeno dvakrát, aby byla eliminována chybovost měření. Menší rozdíly mezi měřeními neměly významný vliv na stanovení objemového otěru. U jamek byl vyhodnocován pouze artikulační povrch, okraj jamky a její zevní obvod nebyl započten do volumetrické analýzy. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5. Střední hodnota objemového otěru jamek byla $395,53 \text{ mm}^3$ ($51,80\text{--}1119,70 \text{ mm}^3$). Rychlost otěru odpovídala $44,37 \text{ mm}^3/\text{rok}$ ($9,98 - 125,85 \text{ mm}^3$; $SD 32,45 \text{ mm}^3$). Celková doba měření jedné jamky trvala obvykle 90 minut.

Pacient	<i>In situ</i> (měsíce)	Velikost implantátu	Typ implantátu	Celkový objemový otěr (mm^3)	Roční objemový otěr (mm^3)
1	145	4/28	Standardní PE	1119,7	92,66
2	126	5/28	Standardní PE	528,97	50,38
3	120	4/28	Antiluxační PE	99,81	9,98
4	131,5	4/28	Standardní PE	752,01	68,62
5	75	6/28	Standardní PE	170,98	27,36
6	48,5	4/28	Standardní PE	162,63	40,24
7	89,5	5/28	Standardní PE	299,66	40,18
8	92,2	4/28	Antiluxační PE	966,92	125,85
9	164	3/28	Standardní PE	584,86	42,79
10	53,6	5/28	Antiluxační PE	69,46	15,55
11	61,9	4/28	Antiluxační PE	152,98	29,66
12	43	7/28	Standardní PE	51,8	14,46
13	114,6	4/28	Standardní PE	182,05	19,06

Tabulka 5: Výsledky měření objemového otěru pomocí optického skeneru.

Porovnání metod měření lineárního otěru

Po vytvoření digitálního modelu opotřebené jamky bylo provedeno porovnání s vloženým modelem neopotřebené jamky, čímž byl získán vektor opotřebení a následně vypočítán lineární otěr (*Digitální modely jamek jsou uvedeny v sekci VII. Doplnující obrázky*). Průměrná hodnota takto získaného lineárního otěru byla 1,06 mm (0,15-2,29 mm). Lineární otěr získaný z RTG měření byl 0,63 mm (0,06- 2,33 mm), Dorrova metoda v tomto případě tedy podhodnocovala o 40,17 %. Hodnoty jednotlivých měření jsou uvedeny v tabulce 6.

Pacient	ATOS (mm)	Dorr (mm)	Dorr (%)
1	2,27	1,60	70,43
2	1,39	0,85	61,02
3	0,43	0,21	48,14
4	1,60	0,51	31,69
5	0,15	0,06	37,45
6	0,48	0,07	15,13
7	0,90	0,80	88,65
8	2,24	0,73	32,71
9	2,29	2,33	101,42
10	0,26	0,29	111,49
11	0,47	0,05	9,96
12	0,31	0,29	93,82
13	0,92	0,43	46,61

Tabulka 6: Porovnání hodnot naměřeného lineárního otěru pomocí optického skeneru ATOS s měřením na RTG snímku dle Dorra.

Diskuze

Při snaze výrobců endoprotéz neustále zlepšovat tribologické vlastnosti implantátů je nutné mít k dispozici přesné, ale i jednoduše použitelné metody k hodnocení míry jejich opotřebení. V současné době představuje právě otěr PE vložky jeden z klíčových faktorů „přežití“ implantátu v těle a jeho akcelerovaný průběh je spjat se zánětlivou reakcí indukující osteolýzu v oblasti kostního lůžka, resp. aseptické uvolnění endoprotézy. Výsledky validačních testů ukazují, že 3D optický skener představuje solidní alternativu k CMM metodě pro měření otěru PE vložky TEP kyčle. Oproti CMM nabízí skener rychlejší měření a současně je schopen registrovat větší počet bodů povrchu a lépe tak reflektovat skutečné opotřebení. Díky digitalizaci obrazu je možné se vzorkem dále pracovat (odfiltrování poškození při extrakci z těla) a vizuálně určit oblast a směr otěru. Nevýhodou optického měření je menší přesnost v porovnání s CMM (která prokazuje přesnost $\pm 1 \mu\text{m}$), jak dokládají validační testy, proto není námi zkoumaná metoda vhodná pro analýzu „tvrdých komponent“, např. párů typu kov-kov či keramika-keramika. Avšak pro analýzu polyetylenu, kde je otěr výraznější, je tato metoda plně dostačující. Je však stále nutné mít na paměti fenomén plastické deformace polyetylenu v prvních měsících po implantaci, která toto měření může zkreslovat jako diskrepance mezi objemovou a hmotnostní ztrátou. Naopak klinické hodnocení otěru vykazuje nižší přesnost měření a poskytuje pouze orientační hodnoty pro klinické sledování. Při našem srovnání pak hodnocení lineárního otěru na RTG snímku dle Dorra podhodnocovalo reálný otěr, což je v souladu s jinou prací porovnávající různé metody (Kang 2003).

Závěr

V této studii byla použita nová metoda stanovení objemového otěru PE jamky pomocí 3D optického skeneru. Hlavní výhodou této metody je její rychlost v porovnání se standardem ve formě CMM, dále získání velkého počtu bodů skenovaného povrchu a možnost softwarové úpravy získaného digitálního modelu. Samotný výpočet objemového otěru byl proveden porovnáním s virtuálně rekonstruovaným modelem neopotřebené jamky. Metoda byla validována pomocí gravimetrie, střední hodnoty rozdílu mezi metodami byly -0,0040 g, -0,0021 g a -0,0029 g. Opakovatelnost skenování byla 0,005 mm. Validace i použití metody na souboru extrahovaných jamek prokazují, že využití 3D optického skeneru je vyhovující k *in vitro* měření povrchového opotřebení a objemového otěru u polyetylenových jamek TEP kyčle.

B. KLINICKÁ ČÁST

STUDIE 1.: HODNOCENÍ KONCENTRACE A DISTRIBUCE KOVŮ V PERIPROTETICKÝCH TKÁNÍCH, VÝPOTKU A KRVI U PACIENTŮ SE SELHÁVAJÍCÍ ENDOPROTÉZOU KYČLE NEBO KOLENE

Cíle

1. Stanovit hladiny těžkých kovů v periprotetických tkáních, výpotku a periferní krvi pacientů s non-MoM endoprotézou kyčle nebo kolena.
2. Korelace hladin kovů k typu implantátu, jeho lokalitě a času uplynulého od implantace.

V rámci daných cílů byly vysloveny následující hypotézy:

1. Implantáty s delší dobou *in situ* budou mít kolem sebe tkáň s vyšší koncentrací daných kovů v porovnání s implantáty s kratším pobytem v těle.
2. Koncentrace kovů budou vyšší v periprotetických tkáních, než ve výpotku z důvodu jejich dlouhodobé akumulace ve tkáni.
3. Nejvyšší koncentrace kovů bude v povrchových tkáních těsně naléhajících na implantát.
4. Obsah kovů bude odlišný při porovnání endoprotézy kyčle a kolena.
5. Implantát uvolněný z kostního lůžka bude do svého okolí uvolňovat vyšší koncentrace kovů ve srovnání se stabilním implantátem.

Výsledky této studie byly uveřejněny v publikaci: *Kuba, M., Gallo, J., Pluhacek, T., Hobza, M., Milde, D.: Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial fluid in patients with total joint arthroplasty. J Biomed Mater Res Part B – Applied Biomaterials, 107B:454-462, 2019, viz příloha č. 5.*

Autor disertační práce zpracoval klinická data souboru pacientů, sumarizoval informace ohledně materiálového složení zkoumaných implantátů a přispěl k sepsání publikace.

Úvod

Fakt, že se z endoprotézy do jejího okolí uvolňují kovy, je ve všeobecném povědomí odborné veřejnosti. Většina studií se však zabývá MoM endoprotézami a největší množství prací přitom hodnotí koncentrace kovů v krevním séru. Při metaanalýze epidemiologických studií byly sérové koncentrace kobaltu po 24 měsících u MoM endoprotéz s malou hlavičkou (do 32 mm) v rozsahu 0,26 - 1,55 $\mu\text{g/l}$, u MoM endoprotéz s velkou hlavičkou (nad 36 mm) v rozsahu 0,7 – 4,5 $\mu\text{g/l}$ a u resurfacingu kyčelního kloubu 0,83 – 2,82 $\mu\text{g/l}$ (Hartmann 2013). Fyziologické hladiny kobaltu se přitom pohybují v rozmezí do 0,6 $\mu\text{g/l}$ (Leysens 2017).

Zvýšené sérové hladiny kovů jsou však popisovány i u endoprotéz s ostatními typy artikulačních párů mimo MoM (Levine 2013). Endoprotézy typu kov-polyetylen však vykazují 2,5x nižší hladiny Co a 2x nižší hladiny Cr oproti jejich MoM protějšku (Li 2018). Porovnání sérových koncentrací Co a Cr u TEP kolene v závěsném provedení (medián 0,03 $\mu\text{g/dl}$ [0-0,07] a 0,033 $\mu\text{g/dl}$ [0,006-0,095]) a megaprotézy (0,75 $\mu\text{g/dl}$ [0-4,7] a 0,298 $\mu\text{g/dl}$ [0,012-2,490]) poukazuje na vliv velikosti protézy na výslednou koncentraci kovů, a tedy možnost deliberace kovů přímo z povrchu endoprotézy (Friesenbichler 2012).

Vyvíjené snahy predikovat selhání MoM endoprotézy na základě sérových hladin kovů nebyly úspěšné, reálnější obraz poskytuje analýza koncentrace kovů v periprotetických tkáních (Lohmann 2013). Jejich odběr je ale pro rutinní diagnostiku poměrně nepraktický.

Tkáňové hladiny kovů u MoM endoprotéz revidovaných z důvodu ARMD v heterogenní skupině implantátů byly dominovány koncentrací chromu – medián 39,2 $\mu\text{g/g}$ (0,4–1955,0), následované kobaltem, 6,4 $\mu\text{g/g}$ (0,2-262,0) a titanem - 5,8 $\mu\text{g/g}$ (3,0-118,9), molybden dosahoval nižších hodnot – 1,8 $\mu\text{g/g}$ (0,2-174,6) (Lehtovirta 2018).

V této práci jsme měli za cíl analyzovat koncentrace kovů v jednotlivých kompartmentech (tkáň, výpotek a sérum) a zhodnotit jejich vzájemnou souvislost a využitelnost pro klinickou diagnostiku a další výzkum.

Metodika a soubor pacientů

Pacienti

Stanovení hladin kovů v této fázi práce bylo provedeno v souboru 117 pacientů při reoperaci TEP kyčle nebo kolena a současně u 43 pacientů bez TEP jako kontrol, u kterých byl proveden odběr při primoimplantaci endoprotézy. Klinická charakteristika souboru a kontrol je popsána v tabulce 7.

		Pacienti (n=117)	Kontroly (n=43)
	Věk	67,4 (39-92)	67,1 (53-82)
Pohlaví	Muž	45	21
	Žena	72	22
Lokalita TEP	Kyčle	73	11
	Kolena	44	32
	Doba <i>in situ</i> (měsíce)	130,7 (1-274)	
	Výška (cm)	167,2 (143-189)	169,4 (158-182)
	Váha (kg)	80,6 (50-120)	88,7 (60-118)
Primární diagnóza	Primární OA	73	38
	Sekundární OA	44	5
Důvod revize	Aseptické uvolnění	42	-
	Infekce	13	-
	Nestabilita	9	-
	Osteolýza	31	-
	Bolestivý kloub	15	-
	Periprotetická zlomenina	7	-

Tabulka 7: Klinická charakteristika sledovaného souboru a kontrol.

Odběr vzorků

Vzorky periferní žilní krve byly odebrány do 10ml zkumavek. Kloubní výpotek byl odebrán punkcí před incizí kloubního pouzdra. Po chirurgickém přístupu do kloubu byla odebrána tenká povrchová vrstva vnitřní strany pseudokapsuly. Tato tkáň (vrstva 1), na rozdíl od hlouběji uložené tkáně (vrstva 2), byla považována za pseudosynoviální membránu, protože je podobná synoviální membráně nativního kloubu a přímo naléhá na implantát, tedy je exponována materiálu uvolněnému z endoprotézy (otěrové částice, ionty atd.), který je obsažen ve výpotku. Tloušťka vrstvy 1 byla preparována konstantně do 5 mm, zatímco vrstva 2 představovala zbylou excidovanou tkáň a její tloušťka byla dána celkovým rozměrem pseudokapsuly a okolních granulací v rámci intence nepoškodit odběrem zdravé tkáně. Tloušťka vrstvy 2 se tedy pohybovala v rozsahu 2-10 mm v závislosti na lokalitě a dalších faktorech (u menšího počtu pacientů nebylo možno vrstvu 2 odebrat). Takto odebrané tkáně byly vloženy do sterilní nádoby a ihned hluboce zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava vzorků

Hluboce zmrazené vzorky byly nejprve lyofilizovány (lyofilizátor ALPHA 1–2/ LD plus, CHRIST, Německo) s následujícím programem: hlavní sušení 3.5 h/ $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/0,63\text{ mbar}$, konečné sušení 0,5 h/ $-76\text{ }^{\circ}\text{C}/0,001\text{ mbar}$ a následně byly rozděleny na tři díly. Každý vzorek pak byl zahřátý na laboratorní teplotu. K mikrovlnné digesci a následné analýze obsažených kovů byl použit 1 ml periferní krve, 1 ml kloubního výpotku nebo 200 mg periprotetické tkáně. Mikrovlnná digesce všech vzorků byla provedena v přístroji MLS 1200 Mega (Milestone, Itálie) s přidáním koncentrované kyseliny dusičné (2-4 ml) a peroxidu vodíku (1-2 ml) v závislosti na hmotnosti vzorku a studovaného materiálu. Poté byl použit následný program mikrovlnné digesce: 2 min/250 W, 5 min/400 W, 2 min/500 W a 6 min/600 W, mezi každým krokem byla dvouminutová pauza a po konci programu následoval třicetiminutový interval chlazení. Všechny zkumavky a nádoby použité během přípravy vzorku byly předtím ponořeny na 24 hodin do 5% kyseliny dusičné a následně omyty deionizovanou ultračistou vodou.

Stanovení hladiny kovů

Všechna měření koncentrace kovů v biologických materiálech byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem na přístroji Agilent 7700x ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometer; Agilent Technologies, Japonsko) vybaveným osmipólovým reakčním systémem (He mód, průtok $4,3\text{ mL min}^{-1}$). Obvyklé nastavení bylo: RF výkon 1550 W , průtok plasmatického plynu 15 L min^{-1} , průtok přidavného plynu $0,9\text{ L min}^{-1}$

a průtok nebulizéru 1.07 L min⁻¹. Pro stanovení byly vybrány následující isotopy: ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁹Co, ⁹³Nb a ⁹⁵Mo.

Reagencia, standardy a certifikované referenční materiály

Pro všechny měřené prvky byly využity jednoprvkové certifikované referenční materiály (CRM) s 1.00060.002 g L⁻¹ (Analytika spol. s. r. o., Česká republika) po zředění na požadovanou koncentraci. Jako vnitřní standard posloužily víceprvkové kalibrační roztoky obsahující Bi, In, Sc, Tb, a Y. K validaci metody a posouzení kvality měření ICP-MS byly použity tři CRM: TM-15,2 (EC, Kanada), TORT-2 (NRC-CNRC, Kanada) a Seronorm trace elements whole blood level 3 (Sero AS, Billingstad, Norsko).

K dekompozici vzorků a přípravě kalibračních standardů byla použita kyselina dusičná (Analpure, Analytika spol. s. r. o., Česká republika) a peroxid vodíku (analytický stupeň 1, Analytika spol. s. r. o., Česká republika). K ředění a omývání byla použita neionizovaná ultračistá voda s odporem 18,2 MΩ.cm získaná z Milli-Q systému (Millipore, Francie).

Statistická analýza

Ke statistickému zhodnocení dat byl využit software NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA) a program Statistica 12.0 (StatSoft). K ověřování hypotéz byl použit neparametrický Mann-Whitney test (s hodnotou statistické významnosti p= 0,01). K výpočtu detekčního limitu byl využit program EffiValidation 3,0 (Effichem, Česká republika).

Výsledky

Zjištěné koncentrace kovů ve vzorcích

Výsledky analýzy jednotlivých kovů obsažených ve vzorcích periprotetické tkáně, výpotku a periferní krvi 117 pacientů a 43 kontrol jsou uvedeny v tabulce 8. Koncentrace kovů v mg/kg⁻¹ byla počítaná na základě surové hmotnosti vzorků před jejich zpracováním. Z výsledků byl patrný velký rozptyl hodnot, zejména mezi tkáňovými vzorky studované skupiny. To je alespoň částečně vysvětlitelné přirozenou heterogenitou souboru, různou kloubní lokalitou, dobou pobytu implantátu v těle, důvodem revize a různými typy implantátů. Po zaměření se na jednotlivé kovy u studované skupiny a kontrol jsme byli schopni identifikovat signifikantní rozdíly pro Ti, V, Cr a Co v periprotetických tkáních a výpotku, avšak rozdíly v periferní krvi nedosáhly signifikantního výsledku.

Prvek	n		Střední hodnoty ±SD (µg/kg)		Medián ±SD (µg/kg)	
	Kontroly	Pacienti	Kontroly	Pacienti	Kontroly	Pacienti
Výpotek						
Ti	36	71	11±5	963±5045	11	22
V	36	40	1±0,2	10±30	1	1
Cr	36	79	10±28	59±167	1	11
Co	36	77	3±6	22±48	1	6
Nb	36	26	1±0,2	7±16	1	1
Mo	25	49	6±13	3±3	2	2
Periferní krev						
Ti	15	70	29±13	26±14	27	24
V	16	42	1±0	3±10	1	1
Cr	13	77	8±22	2±2	1	1
Co	14	75	1±0	1±1	1	1
Nb	18	30	1±0	1±0	1	1
Mo	18	62	2±2	4±12	1	2
Periprotetické tkáně (vrstva 1)						
Ti	22	76	367±957	27330±100900	124	2349
V	22	42	15±41	234±430	5	47
Cr	22	68	381±575	8876±26880	170	1079
Co	22	77	45±109	6522±16380	11	709
Nb	22	22	7±11	228±614	4	4
Mo	21	56	27±27	682±1637	16	44
Periprotetické tkáně (vrstva 2)						
Ti	n/a	49		22050±140600	n/a	851
V	n/a	26		34±43	n/a	15
Cr	n/a	47		3527±8969	n/a	825
Co	n/a	43		1841±8636	n/a	90
Nb	n/a	18		39±103	n/a	4
Mo	n/a	38		215±941	n/a	21

Tabulka 8: Koncentrace kovů ve výpotku, periferní krvi a periprotetických tkáních u pacientů a kontrol.

Porovnání sledované skupiny a kontrol

Zjištěné koncentrace kovů ve všech vzorcích byly zhodnoceny pomocí Mann-Whitney testu s porovnáním sledovaných pacientů a kontrol. Rozdíly koncentrace kovů v periferní krvi se neukázaly jako statisticky signifikantní. Naopak statisticky signifikantní rozdíly byly

nalezeny v koncentracích Ti, V, Cr a Co v periprotetických tkáních a ve výpotku, zatímco v koncentraci Mo a Nb nebyly rozdíly nalezeny. Porovnání hodnot koncentrací kovů ve tkáních, krvi a výpotku je ilustrováno v grafu 5.

Porovnání koncentrace kovů kolem TEP kyčle a TEP kolena

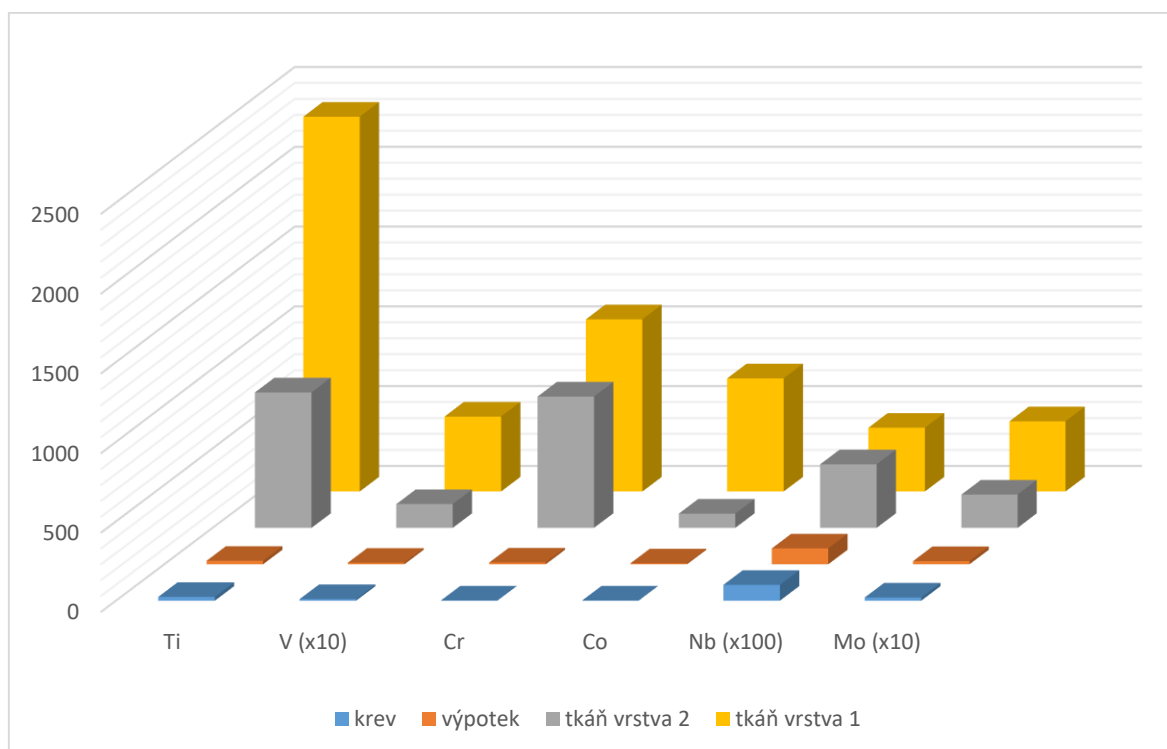
Pomocí Mann-Whitney testu byly porovnány celkové koncentrace kovů v periprotetických tkáních kolem TEP kyčlí a kolen. Statisticky signifikantní rozdíly byly nalezeny pouze u Ti a V, které byly vyšší u TEP kyčle, naopak rozdíly mezi koncentracemi Cr, Co a Mo statisticky signifikantní nebyly. Žádná z TEP kolen neobsahovala niob, který z toho důvodu porovnán nebyl.

Porovnání vrstev periprotetické tkáně

K porovnání koncentrací kovů v obou vrstvách periprotetické tkáně reprezentující jejich vzdálenost od implantátu byl využit párový Wilcoxonův test. S výjimkou niobu byl prokázán signifikantní rozdíl koncentrace kovů v jednotlivých vrstvách. Vrstvu 1 tedy můžeme považovat za reprezentativní vzorek expozice tkání uvolněnými kovy z endoprotézy.

Korelační analýza

Po aplikaci složitějších statistických metod – tj. korelační analýzy a analýzy hlavních komponent (PCA, principle component analysis) se v obou skupinách ukázala doba *in situ* jako hlavní určující faktor pro výslednou koncentraci uvolněných kovů do periprotetických tkání jak Ti implantátů, kde dokázala vysvětlit 95,94 % variability, tak i u Co-Cr implantátů, kde byla zodpovědná za 99,46 % variability koncentrace kovů. Doba uběhlá od implantace endoprotézy je tedy nejvýznamnějším faktorem pro koncentraci kovů v periprotetických tkáních obou typů implantátů.



Graf 5: Porovnání koncentrací kovů v jednotlivých skupinách vzorků, hodnoty uvedeny v µg/kg.

Doba od implantace

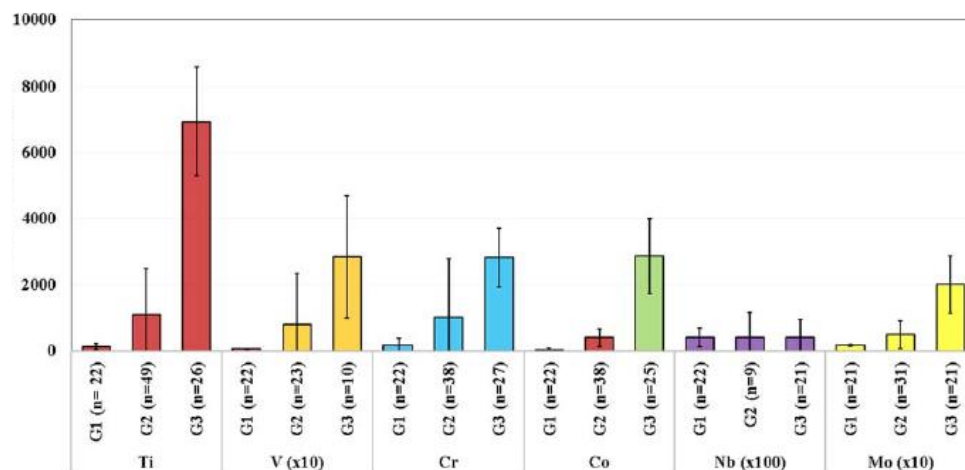
Po stanovení hlavního faktoru pro koncentrace kovů, doby od implantace endoprotézy, byly vytvořeny dvě skupiny k ilustraci vlivu tohoto faktoru na výsledné hladiny kovů. Skupina 1 sdružovala pacienty do 75 měsíců (včetně) od implantace, skupina 2 pak více než 75 měsíců. Rozdíly v koncentracích jednotlivých kovů popisuje tabulka 9.

Indikace k revizi

Pro porovnání jednotlivých indikací k revizi a jejich vlivu na výsledné koncentrace kovů kolem TEP byly vytvořeny následující skupiny: 1) kontrolní skupina; 2) stabilní implantát – např. infekce, bolesti, malpozice komponent či jiné indikace a 3) asepticky uvolněný implantát. Tyto skupiny byly vytvořeny s předpokladem, že nestabilní implantát bude uvolňovat větší množství kovů do svého okolí z důvodu poškození svého povrchu, abraze, a tím i akcentované koroze. Tato hypotéza se potvrdila pro Ti, V, Cr, Co a Mo, s výjimkou niobu, jak dokládá přiložený graf 6.

Prvek	Kontroly		0-75 měsíců <i>in situ</i>		76-274 měsíců <i>in situ</i>	
	n	Medián (μg/kg)	n	Medián (μg/kg)	n	Medián (μg/kg)
TEP kyčle						
Ti	22	124	8	1127	47	4313
V	22	5	4	13	26	125
Cr	22	17	9	1047	37	1155
Co	22	11	9	985	34	1197
Nb	22	4	6	4	19	4
Mo	22	16	8	101	34	171
TEP kolena						
Ti	22	124	13	129	8	2304
V	22	5	10	5	4	10
Cr	22	17	18	723	15	2895
Co	22	11	18	338	15	3511
Mo	22	16	7	16	10	78

Tabulka 9: Koncentrace kovů v periprotetických tkáních v závislosti na době pobytu implantátu v těle.



Graf 6: Porovnání koncentrací jednotlivých kovů v kontrolní skupině (G1), u stabilních (G2) a uvolněných implantátů (G3) v μg/kg.

Diskuze

V této práci byla měřena hladina kovů v krvi, kloubním výpotku a periprotetických tkáních kolem reoperovaných TEP kyčlí a kolen a v kontrolním souboru pacientů bez TEP. Sérové

hladiny kovů naměřené v kontrolní skupině jsou srovnatelné s hodnotami mezinárodních studií (Liu 1998, Sarmiento-Gonzalez 2008) s jedinou výjimkou titanu, u kterého jsme naměřili mírně vyšší koncentrace. Hodnoty v krvi a výpotku sledovaného souboru jsou rovněž srovnatelné s hladinami hlášenými v jiných studiích zabývajících se koncentracemi iontů po implantaci endoprotézy (Sargeant 2006, Matusiewicz 2014).

Provedená analýza prokázala signifikantně zvýšené koncentrace kovových iontů v periprotetických tkáních a výpotku v porovnání s kontrolami, a to pro ionty Ti, V, Cr a Co, naopak v krvi statisticky významný rozdíl koncentrací nalezen nebyl. Sérové hladiny kovových iontů nereflektují lokální situaci kolem endoprotézy, a nejsou tedy vhodné pro provedení korelace s ALTR. Sérové hladiny Co a Cr nebo jejich poměr nejsou užitečné ani v diagnostice ALTR u MoM implantátů (Fehring 2015). Nedochozí ani k elevaci sérových hladin s postupující dobou od implantace, což znamená, že pravděpodobně nebyl překročen práh pro efektivní clearance daných iontů. Nejvíce vypovídající hodnotu tedy poskytují periprotetické tkáně, ve kterých bylo provedeno další hodnocení. Rozdíl v koncentraci Ti a V kolem TEP kyčlí vůči TEP kolen je jednoduše vysvětlitelný jejich materiálovým složením, naopak v koncentraci iontů Co a Cr, ze kterých jsou vyrobeny TEP kyčle i kolena, signifikantní rozdíly nevykazovaly. Z tabulky 9 je patrný rozdíl v koncentracích Cr a Co, který je v nepoměru vůči složení daných implantátů. Tento jev patrný při časnější revizi endoprotézy je vysvětlitelný přítomností pasivační vrstvy Cr_2O_3 na povrchu CoCr slitiny (Liao 2013), naopak při revizi po delší době od implantace už jsou koncentrace uvolněných kovů v souladu s poměrovým složením slitiny.

Vrstva tkáně bližší endoprotéze obsahovala signifikantně vyšší koncentrace jednotlivých kovů než vrstva 2, ve tkáních kolem implantátu je tedy pozorován koncentrační gradient pro uvolněné kovy. Ukazuje se, že periprotetické tkáně mají schopnost akumulace kovů, jejichž koncentrace přímo úměrně souvisí s časovou délkou pobytu implantátu v těle. Koncentrační gradient tkání kolem endoprotézy poukazuje na nízkou „propustnost“ periprotetických tkání pro kovy, respektive to, že tyto tkáně působí jako ochranná bariéra před diseminací kovů do oběhu. Na rozdíl od krve, kde je po delší expozici pozorována stagnace hladin (Hartmann 2013), pravděpodobně z důvodu homeostatických mechanismů, ve tkáních je pozorována akumulace bez plateau v nárůstu koncentrace.

Tkáně kolem uvolněných implantátů jsou více nasyceny kovy, což může být příčinou osteolýzy a následného uvolnění implantátu. Může to však být také dokladem tzv. mechanicky asistované koroze, ke které dochází při mikropohybech v kostním lůžku, které poškozují pasivační vrstvu implantátu a akcelerují tak korozivní procesy. Významným zdrojem uvolněných kovů jsou

modulární spoje endoprotéz (Sultan 2018), kde dochází ke štěrbinové a galvanické korozi, jejich význam a poměr vůči korozi povrchu implantátu a tribokorozi na artikulačním povrchu ale nelze v této práci zhodnotit.

Závěr

Tato práce popisuje variabilitu v přítomnosti kovů ve tkáních a výpotku kolem endoprotéz bez použití artikulárního páru kov-kov, tedy u endoprotéz, kde hladiny kovů nebývají hlavním zájmovým tématem. Periprotetické tkáně jsou schopny akumulovat kovové částice a ionty se vzrůstající koncentrací v závislosti na délce expozice, přičemž nejvyšších koncentrací dosahuje vrstva těsně naléhající na endoprotézu a u implantátů, které mají porušenou kostní fixaci. Naopak sérové hladiny kovů nejsou využitelné pro klinickou diagnostiku selhání endoprotézy, při kterém nedošlo k signifikantnímu zvýšení jejich hladin.

STUDIE 2.: STANOVENÍ VZTAHU MEZI KONCENTRACEMI KOVŮ V PERIPROTETICKÝCH TKÁNÍCH A HISTOLOGICKÝM NÁLEZEM V TĚCHTO TKÁNÍCH

Cíl práce

Zhodnotit tkáňovou odpověď ve vztahu ke koncentracím kovů v periprotetických tkáních u vybraného souboru pacientů s endoprotézami kyčlí a kolen s výjimkou páru MoM.

Hypotéza

Histologická charakteristika periprotetické membrány klasifikovaná dle Krenna a Morawietze se bude měnit v závislosti na koncentraci kovů a s různým odstupem od operace.

Tato práce byla přijata k tisku v časopise *Biomedical papers*. Viz **příloha č. 7**: Hobza, M., Milde, D., Slobodova, Z., Gallo, J.: *The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: a role of metallic byproducts? Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*

Autor disertační práce zpracoval soubor pacientů, podílel se na odběru tkání k chemické a histologické analýze, na zpracování výsledků, sepsání publikace, kde je prvním autorem.

Úvod

Předchozí část práce hodnotila koncentrace kovů v periprotetických tkáních, výpotku a krvi, dalším krokem je zhodnocení významu přítomnosti kovů v periprotetických tkáních pomocí histopatologického vyšetření a korelace nálezu s naměřenými koncentracemi jednotlivých prvků. Histopatologické vyšetření periprotetických tkání nám poskytuje informace nejen o změně kvality tkání, ale při imunohistochemickém vyšetření i znalost přítomnosti jednotlivých buněčných subtypů, které se podílejí na imunitní reakci kolem implantátu. Takto pak získáváme znalosti o způsobech selhání endoprotézy a typech imunologické odpovědi na částice uvolněné z endoprotézy.

Souběžně s hodnocením přežití či revizní četnosti se intenzivně studuje charakter tkáňové odpovědi na přítomnost kovů (Campbell 2014, Salib 2019). Jako první se histologickým popisem periprotetických tkání systematicky zabýval H. G. Willert, který popsal přítomnost částic cementu a kovů s reakcí monocyto-makrofágového systému včetně přítomnosti mnohojaderných buněk (Willert 1974). Tento přístup poté umožnil rozvoj teorie „částicové nemoci“ a studium periprotetické osteolýzy. Za účelem poskytnutí standardu pro histopatologické vyšetření tkání odebraných při revizi endoprotézy navrhli v roce 2006 Morawietz a spol. klasifikaci periprotetické membrány, která rozlišuje čtyři typy membrán, které jsou popisovány následujícím způsobem (Morawietz 2006):

Typ I – membrána indukovaná otěrovými částicemi je charakterizována dominancí makrofágů a obrovskobuněčnou infiltrací se sporadickou příměsí lymfocytů. Z částic je nejčastější PE, dále jsou popisovány částice kostního cementu (polymetylmakrylát), kovů a vzácně nalezené keramické částice. Největší koncentrace částic bývají nalezeny v nekrotických oblastech vzorku.

Typ II – membrána infekčního typu, popisovaná infekce může být nízkého (low-grade) nebo vysokého stupně (high-grade). „Low grade“ infekce je charakterizována chronickou granulací, tedy aktivovanými fibroblasty, proliferací malých cév, edémem a zánětlivou infiltrací granulocytů. Jsou zde četné plasmatické buňky, naopak makrofágy a obrovské buňky jsou ve vzorku vzácně. „High-grade“ infekce je poznatelná podle záplavy neutrofilních granulocytů v edematózní tkáni.

Typ III – membrána kombinovaného typu je kombinací typů I a III, obsahuje tedy oblasti dominující reakce na cizí tělesa, které střídají oblasti zánětlivé granulocytární infiltrace.

Typ IV – membrána přechodného typu je formována pojivovou tkání bohatou na kolagenní fibrily s řídkou buněčnou populací.

Tuto klasifikaci následně v roce 2014 Krenn s Morawietzem revidovali, s detailnějším popisem jednotlivých typů a zaměřením na popis a rozlišení otěrových částic ve tkáních, včetně charakteristiky buněčných populací (Krenn 2014). Klasifikací a histologickým popisem uvolněných částic se také zabývali Perino a spol. (Perino 2018) a další autoři.

Při reakci na přítomnost otěrových částic polyetylenů a kovů v periprotetických tkáních je pozorovatelný rozdíl v imunitní odpovědi. Zatímco částice PE indukují převážně nespecifický typ odpovědi s dominující monocyto-makrofágovou odpovědí s obrovskobuněčnou přestavbou

kolem větších částic (Gibon 2017), v okolí kovových částic je pozorována T-lymfocytární infiltrace, která indukuje specifickou zánětlivou odpověď ve formě imunopatologické reakce IV. typu (Goodman 2007). Z tohoto důvodu je dosaženo vyšší výtěžnosti histopatologického vyšetření, pokud jsou popsány počty zastoupených imunitních buněk.

Metodika a soubor pacientů

Soubor pacientů

Pro účely histologické analýzy periprotetické tkáně v korelaci s koncentrací obsažených kovů byl k dispozici soubor 24 pacientů, kteří byli rozděleni na podskupinu nesoucí implantát z chromkobaltové slitiny ($n = 11$) a podskupinu s implantátem obsahujícím titan či jeho slitinu ($n = 13$). Během reoperací TEP kyčle ($n = 16$; 6 mužů a 10 žen) a kolena ($n = 8$; 4 muži a 4 žen) byly pacientům odebrány periprotetické tkáně z předem určeného odběrového místa. Charakteristika sledovaného souboru je uvedena v tabulce 10.

Odběr vzorků

Za účelem souběžného histologického vyšetření a stanovení koncentrace kovů byl peroperačně odebrán vzorek pseudosynoviální tkáně, tedy vnitřní vrstvy kloubního pouzdra, velikosti cca 2x1 cm a z něj vypreparována tenká povrchová vrstva do 5 mm, která se nacházela v těsném kontaktu s endoprotézou. Takto připravený vzorek byl rozdělen na poloviny, přičemž jedna polovina byla ihned hluboce zmrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dále předána ke zpracování pro analýzu kovů, druhá polovina byla obarvena na straně odlehlé implantátu, fixována v 10% formaldehydu a zaslána k histopatologickému vyšetření.

Histopatologické vyšetření

Na pracovišti Ústavu klinické a molekulární patologie byly vzorky po makroskopickém posouzení zorientovány, přikrojeny a zpracovány standardní histologickou technikou se zalitím do parafinových bloků. Po základním barvení hematoxylin – eozin byly z každého vzorku vybrány 2 až 3 reprezentativní bloky a na připravené řezy o síle 3 až 4 μm byly aplikovány imunohistochemické metody.

Pacient číslo	Lokalita TEP	Pohlaví	BMI	Věk	Primární diagnóza	Diabetes mellitus	Indikace k revizi (jiné - fraktura, nestabilita, bolestivá TEP)	HHS	KSS	KSS-f	TEP in situ (roky)	Typ artikulace	Typ fixace endoprotézy	Materiál endoprotézy	Metalóza
1	Koleno	Žena	26,2	76,1	Primární artróza	Ne	Femoropatelní bolesti	-	56	55	2,1	MoP	C	CoCr slitina	Ne
2	Koleno	Žena	30,5	76,4	Primární artróza	Ne	Nestabilita	-	45	5	4,1	MoP	C	CoCr slitina	Ne
3	Kyčel	Žena	26,7	77,7	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	7	-	-	14,7	MoP	C	CoCr slitina	Ne
4	Koleno	Muž	27,3	74,4	Primární artróza	Ne	Nestabilita	-	64	60	23,4	MoP	C	CoCr slitina	Ne
5	Kyčel	Žena	27,5	73,9	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	4	-	-	0,3	MoP	C	CoCr slitina	Ne
6	Kyčel	Žena	38,3	74,8	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	7	-	-	2,4	MoP	C	CoCr slitina	Ne
7	Koleno	Žena	29,7	72,0	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	-	50	55	7,6	MoP	C	CoCr slitina	Ne
8	Koleno	Muž	29,8	72,6	Primární artróza	Ano	Infekce	-	44	40	15,6	MoP	C	CoCr slitina	Ne
9	Kyčel	Žena	27,0	76,6	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	36	-	-	11,2	MoP	C	CoCr slitina	Ne
10	Koleno	Muž	35,5	72,8	Primární artróza	Ne	Nestabilita	-	70	40	2,1	MoP	C	CoCr slitina	Ne
11	Koleno	Muž	43,0	58,5	Ankylozující spondylartróza	Ne	Infekce	-	38	20	2,7	MoP	C	CoCr slitina	Ne
12	Kyčel	Muž	29,3	59,2	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	51	-	-	2,6	MoP	NC	Ti	Ne
13	Kyčel	Muž	29,4	75,5	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	55	-	-	22,7	MoP	NC	Ti	Ano
14	Kyčel	Muž	30,5	61,6	Primární artróza	Ne	Infekce	52	-	-	9,3	MoP	NC	Ti	Ne
15	Kyčel	Žena	32,7	71,3	Primární artróza	Ne	Opatřebení PE vložky	69	-	-	16,3	MoP	H	Ti	Ne
16	Kyčel	Žena	24,3	78,8	Posttraumatická artróza	Ano	Aseptické uvolnění	31	-	-	2,3	MoP	H	Ti	Ne
17	Koleno	Žena	30,9	57,0	Primární artróza	Ne	Nestabilita	-	76	40	0,1	MoP	C	Ti	Ne
18	Kyčel	Muž	30,5	80,5	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	7	-	-	16,2	CoP	NC	Ti	Ne
19	Kyčel	Žena	27,5	73,3	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	48	-	-	22,8	MoP	NC	Ti	Ne
20	Kyčel	Žena	20,8	74,8	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	31	-	-	21,5	CoP	H	Ti	Ano
21	Kyčel	Muž	32,1	78,1	Primární artróza	Ne	Heterotopické osifikace	56	-	-	5,2	MoP	NC	Ti	Ne
22	Kyčel	Žena	22,0	59,0	Fraktura femuru	Ne	Aseptické uvolnění	34	-	-	21,9	CoP	NC	Ti	Ano
23	Kyčel	Muž	31,9	78,5	Primární artróza	Ne	Aseptické uvolnění	15	-	-	13,5	MoP	NC	Ti	Ne
24	Kyčel	Žena	21,4	70,3	Primární artróza	Ne	Bolestivá TEP	79	-	-	20,5	CoP	NC	Ti	Ne

Tabulka 10: Charakteristika sledovaných pacientů a jejich implantátů; HHS – Harris hip score, KSS – Knee society score, KSS-f – Knee society score, funkční složka, C – cementovaný implantát, NC – necementovaný implantát, H – hybridní fixace, TEP – totální endoprotéza, BMI – body mass index, MoP – kov-polyetylen, CoP – keramika-polyetylen.

Pro účely imunohistochemického vyšetření byla použita 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 třídy 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.

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 specifickým antigenem byla vyjádřena absolutním počtem ve 20 polích při zvětšení 400x (HPF). Byly zaznamenávány počty následujících buněk: histiocyty, T-lymfocyty, B-lymfocyty, neutrofilů, mastocytů, dendritické buňky a eozinofily. Určení typu membrány probíhalo podle klasifikace Krenna a spol. (Krenn 2014).

Stanovení koncentrace kovů

Zmrazené vzorky určené k analýze kovů byly nejprve lyofilizovány a poté podrobeny mikrovlnné digesci. Takto připravené vzorky byly analyzovány ke stanovení koncentrace Ti, V, Co a Cr pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Podrobný popis zpracování a analýzy byl popsán v předchozí části práce.

Statistická analýza

Data byla statisticky zpracována pomocí programu NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA) s využitím Mann-Whitney testu, korelační analýza a analýza hlavních komponent (PCA) byla provedena v programu QC.Expert 3.2 (Trilobyte Ltd., Česká republika).

Výsledky

Délka expozice implantátu

Skupina pacientů s Ti implantátem měla průměrnou dobu od implantace 14,5 let s rozpětím 2,6 – 22,7 let. Skupina s netitanovým (Co-Cr) implantátem byla vyšetřena průměrně 7,8 let od implantace, s rozpětím od 2,1 do 23,4 roků.

Stanovení hladiny kovů v periprotetických tkáních

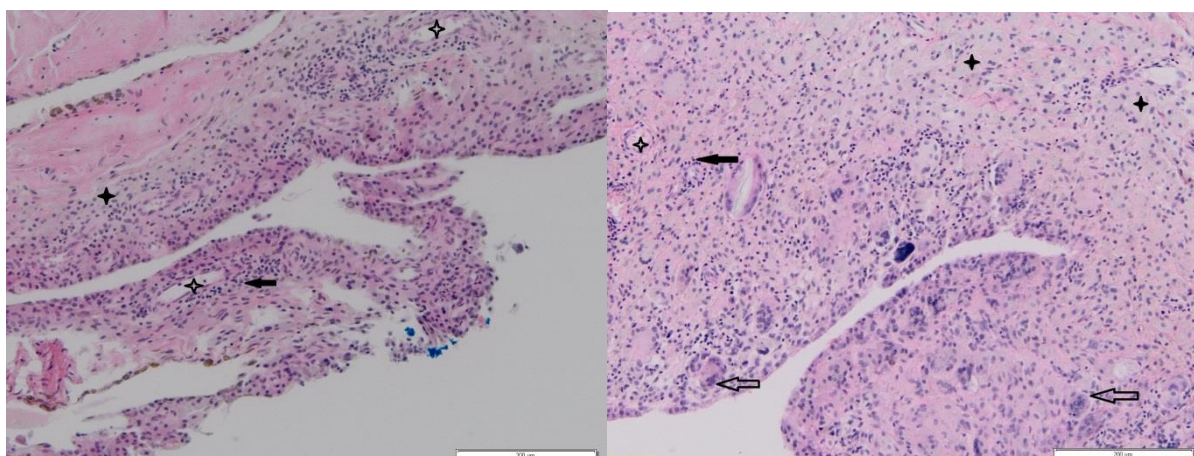
Výsledné hladiny Ti, V, Co a Cr stanovené v periprotetických tkáních jsou uvedeny v tabulce 11. Pomocí Mann-Whitney testu byly potvrzeny rozdíly v koncentracích Ti mezi skupinou s Ti implantátem a skupinou s Co-Cr implantátem.

Pacient číslo	Materiál endoprotézy	TEP <i>in situ</i> (roky)	Ti (mg/kg)	V (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Ni (mg/kg)
1	CoCr slitina	2,1	0,35	0,02	24,59	6,50	0,54
2	CoCr slitina	4,1	0,69	0,04	7,72	0,03	0,26
3	CoCr slitina	14,7	0,53	0,01	3,46	0,83	1,05
4	CoCr slitina	23,4	6,07	0,31	386,48	24,99	0,33
5	CoCr slitina	0,3	2,26	0,04	4,45	1,19	0,26
6	CoCr slitina	2,4	2,83	0,01	0,56	0,02	0,05
7	CoCr slitina	7,6	2,20	0,01	6,67	6,60	0,23
8	CoCr slitina	15,6	20,24	0,85	24,48	34,14	0,20
9	CoCr slitina	11,2	2,69	0,01	9,53	14,50	0,58
10	CoCr slitina	2,1	0,37	0,03	7,06	0,06	1,52
11	CoCr slitina	2,7	30,81	1,28	6,77	0,92	0,06
12	Ti	2,6	34,88	0,64	4,69	3,09	0,39
13	Ti	22,7	3492,69	215,89	37,40	43,23	1,08
14	Ti	9,3	8,94	0,04	169,19	279,57	2,28
15	Ti	16,3	8,14	0,05	24,81	8,37	9,97
16	Ti	2,3	2,22	0,02	1,86	0,03	0,70
17	Ti	0,1	2,27	0,04	7,29	5,79	0,46
18	Ti	16,2	29,42	0,02	0,80	0,02	0,35
19	Ti	22,8	11,38	0,25	5,72	8,54	0,15
20	Ti	21,5	87,11	0,16	162,29	18,37	55,71
21	Ti	5,2	5,11	0,01	4,59	6,73	0,09
22	Ti	21,9	239,09	11,30	2,76	0,09	0,97
23	Ti	13,5	17,99	0,08	39,65	68,66	0,22
24	Ti	20,5	12,95	0,01	0,59	0,03	0,16

Tabulka 11: Koncentrace kovů ve vzorcích periprotetických tkání; TEP – totální endoprotéza.

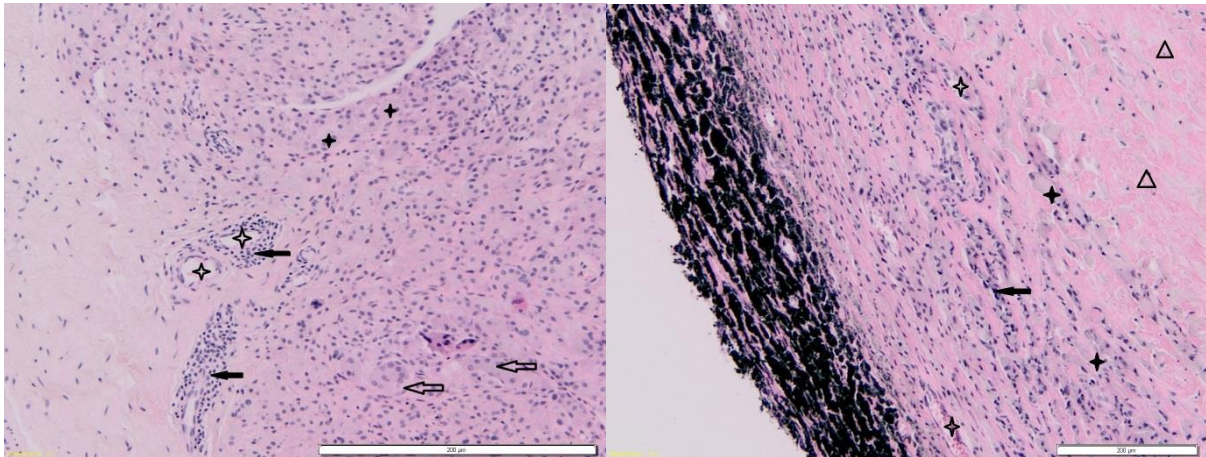
Histopatologické hodnocení periprotetických tkání

Přiřazení jednotlivých vzorků periprotetické membrány k typu dle Krenna a nalezené počty imunitních buněk jsou uvedeny v tabulce 12. Po statistické analýze výsledků pomocí neparametrického testu (Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v typu membrány či počtu buněčných populací mezi oběma podskupinami. Typ kovové slitiny implantátu tedy není určující pro charakteristiku periprotetické membrány. V obou podskupinách se však mění charakter membrány s postupující dobou od implantace, a to s následujícím trendem: **1)** zvyšuje se rozsah zánětlivé infiltrace a nekrózy se stávají četnějšími, **2)** histiocyty se transformují z úzkého lemu v nodulární infiltráty se zvyšujícím se počtem mnohojaderných buněk kolem cizích těles a **3)** lymfocyty, které jsou nejprve v perivaskulární lokalizaci postupně migrují do oblastí zánětlivé infiltrace a objevují se i mezi histiocyty a mnohojadernými buňkami. Trend je ilustrován na histologických snímcích v obrázku 20, 21 a 22.



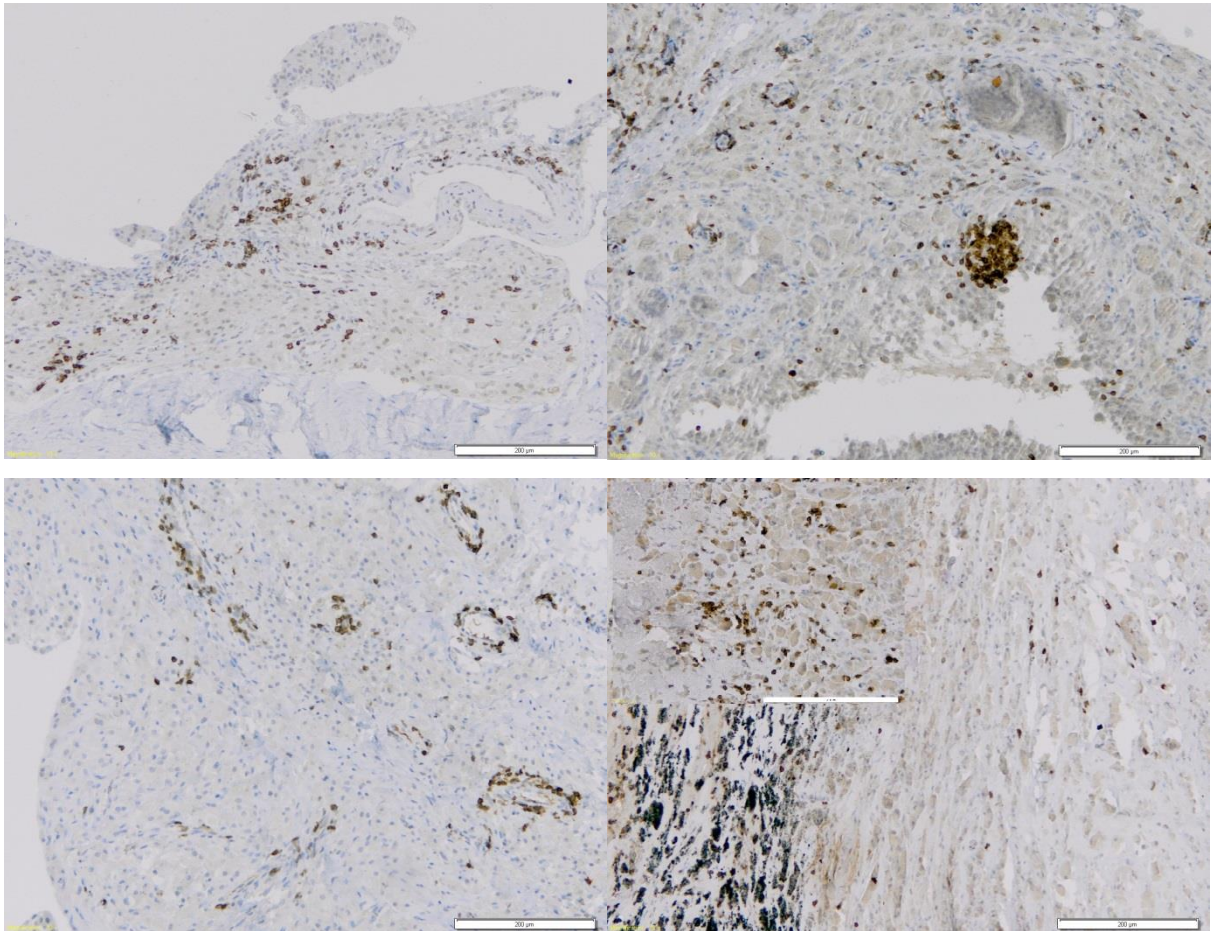
Obrázek 20: Pseudosynoviální membrána v okolí CoCr implantátů. Vlevo membrána typu I dle Krenna a Morawietze – časná reakce: Zánětlivý infiltrát tvoří úzký lem s lymfocyty v perivaskulární lokalizaci s minimem lymfocytů mezi histiocyty. Na obrázku zastíženy histiocyty, perivaskulární lymfocyty, vícejaderné buňky nejsou přítomny. Otěrový materiál je minimální, nachází se v povrchových partiích vzorku. **Vpravo membrána typu I dle Krenna a Morawietze – pozdní reakce:** Rozsah zánětlivého infiltrátu je výrazný, dominují histiocyty a vícejaderné buňky. Lymfocyty jsou kromě perivaskulární lokalizace přítomny i disperzně mezi histiocyty. Otěrový materiál je hojný, nachází se ve všech částech vzorku (histologické snímky poskytl MUDr. Zuzana Slobodová Ph.D., Ústav klinické a molekulární patologie LF a UP v Olomouci).

✦ histiocyty, ✧ cévy, ← lymfocyty, ⇐ vícejaderné buňky, △ nekróza



Obrázek 21: Pseudosynoviální membrána v okolí Ti implantátů. Vlevo membrána typu 1 dle Krenna a Morawietze – časná reakce: Zánětlivý infiltrát tvoří relativně dobře ohraničený lem histiocyťů s příměsí vícejaderných buněk s lymfocyty v perivaskulární lokalizaci s malým množstvím lymfocytů mezi histiocyty. Otěrový materiál je méně nápadný, nachází se v povrchových, méně pak v hlubších partiích vzorku. Vpravo membrána typu 1 dle Krenna a Morawietze – pozdní reakce: Rozsah zánětlivého infiltrátu je výrazný, dominují histiocyty a vícejaderné buňky. Lymfocyty jsou četnější v hlubších partiích vzorku, v perivaskulární lokalizaci jsou méně nápadné, výrazná je disperzní infiltrace mezi histiocyty. Otěrový materiál je hojný, nachází se ve všech částech vzorku, povrchová oblast je hojně imbibována. V pravém horním rohu je zřejmá nekróza (histologické snímky poskytla MUDr. Zuzana Slobodová Ph.D., Ústav klinické a molekulární patologie LF a UP v Olomouci).

✦ histiocyty, ✦ cévy, ← lymfocyty, ⇐ vícejaderné buňky, △ nekróza



Obrázek 22: Imunohistochemické barvení T lymfocytů CD3+ na membráně. Vlevo nahoře: CoCr implantát – časná reoperace: Lymfocyty zejména v perivaskulární lokalizaci; Vpravo nahoře: CoCr implantát – pozdní reoperace: Lymfocyty jsou nejen v perivaskulární lokalizaci, přítomny jsou i disperzně mezi histiocyty. Vlevo dole: Ti implantát – časná reoperace: Lymfocyty v perivaskulární lokalizaci s malým množstvím lymfocytů mezi histiocyty; Vpravo dole: Ti implantát – pozdní reoperace: Povrchové partie obsahují malé množství lymfocytů. Vložený je obrázek s hlubšími partiemi, kde jsou lymfocyty četnější, výrazná je disperzní infiltrace mezi histiocyty, v perivaskulární lokalizaci jsou méně nápadné (histologické snímky poskytl MUDr. Zuzana Slobodová Ph.D., Ústav klinické a molekulární patologie LF a UP v Olomouci).

✦ histiocyty, ✧ cévy, ← lymfocyty, ⇐ vícejaderné buňky, △ nekróza

Pacient číslo	Typ membrány podle Krenna	Histiocyty/HPF	Dendritické buňky/HPF	Vícejaderné buňky /HPF	B-lymfocyty /HPF	Plasmatické buňky/HPF	T-lymfocyty /HPF	Žírné buňky/HPF	Eosinfilní buňky /HPF	Neutrofilní buňky/HPF
1	IV	7,7	-	-	0,6	-	11,2	3,1	-	-
2	I	59,5	0,3	2,6	-	-	83,8	3,1	-	-
3	III	52,8	-	18,3	-	-	24,3	1,6	-	-
4	I	227,6	-	15,5	0,4	-	23,6	5,1	-	-
5	II	79,7	-	0,5	-	-	10,2	4,8	2,7	36,6
6	IV	1,0	-	-	-	-	2,8	3,7	-	-
7	I	200,9	1,2	18,5	-	-	18,8	2,7	-	-
8	III	71,2	3,1	8,8	0,5	3,8	35,4	0,4	-	-
9	I	85,1	-	4,2	-	-	5,6	2,0	-	3,0
10	IV	5,8	0,4	1,2	40,9	1,8	87,4	1,1	-	-
11	III	171,7	1,7	5,7	-	-	32,3	1,9	-	9,7
12	IV	1,2	-	-	-	-	4,5	1,5	4,3	4,9
13	I	224,9	1,7	5,6	-	-	121,7	0,3	-	-
14	III	225,4	0,8	2,5	2,5	-	157,0	4,3	-	300,0
15	I	195,5	1,4	1,4	-	-	13,4	2,2	-	-
16	IV	2,2	-	-	36,6	-	6,0	15,0	-	1,9
17	II	12,1	0,5	0,5	2,8	3,9	35,3	2,6	0,3	2,1
18	IV	3,9	-	-	-	-	3,0	5,0	-	-
19	III	75,0	-	5,9	-	-	42,0	0,6	-	1,2
20	I	203,6	1,8	3,7	-	-	70,3	5,2	-	0,9
21	II	28,9	0,7	0,7	2,4	-	9,7	2,7	0,7	164,1
22	I	202,8	0,9	0,9	-	-	57,6	4,7	-	-
23	I	189,1	1,1	0,7	-	-	5,3	-	0,4	-
24	I	241,9	1,6	1,8	-	-	34,4	11,1	1,2	4,9

Tabulka 12: Určení typu periprotetické membrány dle Krenna a kvantifikace jejích buněčných populací na 1 zorné pole; HPF – high power field, Typ membrány podle Krenna: I – částicový typ, II – infekční typ, III – smíšený typ, IV – indiferentní typ.

Korelační analýza

V rámci korelační analýzy vztahů mezi jednotlivými kovy a jejich koncentrací, histologickým nálezem a délkou expozice byl využit Pearsonův korelační koeficient a hladina pro testování statistické významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$.

V obou skupinách byla prokázána statisticky významná korelace mezi délkou expozice a hladinou relevantních kovů. Jmenovitě ve skupině s Ti implantáty korelovala s délkou expozice hladina Ti ($r = 0,577$) a hladina V ($r = 0,560$), resp. pro Ti a V ($r = 0,714$), ve skupině s implantáty bez Ti pak s délkou expozice korelovala hladina Cr ($r = 0,727$) a dále byla prokázána korelace mezi hladinami Co a Cr ($r = 0,772$).

Analýza hlavních komponent

Pomocí analýzy hlavních komponent bylo možno vypořádat několik trendů:

Při krátké době expozice ve skupině s Ti implantáty převažovaly nízké hladiny kovů a membrána typu IV dle Krenna, naopak při dlouhé expozici byly vysoké hladiny kovů a vysoké počty T-lymfocytů.

Ve skupině s implantáty bez Ti byla krátká expozice charakterizována membránou typu IV a vyšším počtem T-lymfocytů, při dlouhé expozici byly pozorovány vysoké hladiny kovů, převažující T-lymfocyty mezi buňkami a typ membrány nebyly určující. V obou skupinách však při delší expozici převažovala membrána typu I a III dle Krenna. Z uvedeného vyplývá, že typ membrány, ani počet jednotlivých buněk neodpovídá určitému kovu, ale je tedy spíše funkcí délky expozice nežli vlivu konkrétní koncentrace sledovaných kovů.

Diskuse

U endoprotéz typu kov-polyetylen a keramika-polyetylen dochází k uvolňování kovů z artikulačního povrchu kovové hlavičky cestou tribokoroze, korozivními ději z celého těla endoprotézy a jako významný zdroj kovů jsou považovány modulární spoje, v tomto případě spojení konusu femorální komponenty s hlavičkou, což je označováno anglicky jako „trunnion corrosion“ (Hussenbocus 2015). V posledním případě se jedná o kombinaci dějů, které se podílí na uvolňování kovů – abraze při mikropohybech, mechanicky asistovaná koroze, štěrbinová koroze a v případě styku různých kovů i galvanická koroze (Gibon 2017). Takto uvolněné kovy indukují celou řadu biologických jevů (viz úvod) a stimulují zánětlivou odpověď okolních tkání, v tomto případě s podílem specifické zánětlivé odpovědi zprostředkované T-lymfocyty. Podrobněji byly popsány vztahy histologického nálezu s tkáňovými kovy u endoprotéz typu kov-kov, kde jsou publikovány ambivalentní výsledky – na jedné straně stojící nespecifická

imunitní odpověď bohatá na makrofágy v korelaci s vysokou tkáňovou koncentrací kovů a lymfocytární infiltrace ve tkáních korelující s nízkou koncentrací kovů (Campbell 2010). Na druhou stranu Lohmann našel opačný vztah, tedy nízké koncentrace kovů s makrofágovou infiltrací a vysoké tkáňové koncentrace kovů asociované s lymfocytární infiltrací, což je ve větší shodě s našimi výsledky (Lohmann 2013). V nedávné studii srovnávající histopatologický nález ve vztahu ke koncentracím kovů u MoM endoprotéz a resurfacingu nebyla nalezena žádná jasná korelace v obou skupinách (Lehtovirta 2018).

V obou námi sledovaných skupinách byl pozorován nárůst koncentrace kovů uvolněných do periprotetických tkání v závislosti na době *in situ*, což potvrzuje i předchozí část práce. Sérové hladiny kovů v této práci měřeny nebyly, protože nebyla prokázána korelace mezi tkáňovými a sérovými hladinami, ani jejich význam pro selhání endoprotézy. U některých vzorků ze skupiny Ti implantátu byla naměřena vyšší hladina Cr a Co, což je dáno použitím CoCr hlavičky nebo jednou z komponent TEP obsahující tuto slitinu, naopak nízké hladiny V a Nb v této skupině jsou dány jejich malým zastoupením ve slitině.

Tkáňová reakce nabývá po delší expozici všeobecně stejného charakteru v obou námi sledovaných skupinách a typ membrány dle Krenna není určující – není tedy závislá na typu implantátu (přesněji kovové slitiny). Naopak při krátké expozici a nízkých hladinách kovů převažoval IV. typ membrány. V obou skupinách je také zjevná tkáňová infiltrace T-lymfocyty při vyšších koncentracích kovů, jakožto specifická imunitní odpověď, což je nejvíce pozorováno u MoM endoprotéz, kde jsou hladiny kovů ještě výrazně vyšší (Hopf 2017). Akumulace T-lymfocytů byla již popsána i u MoP endoprotéz, tedy nejedná se o reakci typickou jen pro MoM (Ng 2011, Von Domarus 2011). Právě proto by se mohlo jednat o reakci na kovy. Tuto hypotézu podporuje i nález uvolnění kovů a částic cestou tribokoroze na artikulárním povrchu MoP současně s „fretting“ korozí modulárních spojů, spjaté se specifickou imunitní reakcí a akumulací T-lymfocytů v periprotetických tkáních (Wang 2019).

Výsledky histologické analýzy a profil buněčných populací získaný v obou skupinách implantátů vytváří obraz velmi podobný pozdní hypersensitivní reakci, tedy akumulace antigen-prezentujících buněk a T-lymfocytů. Pro potvrzení této domněnky by bylo nutné doplnit cytokinový profil v souladu s daným histologickým nálezem. Cytokinový profil spolu s epikutánním testem a lymfocytárním transformačním testem někteří autoři doporučují v rámci diagnostiky implantátové alergie (Thomas 2015).

Dále tato analýza popisuje pouze část komplexních vztahů periprotetických tkání k částicím uvolněným z implantátu. Zánětlivá reakce na otěrové částice polyetyleny je již dobře popsána a měla by být brána v úvahu i v rámci tohoto hodnocení reakce na kovy. Zjištěné je tedy podnětem pro další výzkum, který by měl provést komplexní analýzu koncentrace jak kovů, tak i ostatních otěrových částic (včetně PE) v periprotetických tkáních současně s histologickou analýzou typu zánětlivé reakce včetně cytokinové analýzy. Taková práce by dále mohla významně přispět k hlubšímu porozumění zánětlivé reakce kolem implantátů a určit nakolik se reakce na kovy podílí na celkovém obrazu periprotetické osteolýzy.

Závěr

Při analýze souboru 24 revidovaných endoprotéz kyčle a kolene byla potvrzena narůstající koncentrace kovů v periprotetických tkáních v závislosti na době, po kterou je implantát v těle. Histologická analýza ukazuje shodnou charakteristiku časně revidovaných endoprotéz v obou skupinách (titanové i bez Ti) s nízkým buněčným zastoupením a membránou IV typu dle Krenna. Při delší expozici tkání produkty uvolňovanými z endoprotézy naopak nebyl typ membrány specifický pro daný typ implantátu. V obou skupinách je při delší expozici a vyšších koncentracích kovů patrna výraznější lymfocytární infiltrace. To by mohlo poukazovat na narůstající podíl specifické imunitní odpovědi na celkové reakci tkání na odpadové produkty TEP, včetně kovových částic.

III. SHRNU TÍ ZÁVĚRŮ JEDNOTLIVÝCH STUDIÍ

1. Vyvinuli jsme a otestovali nekontaktní metodu měření povrchového opotřeben í polyetylen u extrahovaných náhrad TEP kyčle pomocí 3D optického skeneru. Přesnost metody daná její opakovatelností je 0,005 mm. Výhodou je rychlost měření a možnost dále pracovat s digitalizovaným modelem skenované jamky. V porovnání s referenční CMM metodou nedosahuje takové přesnosti pro měření otěru tvrdých povrchů, avšak pro otěr PE se tato metoda ukazuje jako vhodná.
2. Stanovili jsme hladiny Ti, V, Cr, Co, Nb a Mo v periprotetických tkáních, kloubním výpotku a v krevním séru v souboru 117 pacientů s endoprotézou kyčle nebo kolene. Systémová expozice organismu u endoprotéz typu kov-polyetylen a keramika-polyetylen je velmi nízká a většina uvolněných kovů se akumuluje v periprotetických tkáních. Naopak v periferní krvi se hladina kovů nezvyšuje. Podle stanovené hladiny kovů v krvi tedy není možné určit stupeň selhání endoprotéz typu kov-polyetylen nebo keramika-polyetylen.
3. Tkáňová koncentrace kovů narůstá v závislosti na době, po kterou byla endoprotéza v těle. Co se týče prostorových vztahů, prokázali jsme koncentrační gradient dle vzdálenosti od implantátu. Při aseptickém uvolnění endoprotézy dosahují okolní tkáň vyšších hladin kovů, což poukazuje na podíl mechanicky asistované koroze na uvolnění kovů z implantátu.
4. U časných revizí byla naměřena nízká koncentrace kovů v periprotetických tkáních a převažovala membrána IV. typu dle Krenna s nízkým zastoupením imunitních buněk.
5. S narůstající dobou od primóoperace se zvyšovala koncentrace kovů v periprotetických tkáních, avšak typ membrány dle Krenna nebyl schopen jemněji diferencovat typ tkáňové odpovědi (podobně ani buněčný profil). Souběžně s koncentrací kovů a délkou expozice narůstal počet lymfocytů v periprotetické membráně, z čehož můžeme usuzovat na zvyšující se podíl specifické imunitní reakce.

IV. SUMMARY

1. We developed and tested a contactless method of polyethylene cup surface wear using 3D optical scanner. Accuracy of the method given by the reproducibility is 0.005 mm. Advantages of the method are its speed and opportunity of postprocessing the digitized model of scanned cup. It does not provide such accuracy for hard surface measurement when compared to referential CMM method, but is fully sufficient for polyethylene wear measurement.
2. Levels of Ti, V, Cr, Co, Nb and Mo have been evaluated in periprosthetic tissues, joint fluid and peripheral blood in group of 117 patients undergoing total hip and knee arthroplasty revision. Total body exposition to metals from implants with metal on polyethylene and ceramic on polyethylene bearings is very low and most of the metals accumulate in periprosthetic tissues and not in peripheral blood. Blood metal levels in non-MoM endoprosthesis is therefore not an effective biomarker of implant failure.
3. Tissue metal concentration is rising with time of implant service and is following a concentration gradient relative to the implant. The highest concentrations are found around aseptically loosened implants, which is indicating, that mechanically assisted corrosion is taking part in the process of metal debris production.
4. In early revisions a low metal concentration in periprosthetic tissues and a low cellular count was found with mostly type IV membrane according to Krenn.
5. A higher concentration of metals was found in late revisions, but the type of membrane was not determining. Type of tissue reaction did not correlate with specific implant type. Along with rising metal concentrations in longer exposition a rising tissue lymphocyte count was found, which is indicating of specific immunity participation.

V. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TEP	Totální endoprotéza
PE	Polyetylen
MoP	Artiklace kov-polyetylen (metal-on-polyethylene)
CoP	Artiklace keramika-polyetylen (ceramic-on-polyethylene)
CoC	Artiklace keramika-keramika (ceramic-on-ceramic)
MoM	Artiklace kov-kov (metal-on-metal)
ICLH	Imperial College of Science and Technology in London Hospital
UHMWPE	Vysokomolekulární polyetylen (Ultra-high-molecular-weight polyethylene)
HXLPE	Vysoce síťovaný polyetylen (Highly Crosslinked Polyethylene)
SLIM	Pseudosynoviální membrána (Synovial-Like Interface Membrane)
MCP-1	Monocytární chemoatraktantní protein-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa (Tumor Necrosis Factor- α)
RANK	Receptor aktivující nukleární faktor kappa-B (Receptor activator of nuclear factor kappa-B)
PPOL	Periprotetická osteolýza
ASTM	Americká společnost pro testování a materiály (American Society for Testing and Materials)
CP Ti	Komerčně čistý titan (commercially pure titanium)
ARMD	Nežádoucí reakce na kovové částice (Adverse reaction to metal debris)
ALTR	Adverse local tissue reaction
ALVAL	Aseptic Lymphocyte-dominated Vasculitis-Associated Lesion
APC	Antigen prezentující buňky (Antigen-presenting cell)
LTT	Lymfocytární transformační test

mLST	Modifikovaný lymfocytární stimulační test
LIF	Leukocytární inhibiční faktor
PGE2	Prostaglandin E2
CRP	C-reaktivní protein
CMM	Coordinate measuring machine
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)
CRM	Certifikované referenční materiály
PCA	Analýza hlavních komponent (Principal component analysis)
CD	Diferenční skupina (Cluster of differentiation)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
HPF	Maximální zvětšení mikroskopu (high-power field)

VI. SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ, SCHÉMAT A TABULEK

Obrázky:

Obrázek 1: Moorův dřík.....	17
Obrázek 2: Thompsonův dřík.....	17
Obrázek 3: McKee-Farrarova endoprotéza typu kov-kov.....	18
Obrázek 4: Charnleyho endoprotéza s polyetylenovou jamkou.....	19
Obrázek 5: Implantát prof. Glücka vyrobený ze slonoviny	19
Obrázek 6: Gunstonův polycentrický implantát.....	20
Obrázek 7: Endoprotéza s názvem Duopatella	21
Obrázek 8: Pokročilý otěr PE vložky TEP obou kyčlí.....	36
Obrázek 9: Opatřebená a prasklá PE vložka TEP kolene	37
Obrázek 10: Peroperační vzorky z revize TEP kyčle pro aseptické uvolnění jamky.....	37
Obrázek 11: 3D optický skener ATOS Triple Scan a princip jeho měření.....	44
Obrázek 12: Digitální rekonstrukce povrchu poškozeného při extrakci PE vložky.....	45
Obrázek 13: Určení směru opotřebení jamky	46
Obrázek 14: Určení lineárního otěru v jednotlivých osách.....	46
Obrázek 15: Vytvoření prostorového modelu k hodnocení objemového otěru	47
Obrázek 16: Kyvadlový simulátor otěru PE jamky	48
Obrázek 17: Výpočet lineárního otěru na RTG snímku.....	49
Obrázek 18: RTG snímek asepticky uvolněné jamky Bicon s její proximální migrací.....	51
Obrázek 19: Fotografie extrahované jamky	52
Obrázek 20: Pseudosynoviální membrána v okolí CoCr implantátů	74
Obrázek 21: Pseudosynoviální membrána v okolí Ti implantátů	75
Obrázek 22: Imunohistochemické barvení T lymfocytů CD3+ na membráně	76

Grafy:

Graf 1: Vývoj počtu primoimplantací TEP kyčle a kolene za rok dle Britského národního registru kloubních náhrad	14
Graf 2: Vývoj počtu primoimplantací TEP kyčle a kolene za rok dle Národního registru kloubních náhrad České republiky v letech 2003 až 2018	14
Graf 3: Procentuální zastoupení nejčastějších indikací k revizi TEP kyčle a kolene dle dat ze světových ortopedických registrů	24

Graf 4: Poměrné zastoupení nejčastějších indikací k revizi TEP kyčle a kolene dle dat z Národního registru kloubních náhrad České republiky za rok 2019.....	25
Graf 5: Porovnání koncentrací kovů v jednotlivých skupinách vzorků	64
Graf 6: Porovnání koncentrací jednotlivých kovů	65

Schémata:

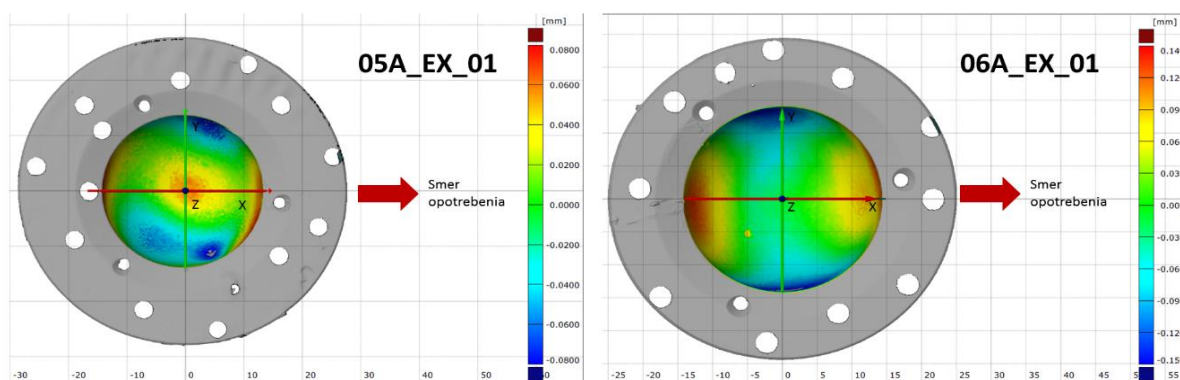
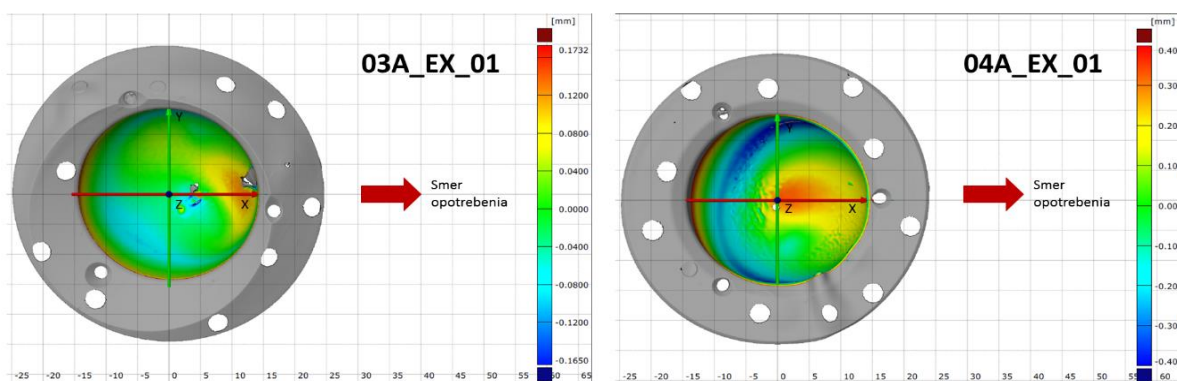
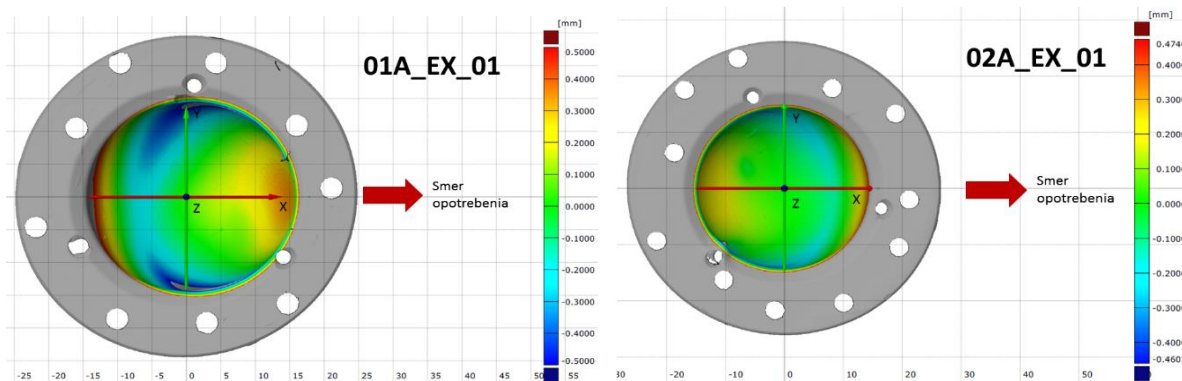
Schéma 1: Biologické efekty kovů na buněčné úrovni a indukované klinické projevy	31
Schéma 2: Algoritmus řešení alergie na kovy v ortopedii dle Christensena.....	33

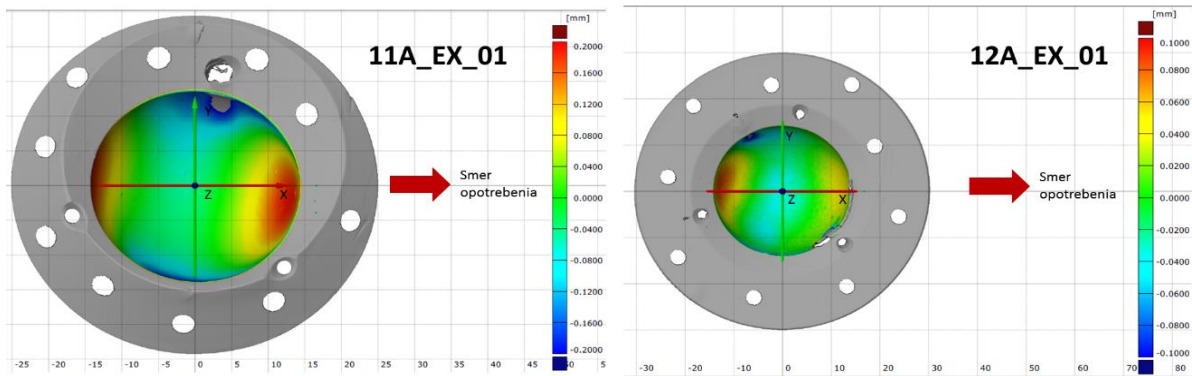
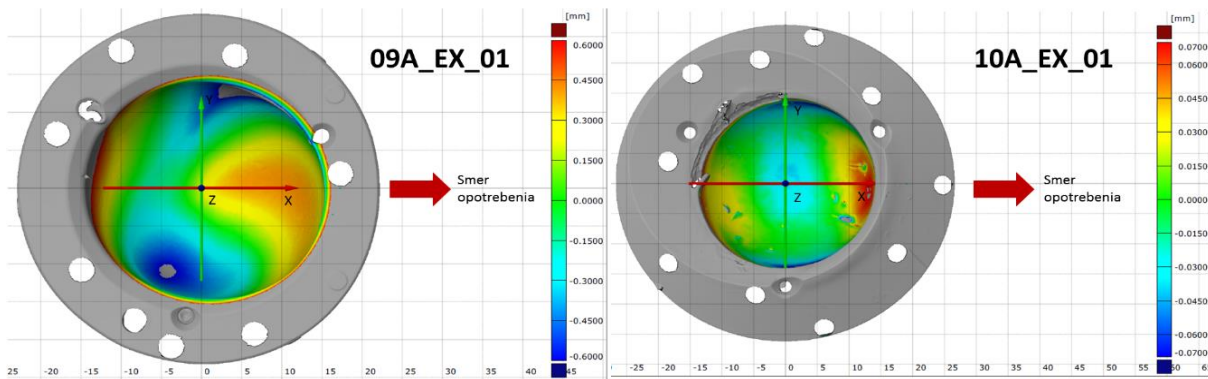
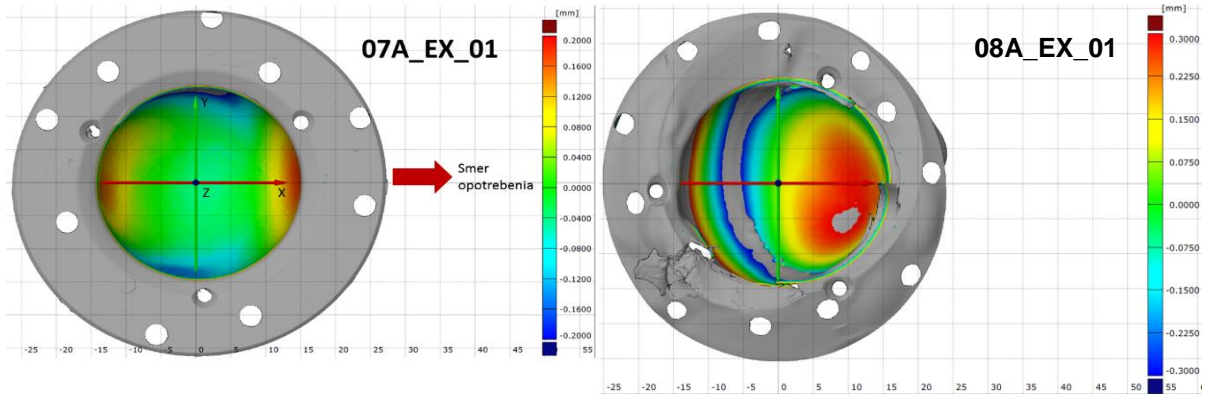
Tabulky:

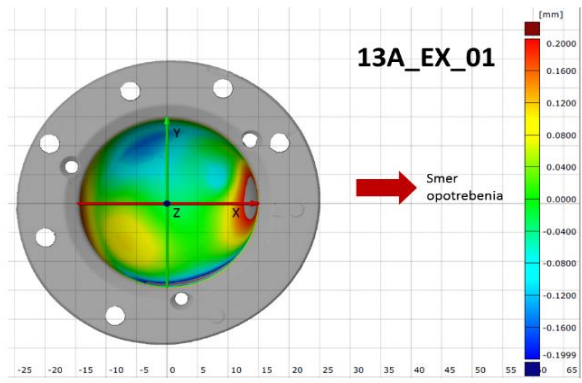
Tabulka 1: Nejčastěji používané slitiny v ortopedii a váhové zastoupení jejich složek	27
Tabulka 2: Doporučené použití materiálů dle jednotlivých příčin alergie dle Mahmooda.....	34
Tabulka 3: Stanovení koncentrace chloridu daného kovu potřebné k vyvolání toxicity s kritériem 50% poklesu viability nebo proliferace daných buněk dle Hallaba	35
Tabulka 4: Charakteristika souboru pacientů	50
Tabulka 5: Výsledky měření objemového otěru pomocí optického skeneru.	53
Tabulka 6: Porovnání hodnot naměřeného lineárního otěru pomocí optického skeneru ATOS s měřeními na RTG snímku dle Dorra	54
Tabulka 7: Klinická charakteristika sledovaného souboru a kontrol	59
Tabulka 8: Koncentrace kovů ve výpotku, periferní krvi a periprotetických tkáních u pacientů a kontrol	62
Tabulka 9: Koncentrace kovů v periprotetických tkáních v závislosti na době pobytu implantátu v těle.....	65
Tabulka 10: Charakteristika sledovaných pacientů a jejich implantátu	71
Tabulka 11: Koncentrace kovů ve vzorcích periprotetických tkání.....	73
Tabulka 12: Určení typu periprotetické membrány dle Krenna a kvantifikace jejích buněčných populací na 1 zorné pole	77

VII. DOPLŇUJÍCÍ OBRÁZKY

Obrázky naskenovaných jamek s určením vektoru opotřebení v rámci měření otěru polyetylenu pomocí ATOS skeneru (poskytl ing. Matuš Ranuša, VUT Brno).







VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akil, S., J. M. Newman, N. V. Shah, N. Ahmed, A. J. Deshmukh and A. V. Maheshwari (2018). "Metal hypersensitivity in total hip and knee arthroplasty: Current concepts." J Clin Orthop Trauma **9**(1): 3-6.
- Amanatullah, D. F., M. G. Sucher, G. F. Bonadurer, 3rd, G. C. Pereira and M. J. Taunton (2016). "Metal in Total Hip Arthroplasty: Wear Particles, Biology, and Diagnosis." Orthopedics **39**(6): 371-379.
- Amis, A. A. (1996). "Is polyethylene still the best prosthetic bearing surface?" J Bone Joint Surg Br **78**(3): 345-348.
- Angadji, A., M. Royle, S. N. Collins and J. C. Shelton (2009). "Influence of cup orientation on the wear performance of metal-on-metal hip replacements." Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine **223**(4): 449-457.
- Bills, P., L. Blunt and X. Jiang (2007). "Development of a technique for accurately determining clinical wear in explanted total hip replacements." Wear **263**(7): 1133-1137.
- Bozic, K. J., S. Kurtz, E. Lau, K. Ong, V. Chiu, T. P. Vail, H. E. Rubash and D. J. Berry (2009). "The epidemiology of bearing surface usage in total hip arthroplasty in the United States." J Bone Joint Surg Am **91**(7): 1614-1620.
- Bradberry, S. M., J. M. Wilkinson and R. E. Ferner (2014). "Systemic toxicity related to metal hip prostheses." Clin Toxicol (Phila) **52**(8): 837-847.
- Brand, R. A., M. A. Mont and M. M. Manring (2011). "Biographical sketch: Themistocles Gluck (1853-1942)." Clinical orthopaedics and related research **469**(6): 1525-1527.
- Brown, S. R., W. A. Davies, D. H. DeHeer and A. B. Swanson (2002). "Long-term survival of McKee-Farrar total hip prostheses." Clin Orthop Relat Res(402): 157-163.
- Campbell, P., E. Ebramzadeh, S. Nelson, K. Takamura, K. De Smet and H. C. Amstutz (2010). "Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips." Clin Orthop Relat Res **468**(9): 2321-2327.
- Campbell, P. A., M. S. Kung, A. R. Hsu and J. J. Jacobs (2014). "Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions?" Clin Orthop Relat Res **472**(12): 3718-3727.
- Campbell, R. E. and R. H. Rothman (1971). "Charnley low-friction total hip replacement." Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med **113**(4): 634-641.

- Catalani, S., M. C. Rizzetti, A. Padovani and P. Apostoli (2012). "Neurotoxicity of cobalt." Hum Exp Toxicol **31**(5): 421-437.
- Conner-Spady, B. L., E. Bohm, L. Loucks, M. J. Dunbar, D. A. Marshall and T. W. Noseworthy (2020). "Patient expectations and satisfaction 6 and 12 months following total hip and knee replacement." Qual Life Res **29**(3): 705-719.
- Coventry, M. B. (1987). "Evolution of hip joint replacement." Current Orthopaedics **1**(3): 290-296.
- Cuckler, J. M. (2005). "The rationale for metal-on-metal total hip arthroplasty." Clin Orthop Relat Res **441**: 132-136.
- Čech, O. (1974). "Totální endoprotéza kyčelního kloubu Poldi." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **41**(3): 193-203.
- Daley, B., A. T. Doherty, B. Fairman and C. P. Case (2004). "Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture." J Bone Joint Surg Br **86**(4): 598-606.
- Danielsson, L. (1965). "ARTHROPLASTY OF THE HIP ACCORDING TO THOMPSON AND MOORE." Acta Orthop Scand **35**: 348-357.
- De Haan, R., C. Pattyn, H. S. Gill, D. W. Murray, P. A. Campbell and K. De Smet (2008). "Correlation between inclination of the acetabular component and metal ion levels in metal-on-metal hip resurfacing replacement." J Bone Joint Surg Br **90**(10): 1291-1297.
- de Villiers, D., A. Traynor, S. N. Collins and J. C. Shelton (2015). "The increase in cobalt release in metal-on-polyethylene hip bearings in tests with third body abrasives." Proc Inst Mech Eng H **229**(9): 611-618.
- Denk, F., P. Vavřík and V. Rybka (1988). "Konstrukce, výroba a vývoj kondylární náhrady kolenního kloubu "Motorlet"." Časopis lékařů českých **127**(37/38): 1160-1164.
- Dickel, H., P. Altmeyer and J. Brasch (2011). "“New” techniques for more sensitive patch testing?" **9**(11): 889-896.
- Dobbs, H. S. and M. J. Minski (1980). "Metal ion release after total hip replacement." Biomaterials **1**(4): 193-198.
- Dorr, L. D. and Z. Wan (1995). "Ten years of experience with porous acetabular components for revision surgery." Clin Orthop Relat Res(319): 191-200.
- Dowson, D. (2008). 18 - Hip replacement: tribological principles, materials and engineering. Joint Replacement Technology. P. A. Revell, Woodhead Publishing: 431-461.

- Dumbleton, J. H., M. T. Manley and A. A. Edidin (2002). "A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty." J Arthroplasty **17**(5): 649-661.
- Dungl, P., R. Pavlanský and A. Podškubka (1982). "Naše zkušenosti s aloplastikou kolenního kloubu." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **49**(1): 49-62.
- Ekman, E., I. Laaksonen, A. Eskelinen, P. Pulkkinen, E. Pukkala and K. Makela (2018). "Midterm risk of cancer with metal-on-metal hip replacements not increased in a Finnish population." Acta Orthop **89**(5): 575-579.
- Evans, E. M., M. A. Freeman, A. J. Miller and B. Vernon-Roberts (1974). "Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement." J Bone Joint Surg Br **56-b**(4): 626-642.
- Fehring, K. A. and T. K. Fehring (2015). "Modes of failure in metal-on-metal total hip arthroplasty." Orthop Clin North Am **46**(2): 185-192.
- Fehring, T. K., J. L. Carter, K. A. Fehring, S. M. Odum and W. L. Griffin (2015). "Cobalt to Chromium Ratio is Not a Key Marker for Adverse Local Tissue Reaction (ALTR) in Metal on Metal Hips." J Arthroplasty **30**(9 Suppl): 107-109.
- Ferguson, R. J., A. J. Palmer, A. Taylor, M. L. Porter, H. Malchau and S. Glyn-Jones (2018). "Hip replacement." Lancet **392**(10158): 1662-1671.
- Friesenbichler, J., W. Maurer-Ertl, P. Sadoghi, T. Lovse, R. Windhager and A. Leithner (2012). "Serum metal ion levels after rotating-hinge knee arthroplasty: comparison between a standard device and a megaprosthesis." Int Orthop **36**(3): 539-544.
- Fritz, J., B. Fritz, G. K. Thawait, E. Raithel, W. D. Gilson, M. Nittka and M. A. Mont (2016). "Advanced metal artifact reduction MRI of metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty implants: compressed sensing acceleration enables the time-neutral use of SEMAC." Skeletal Radiol **45**(10): 1345-1356.
- Fulín, P., D. Pokorný, M. Šlouf, M. Nevoralová, T. Vacková, J. Dybal and J. Pilař (2014). "Quantification of structural changes of UHMWPE components in total joint replacements." BMC Musculoskeletal Disorders **15**(1): 109.
- Fulín, P., D. Pokorný, M. Šlouf, T. Vacková, J. Dybal and A. Sosna (2014). "Vliv sterilizace formaldehydem, gama zářením a etylenoxidem na vlastnosti polyetylenových komponent kloubních náhrad." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **81**(1): 33-39.
- Fulín, P., M. Šlouf, H. Vlková, S. Krejčíková, J. Kredatusová and D. Pokorný (2019). "Porovnání kvality nejčastěji používaných nových UHMWPE artikulačních vložek

- náhrady kyčelního kloubu." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **86**(2): 101-109.
- Gallo, J., S. B. Goodman, Y. T. Konttinen and M. Raska (2013). "Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty." Innate Immun **19**(2): 213-224.
- Gallo, J., M. Hartl, M. Vrbka, T. Návrat and I. Křupka (2013). "Co by měl vědět ortoped o biotribologii totální endoprotézy kyčelního kloubu." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **80**(6): 377-385.
- Gallo, J. and M. Kamínek (2011). "Předoperační diagnostika infekcí kloubních náhrad." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **78**(6): 510-518.
- Gallo, J., V. Havranek, J. Zapletalová and D. Mandát (2006). "Měření otěru polyetylenových jamek TEP kyčelního kloubu univerzálním měřicím mikroskopem. Charakteristika měření." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **73**(1): 28-33.
- Gallo, J., I. Landor and P. Vavřík (2006). "Současné možnosti prevence infekcí kloubních náhrad." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **73**(4): 229-236.
- Gao, X., R. X. He, S. G. Yan and L. D. Wu (2011). "Dermatitis associated with chromium following total knee arthroplasty." J Arthroplasty **26**(4): 665 e613-666.
- Garbuz, D. S., B. A. Hargreaves, C. P. Duncan, B. A. Masri, D. R. Wilson, B. B. J. C. O. Forster and R. Research® (2014). "The John Charnley Award: Diagnostic Accuracy of MRI Versus Ultrasound for Detecting Pseudotumors in Asymptomatic Metal-on-Metal THA." **472**(2): 417-423.
- Gibon, E., D. F. Amanatullah, F. Loi, J. Pajarinen, A. Nabeshima, Z. Yao, M. Hamadouche and S. B. Goodman (2017). "The biological response to orthopaedic implants for joint replacement: Part I: Metals." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **105**(7): 2162-2173.
- Gibon, E., L. A. Cordova, L. Lu, T. H. Lin, Z. Yao, M. Hamadouche and S. B. Goodman (2017). "The biological response to orthopedic implants for joint replacement. II: Polyethylene, ceramics, PMMA, and the foreign body reaction." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **105**(6): 1685-1691.
- Gogna, P., P. Paladini, G. Merolla, C. A. Augusti, F. Maddalena and G. Porcellini (2016). "Metallosis in shoulder arthroplasty: an integrative review of literature." Musculoskelet Surg **100**(Suppl 1): 3-11.
- Goodman, S. B. (2007). "Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system." Biomaterials **28**(34): 5044-5048.

- Grammatopoulos, G., M. Munemoto, A. Pollalis and N. A. Athanasou (2017). "Correlation of serum metal ion levels with pathological changes of ARMD in failed metal-on-metal-hip-resurfacing arthroplasties." Arch Orthop Trauma Surg **137**(8): 1129-1137.
- Granchi, D., E. Cenni, A. Giunti and N. Baldini (2012). "Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review." J Bone Joint Surg Br **94**(8): 1126-1134.
- Granchi, D., E. Cenni, D. Tigani, G. Trisolino, N. Baldini and A. Giunti (2008). "Sensitivity to implant materials in patients with total knee arthroplasties." Biomaterials **29**(10): 1494-1500.
- Granchi, D., E. Cenni, G. Trisolino, A. Giunti and N. Baldini (2006). "Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **77**(2): 257-264.
- Gunston, F. H. (1971). "Polycentric knee arthroplasty. Prosthetic simulation of normal knee movement." J Bone Joint Surg Br **53**(2): 272-277.
- Gustafson, K., S. S. Jakobsen, N. D. Lorenzen, J. P. Thyssen, J. D. Johansen, C. M. Bonefeld, M. Stilling, T. Baad-Hansen and K. Soballe (2014). "Metal release and metal allergy after total hip replacement with resurfacing versus conventional hybrid prosthesis." Acta Orthop **85**(4): 348-354.
- Hallab, N., K. Merritt and J. J. Jacobs (2001). "Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants." J Bone Joint Surg Am **83-A**(3): 428-436.
- Hallab, N. J. (2016). "Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris." Spine (Phila Pa 1976) **41 Suppl 7**: S30-31.
- Hallab, N. J., S. Anderson, M. Caicedo, A. Brasher, K. Mikecz and J. J. Jacobs (2005). "Effects of soluble metals on human peri-implant cells." J Biomed Mater Res A **74**(1): 124-140.
- Hallab, N. J. and J. J. Jacobs (2009). "Biologic effects of implant debris." Bull NYU Hosp Jt Dis **67**(2): 182-188.
- Hallab, N. J., C. Vermes, C. Messina, K. A. Roebuck, T. T. Glant and J. J. Jacobs (2002). "Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts." J Biomed Mater Res **60**(3): 420-433.
- Harrington, K., E. Phelan, W. C. Torreggiani and O. Doody (2016). "The Management of the Symptomatic Patient With a Metal-on-Metal Hip Prosthesis." Can Assoc Radiol J **67**(1): 76-81.

- Harris, W. H. (1994). "Osteolysis and particle disease in hip replacement. A review." Acta Orthop Scand **65**(1): 113-123.
- Hartmann, A., F. Hannemann, J. Lutzner, A. Seidler, H. Drexler, K. P. Gunther and J. Schmitt (2013). "Metal ion concentrations in body fluids after implantation of hip replacements with metal-on-metal bearing--systematic review of clinical and epidemiological studies." PLoS One **8**(8): e70359.
- Hasegawa, M., K. Yoshida, H. Wakabayashi and A. Sudo (2012). "Cobalt and chromium ion release after large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty." J Arthroplasty **27**(6): 990-996.
- Hobza, M., Gallo, J. (2020). "Klinické aspekty dlouhodobé přítomnosti kloubní náhrady v lidském těle: zátěž kovy." Ortopedie **14**(1): 23-28.
- Hopf, F., P. Thomas, S. Sesselmann, M. N. Thomsen, M. Hopf, J. Hopf, M. G. Krukemeyer, H. Resch and V. Krenn (2017). "CD3+ lymphocytosis in the peri-implant membrane of 222 loosened joint endoprostheses depends on the tribological pairing." Acta Orthop **88**(6): 642-648.
- Hunt, L. P., A. W. Blom, G. S. Matharu, M. L. Porter and M. R. Whitehouse (2018). "The risk of developing cancer following metal-on-metal hip replacement compared with non metal-on-metal hip bearings: Findings from a prospective national registry "The National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man". " PLoS One **13**(9): e0204356.
- Hussenbocus, S., D. Kosuge, L. Solomon, D. Howie and R. Hashemi (2015). "Head-Neck Taper Corrosion in Hip Arthroplasty." BioMed Research International **2015**: 1-9.
- Charnley, J. (1960). "Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur." J Bone Joint Surg Br **42-b**: 28-30.
- Charnley, J. (1961). "Arthroplasty of the hip. A new operation." Lancet **1**(7187): 1129-1132.
- Charnley, J. and N. Eftekhari (1969). "Postoperative infection in total prosthetic replacement arthroplasty of the hip-joint. With special reference to the bacterial content of the air of the operating room." Br J Surg **56**(9): 641-649.
- Charnley, J. and D. K. Halley (1975). "Rate of wear in total hip replacement." Clin Orthop Relat Res(112): 170-179.
- Cheung, A. C., S. Banerjee, J. J. Cherian, F. Wong, J. Butany, C. Gilbert, C. Overgaard, K. Syed, M. G. Zywiell, J. J. Jacobs and M. A. Mont (2016). "Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 - history, mechanism, measurements, and pathophysiology." Bone Joint J **98-b**(1): 6-13.

- Christensen, T. J., S. A. Samant and A. Y. Shin (2017). "Making Sense of Metal Allergy and Hypersensitivity to Metallic Implants in Relation to Hand Surgery." J Hand Surg Am **42**(9): 737-746.
- Christian, W. V., L. D. Oliver, D. J. Paustenbach, M. L. Kreider and B. L. Finley (2014). "Toxicology-based cancer causation analysis of CoCr-containing hip implants: a quantitative assessment of genotoxicity and tumorigenicity studies." J Appl Toxicol **34**(9): 939-967.
- Jacobs, J. J., A. K. Skipor, L. M. Patterson, N. J. Hallab, W. G. Paprosky, J. Black and J. O. Galante (1998). "Metal Release in Patients Who Have Had a Primary Total Hip Arthroplasty. A Prospective, Controlled, Longitudinal Study*." JBJS **80**(10): 1447-1458.
- Jahoda, D., I. Landor, A. Sosna, P. Vavřík and D. Pokorný (2000). "Infekce kloubních náhrad." Sanquis : odborný a společenský časopis pro lékaře(8): 18-22.
- Jahoda, D., O. Nyč, D. Pokorný, I. Landor and A. Sosna (2006). "Antibiotika v prevenci infekčních komplikací u operací kloubních náhrad." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **73**(2): 108-114.
- Jahoda, D., J. Tomaidēs, P. Vavřík, I. Landor, A. Sosna and D. Pokorný (2005). "Sedmileté klinické zkušenosti s náhradou kolenního kloubu SVL / Beznoska." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **72**(5): 277-281.
- Kang, J. S., S. R. Park, E. Ebrahimzadeh and L. D. Dorr (2003). "Measurement of polyethylene wear in total hip arthroplasty--accuracy versus ease of use." Yonsei Med J **44**(3): 473-478.
- Kapadia, B. H., R. A. Berg, J. A. Daley, J. Fritz, A. Bhave and M. A. Mont (2016). "Periprosthetic joint infection." Lancet **387**(10016): 386-394.
- Karov, J., A. Sinclair and I. Hinberg (2002). "Repassivation of a high chromium stainless steel orthopaedic alloy." Biomed Mater Eng **12**(4): 375-386.
- Keegan, G. M., I. D. Learmonth and C. P. Case (2007). "Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies." J Bone Joint Surg Br **89**(5): 567-573.
- Kleman, L. T., A. Bala, C. T. Penrose, T. M. Seyler, S. S. Wellman and M. P. Bolognesi (2018). "Comparison of Postoperative Complications Following Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty With Other Hip Bearings in Medicare Population." J Arthroplasty **33**(6): 1826-1832.

- Kolatat, K., G. Perino, G. Wilner, E. Kaplowitz, B. F. Ricciardi, F. Boettner, G. H. Westrich, S. A. Jerabek, S. R. Goldring and P. E. Purdue (2015). "Adverse local tissue reaction (ALTR) associated with corrosion products in metal-on-metal and dual modular neck total hip replacements is associated with upregulation of interferon gamma-mediated chemokine signaling." J Orthop Res **33**(10): 1487-1497.
- Krenn, V., L. Morawietz, G. Perino, H. Kienapfel, R. Ascherl, G. J. Hassenpflug, M. Thomsen, P. Thomas, M. Huber, D. Kendoff, D. Baumhoer, M. G. Krukemeyer, S. Natu, F. Boettner, J. Zustin, B. Kolbel, W. Ruther, J. P. Kretzer, A. Tiemann, A. Trampuz, L. Frommelt, R. Tichilow, S. Soder, S. Muller, J. Parvizi, U. Illgner and T. Gehrke (2014). "Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology." Pathol Res Pract **210**(12): 779-786.
- Kuba, M., J. Gallo, T. Pluhacek, M. Hobza and D. Milde (2019). "Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **107**(2): 454-462.
- Kurtz, S. M., H. A. Gawel and J. D. Patel (2011). "History and systematic review of wear and osteolysis outcomes for first-generation highly crosslinked polyethylene." Clin Orthop Relat Res **469**(8): 2262-2277.
- Lachiewicz, P. F., T. S. Watters and J. J. Jacobs (2016). "Metal Hypersensitivity and Total Knee Arthroplasty." The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons **24**(2): 106-112.
- Lehtovirta, L., A. Reito, J. Parkkinen, S. Peräniemi, J. Vepsäläinen and A. Eskelinen (2018). "Association between periprosthetic tissue metal content, whole blood and synovial fluid metal ion levels and histopathological findings in patients with failed metal-on-metal hip replacement." PloS one **13**(5): e0197614-e0197614.
- Levasic, V., I. Milosev and V. Zadnik (2018). "Risk of cancer after primary total hip replacement: The influence of bearings, cementation and the material of the stem." Acta Orthop **89**(2): 234-239.
- Levine, B. R., A. R. Hsu, A. K. Skipor, N. J. Hallab, W. G. Paprosky, J. O. Galante and J. J. Jacobs (2013). "Ten-year outcome of serum metal ion levels after primary total hip arthroplasty: a concise follow-up of a previous report*." J Bone Joint Surg Am **95**(6): 512-518.
- Leysens, L., B. Vinck, C. Van Der Straeten, F. Wuyts and L. Maes (2017). "Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects." Toxicology **387**: 43-56.

- Li, Z., Z. F. Chen, J. X. Liu and F. Liu (2018). "Comparative Mid-term Follow-up Study of Primary Total Hip Arthroplasty with Metal-on-metal and Metal-on-polyethylene Bearings." Orthopaedic Surgery **10**(4): 312-320.
- Liao, Y., E. Hoffman, M. Wimmer, A. Fischer, J. Jacobs and L. Marks (2013). "CoCrMo metal-on-metal hip replacements." Phys Chem Chem Phys **15**(3): 746-756.
- Lindgren, K., M. B. Anderson, C. L. Peters, C. E. Pelt and J. M. Gililland (2016). "The Prevalence of Positive Findings on Metal Artifact Reduction Sequence Magnetic Resonance Imaging in Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty." J Arthroplasty **31**(7): 1519-1523.
- Liu, T. K., S. H. Liu, C. H. Chang and R. S. Yang (1998). "Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty." Tohoku J Exp Med **185**(4): 253-262.
- Lohmann, C. H., R. Hameister and G. Singh (2017). "Allergies in orthopaedic and trauma surgery." Orthop Traumatol Surg Res **103**(1S): S75-S81.
- Lohmann, C. H., H. Meyer, J. V. Nuechtern, G. Singh, S. Junk-Jantsch, H. Schmotzer, M. M. Morlock and G. Pfluger (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." J Bone Joint Surg Am **95**(17): 1561-1568.
- Lochner, K., A. Fritsche, A. Jonitz, D. Hansmann, P. Mueller, B. Mueller-Hilke and R. Bader (2011). "The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles." Int J Mol Med **28**(6): 1055-1063.
- Magone, K., D. Luckenbill and T. Goswami (2015). "Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis." Arch Orthop Trauma Surg **135**(5): 683-695.
- Mahendra, G., H. Pandit, K. Kliskey, D. Murray, H. S. Gill and N. Athanasou (2009). "Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties." Acta Orthopaedica **80**(6): 653-659.
- Mahmood, B. and W. C. Hammert (2015). "Metal implant allergy." J Hand Surg Am **40**(4): 831-833; quiz 834.
- Makela, K. T., M. Matilainen, P. Pulkkinen, A. M. Fenstad, L. Havelin, L. Engesaeter, O. Furnes, A. B. Pedersen, S. Overgaard, J. Karrholm, H. Malchau, G. Garellick, J. Ranstam and A. Eskelinen (2014). "Failure rate of cemented and uncemented total hip replacements: register study of combined Nordic database of four nations." Bmj **348**: f7592.

- Matusiewicz, H. (2014). "Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: from ions to nanoparticles--a systematic analytical review." Acta Biomater **10**(6): 2379-2403.
- McCalden, R. W., D. D. Naudie, X. Yuan and R. B. Bourne (2005). "Radiographic methods for the assessment of polyethylene wear after total hip arthroplasty." J Bone Joint Surg Am **87**(10): 2323-2334.
- McKellop, H. A. (2007). "The lexicon of polyethylene wear in artificial joints." Biomaterials **28**(34): 5049-5057.
- Meng, Q., F. Liu, J. Fisher and Z. Jin (2013). "Effect of simplifications of bone and components inclination on the elastohydrodynamic lubrication modeling of metal-on-metal hip resurfacing prosthesis." Proc Inst Mech Eng H **227**(5): 523-534.
- Middleton, S. and A. Toms (2016). "Allergy in total knee arthroplasty: a review of the facts." Bone Joint J **98-B**(4): 437-441.
- Mistry, J. B., M. Chughtai, R. K. Elmallah, A. Diedrich, S. Le, M. Thomas and M. A. Mont (2016). "Trunnionosis in total hip arthroplasty: a review." Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology **17**(1): 1-6.
- Morawietz, L., R. A. Classen, J. H. Schroder, C. Dynybil, C. Perka, A. Skwara, J. Neidel, T. Gehrke, L. Frommelt, T. Hansen, M. Otto, B. Barden, T. Aigner, P. Stiehl, T. Schubert, C. Meyer-Scholten, A. Konig, P. Strobel, C. P. Rader, S. Kirschner, F. Lintner, W. Ruther, I. Bos, C. Hendrich, J. Kriegsmann and V. Krenn (2006). "Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane." J Clin Pathol **59**(6): 591-597.
- Moro, T., K. Ishihara, Y. Takatori, S. Tanaka, M. Kyomoto, M. Hashimoto, H. Ishikura, R. Hidaka, T. Tanaka, H. Kawaguchi and K. Nakamura (2019). "Effects of a roughened femoral head and the locus of grafting on the wear resistance of the phospholipid polymer-grafted acetabular liner." Acta Biomater **86**: 338-349.
- Moroni, A., L. Savarino, M. Hoque, M. Cadossi and N. Baldini (2011). "Do ion levels in hip resurfacing differ from metal-on-metal THA at midterm?" Clin Orthop Relat Res **469**(1): 180-187.
- Musil, D., M. Balejová, M. Horníková, A. Chrdle, N. Mallátová, O. Nyč, V. Chmelík, J. Gallo, D. Jahoda and J. Stehlík (2017). "Infekce endoprotéz – doporučení antibiotické léčby Společné doporučení České společnosti pro ortopedii a traumatologii a

- Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **84**(3): 219-230.
- Natu, S., R. P. Sidaginamale, J. Gandhi, D. J. Langton and A. V. Nargol (2012). "Adverse reactions to metal debris: histopathological features of periprosthetic soft tissue reactions seen in association with failed metal on metal hip arthroplasties." J Clin Pathol **65**(5): 409-418.
- Ng, V. Y., A. V. Lombardi, Jr., K. R. Berend, M. D. Skeels and J. B. Adams (2011). "Perivascular lymphocytic infiltration is not limited to metal-on-metal bearings." Clin Orthop Relat Res **469**(2): 523-529.
- Onega, T., J. Baron and T. MacKenzie (2006). "Cancer after total joint arthroplasty: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(8): 1532-1537.
- Palousek, D., M. Omasta, D. Koutny, J. Bednar, T. Koutecky and F. Dokoupil (2015). "Effect of matte coating on 3D optical measurement accuracy." Optical Materials **40**: 1-9.
- Parvizi, J., T. L. Tan, K. Goswami, C. Higuera, C. Della Valle, A. F. Chen and N. Shohat (2018). "The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria." J Arthroplasty **33**(5): 1309-1314.e1302.
- Paustenbach, D. J., B. E. Tvermoes, K. M. Unice, B. L. Finley and B. D. Kerger (2013). "A review of the health hazards posed by cobalt." Crit Rev Toxicol **43**(4): 316-362.
- Pechancová, R., T. Pluháček, J. Gallo and D. Milde (2018). "Study of chromium species release from metal implants in blood and joint effusion: Utilization of HPLC-ICP-MS." Talanta : the international journal of pure and applied analytical chemistry **185**(-): 370-377.
- Perino, G., S. Sunitsch, M. Huber, D. Ramirez, J. Gallo, J. Vaculova, S. Natu, J. P. Kretzer, S. Muller, P. Thomas, M. Thomsen, M. G. Krukemeyer, H. Resch, T. Huggle, W. Waldstein, F. Boettner, T. Gehrke, S. Sesselmann, W. Ruther, Z. Xia, E. Purdue and V. Krenn (2018). "Diagnostic guidelines for the histological particle algorithm in the periprosthetic neo-synovial tissue." BMC Clin Pathol **18**: 7.
- Peters, R. M., P. Willemse, P. C. Rijk, M. Hoogendoorn and W. P. Zijlstra (2017). "Fatal Cobalt Toxicity after a Non-Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty." Case Rep Orthop **2017**: 9123684.
- Pivec, R., R. M. Meneghini, W. J. Hozack, G. H. Westrich and M. A. Mont (2014). "Modular taper junction corrosion and failure: how to approach a recalled total hip arthroplasty implant." J Arthroplasty **29**(1): 1-6.

- Pochmon, M., T. Rossler, D. Mandat, J. Gallo and M. Hrabovsky (2007). "Verification of abrasion measurement of juncture implants using Fourier profilometry." Proc SPIE **6609**.
- Pokorný, D., M. Šlouf and P. Fulín (2012). "Současné poznatky o vlivu technologie výroby a sterilizace na strukturu, vlastnosti a životnost UHMWPE v kloubních náhradách." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **79**(3): 213-221.
- Pritchett, J. W. (2012). "Adverse reaction to metal debris: metallosis of the resurfaced hip." **23**(1): 50-58.
- Ranawat, C. S. (2002). "History of total knee replacement." J South Orthop Assoc **11**(4): 218-226.
- Ranuša, M., J. Gallo, M. Vrbka, M. Hobza, D. Paloušek, I. Křupka and M. Hartl (2016). "Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner." Tribology Transactions **74**: 00-00.
- Robinson, R. P. (2005). "The Early Innovators of Today's Resurfacing Condylar Knees." The Journal of Arthroplasty **20**: 2-26.
- Rooker, G. D. and J. D. Wilkinson (1980). "Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement. A prospective study." J Bone Joint Surg Br **62-B**(4): 502-505.
- Rossler, T., D. Mandat, J. Gallo, M. Hrabovsky, M. Pochmon and V. Havranek (2009). "Optical 3D methods for measurement of prosthetic wear of total hip arthroplasty: principles, verification and results." Opt Express **17**(15): 12723-12730.
- Rybka, V. and P. Vavřík (1983). "Zkušenosti s anatomickou totální náhradou kolenního kloubu podle Townleye." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **50**(4): 322-336.
- Rybka, V., P. Vavřík, I. Landor, J. Valenta, M. Valešová and K. Trnavský (1988). "Zkušenosti s kondylární náhradou kolenního kloubu Walter-Motorlet." Časopis lékařů českých **127**(37/38): 1185-1189.
- Sadoghi, P., M. Liebensteiner, M. Agreiter, A. Leithner, N. Bohler and G. Labek (2013). "Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers." J Arthroplasty **28**(8): 1329-1332.
- Salib, C. G., E. A. Lewallen, C. R. Paradise, M. E. Tibbo, J. X. Robin, W. H. Trousdale, L. M. Morrey, J. Xiao, T. W. Turner, A. K. Limberg, A. G. Jay, R. Thaler, A. Dudakovic, J. Sanchez-Sotelo, M. E. Morrey, D. J. Berry, D. G. Lewallen, A. J. van Wijnen and M. P. Abdel (2019). "Molecular pathology of adverse local tissue reaction caused by metal-on-metal implants defined by RNA-seq." Genomics **111**(6): 1404-1411.

- Sargeant, A., T. Goswami and M. Swank (2006). "Ion concentrations from hip implants." J Surg Orthop Adv **15**(2): 113-114.
- Sarmiento-Gonzalez, A., J. M. Marchante-Gayon, J. M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jimenez and A. Sanz-Medel (2008). "High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis." Anal Bioanal Chem **391**(7): 2583-2589.
- Schaal, T., T. Schoenfelder, J. Klewer and J. Kugler (2016). "Determinants of patient satisfaction and their willingness to return after primary total hip replacement: a cross-sectional study." BMC Musculoskelet Disord **17**: 330.
- Schafer, T., E. Bohler, S. Ruhdorfer, L. Weigl, D. Wessner, B. Filipiak, H. E. Wichmann and J. Ring (2001). "Epidemiology of contact allergy in adults." Allergy **56**(12): 1192-1196.
- Scharf, B., C. C. Clement, V. Zolla, G. Perino, B. Yan, S. G. Elci, E. Purdue, S. Goldring, F. Macaluso, N. Cobelli, R. W. Vachet and L. Santambrogio (2014). "Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity." Sci Rep **4**: 5729.
- Singh, G., R. Klassen, J. Howard, D. Naudie, M. Teeter and B. Lanting (2018). "Manufacturing, oxidation, mechanical properties and clinical performance of highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty." Hip Int **28**(6): 573-583.
- Skoldenberg, O., A. Rysinska, T. Eisler, M. Salemyr, H. Boden and O. Muren (2016). "Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." BMC Musculoskelet Disord **17**: 174.
- Sonntag, R., J. Reinders and J. P. Kretzer (2012). "What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement." Acta Biomaterialia **8**(7): 2434-2441.
- Sultan, A. A., W. A. Cantrell, A. Khlopas, R. J. Berger, N. Sodhi, R. M. Molloy, V. E. Krebs and M. A. Mont (2018). "Evidence-Based Management of Trunnionosis in Metal-on-Polyethylene Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review." J Arthroplasty **33**(10): 3343-3353.
- Tauriainen, T. J. T., T. T. Niinimäki, J. L. Niinimäki, T. O. P. Nousiainen and J. I. Leppilähti (2017). "Poor Acetabular Component Orientation Increases Revision Risk in Metal-on-Metal Hip Arthroplasty." J Arthroplasty **32**(7): 2204-2207.
- Thomas, P. and B. Summer (2017). "Implant allergy." Allergol Select **1**(1): 59-64.
- Thomas, P., C. von der Helm, C. Schopf, F. Mazoochian, L. Frommelt, H. Gollwitzer, J. Schneider, M. Flaig, V. Krenn, B. Thomas and B. Summer (2015). "Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy

- diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern." Biomed Res Int **2015**: 910156.
- Thyssen, J. P. and T. Menne (2010). "Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications." Chem Res Toxicol **23**(2): 309-318.
- Vasudevan, A., E. F. DiCarlo, T. Wright, D. Chen, M. P. Figgie, S. R. Goldring and L. A. Mandl (2012). "Cellular response to prosthetic wear debris differs in patients with and without rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **64**(4): 1005-1014.
- Vavřík, P., I. Landor, J. Tomaides and S. Popelka (2009). "Střednědobé výsledky u náhrad kolenního kloubu Medin Modular." Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca **76**(1): 30-34.
- Visuri, T., P. Pulkkinen, P. Paavolainen and E. Pukkala (2010). "Cancer risk is not increased after conventional hip arthroplasty." Acta Orthop **81**(1): 77-81.
- Voleti, P. B., K. D. Baldwin and G. C. Lee (2012). "Metal-on-metal vs conventional total hip arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." J Arthroplasty **27**(10): 1844-1849.
- von Domarus, C., J. P. Rosenberg, W. Ruther and J. Zustin (2011). "Necrobiosis and T-lymphocyte infiltration in retrieved aseptically loosened metal-on-polyethylene arthroplasties." Acta Orthop **82**(5): 596-601.
- Vrbka, M., D. Nečas, M. Hartl, I. Krupka, F. Urban and J. Gallo (2015). "Visualization of lubricating films between artificial head and cup with respect to real geometry." Biotribology **1-2**: 61-65.
- Wang, Q., F. Eltit, D. Garbuz, C. Duncan, B. Masri, N. Greidanus and R. Wang (2019). "CoCrMo metal release in metal-on-highly crosslinked polyethylene hip implants." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.
- Wiley, K. F., K. Ding, J. A. Stoner, D. C. Teague and K. M. Yousuf (2013). "Incidence of pseudotumor and acute lymphocytic vasculitis associated lesion (ALVAL) reactions in metal-on-metal hip articulations: a meta-analysis." J Arthroplasty **28**(7): 1238-1245.
- Willert, H. G., G. H. Buchhorn, A. Fayyazi, R. Flury, M. Windler, G. Koster and C. H. Lohmann (2005). "Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study." J Bone Joint Surg Am **87**(1): 28-36.
- Willert, H. G., J. Ludwig and M. Semlitsch (1974). "Reaction of bone to methacrylate after hip arthroplasty: a long-term gross, light microscopic, and scanning electron microscopic study." J Bone Joint Surg Am **56**(7): 1368-1382.

- Willert, H. G. and M. Semlitsch (1977). "Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses." J Biomed Mater Res **11**(2): 157-164.
- Witt, J. D. and M. Swann (1991). "Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements." J Bone Joint Surg Br **73**(4): 559-563.
- Xing, S., J. P. Santerre, R. S. Labow and E. L. Boynton (2002). "The effect of polyethylene particle phagocytosis on the viability of mature human macrophages." J Biomed Mater Res **61**(4): 619-627.
- Zeman, J., M. Ranusa, M. Vrbka, J. Gallo, I. Krupka and M. Hartl (2018). "UHMWPE acetabular cup creep deformation during the run-in phase of THA's life cycle." J Mech Behav Biomed Mater **87**: 30-39.
- Zhang, Y., J. Wang, P. Wang, X. Fan, X. Li, J. Fu, S. Li, H. Fan and Z. Guo (2013). "Low elastic modulus contributes to the osteointegration of titanium alloy plug." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **101**(4): 584-590.
- Zitter, H. and H. Plenk, Jr. (1987). "The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility." J Biomed Mater Res **21**(7): 881-896.

IX. ELEKTRONICKÉ ZDROJE

- www.njrcentre.co.uk
- Národní registr kloubních náhrad ČR, vstup do registru 2. 4. 2020, na adrese: <http://eregpublic.ksrzis.cz/cms/web/NZIS/Stranky/NRKN.aspx>
- <https://hipandkneebook.com/primary-implants>
- www.auxein.com
- <https://www.gom.com/metrology-systems/atos/atos-triple-scan.html>

X. SEZNAM PŘÍLOH – PUBLIKACE AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE

1. **Hobza, M.**, Gallo, J.: Aktuální postavení perorálních chrupavku ovlivňujících látek v prevenci a terapii kloubních nemocí. *Klin Farmakol Farm*, 31(4): 14-17, 2017.
2. Ranuša, M., Gallo, J., **Hobza, M.**, Vrbka, M., Nečas, D., Hartl, M.: Opatřebení a drsnost artikulačního povrchu u extrahovaných polyetylenů jamky Bicon. *Acta Chir orthop Traum česk*, 84(3): 159-167, 2017. (IF 2017: 0.645)*
3. Ranuša, M., Gallo, J., Vrbka, M., **Hobza, M.**, Palousek, D., Krupka, I., Hartl, M.: Wear analysis of extracted polyethylene acetabular cups using a 3D optical scanner. *Tribology Transactions*, 60(3): 437-447, 2017. (IF 2017: 1.723)*
4. Gallo, J., Panacek, A., Prucek, R., Kriegova, E., Hradilova, S., **Hobza, M.**, Holinka, M.: Silver nanocoating technology in prevention of prosthetic joint infection. *Materials* 9(5):337, 2016. (IF 2016: 2.654)
5. Kuba, M., Gallo, J., Pluhacek, T., **Hobza, M.**, Milde, D.: Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res Part B – Applied Biomaterials*, 107B:454-462, 2019. (IF 2018: 2.674)*
6. **Hobza, M.**, Gallo, J.: Klinické aspekty dlouhodobé přítomnosti kloubní náhrady v lidském těle: zátěž kovy. *Ortopedie*, 14(1): 23-28, 2020.*
7. **Hobza, M.**, Milde, D., Slobodova, Z., Gallo, J.: The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: a role of metallic byproducts? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (přijato k tisku) (IF 2018: 1,121).*

Souhrnný impaktový faktor všech prací: 8,817.

* Publikace, které byly využity v předložené disertační práci

Aktuální postavení perorálních chrupavku ovlivňujících látek v prevenci a terapii kloubních nemocí

Martin Hobza, Jiří Gallo

Ortopedická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Poruchy metabolismu chrupavky a zánětlivé změny kloubní výstelky hrají zásadní roli ve vývoji degenerativních a dalších kloubních onemocnění. Na tyto procesy cílí substance podávané perorálně k léčbě kloubní symptomatologie při chondropatiích a osteoartróze. Některé z nich stimulují obnovu mezibuněčné hmoty chrupavky, podílí se na regulaci jejího metabolismu a do určité míry tlumí zánětlivé procesy. Mají pomalý nástup účinku, působí symptomaticky a někdy je u nich uváděn i efekt zpomalující průběh onemocnění. Nejrozšířenější a také nejvíce prostudované jsou chondroitinsulfát a glukosaminsulfát, mnohem méně informací máme o klinickém efektu diacereinu, piascledinu či metylsulfonylmetanu. Shoda ohledně jejich klinické užitečnosti se stále hledá. Většina odborných společností zabývajících se terapií osteoartrózy podávání těchto látek doporučuje. Jednotlivá doporučení se však liší ve stupni ocenění intervence. Obecně platí, že s narůstající závažností klesá efekt podávání nutraceutik.

Klíčová slova: chrupavka, osteoartróza, chondroitinsulfát, glukosaminsulfát, diacerein, piascledin, metylsulfonylmetan.

Chondroitin, glucosamine, diacerein, piascledine, and methylsulphonylmethane in the prevention and treatment of joint diseases

Metabolic disorders and inflammatory processes in cartilage tissue have a pivotal role in the course of degenerative and other joint diseases. These processes are aimed at by orally administered medication for treatment of osteoarthritis and joint symptoms. Some of these substances stimulate recovery of the extracellular matrix in the cartilage, take part in its metabolic regulation and suppress inflammatory changes to a certain extent. These drugs have a slow onset of effect, alleviate symptoms and are thought to have a disease-modifying effect. Chondroitin sulfate and glucosamine sulfate are most commonly used and best studied; less information is available for diacerein, piascledine and methylsulphonylmethane. An agreement on their clinical usefulness is yet to be found. Most of the clinical societies involved in osteoarthritis treatment recommend administering these substances. However, significance of this intervention can differ in various guidelines.

Key words: cartilage, osteoarthritis, chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, diacerein, piascledine, methylsulphonylmethane

Úvod

Kloubní chrupavka je považována za klíčovou strukturu umožňující hladké asymptomatické fungování kloubu. Její zachování či regenerace jsou proto považovány za důležitý cíl léčebné intervence. Kloubní chrupavku poškozují jednorázové větší úrazy (nitrokloubní zlomeniny) i menší

opakované úrazy, metabolické nemoci či vrozené vady. Zejména se však v souvislosti s chrupavkou uvádí osteoartróza, přestože nejde o onemocnění postihující pouze chrupavku. Jde však o nejčastější kloubní onemocnění v dospělosti.

Velmi atraktivním a společensky závažným tématem je prevence rozvoje degenerativních

kloubních nemocí. Je třeba říci, že zatím neznáme žádnou látku, která by dokázala zabránit vzniku osteoartrózy. Vášnivě se diskutuje o zpomalovacím účinku, protože i tento efekt má potenciálně vysokou klinickou i společenskou hodnotu. V našem sdělení se pokusíme velmi stručně shrnout aktuální poznatky o podávání

Tab. 1. Příklady klinických instrumentů určených ke sledování efektu konzervativní terapie osteoartrózy váhonosných kloubů

Název měřicího nástroje	Základní vlastnosti
Lequesne index	Index závažnosti osteoartrózy kyčelního kloubu používaný ke zhodnocení efektu léčby. Řeší bolest, vzdálenost, kterou pacient ujde, a schopnost provádět běžné denní činnosti.
WOMAC index	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index hodnotí pacientem vyplněný dotazník pro osteoartrózu kyčle a kolenního kloubu. Otázky se zabývají bolestí, ztuhlostí kloubu a funkcí při běžných denních aktivitách.
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score je další variantou dotazníku pro kolenní kloub. Je určen pro hodnocení po úrazech kolene, které mohou vyústit v posttraumatickou artrózu, ale může být použit i u primární osteoartrózy.

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis, KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score

některých perorálních látek ovlivňujících kloubní mikroprostředí.

Současné poznatky o hojení a regeneraci chrupavky

Chrupavka se jako pojivová tkáň skládá z převažující extracelulární matrix, která vytváří charakteristické mechanické vlastnosti chrupavky, z chondrocytů, které matrix syntetizují, a regulují tím metabolismus chrupavky, a směsí povrchových molekul, které garantují excelentní tribologické vlastnosti přirozeného a zdravého kloubu.

Mezibuněčná hmota se skládá z vody, kolagenních vláken a amorfni složky tvořené glykosaminoglykany (kyselina hyaluronová (HA), chondroitinsulfát (CS), keratansulfát), proteoglykany a strukturálními glykoproteiny. Proteoglykany se váží na povrch molekuly kyseliny hyaluronové, a tvoří tak agregáty proteoglykanů (agregan), které jsou schopny vázat velké množství vody a chrupavce poskytují charakteristickou pružnost, hladkost a klouzavost.

Při degenerativním postižení chrupavky dochází postupně k převaze katabolických dějů, což má za následek nejen poruchy její architektury (až nakonec její úbytek), ale také narušení unikátních a pro fyziologii kloubu nezastupitelných vlastností. Osteoartrózu dnes vnímáme jako komplexní onemocnění postihující celý kloub, okolní měkké tkáně i pohybové řetězce, v nichž je pohybový segment zapojen (1). Součástí onemocnění je rovněž různě intenzivní zánětlivá reakce, které se účastní celá řada mediátorů a lytických enzymů (2, 3). V chrupavce postupně ubývá podíl proteoglykanů, a klesá tedy mimo jiné její schopnost vázat vodu. Chrupavka ztrácí pružnost a pevnost a začne se rozvláknovat, delaminovat a podléhat mechanickým vlivům, což vyúsťuje v její postupný úbytek (obr. 1) Právě na tyto patologické procesy původně měla cílit zde uváděná léčiva, dokonce

jako prekursori nebo zástupci extracelulární složky. Situace je však složitější.

SYSADOA, DMOADs a sledování klinického efektu

Dnešní klinickou praxi si neumíme představit bez systematického sledování účinku léčebných strategií. Historicky se v souvislosti s perorálně užívanými látkami postupně navrhlo a opustilo několik koncepcí. Aktuálně se jim přiznává statut látek s pomalým nástupem účinku, který by však měl být déletrvajícím (SYSADOA = Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis). Efekt takové léčby můžeme sledovat pomocí různých skórovacích systémů (tab. 1).

Část výzkumníků je přesvědčena o tom, že některé z perorálních chrupavku ovlivňujících látek by mohly mít tzv. strukturu modifikující efekt. To znamená, že by mohly zpomalovat nebo dokonce zastavit rozvoj osteoartrózy, což dokládají pomocí moderních zobrazovacích metod (zvláště NMR – nukleární magnetická rezonance) anebo pomocí klinického kritéria, jakým je například oddálení potřeby implantace TEP (totální endoprotézy). Takové látky by směly být zařazeny do skupiny DMOADs (Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs). Avšak do dnešních dnů není známa ani jedna, na které by se autority v dané oblasti shodly.

Volba léčebné a preventivní strategie – doporučené léčebné postupy

V dnešní době se požaduje, aby lékař či fyzioterapeut postupoval u každého pacienta s ohledem na jeho individualitu, resp. s ohledem na „jeho konkrétní“ osteoartrózu. Odborné společnosti mu nabízí rozříděný seznam léčebných intervencí, které mohou být s určitým zjednodušením rozděleny na konzervativní léčbu, tedy režimová opatření, farmakologickou terapii a využití pomůcek a léčbu operační.

Obr. 1. Pyramida léčebných intervencí

Látky potenciálně ovlivňující kloubní mikroprostředí a chrupavku patří do skupiny „farmakologické terapie“, přestože jsou v řadě zemí považovány pouze za doplňky stravy (nutraceutika), a nikoli léčiva. Léčivé přípravky obvykle obsahují jen jednu účinnou látku (oproti mnohdy více-složkovým doplňkům stravy), zato procházejí procesem schválení pro klinické využití, a mají tak mimo jiné průkazné množství účinné látky v balení. Pacienti si většinou tento rozdíl neuvědomují.

Látky k perorálnímu užití s potenciálně pozitivním vlivem na chrupavku a kloubní prostředí

Chondroitinsulfát

Chondroitinsulfát (CS) je jednou z hlavních složek mezibuněčné hmoty chrupavky a je obsažen v agregátech proteoglykanů, které udávají mechanické vlastnosti chrupavky. Zástupcem je léčivý přípravek Condrosulf, který je podáván v denní dávce 800 mg po dobu 3 měsíců. Následuje tříměsíční pauza, po které je možno léčbu opakovat. Vstřebané součásti CS se akumulují v oblasti kloubní chrupavky, inhibují aktivitu katabolických enzymů, stimuluji biosyntetické děje, a tím zlepšují mecha-

Obr. 2. Arroskopický obraz chondropatie při osteoartróze kolena



nicko-elastické vlastnosti chrupavky. Některé studie ukazují, že CS inhibuje mediátory zánětlivého procesu při osteoartróze (3, 4). CS má tedy jak symptomatické účinky – úleva od bolesti, omezení počtu exsudativních epizod a zlepšení funkce kloubu, tak i účinky strukturu ovlivňující, jak dokumentuje Hochberg ve své metaanalýze (5). Data z dvouletého sledování více než 1 000 pacientů ukazují snížení úbytku kloubní chrupavky na rentgenovém snímku v porovnání s placebem o 0,13 mm (95 % CI = 0,06, 0,19) (P = 0,0002). Pelletierova studie (6) s dvouletým sledováním úbytku kloubní chrupavky magnetickou rezonancí prokazuje lepší účinnost CS v porovnání s celecoxibem. Z toho vyplývá závěr, že CS má nejen symptomatický, ale částečně i strukturu ovlivňující (DMOADs) efekt. Řada dalších studií však zpochybňuje význam klinického efektu léčby a zejména příslušnost k DMOADs (7).

Glukosaminsulfát

Glukosaminsulfát (GS) je solí glukosaminu fyziologicky přítomného v lidském těle. Glukosamin je k dispozici v několika formách: glukosaminsulfát, glukosamin-hydrochlorid nebo N-acetylglukosamin. V terapii osteoartrózy se ukazuje jako nejlepší jeho forma krystalického sulfátu (8). Na našem trhu je k dispozici např. jako Dona nebo Gool. Denní dávka je 1 500 mg a terapie trvá 1–3 měsíce. Komplexní mechanismus účinku ještě není zcela objasněn, avšak víme, že GS podporuje chondrocyty k tvorbě mezibuněčné hmoty a zároveň má antiflogistické účinky na kloub inhibicí IL-1 β (interleukin 1 beta), čímž tlumí syntézu metaloproteináz, cyklooxygenázy-2 a dalších proteolytických enzymů (9).

Pro preskripci je v klinické praxi důležité mít na paměti, že užívání glukosaminu spolu s warfarinem může potencovat účinek tohoto kumari-

nového preparátu, a zvýšit tak INR (International normalized ratio) na rizikové hodnoty, jak dokumentují některé kazuistiky (10).

Existují studie prokazující analgetický efekt glukosaminsulfátu u gonartrózy (11), další studie naopak vyvracejí efektivitu GS jak samostatně, tak ve spojení s CS. Studie GAIT z roku 2006 uvádí, že jednotlivé léky ani jejich kombinace neposkytují příliš účinnou léčbu bolesti artrotického kolena (12). Ukázala však, že skupina se střední až závažnou bolestí může z kombinace těchto látek do určité míry profitovat. V jedné randomizované dvojitě zaslepené kontrolované studii dokonce prokázali nižší efekt kombinace CS a GS při šestiměsíční léčbě bolesti artrotického kolena v porovnání s placebem (13). Další dvouletá dvojitě zaslepená kontrolovaná studie prokázala prospěšné účinky kombinace CS a GS na bolest, ale tyto výsledky opět nedosáhly statistické významnosti (7). Heterogenita výsledků v klinických studiích se vysvětluje mimo jiné i technologickým postupem používaným při výrobě GS. Výrobky Rottapharm/Madaus dosahují ve většině studií lepších výsledků nežli výrobky ostatních firem (14). V současnosti se však zdá, že ani GS nespĺňuje nároky látky, která by vedla alespoň ke střednímu efektu terapie u pacientů s osteoartrózou kolena či kyčle (15), případně v jiných anatomických lokalitách.

Diacerein

Diacerein je výtažek z rebarbory, který je v České republice prodáván jako Artrodar. Doporučená denní dávka je 50 mg dvakrát denně. Účinek diacereinu je podobný jako u glukosaminsulfátu: inhibuje produkci a aktivitu IL-1 β, dále pak podporuje produkci růstových faktorů, jako je TGF-β (transformující růstový faktor beta), a tím stimuluje syntézu látek mezibuněčné hmoty chrupavky. Aktualizovaná metaanalýza Cochrane z roku 2014 hodnotí terapeutický efekt diacereinu u celkem 2 210 pacientů s osteoartrózou prokázala pouze malý klinický efekt na léčbu bolesti a omezený vliv na rychlost degenerace chrupavky (16). Oproti ostatním chondroprotektivům má diacerein častější výskyt závažnějších nežádoucích účinků, jako je hepatotoxicita nebo silné průjemy. Z tohoto důvodu vydal v roce 2014 Farmakovigilanční výbor Evropské lékové agentury doporučení

pro omezení používání diacereinu: ten by měl být používán jen k terapii pomalu progredující osteoartrózy kyčle a kolene u pacientů mladších 65 let, bez jaterního onemocnění, léčba by měla být započata poloviční dávkou a ukončena v případě výskytu průjmů či zhoršení jaterních funkcí (17).

Piascledine

Piascledine je přípravek obsahující extrakt z avokáda a sójových bobů ve formě nezmýdelnitelných látek označovaných jako ASU (avocado-soybean unsaponifiables). Dávkování je 300 mg denně po dobu 3 měsíců, účinek by měl přetrvávat ještě po dobu dalších dvou měsíců. ASU snižují produkci IL-1, stimuluje tvorbu kolagenu, zvyšují expresi PAI-1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru) a podporují tvorbu TGF-β, jak dokumentují in vitro studie (18, 19). Maheu v klinické studii dokonce prokazuje strukturu modifikující efekt na koxartrózu (20). Metaanalýza randomizovaných kontrolovaných studií zahrnující 664 pacientů s osteoartrózou favorizuje ASU vůči placebu v terapii bolesti s velikostí efektu 0,39 (95 % CI = 0,01–0,76, P = 0,04), prokázán byl rovněž i vliv na funkční skóre (21). Použití Piascledinu pro léčbu osteoartrózy váhonosných kloubů může být doporučeno i vzhledem k jeho dobré toleranci a absenci výskytu závažných nežádoucích účinků.

Metylsulfonylmetan

Metylsulfonylmetan (MSM) je látka, která je přítomna v pojivové tkáni. Její podávání je tudíž velmi bezpečné, uvádí se, že je možné podávat až 4 g denně (22). Má velmi zajímavou historii a v současnosti prožívá „boom“ v prevenci a terapii kloubních i mimokloubních nemocí pohybového aparátu, zvláště těch spojených s větší mechanickou zátěží.

Podle některých prací by MSM mohl ovlivňovat až 4 transkripční faktory a skrze ně se podílet nejen na regulaci metabolismu pojiva, zánětu či aktivity proteolytických enzymů, ale dokonce i při útlumu osteoklastogeneze (22, 23). Na druhou stranu existuje jen málo kvalitních klinických studií, které by podávání této látky, ať už samostatně, nebo ve směsi, doporučovalo (24). Proto nelze podávání této látky všeobecně doporučovat a bude nutné vyčkat na další kvalitně vedené studie.

Současné postavení látek, které potenciálně cílí na kloubní chrupavku

Perorální látky ovlivňující kloubní mikroprostředí jsou vítanou možností terapie kloubních onemocnění zejména vzhledem k dobré snášenlivosti a nízkému výskytu nežádoucích účinků i při dlouhodobém podávání. Jak dokumentují četné

klinické studie a jejich metaanalýzy, je však jejich klinický efekt omezený a zdaleka ne u všech pacientů přináší očekávanou úlevu. Přesto zůstávají nadále součástí komplexní doporučené terapie. Tyto látky je tedy možno zařadit do konzervativní léčby osteoartrózy ve všech jejích stupních a klinických projevech, avšak obecně se očekává, že z těchto látek budou spíše profitovat pacienti

s klinicky počínající či středně závažnou osteoartrózou, zatímco pacienti s výrazně pokročilou osteoartrózou a těžkou symptomatologií budou vědeckými kandidáty na kloubní náhradu či jiné definitivní operační řešení. Chybí také dostatečně silné a homogenní důkazy o tom, že by dlouhodobé podávání těchto látek bránilo vzniku či rozvoji degenerativních kloubních změn.

LITERATURA

- Gallo J. Osteoartróza. Praha: Maxdorf, 2014: 150.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 2009; 14: 913–925.
- Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 14–18.
- Monfort J, Nacher M, Montell E, Vila J, Verges J, Benito P. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500–730 kDa) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res* 2005; 31: 71–76.
- Hochberg MC. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 28–31.
- Pelletier J, Raynaud J, Beaulieu A, et al. SAT0454 In A Two-Year Double-Blind Randomized Controlled Multicenter Study, Chondroitin Sulfate Was Significantly Superior To Celecoxib at Reducing Cartilage Loss with Similar Efficacy at Reducing Disease Symptoms In Knee Osteoarthritis Patients. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 836.
- Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, et al. Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1459–1464.
- Saengnipanthkul S, Waikakul S, Rojanasthien S, et al. Differentiation of patented crystalline glucosamine sulfate from other glucosamine preparations will optimize osteoarthritis treatment. *Int J Rheum Dis*, v tisku.
- Shahine E, Elhadidi A. AB0776 Efficacy of Glucosamine Sulfate in Lowering Serum Level of Interleukin-1 β in Symptomatic Primary Knee Osteoarthritis: Clinical and Laboratory Study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1061.
- Knudsen JF, Sokol GH. Potential glucosamine-warfarin interaction resulting in increased international normalized ratio: case report and review of the literature and MedWatch database. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 540–548.
- Kongtharvonskul J, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Woratanarat P, Thakkinstian A. Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis. *Eur J Med Res* 2015; 20: 24.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 795–808.
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G. CS/GS Combined Therapy Study Group. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis: A Six-Month Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69: 77–85.
- Kucharz EJ, Kovalenko V, Szántó S, Bruyère O, Cooper C, Reginster JY. A review of glucosamine for knee osteoarthritis: why patented crystalline glucosamine sulfate should be differentiated from other glucosamines to maximize clinical outcomes. *Curr Med Res Opin* 2016; 32: 997–1004.
- Wandel S, Jüni P, Tendal B, et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ* 2010; 341: 4675.
- Fidelix TS, Macedo CR, Maxwell LJ, Fernandes Moça Trevisani V. Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 2: CD005117.
- Oddělení farmakovigilance, Státní ústav pro kontrolu léčiv. Diacerein – další informace, 2014. Online. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/diacerein-dalsi-informace>
- Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guillou GB, Pujol JP. Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 148–156.
- Henrotin YE, Sanchez C, Deberg MA, et al. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol* 2003; 30: 1825–1834.
- Maheu E, Cadet C, Marty M, et al. Randomised, controlled trial of avocado–soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 376–384.
- Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 399–408.
- Butawan M, Benjamin RL, Bloomer RJ. Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. *Nutrients* 2017; 9: 290.
- Joung YH, Darvin P, Kang DY, et al. Methylsulfonylmethane Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF- κ B and STAT3 Activities. *PLoS One* 2016; 11: e0159891.
- Gallagher B, Tjoumakaris FP, Harwood MI, Good RP, Cicotti MG, Freedman KB. Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents. *Am J Sports Med* 2015; 43: 734–744.

Opotřebení a drsnost artikulačního povrchu u extrahovaných polyetylenů jamky Bicon-Plus

Wear and Roughness of Bearing Surface in Retrieved Polyethylene Bicon-Plus Cups

M. RANUŠA¹, J. GALLO², M. HOBZA², M. VRBKA¹, D. NEČAS¹, M. HARTL¹

¹ Ústav konstruování, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně

² Ortopedická klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

By 7th December 2016, 4,755 Bicon-Plus cups in total were implanted in the Czech Republic. Some of them have been continuously re-operated, while the most frequent reason of failure is polyethylene wear and aseptic loosening. The present study is focused on surface analysis of retrieved polyethylene Bicon-Plus cups and the determination of the roughness of their bearing surfaces.

MATERIAL AND METHODS

In this study, we had 13 high molecular weight polyethylene cups with the average time *in situ* of 8.11 years (3.6–13.7, SD 3.2) before the retrieval. The study population was composed of 3 men, 10 women, with the mean age of 53.31 years. An optical scanning method, based on the principle of active triangulation, was used to determine wear rate. The rate of wear was identified by means of an obtained scan subsequently processed with the use of the GOM Inspect software. The roughness of surfaces was analysed with the application of Contour GT-X8 profiler using the principle of phase shifting interferometry. Measurements of surface topography of the retrieved cups were performed on the entire bearing surfaces. For the individual surface changes, a typical range of surface roughness, describing the particular wear character, was determined. By means of morphology analysis of the tested implants, three areas were identified: unworn area; area representing the worn part of the cup; and the area roughened by parallel grooving. The total surface roughness was evaluated as an arithmetic mean of the measured values. Subsequently, the values were sorted based on frequency and were classified into categories defining the particular wear mechanisms.

RESULTS

Wear rate of the retrieved acetabular cups was evaluated based on the wear direction vector and the size of linear wear. The average linear wear was equal to 0.13 mm/year (ranging from 0.26 to 2.29 mm/year), and the mean value of total volumetric material loss was 44.37 mm³/year (the range being from 51.80 to 1,119.7 mm³/year). Using the optical profilometer, a map of roughness distribution of the individual cups was obtained. For each implant, 76 values of roughness were evaluated. With the respect to average roughness, the samples were sorted to various categories describing: surface polishing; abrasive-adhesive wear; surfaces with preserved grooving; substantial plastic deformation.

DISCUSSION

The results clearly showed an increase of wear depending on implant survival; however, the tendency is not linear. This fact can be attributed to a larger amount of abrasive particles, causing an increase of wear or occurrence of surface wear in terms of micro cracks and oxidation degradation of polyethylene. This study indicates that geometry, positioning, and cup alignment during the implantation have a fundamental impact on the cup durability. Further correlation, which was observed in the case of the cup with prevailing roughness in the range from 0.1 to 0.3 µm, is a relatively wide wear vector angle determined with the use of the optical method. Considering the implants with the longest survival time with no loosening of the acetabular cup, the mean angle of direction vector was 56.8° (SD 2.1°).

CONCLUSIONS

The present study provides the results of morphology analysis of the retrieved Bicon-Plus cups. In general, relatively high wear rate, mainly of abrasive-adhesive character was identified. The dependence between wear and implant *in situ* longevity was not clearly linear, which suggests the influence of other parameters on the polyethylene wear rate. An important role of implant positioning on survival was also revealed. Moreover, it seems that it can be a more important parameter than the characteristics of the patient.

Key words: total hip arthroplasty, Bicon-Plus cup, retrieval analysis, surface analysis, wear measurement, roughness, deformation, survivorship.

ÚVOD

Bikonická titanová šroubovací jamka byla uvedena do praxe koncem roku 1993 (Bicon-Plus®; Plus Orthopedics AG, Rotkreuz, Switzerland). Charakteristickým konstrukčním rysem této jamky jsou tenký plášť, lamelární závit a dvojitý kónus, který v porovnání s jednoduchým kónusem, například u jamky Alloclassic, šetří kost při frézování acetabula. Jamka má verzi standardní a tzv. porózní s rozšířeným povrchem zdrsňelého titanu. Podle firemních údajů jí bylo implantováno několik set tisíc. V literatuře lze nalézt studie s 10- a víceletým sledováním tohoto implantátu s výbornými klinickými výsledky a vynikajícím přežitím k 10. roku od operace (20, 28, 37). V české literatuře se jí věnovalo několik autorských týmů (2, 5, 24). Implantát se stále používá, a proto má smysl věnovat se výzkumu jeho výsledků.

Jamku Bicon používáme na naší klinice nepřetržitě od roku 1998 v primární a revizní indikaci, v posledních letech s polyetylenem RexPol (s vysokým stupněm síťování). V poslední době se setkáváme s aseptickým uvolněním implantátů, které jsme operovali v první dekádě tohoto století. Setkali jsme se také několikrát s její frakturou. Měření otěru polyetylenu se věnujeme dlouhodobě, vyvinuli jsme postupně kontaktní (9) i bezkontaktní metody (27) ke stanovení jeho míry na extrahovaných jamkách. Cílem této studie bylo změřit opotřebení extrahovaných polyetylenů u jamek Bicon-Plus a stanovit drsnost jejich artikulárního povrchu.

MATERIÁL A METODIKA

Pacienti

V letech 2010 až 2016 jsme reoperovali 51 jamek Bicon-Plus. Důvod k reoperaci byl 46x aseptický (aseptické uvolnění včetně centrální migrace jamky (obr. 1), opotřebení polyetylenu, periprotetické zlomeniny) a 5x byla kyčel reoperována pro infekci. Do studie s měřením ex-



Obr. 1. Aseptické uvolnění jamky Bicon.

trahovaného polyetylenu jsme mohli zařadit 13 vyjmutých komponent od 13 pacientů, kterým jsme extrahovali polyetylenovou vložku TEP kyčle s jamkou Bicon-Plus. U ostatních byl povrch polyetylenu při vyprošťování z kovové části jamky buď výrazně poškozen, anebo se jamku nepodařilo archivovat podle níže uvedeného protokolu. Základní informace o pacientech shrnuje tabulka 1.

Tab. 1. Základní klinické informace o pacientech

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	BMI	Strana	Datum implantace	Věk v době implantace	Primární diagnóza	Abdukční úhel [°]	Přežití implantátu [roky]	Stabilita implantátu	Důvod revize
01	m	1947	24,24	pravá	9. 1. 2003	55	PA	50,6	12,08	1	PPFF
02	ž	1963	19,23	pravá	15. 4. 2001	37	PD	35,5	10,5	1	asymptomatické, uvolnění dříku
03	ž	1957	27,55	levá	5. 4. 2002	45	PA	35,7	10	1	bolesti
04	ž	1952	24,01	pravá	30. 9. 2002	50	PA	48	10,96	2	bolesti
05	m	1960	32,51	pravá	8. 11. 2005	45	AVN	46,4	6,25	0	bolesti
06	ž	1936	34,38	pravá	13. 1. 2010	73	PA	46	4,04	2	bolesti
07	m	1940	30,86	levá	4. 1. 2006	66	PA	48	7,46	1	bolesti
08	ž	1966	21,05	levá	15. 1. 2003	36	PD	34	7,68	2	fraktura pláště jamky
09	ž	1950	23,31	pravá	3. 3. 2000	50	PA	51	13,67	0	bolesti
10	ž	1960	26,77	pravá	7. 4. 2010	49	PD	35,5	4,47	2	bolesti
11	ž	1944	26,96	levá	13. 1. 2009	64	PA	63	5,16	2	bolesti
12	ž	1933	22,04	pravá	14. 2. 2007	73	PA	40	3,58	2	bolesti
13	ž	1951	29,05	levá	3. 10. 2001	50	PA	39	9,55	1	bolesti

m = muž, ž = žena; * 0 = obě komponenty stabilní, 1 = stabilní jamka, nestabilní dřík, 2 = uvolněná jamka; AVN = avaskulární nekróza hlavičky femuru; BMI = body mass index; PA = primární artróza; PD = postdysplastická artróza; PPFF = periprotetická fraktura femuru.

Polyetylenová vložka do jamky Bicon-Plus

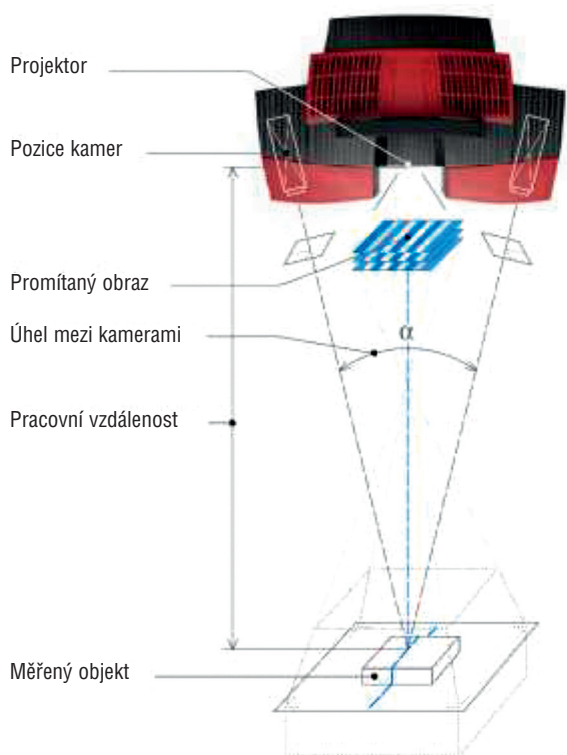
Acetabulární vložka z vysokomolekulárního polyetylenu GUR 1020 (Ticona) byla vyrobena technologií „compression molded“ podle normy ISO 5834-2. Sterilizace probíhala gama zářením (2,5 Mrad; 1 rad = 0,01 Gy) v inertním prostředí dusíku. Zámek vložky fungoval výborně. Polyetylenová vložka artikulovala s keramickou hlavíci.

Extrakce a archivování

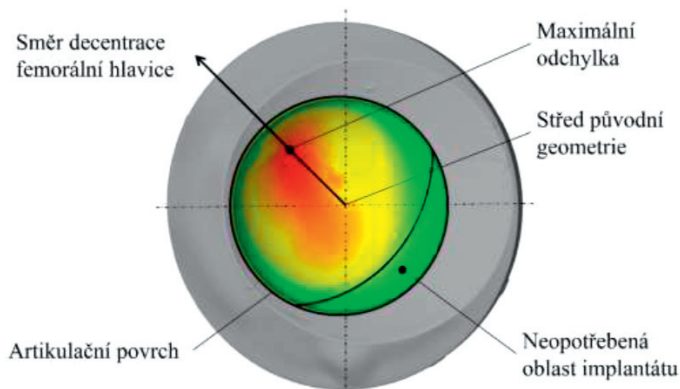
Extrahované polyetyleny byly ihned po vyjmutí z těla mechanicky očištěny a sterilizovány v roztoku Sekusept Aktiv (Ecolab GmbH, Düsseldorf, Německo). Po vysušení a zabalení byly jamky archivovány za standardní pokojové teploty. Následně byly poslány do laboratoře spoluautorů k měření otěru.

Metodika měření otěru

Pro stanovení otěru u artikulačních povrchů extrahovaných polyetylenových vložek byla použita optická skenovací metoda (21). Měření bylo realizováno s využitím skeneru ATOS Triple Scan od společnosti GOM. Princip metody je založený na aktivní triangulaci. Analyzovaný objekt je nasvícený úzkopásmovým modrým světlem, přičemž se využívá takzvaná proužková projekce. Využívaná technologie se nazývá „blue light technology“. Jednou z výhod této technologie je nezávislost na okolních světelných podmínkách (10). Obrazce promítané na objekt jsou snímány dvěma kamerami, které jsou uloženy ve skenovací hlavě. Ze získaných obrazů a na základě znalosti úhlu mezi snímacími kamerami je možné pomocí triangulačních algoritmů získat prostorové souřadnice jednotlivých bodů na skenovaném objektu



Obr. 2. Schéma principu optického skenování.



Obr. 3. Odchylová mapa opotřebovaného implantátu.

(obr. 2). Výsledkem skenovacího procesu je tak získání velkého počtu bodů na povrchu objektu. V případě skenování acetabulární jamky s průměrem 28 mm je na jejím artikulačním povrchu získáno přibližně 200 000 bodů. Hustota bodů poskytuje možnost přesnější vizualizace povrchu.

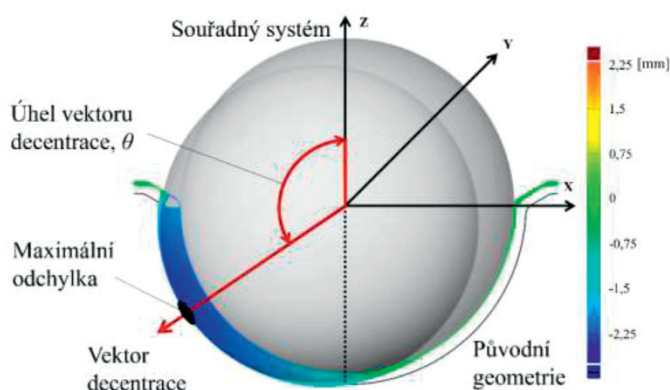
Následně jsou data polygonizována za pomoci software GOM Inspect, čímž je získána geometrie povrchu jamky. Tuto geometrii je možné dále editovat. V prvním kroku byla odstraněna všechna poškození způsobená chirurgem při explantaci, která do objemového úbytku jamky v těle pacienta nesmí být započítána. V dalším kroku byla odstraněna nadbytečná data, jako je například okolí analyzované jamky. K analýze byl zachován jen artikulační povrch explantátu a jeho blízké okolí. Následně jsou povrchová data transformována na objemové těleso.

Získaná geometrie byla následně proložena ideální koulí, takzvaným primitivem, o nominálním průměru odpovídajícím průměru neopotřebované části jamky. Tím bylo možné stanovit odchylku od ideální geometrie v jednotlivých směrech, a následně tak definovat neopotřebovanou oblast acetabulární jamky a směr nárůstu opotřebování. Na základě definovaného neopotřebovaného povrchu byla softwarově vytvořena rekonstrukce původní geometrie implantátu (obr. 3).

Model skenu extrahovaného implantátu byl následně porovnán s rekonstruovanou původní geometrií. Tímto postupem je možné stanovit množství úbytku materiálu v těle pacienta, směr nárůstu opotřebování a velikost decentrace femorální hlavice. Jedním z parametrů, který definuje rozsah opotřebování, je směrový vektor opotřebování, často také označovaný jako vektor decentrace, který je určen maximální odchylkou opotřebované artikulační oblasti vůči původní geometrii. Tento vektor svírá s vertikální osou jamky (osa z) takzvaný úhel vektoru decentrace (obr. 4), (26).

Metodika měření drsnosti

Pro stanovení drsnosti povrchu extrahovaných jamek byl využit profilometr Contour GT-X8 od společnosti Bruker. Optický profilometr pracuje na principu interferometrie s řízenou změnou fáze. Profilometr využívá vlnovou délku světla pro porovnání optických drah světla mezi analyzovaným povrchem a referenčním po-



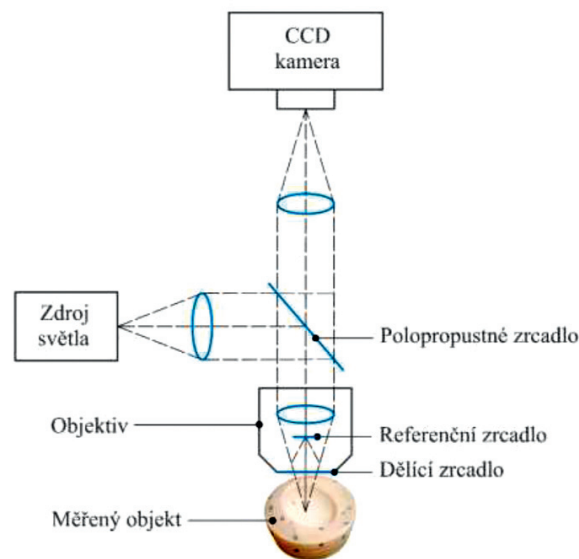
Obr. 4. Stanovení vektoru decentrace femorální hlavičky.

vrchem. Vyzařovaný světelný paprsek je rozdělen, přičemž jedna jeho část se odrazí od testovaného povrchu po průchodu objektivem a druhá část se odrazí od referenčního zrcadla. Na základě interference paprsků je možné následně vyhodnotit topografii povrchu, přičemž výsledný interferogram (obrazec interferujících paprsků) je snímán CCD kamerou (obr. 5).

Metoda poskytuje měření topografie povrchu s rozlišením až 0,1 nm. Pro skenování povrchu byl použit objektiv s 20násobným zvětšením snímání plochy o velikosti 0,22 mm², což je dostatečné pro účely námi prováděných měření. U acetabulární jamky o průměru 28 mm docházelo při měření drsnosti v určitých bodech ke kolizi mezi jamkou a objektivem. Nutností tak bylo měřené jamky rozřezat na čtyři části a po měření data následně složit do komplexní mapy popisující topografii povrchu. Pro definici jednotlivých měřených bodů na povrchu jamky byl navržený polohovací přípravek umožňující natočení vzorku do konkrétní definované polohy, přičemž se využívá takzvaný polární souřadnicový systém.

Výsledkem měření na optickém profilometru je mapa rozložení drsností u jednotlivých explantátů. U každé čtvrtiny jamky bylo provedeno měření v 19 definovaných místech rovnoměrně rozložených podle stanovené souřadnicové mapy měření (obr. 6). Celkem tak bylo získáno 76 hodnot drsností pro každý extrahovaný implantát.

U jednotlivých povrchových změn bylo na základě struktury povrchu stanoveno typické rozmezí drsností popisující konkrétní charakter opotřebení. Analýzou morfologie povrchu testovaných náhrad byly stanoveny tři oblasti lišící se úrovní drsnosti povrchu. Jednu z oblastí lze popsat jako neopotřebovanou. V této oblasti jsou jasně viditelné stopy po výrobním nástroji. Pověštinou se přitom jeví jako neopotřebované, případně bylo pozorováno jen jejich velmi omezené opotřebení. Drsnost této oblasti dosahuje hodnot nižších, než bylo naměřeno u jamek před opotřebením,



Obr. 5. Schéma principu optické profilometrie.

což naznačuje, že v důsledku artikulace náhrady došlo k určitému vyhlazení povrchu (6, 13). Další dvě oblasti popisují opotřebovanou oblast jamky a oblast zdrsněnou paralelním rýhováním způsobeným kontaktem jamky s povrchem hlavičky. Z pozorování opotřebované oblasti bylo identifikováno zvlnění povrchu jamky a případná delaminace, která je přisuzována plastické deformaci (30). Měřená drsnost povrchu jamek byla popsána parametrem drsnosti R_a , tedy střední aritmetickou úchytkou profilu. Jednotlivé hodnoty drsnosti u každého explantovaného vzorku byly zařazené do rozmezí drsností (obr. 6).

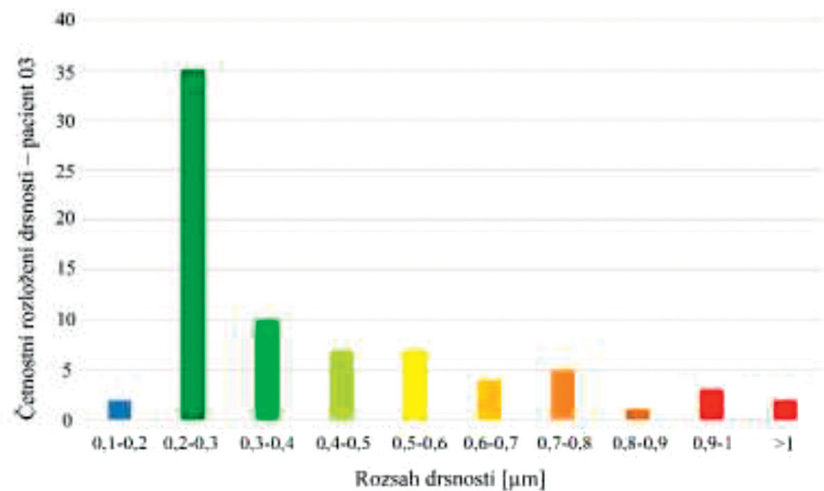
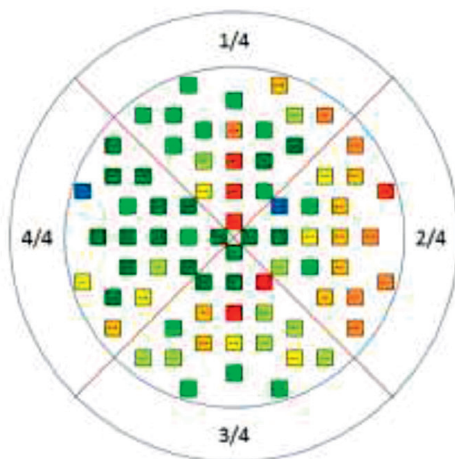
VÝSLEDKY

Opotřebení povrchu

Na základě měření za pomoci optické skenovací metody byl u třinácti extrahovaných acetabulárních jamek stanoven směrový vektor opotřebení, velikost lineárního opotřebení a celkový objemový úbytek materiálu. Výsledky těchto parametrů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Geometrická analýza extrahovaných implantátů

Číslo pacienta	Velkost implantátu	Lineární opotřebení [mm]	Lineární opotřebení [mm/rok]	Úhel vektoru opotřebení [°]	Objemové opotřebení [mm ³]	Objemové opotřebení [mm ³ /rok]
01	4/28	2,27	0,19	63,4	1119,7	92,66
02	5/28	1,39	0,13	59,3	528,97	50,38
03	4/28-Antilux.	0,43	0,04	-	99,81	9,98
04	4/28	1,60	0,15	13,8	752,02	68,63
05	6/28	0,66	0,11	-	170,98	27,36
06	4/28	0,48	0,12	42,6	162,63	40,24
07	5/28	0,90	0,12	-	299,66	40,18
08	4/28-Antilux.	2,24	0,30	59,3	966,92	125,85
09	3/28	2,29	0,17	53,0	584,86	42,79
10	5/28-Antilux.	0,26	0,06	62,9	69,46	15,55
11	4/28-Antilux.	0,47	0,09	20,8	152,98	29,66
12	7/28	0,31	0,09	33,1	51,80	14,46
13	4/28	0,92	0,10	67,8	182,05	19,06



Obr. 6. Měření drsnosti povrchu – pacient 03.

Měření bylo u každého vzorku třikrát zopakováno a z naměřených hodnot byl stanoven aritmetický průměr. Průměrná rychlost lineárního otěru u měřených jamek byla 0,13 mm/rok (směrodatná odchylka, angl. standard deviation (SD) = 0,06 mm/rok). Průměrná hodnota objemového otěru byla 44,37 mm³/rok (SD = 32,45 mm³/rok). Získaná data byla porovnána s klinickými daty jednotlivých pacientů. Graf 1 popisuje závislost rychlosti lineárního opotřebení v závislosti na době přežití implantátu v těle pacienta. Na elementární úrovni lze očekávat, že opotřebení bude narůstat přímo úměrně s časem, po který je implantát přítomný v těle pacienta. Na základě výsledků uvedených v grafu 1 se však ukazuje, že závislost mezi rychlostí otěru a délkou používání implantátu lineární není. Podobně jsme stanovili závislost mezi rychlostí otěru, délkou implantátu in situ a body mass indexem (BMI), (graf 2, 3).

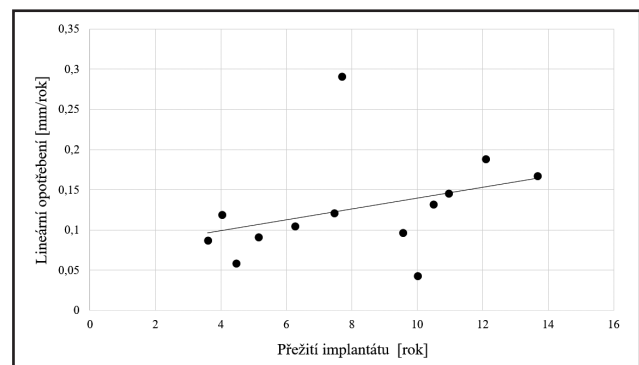
Drsnost povrchu

Měření topografie povrchu na extrahovaných jamkách bylo realizované rovnoměrně po celém artikulačním povrchu. Celková drsnost povrchu byla stanovena aritmetickým průměrem naměřených hodnot. Následně byly hodnoty seřazeny podle četnosti a byly zařazeny do kategorie definující jednotlivé mechanismy opotřebení (tab. 3). Tímto způsobem je možné definovat vzorky, u kterých došlo k výraznému vyhlazení povrchu abrazivně adhezním opotřebením (obr. 7a), povrchy se zachovanými rýhami po výrobním nástroji (obr. 7b) a vzorky s výrazným plastickým poškozením (obr. 7c).

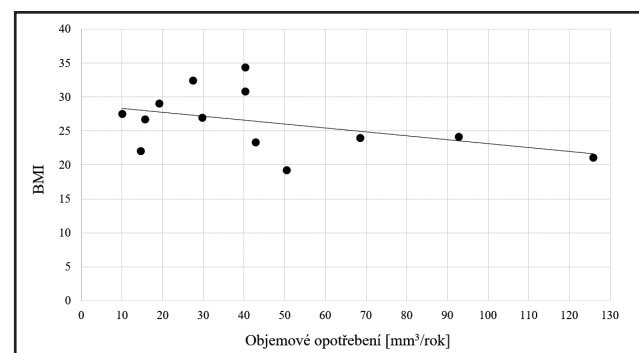
DISKUSE

U souboru 13 vzorků extrahovaných implantátů Bicon s průměrnou délkou přežití 8,1 roku (SD 3,2 roku) byly analyzovány geometrické a topografické změny artikulačních povrchů. Získané výsledky byly následně hodnoceny v porovnání s dostupnými klinickými daty pacientů.

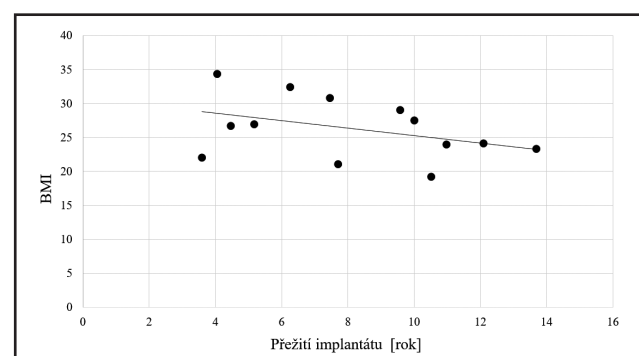
Graf 1. Závislost lineárního opotřebení na době přežití implantátu



Graf 2. Závislost objemového opotřebení na BMI



Graf 3. Závislost přežití implantátu na BMI



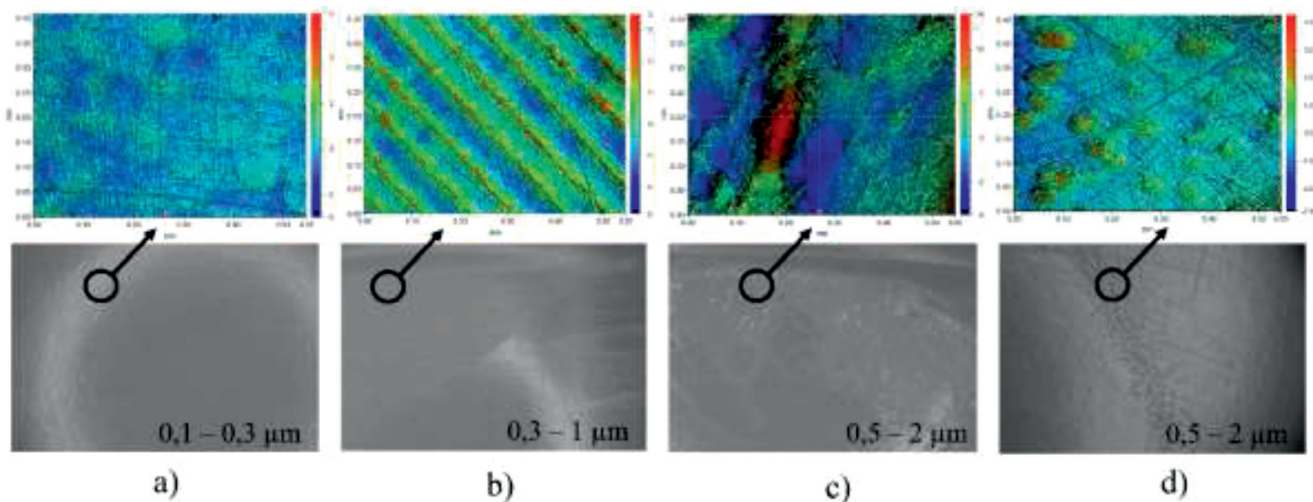
Tab. 3. Vyhodnocení drsností artikulárních povrchů u extrahovaných jamek

Číslo pacienta	Průměrná drsnost [μm]	Drsnost artikulujícího povrchu [μm]								
		0,1–0,3	0,3–0,4	0,4–0,5	0,5–0,6	0,6–0,7	0,7–0,8	0,9–1	1 <	
		Vyhlaz.	Znatelné rýhy po nástroji				Výrazné rýhy po nástroji			
		Plastické deformace, znatelné poškození								
01	0,33	58 %	17 %		12 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
02	0,53	30 %	14 %	18 %						Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
03	0,42	46 %	13 %		9 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
04	1,46				9 %	14 %			55 %	Vyhlazení, výrazné plastické deformace
05	0,42	43 %	18 %						11 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, počátek pittingu
06	0,46		30 %	37 %	24 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, trhliny
07	0,75		18 %	13 %					26 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, trhliny
08	–									Delaminace povrchu, hranové poškození
09	0,63	34 %	33 %						28 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, delaminace povrchu
10	0,70			13 %	37 %	28 %				Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, delaminace, hranové poškození
11	0,45	20 %	25 %	24 %						Vyhlazení, stopy po obrábění
12	0,37	25 %	53 %			9 %				Vyhlazení, stopy po obrábění, delaminace, hranové poškození
13	0,51	41 %	22 %					21 %		Vyhlazení, stopy po obrábění

Jednou z porovnávaných veličin je rychlost lineárního opotřebení implantátu stanovená jako rychlost vnoření femorální hlavice do polyetylenové jamky vyjádřená v mm/rok, případně mm³/rok. Z literatury i z vlastní zkušenosti víme, že hodnocený implantát má vynikající přežití (tab. 4), (12, 16, 20, 29, 31, 37). V naší práci jsme zjistili průměrnou rychlost otěru polyetylenu vyšší než 0,1 mm/rok a převážně abrazivně adhezní typ otěru. Také další autoři změřili na rentgenových snímcích rychlost otěru vyšší než 0,1 mm/rok (tab. 5), což by měla být hodnota sružená s vyšší pravděpodobností výskytu periprotetické osteolýzy a aseptického uvolnění (4). Jinými slovy, tento implantát se zjevně dokázal ubránit rozvoji osteolýzy, přestože základní podmínka rozvoje této reakce byla splněna. Přesto doporučujeme

pacienty s jamkou Bicon-Plus a starším polyetylenem pravidelně kontrolovat, a to zejména po desátém roce od operace.

Z výsledků je jasně pozorovatelný nárůst opotřebení s délkou přežití implantátu, kdy se však nejedná o závislost lineární (graf 1). Tento jev může být způsoben vyšším počtem abrazivních částic způsobujících zvýšení tření, případně výskyt povrchového opotřebení ve formě mikrotrhlin a oxidační degradace polyetylenu (6, 7). Procesy opotřebení může ovlivňovat dále také různá velikost a tvar otěrových částic (36). Je však třeba zdůraznit, že bylo analyzováno pouze 13 vzorků, což nemusí být pro vyvození jasných závěrů dostatečné množství. Nejvyšší odchylky od lineárního trendu nárůstu opotřebení v porovnání s dobou přežití byly pozorovány u pacientů



Obr. 7. Typy opotřebení na explantovaných vzorcích.

Tab. 4. Přehled studií referujících přežití TEP Bicon-Plus

Autor	Počet kyčlí	Délka sledování (roky)	Přežití k 10. roku od operace	Výskyt AU	Výskyt PPOL
Zweymuller, 2007	232	10	99,3 % (96,9 – 99,8 %) *#	0	1/232; 0,43 %
Veen, 2016	125	7	99,2 % # **	1/125; 0,80 %	–
Topolovec, 2014	587	11	96,1 % (94,3 – 97,9 %) *#	13/587; 2,21 %	13/587; 2,21 % §
Milošev, 2012	200	10	98,4 % (96,6 – 100 %) *#	1/200; 0,5 %	0 §
Korovessis, 2011	153	11	97,5 % (94,0 – 99,0 %) *	4/153; 2,61 %	6,54 %
Schmolders, 2016	81	13,5	96,8 % (90,5 – 98,9 %) *#	4/81; 4,94 %	12/81; 14,81 %
Ottink, 2015	218	14,4	97 % (0,95 – 0,99 %) *#	7/218; 3,21 %	–

AU = aseptické uvolnění, PPOL = periprotetická osteolýza, # = reoperace z jakéhokoliv důvodu, * = v závorce je uveden 95% interval spolehlivosti, ** = přežití k 7. roku, § = osteolýza hodnocena jen u revidovaných pacientů.

Tab. 5. Rychlost otěru polyetylen u jamky Bicon-Plus

Autor	Počet kyčlí	Délka sledování (roky)	Kloubní pár	Průměr hlavičky	Metoda měření	Lineární otěr (mm)	Lineární otěr (mm/R)
Zweymuller, 2007	232	10	Ker-PE	?	Hall	1,33 ± 0,66	0,13
Ottink, 2015	218	14,4	Ker-PE	32 mm	Rogan-Delft software	1,80	0,12
Korovessis, 2011	153	11	Ker-PE	28 mm	Diagnostic PRO Advantage	–	0,059 ± 0,06

Ker = keramika; PE = polyetylen; R = rok; ? = není explicitně uvedeno.

s menším abdukčním úhlem náhrady, přičemž však i u těchto jamek je hodnota abdukčního úhlu v rozsahu 30°–50°, kdy by na základě studií (14, 15, 35) mělo docházet k nejmenšímu opotřebení artikulační vložky. Uložení mimo optimální rozsah je spjato s vyšší rychlostí otěru, případně s poškozením jamky frakturou.

Mnohem méně víme o reálném rozložení a velikosti síly působící na kloub při zátěži a o způsobu zatěžování jednotlivými pacienty. Tento fakt do velké míry ovlivňuje přežití náhrady v důsledku opotřebením, případně jejího uvolnění. Doposud však nebyla publikována práce, která by porovnávala reálné parametry zatěžování kloubní soustavy při běžných aktivitách v souvislosti s objemovým opotřebením implantátu. Jedná se pouze o simulace jednotlivých stavů za pomoci numerických metod. Tato studie se snaží poukázat na fakt, že geometrie, poloha a způsob uložení jamky při její implantaci mají zásadní vliv na její životnost. Dalšími parametry, které rovněž nelze opomenout, je konkrétní materiálová kombinace, případně velikost implantátu (33).

Následně byla data rozšířena o porovnání topografie artikulačního povrchu. U těchto výsledků je nutné poukázat na vzorky, kde byla zaznamenána největší četnost drsností v rozsahu 0,1–0,3 μm (tab. 3). Tato hodnota drsnosti je vykazována u povrchů, kde došlo v důsledku proběhlé artikulace k výraznému vyhlazení povrchu oproti drsnosti dosažené při výrobě jamky. Jde přitom o mechanismus abrazivně adhezního opotřebením s přítomností významných paralelních rýh od kovové femorální hlavičky (25). V našem souboru však polyetylen artikuloval s keramickou hlavičkou. Toto opotřebením bylo pozorováno výhradně u pacientů, kde nedošlo k uvolnění jamky, a ve vícero případech předcházelo vzniku mikrotrhlin – pittingu (obr. 7d) či odlupování větších povrchových vrstev (obr. 7c). Tento jev je možné pozorovat u implantátů s průměrnou dobou přežití 10,5 roku (SD 2,5 roku). Avšak plastická deformace a dela-

minace materiálu mohou souviset také s uvolněním jamky. U tohoto typu selhání je možné předpokládat změny směru zatěžování, které mohou způsobovat tento důsledek a případně vést až ke kolizi okraje jamky s krčkem femorální hlavičky, což se projevilo u některých našich pacientů (konkrétně u pacientů č. 08, 10, 12). Změna rozložení tlaku vlivem natočení vložky je popsána v několika studiích (11, 23).

Další korelací, která je identifikována u jamek s převážující drsností v rozsahu 0,1–0,3 μm, je poměrně velký úhel vektoru opotřebením stanovený za pomoci optické metody. U implantátů s nejdelší dobou přežití, u kterých současně nedošlo k uvolnění acetabulární jamky, byl stanovený průměrný úhel směrového vektoru 56,8° (SD 2,1°). Tyto výsledky jsou unikátní, a nemůžeme je proto porovnat s literárními údaji. Z hlediska biotribologických procesů vyplývajících z pozorování je přežití implantátu spojené tedy i se strukturou povrchu. V běžných podmínkách, kdy je implantát uložený do těla v rozmezí doporučovaných abdukčních úhlů, a za předpokladu stability implantátu dochází k rovnoměrnému opotřebením a vyhlazování povrchu.

Metody schopné testovat parametry konkrétního souboru extrahovaných implantátů můžeme v uvedeném kontextu chápat jako nezbytné analytické nástroje pro zpětné hodnocení procesů opotřebením TEP kyčle. Z hlediska geometrie náhrady hraje dále velmi podstatnou roli i velikost průměrové vřle. Studie (1) se zabývala vlivem velikosti vřle na koeficient tření mezi povrchy, kdy byl pozorován trend snižujícího se tření se snižující se vřlí mezi komponentami. Stejně chování bylo popsáno i v další literatuře (3), kdy byl zaznamenán pokles opotřebením u dvojic s menší vřlí. Tento efekt byl pozorován jak v případě 36 mm, tak 54 mm implantátu. S ohledem na vliv průměru tak autoři konstatovali, že velikost implantátu by měla být co možná největší při zachování co možná nejmenší průměrové vřle. V této souvislosti je

třeba také zmínit problematiku mazání, která má bezpochyby na opotřebením implantátů zásadní vliv. Z tohoto pohledu je rozhodující především tloušťka mazacího filmu (32) a adsorpce proteinů na třecí povrchy (22). Přitom bylo v literatuře poukázáno na fakt, že utváření proteinového mazacího filmu mezi komponentami náhrady je ovlivněno jak materiálovou kombinací (18, 19), tak geometrií (34), a především pak velikostí náhrady a průměrovou vůlí (17). Rovněž je třeba vzít v úvahu složení synoviální kapaliny, která se liší v závislosti na mnoha faktorech, jako je pohlaví, věk, zdravotní stav apod. (8).

Pokud jde o limitace provedené studie, je třeba zmínit zejména malý soubor analyzovaných implantátů. Dále by bylo nepochybně vhodné doplnit povrchové analýzy o stanovení oxidačního indexu extrahovaných polyetylenů. Tuto metodu však v současné době nemáme k dispozici.

ZÁVĚR

V této práci předkládáme výsledky morfologické analýzy extrahovaných jamek Bicon-Plus. Zjistili jsme relativně vysokou rychlost otěru, který byl převážně abrazivně adhezivního typu. Závislost mezi otěrem a délkou implantátu *in situ* nebyla jednoznačně lineární, což ukazuje na vliv dalších parametrů na rychlost opotřebením polyetylenu. Přesto doporučujeme pacienty s tímto implantátem pravidelně sledovat, zvláště po 10. roce od operace. Důležitý vliv na celkové přežití implantátu má také jeho poloha po implantaci. Zdá se dokonce, že jde o významnější parametr, nežli jsou charakteristiky pacienta. Z optických měření je možné pozorovat vliv směrového vektoru opotřebením na topografii povrchu. Při vyšších úhlech byla celková stanovená drsnost menší, což se projevilo hlavně na stabilitě jamky, a tím i na jejím přežití po implantaci.

Literatura

1. Brockett CL, Harper P, Williams S, Issac GH, Dwyer-Joyce RS, Jin Z, Fisher J. The influence of clearance on friction, lubrication and squeaking in large diameter metal-on-metal hip replacements. *J Mater Sci Mater M*. 2008;19:1575–1579.
2. Cichy Z. [Treatment of dysplastic acetabulum using total hip arthroplasty: our intermediate-term results]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2006;73:340–344.
3. Dowson D, Hardaker C, Flett M, Isaac GH. A hip joint simulator study of the performance of metal-on-metal joints – Part II: Design. *J Arthroplasty*. 2004;19:124–130.
4. Dumbleton JH, Manley MT, Edidin AA. A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2002;17:649–661.
5. Dungl P, Stedry V, Hajny P. [Medium-term Experience with Zweymuller's Bicon Plus Cup in the Treatment of Postdysplastic Osteoarthritis of the Hip Joint.]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2000;67:88–92.
6. Edidin AA, Rinnac CM, Goldgber VM, Kurtz SM. Mechanical behavior, wear surface morphology, and clinical performance of UHMWPE acetabular components after 10 years of implantation. *Wear*. 2001;250:152–158.
7. Fulín P, Pokorný D, Šlouf M, Nevalová M, Vacková T, Dybal J, Kaspíková N, Landor I. [Analysis of Oxidative Damage to Components Removed from Beznoska/Poldi Total Hip Replacements]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2016;83:155–162.
8. Galandáková A, Ulrichová J, Langová K, Hanáková A, Vrbka M, Hartl M, Gallo J. Characteristics of synovial fluid required for optimization of lubrication fluid for biotribological experiments. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2016.
9. Gallo J, Havranek V, Cechova I, Zapletalova J. Wear measurement of retrieved polyethylene ABG 1 cups by universal-type measuring microscope and X-ray methods. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150:321–326.
10. GOM. GOM mbH, ATOS - Industrial 3D Scanning Technology. Available at: <http://www.gom.com/metrology-systems/3d-scanner.html>.
11. Korhonen RK, Koistinen A, Kontinen YT, Santavirta SS, Lappalainen R. The effect of geometry and abduction angle on the stresses in cemented UHMWPE acetabular cups - Finite element simulations and experimental tests. *Biomed Eng Online*. 2005;4:32.
12. Korovessis P, Repantis T, Zafirooulos A. High medium-term survivorship and durability of Zweymuller-Plus total hip arthroplasty. *Arch Orthop Traum Su*. 2011;131:603–611.
13. Kurtz SM, Turner J, Herr M, Edidin AA, Rinnac CM. Assessment of surface roughness and waviness using white light interferometry for short-term implanted, highly crosslinked acetabular components. In: Kurtz SM, Gsell, RA, Martell, J, (eds). *Crosslinked and thermally treated ultra-high molecular weight polyethylene for joint replacements*. ASTM International, West Conshohocken, 2004, pp 41–56.
14. Little NJ, Busch CA, Gallagher JA, Rorabeck CH, Bourne RB. Acetabular Polyethylene Wear and Acetabular Inclination and Femoral Offset. *Clin Orthop Relat R*. 2009;467:2895–2900.
15. McBride A, Flynn J, Miller G, Barnes M, Mackie S. Body mass index and acetabular component position in total hip arthroplasty. *ANZ J Surg*. 2013;83:171–174.
16. Milosev I, Kovac S, Trebse R, Levasic V, Pisot V. Comparison of ten-year survivorship of hip prostheses with use of conventional polyethylene, metal-on-metal, or ceramic-on-ceramic bearings. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94:1756–1763.
17. Nečas D, Vrbka M, Urban F, Křupka I, Hartl M. The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements. *J Mech Behav Biomed*. 2016;55:295–307.
18. Nečas D, Vrbka M, Křupka I, Hartl M, Galandáková A. Lubrication within hip replacements - Implication for ceramic-on-hard bearing couples. *J Mech Behav Biomed*. 2016;61:371–383.
19. Nečas D, Vrbka M, Urban F, Křupka I, Hartl M. The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements. *J Mech Behav Biomed*. 2015;55:295–307.
20. Ottink K, Barnaart L, Westerbeek R, van Kampen K, Bulstra S, van Jonbergen HP. Survival, clinical and radiological outcome of the Zweymuller SL/Bicon-Plus total hip arthroplasty: a 15-year follow-up study. *Hip Int* 2015;25:204–208.
21. Palousek D, Omasta M, Koutny D, Bednar J, Koutecky T, Dokoupil F. Effect of matte coating on 3D optical measurement accuracy. *Opt Mater*. 2015;40:1–9.
22. Parkes M, Myant C, Cann PM, Wong JSS. The effect of buffer solution choice on protein adsorption and lubrication. *Tribol Int*. 2014;72:108–117.
23. Patil S, Bergula A, Chen PC, Colwell JR, CW, D'Lima DD. Polyethylene wear and acetabular component orientation. *J Bone Joint Surg A*. 2003;85:56–63.
24. Pavelka T, Linhart M, Houček P. [Hip joint arthroplasty following surgical treatment of acetabular fracture]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2006;73:268–274.
25. Pruitt LA, Chakravartula AM. *Mechanics of biomaterials: Fundamental principles for implant design*. Cambridge University Press, New York, 2011.
26. Ranuša M, Gallo J, Vrbka M, Hobza M, Paloušek D, Křupka I, Hartl M. Wear analysis of extracted polyethylene acetabular cups using a 3D optical scanner. *Tribol Trans*. 2017;60:437–447.
27. Rossler T, Mandat D, Gallo J, Hrabovsky M, Pochmon M, Havranek V. Optical 3D methods for measurement of prosthetic wear of total hip arthroplasty: principles, verification and results. *Opt Express*. 2009;17:12723–12730.
28. Schmolders J, Amvrazis G, Pennekamp PH, Strauss AC, Friedrich MJ, Wimmer MD, Rommelspacher Y, Wirtz DC, Wallny T. Thirteen year follow-up of a cementless femoral stem and a threaded

- acetabular cup in patients younger than fifty years of age. *Int Orthop.* 2017;41:39–45.
29. Topolovec M, Milosev I. A comparative study of four bearing couples of the same acetabular and femoral component: a mean follow-up of 11.5 years. *J Arthroplasty.* 2014;29:176–180.
30. Trommer RM, Maru MM, Oliveira Filho WL, Nykanen VPS, Gouvea CP, Archanjo BS, Martins Ferreira EH, Silva RF, Achete CA. Multi-scale evaluation of wear in UHMWPE-metal hip implants tested in a hip joint simulator. *Biotribology.* 2015;4:1–11.
31. Veen EJ, Schrier JC, Van'T Riet E, Breslau MJ, Barnaart AF. Outcome of the cementless Zweymuller BICON-PLUS Cup and SL-PLUS stem in the very elderly individuals. *Geriatr Orthop Surg Rehabil.* 2016;7:74–80.
32. Vrbka M, Návrat T, Křupka I, Hartl M, Šperka P, Gallo J. Study of film formation in bovine serum lubricated contacts under rolling/sliding conditions. *P I Mech Eng J-J Eng Tribol.* 2013;227:459–475.
33. Vrbka M, Nečas D, Bartoščík J, Hartl M, Křupka I, Galandáková A, Gallo J. [Determination of a friction coefficient for THA bearing couples]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2015;82:341–347.
34. Vrbka M, Nečas D, Hartl M, Křupka I, Urban F, Gallo J. Visualization of lubricating films between artificial head and cup with respect to real geometry. *Biotribology.* 2015;1–2:61–65.
35. Wan Z, Boutary M, Dorr LD. The Influence of Acetabular Component Position on Wear in Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2008;23:51–56.
36. Zolotarevova E, Entlicher G, Pavlova E, Slouf M, Pokorný 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;6:3595–3600.
37. Zweymuller KA, Steindl M, Schwarzingler U. Good stability and minimal osteolysis with a biconical threaded cup at 10 years. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;463:128–137.

Korespondující autor:

prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP a FNOL
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz



Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner

Matůš Ranuša, Jiří Gallo, Martin Vrbka, Martin Hobza, David Paloušek, Ivan Křupka & Martin Hartl

To cite this article: Matůš Ranuša, Jiří Gallo, Martin Vrbka, Martin Hobza, David Paloušek, Ivan Křupka & Martin Hartl (2017) Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner, Tribology Transactions, 60:3, 437-447, DOI: [10.1080/10402004.2016.1176286](https://doi.org/10.1080/10402004.2016.1176286)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10402004.2016.1176286>



Accepted author version posted online: 09 May 2016.
Published online: 25 Aug 2016.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 229



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 9 [View citing articles](#)

Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner

Matúš Ranuša^a, Jiří Gallo^b, Martin Vrbka^a, Martin Hobza^b, David Paloušek^a, Ivan Křupka^a, and Martin Hartl^a

^aFaculty of Mechanical Engineering, Institute of Machine and Industrial Design, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic; ^bDepartment of Orthopaedics, University Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

ABSTRACT

Wear analysis of total hip replacements (THRs) is considered one of the most relevant research areas helping to improve the longevity and overall design of THRs. The coordinate machine method (CMM) and Fourier profilometry are the most common methods for measuring THR wear. This article presents optical scanner digitalization as a new method for measuring the wear of polyethylene (PE) acetabular cups. The aim of this article is to explore the potential of this method for the PE wear measurements. Optical scans for the purposes of this study were produced using an ATOS Triple Scan 3D optical scanner. The optical scanner is efficient and it can measure a large number of points for polygonization and for further development of the preworn models. In this study, the scanner first generated point clouds on a sample of 13 retrieved ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) acetabular cups. Next, volumetric models of the cups were created by polygonizing the point clouds. Reverse engineering was used to develop models of the original acetabular cups using the geometry of the unworn parts of the retrieved cups. A comparison of the two models then showed the total volume of the PE debris. The optical scanning method was validated against the gravimetric method using three new acetabular cups that were worn out on a hip pendulum simulator. Validation shows that the optical scanning method is a valid method for wear analysis of the retrieved UHMWPE acetabular cups.

ARTICLE HISTORY

Received 15 December 2015
Accepted 5 April 2016

KEYWORDS

Total hip replacement; polyethylene; wear measurement; optical digitalization; volumetric wear

Introduction

Total hip replacement (THR) is currently the most effective treatment of a number of hip afflictions that helps to alleviate pain and improve quality of life. This surgical procedure consists of removing the damaged joint surfaces and replacing them with artificial ones—an acetabular cup articulating surface with femoral head on a femoral stem. The most common combination of bearing materials is a polyethylene (PE) acetabular cup articulating with a metal or ceramic head.

Along with a growing number of THRs, there is a growing need for revision surgeries due to prosthesis failure. Projected estimates made for the United States show that by 2030 the demand for primary THA will grow by 174% for primary surgery and 137% for revision surgery compared to the levels in 2005 (Kurtz, et al. (1)). By far, the main reason for a revision surgery is aseptic loosening followed by infection and dislocation. Aseptic loosening is causally associated with liberation of huge amount of prosthetic wear particles from the bearing surfaces. These particles stimulate the receptors of innate immunity to trigger a foreign body host response driven predominantly by macrophages and fibrocytes (Gallo, et al. (2)). That is why manufacturers and researchers are motivated to develop bearing materials with increased resistance to wear.

In order to measure the amount and rate of prosthetic wear, various in vivo and in vitro methods have been developed offering clinicians as well as researchers the ability to determine

damage to the prosthetic cup liner (Patel, et al. (3)). In vivo wear measurement methods rely on the assumption that a definite relationship exists between a quantifiable X-ray penetration of the prosthetic head in the cup and the true amount of wear. However, this article focuses only on in vitro methods. Gravimetric methods are suitable for evaluation of the cups tested under repetitive load cycle in special hip joint simulators when the pretest weight of a cup is known. The gravimetric method is also suitable for assessment of artificially worn components in experimental settings. The approach is defined by international standards ISO 14242 (Affatato, et al. (4)). The accuracy of this method is a minimum of 0.1 mg according to ISO 14242–2 (5).

However, this method is not useful for the analysis of extracted hip implants because the weight of the original cup in a preworn stage is not known. Therefore, development of alternative methods allowing the measurement of volumetric wear in a retrieved cup without knowledge of its weight before its use is needed (Bills, et al. (6)).

One of these methods is the analysis of surface geometry by a coordinate measurement machine (CMM). It is the most common method for measuring the geometry in manufacturing practice for control of the shape and dimensions of product elements. Use of this method has also become a correct standard method for the measurement of THR volumetric wear during in vitro tests (Bills, et al. (7); Martell, et al. (8)). A precise description of

this method is clearly summarized in ISO 14242-2 (5), where a particular focus is dedicated to the maximum axial position error of measurement, which is described as $D = 4 + 4l \times 10^{-6}$ (D = volumetric position error in micrometers, and l = measuring length of the work envelope in millimeters). A location change of specimen must affect the volume by no more than 0.05%, and the point mesh spacing should be <1 mm. This standard offers a fundamental basis for the volumetric wear analysis with defined uncertainty of THR measurement (ISO 14242-2 (5)).

There are many studies describing the uncertainty and postprocessing algorithm related to this method. Kothari, et al. (9) published one of the first studies discussing the use of a CMM method to evaluate 22 retrieved THR components. Three hundred and twenty-five points were measured on the surface of a sample. The analysis was carried out in vitro and the examined implants were from metal material (Kothari, et al. (9)). The declared accuracy of this method was $\pm 5 \mu\text{m}$, with the definition described in geometrical product specification for CMM system declaration by ISO 10360-2 (10). Becker and Dirix (11) evaluated the precision of this method in the study comparing two CMM methods with a standard precision of $2.6 \mu\text{m}$ and a high precision of $1.2 \mu\text{m}$. Lord, et al. (12) assessed metal-on-metal THR components, analyzing 32 femoral heads and 22 acetabular cups. The aim was to evaluate the effectiveness of the CMM method against a conventional gravimetric method. To determine the volumetric wear, a program using mathematical software was created. This program aimed to identify the origin of the spherical components from as wide an area of the articulating surface as possible. Then the worn area was localized. Results of this study were verified by the gravimetric method. A validation procedure compared the mathematical and the gravimetric method. In Lord, et al. (12), three stages of mean absolute error—0.53, 0.50, and 0.24 mm^3 —were reported for metal components. Another study examined distribution of the scan lines. The results deal with the impact of the scanning method (polar, planar, etc.), distances between the scan lines, and distribution of points along a single scan line (Bills, et al. (6)).

An innovative surface analysis methodology is the optical method. A noncontact analysis provides simplification of measurements and postprocessing analysis. On the other hand, it offers new possibilities for postprocessing the scanned geometry. The main method used for complex analysis of THR geometry is based on reflectivity of the surface. Reflection of the incident beam is processed by an active or passive triangulation.

One of the studies focused on the use of a noncontact scanning method using Fourier profilometry (Rossler, et al. (13)). The study deals with a sinusoidal grating projector that creates an optical pattern on the object. This pattern is deformed by refraction on the surface, which is reflected in changes of its phase. The image is recorded by a digital camera. Information about the geometry and topographic depth is obtained by the image processing and by the mathematical algorithm computing the phase shift toward the reference plane. A relative percentage difference of this method compared to the gravimetric method is approximately 6.3% depending on the rate of volumetric wear (Rossler, et al. (13)).

Another approach, called scanning profilometry, uses only a one-strip projection. For the analysis of all surfaces, the object is rotated. The sensitivity and accuracy of this method depends on the size of the angle of object rotation. As a result, the whole profile is created by connecting the individual linear scans. The third coordinate is determined from the equal compared reference plane and the plane of refraction. The relative percentage difference of this method compared to the gravimetric method is about 10% (Pochmon, et al. (14)).

Zou, et al. (15) studied the macrostructure surface of acetabular cups. To establish an accurate method for digitizing a convex hemispherical shape, a laser probe fitted on a CMM machine is used. The principle of this optical method is based on triangulation. The surface was digitized at 0.1-mm intervals in X and Y directions divided into six scans. Then discrete points were merged into one surface data. Reproducibility of the method shows a volumetric difference of 1.411 mm^3 (Zou, et al. (15)).

Yun, et al. (16) used 3D optical scanning for validation of the reliability of a power point method to recognize volumetric wear in vivo from radiographs. This method is applied on 17 retrieved PE acetabular cups. A 3D laser scanner used for the analysis of the cup has a resolution of 2.0 megapixels and precision less than 0.01 mm. Data are postprocessed using special software (Geomagic, Morrisville, NC). The mean wear volume achieved by the 3D laser scanning method is $1,146.72 \pm 576.59 \text{ mm}^3$. The main message is to show that the power point method correlated well with the 3D scanning method (Yun, et al. (16)).

The aim of this article is to demonstrate the optical method as a method suitable for determination of volumetric wear and material loss. This method is applicable for retrieved PE acetabular cups at various stages of wear. The data obtained from the 3D digitizing process by the optical scanner are processed and evaluated using computer-aided design (CAD). Using a post-processing algorithm, it is possible to determine the amount of volumetric wear. A particular focus is given to validation of this method by the standard gravimetric method. This method ranks among the most innovative methods in the respective field to determine the volumetric wear of PE acetabular cups. Information on volumetric wear can be used to suggest an effective modification of geometry that would lower the friction and wear by effectively moving the lubrication regime away from the boundary regime toward the mixed and hydrodynamic lubrication regimes (Dougherty, et al. (17); Choudhury, et al. (18)).

As indicated above, the CMM and the gravimetric method are the two most widely used methods for determining the volumetric wear on acetabular cups in vitro. These methods are very precise and have high confidence levels. In recent years, these methods have been supplemented with optical methods to obtain a more comprehensive and time-efficient analysis. The main advantage of the approach described in this article is its ability to reconstruct the unworn geometry of the cup. The analysis of geometry is made on the basis of a large number of points forming the point clouds. This advantage opens new opportunities for analytic and statistical approaches for determination of volumetric wear.

Table 1. Characteristics of the patients enrolled in the study.

Patient	Gender	Weight (kg)	Body ms index	Age (years)	Side	Date of revision	Duration (months)	Type of patient ^a	Reason for revision
1	M	66	24.24	67	Right	January 27, 2015	145	B	Periprosthetic fracture, wear
2	F	48	19.23	48	Right	October 10, 2011	126	B	Aseptic loosening ^b
3	F	75	27.55	55	Left	November 5, 2012	120	B	Aseptic loosening–stem
4	F	63	24.01	61.5	Right	September 11, 2013	131.5	B	Aseptic loosening
5	M	103	32.51	52	Right	January 30, 2012	75	A	Painful hip
6	F	88	34.38	77	Right	January 22, 2014	48.5	B	Aseptic loosening
7	M	100	30.86	73	Left	May 14, 2013	89.5	A	Aseptic loosening–stem
8	F	58	21.05	43	Left	October 20, 2010	92.2	B	Fracture of the cup
9	F	56	23.31	63	Right	October 30, 2013	164	B	Aseptic loosening
10	F	72	26.77	53	Right	September 24, 2014	53.6	A	Aseptic loosening
11	F	77	26.96	69	Left	March 12, 2014	61.9	A	Aseptic loosening
12	F	60	22.04	77	Right	September 14, 2010	43	B	Aseptic loosening
13	F	68	29.05	59	Left	April 20, 2011	114.6	B	Aseptic loosening

^aThe Charnley classification tries to estimate the level of walking capacity, with class A having no disturbance in locomotion, class B with bilateral hip disease (or hip and knee) and normal findings in other weight-bearing joints, and class C with severe compromise of locomotion due to multiple joint involvement.

^bBoth components.

Materials and methods

Components

The new method of wear evaluation was demonstrated on 13 acetabular cups with a diameter of 28 mm (Table 1). All extracted acetabular cups were part of the Bicon-plus cup (Plus Endoprothetik AG, Rotkreuz, Switzerland; later Smith and Nephew). Ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) was made of RCH-1000 Chirulen (Quadrant PHS Deutschland GmbH, Vreden, Germany) according to ISO 5834-2 and ASTM F648. The UHMWPE liner was gamma radiation sterilized (cobalt-60) while sealed in a threefold pouch in a nitrogen atmosphere. The dose adopted was between a minimum of 25 kGy and a maximum of 37 kGy (Milosev, et al. (19)). There is a consistent agreement in clinical studies that the UHMWPE represents an improvement in wear over conventional PE (Williams, et al. (20)). The extracted cups were produced in two designs. The first design was a standard acetabular cup and the second design was an acetabular cup with an elevated rim (the so-called antiluxation modification). Retrieved prostheses were obtained at revision surgeries between 2010 and 2015. All surgeries were performed by one surgeon. The component's survival time in situ was on average 97.29 months (range = 43–145, SD = 37.83 months). After prosthesis extraction, all of the PE liners were mechanically cleaned, immersed in a disinfectant for 24 h, and then sterilized routinely for 2 h. All retrieved cups were obtained under standard conditions with written informed patient consent, and the study was approved by the local Ethics Committee (as a part of project NT11049-5, Ministry of Health, Czech Republic).

New acetabular cups with a diameter of 28 mm were used as reference samples for validation of the method. The new acetabular cups were Durasul Low Profile Cups produced by Zimmer (size 50/28). Validation was replicated on three independent samples to eliminate measurement and manufacturing random errors.

Optical scanning method

Acetabular cups were measured using an 3D ATOS Triple Scan optical scanner (Fig. 1). This optical system is based on active fringe projection and triangulation. The ATOS Triple Scan uses

blue light technology in three viewing angles between the stereo camera and projector. With this approach, the measurements are not dependent on environmental factors and therefore it is not necessary to maintain constant environmental conditions during the measurements. A fringe pattern is projected on the object to be measured and the image is acquired using a two-camera system (Fig. 2). The final scan is composed of multiple partial scans that are aligned according to the reference points detected by software.

For measurement of the acetabular cups, the reference points with a diameter of 0.8 mm were positioned on the surface of the cups outside their evaluated areas (GOM (21)). The measurement was carried out with MV170 lenses with a measurement volume of 170 × 130 × 130 mm calibrated in a small object arrangement. The lenses complied with VDI/VDE2634-3 (22). Further parameters of the measuring equipment are shown in Table 2.

The scanner was calibrated according to the procedures as defined by the producer. Results of calibration are shown in Table 3.

The surface of PE acetabular cups was too transparent for scanning and it was necessary to apply a layer of TiO₂ coating. An airbrush system was used to apply an approximately 3 μm coating (Palousek, et al. (23)). The acetabular cup was fixed in the middle of a rotary measurement table. The scanner was focused on the center of the acetabular cup at a scanning

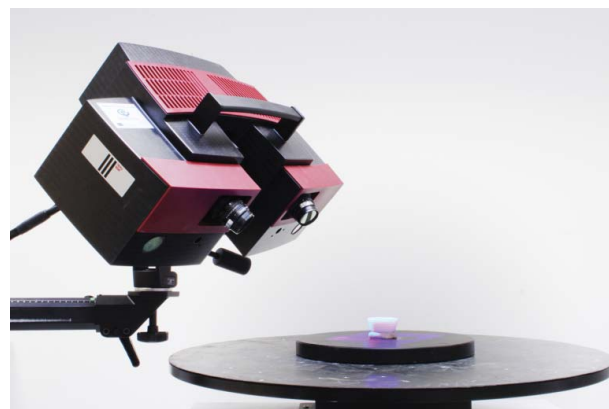


Figure 1. Measuring by ATOS III Triple Scan 3D optical scanner.

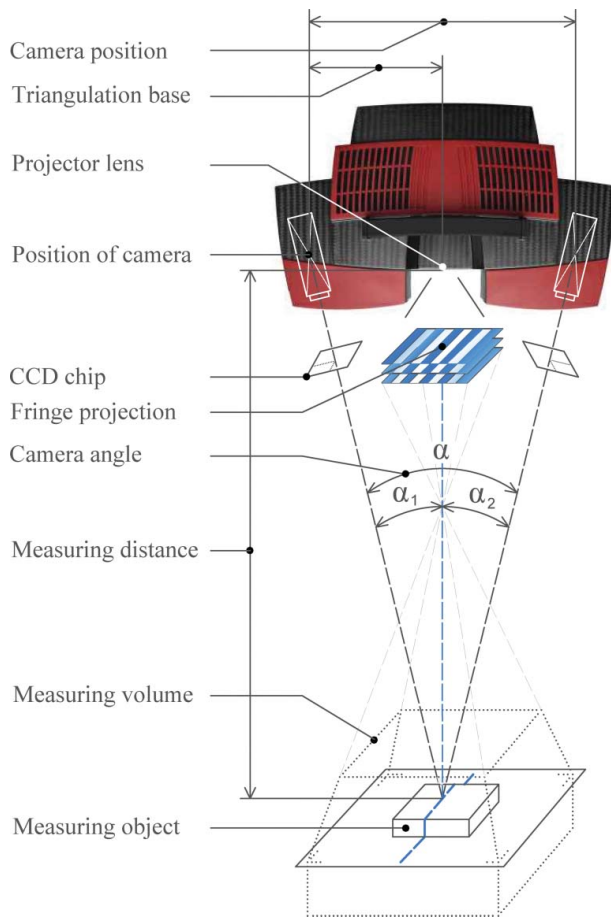


Figure 2. Principle of ATOS 3D optical system.

distance of 490 mm. Each individual scan consists of a large number of isolated points, technically described as a point cloud. Approximately six partial scans were used for the final scan to be used in postprocessing.

Polygonization and definition of coordinate system

After the measurement, the data were postprocessed using the software GOM Inspect (GOM mbH). First, the scan was polygonized. For the purpose of further analysis, only the articulating surface and its close surroundings were necessary; redundant data were removed. Next, the polygonized object was reconstructed by removing and filling in damage caused by the surgeon during extraction of THR components (Fig. 3). Surgical damage was identified after analyzing and considering

Table 2. Parameters of GOM ATOS III Triple Scan 3D scanner (Palousek, et al. (23)).

Parameters	ATOS Triple Scan
Camera pixels (Mpx)	2 × 8
Measuring volume (mm)	170 × 130 × 130
Measuring distance (mm)	490
Lamp	LED
Focal length camera lenses (mm)	40
Focal length projector lens (mm)	60
Point distance (mm)	0.055
Reference points diameter (mm)	0.8
Camera position	Small object

Table 3. Results of calibration.

Parameters	Results of calibration
Deviation of calibration (pixels)	0.033
Optimized deviation of calibration (pixels)	0.020
Calibration of projector (pixels)	0.118
Optimized calibration of projector (pixels)	0.019
Angles of cameras (°)	27.2
Temperature (°C)	24
Type of calibration object	CP40-170-40346

the procedures used for extracting of THR implants. After these modifications, the polygonized geometry was smoothed with a surface tolerance of 3 μm to remove the surface roughness and possible coating defects that could distort the measurements.

A reference coordinate system for cup geometry was created using three fitting elements: a line, a point, and a plane.

The line represented the direction of the wear path (also described as a wear scar) and was used to identify the unworn parts of the samples. The 3D model was created on the basis of the nominal value of the acetabulum diameter. The direction of the wear scar was obtained by an initial comparison of the measured data with the nominal data of the new acetabular cup using the best-fit function of GOM Inspect. This comparison rendered a map of deviations that enabled us to infer the final direction of the wear scar (Fig. 4).

The point was defined by the center of a sphere with a diameter corresponding to the original dimensions of the acetabular cup. The sphere itself was created using the Gaussian best-fit method on a cloud of points of the unworn region. A selection of points defining the unworn region is made manually according to the deviations from the ideal model. Cups with higher wear volumes have a clearly identifiable line between the worn and unworn regions. The selected points were then evaluated with three sigma statistical criteria enabling use of 99.73% of the points.

The plane was defined by the rim of the acetabular cup. A selection of points was performed automatically. A different method of point selection was used for antiluxation cups where the definition points were located only on the outer edge of the rim.

Polygonal data with the defined coordinate system were then used to determine the wear vector as a vector originating from the center of the unworn cup geometry to the most worn point on the inner surface of the cup. The center of the unworn region is defined by the point in the center of the coordinate system as described above. The center of the worn region is defined by the best-fit function applied to the selection of data in the direction of the wear scar. This can be calculated using the basic linear algebra equation for the angle between the two vectors (Fig. 5; Uddin (24)).

The surface of the original acetabular cup was defined by fitting the primitives on unworn parts of the extracted acetabular cup as described above (Fig. 6d). The original unworn model was created on the basis of the dimensions of the primitives from the unworn parts of the samples by means of reverse engineering (Fig. 6e). This method assumed that the original unworn surface was truly spherical and without roughness after machining.

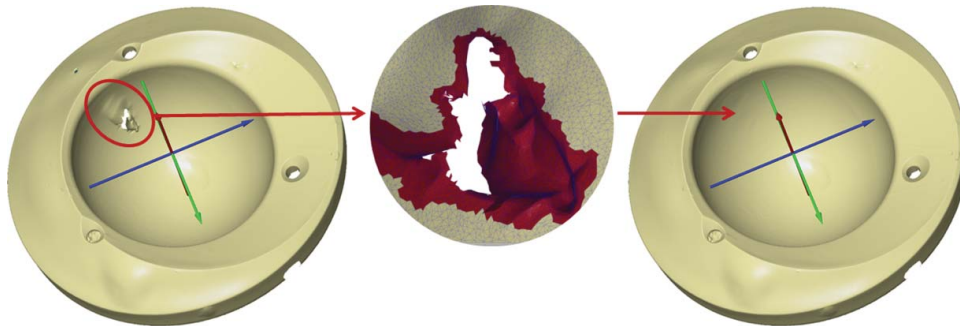


Figure 3. Reconstruction of extracted acetabular cup (GOM Inspect).

Surface and volume creation

Polygonal data were exported to STL (STereoLithography) format for further postprocessing with Geomagic Design X (3D Systems GmbH) software (Fig. 6b). First, the surface model was generated from the polygonal data using the Geomagic auto-surface tool. The quality of this transformation was evaluated by comparing the rendered surface model with the polygonal data. This comparison showed a maximum deviation of $2 \mu\text{m}$, which is a negligible uncertainty (Fig. 7).

Next, the scanned geometry was trimmed and closed with a cylindrical geometry. Dimensions of the geometry were specified with respect to the extent of the volumetric wear. The cylindrical geometry had to include the whole articulation surface showing any material loss. The resulting surface model was suitable for transformation to the volumetric model using Geomagic tools (Fig. 6c).

In the next step, the volumetric model was compared with the model of the original acetabular cup. The resulting comparison shows the volume of material released to a human body during the life cycle of the cup (Fig. 6f).

Validation of method

The 3D scanning method was validated by a gravimetric comparison. Wear of the extracted cups was simulated simply by removing the material from new cups. The method specification

and preparation of specimen can be found in ISO 14242-2 (5). The samples were cleaned of the PE particles to avoid loosening of the particles during scanning.

A Kern ABS 320-4N analytic balance was used to determine the weight loss. Reproducibility of the balance was 0.2 mg and the linearity was ± 0.3 mg. The resolution was ± 0.1 mg, which results in the volumetric uncertainty of $\pm 0.106 \text{ mm}^3$ for PE analysis. Gravimetric measurements were performed at temperatures between 22 and 23°C at a constant humidity level. Gravimetric measurements were taken five times in order to reduce a random error. The average of the measurements was used for the gravimetric comparison.

The volume of the acetabular cup was multiplied by the density of UHMWPE (0.940 g/cm^3 ; McKellop, et al. (25)). The validation samples consisted of three noncemented new acetabular cups with a size of 50/28.

Wear was carried out on a hip pendulum composed of two main parts: a base frame with an acetabular cup and a pendulum with a femoral head. The pendulum was allowed to oscillate freely in the flexion–extension plane. The simulator setup is described in detail elsewhere (Vrbka, et al. (26)). The parameter of weight loss was defined as the decisive parameter for validation. The articulating surface of the metal (CoCrMo) femoral head was scratched to increase the material loss (Fig. 8). One test of volumetric wear lasted 1.5 h with a frequency of approximately 0.48 Hz. The test was performed without lubrication. Weights on pendulum arms ensured a total load of 2,080 N. The weight loss of the cups was measured in six cycles. The average weight loss after the sixth cycle was 0.075 g (80 mm^3). This material loss simulates the wear rate as discussed in previous research (Dumbleton, et al. (27)).

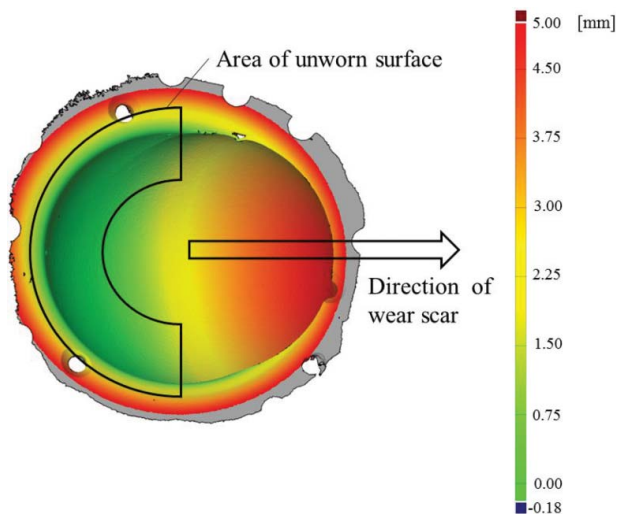


Figure 4. Definition of wear scar direction and coordinate system.

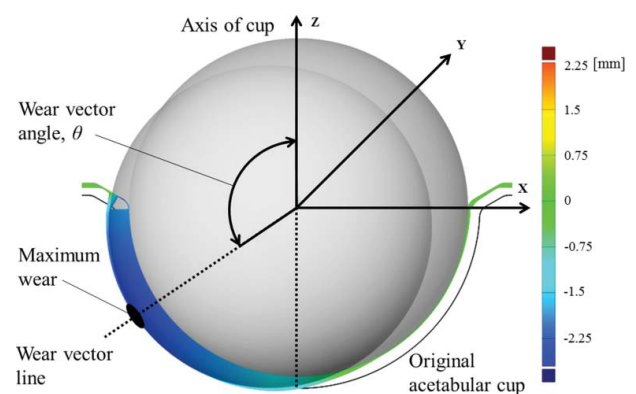


Figure 5. Determination of wear vector.

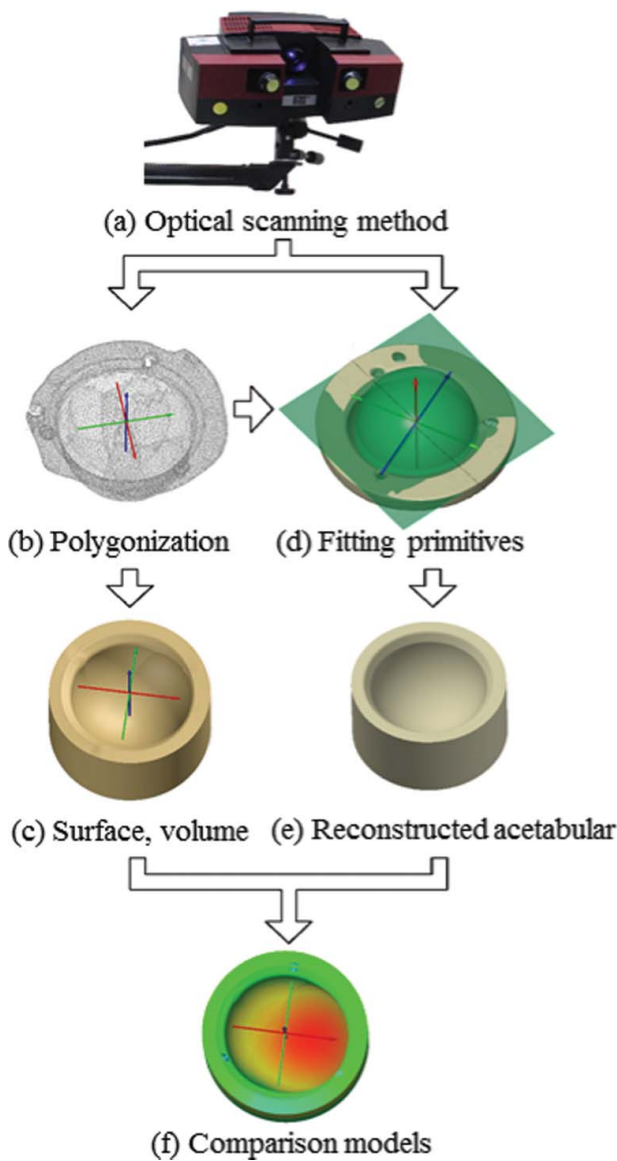


Figure 6. Process of evaluation of volumetric wear.

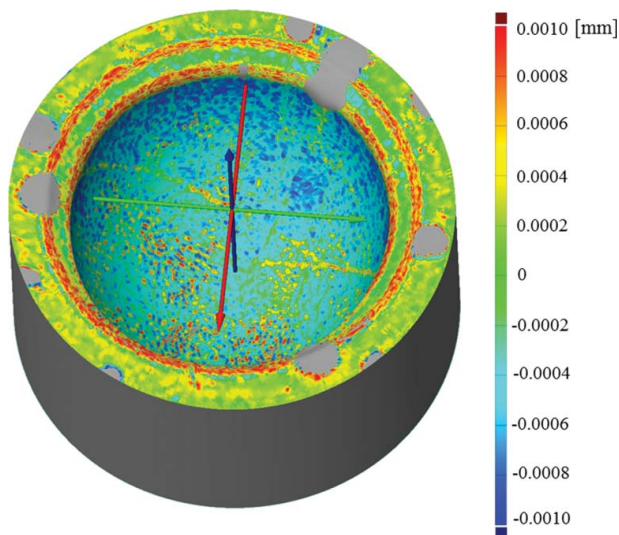


Figure 7. Comparison of 3D scan and reconstructed geometry.



Figure 8. Validation test by hip pendulum.

The sample was weighed before and after testing. In order to mount the acetabular cup on the hip pendulum, it was necessary to fix the outer rim into the epoxy resin mixture. All tests were performed with this fixation; each cup was thoroughly cleaned before weighing and scanning.

Results

Validation of 3D scanning method by gravimetric method

The material loss of the cups was measured in six cycles using both the gravimetric and 3D optical methods. Each cycle lasted 15 min and the process was replicated on three cups. Validation results are shown in Figs. 9a–9c. As can be seen, the mean difference between the reference gravimetric method and the optical scanning method was

- -0.0040 g (range -0.0352 to 0.0089 g) for cup 1 (Fig. 9a).
- -0.0021 g (range -0.0159 to 0.0051 g) for cup 2 (Fig. 9b).
- -0.0029 g (range -0.0286 to 0.0067 g) for cup 3 (Fig. 9c).

A significant difference in volumetric wear values measured with the gravimetric method and optical scanning method was present after the first 15-min cycle. This difference may have occurred due to the plastic deformation process. Polygonal data for each measurement were created on average from 191,500 points. This number of points ensures a high quality of surface transformation with deviations less than 0.002 mm as shown in Fig. 7. A volume calculation based on surface data was carried out using the CAD system calculation algorithm. The calculation was replicated using three independent software systems. The difference was less than 0.1 mm³; hence, the deviation of the calculation algorithm is considered negligible.

In order to demonstrate the time efficiency of the method, the duration of each step in the measurement process was recorded. Results are shown in Table 4.

Analysis of extracted acetabular cups

This study analyzed 13 extracted acetabular cups using the optical scanning method based on the principle of fringe

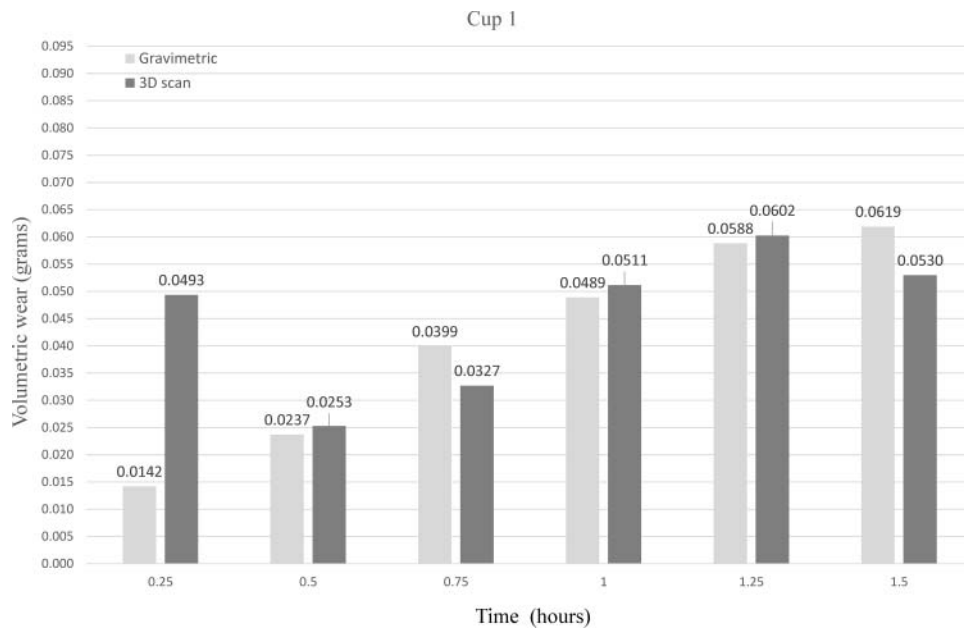


Figure 9a. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 1.

projection and triangulation. The cups were scanned using the ATOS III Triple scan to create digital representations of articulating surfaces of cups. Results of measurements and the analysis of 13 extracted UHMWPE bearing cups are shown in Table 5.

The nominal inner diameter of the extracted acetabular cups was 28 mm. The outer diameter varied; however, this had no influence on the results. Acetabular cups exhibited a mean volumetric wear of 395.53 mm³ (range = 51.80–1,119.70 mm³). The mean wear rate was 44.37 mm³/year (range = 9.98–125.85 mm³, SD = 32.45 mm³). Each measurement was replicated twice in order to eliminate scanning errors. Small differences between the measurements had no impact on quantification of volumetric wear. This can be supported by the

repeatability analysis of measurement. The results were supported by a study of survival of replacements produced by Bicon-plus where the mean linear wear of the Bicon-plus PE was 1.8 mm, which corresponds to 0.12 mm/year (Ottink, et al. (28)). Another study validates the results of the scanning method with a widely used radiographic method where the volumetric wear of the failed replacement ranged from 730 to 813 mm³ (Ilchmann, et al. (29)).

A new acetabular cup produced by the same producer as the extracted cups (Endoplus GmbH) was used as a reference sample for repeatability of the optical scanning method. Results of the repeatability test are shown in the graph below (Fig. 10). Repeatability was evaluated on the basis of the software-determined value of the inner diameter using the best-fit function.

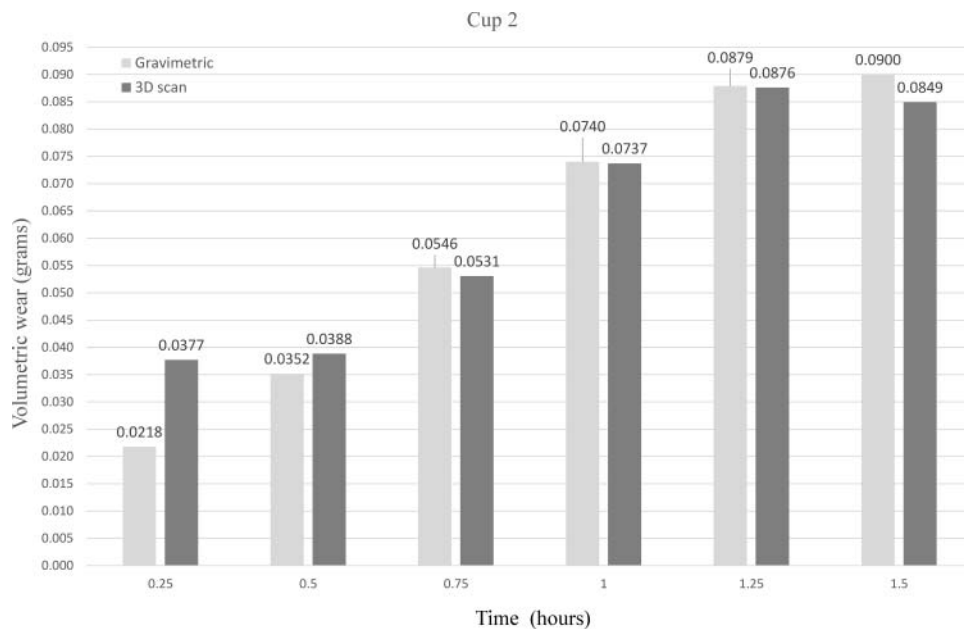


Figure 9b. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 2.

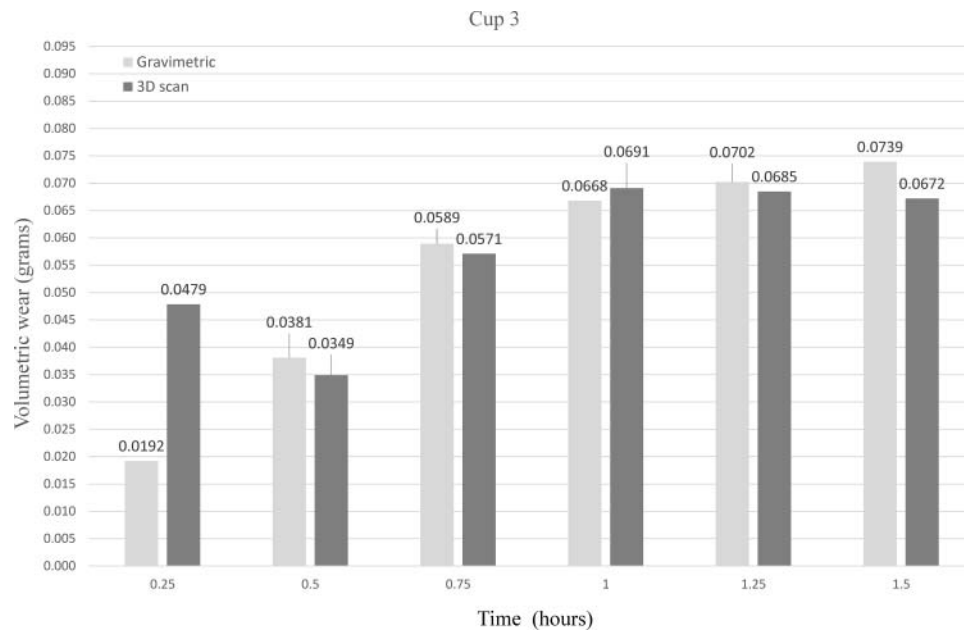


Figure 9c. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 3.

The method was set to the Gaussian statistic method using point filtration three sigma. Measurements were replicated 10 times. Results of measurement were obtained only from the articulating surface; the rim and the outer diameter were not taken into account when determining the volumetric wear. Roughness and roundness of the measured object were neglected. The mean variation of the inner diameter was 0.005 mm (range = 28.624–28.643 mm, SD = 0.005 mm).

Discussion

The results show that the 3D optical method is suitable for measuring the THR wear of PE acetabular cups and thus it represents an effective alternative to the CMM method, which has, in some cases, reached the limits of its use.

One of the major limitations of the CMM method is a limited number of measured points collected for designing the geometry. Collecting a larger number of surface points using the CMM method is relatively time consuming. However, larger numbers of collected points are crucial for credible reconstruction of the unworn geometry and hence for a more precise analysis of wear. Previous studies showed that the mesh definition and performance of the meshing algorithms can significantly influence the obtained results (Bills, et al. (6); Lord, et al. (12); Carmignato, et al. (30)).

Table 4. Time efficiency of scanning method.

Operation	Approximate time (min)
Cleaning of acetabular cup	10
Application of titanium coating	15
Placement of a reference points	10
Scanning process	12
Polygonization	5
Repair of geometry	10 (depends on rate of damage)
Transformation on surface	20
Transformation on volume	8
Total	90

This limitation of the CMM method can be solved by the optical scanning method, which allows for collecting a larger number of points in a shorter time. Approximately 191,500 points collected on a single 28-mm acetabular cup can help to create a better surface visualisation. The resulting close point spacing solves the problem of curvature of the elements (Lu and McKellop (31)) and the problems related to the latitudinal and longitudinal mesh pattern (Bills, et al. (6)). Moreover, the ability to produce fully three-dimensional wear contours allows us to locate the wear scar with high reliability. The direction of the wear scar helps to define the unworn area of the acetabular cup. A right selection of points in the unworn area can then have a significant influence on the obtained result.

It is therefore important to carefully select the measured points of the unworn area to create the original geometry and to define the diameter. One of the options is to use GOM Inspect software. This approach was used in this study, taking advantage of compatibility of the results with the CAD software for further analysis. Another option is to use a fitting histogram for a precise selection of the unworn area points (Uddin (24)).

Table 5. Quantification of volumetric wear explanted acetabular cup.

Patient	Duration (months)	Size of implants	Type of implant	Material loss (mm ³)	Material loss per year (mm ³)
1	145	4/28	PE insert standard	1,119.7	92.66
2	126	5/28	PE insert standard	528.97	50.38
3	120	4/28	PE insert antiluxation	99.81	9.98
4	131.5	4/28	PE insert standard	752.01	68.63
5	75	6/28	PE insert standard	170.98	27.36
6	48.5	4/28	PE insert standard	162.63	40.24
7	89.5	5/28	PE insert standard	299.66	40.18
8	92.2	4/28	PE insert antiluxation	966.92	125.84
9	164	3/28	PE insert standard	584.86	42.80
10	536	5/28	PE insert antiluxation	69.46	15.55
11	61.9	4/28	PE insert antiluxation	152.98	29.66
12	43	7/28	PE insert standard	51.80	14.46
13	114.6	4/28	PE insert standard	182.05	19.06

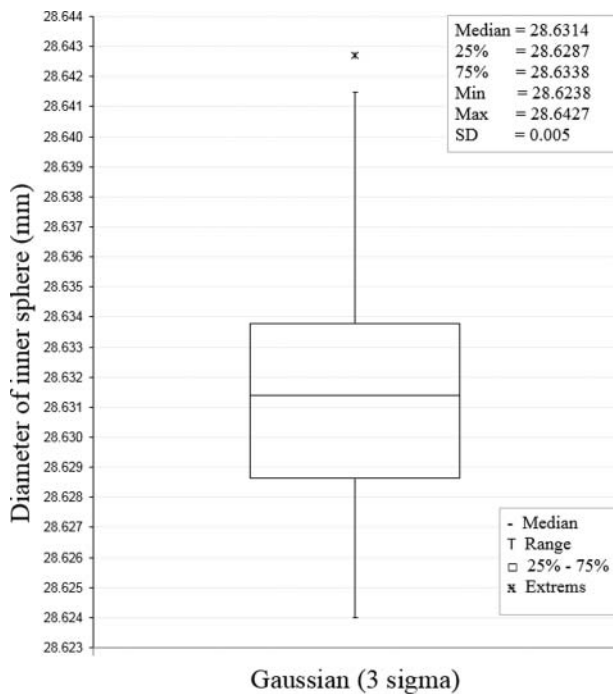


Figure 10. Repeatability of 3D scanning measurement.

Another advantage of the optical 3D method is the ability to define the wear vector on the basis of decentration of the worn region position against the original, software-generated geometry (Fig. 5). Parameters of the resulting wear vector can be then compared with the results obtained by medical methods (Dai, et al. (32)).

Data collected through the optical scanning method can be also suitable as input parameters for finite element prediction models (Uddin and Zhang (33)).

Despite the clear advantages of the optical scanning method, this method poses some challenges and limitations. The main limitation is the precision of the optical 3D scanner, which was established by repeatability of the measurement and parameters of the device. The optical scanning precision as established for the purposes of this study did not reach the levels of accuracy of the CMM method. The maximum accuracy of CMM is approximately $\pm 1 \mu\text{m}$. An evaluation of measurement method uncertainty, following ISO/IEC98-3 (34), is fundamental for both establishing a metrological traceability and allowing a proper comparison to the reference gravimetric method. The CMM method finds its application for the analysis of small amounts of material loss. Therefore, it is often used for metal femoral heads, which have a wear rate of approximately 1–40 mm³ (Bills, et al. (6); Lu and McKellop (31)). The method of measurement is defined by standard ISO 14242-2 (5).

The lower precision of the optical scanning method makes the method inadequate for the analysis of hard components. On the other hand, the accuracy of the optical scanning method is fully acceptable when it comes to the analysis of PE components.

When evaluating the quantitative wear of PE acetabular cups by volume loss, it is also necessary to consider the cold flow phenomenon. This process takes place in the first few months of implant use and results in plastic deformation of PE cup

without generation of wear debris (McKellop (35)). This phenomenon and effect of radial clearance of hard prostheses can be analyzed and specified by the finite element method (Shankar and Nithyaprakash (36)).

The analysis of PE components using the optical scanning method poses the problem of the correct selection of the unworn area of the components, which is important for further reconstruction of the original geometry as stated above. The optical scanning method takes into account neither the problem of the surface roughness nor the problem of nonsphericity of the cups. This issue is particularly evident in the initial phases after implanting the acetabulum when the material loss is relatively low as simulated during the first cycle of our validation, where there was a significant difference in volumetric wear values measured with the gravimetric method and optical scanning method, probably due to the plastic deformation process.

Because there is a wide selection of THRs on the market, some cups are nonspherical in their original geometry as produced by the manufacturers; other cups are originally spherical but can be deformed later. Nonsphericity of the cups is one of the limitations of the presented method and opens up the possibilities for further research aimed at developing an evaluation algorithm to correct the manufacturing tolerance and the nonspherical shape of the cup.

Despite these shortcomings, the 3D optical method is a fast and effective measurement method that simplifies further data processing. It is particularly suitable for the analysis of PE acetabular cups where the volumetric wear is more significant than in the case of metal and ceramic bearing components.

Conclusion

This article presents a new method of determining volumetric wear using an optical 3D scanner. This method was demonstrated on 13 extracted UHMWPE acetabular cups with various ranges of wear.

The study consists of three parts: (1) description of the optical method used for volumetric wear analysis, (2) validation of the methodology, and (3) application of methodology on the extracted acetabular cups.

1. The optical 3D scanner was used to investigate the volume loss of an acetabular cup. This method is less time consuming than the conventionally used CMM method. Another advantage of the method is the ability to develop a complex geometry built on a large number of points. This approach enables us to reconstruct the most accurate original geometry. A comparison of the extracted cup scans with models of their original geometry reconstructed on the basis of these scans can determine the volumetric wear for PE acetabular cups with satisfying results. The obtained data can be further processed by CAD software.
2. The optical scanning method was validated with the gravimetric method as defined by the standard ISO 14242-2 (5). The mean difference between the methods in quantifying the volume for three cups was -0.0040 , -0.0021 , and -0.0029 g. Repeatability of the scanning method was 0.005 mm on the evaluated diameter.

- This method was demonstrated on a series of 13 extracted UHMWPE acetabular cups with known clinical history. Here, all components showed volumetric wear that exceeds the uncertainty of measurement. This method allows for an efficient analysis of acetabular cups.

Basically, there are contact and noncontact methods of volumetric wear measurement. Selection of the most suitable wear measurement method usually depends on various characteristics of the measured samples. This article introduces a new optical scanning method using the ATOS Triple Scan and evaluates its advantages and disadvantages in the context of the conventional CMM method.

Previous research shows that CMM enables more accurate measurements suitable for metal and ceramic components. This article suggests that the scanning method enables more efficient data collection and a more variable geometry processing, which is particularly useful for PE extracted acetabular cups.

Acknowledgements

The authors thank A. Příkryl for optical scanning of acetabular cups and V. Trulíková for help with editing the article.

Funding

This research was carried out under the project NETME CENTRE PLUS (LO1202) with financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports under the National Sustainability Programme I. This research was also supported by the project “The Influence of Joint Fluid Composition on Formation of Lubricating Film in THA” (NT/14267-3/2013) financed by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., and Halpern, M. (2007), “Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, **89**(4), pp 780–785.
- Gallo, J., Goodman, S. B., Konttinen, Y. T., and Raska, M. (2013), “Particle Disease: Biologic Mechanisms of Periprosthetic Osteolysis in Total Hip Arthroplasty,” *Innate Immunity*, **19**(2), pp 213–224.
- Patel, A., Pavlou, G., Mujica-Mota, R. E., and Toms, A. D. (2015), “The Epidemiology of Revision Total Knee and Hip Arthroplasty in England and Wales: A Comparative Analysis with Projections for the United States. A Study Using the National Joint Registry Dataset,” *Bone & Joint*, **97**(8), pp 1076–1081.
- Affatato, S., Zavalloni, M., Taddei, P., Di Foggia, M., Fagnano, C., and Viceconti, M. (2008), “Comparative Study on the Wear Behaviour of Different Conventional and Cross-Linked Polyethylenes for Total Hip Replacement,” *Tribology International*, **41**(8), pp 813–822.
- International Organization for Standardization (ISO) 14242-2. (2000), “Implants for Surgery—Wear of Total Hip-Joint Prostheses,” Geneva, Switzerland.
- Bills, P. J., Racasan, R., Underwood, R. J., Cann, P., Skinner, J., Hart, A. J., Jiang, X., and Blunt, L. (2012), “Volumetric Wear Assessment of Retrieved Metal-on-Metal Hip Prostheses and the Impact of Measurement Uncertainty,” *Wear*, **274–275**, pp 212–219.
- Bills, P., Blunt, L., and Jiang, X. (2007), “Development of a Technique for Accurately Determining Clinical Wear in Explanted Total Hip Replacements,” *Wear*, **263**(7–12), pp 1133–1137.
- Martell, J. M., Leopold, S. S., and Liu, X. L. (2000), “The Effect of Joint Loading on Acetabular Wear Measurement in Total Hip Arthroplasty,” *Journal of Arthroplasty*, **15**(4), pp 512–518.
- Kothari, M., Bartel, D. L., and Booker, J. F. (1996), “Surface Geometry of Retrieved McKee-Farrar Total Hip Replacements,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **329**, pp S141–S147.
- International Organization for Standardization (ISO) 10360-2. (2009), “Geometrical Product Specifications (GPS)—Acceptance and Reverification Tests for Coordinate Measuring Machines (CMM),” Geneva, Switzerland.
- Becker, A. and Dirix, Y. (2009), “Wear Measurements on Retrieved Metal-on-Metal Bearings: A High Accuracy 3D Measurement Approach,” *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, Poster No. 2270, Smith & Nephew Orthopaedics AG: Aarau, Switzerland.
- Lord, J. K., Langton, D. J., Nargol, A. V. F., and Joyce, T. J. (2011), “Volumetric Wear Assessment of Failed Metal-on-Metal Hip Resurfacing Prostheses,” *Wear*, **272**(1), pp 79–87.
- Rosler, T., Mandat, D., Gallo, J., Hrabovsky, M., Pochmon, M., and Havranek, V. (2009), “Optical 3D Methods for Measurement of Prosthetic Wear of Total Hip Arthroplasty: Principles, Verification and Results,” *Optics Express*, **17**(15), pp 12723–12730.
- Pochmon, M., Rosler, T., Mandat, D., Gallo, J., and Hrabovsky, M. (2007), “Verification of Abrasion Measurement of Juncture Implants Using Fourier Profilometry,” *15th Czech-Polish-Slovak conference on Wave and Quantum Aspect of Contemporary Optics*, 9780819467485, p. 6609.
- Zou, L., Samarawickrama, D. Y. D., Jovanovski, V., and Shelton, J. C. (2001), “Measurements of Sequential Impressions of Acetabula Cups from a Total Hip Joint Replacement Using a Non-Contact Measurement System,” *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, **41**(13–14), pp 2023–2030.
- Yun, H. H., Shon, W. Y., Yoon, J. R., Yang, J.-H., and Lim, D.-S. (2012), “Reliability of a PowerPoint Method for Wear Measurement After Total Hip Arthroplasty: A Retrieval Study Using 3-Dimensional Laser Scanning,” *The Journal of Arthroplasty*, **27**(8), pp 1530–1537.
- Dougherty, P. S. M., Srivastava, G., Onler, R., Ozdoganlar, O. B., and Higgs, C. F., III. (2015), “Lubrication Enhancement for UHMWPE Sliding Contacts through Surface Texturing,” *Tribology Transactions*, **58**(1), pp 79–86.
- Choudhury, D., Ghosh, S., Ali, F., Vrbka, M., Hartl, M., and Krupka, I. (2015), “The Influence of Surface Modification on Friction and Lubrication Mechanism under a Bovine Serum Lubricated Condition,” *Tribology Transactions*, **59**, pp 1–28.
- Milosev, I., Kovac, S., Trebse, R., Levasic, V., and Pisot, V. (2012), “Comparison of Ten-Year Survivorship of Hip Prostheses with Use of Conventional Polyethylene, Metal-on-Metal, or Ceramic-on-Ceramic Bearings,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, **94**(19), pp 1756–1763.
- Williams, P. A., Yamamoto, K., Masaoka, T., Oonishi, H., and Clarke, I. C. (2007), “Highly Crosslinked Polyethylenes in Hip Replacements: Improved Wear Performance or Paradox?,” *Tribology Transactions*, **50**(2), pp 277–290.
- GOM mbH. Available at: <http://www.gom.com/metrology-systems/3d-scanner.html>. (accessed October 16, 2015).
- VDI/VDE2634-3. (2008), “Optical 3D-Measuring Systems-Multiple view systems based on area scanning,” Fachbereich Fertigungsmesstechnik: Dusseldorf, Germany.
- Palousek, D., Omasta, M., Koutny, D., Bednar, J., Koutecky, T., and Dokoupil, F. (2015), “Effect of Matte Coating on 3D Optical Measurement Accuracy,” *Optical Materials*, **40**, pp 1–9.
- Uddin, M. S. (2014), “Wear Measurement and Assessment of Explanted Cross-Linked PE Acetabular Cups Using a CMM,” *Tribology Transactions*, **57**(5), pp 767–777.
- McKellop, H. A., Campbell, P., Park, S. H., Schmalzried, T. P., Grigoris, P., Amstutz, H. C., and Sarmiento, A. (1995), “The Origin of Submicron Polyethylene Wear Debris in Total Hip-Arthroplasty,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **311**, pp 3–20.
- Vrbka, M., Nečas, D., Hartl, M., Krupka, I., Urban, F., and Gallo, J. (2015), “Visualization of Lubricating Films between Artificial Head and Cup with Respect to Real Geometry,” *Biotribology*, **1–2**, pp 61–65.
- Dumbleton, J. H., Manley, M. T., and Edidin, A. A. (2002), “A Literature Review of the Association between Wear Rate and Osteolysis in Total Hip Arthroplasty,” *Journal of Arthroplasty*, **17**(5), pp 649–661.

- (28) Ottink, K., Barnaart, L., Westerbeek, R., van Kampen, K., Bulstra, S., and van Jonbergen, H. P. (2015), "Survival, Clinical and Radiological Outcome of the Zweymuller SL/Bicon-Plus Total Hip Arthroplasty: A 15-Year Follow-Up Study," *Hip International*, **25**(3), pp 204–208.
- (29) Ilchmann, T., Lüem, M., Pannhorst, S., and Clauss, M. (2012), "Acetabular Polyethylene Wear Volume after Hip Replacement: Reliability of Volume Calculations from Plain Radiographs," *Wear*, **282–283**, pp 69–75.
- (30) Carmignato, S., Spinelli, M., Affatato, S., and Savio, E. (2011), "Uncertainty Evaluation of Volumetric Wear Assessment from Coordinate Measurements of Ceramic Hip Joint Prostheses," *Wear*, **270** (9–10), pp 584–590.
- (31) Lu, Z. and McKellop, H. A. (2014), "Accuracy of Methods for Calculating Volumetric Wear from Coordinate Measuring Machine Data of Retrieved Metal-on-Metal Hip Joint Implants," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers - Part H: Journal of Engineering in Medicine*, **228**(3), pp 237–249.
- (32) Dai, X. S., Omori, H., Okumura, Y., Ando, M., Oki, H., Hashimoto, N., and Baba, H. (2000), "Serial Measurement of Polyethylene Wear of Well-Fixed Cementless Metal-Backed Acetabular Component in Total Hip Arthroplasty: An over 10 Year Follow-Up Study," *Artificial Organs*, **24**(9), pp 746–751.
- (33) Uddin, M. S. and Zhang, L. C. (2013), "Predicting the Wear of Hard-on-Hard Hip Joint Prostheses," *Wear*, **301**(1–2), pp 192–200.
- (34) International Organization for Standardization (ISO)/IEC98-3. (2008), "Uncertainty of Measurement," Geneva, Switzerland.
- (35) McKellop, H. A. (2007), "The Lexicon of Polyethylene Wear in Artificial Joints," *Biomaterials*, **28**(34), pp 5049–5057.
- (36) Shankar, S. and Nithyaprakash, R. (2014), "Effect of Radial Clearance on Wear and Contact Pressure of Hard-on-Hard Hip Prostheses Using Finite Element Concepts," *Tribology Transactions*, **57**(5), pp 814–820.

Review

Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection

Jiri Gallo ^{1,*}, Ales Panacek ², Robert Prucek ², Eva Kriegova ³, Sarka Hradilova ², Martin Hobza ¹ and Martin Holinka ¹

¹ Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, I. P. Pavlova 6, Olomouc 779 00, Czech Republic; martinholinka@gmail.com (M.H.); mholinka@seznam.cz (M.H.)

² Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, Czech Republic; ales.panacek@upol.cz (A.P.); robert.prucek@upol.cz (R.P.); sarka.hradilova@upol.cz (S.H.)

³ Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, Olomouc 779 00, Czech Republic; eva.kriegova@email.cz

* Correspondence: jiri.gallo@volny.cz; Tel.: +420-588-443-548

Academic Editor: Fernão D. Magalhães

Received: 31 March 2016; Accepted: 27 April 2016; Published: 5 May 2016

Abstract: Prosthetic joint infection (PJI) is a feared complication of total joint arthroplasty associated with increased morbidity and mortality. There is a growing body of evidence that bacterial colonization and biofilm formation are critical pathogenic events in PJI. Thus, the choice of biomaterials for implanted prostheses and their surface modifications may significantly influence the development of PJI. Currently, silver nanoparticle (AgNP) technology is receiving much interest in the field of orthopaedics for its antimicrobial properties and a strong anti-biofilm potential. The great advantage of AgNP surface modification is a minimal release of active substances into the surrounding tissue and a long period of effectiveness. As a result, a controlled release of AgNPs could ensure antibacterial protection throughout the life of the implant. Moreover, the antibacterial effect of AgNPs may be strengthened in combination with conventional antibiotics and other antimicrobial agents. Here, our main attention is devoted to general guidelines for the design of antibacterial biomaterials protected by AgNPs, its benefits, side effects and future perspectives in PJI prevention.

Keywords: prosthetic joint infection; biomaterial-associated infection; anti-adhesive; anti-biofilm; antibacterial surface treatment; silver nanocoating; silver nanoparticles

1. Introduction

Prosthetic joint infection (PJI) is a feared complication of modern orthopaedic surgery that substantially increases morbidity and even mortality following total joint arthroplasty (TJA) [1,2]. Generally, PJI leads to implant removal and long-term antibiotic therapy with a permanent, increased risk for PJI development in affected patients [3].

Current estimates suggest that up to 3% of primary hip and knee arthroplasties [4], up to 15.4% of revision hip and 25% of knee arthroplasties are complicated by PJI respectively [5]. According to some authors, these numbers are not only underestimated but they are also on the rise [6]. The annual cost of infected revisions in hospitals of the United States of America (USA) could increase from \$566 million in 2009 to \$1.62 billion by 2020 [7]. As a result, therapy of PJI continues to be associated with enormous costs.

The first postoperative months are the most typical period of PJI manifestation [8] with the incidence rate of late PJI in hip and knee arthroplasty at about 0.07% per prosthesis-year and a higher risk in knee arthroplasties when compared to hip [9].

The leading causes of PJIs are *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci followed by streptococci and enterococci (all of these account for approximately 10% of PJI cases) [10,11]. Importantly, the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in PJI is increasing, especially in the USA [12]. In addition, polymicrobial infections can occur in up to 15% of cases [13] despite the fact that some authors reported a substantial increase in the yearly occurrence of polymicrobial infections over the period of six years (2004 to 2010) with a greater increase in the proportion of gram-negative bacteria during the same period [14].

2. Pathogenesis of PJI

The distribution of PJI in time strongly points to the causative link towards surgery and the early postoperative period. A basic prerequisite for PJI development is the size of the bacterial load influencing the operating wound, immune response and the implant. The last two decades were under strong dominance of Gristina's concept of "race for the surface" [15]. Accordingly, host and bacterial cells compete in determining the ultimate fate of the implant, when host cells colonize the implant surface first, the probability of attachment of bacterial cells is very low and vice versa. However, Gristina's model is not able to predict PJI in "less clear" situations when the host cell coverage of an implant surface is incomplete and thus offering some places for bacteria adhesion. In addition, some prosthetic surfaces, either articulating or non-articulating, preclude host cell adhesion and development of a protective host film. This model can also be criticized for static conditions because fluid waves occurring many times per hour are typical for TJA. Finally, immune and host tissue responses contribute to the protection of an implant surface to a greater extent than only in terms of simple mechanistic competition for an implant surface. Despite the fact that not all the critical pathogen and host steps/factors have been elucidated to date [16], for instance an infection dose no doubt plays an important role. A higher bacterial load of *S. aureus* could alter the host immune response and accelerate biofilm formation [17] while a low level of "appropriate" bacterial contamination might even serve as a potent immunomodulatory factor preventing the development of PJI ("implant infection paradox") [18]. Some evidence also suggests the role of genetic susceptibility [19,20]. Taken together, instead of Gristina's metaphor, a specific local immunologic and tissue constellation type of pathogen as well as bacterial load interplay with each other and influence the implant-tissue interactions, either towards non-infective or infective statuses.

The most destabilizing factor is the basic yet highly successful survival strategy of bacteria in general: their ability to adhere and survive on virtually all natural and synthetic surfaces (Figure 1) [21,22]. The bacterial cell membrane contains various types of adhesins for a wide range of biomaterial surface receptor sites, members of the family of Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) [23]. Environmental and surface characteristics of a biomaterial such as surface roughness, hydrophobicity and electrostatic charge play only conditional roles [24]. A reservoir of receptors for bacterial adhesive ligands mediating adhesion of free-floating bacteria to the surface of the biomaterial, offers a conditional protein film covering the implant immediately after its placement into the host body [25]. The spectrum of binding molecules depends at least partly on the particular type of biomaterials attracting an exact set of host proteins and lipids [26–28].

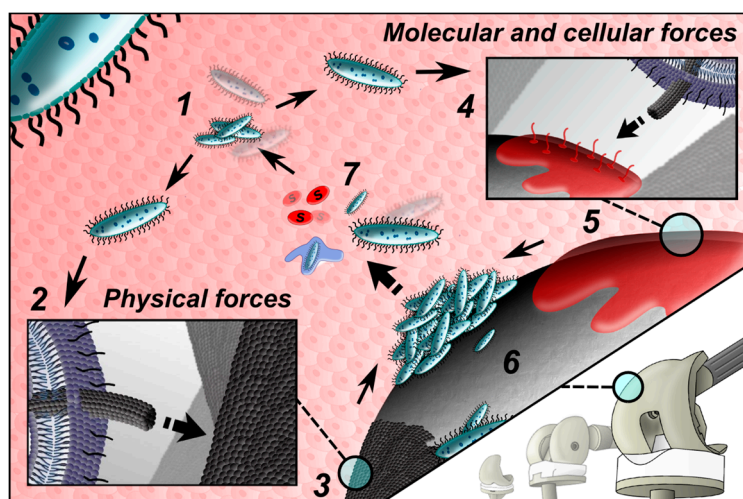


Figure 1. Free-floating bacteria (1) come close to the implant surface, here they interact via a set of chemical and physical mechanisms with a biomaterial surface covered by host cells/proteins. The majority of bacterial pathogens express specific surface adhesion molecules called adhesins (bacteria may have multiple adhesins for different surfaces); bacterial adhesion can be described as having an initial reversible, predominantly physically driven phase (2) and a time-dependent and irreversible molecular and cellular phase (4). The former is realized by Brownian motion, van der Waals attraction forces, gravitational forces, surface electrostatic charge and hydrophobic interactions (3); the latter employs a selective bridging function of bacterial surface polymeric structures, which include capsules, fimbriae or pili and slime; intermolecular interactions are facilitated by a protein film covering an implant immediately after its placement into the host body (5). Firm sticking of bacteria to the biomaterial surface allows them to create colonies (6) with biofilm formation, which is associated with a continuous release of free floating bacteria and signaling molecules (7).

Conceptually, the process of bacterial adhesion can be divided into two basic phases: reversible, and irreversible [29,30]. The former is mechanically and biologically less stable than the latter. The explanation lies partly in the origin of nonspecific interactions between the implant surface characteristics and bacterial surface adhesins, followed by molecular and cellular interactions closely associated with expression of biofilm specific gene clusters in reversibly attached bacteria [31]. At least four distinct classes of surface proteins have been identified to participate on firm adhesion of *S. aureus* micro-colonies to a biomaterial and to each other [32]. The adhesion phase is followed by gene expression for secretion of protective slime. This process makes bacteria extremely resistant to both the host immune system and antibiotic diffusion [30,33]. The transition between the reversible and irreversible phases of biofilm formation coupled with a phenotypical change, is the last window of opportunity for clinically reasonable preventative measures. Other parameters of biofilm formation are described in detail elsewhere [34], as well as the ability of bacteria to combine different pathogenic strategies [35].

In the host site, the details of tissue integration of a biomaterial are still poorly understood [36,37]. It is believed that immune as well as tissue resident cells recognize an implant surface and orchestrate the processes, leading to periprosthetic bone/soft-tissue regeneration and remodeling, preventing the development of biofilm in the majority of patients [38,39]. However, neither osseointegration nor fibrous tissue encapsulation of large non-fixation parts of an implant can eliminate long-term survivorship of bacterial micro-colonies. Moreover, the peri-implant fibrous barrier impedes contact between the host immunity sentinel cells and bacterial molecules. This interaction is critical for host immune responses dependent on recognition of bacterial pattern-recognition receptors (PRRs; also microbe associated molecular patterns = MAMPs). Importantly, it has been demonstrated

that implantation of a medical device impairs the innate local host response and may facilitate the development of PJI [40,41].

As the majority of operating rooms are contaminated within the first few hours of service [42,43], most surgeries are not performed in a bacterial-free environment. All patients are exposed to the same environment within a particular operating room. The question therefore arises as to why some patients go on to have infections and others do not. There is a growing body of evidence that PJI results from a relatively unclear and perhaps unique combination of environmental and genetic factors. The environmental ones could be linked to immune and non-immune factors affecting host response to bacterial load (age, gender, malnutrition, weight, diabetes mellitus, smoking *etc.*); the factors related specifically to implant facilitating for instance, adhesion of bacteria and those related to the surgeon and surgery (operating skills, operating room parameters, surgical time *etc.*). The host genetics strongly influences an individual's susceptibility to infectious diseases and there is some evidence available for genetic susceptibility to PJI [19].

As a result, there is a strong need for intrinsic implant surface antibacterial functionality that can protect the implant surface from a perioperative attack of pathogenic bacteria as well as help to overcome implant-induced defects in the local immune response.

3. Rationale and Basic Concepts of PJI Prevention

Strategies relying on a decreased bacterial load and creating a bacteria-free environment around an implant during the perioperative period are widely implemented in clinical practice [44,45]. There is sufficient evidence supporting systemic [46] and in some cases local *antibiotic prophylaxis* [47]. However, the optimal protocol for individual clinical situations is not known yet. At present, antibiotics are administered to all the patients undergoing TJA regardless of the individual risk for PJI development, at least in terms of the beginning, the type of antibiotic and the duration of antibiotic prophylaxis. With regard to the latter, the 24 h regime does not cover the time needed for early wound stabilization, or the period of time the suction drain is in contact with joint and deep tissues. In addition, the increasing occurrence of antibiotic resistance has been recognized to be a global problem. There is also some evidence for selecting antibiotic-resistant staphylococci in relation to wide-range antibiotic prophylaxis [48].

Attempts at formulating evidence-based standards for good clinical and logistic practice in orthopaedic *operating rooms* have been made [45,49]. There is a growing pressure on surgeons to improve their surgical skills in order to minimize the surgery-related factors. Educational programs aimed at educating/training orthopaedic surgeons (and all staff) in perioperative strategies of PJI prevention are under way [50].

Finally, strategies based on *identification of risk patients and optimization of their conditions* to decrease the probability of PJI development have been proposed. Even though modifiable PJI risk factors have been identified and well-described [50,51], it is often not possible to avoid operating "risk" patients who are not "optimized". For instance, significant obesity precluded the indication for total hip or knee arthroplasty in some countries several years ago. However, it is unethical to reject surgery in these patients today, despite the fact that they have an increased risk for PJI [52]. Research testing is assessing whether the risk for PJI could be decreased after preoperative immunization of the patients at-risk, by a vaccine that targets either the most frequent pathogen as *S. aureus*, or the key molecules of bacterial adhesion and biofilm formation [53].

Taking into account the weaknesses associated with all the current preventative strategies, leaders in the field recommend a multistep preventative concept (Figure 2) covering simultaneously all the well-known targets, including the "anti-infective implant" [54–56].

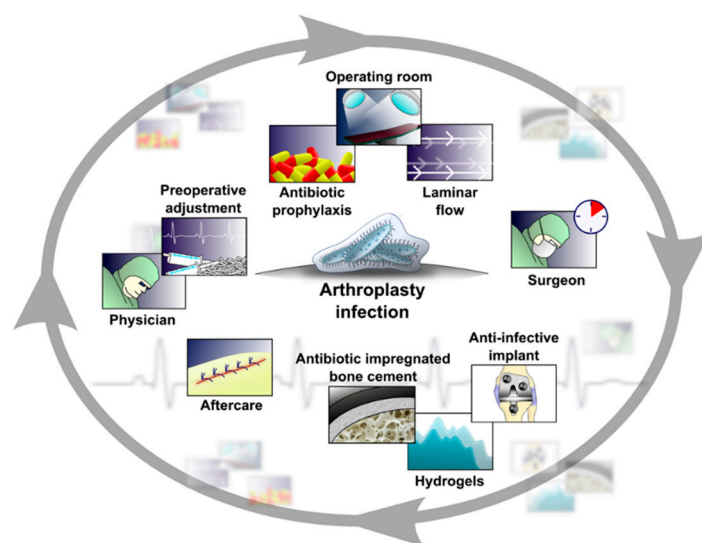


Figure 2. Prevention of PJI consists of a list of measurements optimizing host status/preparedness for surgery (identification of host risk factors, determination of host comorbidities; local antibacterial activities); reducing bacterial load during the surgery (intravenous antibiotic prophylaxis, operating room environment/traffic/management, surgical experience, measurements/tools preventing deliberation of bacteria from the surgeon/operating room personnel, protection of the implant from bacterial contamination/adhesion) and minimizing the chance for postoperative bacterial contamination (wound care strategy, rapid optimization of postoperative immune and metabolic conditions, early ambulance, experienced physiotherapy, eradication of local infections and haematogenous sources of bacteria).

4. Indications for Implants with Antibacterial Surface Treatment

In accordance with the evidence-based medical rules, it would be relevant to calculate the number of PJIs prevented, by usage of implants with an antibacterial surface. Theoretically, all the patients undergoing TJA are at risk for PJI. Revision cases carry an increased risk, partly due to the prolonged operating time during revision surgeries, in conjunction with a suboptimal local tissue environment [57]. Moreover, there is some evidence that the risk of PJI across the board in orthopaedic surgery, is on the rise [6]. As a result, one could argue that all patients should benefit from implants coated with a proven anti-infective surface. On the other hand, the risk for PJI is not homogeneously distributed among arthroplasty patients [50]. Therefore, it might be convincing to implant “biofilm resistant” prostheses only in patients at an increased risk of PJI [51,58]. However, a validated tool for screening patients for an increased risk of PJI does not currently exist. Taken together, the preventative strategy involving all the patients undergoing primary and revision TJA seems to be more justifiable than a more restrictive approach targeting the high-risk patients. However, prior to implementation of such devices, it is necessary to demonstrate the significant reduction of PJI in a well-done, population-based, cost-benefit analysis [38]. An important consideration in designing implants with antibacterial coating relates to the characterization of reasonable and justifiable costs.

5. Recommendations for Construction of Implants with Anti-Infective Surfaces

A wide spectrum of substances and technological approaches has been proposed and tested for antibacterial features in orthopaedics (Table 1). In order to fully discuss and evaluate surface treatment technologies it is essential to review the strict criteria related generally to the process of innovation in this field. The requested parameters are as follows:

1. **biocompatibility** (the ability of a material to work efficiently with an appropriate host response in specific applications) [59];

2. **strong evidence of anti-infective efficiency** (the anti-bacterial efficiency should be demonstrated *in vitro*, *in vivo* and also in an appropriate model of PJI) [60–62];
3. **fixation properties cannot be compromised** (the antibacterial coating must not compromise long-term stable implant osseointegration or cement fixation);
4. **durability of the anti-infective effect** (while clear recommendations are lacking the epidemiological viewpoint suggests that at least two years would be appreciated) [63,64];
5. **mechanical characteristics of the antibacterial coating** (resistance to mechanical stresses and strains either during surgery or postoperatively) [65].

Table 1. Examples of anti-infective strategies proposed for treating of surfaces used in orthopaedic implants.

Strategy	Features	Examples	References
Prevention in adhesion and adsorption		Anti-adhesive polymers	[66–68]
		Albumin	[69]
		Super-hydrophobic surfaces	[70–72]
		Nano-patterned surface	[73–77]
		Hydrogels	[78–81]
Methods to kill bacteria	Inorganic	Silicon nitride ceramics	[82,83]
		Silver, silver-oxide	[84–86]
		Silver nanoparticles	[87–94]
		Gold nanoparticles	[95,96]
		Titanium dioxide	[97–99]
		Selenium ions	[100–102]
		Copper ions/nanoparticles	[103,104]
		Zinc ions	[105,106]
		Iodine coating	[107]
		Bioactive glass	[108,109]
	Graphene oxide	[110,111]	
	Organic	Coated or covalently linked antibiotics	[112–116]
		Chitosan derivatives	[117–120]
Signaling, inhibiting and antimicrobial peptides		[121–123]	
Other	Cytokines	[124]	
	Enzymes	[125,126]	
Combined	Non-antibiotic bactericidal substances	[127]	
	Multilayer coating	[128–132]	
	Synergy material intensification	[133–135]	
Multi-functional and smart coating	Positively charged polymers	[136]	
	Passive	Nanostructured “smart” materials	[68,137–140]
Alternative approach	Active	Concept: sensors conjoined to nanocontainers	[141–146]
		Lytic bacteriophages	[147]
		Surface-adaptive anti-biofilm nanocarriers	[148]

Recently, a new classification of the implant-related antibacterial strategies has been proposed distinguishing:

1. **passive surface finishing/modification** (PSM);
2. **active surface finishing/modification** (ASM);
3. **perioperative antibacterial local carriers or coatings** (LCCs) [56].

If the active substance is released from the surface of the implant, over time it may lead to its exhaustion and thereby, a loss of efficiency. It is therefore extremely relevant to design surface

modifications with minimal but effective release of active substances into the surrounding tissue, thereby achieving a long, or even indefinite period of effectiveness. This approach may ensure antibacterial protection throughout the life of the implant. A specific set of problems are related to fluid dynamics and adhesion of host proteins, lipids, cells to “active” implant surfaces, limiting their antibacterial efficacy.

6. General Remarks on Prosthetic Implant Surface Modifications

Polyethylene, a modern generation of zirconia treated ceramic, stainless steel, cobalt-chrome and titanium alloys are the most commonly used materials in TJA implants. In TJA, each material/surface modification has its specific role (e.g., an articulating or a fixation surface) and can occupy a different place in the bulk implant (Figure 3). These parameters together, define the requirements for particular surface modifications in specific implant sites.

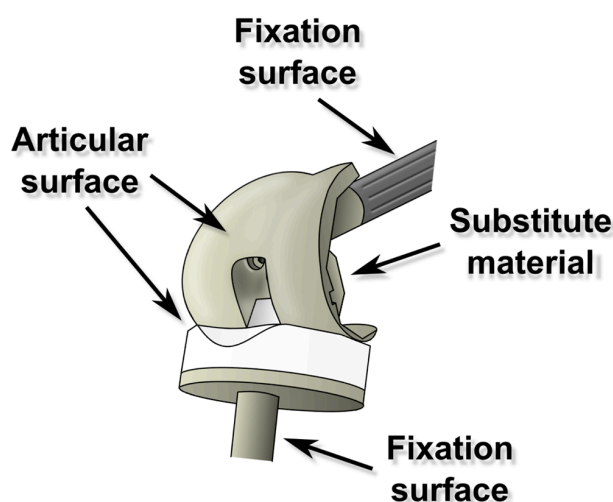


Figure 3. Total joint arthroplasty has several types of surfaces according to their locations and functions; ideally the whole implant should be covered via application of an antibacterial strategy; however, in practice the antibacterial strategy for a particular kind of surface has to respect its critical characteristics (for example the strategy for an articulating surface, let’s say a polyethylene one, has to be different from a non-articulating metallic one).

A number of principles from basic research have been proposed for translation into technologies potentially suitable for antibacterial treatment of orthopaedic implants [149]. It is easy to distinguish between technologies offering *anti-adhesive properties*, those working as *antimicrobial agents* and those *combining the above-mentioned approaches*. Anti-infective surfaces can be classified as “*contact killing*” and *antimicrobial agent eluting* respectively [150].

Antibacterial surface technologies can employ *metals* (silver, zinc, copper, zirconium *etc.*), *non-metal elements* (e.g., selenium), *organic substances* (antibiotics, anti-infective peptides, chitosan, other substances) and *their combinations*. Antibacterial activity of the majority of metal coatings is closely linked to the ionic or nano-form, rather than to the bulk material [151]. *Nanostructured surfaces and coatings* (either of inorganic or organic origin) are therefore of great interest. Consequently, the nanoscale surface patterning methods have been applied to fabricate different nanopatterns (e.g., ordered stripes, pits, pillars or squares). Several studies have demonstrated that nanopatterning in conjunction with other surface treatment can inhibit bacterial adhesion [152,153].

In terms of functionality, one may divide surfaces as *mono-functional and multi-functional*. The latter are expected to target multiple biological tasks simultaneously (Figure 4), orchestrating early/long-term tissue adaptation to an implant, facilitating osseointegration and regulating the anti-infective immune response, all in addition to the “intrinsic” antibacterial surface effect [154].

Smart surface could be a completely different methodology designed to be a self-responsive multitask micro-machine that releases antimicrobial (and other) substances, after stimulation by microbial (or other) signals [155].

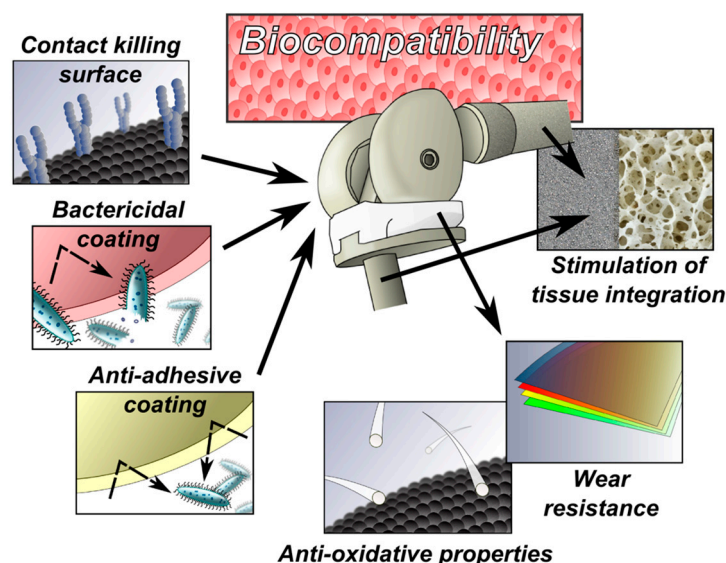


Figure 4. A particular implant surface has to address several implant-related tasks simultaneously and continuously (in the ideal case), therefore engineers have to solve the problem of how to bind (attract, fix) often contradictory functionalities via specific modifications/treatments in the particular surface location.

7. Why Silver Nanoparticle Technologies on the Implant Surfaces?

Currently, AgNP technology is receiving much interest in its use on implant surfaces, mainly for its antimicrobial properties and strong anti-biofilm potential together with relatively low cytotoxicity to mammalian cells. *AgNPs effectively inhibit the growth of bacteria* including highly resistant strains at very low concentrations in units of mg/L [92,156–162], whereas such concentrations do not exhibit an acute cytotoxic effect, which was proved at the concentrations higher than 20 mg/L [163–165].

Moreover, in the case of AgNPs, bacterial resistance has not been reported up to now, despite the fact that resistance to ionic silver has been observed. The multilevel antimicrobial (broad target attack) mode of AgNPs ensures that resistance cannot be easily acquired by single point mutations in contrast to antibiotics. Having *a very low risk of development of bacterial resistance* it is therefore relevant to know the antibacterial effects of AgNPs. This is an extremely valuable effect especially today, when we are facing growing antibacterial resistance observed in antibiotics and other antibacterial substances. Some experts even refer to the current state as to a “worldwide calamity” or “antibiotic resistance crisis”. Therefore, a joint multilevel and global interdisciplinary action including substituting antibiotics by non-antibiotic approaches could decrease the range and rate of bacterial resistance.

Moreover, AgNPs have a *strong anti-biofilm potential* [162,166–179]. Therefore, these are potentially very attractive for surface protection of orthopaedic implants since PJI is biofilm driven in the majority of clinical cases. As a result, silver is the most prevalent metal used in biomedical applications for antibacterial coating of prosthetic metal implants [180–190]. Both uncoated and coated AgNPs on various surfaces, such as titanium surfaces or catheter surfaces, thoroughly inhibit both planktonic and biofilm-forming bacteria [94,167,191,192]. Saleh *et al.* reported that biofilm and planktonic *E. coli* and *P. aeruginosa* cells showed very similar tolerance to AgNPs upon exposure [191]. Agarwala *et al.* reported high antimicrobial activity on catheters loaded with AgNPs towards planktonic as well as biofilm-forming cells [167]. Similarly, Zhong *et al.* and Harraser *et al.* reported that AgNP-loaded titanium can kill planktonic and adherent bacteria during 1, 4 and 12 days with

similar effectiveness [94,192]. On the other side, several studies showed that biofilms decreased susceptibility to AgNPs compared to planktonic cells [193,194]. Choi *et al.* found that biofilms were four times less susceptible to AgNP exposure than planktonic cells were [194]. Starch-coated NPs reduced *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilm growth but completely inactivated planktonic cells at the same AgNP concentrations [195]. It is known that both planktonic and biofilm-forming bacteria produce extracellular polymeric substances (EPS), which has been proved to lower the diffusion rate of NPs [196]. EPS production is much greater in biofilms compared to planktonic bacteria and therefore may provide some protection to biofilm-forming cells from NPs.

8. Synthesis of Silver Nanoparticles on the Implant Surface

There are several approaches to synthesize the AgNPs on the implant surface. In the study [87], TiO₂ (titanium dioxide) nanotubes (NT) on a titanium (Ti) surface were prepared by anodization of the Ti surface and consequently AgNTs were generated on the NT surface by ultraviolet reduction of silver ions. The TiO₂-NTs loaded with Ag (silver) exhibited a strong antibacterial activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, ATCC43300) *in vitro* for 30 days.

The cathodic arc silver plasma immersion ion implantation process can serve as another method of preparation and immobilization of AgNPs on a Ti surface. The immobilized AgNPs offered good defense against multiple cycles of bacteria (*S. epidermidis*) attacks *in vitro* and the mechanism was independent of silver release [197].

Also Pulse DC magnetron sputtering can be utilized for a generation of AgNPs on a Ti surface, where nanostructured Ti-Ag coatings with different Ag contents (1.2% to 21.6%) are able to kill *S. aureus* effectively during the first few days and remain moderately antibacterial after immersion for 75 days. Compared to pure Ti, the Ti-Ag coatings show good cytocompatibility as indicated by good osteoblast adhesion, proliferation, intracellular total protein synthesis and alkaline phosphatase activity [198].

AgNPs with the size of 50 nm can also be incorporated into a dopamine-modified alginate/chitosan (DAL/CHI) polyelectrolyte multilayer to modify titanium alloy surfaces. The polyelectrolyte multilayer coating enhanced wet ability of titanium alloy and promoted the fibroblast proliferation significantly, which could be attributed to the excellent biocompatibility of DAL/CHI [199]. Despite the slight fall of L929 cell activity after AgNP incorporation, AgNP-DAL/CHI multilayer inhibited the growth of both *E. coli* and *S. aureus* [199].

Hexagonal closed-packed TiO₂ nanotubes with the diameter of 30–100 nm were prepared by anodization of a Ti foil, where the size of nanotubes was dependent on the parameters of anodization [200]. The size and shape of the generated AgNPs (12–40 nm) on TiO₂ nanotubes by UV (ultraviolet) irradiation depends mainly on the size of TiO₂ nanotubes and silver ion concentration. The highest antibacterial activity was obtained for TiO₂ nanotubes with the opening diameter of about 100 nm and AgNPs with an average size of 20 nm, whereas good cell viability using osteoblast MG63 cells was remained [200]. The Ti/TiO₂ nanotubes/AgNPs composites can also be prepared with the assistance of quaternary ammonium salt (QAS, 3-trimethoxysily-propyldimethyloctadecyl-ammonium chloride). The Ag nanoparticle loaded and QAS coated TiO₂ nanotube substrates demonstrated long-term antibacterial effect and displayed good biocompatibility [201].

9. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles

The effects of silver, either as a metal (AgNPs) or in compounds is known to be non-specific, influencing many bacterial structures and metabolic processes at the same time (Figure 5). Among these are the following: inactivation of bacterial enzymes [202,203], disruption of bacterial metabolic processes [204–206] and the bacterial cell wall, accumulation in the cytoplasmic membrane and increase of its permeability [167,203,207], collapse the plasma membrane potential [206], interaction with DNA (deoxyribonucleic acid) [202] and generation of reactive oxygen species [208–210], which damage biomacromolecules [211]. Thanks to their multi-level mode of action, AgNPs destroy or inhibit the growth of pathogenic microorganisms including highly resistant bacterial strains at low concentrations

from a few to several tens of mg/L [92,160,162,167,175,207]. Importantly, no relevant data describing bacterial resistance to AgNPs or inactivation of antibacterial action of AgNPs (nanoparticles) have been reported yet. Bacterial resistance to silver is driven only with the ionic form of silver and apart from others, was deeply researched by Silver *et al.* [212,213]. Bacterial resistance to ionic silver originated from clinical environments [214] and also from naturally occurring strains [215]. Besides reduction of Ag⁺ to a less toxic oxidation state, the probable Ag⁺ resistance mechanism involves an active efflux from the cell, by either P-type ATPases (adenosine triphosphatase) or chemiosmotic Ag⁺/H⁺ antiporters [216–218].

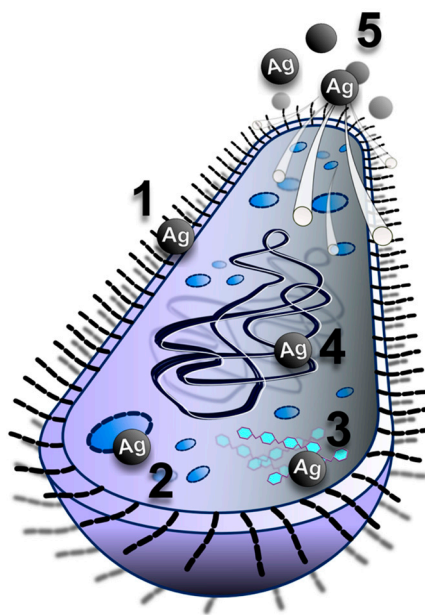


Figure 5. Silver nanoparticles simultaneously target bacteria via the destruction of their wall, inactivation of their enzymes, disrupting of critical metabolic pathways and interaction with bacterial DNA.

In recent years, a synergistic effect between AgNPs and various antibacterial agents has been investigated. Potara *et al.* studied antimicrobial activity of chitosan-coated AgNPs against two strains of *S. aureus* [219] and revealed that minimum inhibitory concentrations (MICs) of the composites were ten times lower than those of AgNPs and chitosan alone respectively. Another capping agent, myramistin increased activity of AgNPs against *E. coli* up to 20 times [220]. Combined treatments with a lactoferrin/xylitol hydrogel and silver-based wound dressings acted synergistically against the forming of biofilms of clinical wound isolates of methicillin-resistant *S. aureus* and *P. aeruginosa* [221]. Synergy of AgNPs and antimicrobial peptides polymyxin B and gramicidin S was reported also against different Gram-negative bacteria [222].

Recently several studies have indicated that AgNPs may strengthen the antibacterial effects of conventional antibiotics (beta-lactam antibiotics, macrolides, lincosamides, aminoglycosides) either additively or synergistically [223–229]. The synergistic effect of antibiotics and AgNPs was reported even at concentrations below their own effectiveness (*i.e.*, below MICs) [225,230–233]. Brown *et al.* showed a synergistic effect of AgNPs functionalized with ampicillin, even against multiple-antibiotic-resistant isolates of *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* and methicillin-resistant *S. aureus* [234]. Also Smekalova *et al.* and Panacek *et al.* proved enhancement of the antibacterial effect of antibiotics in combination with AgNPs against several animal and human pathogens and resistant bacterial strains [235–237]. These findings clearly showed that it is possible to find an effective combination of antibiotics and AgNPs or another antimicrobial with a multi-level mode of action, resulting in a synergistic antimicrobial effect allowing efficient inhibition of bacterial pathogens including

highly resistant bacterial strains using significantly lower doses as compared to an antibiotic alone. Replacement of frequently used antibiotics by AgNPs or a combination of these antibiotics with AgNPs represent a promising tool on how to kill bacteria without the development of antibiotic resistance [238].

10. Potential Side Effects of Silver Nanoparticles

The main problem by using AgNPs on biomaterials is that they are considered toxic not only for bacteria, but also to human host cells. Toxicity of silver nanoparticles to mammalian cells is considerably lower in comparison with antibacterial effective concentrations also due to the fact that eukaryotic cells have an antioxidant cellular mechanism that protects them [239,240]. The extended use of AgNPs can lead to a number of health problems from argyria [241] to silver accumulation in human liver and kidney. Although silver and its derivatives are already in clinical use, evidence of serious health problems [242] and high toxicity are rare [243].

A number of *in vitro* studies have been performed exploring the effects of AgNPs on a variety of cell types [88,239,244–253]. The most common mechanisms of toxicity from nanosized silver particles, as well as silver ions released from them [245,254] are: oxidative stress [246,255], Trojan-horse mechanisms [256,257] and DNA damage [163].

The question arises as to what determines if silver nanoparticles are toxic or not. In general, toxicity is determined by many factors, either on the side of the nanoparticles or on the side of the body that they are in contact with. Regarding nanoparticles, these are mainly size, shape [258], charge, surface modification, tendency to release ions, dose and exposure time. The role of the particle size is more important than concentration or dose [259,260] because smaller nanoparticles have a higher surface/volume ratio leading to higher oxidation and dissolution, accompanied by higher silver ion release [261]. Therefore, smaller AgNPs may show higher toxicity due to their larger specific surface area and associated faster Ag⁺ release compared to larger AgNPs [260]. However, that does not necessarily mean higher toxicity in a particular material and situation. Silver ion release is controlled by surface modification/stabilization and can be further influenced by other compounds presented in biological environment. Moreover, Ag⁺ release is also dependent on the formation of a protective oxidized silver layer that prevents full oxidation and dissolution of AgNPs [262]. Likewise, it is known that spherical nanoparticles are less toxic than wires [263] and negatively charged NPs exhibit low toxicity [264,265].

On the host side, the potential toxicity of AgNPs is determined by patient health status, routes of exposure, gender and other factors. In some organs (liver, kidney), silver is accumulated soon after application, while in others (brain, lung) higher concentrations are detected after a prolonged period [266–269]. Pauksch *et al.* [270] investigated the effect of AgNPs on human osteoblasts and it turned out that AgNPs were toxic at concentrations higher than 10 µg/g. The authors suggested that there is a gap between the toxic and antibacterial doses of AgNPs. This statement was confirmed by Necula *et al.* [271] who tested the antibacterial efficacy and toxicity towards the human osteoblastic cell line. They demonstrated that the antibacterial dose is by an order of magnitude lower than that having a toxic effect on human cells. These observations support the promising usage of presence of a therapeutically useful window for the application of AgNPs in orthopaedics.

11. Protocol for Testing of Silver Nanoparticle Coating Technologies Intended for Usage in Orthopaedics

There is no doubt that nanotreatment of biomaterial surfaces offers new opportunities for PJI prevention. On the other hand, the main obstacles preventing broader usage of such technologies are cytotoxicity and resultant decreased biocompatibility. It should be cautioned that nanotechnologies can also induce unintended inflammatory responses related to activation of immune cells such as dendritic cells, macrophages and others. Concern also exists over the mechanical properties of implant nanocoatings since damage may occur during surgical implantation, especially in cementless implants

inserted via press-fit methods. In addition, creating a coating-substrate interface robust enough to sustain the mechanical stresses involved in surgical implant insertion and ultimate loading once *in vivo* remains a challenge. Lastly, the risk of remote effects of absorbed nanosilver is still a potential problem.

Therefore, a set of *in vitro* tests (followed by *in vivo* experiments) is required to characterize in detail antibacterial efficacy, as well as biocompatibility and safety of such material modifications. The latter means to examine the cytotoxicity, cancerogenicity, interactions with osteoblasts and other cells and the potential of adverse stimulation of an immune response. As a result, specialists in nano-toxicology (esp. nano-genotoxicology, cytotoxicity, immunotoxicity), *in vitro* pharmacokinetics, pharmacodynamics and kinetics of particles are needed to collaborate in the development, preclinical testing and approval of any material modifications for clinical usage.

11.1. Demonstration of Antibacterial Efficacy

A critical step in progress lies in the demonstrating that newly developed biomaterials, or surface modifications possess antibacterial efficacy [272]. To date there is no widely accepted methodology available that could precisely and reproducibly demonstrate antibacterial behaviour of the proposed anti-infective technologies. Major criticisms are levelled at the static “closed” testing system, whereas *in vivo*, the implant has to face a dynamic, continuously changing, mechanically unstable and predominantly fluid environment [273]. As a result, the majority of studies to date have used inappropriate and insufficient protocols.

Controllable, standardized testing conditions that closely mimic the human *in vivo* environment are needed in order to overcome the aforementioned issues [273]. PJIs develop under low shear conditions and a multidirectional low-pressure fluid flow. A variety of testing tools have been proposed that attempt to simulate conditions of continuous or intermittent fluid-displacement in both the low and high shear conditions [274]. Protocols for cultivation of particular species (multispecies) biofilms under controllable, constant and reproducible conditions have been also described [275]. Finally, representative *in vitro* and *in vivo* models to test bacterial adhesion and biofilm formation on biomaterials for each particular clinical situation (*i.e.*, total joint arthroplasty, internal, external fixation) should be further developed and appropriately validated. Given the large variability of antibacterial strategies, it is likely that testing methods must be better tailored to match the specific proposed strategy at hand [150].

11.2. Testing of Cytotoxicity

Although many studies presented new nanoparticle surface treatments proving *in vitro* safety [271], others demonstrated the potential danger of such materials [276]. Nanoparticles have different effects on human health depending on the bulk material from which they have been produced [277]. In addition to the elemental composition, factors like nanoparticle dose, size, shape, exposure time and surface chemistry can affect its biological behaviour. Regarding the shape, silver nanowires showed the strongest cytotoxicity and immunological responses, whereas spherical silver particles had negligible effects on cells when tested in human cells [278]. Liu *et al.* found that 5 nm AgNPs were more toxic than 20 and 50 nm AgNPs in four cell lines (A549, HepG2, MCF-7, SGC-7901), indicating a size-dependent effect on cell viability [253]. It should be noted that some cell lines (PC-12 and NIH-3T3) exhibit greater sensitivity to AgNPs than another mammalian cell lines [279]. The rate of ion release and its variation in different media should be taken in consideration as well. All this concludes that cytotoxicity testing should be always suited exactly for the proposed implant coating (*i.e.*, exact nanoparticle size, concentration, shape, fixation method *etc.*) and its intended use in a specific tissue. In addition, a level of cytotoxicity can be dependent on the assay technique and a difference between extraction-based and direct contact assays has been found [280].

When testing new materials or surface modifications, the cytotoxicity testing is performed first and other tests (anti-bacterial, immunoreactivity *etc.*) are advanced only after the biomaterial is classified as biologically not harmful. Cytotoxicity testing is rapid, sensitive and inexpensive. Another

big advantage of cytotoxicity testing is the standardization of the procedure, ISO 10993 and the FDA (Food and Drug Administration) blue book memorandum (#G95-1) and its suitability for the testing of biomaterial from any part of the medical device (*i.e.*, TJA, internal, external fixation). This test is commonly performed using a mouse fibroblasts cell-line as target cells, following the exposure with the material (direct contact) as well as the extract of the material. Cells are very sensitive to biologically harmful extractables in certain quantities resulting in visible signs of toxicity, such as changes in cell morphology, vacuolization, or detachment. A different way of testing the nanotoxicity was described by Liu *et al.* via evaluation of induction of apoptosis [281].

Regarding novel anti-infective treatments with silver nanoparticles, a recent study reported that the BALB/c 3T3 cell line is 1000 times more sensitive for testing the toxicity of silver NPs than the *in vivo* animal models [282]. Although some studies showed a dose-dependent cytotoxic effect of nano-silver, new types of nano-silver were proven to be not cytotoxic [283], or it was shown that combination of a low amount of nano-silver with antibiotics provides an effective antibacterial action with negligible cytotoxic effect [236].

11.3. Testing of Immunoreactivity

Sensitization testing represents another part of the testing battery for new biomaterials, establishing the potential of a biomaterial to elicit immunogenic and allergenic responses (immunoreactivity). Currently, the most commonly used tests for novel materials and those medical devices that contact deep tissue, is the guinea pig maximization test (GPMT) where the extract of a biomaterial together with an adjuvant, is intradermally injected in model animals (Biological Evaluation of Medical Devices). Alternatively, a mouse local lymph node assay (LLNA) requiring less material than GPMT but needed to harvest the lymph nodes from sacrificed animals may be used with some precautions, such as a high number of false positives.

However, all animal tests are expensive and take days (weeks) to get results. It is therefore of great interest to replace or drastically reduce the utilization of tests based on experimental animals with suitable cell-based assays which exhibit required reliability, accuracy and importantly correlate to human reactivity. Several studies have shown great potential in the use of the MUTZ-3 human dendritic-cell cell-line for assessing *in vitro* sensitizing potency of chemicals and biomaterials, using a genomic biomarker signature [284–286]. Besides the MUTZ-3 assay, other tests are investigated for their potential to predict sensibilisation in humans as well [287]. However, it is likely that new testing methods must be validated and standardized to match the requirements for accuracy and ability, to be sensitive to the whole spectrum of molecules, with allergenic potential including nanosilver.

12. Time to Translation?

In the field of orthopaedics, there are no implants protected with silver nanotreatment available for clinical usage to date. At least two manufacturers already produce TJA treated by galvanic deposition of elementary silver on request (Implantcast GmbH–Medizintechnik, Buxtehude, Germany; Stanmore Implants, Borehamwood, UK). Initial clinical experiences with these “tailored” implants have been promising [288]. In addition, at least one study examined clinical usage of thermal-sprayed silver oxide in hydroxyapatite coating for total hip implants [84].

The situation is a little better in the field of indwelling medical devices protected by surface treatment with AgNPs. Again, in contrast to extensive experimental research, only several clinical studies have been conducted to demonstrate reduction of infections associated with the AgNP coating in these devices (left within a bodily organ for a limited time). For instance, the usage of external ventricular drainage catheters treated with AgNPs decreased the infection rate [289] while the venous catheters tailored with AgNPs failed to lower infection rates [290]. However, together these data preclude making any conclusions in support of their widespread clinical usage.

Examination of global grants and published studies of this topic suggests a striking discrepancy between proposed strategies of antibacterial surface treatment and ultimate completion of *in vitro* and

in vivo experimentation. In fact, we believe that very little progress has actually been made in the translation of the aforementioned modalities into clinically useful technologies. Barriers to translational medicine in this area are not only related to economic, medicolegal and biotechnological issues but with major problems in the demonstration of the safety of clinical trials. Concerns about long-term durability of such new implants as compared to traditional implants are also realistic. Leaders in this field have recently proposed that in order for some of these obstacles to be overcome, we must improve efficiency and effectiveness amongst all the partners involved. Patients will benefit from these technologies only by improving collaborative efforts among governments, regulatory agencies, industry leaders and health care payers [291]. While pressures exist worldwide to diminish the incidence of PJIs, surprisingly there is not a single large clinical study examining the role of broad-range implementation of implants containing antibacterial surface treatments.

13. Future Developments

The ideal implant surface modification using whatever approach, should provide antibacterial protection throughout the life of the implant with minimal side effects. In relation to AgNPs and their usage in modification of implants, there are three crucial future developments. The first one is synthesis of AgNPs with defined optimal size, ensuring high antibacterial activity and concurrently low cytotoxicity to mammalian cells; that means good biocompatibility with tissues without acute or long-term adverse effects. The second is the development of a new coating technique, or improvement and optimization of a current one ensuring reliable formation of compact, continuous and durable layer of AgNPs. The third concerns the elimination of an inhibitory effect of human lipids and proteins preventing AgNPs from implementing their intended antibacterial effect. These substances cover surfaces of TJA immediately after an implant is placed into the human body. To meet this challenge, recent advances in the field of surface chemistry, fluid mechanics, fluid mechanobiology, bio-inspired materials and/or endogenous mechanisms of immune stimulation should be utilized.

Another important issue related to antibacterial efficiency of AgNPs is connected with the possible development of bacterial resistance to silver NPs. It can be expected that with increasing use of AgNPs in killing bacteria or in the prevention of bacterial colonization in clinical medicine, the bacterial resistance to AgNPs could develop. As a result, strategies combining AgNPs with other antibacterial substances/approaches (either composite or nanocomposite layers), in order to achieve additive/synergistic effects are highly reasonable and should be investigated.

Finally, further investigation should be carried out in the field of strategies combining AgNPs with approaches restoring/maintaining local tissue homeostasis and modulating the immunologic surveillance and patrolling. This concept might comply with a wide variety of clinical situations ranging from residual low dose bacterial load during the surgery, to late haematogenic spreading of infection.

14. Conclusions

There is no doubt that prevention is the best response to the growing problem of orthopaedic implant infections. Engineers believe they are able to develop reliable, durable, non-toxic and safe biomaterials preventing bacterial adhesion and formation of biofilm on surfaces. Strategies incorporating nanopatterning and other nanotechnologies show great promise. Research in the field of antibacterial surface treatment has demonstrated *in vitro* and *in vivo* effectiveness of the technologies based on AgNPs, combining a strong antibacterial effect with relative inertness to the inner environment of a patient. On the other hand, issues relating to the mechanical properties of these technologies and the potential for detrimental side effects, such as toxicity and interference with osseointegration require further investigation.

Acknowledgments: Funding was obtained from the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A).

Author Contributions: J.G. gave the ideas, designed the review and wrote relevant parts of the manuscript. A.P., R.P., S.H. are responsible for the parts of the manuscript related to silver nanoparticles. E.K. contributed especially to the part on the methods appropriate to testing of silver nanocoating. M.Hob. read the literature and contributed to the orthopaedic parts of the manuscript. M.Hol. drew all the figures in the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: All the authors certify that they have no commercial associations that may pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Ag	silver
AgNP	silver nanoparticle
ATPase	adenosine triphosphatase
DAL/CHI	dopamine-modified alginate/chitosan
DNA	deoxyribonucleic acid
EPS	extracellular polymeric substances
FDA	Food and Drug Administration
GPMT	guinea pig maximization test
LCC	local carriers or coating
LLNA	local lymph node assay
MAMP	microbe associated molecular pattern
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule
NP	nanoparticle
NT	nanotube
PJI	prosthetic joint infection
PRR	pattern-recognition receptor
QAS	3-trimethoxysily-propyldimethyloctadecyl-ammonium chloride
QAS	quaternary ammonium salt
Ti	titanium
TiO ₂	titanium dioxide
TJA	total joint arthroplasty
USA	United States of America
UV	ultraviolet

References

1. Berend, K.R.; Lombardi, A.V., Jr.; Morris, M.J.; Bergeson, A.G.; Adams, J.B.; Sneller, M.A. Two-stage treatment of hip periprosthetic joint infection is associated with a high rate of infection control but high mortality. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2013**, *471*, 510–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. De Angelis, G.; Mutters, N.T.; Minkley, L.; Holderried, F.; Tacconelli, E. Prosthetic joint infections in the elderly. *Infection* **2015**, *43*, 629–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bedair, H.; Goyal, N.; Dietz, M.J.; Urish, K.; Hansen, V.; Manrique, J.; Hamilton, W.; Deirmengian, G. A history of treated periprosthetic joint infection increases the risk of subsequent different site infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 2300–2304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Voigt, J.; Mosier, M.; Darouiche, R. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of antibiotics and antiseptics for preventing infection in people receiving primary total hip and knee prostheses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6696–6707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kamath, A.F.; Ong, K.L.; Lau, E.; Chan, V.; Vail, T.P.; Rubash, H.E.; Berry, D.J.; Bozic, K.J. Quantifying the burden of revision total joint arthroplasty for periprosthetic infection. *J. Arthroplast.* **2015**, *30*, 1492–1497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Witso, E. The rate of prosthetic joint infection is underestimated in the arthroplasty registers. *Acta Orthop.* **2015**, *277*–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kurtz, S.M.; Lau, E.; Watson, H.; Schmier, J.K.; Parvizi, J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the united states. *J. Arthroplast.* **2012**, *27*, 61–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lindgren, V.; Gordon, M.; Wretenberg, P.; Karrholm, J.; Garellick, G. Deep infection after total hip replacement: A method for national incidence surveillance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2014**, *35*, 1491–1496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huotari, K.; Peltola, M.; Jansen, E. The incidence of late prosthetic joint infections: A registry-based study of 112,708 primary hip and knee replacements. *Acta Orthop.* **2015**, *86*, 321–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tande, A.J.; Patel, R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 302–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. 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*, 97–104. [[PubMed](#)]
12. Aggarwal, V.K.; Bakhshi, H.; Ecker, N.U.; Parvizi, J.; Gehrke, T.; Kendoff, D. Organism profile in periprosthetic joint infection: Pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in europe and in the united states. *J. Knee Surg.* **2014**, *27*, 399–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bemmer, P.; Plouzeau, C.; Tande, D.; Leger, J.; Giraudeau, B.; Valentin, A.S.; Jolivet-Gougeon, A.; Vincent, P.; Corvec, S.; Gibaud, S.; *et al.* Evaluation of 16s rRNA gene pcr sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: A prospective multicenter cross-sectional study. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3583–3589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Benito, N.; Franco, M.; Coll, P.; Galvez, M.L.; Jordan, M.; Lopez-Contreras, J.; Pomar, V.; Monllau, J.C.; Mirelis, B.; Gurgui, M. Etiology of surgical site infections after primary total joint arthroplasties. *J. Orthop. Res.* **2014**, *32*, 633–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gristina, A.G.; Naylor, P.; Myrvik, Q. Infections from biomaterials and implants: A race for the surface. *Med. Prog. Technol.* **1988**, *14*, 205–224. [[PubMed](#)]
16. Nishitani, K.; Sutipornpalangkul, W.; de Mesy Bentley, K.L.; Varrone, J.J.; Bello-Irizarry, S.N.; Ito, H.; Matsuda, S.; Kates, S.L.; Daiss, J.L.; Schwarz, E.M. Quantifying the natural history of biofilm formation *in vivo* during the establishment of chronic implant-associated staphylococcus aureus osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J. Orthop. Res.* **2015**, *33*, 1311–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vidlak, D.; Kielian, T. Infectious dose dictates the host response during *S. Aureus* orthopedic biofilm infection. *Infect. Immun.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yue, C.; Zhao, B.; Ren, Y.; Kuijjer, R.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.; Rochford, E.T. The implant infection paradox: Why do some succeed when others fail? Opinion and discussion paper. *Eur. Cells Mater.* **2015**, *29*, 303–310.
19. Zhou, X.; Yishake, M.; Li, J.; Jiang, L.; Wu, L.; Liu, R.; Xu, N. Genetic susceptibility to prosthetic joint infection following total joint arthroplasty: A systematic review. *Gene* **2015**, *563*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Navratilova, Z.; Gallo, J.; Mrazek, F.; Lostak, J.; Petrek, M. Mbl2 gene variation affecting serum mbl is associated with prosthetic joint infection in czech patients after total joint arthroplasty. *Tissue Antigens* **2012**, *80*, 444–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Busscher, H.J.; van der Mei, H.C. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Costerton, W.; Veeh, R.; Shirtliff, M.; Pasmore, M.; Post, C.; Ehrlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1466–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eichenberger, E.M.; Thaden, J.T.; Sharma-Kuinkel, B.; Park, L.P.; Rude, T.H.; Ruffin, F.; Hos, N.J.; Seifert, H.; Rieg, S.; Kern, W.V.; *et al.* Polymorphisms in fibronectin binding proteins a and b among staphylococcus aureus bloodstream isolates are not associated with arthroplasty infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, Y.; Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Norde, W. Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 5065–5070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chagnot, C.; Zorgani, M.A.; Astruc, T.; Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: Bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Thevenot, P.; Hu, W.; Tang, L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 270–280. [[PubMed](#)]
27. Roach, P.; Eglin, D.; Rohde, K.; Perry, C.C. Modern biomaterials: A review—Bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1263–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wilson, C.J.; Clegg, R.E.; Leavesley, D.I.; Pearcy, M.J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Stoodley, P.; Ehrlich, G.D.; Sedghizadeh, P.P.; Hall-Stoodley, L.; Baratz, M.E.; Altman, D.T.; Sotereanos, N.G.; Costerton, J.W.; Demeo, P. Orthopaedic biofilm infections. *Curr. Orthop. Pract.* **2011**, *22*, 558–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Laverty, G.; Gorman, S.P.; Gilmore, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 509–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Foster, T.J.; Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K.; Hook, M. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of staphylococcus aureus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fux, C.A.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Stoodley, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Ehrlich, G.D.; Montanaro, L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *830*, 29–46. [[PubMed](#)]
35. Spaan, A.N.; Surewaard, B.G.; Nijland, R.; van Strijp, J.A. Neutrophils *versus* staphylococcus aureus: A biological tug of war. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 629–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gardner, A.B.; Lee, S.K.; Woods, E.C.; Acharya, A.P. Biomaterials-based modulation of the immune system. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 732182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pajarinen, J.; Lin, T.H.; Sato, T.; Yao, Z.; Goodman, S. Interaction of materials and biology in total joint replacement—Successes, challenges and future directions. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **2014**, *2*, 7094–7108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Subbiahdoss, G.; Jutte, P.C.; van den Dungen, J.J.; Zaat, S.A.; Schultz, M.J.; Grainger, D.W. Biomaterial-associated infection: Locating the finish line in the race for the surface. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 153rv10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yue, C.; van der Mei, H.C.; Kuijper, R.; Busscher, H.J.; Rochford, E.T. Mechanism of cell integration on biomaterial implant surfaces in the presence of bacterial contamination. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103*, 3590–3598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Higgins, D.M.; Basaraba, R.J.; Hohnbaum, A.C.; Lee, E.J.; Grainger, D.W.; Gonzalez-Juarrero, M. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 161–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zimmerli, W.; Sendi, P. Pathogenesis of implant-associated infection: The role of the host. *Semin. Immunopathol.* **2011**, *33*, 295–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. An, Y.H.; Friedman, R.J. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J. Hosp. Infect.* **1996**, *33*, 93–108. [[CrossRef](#)]
43. Humphreys, H. Surgical site infection, ultraclean ventilated operating theatres and prosthetic joint surgery: Where now? *J. Hosp. Infect.* **2012**, *81*, 71–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McHugh, S.M.; Hill, A.D.; Humphreys, H. Laminar airflow and the prevention of surgical site infection. More harm than good? *Surgeon* **2015**, *13*, 52–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mejia, E.; Williams, A.; Long, M. Decreasing prosthetic joint surgical site infections: An interdisciplinary approach. *AORN J.* **2015**, *101*, 213–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Thornley, P.; Evaniew, N.; Riediger, M.; Winemaker, M.; Bhandari, M.; Ghert, M. Postoperative antibiotic prophylaxis in total hip and knee arthroplasty: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ Open* **2015**, *3*, E338–E343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wang, J.; Zhu, C.; Cheng, T.; Peng, X.; Zhang, W.; Qin, H.; Zhang, X. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. McMurray, C.L.; Hardy, K.J.; Verlander, N.Q.; Hawkey, P.M. Antibiotic surgical prophylaxis increases nasal carriage of antibiotic-resistant staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 1489–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Illingworth, K.D.; Mihalko, W.M.; Parvizi, J.; Sculco, T.; McArthur, B.; el Bitar, Y.; Saleh, K.J. How to minimize infection and thereby maximize patient outcomes in total joint arthroplasty: A multicenter approach: Aaos exhibit selection. *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **2013**, *95*, e50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Florschütz, A.V.; Fagan, R.P.; Matar, W.Y.; Sawyer, R.G.; Berrios-Torres, S.I. Surgical site infection risk factors and risk stratification. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2015**, *23*, S8–S11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Maoz, G.; Phillips, M.; Bosco, J.; Slover, J.; Stachel, A.; Inneh, I.; Iorio, R. The otto aufranc award: Modifiable versus nonmodifiable risk factors for infection after hip arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ma, Z.; Guo, F.; Qi, J.; Xiang, W.; Zhang, J. Meta-analysis shows that obesity may be a significant risk factor for prosthetic joint infections. *Int. Orthop.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alijanipour, P.; Heller, S.; Parvizi, J. Prevention of periprosthetic joint infection: What are the effective strategies? *J. Knee Surg.* **2014**, *27*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rezapoor, M.; Parvizi, J. Prevention of periprosthetic joint infection. *J. Arthroplast.* **2015**, *30*, 902–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Getzlaf, M.A.; Lewallen, E.A.; Kremers, H.M.; Jones, D.L.; Bonin, C.A.; Dudakovic, A.; Thaler, R.; Cohen, R.C.; Lewallen, D.G.; van Wijnen, A.J. Multi-disciplinary antimicrobial strategies for improving orthopaedic implants to prevent prosthetic joint infections in hip and knee. *J. Orthop. Res.* **2016**, *34*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Romano, C.L.; Scarponi, S.; Gallazzi, E.; Romano, D.; Drago, L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: A classification proposal in an evolving panorama. *J. Orthop. Surg. Res.* **2015**, *10*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tsaras, G.; Osmon, D.R.; Mabry, T.; Lahr, B.; St Sauveur, J.; Yawn, B.; Kurland, R.; Berbari, E.F. Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: A population-based study, olmsted county, minnesota, 1969–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2012**, *33*, 1207–1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhu, Y.; Zhang, F.; Chen, W.; Liu, S.; Zhang, Q.; Zhang, Y. Risk factors for periprosthetic joint infection after total joint arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 82–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ratner, B.D.; Schoen, F.J. The concept and assessment of biocompatibility. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed.; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 1, pp. 588–592.
60. Bernthal, N.M.; Stavrakis, A.I.; Billi, F.; Cho, J.S.; Kremen, T.J.; Simon, S.I.; Cheung, A.L.; Finerman, G.A.; Lieberman, J.R.; Adams, J.S.; et al. A mouse model of post-arthroplasty staphylococcus aureus joint infection to evaluate *in vivo* the efficacy of antimicrobial implant coatings. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Scherr, T.D.; Lindgren, K.E.; Schaeffer, C.R.; Hanke, M.L.; Hartman, C.W.; Kielian, T. Mouse model of post-arthroplasty staphylococcus epidermidis joint infection. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1106*, 173–181. [[PubMed](#)]
62. Gatin, L.; Saleh-Mghir, A.; Massin, P.; Cremieux, A.C. Critical analysis of experimental models of periprosthetic joint infection. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2015**, *101*, 851–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Corvec, S.; Portillo, M.E.; Pasticci, B.M.; Borens, O.; Trampuz, A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 923–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kapadia, B.H.; Berg, R.A.; Daley, J.A.; Fritz, J.; Bhawe, A.; Mont, M.A. Periprosthetic joint infection. *Lancet* **2016**, *387*, 386–394. [[CrossRef](#)]
65. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S. Physicochemical surface modifications of materials used in medicine. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press (Elsevier): Waltham, MA, USA, 2013; Volume 1, pp. 259–276.
66. Follmann, H.D.; Martins, A.F.; Gerola, A.P.; Burgo, T.A.; Nakamura, C.V.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of tmc/heparin complexes. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3711–3722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Neoh, K.G.; Kang, E.T. Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: Relevance to marine and medical applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2808–2819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Muszanska, A.K.; Rochford, E.T.; Gruszka, A.; Bastian, A.A.; Busscher, H.J.; Norde, W.; van der Mei, H.C.; Herrmann, A. Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and rgd peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2019–2026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. An, Y.H.; Stuart, G.W.; McDowell, S.J.; McDaniel, S.E.; Kang, Q.; Friedman, R.J. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating *in vitro*. *J. Orthop. Res.* **1996**, *14*, 846–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Zhu, H.; Guo, Z.; Liu, W. Adhesion behaviors on superhydrophobic surfaces. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3900–3913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Stallard, C.P.; McDonnell, K.A.; Onayemi, O.D.; O’Gara, J.P.; Dowling, D.P. Evaluation of protein adsorption on atmospheric plasma deposited coatings exhibiting superhydrophilic to superhydrophobic properties. *Biointerphases* **2012**, *7*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Poncin-Epaillard, F.; Herry, J.M.; Marmey, P.; Legeay, G.; Debarnot, D.; Bellon-Fontaine, M.N. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface—A potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 1152–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Shida, T.; Koseki, H.; Yoda, I.; Horiuchi, H.; Sakoda, H.; Osaki, M. Adherence ability of staphylococcus epidermidis on prosthetic biomaterials: An *in vitro* study. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 3955–3961.
74. Singh, A.V.; Vyas, V.; Patil, R.; Sharma, V.; Scopelliti, P.E.; Bongiorno, G.; Podesta, A.; Lenardi, C.; Gade, W.N.; Milani, P. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ivanova, E.P.; Truong, V.K.; Wang, J.Y.; Berndt, C.C.; Jones, R.T.; Yusuf, I.I.; Peake, I.; Schmidt, H.W.; Fluke, C.; Barnes, D.; *et al.* Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2010**, *26*, 1973–1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Truong, V.K.; Lapovok, R.; Estrin, Y.S.; Rundell, S.; Wang, J.Y.; Fluke, C.J.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3674–3683. [[PubMed](#)]
77. Filova, E.; Fojt, J.; Kryslova, M.; Moravec, H.; Joska, L.; Bacakova, L. The diameter of nanotubes formed on ti-6al-4v alloy controls the adhesion and differentiation of saos-2 cells. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 7145–7163.
78. Pandit, V.; Zuidema, J.M.; Venuto, K.N.; Macione, J.; Dai, G.; Gilbert, R.J.; Kotha, S.P. Evaluation of multifunctional polysaccharide hydrogels with varying stiffness for bone tissue engineering. *Tissue Eng. A* **2013**, *19*, 2452–2463.
79. Zhao, C.; Li, X.; Li, L.; Cheng, G.; Gong, X.; Zheng, J. Dual functionality of antimicrobial and antifouling of poly(n-hydroxyethylacrylamide)/salicylate hydrogels. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2013**, *29*, 1517–1524.
80. Zan, X.; Kozlov, M.; McCarthy, T.J.; Su, Z. Covalently attached, silver-doped poly(vinyl alcohol) hydrogel films on poly(l-lactic acid). *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1082–1088.
81. Drago, L.; Boot, W.; Dimas, K.; Malizos, K.; Hansch, G.M.; Stuyck, J.; Gawlitta, D.; Romano, C.L. Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation *in vitro*? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2014**, *472*, 3311–3323.
82. Bock, R.M.; McEntire, B.J.; Bal, B.S.; Rahaman, M.N.; Boffelli, M.; Pezzotti, G. Surface modulation of silicon nitride ceramics for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 318–330.
83. Webster, T.J.; Patel, A.A.; Rahaman, M.N.; Sonny Bal, B. Anti-infective and osteointegration properties of silicon nitride, poly(ether ether ketone), and titanium implants. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 4447–4454. [[PubMed](#)]
84. Eto, S.; Kawano, S.; Someya, S.; Miyamoto, H.; Sonohata, M.; Mawatari, M. First clinical experience with thermal-sprayed silver oxide-containing hydroxyapatite coating implant. *J. Arthroplast.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Guimond-Lischer, S.; Ren, Q.; Braissant, O.; Gruner, P.; Wampfler, B.; Maniura-Weber, K. Vacuum plasma sprayed coatings using ionic silver doped hydroxyapatite powder to prevent bacterial infection of bone implants. *Biointerphases* **2016**, *11*, 011012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Unosson, E.; Rodriguez, D.; Welch, K.; Engqvist, H. Reactive combinatorial synthesis and characterization of a gradient ag-ti oxide thin film with antibacterial properties. *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Cheng, H.; Li, Y.; Huo, K.; Gao, B.; Xiong, W. Long-lasting *in vivo* and *in vitro* antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102*, 3488–3499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Gao, A.; Hang, R.Q.; Huang, X.B.; Zhao, L.Z.; Zhang, X.Y.; Wang, L.; Tang, B.; Ma, S.L.; Chu, P.K. The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4223–4235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Mei, S.; Wang, H.; Wang, W.; Tong, L.; Pan, H.; Ruan, C.; Ma, Q.; Liu, M.; Yang, H.; Zhang, L.; *et al.* Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4255–4265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dong, W.; Zhu, Y.; Zhang, J.; Lu, L.; Zhao, C.; Qin, L.; Li, Y. Investigation on the antibacterial micro-porous titanium with silver nano-particles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 6782–6786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Panacek, A.; Balzerova, A.; Pucek, R.; Ranc, V.; Vecerova, R.; Husickova, V.; Pechousek, J.; Filip, J.; Zboril, R.; Kvitek, L. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of ag/pdda-diatomite nanocomposite. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *110*, 191–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kvitek, L.; Panacek, A.; Soukupova, J.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R.; Holecova, M.; Zboril, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (nps). *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5825–5834. [[CrossRef](#)]
93. Knetsch, M.L.W.; Koole, L.H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* **2011**, *3*, 340–366. [[CrossRef](#)]
94. Harrasser, N.; Jussen, S.; Banke, I.J.; Kmeth, R.; von Eisenhart-Rothe, R.; Stritzker, B.; Gollwitzer, H.; Burgkart, R. Antibacterial efficacy of titanium-containing alloy with silver-nanoparticles enriched diamond-like carbon coatings. *AMB Express* **2015**, *5*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Bai, Y.; Bai, Y.; Wang, C.; Gao, J.; Ma, W. Fabrication and characterization of gold nanoparticle-loaded tio2 nanotube arrays for medical implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ahmed, R.A.; Fadelallah, S.A.; El-Bagoury, N.; El-Rab, S.M.F.G. Improvement of corrosion resistance and antibacterial effect of niti orthopedic materials by chitosan and gold nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *292*, 390–399. [[CrossRef](#)]
97. Koseki, H.; Asahara, T.; Shida, T.; Yoda, I.; Horiuchi, H.; Baba, K.; Osaki, M. Clinical and histomorphometrical study on titanium dioxide-coated external fixation pins. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 593–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Haenle, M.; Fritsche, A.; Zietz, C.; Bader, R.; Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Gollwitzer, H. An extended spectrum bactericidal titanium dioxide (tio2) coating for metallic implants: *In vitro* effectiveness against mrsa and mechanical properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 381–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Yue, C.; Kuijjer, R.; Kaper, H.J.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J. Simultaneous interaction of bacteria and tissue cells with photocatalytically activated, anodized titanium surfaces. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2580–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Holinka, J.; Pilz, M.; Kubista, B.; Presterl, E.; Windhager, R. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth. *Bone Jt. J.* **2013**, *95-B*, 678–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Tran, P.A.; Webster, T.J. Selenium nanoparticles inhibit staphylococcus aureus growth. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 1553–1558.
102. Rodriguez-Valencia, C.; Lopez-Alvarez, M.; Cochon-Cores, B.; Pereiro, I.; Serra, J.; Gonzalez, P. Novel selenium-doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 853–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. LewisOscar, F.; MubarakAli, D.; Nithya, C.; Priyanka, R.; Gopinath, V.; Alharbi, N.S.; Thajuddin, N. One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (cunps) against clinical strains of pseudomonas aeruginosa. *Biofouling* **2015**, *31*, 379–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hoene, A.; Prinz, C.; Walschus, U.; Lucke, S.; Patrzyk, M.; Wilhelm, L.; Neumann, H.G.; Schlosser, M. *In vivo* evaluation of copper release and acute local tissue reactions after implantation of copper-coated titanium implants in rats. *Biomed. Mater.* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Elizabeth, E.; Baranwal, G.; Krishnan, A.G.; Menon, D.; Nair, M. Zno nanoparticle incorporated nanostructured metallic titanium for increased mesenchymal stem cell response and antibacterial activity. *Nanotechnology* **2014**, *25*, 115101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. Hu, H.; Zhang, W.; Qiao, Y.; Jiang, X.; Liu, X.; Ding, C. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of zn-incorporated tio2 coatings on titanium. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 904–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Tsuchiya, H.; Shirai, T.; Nishida, H.; Murakami, H.; Kabata, T.; Yamamoto, N.; Watanabe, K.; Nakase, J. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J. Orthop. Sci.* **2012**, *17*, 595–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bellucci, D.; Sola, A.; Cannillo, V. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 1030–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Durgalakshmi, D.; Balakumar, S.; Raja, C.A.; George, R.P.; Mudali, U.K. Structural, morphological and antibacterial investigation of ag-impregnated sol-gel-derived 45s5 nanobioglass systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 4285–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Shi, Y.Y.; Li, M.; Liu, Q.; Jia, Z.J.; Xu, X.C.; Cheng, Y.; Zheng, Y.F. Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan-hydroxyapatite nanocomposite coatings on ti substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Richtera, L.; Chudobova, D.; Cihalova, K.; Kremplova, M.; Milosavljevic, V.; Kopel, P.; Blazkova, I.; Hynek, D.; Adam, V.; Kizek, R. The composites of graphene oxide with metal or semimetal nanoparticles and their effect on pathogenic microorganisms. *Materials* **2015**, *8*, 2994–3011. [[CrossRef](#)]
112. Antoci, V., Jr.; Adams, C.S.; Parvizi, J.; Ducheyne, P.; Shapiro, I.M.; Hickok, N.J. Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, *461*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Antoci, V., Jr.; King, S.B.; Jose, B.; Parvizi, J.; Zeiger, A.R.; Wickstrom, E.; Freeman, T.A.; Composto, R.J.; Ducheyne, P.; Shapiro, I.M.; *et al.* Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 858–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Walter, M.S.; Frank, M.J.; Satue, M.; Monjo, M.; Ronold, H.J.; Lyngstadaas, S.P.; Haugen, H.J. Bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers *in vitro* and *in vivo*. *Dent. Mater.* **2014**, *30*, 200–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Chennell, P.; Feschet-Chassot, E.; Devers, T.; Awitor, K.O.; Descamps, S.; Sautou, V. *In vitro* evaluation of tio2 nanotubes as cefuroxime carriers on orthopaedic implants for the prevention of periprosthetic joint infections. *Int. J. Pharm.* **2013**, *455*, 298–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Hickok, N.J.; Shapiro, I.M. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1165–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Norowski, P.A.; Courtney, H.S.; Babu, J.; Haggard, W.O.; Bumgardner, J.D. Chitosan coatings deliver antimicrobials from titanium implants: A preliminary study. *Implant Dent.* **2011**, *20*, 56–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Chen, X.N.; Gu, Y.X.; Lee, J.H.; Lee, W.Y.; Wang, H.J. Multifunctional surfaces with biomimetic nanofibres and drug-eluting micro-patterns for infection control and bone tissue formation. *Eur. Cells Mater.* **2012**, *24*, 237–248.
119. Renoud, P.; Toury, B.; Benayoun, S.; Attik, G.; Grosogeat, B. Functionalization of titanium with chitosan via silanation: Evaluation of biological and mechanical performances. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Tan, H.; Ma, R.; Lin, C.; Liu, Z.; Tang, T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: Antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1854–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Yazici, H.; O'Neill, M.B.; Kacar, T.; Wilson, B.R.; Oren, E.E.; Sarikaya, M.; Tamerler, C. Engineered chimeric peptides as antimicrobial surface coating agents toward infection-free implants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 5070–5081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Rapsch, K.; Bier, F.F.; Tadros, M.; von Nickisch-Roseneck, M. Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 308–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Zheng, D.; Neoh, K.G.; Shi, Z.; Kang, E.T. Assessment of stability of surface anchors for antibacterial coatings and immobilized growth factors on titanium. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *406*, 238–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

124. Li, B.; McKeague, A.L. Emerging ideas: Interleukin-12 nanocoatings prevent open fracture-associated infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 3262–3265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Thallinger, B.; Prasetyo, E.N.; Nyanhongo, G.S.; Guebitz, G.M. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Chua, P.H.; Neoh, K.G.; Kang, E.T.; Wang, W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and rgd for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1412–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C.M.; Jouenne, T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1670–1684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. He, T.; Chan, V. Covalent layer-by-layer assembly of polyethyleneimine multilayer for antibacterial applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95*, 454–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Fu, J.; Ji, J.; Fan, D.; Shen, J. Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Zhou, B.; Li, Y.; Deng, H.; Hu, Y.; Li, B. Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *116*, 432–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Huang, W.; Li, X.; Xue, Y.; Huang, R.; Deng, H.; Ma, Z. Antibacterial multilayer films fabricated by lbl immobilizing lysozyme and htcc on nanofibrous mats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *53*, 26–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Min, J.; Braatz, R.D.; Hammond, P.T. Tunable staged release of therapeutics from layer-by-layer coatings with clay interlayer barrier. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2507–2517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Rizzello, L.; Pompa, P.P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem. Soc. Rev.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zhang, M.; Zhao, Y.; Yan, L.; Peltier, R.; Hui, W.; Yao, X.; Cui, Y.; Chen, X.; Sun, H.; Wang, Z. Interfacial engineering of bimetallic ag/pt nanoparticles on reduced graphene oxide matrix for enhanced antimicrobial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 8834–8840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Funao, H.; Nagai, S.; Sasaki, A.; Hoshikawa, T.; Tsuji, T.; Okada, Y.; Koyasu, S.; Toyama, Y.; Nakamura, M.; Aizawa, M.; *et al.* A novel hydroxyapatite film coated with ionic silver via inositol hexaphosphate chelation prevents implant-associated infection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Gottenbos, B.; van der Mei, H.C.; Klatter, F.; Grijpma, D.W.; Feijen, J.; Nieuwenhuis, P.; Busscher, H.J. Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2707–2710. [[CrossRef](#)]
137. Braem, A.; De Cremer, K.; Delattin, N.; De Brucker, K.; Neirinck, B.; Vandamme, K.; Martens, J.A.; Michiels, J.; Vleugels, J.; Cammue, B.P.; *et al.* Novel anti-infective implant substrates: Controlled release of antibiofilm compounds from mesoporous silica-containing macroporous titanium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *126*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Yu, Q.; Cho, J.; Shivapooja, P.; Ista, L.K.; Lopez, G.P. Nanopatterned smart polymer surfaces for controlled attachment, killing, and release of bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 9295–9304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Holzapfel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Noth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Huttmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 581–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Cipriano, A.F.; Miller, C.; Liu, H. Anodic growth and biomedical applications of tio2 nanotubes. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 2977–3003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Parvizi, J.; Antoci, V., Jr.; Hickok, N.J.; Shapiro, I.M. Selfprotective smart orthopedic implants. *Expert Rev. Med. Devices* **2007**, *4*, 55–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Mastronardi, E.; Foster, A.; Zhang, X.; Derosa, M.C. Smart materials based on DNA aptamers: Taking aptasensing to the next level. *Sensors* **2014**, *14*, 3156–3171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Ehrlich, G.D.; Stoodley, P.; Kathju, S.; Zhao, Y.; McLeod, B.R.; Balaban, N.; Hu, F.Z.; Sotereanos, N.G.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; *et al.* Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2005**, *437*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

144. Shchukin, D.G.; Mohwald, H. Self-repairing coatings containing active nanoreservoirs. *Small* **2007**, *3*, 926–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Shchukin, D.; Mohwald, H. Materials science. A coat of many functions. *Science* **2013**, *341*, 1458–1459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Keller, L.; Wagner, Q.; Offner, D.; Eap, S.; Musset, A.M.; Arruebo, M.; Kelm, J.M.; Schwinte, P.; Benkirane-Jessel, N. Integrating microtissues in nanofiber scaffolds for regenerative nanomedicine. *Materials* **2015**, *8*, 6863–6867. [[CrossRef](#)]
147. Yilmaz, C.; Colak, M.; Yilmaz, B.C.; Ersoz, G.; Kutateladze, M.; Gozlugol, M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: An experimental study. *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **2013**, *95*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Liu, Y.; Busscher, H.J.; Zhao, B.; Li, Y.; Zhang, Z.; van der Mei, H.C.; Ren, Y.; Shi, L. Surface-adaptive, antimicrobially loaded, micellar nanocarriers with enhanced penetration and killing efficiency in staphylococcal biofilms. *ACS Nano* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Yu, Q.; Wu, Z.; Chen, H. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomater.* **2015**, *16*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Zaborowska, M.; Welch, K.; Branemark, R.; Khalilpour, P.; Engqvist, H.; Thomsen, P.; Trobos, M. Bacteria-material surface interactions: Methodological development for the assessment of implant surface induced antibacterial effects. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Lemire, J.A.; Harrison, J.J.; Turner, R.J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 371–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Ketabchi, A.; Komm, K.; Miles-Rossouw, M.; Cassani, D.A.; Variola, F. Nanoporous titanium surfaces for sustained elution of proteins and antibiotics. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Hizal, F.; Zhuk, I.; Sukhishvili, S.; Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Choi, C.H. Impact of 3d hierarchical nanostructures on the antibacterial efficacy of a bacteria-triggered self-defensive antibiotic coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 20304–20313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Tian, B.; Chen, W.; Yu, D.; Lei, Y.; Ke, Q.; Guo, Y.; Zhu, Z. Fabrication of silver nanoparticle-doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *61*, 345–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Gallo, J.; Holinka, M.; Moucha, C.S. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 13849–13880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D.J.; Shah, S.I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 244–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Chen, C.Y.; Chiang, C.L. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3607–3609. [[CrossRef](#)]
158. Martinez-Castanon, G.A.; Nino-Martinez, N.; Martinez-Gutierrez, F.; Martinez-Mendoza, J.R.; Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 1343–1348. [[CrossRef](#)]
159. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Panacek, A.; Kvitek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V.K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Sharma, V.K.; Yngard, R.A.; Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 83–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S.; Saquib, Q.; Musarrat, J. Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of pseudomonas aeruginosa. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54*, 688–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. AshaRani, P.V.; Mun, G.L.K.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *Acs Nano* **2009**, *3*, 279–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Hess, K.L.; Jones, R.L.; Schlager, J.J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13608–13619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

165. Hussain, S.M.; Hess, K.L.; Gearhart, J.M.; Geiss, K.T.; Schlager, J.J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. In Proceedings of the 13th International Workshop on *in Vitro* Toxicology, Zegrze, Poland, 8–11 September 2004; pp. 975–983.
166. Afkhami, F.; Pourhashemi, S.J.; Sadegha, M.; Salehi, Y.; Fard, M.J.K. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against enterococcus faecalis. *J. Dent.* **2015**, *43*, 1573–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Agarwala, M.; Barman, T.; Gogoi, D.; Choudhury, B.; Pal, A.R.; Yadav, R.N.S. Highly effective antibiofilm coating of silver-polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1223–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Alberto Perez-Diaz, M.; Boegli, L.; James, G.; Velasquillo, C.; Sanchez-Sanchez, R.; Martinez-Martinez, R.-E.; Alejandro Martinez-Castanon, G.; Martinez-Gutierrez, F. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against streptococcus mutans and their cytotoxic effect. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *55*, 360–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Ali, K.; Ahmed, B.; Dwivedi, S.; Saquib, Q.; Al-Khedhairi, A.A.; Musarrat, J. Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with eucalyptus globulus leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Besinis, A.; De Peralta, T.; Handy, R.D. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 745–754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Fufa, O.; Andronescu, E.; Grumezescu, V.; Holban, A.M.; Mogoanta, L.; Mogosanu, G.D.; Socol, G.; Iordache, F.; Chifiriuc, M.C.; Grumezescu, A.M. Silver nanostructured surfaces prepared by maple for biofilm prevention. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2015**, *5*, 1011–1017.
172. Ghosh, S.; Jagtap, S.; More, P.; Shete, U.J.; Maheshwari, N.O.; Rao, S.J.; Kitture, R.; Kale, S.; Bellare, J.; Patil, S.; *et al.* Dioscorea bulbifera mediated synthesis of novel aucoreagshell nanoparticles with potent antibiofilm and antileishmanial activity. *J. Nanomater.* **2015**. [[CrossRef](#)]
173. Jaiswal, S.; Bhattacharya, K.; McHale, P.; Duffy, B. Dual effects of beta-cyclodextrin-stabilised silver nanoparticles: Enhanced biofilm inhibition and reduced cytotoxicity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 5367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Palanisamy, N.K.; Ferina, N.; Amirulhusni, A.N.; Mohd-Zain, Z.; Hussaini, J.; Ping, L.J.; Durairaj, R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against pseudomonas aeruginosa. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Rajiv, S.; Drilling, A.; Bassiouni, A.; James, C.; Vreugde, S.; Wormald, P.-J. Topical colloidal silver as an anti-biofilm agent in a staphylococcus aureus chronic rhinosinusitis sheep model. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 283–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Taglietti, A.; Arciola, C.R.; D’Agostino, A.; Dacarro, G.; Montanaro, L.; Campoccia, D.; Cucca, L.; Vercellino, M.; Poggi, A.; Pallavicini, P.; *et al.* Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials* **2014**, *35*, 1779–1788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Taraszkiwicz, A.; Fila, G.; Grinholc, M.; Nakonieczna, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed. Res. Int.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Thomas, R.; Soumya, K.R.; Mathew, J.; Radhakrishnan, E.K. Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of coagulase negative staphylococci. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *149*, 68–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Wu, D.; Fan, W.; Kishen, A.; Gutmann, J.L.; Fan, B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against enterococcus faecalis biofilm. *J. Endod.* **2014**, *40*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Xie, C.M.; Lu, X.; Wang, K.F.; Meng, F.Z.; Jiang, O.; Zhang, H.P.; Zhi, W.; Fang, L.M. Silver nanoparticles and growth factors incorporated hydroxyapatite coatings on metallic implant surfaces for enhancement of osteoinductivity and antibacterial properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8580–8589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Rodriguez-Cano, A.; Pacha-Olivenza, M.A.; Babiano, R.; Cintas, P.; Gonzalez-Martin, M.L. Non-covalent derivatization of aminosilanized titanium alloy implants silver-enhanced coating of antibacterial organics. *Surf. Coat. Technol.* **2014**, *245*, 66–73. [[CrossRef](#)]
182. Zhao, C.J.; Feng, B.; Li, Y.T.; Tan, J.; Lu, X.; Weng, J. Preparation and antibacterial activity of titanium nanotubes loaded with ag nanoparticles in the dark and under the uv light. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *280*, 8–14. [[CrossRef](#)]

183. Wang, Z.; Sun, Y.; Wang, D.; Liu, H.; Boughton, R.I. *In situ* fabrication of silver nanoparticle-filled hydrogen titanate nanotube layer on metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implantation. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 2903–2916.
184. Saidin, S.; Chevallier, P.; Kadir, M.R.A.; Hermawan, H.; Mantovani, D. Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 4715–4724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. De Giglio, E.; Cafagna, D.; Cometa, S.; Allegretta, A.; Pedico, A.; Giannossa, L.C.; Sabbatini, L.; Mattioli-Belmonte, M.; Iatta, R. An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: Development and analytical characterization. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 805–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Secinti, K.D.; Ozalp, H.; Attar, A.; Sargon, M.F. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* **2011**, *18*, 391–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Cao, H.L.; Liu, X.Y.; Meng, F.H.; Chu, P.K. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials* **2011**, *32*, 693–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Della Valle, C.; Visai, L.; Santin, M.; Cigada, A.; Candiani, G.; Pezzoli, D.; Arciola, C.R.; Imbriani, M.; Chiesa, R. A novel antibacterial modification treatment of titanium capable to improve osseointegration. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 864–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Ionita, D.; Grecu, M.; Ungureanu, C.; Demetrescu, I. Antimicrobial activity of the surface coatings on tialzr implant biomaterial. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 630–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Brennan, S.A.; Ni Fhoghlu, C.; Devitt, B.M.; O'Mahony, F.J.; Brabazon, D.; Walsh, A. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *Bone Jt. J.* **2015**, *97-B*, 582–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Saleh, N.B.; Chambers, B.; Aich, N.; Plazas-Tuttle, J.; Phung-Ngoc, H.N.; Kirisits, M.J. Mechanistic lessons learned from studies of planktonic bacteria with metallic nanomaterials: Implications for interactions between nanomaterials and biofilm bacteria. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Zhong, X.; Song, Y.J.; Yang, P.; Wang, Y.; Jiang, S.Y.; Zhang, X.; Li, C.Y. Titanium surface priming with phase-transited lysozyme to establish a silver nanoparticle-loaded chitosan/hyaluronic acid antibacterial multilayer via layer-by-layer self-assembly. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Fabrega, J.; Renshaw, J.C.; Lead, J.R. Interactions of silver nanoparticles with pseudomonas putida biofilms. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 9004–9009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Choi, O.Y.; Yu, C.P.; Fernandez, G.E.; Hu, Z.Q. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* **2010**, *44*, 6095–6103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Mohanty, S.; Mishra, S.; Jena, P.; Jacob, B.; Sarkar, B.; Sonawane, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 916–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Peulen, T.O.; Wilkinson, K.J. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 3367–3373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Qin, H.; Cao, H.L.; Zhao, Y.C.; Zhu, C.; Cheng, T.; Wang, Q.J.; Peng, X.C.; Cheng, M.Q.; Wang, J.X.; Jin, G.D.; et al. *In vitro* and *in vivo* anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9114–9125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Bai, L.; Hang, R.Q.; Gao, A.; Zhang, X.Y.; Huang, X.B.; Wang, Y.Y.; Tang, B.; Zhao, L.Z.; Chu, P.K. Nanostructured titanium-silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *355*, 32–44. [[CrossRef](#)]
199. Zhang, X.M.; Li, Z.Y.; Yuan, X.B.; Cui, Z.D.; Bao, H.J.; Li, X.; Liu, Y.D.; Yang, X.J. Cytotoxicity and antibacterial property of titanium alloy coated with silver nanoparticle-containing polyelectrolyte multilayer. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 2816–2820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Esfandiari, N.; Simchi, A.; Bagheri, R. Size tuning of ag-decorated TiO₂ nanotube arrays for improved bactericidal capacity of orthopedic implants. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102*, 2625–2635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Chen, X.Y.; Cai, K.Y.; Fang, J.J.; Lai, M.; Li, J.H.; Hou, Y.H.; Luo, Z.; Hu, Y.; Tang, L.L. Dual action antibacterial TiO₂ nanotubes incorporated with silver nanoparticles and coated with a quaternary ammonium salt (QAS). *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *216*, 158–165. [[CrossRef](#)]
202. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Duan, S.S.; Ouyang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on staphylococcus aureus. *Biometals* **2011**, *24*, 135–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

203. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Zeng, H.Y.; Ou-Yang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1115–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Cui, L.; Chen, P.Y.; Chen, S.D.; Yuan, Z.H.; Yu, C.P.; Ren, B.; Zhang, K.S. *In situ* study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5436–5443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Lara, H.H.; Ayala-Nunez, N.V.; Turrent, L.D.I.; Padilla, C.R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 615–621. [[CrossRef](#)]
206. Lok, C.N.; Ho, C.M.; Chen, R.; He, Q.Y.; Yu, W.Y.; Sun, H.Z.; Tam, P.K.H.; Chiu, J.F.; Che, C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 916–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. SonDI, I.; Salopek-SonDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E-coli* as a model for gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Choi, O.; Hu, Z.Q. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4583–4588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 95–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Xu, H.Y.; Qu, F.; Xu, H.; Lai, W.H.; Wang, Y.A.; Aguilar, Z.P.; Wei, H. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* o157:H7. *Biometals* **2012**, *25*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. CabiscoL, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **2000**, *3*, 3–8. [[PubMed](#)]
212. Silver, S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 341–353. [[CrossRef](#)]
213. Silver, S.; Phung, L.T.; Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 627–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Kremer, A.N.; Hoffmann, H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the enterobacter cloacae complex. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3249–3257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Haefeli, C.; Franklin, C.; Hardy, K. Plasmid-determined silver resistance in *pseudomonas-stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* **1984**, *158*, 389–392. [[PubMed](#)]
216. Gupta, A.; Matsui, K.; Lo, J.F.; Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in salmonella. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 183–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Li, X.Z.; Nikaido, H.; Williams, K.E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6127–6132. [[PubMed](#)]
218. Nies, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 313–339. [[CrossRef](#)]
219. Potara, M.; Jakab, E.; Damert, A.; Popescu, O.; Canpean, V.; Astilean, S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on staphylococcus aureus. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Vertelov, G.K.; Krutyakov, Y.A.; Efremenkova, O.V.; Olenin, A.Y.; Lisichkin, G.V. A versatile synthesis of highly bactericidal myramistin (r) stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Ammons, M.C.B.; Ward, L.S.; James, G.A. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int. Wound J.* **2011**, *8*, 268–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Ruden, S.; Hilpert, K.; Berditsch, M.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3538–3540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Birla, S.S.; Tiwari, V.V.; Gade, A.K.; Ingle, A.P.; Yadav, A.P.; Rai, M.K. Fabrication of silver nanoparticles by phoma glomerata and its combined effect against *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* and staphylococcus aureus. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Fayaz, A.M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P.T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

225. Ghosh, S.; Patil, S.; Ahire, M.; Kitture, R.; Kale, S.; Pardesi, K.; Cameotra, S.S.; Bellare, J.; Dhavale, D.D.; Jabgunde, A.; *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using dioscorea bulbifera tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 483–496.
226. Muhsin, T.M.; Hachim, A.K. Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles and their activity against some human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2081–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M.I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S.; Ali, N. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 3187–3195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Sathiyarayanan, G.; Kiran, G.S.; Selvin, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine bacillus subtilis MSBN17. *Colloid Surface B* **2013**, *102*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Shahverdi, A.R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 168–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Hwang, I.S.; Hwang, J.H.; Choi, H.; Kim, K.J.; Lee, D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1719–1726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Li, P.; Li, J.; Wu, C.Z.; Wu, Q.S.; Li, J. Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1912–1917. [[CrossRef](#)]
232. Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Krawczyk, K.; Wrobel, I.; Wolska, K.I. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in pseudomonas aeruginosa by silver nanoparticles. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 849–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Singh, R.; Wagh, P.; Wadhvani, S.; Gaidhani, S.; Kumbhar, A.; Bellare, J.; Chopade, B.A. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from acinetobacter calcoaceticus and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4277–4289.
234. Brown, A.N.; Smith, K.; Samuels, T.A.; Lu, J.R.; Obare, S.O.; Scott, M.E. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of pseudomonas aeruginosa and enterobacter aerogenes and methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2768–2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Smekalova, M.; Aragon, V.; Panacek, A.; Pucek, R.; Zboril, R.; Kvitek, L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet. J.* **2016**, *209*, 174–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Panacek, A.; Smekalova, M.; Kilianova, M.; Pucek, R.; Bogdanova, K.; Vecerova, R.; Kolar, M.; Havrdova, M.; Plaza, G.A.; Chojniak, J.; *et al.* Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* **2015**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Panáček, A.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Bogdanová, K.; Röderová, M.; Kolář, M.; Kilianová, M.; Hradilová, Š.; Froning, J.P.; Havrdová, M.; *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant enterobacteriaceae. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *142*, 392–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* **2015**, *20*, 8856–8874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *236*, 310–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Scavone, M.; Armentano, I.; Fortunati, E.; Cristofaro, F.; Mattioli, S.; Torre, L.; Kenny, J.M.; Imbriani, M.; Arciola, C.R.; Visai, L. Antimicrobial properties and cytocompatibility of plga/ag nanocomposites. *Materials* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
241. Kwon, H.B.; Lee, J.H.; Lee, S.H.; Lee, A.Y.; Choi, J.S.; Ahn, Y.S. A case of argyria following colloidal silver ingestion. *Ann. Dermatol.* **2009**, *21*, 308–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Mayr, M.; Kim, M.J.; Wanner, D.; Helmut, H.; Schroeder, J.; Mihatsch, M.J. Argyria and decreased kidney function: Are silver compounds toxic to the kidney? *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *53*, 890–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Drake, P.L.; Hazelwood, K.J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann. Occup. Hyg.* **2005**, *49*, 575–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

244. Shahbazzadeh, D.; Ahari, H.; Motalebi, A.A.; Anvar, A.A.; Moaddab, S.; Asadi, T.; Shokrgozar, M.A.; Rahman-Nya, J. *In vitro* effect of nanosilver toxicity on fibroblast and mesenchymal stem cell lines. *Iran. J. Fish. Sci.* **2011**, *10*, 487–496.
245. Mukherjee, S.G.; O’Clonadh, N.; Casey, A.; Chambers, G. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 238–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Kim, S.; Choi, J.E.; Choi, J.; Chung, K.H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D.Y. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 1076–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Kawata, K.; Osawa, M.; Okabe, S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 6046–6051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Avalos Funez, A.; Isabel Haza, A.; Mateo, D.; Morales, P. *In vitro* evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. *Toxicol. Mech. Methods* **2013**, *23*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Asare, N.; Instanes, C.; Sandberg, W.J.; Refsnes, M.; Schwarze, P.; Kruszewski, M.; Brunborg, G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* **2012**, *291*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Albers, C.E.; Hofstetter, W.; Siebenrock, K.A.; Landmann, R.; Klenke, F.M. *In vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 30–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Frankova, J.; Pivodova, V.; Vagnerova, H.; Juranova, J.; Ulrichova, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Galandakova, A.; Frankova, J.; Ambrozova, N.; Habartova, K.; Pivodova, V.; Zalesak, B.; Safarova, K.; Smekalova, M.; Ulrichova, J. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, C.; Li, H.C.; Wang, T.; Liao, C.Y.; Cui, L.; Zhou, Q.F.; Yan, B.; Jiang, G.B. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 319–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. De Matteis, V.; Malvindi, M.A.; Galeone, A.; Brunetti, V.; De Luca, E.; Kote, S.; Kshirsagar, P.; Sabella, S.; Bardi, G.; Pompa, P.P. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of ag-ion release in the cytosol. *Nanomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 731–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Chairuangkitti, P.; Lawanprasert, S.; Roytrakul, S.; Aueviriyavit, S.; Phummiratch, D.; Kulthong, K.; Chanvorachote, P.; Maniratanachote, R. Silver nanoparticles induce toxicity in a549 cells via ros-dependent and ros-independent pathways. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 330–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Hsiao, I.L.; Hsieh, Y.K.; Wang, C.F.; Chen, I.C.; Huang, Y.J. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 3813–3821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Park, E.J.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Park, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a trojan-horse type mechanism. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 872–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
258. Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.F.; Zhang, H.S.; Xi, Z.G. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 69–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med. J.* **2014**, *55*, 283–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
260. Park, M.; Neigh, A.M.; Vermeulen, J.P.; de la Fonteyne, L.J.J.; Verharen, H.W.; Briede, J.J.; van Loveren, H.; de Jong, W.H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9810–9817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
261. Liu, J.Y.; Sonshine, D.A.; Shervani, S.; Hurt, R.H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6903–6913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
262. Molleman, B.; Hiemstra, T. Surface structure of silver nanoparticles as a model for understanding the oxidative dissolution of silver ions. *Langmuir* **2015**, *31*, 13361–13372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Stoehr, L.C.; Gonzalez, E.; Stampfl, A.; Casals, E.; Duschl, A.; Puentes, V.; Oostingh, G.J. Shape matters: Effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Kasemets, K.; Suppi, S.; Mantecca, P.; Kahru, A. Charge and size-dependent toxicity of silver nanoparticles to yeast cells. *Toxicol. Lett.* **2014**, *229*, S193–S194. [[CrossRef](#)]

265. Schlinkert, P.; Casals, E.; Boyles, M.; Tischler, U.; Hornig, E.; Tran, N.; Zhao, J.; Himly, M.; Riediker, M.; Oostingh, G.J.; *et al.* The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *J. Nanobiotechnol.* **2015**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
266. Dziendzikowska, K.; Gromadzka-Ostrowska, J.; Lankoff, A.; Oczkowski, M.; Krawczynska, A.; Chwastowska, J.; Sadowska-Bratek, M.; Chajduk, E.; Wojewodzka, M.; Dusinska, M.; *et al.* Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32*, 920–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Loeschner, K.; Hadrup, N.; Qvortrup, K.; Larsen, A.; Gao, X.Y.; Vogel, U.; Mortensen, A.; Lam, H.R.; Larsen, E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Van der Zande, M.; Vandebriel, R.J.; Van Doren, E.; Kramer, E.; Rivera, Z.H.; Serrano-Rojero, C.S.; Gremmer, E.R.; Mast, J.; Peters, R.J.B.; Hollman, P.C.H.; *et al.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7427–7442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
269. Garza-Ocanas, L.; Ferrer, D.A.; Burt, J.; Diaz-Torres, L.A.; Ramirez Cabrera, M.; Tamez Rodriguez, V.; Lujan Rangel, R.; Romanovicz, D.; Jose-Yacamán, M. Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats. *Metallomics* **2010**, *2*, 204–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
270. Pauksch, L.; Hartmann, S.; Rohnke, M.; Szalay, G.; Alt, V.; Schnettler, R.; Lips, K.S. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 439–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Necula, B.S.; van Leeuwen, J.P.T.M.; Fratila-Apachitei, L.E.; Zaat, S.A.J.; Apachitei, I.; Duszczyk, J. *In vitro* cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 4191–4197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
272. Campoccia, D.; Cangini, I.; Selan, L.; Vercellino, M.; Montanaro, L.; Visai, L.; Arciola, C.R. An overview of the methodological approach to the *in vitro* study of anti-infective biomaterials. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 800–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
273. Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L.; Costerton, B.; DeMeo, P.; Shirtliff, M.; Gawalt, E.; Kathju, S. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press (Elsevier): Waltham, MA, USA, 2013; Volume 1, pp. 565–583.
274. Barros, J.; Grenho, L.; Manuel, C.M.; Ferreira, C.; Melo, L.F.; Nunes, O.C.; Monteiro, F.J.; Ferraz, M.P. A modular reactor to simulate biofilm development in orthopedic materials. *Int. Microbiol.* **2013**, *16*, 191–198. [[PubMed](#)]
275. Ludecke, C.; Jandt, K.D.; Siegismund, D.; Kujau, M.J.; Zang, E.; Rettenmayr, M.; Bossert, J.; Roth, M. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84837.
276. Rujanapun, N.; Aueviriyavit, S.; Boonrungsiman, S.; Rosena, A.; Phummiratch, D.; Riolueang, S.; Chalaow, N.; Viprakasit, V.; Maniratanachote, R. Human primary erythroid cells as a more sensitive alternative *in vitro* hematological model for nanotoxicity studies: Toxicological effects of silver nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 1982–1992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Albrecht, M.A.; Evans, C.W.; Raston, C.L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem* **2006**, *8*, 417–432. [[CrossRef](#)]
278. Nunez-Anita, R.E.; Acosta-Torres, L.S.; Vilar-Pineda, J.; Martinez-Espinosa, J.C.; de la Fuente-Hernandez, J.; Castano, V.M. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3999–4006.
279. Sambale, F.; Wagner, S.; Stahl, F.; Khaydarov, R.R.; Scheper, T.; Bahnemann, D. Investigations of the toxic effect of silver nanoparticles on mammalian cell lines. *J. Nanomater.* **2015**. [[CrossRef](#)]
280. Sussman, E.M.; Casey, B.J.; Dutta, D.; Dair, B.J. Different cytotoxicity responses to antimicrobial nanosilver coatings when comparing extract-based and direct-contact assays. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 631–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
281. Liu, Y.; Li, X.; Bao, S.; Lu, Z.; Li, Q.; Li, C.M. Plastic protein microarray to investigate the molecular pathways of magnetic nanoparticle-induced nanotoxicity. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 175501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

282. Zou, J.; Feng, H.; Mannerstrom, M.; Heinonen, T.; Pyykko, I. Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Chan, E.L.; Zhang, C.; Cheung, G.S. Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic irrigant. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2015**, *7*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
284. Albrekt, A.S.; Johansson, H.; Borje, A.; Borrebaeck, C.; Lindstedt, M. Skin sensitizers differentially regulate signaling pathways in mutz-3 cells in relation to their individual potency. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *15*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
285. Johansson, H.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A.; Lindstedt, M. The gard assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 1163–1169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
286. Johansson, H.; Lindstedt, M.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based *in vitro* alternative to animal tests. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
287. Wong, C.L.; Ghassabian, S.; Smith, M.T.; Lam, A.L. *In vitro* methods for hazard assessment of industrial chemicals—Opportunities and challenges. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
288. Wafa, H.; Grimer, R.J.; Reddy, K.; Jeys, L.; Abudu, A.; Carter, S.R.; Tillman, R.M. Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: Case-control study. *Bone Jt. J.* **2015**, *97*, 252–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
289. Lemcke, J.; Depner, F.; Meier, U. The impact of silver nanoparticle-coated and antibiotic-impregnated external ventricular drainage catheters on the risk of infections: A clinical comparison of 95 patients. *Acta Neurochir. Suppl.* **2012**, *114*, 347–350. [[PubMed](#)]
290. Antonelli, M.; De Pascale, G.; Ranieri, V.M.; Pelaia, P.; Tufano, R.; Piazza, O.; Zangrillo, A.; Ferrario, A.; De Gaetano, A.; Guaglianone, E.; *et al.* Comparison of triple-lumen central venous catheters impregnated with silver nanoparticles (agrive(r)) *vs.* conventional catheters in intensive care unit patients. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *82*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
291. Grainger, D.W.; van der Mei, H.C.; Jutte, P.C.; van den Dungen, J.J.; Schultz, M.J.; van der Laan, B.F.; Zaat, S.A.; Busscher, H.J. Critical factors in the translation of improved antimicrobial strategies for medical implants and devices. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9237–9243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty

Martin Kuba,¹ Jiří Gallo ,² Tomáš Pluháček ,¹ Martin Hobza,² David Milde ¹

¹Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

²Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Received 16 August 2017; revised 14 March 2018; accepted 23 March 2018

Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.34137

Abstract: This prospective study examined the content of metals released from total joint arthroplasty into joint fluid, whole blood and periprosthetic tissues. We determined the levels of Ti, V, Nb, Co, Cr, and Mo, using inductively coupled plasma mass spectrometry, in samples from patients who underwent reoperation of total hip or knee arthroplasty. All of the patients ($n = 117$) included in the study had either metal on polyethylene or ceramic on polyethylene-bearing pairs. First, our results conclusively showed that the majority of released metals were deposited in periprosthetic tissues. In this context, the bloodstream turned out to be an ineffective biomarker of the effects occurring in local tissues. Second, there was a clear time-dependent nature of metallic

accumulation. Based on our extensive dataset, we found significantly elevated levels of the released metals in joint fluid and periprosthetic tissues originating from loosened implants compared to stable ones, as well as recognizable differences between the groups with stable implants and aseptic loosening. Finally, it was proved that the concentrations of metals decreased dependent on the distance of the tissue from the implant. © 2018 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B: 000–000, 2018.

Key Words: inductively coupled plasma mass spectrometry, total joint replacement, metal release, periprosthetic tissue, joint fluid

How to cite this article: Kuba M, Gallo J, Pluháček T, Hobza M, Milde D 2018. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res Part B* 2018;00B:000–000.

INTRODUCTION

One of the main and still unresolved problems of total joint arthroplasty is continual exposure of periprosthetic tissues to metal particles released from the bearing/non-bearing surfaces of total hip arthroplasty (THA) and knee arthroplasty (TKA). These particles contribute to the local adverse reaction to the implant, as well as to remote effects, by spreading throughout the body via blood and lymphoreticular dissemination.¹ The latter effects are still poorly understood despite several methods having been applied in various clinical and epidemiological studies.^{2,3} Therefore, it should still be considered an unproven hypothesis that these particles have potentially harmful effects on the immune system, liver, kidneys, and central nervous system.^{4–6}

Locally, metal particles and ions are toxic⁷ and potentially carcinogenic³ depending on concentrations. Finally, metal particles are well-known inducers of allergic hypersensitivity reactions.⁸ All of the aforementioned and other

metal-related side effects are now the center of attention. Metallic debris has been associated with pseudotumor formation, early aseptic loosening, and aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesions.⁹ Some studies have also demonstrated that the type of local tissue response depends on the metal content in the evaluated tissues.¹⁰

A considerable number of papers have addressed the concentrations of metals in body fluids, such as blood, serum or urine, looking for metals as markers of total joint arthroplasty (TJA) failure.¹¹ In contrast, less attention has been paid to other clinical materials, especially synovial fluid^{12,13} and periprosthetic tissues as representative samples to observe the total load of locally released metals.^{14,15}

The primary aim of the current study was to present the metal content (Ti, V, Nb, Co, Cr, Mo) in the joint fluid, periprosthetic tissues and peripheral blood of patients with other than metal-on-metal bearings to provide an insight into the total metallic load in patients with this type of TJA implant. The secondary aim was to associate the metal

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: D. Milde; e-mail: david.milde@upol.cz

Contract grant sponsor: Univerzita Palackého v Olomouci; contract grant number: PrF_2018_027

Contract grant sponsor: Grant Agency of the Ministry of Health; contract grant number: 16-31852A

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Youth and Sports; contract grant number: LO 1305

content in a particular body compartment with types of implants and their lengths of implant service. We hypothesized in this context that (1) implants with a longer time in service (i.e., length of implant service) would show higher tissue concentrations of particular metals, compared to those with a shorter period; (2) the metal content would be higher in periprosthetic tissues compared to joint fluid, indicating the chronic uptake and accumulation of metal particles and ions released from metallic surfaces; (3) the metal content would be higher in surface tissues than in deeper ones; and (4) there would be a difference in the metal content between total hip and knee arthroplasties. Whereas most of the published studies have been based on small sample sets, in our research, we studied a group of 117 subjects with a wide range of implanted replacements and 43 patients without any implants. Our study provided detailed insight into the distribution of metal particles across several body compartments, as well as information about the potential exposure of periprosthetic tissues to implant-related metals in this population of patients. The design of our study was pragmatic and strongly based on the epidemiologically analytical approach, and the samples were enrolled chronologically as the patients underwent surgery and regarding their individual conditions during the relatively long duration of the study. We believe that our complex approach could provide a better understanding of the topic of chronic exposition of the local and systemic environment to TJA metallic by-products.

MATERIAL AND METHODS

Laboratory instrumentation

All of the measurements were performed with an Agilent 7700x inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) (Agilent Technologies, Japan), equipped with an octopole reaction system (He mode, flow rate 4.3 mL min^{-1}). The typical operating conditions were: RF power 1550 W, plasma gas flow rate 15 L min^{-1} , auxiliary gas flow rate 0.9 L min^{-1} , and nebulizer gas flow rate 1.07 L min^{-1} . The following isotopes were selected for the determination: ^{47}Ti , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{59}Co , ^{93}Nb , and ^{95}Mo .

Reagents, standards, and certified reference materials

Single element certified reference materials (CRMs) with $1.000 \pm 0.002 \text{ g L}^{-1}$ (water calibration solutions, Analytika, Ltd., Czech Republic) for all of the measured elements were diluted to the required concentrations. A multielemental calibration solution containing Bi, In, Sc, Tb, and Y served as an internal standard. Three CRMs—TM-15.2 (EC, Canada), TORT-2 (NRC-CNRC, Canada) and Seronorm trace elements whole blood level 3 (Sero AS, Billingstad, Norway)—were used to validate the method, as well as for quality control of the ICP-MS measurements. The results for the method validation, as well as the limit of detection and concentration levels of CRMs, are presented in supplementary files (Tables S2 and S3). Nitric acid (Anapure, Analytika Ltd., Czech Republic) and hydrogen peroxide (analytical grade+, Analytika, Czech Republic) were utilized for the sample decomposition and preparation of calibration standards. Deionized

ultrapure water with resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ obtained from a Milli-Q water system (Millipore, France) was used for dilutions and rinsing.

Sample collection

Peripheral blood samples were collected in 10 mL polypropylene tubes. The joint fluid samples were aspirated into 5 mL tubes before incision of a joint capsule. A thin surface layer of the tissue covering the inner side of the joint capsule was collected after the incision of the knee/hip joint capsule. This layer (here called 1) was designated as the pseudosynovial membrane since it resembles the synovial membrane, and it was in a direct physical contact with the implant and prosthetic by-products (wear particles, metal ions, and so forth) contained in the joint fluid, in contrast to the tissue lying above (layer 2). Regarding the thickness of the tissue layer, the tissue layer 1 thickness was within 5 mm, while the thickness of tissue layer 2 was determined intraoperatively with the intention of not damaging the healthy periprosthetic tissues. As a result, the thickness of the tissue layer varied from 2 to 10 mm depending on the location of sampling and other local factors (layer 2 could not be sampled in a small number of the patients). The tissue samples were placed into sterile containers separately and deeply frozen at -80°C immediately after sampling.

Sample preparation

Prior to the decomposition step, the deeply frozen tissue samples were lyophilized (ALPHA 1–2 LD plus freeze drier, CHRIST, Germany) according to the lyophilization program composed of: main drying $3.5 \text{ h}/-25^\circ\text{C}/0.63 \text{ mbar}$; and final drying $0.5 \text{ h}/-76^\circ\text{C}/0.001 \text{ mbar}$; and it was subsequently divided into three separate aliquots. Each sample was warmed to the laboratory temperature. One milliliter of joint fluid, 1 mL of peripheral blood or 200 mg of periprosthetic tissue were utilized for microwave-assisted digestion, followed by the ICP-MS analysis of the implant-related metals. Microwave digestion of all of the samples was performed in a power controlled microwave digestion system MLS 1200 mega system (Milestone, Italy) with the addition of concentrated HNO_3 (2–4 mL) and H_2O_2 (1–2 mL), depending on the weight of the sample and the material under study. Subsequently, a microwave digestion program was used: 2 min/250 W, 5 min/400 W, 2 min/500 W, and 6 min/600 W, with 2 min/0 W of waiting between each step and a 30-min cooling interval after the end of the process. All of the tubes and containers used during sample preparation in the laboratory were pre-treated in 5% (v/v) HNO_3 for 24 h and then rinsed with deionized ultrapure water.

Subjects

The study included Czech Caucasian patients operated on between September 2008 and February 2014 by a single surgeon (JG) at a single institution. Our data reflected the total load of metals in the exposed population in our region during the period of enrollment. Samples of peripheral blood, joint fluid, and periprosthetic tissues were obtained from 43 controls without TJA and 117 subjects with TJA.

TABLE I. Patient Characteristics

	Patients (<i>n</i> = 117)	Controls (<i>n</i> = 43)
Age	39–92 (\bar{x} = 67.4)	53–82 (\bar{x} = 67.1)
Sex	Males 45/ females 72	Males 21/ females 22
Localization	73 hips/44 knees	11 hips/32 knees
<i>In situ</i> (months)	1–274 (\bar{x} = 130.7)	-
Height (cm)	143–189 (\bar{x} = 167.2)	158–182 (\bar{x} = 169.4)
Weight (kg)	50–120 (\bar{x} = 80.6)	60–118 (\bar{x} = 88.7)
Primary diagnosis	Primary OA—73 Secondary OA—44	Primary OA—38 Secondary OA—5
Reasons for revision	AL = 42 Inf = 13 Inst = 9 OL = 31 PJ = 15 PPF = 7	-

n, number of patients; \bar{x} , sample mean; OA, osteoarthritis; AL, aseptic loosening; Inf, infection; Inst, instability; OL, osteolysis; PJ, painful joint; PPF, periprosthetic fracture.

From this group, 42 patients were reoperated on for aseptic loosening of total hip arthroplasty (THA; *n* = 30) and total knee arthroplasty (TKA; *n* = 12), and 75 patients were reoperated on for other reasons and had stable implants at the time of surgery (THA: *n* = 43, TKA: *n* = 32). The same types of materials were collected from 43 patients with primary osteoarthritis undergoing THA (*n* = 11) and TKA (*n* = 32). This latter group served as control subjects without a TJA at the site of interest. For the patients' detailed characteristics, see Table I; a summary of the TJA materials is shown in the supplementary files (Table S1).

Limitations

Whereas our study was performed over a long period of time (2008–2014), several elements were included in the study (Mo, Nb) after the first series of experiments; collection of peripheral blood and joint fluid started later during the study as well, which resulted in different numbers of samples for individual elements, as well as materials under study. In addition, it was not always possible to sample the layer 2 tissue. Not all of the patients reoperated on during the period of study could be included, which might have incurred selection bias. The number of patients in the groups of particular implants was not identical, which could have affected the variability of the observed metal content at least partially. Some of the patients also had other TJAs than those that were included into the study, which could have affected the blood concentrations of the particular metals. The exact information about the metallic content of a particular implant was limited (only partly based on exact information from manufacturers). Some inaccuracy in tissue sampling could have occurred especially in relation to layer 2. To minimize the inter-surgeon differences in tissue sampling, the only surgeon (JG) obtained all of the samples in this study, including tissue samples.

Statistical analysis

The NCSS 2007 statistical software package (NCSS LLC) and the Statistica software package, version 12.0 (StatSoft), were used for the statistical analysis. Non-parametric two-tailed tests were used for hypothesis testing (level of significance $p = 0.01$). EffiValidation software package 3.0 (Effichem, Czech Republic) was used for limit of detection (LOD) calculation.

RESULTS

Method validation and quality control

The entire measurement procedure was validated with certified reference materials and the following parameters: LOD, linearity, precision and trueness. To ensure the quality of long-term measurements, the entire method was continuously monitored by measuring of the CRMs TM-15.2 and Seronorm trace elements whole blood (level 3). The results of the method validation, as well as the long-term measurement validation parameters, were appropriate for our purposes, and all of the details are presented in the supplementary files (Tables S2 and S3).

Descriptive statistics

The samples of 117 patients and 43 controls were analyzed, and descriptive statistics for all of the determined elements (Ti, V, Cr, Co, Nb, and Mo) in joint fluid, peripheral blood and periprosthetic tissues were calculated and are summarized in Table II. The mass concentration of the metals in $\mu\text{g kg}^{-1}$ was calculated based on the weight of the original samples. The descriptive statistics revealed a large dispersion of the data, especially in the tissue samples of the patient group. This dispersion is caused at least in part by the natural heterogeneity of our data, that is, different joints, reasons for revisions, months *in situ*, and types of implants compared. When the data of the patients and the controls were compared separately for each sampled material under study, we revealed significant differences for Ti, V, Cr, and Co in joint effusions and periprosthetic tissue samples but not in whole blood.

Comparison of the patient and control groups

The Mann-Whitney test was applied to compare all of the elements in all of the matrices. There were no statistically significant differences for the studied metals in the peripheral blood samples. Statistically significant differences were found only for Ti, V, Cr, and Co in the joint effusion and periprosthetic tissue samples, while no differences were found for Mo and Nb. An indicative comparison of all of the analyzed elements and matrices is presented in Figure 1. It is important to emphasize that only the samples originating from patients with metal present at the place of sampling (joint fluid, tissue) or with replacements made from this metal anywhere in the body (peripheral blood) were included for all of the statistics. Considering that significantly higher concentrations were found in periprosthetic tissues, all of the following statistical evaluations focused on this matrix.

TABLE II. Concentration of Metals in Control and Patient Groups for Joint Fluid, Peripheral Blood and Periprosthetic Tissue

Element	n		Mean ± SD (µg kg ⁻¹)		Median (µg kg ⁻¹)	
	Control	Patients	Control	Patient	Control	Patient
Joint Fluid						
Ti	36	71	11 ± 5	963 ± 5045	11	22
V	36	40	1 ± 0.2	10 ± 30	1	1
Cr	36	79	10 ± 28	59 ± 167	1	11
Co	36	77	3 ± 6	22 ± 48	1	6
Nb	36	26	1 ± 0.2	7 ± 16	1	1
Mo	25	49	6 ± 13	3 ± 3	2	2
Peripheral Blood						
Ti	15	70	29 ± 13	26 ± 14	27	24
V	16	42	1 ± 0	3 ± 10	1	1
Cr	13	77	8 ± 22	2 ± 2	1	1
Co	14	75	1 ± 0	1 ± 1	1	1
Nb	18	30	1 ± 0	1 ± 0	1	1
Mo	18	62	2 ± 2	4 ± 12	1	2
Periprosthetic Tissue (In Patient Group—Layer 1)						
Ti	22	76	367 ± 957	27,330 ± 100,900	124	2349
V	22	42	15 ± 41	234 ± 430	5	47
Cr	22	68	381 ± 575	8876 ± 26,880	170	1079
Co	22	77	45 ± 109	6522 ± 16,380	11	709
Nb	22	22	7 ± 11	228 ± 614	4	4
Mo	21	56	27 ± 27	682 ± 1637	16	44
Periprosthetic Tissue (In Patient Group—Layer 2)						
Ti	n/a	49	n/a	22,050 ± 140,600	n/a	851
V	n/a	26	n/a	34 ± 43	n/a	15
Cr	n/a	47	n/a	3527 ± 8969	n/a	825
Co	n/a	43	n/a	1841 ± 8636	n/a	90
Nb	n/a	18	n/a	39 ± 103	n/a	4
Mo	n/a	38	n/a	215 ± 941	n/a	21

n, number of patients; SD, standard deviation; n/a, not available.

Difference in the metal content between total hip and knee arthroplasties

The Mann-Whitney test was used to compare the total concentration levels of metals released from the hip and knee. Statistically significant differences were found only for Ti and V (higher concentrations were found in the hip), while none were found for Cr, Co and Mo. Niobium was not compared because none of the patients in our study group had knee replacements containing alloy of Nb.

Comparison of obtained tissue layers

Wilcoxon's signed-rank test was used for the comparison of the metal concentrations between two layers of the

periprosthetic tissue as a matter of distance from the joint cavity. Acetabular/femoral components, made from Ti, Ti-Al-V, Co-Cr, and Co-Cr-Mo, were compared. Significant differences between these layers for all of the studied elements were observed with the exception of Nb. As a result, we believe that the layer 1 tissues should reflect more closely the total load of metals than the layer 2 tissues.

Principal component analysis

Considering that we had a multivariate dataset, an advanced statistical technique (i.e., principal component analysis (PCA)) was applied to examine the true relationships among our data. This approach allowed us to reveal strong patterns

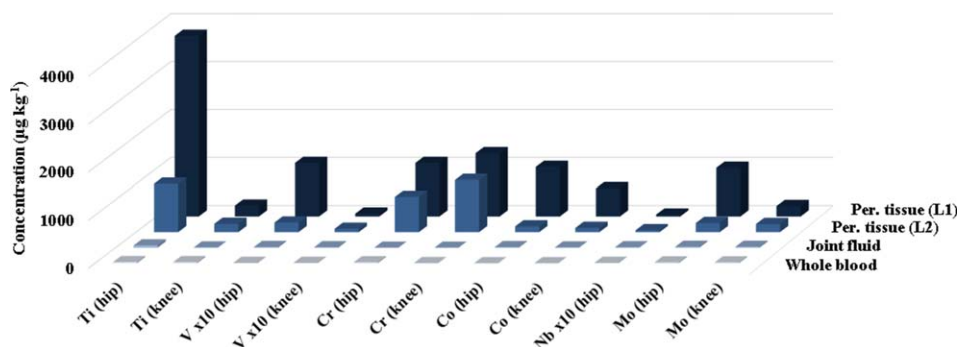


FIGURE 1. Indicative comparison of all the analyzed elements and matrices, presented by medians. L2, periprosthetic tissue layer 2; L1, periprosthetic tissue layer 1.

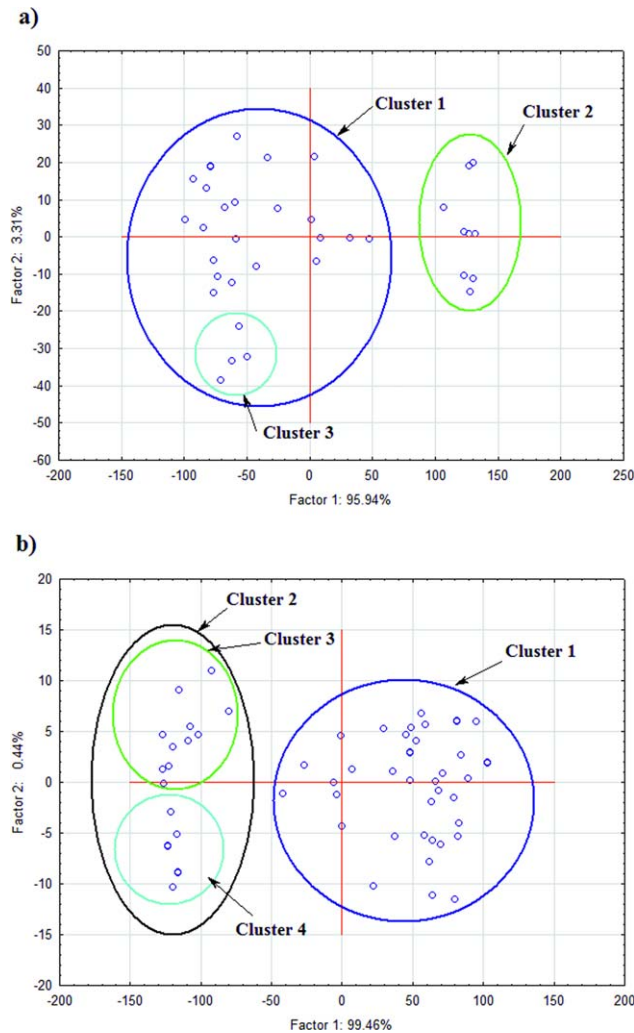


FIGURE 2. Components loadings plot for Ti-Al-V (a) and Co-Cr-Mo (b).

existing in the dataset. Statistical testing was performed on the data derived from tissue samples from joints where one of the components made of the most frequently used alloys, such as Ti-Al-V ($n = 40$) and Co-Cr-Mo ($n = 60$). The following original variables were included in the PCA model: analyzed metals (Ti, V/Co, Cr, Mo); reason for surgery; joint (hip/knee); months *in situ* (overall 1–274); sex (male/female); and BMI (body mass index), which was calculated instead of using of the patients' height and weight. Box-Cox transformation was applied to the dataset prior to PCA. For the analysis of the Ti-Al-V group, 95.94% of the variability could be explained by the first principal component, which was strongly correlated with the variable of months *in situ* according to the factor coordinate variables. The components loadings plot [Figure 2(a)] revealed two main, clearly recognizable clusters. Cluster 2 was recognized as the group of patients with a short period of replacement *in situ* ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 13.5$) and cluster 1 as the group of patients with a long period of replacement *in situ* ($n = 29$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 182.8$). A small group of 4 points (cluster 3) was identified at the bottom side of cluster 1. What these

subjects had in common is that they had a high BMI ($n = 4$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 35.5$). Moreover, cluster 2 had higher BMI ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 34.0$) than the others ($n = 33$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 26.5$). For Co-Cr-Mo alloys, 99.46% of variability could be explained by the first principal component, which was strongly correlated with the variable of months *in situ* according to the factor coordinate variables. The components loadings plot also revealed two main, clearly recognizable groups [Figure 2(b)], similarly to the PCA for Ti-Al-V. Cluster 2 was recognized as the group of patients with a short period of replacement *in situ* ($n = 19$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 27.6$) and cluster 1 as the group of patients with a long period of replacement *in situ* ($n = 41$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 179.2$). Higher BMI in the patients with a short period of replacement *in situ* was not clearly confirmed: $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 30.1$, compared to the patients with a long term $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 27.1$. However, cluster 2 could be additionally divided into cluster 3 ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 25.5$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 37.0$) and cluster 4 ($n = 8$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 36.5$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 43.5$).

Comparison between reasons for surgery

The patients included in this study were reoperated on either for aseptic loosening of at least one component of total joint arthroplasty, or they had the whole implant stable at the time of surgery. We speculated that the former group could have increased levels of particular metals compared to the latter due to direct mechanical damage to the metallic surface of the TJA. The results for the aforementioned groups are graphically expressed by the medians and are compared with the control group in Figure 3.

Length of implant service

To show the total metallic burden over time, it is necessary to choose suitable "time windows" for the entire group of patients/implants. Ideally, the NICE (National Institute for health and Care Excellence) criteria might be used as in clinical practice. However, the design of the study (accidental enrollment, ethical rules, and so forth) precluded the use of strictly predefined checkpoints during the follow-up. Instead, the patients (implants) were classified according to outcomes resulting directly from PCA, in which the first principal component was strongly correlated with the variable "months *in situ*". As a result, the first group consisted of patients reoperated on within 75 months after the index surgery, while in the second group, the length of implant service was between 76 and 274 months. The median for each group was calculated for the hip and knee joints separately, and the results are summarized in Table III. Box and whisker plots for Ti (hip) and Cr (knee) are shown in Figure 4 (for the remainder of the elements, see the supplementary information file—Figures S1–S9 online). There was a visually distinguishable trend for the majority of the elements.

DISCUSSION

Although the clinical benefits of articular replacements are unexceptionable, the release of metals from implants may be associated with adverse health effects in some patients.

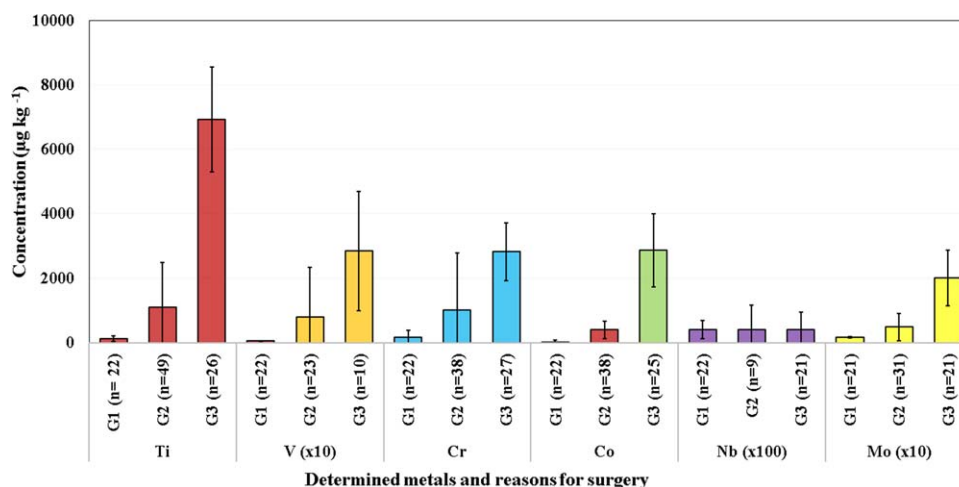


FIGURE 3. Indicative comparison of metals concentrations related to reasons for surgery, presented by median. G1, control group; G2, stable implants; G3, aseptic loosening; n, number of patients.

On the other hand the permanent release of metals is not necessarily a substantial problem in the majority of patients with TJA. As described in the literature, various releasing mechanisms and procedures can occur¹¹ during the lifetime of the implant in the body, considering that no metal or alloy is fully inert.¹⁵ The interactions of these metals with biomolecules,¹⁶ toxicity to T-cells, cancer risk,³ chromosomal damage¹⁷ and potentially adverse effects⁷ continue to be widely discussed.

In our study, the metal content in joint fluid, periprosthetic tissues and peripheral blood was investigated in a large set of patients. The results of our study can be formulated as two leading conclusions, which are supported by further results as well. First, our results conclusively showed that the majority of released metals were deposited in periprosthetic tissues. Second, there was a clearly time-dependent manner of metallic accumulation. All of the results are discussed in detail in following paragraphs.

The concentration levels found in peripheral blood in the control group that we report on were comparable with the published studies worldwide,¹⁸⁻²⁰ and in our region.²¹ Only a slightly higher concentration of titanium was observed. Unfortunately, in the majority of cases, the concentration levels in the control group were not reported for periprosthetic tissues in the literature and only rarely for joint fluid.¹³ The concentration levels in joint fluid and whole blood in the patient group were comparable with the levels reported in reviews addressing ion concentrations after implantation.^{11,14} Similarly, elevated concentrations for metals in tissues were reported.¹⁴ The authors of this study note that it is difficult to compare these values reported directly with the data presented in this article because of the great variety of factors influencing the results. This study showed that the bloodstream is relatively protected from the accumulation of substantial concentrations of released metals regardless of the relatively large number of

TABLE III. Concentration of Metals Related to Survivorship of Total Hip and Knee Replacements.

Element	Control Group		Months <i>In Situ</i>			
	n	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0-75		76-274	
			n	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Hip						
Ti	22	124	8	1127	47	4313
V	22	5	4	13	26	125
Cr	22	17	9	1047	37	1155
Co	22	11	9	985	34	1197
Nb	22	4	6	4	19	4
Mo	22	16	8	101	34	171
Knee						
Ti	22	124	13	129	8	2304
V	22	5	10	5	4	10
Cr	22	17	18	723	15	2895
Co	22	11	18	338	15	3511
Mo	22	16	7	16	10	78

n, number of patients.

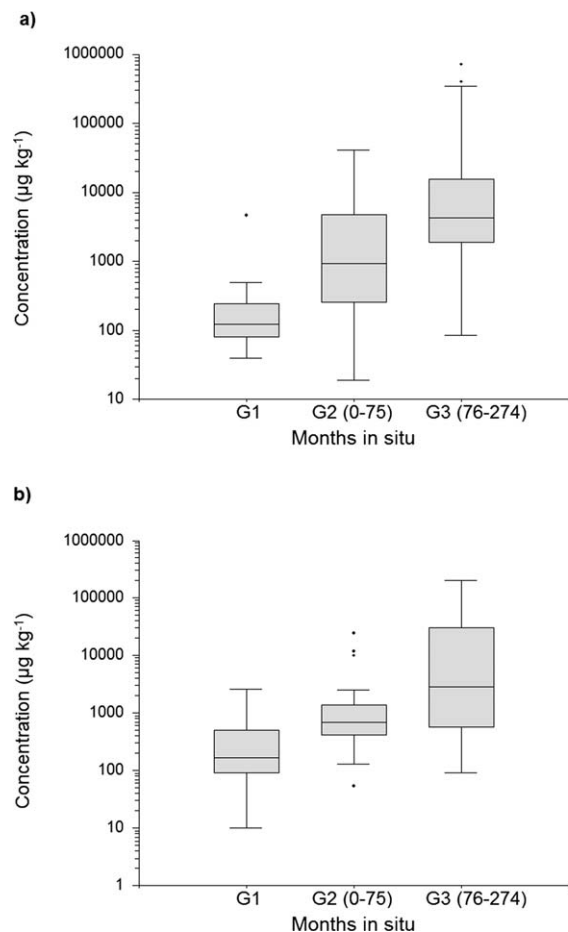


FIGURE 4. Concentration of Ti in periprosthetic tissues in hip (a) and Cr in knee (b) related to survivorship of implants. G1, control group; G2, short period of replacement *in situ* (0–75 months); G3, long period of replacement *in situ* (76–274 months).

implants used in the patients under study and for different time periods. Other variables, such as reasons for failure, sex and BMI, did not affect the blood concentrations of the examined metals either. Importantly, this study involved only implants combining polyethylene with metallic or ceramic counterparts. Significant differences in the concentrations of metals coming from TJA in the peripheral blood have been described in the literature for metal-on-metal bearings,^{22–24} as well as other articulating pairs.²⁵ Therefore, it must be assumed that the bloodstream participates in metallic dissemination to the organs. Thus, finding substantial metal concentrations in the plasma indicates that the clearance capacity of the blood system must be overcome at the time of sampling, which could be caused by a higher burden of metallic by-products in the patients whom an increased concentration was detected in. Thus, the mentioned discrepancy could lie at least partially in different dynamics of metal release from the implant surface. On the other hand, our results agree with literature to some extent where statistically significant differences for several elements in synovial fluids were also found.^{12,13,26} Our results showed that the bloodstream is not an effective biomarker

of the effects occurring in local tissues due to non-metal-on-metal bearing. Nevertheless, this finding does not exclude individual cases in which monitoring of the bloodstream could be a useful indicator of implant malfunction,²⁷ and several researchers have reported that the serum metal ion level did not exclude this diagnosis.²⁴

As we hypothesized, the metallic burden in patients with TJA should increase over time, depending on the time in service of the implants under study. We found a visually distinguishable trend for the majority of elements, confirming this prediction. The only exceptions were chromium and cobalt in the hip, for which the concentrations in the short-term group were outside of the predicted trend. Our data presented in Table III show that the proportions of released Co and Cr did not agree with their theoretical alloy compositions. Our results showed that Cr was the predominantly released metal in patients with short-term replacement *in situ*. In contrast, in patients with long-term replacement *in situ*, the proportions of Cr and Co were closer to the alloy compositions. This phenomenon could be explained by Co-Cr-Mo-based alloys being covered with a thin layer of Cr₂O₃, increasing alloy bio-resistance.^{28,29} Differences in this proportion were especially recognizable from the results of knee arthroplasty.

Unfortunately, in the majority of the cases, there were no statistically significant differences because of the great spread of the data. The results of Mo and Nb were affected by values very close to the limit of detection, likely due to their low content in the used alloys. Time-dependent changes in metal concentrations have been discussed in several studies, describing a stagnant concentration plateau for whole blood or serum after the first months/years after implantation if the prosthesis is functioning well.³⁰ In contrast, with these studies, our results found a continually increasing metallic burden after the initial load in periprosthetic tissues, which could be associated with both the continuous pressure of corrosive factors and/or inefficiency in creating an effective barrier on the implant surface to prevent metallic ions from being released.³¹ Simultaneously, there is information about periprosthetic tissues not having a powerful mechanism of clearance, such as blood plasma does. The most affected tissues are in direct contact with metallic surfaces.

The results of our study also confirmed our hypothesis about the concentration gradient of released metals in surrounding tissues. Both the layers of periprosthetic tissues were statistically compared, and the dependence of the concentration on the distance from the joint cavity was confirmed. To the authors' best knowledge, similar results have not yet been published. Based on our findings, we can conclude that the "permeability" of the pseudosynovial tissue for metallic by-products is relatively low; thus, this membrane protects the organism at least partially from unregulated dissemination of metals released from the implant surface.

It is not clear whether metals are released more from THA or TKA. Looking at the absolute figures, the differences seem small. A role could be played by differences in

particular surface metallurgy, the size of the implant surface from which a particular metal might be released into the joint fluid or differences related to the construction list of an implant (type of bearings, modular or non-modular nature, head-neck interface, additional screw fixation, and so forth). In Table III, it can also be observed that there were differences between the quantities of early reoperated patients with hip and knee arthroplasties. We found higher concentrations of Ti and V in hip samples relative to their content in THA. In contrast, no statistically significant differences were observed for Cr, Co, and Mo; thus, we are not able to conclusively confirm that there were differences in the metal contents between total hip and knee arthroplasties. Similarly, although we analyzed an enormous dataset, we were not able to conclusively determine which type (manufacturer) of implant burdens the patient with metal more than others because of the very small numbers of patients with particular type of implant.

We were able to evaluate additional conclusions, which were not hypothesized before the start of study, owing to the large dataset. First, the patients included in the study were reoperated on for several reasons. The patients with loosened implants had higher levels of metals compared to those with stable implants due to motion between the implant and its firm surroundings, resulting in accelerated surface damage (Figure 3). Studies investigating the mechanisms of metallic release suggested contributions of both particles and ions.²⁸ We found a trend toward higher concentrations in the patients reoperated on for aseptic loosening, supporting the above assumptions. These results were in partial agreement with some studies focusing on metal concentrations after implant loosening in whole blood, serum or urine,^{19,32} and elevated metal concentrations after aseptic loosening in serum were also published.³³ In addition, similar results were reported in which well-functioning and malfunctioning implants were compared by means of synovial fluid, serum and pseudocapsule.^{12,34} Our data confirmed that metals were continuously released in the human body, especially to surrounding tissues, regardless of whether the implant was stable or not. Finally, we analyzed whether a higher risk of early reoperation could be associated with relevant changes in the metallic profiles in patients with higher BMI because heavier patients could induce greater stress on the implant surfaces/interfaces. The concentrations of Ti and V did not differ in relation to BMI in this study, but only a small number of subjects were available here, and a future study will be needed. A different situation was observed with Co-Cr-based alloys, with which statistically higher concentrations of Cr were determined in the higher BMI patient group, compared to lower BMI subjects. According to our best knowledge, this study was the first that revealed the relationship between Cr concentrations and BMI.

CONCLUSIONS

We successfully developed and validated a measurement procedure for simultaneous multielemental determination of

selected metals (Ti, V, Cr, Co, Nb, Mo) in various clinical samples. This procedure was subsequently applied to a large sample of clinical patients with TJA. Very low concentrations of released metals were found in whole blood and joint fluid. Regarding the bloodstream, we found that the systemic metallic burden driven by metal-on-polyethylene and ceramic-on-polyethylene TJAs was very low across a wide spectrum of implant types and time periods. In contrast, we found increased concentrations of particular metals in periprosthetic tissues. Tissues accumulated particular metals relative to the time and distance from TJA. Moreover, patients with aseptic loosening had higher concentrations of metals in tissues than patients with stable implants and the controls. Finally, it is clear that the metals released from TJA surfaces accumulate in the body (esp. the tissues around the implant) over the time elapsing since surgery. However, the levels of released metals were not extremely high, compared with those found in studies of metal-on-metal implants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pavol Buňa, M.D., and Jiří Lošťák, M.D., Ph.D. for their contribution to collection of data from clinical database.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The written informed consent about the use of blood, joint fluid, and periprosthetic tissues for the purpose of this study was obtained from each subject, and this study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Olomouc and the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc (reference number 168/09) as a part of research projects IGA Ministry of Health, Czech Republic; NS10260, NT11049. All the methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations valid for the Teaching Hospitals in the Czech Republic and in accordance with the current regulatory practice for clinical research in the Czech Republic.

REFERENCES

1. Novak CC, Hsu AR, Della Valle CJ, Skipor AK, Campbell P, Amstutz HC, Jiranek WA, Onyike A, Pombar XF, Jacobs JJ. Metal ion levels in maternal and placental blood after metal-on-metal total hip arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2014;43(12):E304–E308.
2. Visuri T, Borg H, Pulkkinen P, Paavolainen P, Pukkala E. A retrospective comparative study of mortality and causes of death among patients with metal-on-metal and metal-on-polyethylene total hip prostheses in primary osteoarthritis after a long-term follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:78.
3. Brewster DH, Stockton DL, Reekie A, Ashcroft GP, Howie CR, Porter DE, Black RJ. Risk of cancer following primary total hip replacement or primary resurfacing arthroplasty of the hip: A retrospective cohort study in Scotland. *Br J Cancer* 2013;108(9):1883–1890.
4. Gunaratnam M, Grant MH. The interaction of the orthopaedic metals, chromium VI and nickel, with hepatocytes. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(10–12):945–948.
5. Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, Perka C, Schulze F, Ode A. Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro. *Biomaterials* 2016;98:31–40.

6. Pearson MJ, Williams RL, Floyd H, Bodansky D, Grover LM, Davis ET, Lord JM. The effects of cobalt-chromium-molybdenum wear debris in vitro on serum cytokine profiles and T cell repertoire. *Biomaterials* 2015;67:232–239.
7. Gill HS, Grammatopoulos G, Adshead S, Tsiologiannis E, Tsiridis E. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty. *Trend Mol Med* 2012;18(3):145–155.
8. 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(1):172–180.
9. 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.
10. C H Lohmann, H Meyer, J V Nuechtern, G Singh, S Junk-Jantsch, H Schmotzer, M M Morlock, G Pflüger, 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(17):1561–1568.
11. Matusiewicz H. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles—A systematic analytical review. *Acta Biomater* 2014;10(6):2379–2403.
12. Brien WW, Salvati EA, Betts F, Bullough P, Wright T, Rimnac C, Buly R, Garvin K. Metal levels in cemented total hip arthroplasty—A comparison of well-fixed and loose implants. *Clin OrthopRelat Res* 1992(276):66–74.
13. Beraudi A, Catalani S, Montesi M, Stea S, Sudanese A, Apostoli P, Toni A. Detection of cobalt in synovial fluid from metal-on-metal hip prosthesis: Correlation with the ion haematic level. *Biomarkers* 2013;18(8):699–705.
14. Sargeant A, Goswami T. Hip implants—Paper VI—Ion concentrations. *Mater Des* 2007;28(1):155–171.
15. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Filgueira L. Metal is not inert: Role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening—Current concepts. *J Biomed Mater Res Part A* 2009;91A(4):1252–1262.
16. Nuevo-Ordóñez Y, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Paz-Aparicio J, Raimundez JD, Tejerina JM, Peña MA, Sanz-Medel A. Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(9):2747–2754.
17. Daley B, Doherty AT, Fairman B, Case CP. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br Vol* 2004;86B(4):598–606.
18. Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz-Jiménez J, Sanz-Medel A. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal Bioanal Chem* 2008;391(7):2583–2589.
19. Liu TK, Liu SH, Chang CH, Yang RS. Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty. *Tohoku J Exp Med* 1998;185(4):253–262.
20. Antoniou J, Zukor DJ, Mwale F, Minarik W, Petit A, Huk OL. Metal ion levels in the blood of patients after hip resurfacing: A comparison between twenty-eight and thirty-six-millimeter-head metal-on-metal prostheses. *J Bone Joint Surg Am Vol* 2008;90A:142–148.
21. Kuera J, Bencko V, Sabbioni E, Vandervenne M. Review of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evaluation of their possible use as reference values. *Sci Total Environ* 1995;166(1):211–234.
22. Nuevo Ordóñez Y, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Paz-Jiménez J, Tejerina-Lobo JM, Peña-López JM, Sanz-Medel A. Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins. *J Anal Atomic Spectrom* 2009;24(8):1037–1043.
23. Dunstan E, Sanghrajka AP, Tilley S, Unwin P, Blunn G, Cannon SR, Briggs TWR. Metal ion levels after metal-on-metal proximal femoral replacements—A 30-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br Vol* 2005;87B(5):628–631.
24. Grammatopoulos G, Munemoto M, Pollalis A, Athanasou NA. Correlation of serum metal ion levels with pathological changes of ARMD in failed metal-on-metal-hip-resurfacing arthroplasties. *Arch Orthop Trauma Surg* 2017;137(8):1129–1137.
25. Kreibich DN, Moran CG, Delves HT, Owen TD, Pinder IM. Systemic release of cobalt and chromium after uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78(1):18–21.
26. Lugowski SJ, Smith DC, McHugh AD, Vanloon JC. Determination of chromium, cobalt and molybdenum in synovial-fluid by GFAAS. *J Trace Elements Electrol Health Dis* 1991;5(1):23–29.
27. Fox KA, Phillips TM, Yanta JH, Abesamis MG. Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components. *Clin Toxicol (Phila)* 2016;54(9):874–877.
28. Liao YF, Hoffman E, Wimmer M, Fischer A, Jacobs J, Marks L. CoCrMo metal-on-metal hip replacements. *Phys Chem Chem Phys* 2013;15(3):746–756.
29. Lewis AC, Heard PJ. The effects of calcium phosphate deposition upon corrosion of CoCr alloys and the potential for implant failure. *J Biomed Mater Res Part A* 2005;75A(2):365–373.
30. Jacobs JJ, Skipor AK, Campbell PA, Hallab NJ, Urban RM, Amstutz HC. Can metal levels be used to monitor metal-on-metal hip arthroplasties? *J Arthrop* 2004;19(8):59–65.
31. Ryu JJ, Shrotriya, P. Synergistic mechanisms of biotribocorrosion in medical implants. In: Yan Y, editor. *Bio-tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing; 2013. p 25–44.
32. Leopold SS, Berger RA, Patterson L, Skipor AK, Urban RM, Jacobs JJ. Serum titanium level for diagnosis of a failed, metal-backed patellar component. *J Arthrop* 2000;15(7):938–943.
33. Lazennec JY, Boyer P, Poupon J, Rousseau MA, Roy C, Ravaud P, Catonne Y. Outcome and serum ion determination up to 11 years after implantation of a cemented metal-on-metal hip prosthesis. *Acta Orthop* 2009;80(2):168–173.
34. Hallab NJ, Mikecz K, Vermes C, Skipor A, Jacobs JJ. Orthopaedic implant related metal toxicity in terms of human lymphocyte reactivity to metal-protein complexes produced from cobalt-base and titanium-base implant alloy degradation. *Mol Cell Biochem* 2001;222(1–2):127–136.

Klinické aspekty dlouhodobé přítomnosti kloubní náhrady v lidském těle: zátěž kovy

Clinical aspects of long-term presence of total joint arthroplasties in human body: metal load

Martin Hobza, Jiří Gallo

Ortopedická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, tel.: 588 443 607, e-mail: jiri.gallo@volny.cz

Souhrn:

V souvislosti s neúspěchem TEP kyčle typu kov-kov se oživil zájem o problematiku dlouhodobé akumulace kovů pocházejících z kloubní náhrady. Přitom je známo, že kovy se uvolňují také z ostatních typů kloubních náhrad, zejména mechanismem koroze. Kovy se dostávají do výpotku a do tkání, působí cytotoxicky, mohou indukovat změny DNA a stimulovat imunitní systém. Pravděpodobně nejdiskutovanějším tématem v souvislosti s kovy je alergická reakce a její podíl na předčasném selhání implantátu. Přes veškerý výzkum nepanuje v této otázce shoda. Některé vlivné odborné společnosti dokonce roli pozdní přecitlivělosti na kovy marginalizují a připouští pouze jako diagnózu per exclusionem. Obavy panují také z dlouhodobé akumulace kovů v těle, zejména u mladých pacientů. Nepodařilo se však prokázat ani genotoxický, ani karcinogenní efekt. Některé experimentální studie dokládají, že by se kovy uvolněné z povrchu kloubní náhrady mohly připojit k ostatním materiálům (polyetylen, kostní cement) při stimulaci nespecifické zánětlivé odpovědi, která se podílí na vzniku aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy. V článku jsou shrnuty současné pohledy na problematiku působení kovů na periprotetické tkáně i důsledky systémové zátěže.

Klíčová slova: totální endoprotéza, kovy, alergie, koroze, toxicita, karcinogeneze

Summary:

In the context of metal-on-metal hip replacement failure, concerns regarding long-term accumulation of metals originating from joint replacement have been raised again. It is known at the same time that metals are released from other implant types as well, mainly by corrosion. Metals are released into surrounding tissues and joint fluid, produce cytotoxicity, stimulate immune reaction and can induce a DNA change. The most discussed topic regarding metals in joint arthroplasty probably is the allergic reaction and its contribution to premature implant failure. There still is no consensus on this topic despite all the research that has been made. Some clinical societies even marginalise the significance of late hypersensitivity and acknowledge the allergy only as a diagnosis of exclusion. So far, there is no definite evidence for a genotoxic or carcinogenic effect. Some experimental studies suggest that released metals in addition to other materials (polyethylene, bone cement) can take part in the innate immune response leading to periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. This article summarises current views on the metal load effect on periprosthetic tissues and systemic metal burden effects.

Key words: total joint replacement, metal, allergy, corrosion, toxicity, carcinogenesis

Ortopedie 2020;1:23–28

Úvod

V současnosti narůstá počet primárních totálních endoprotéz (TEP) kyčlí a kolen. Důvody souvisí nejen s populační dynamikou, ale i s tím, že pro pokročilé formy osteoartrózy stále nemáme klinicky užitečnou léčebnou alternativu. Obecně se kloubní náhrada skládá z těla, které bývá obvykle vyrobeno z kovové slitiny, a kloubního povrchu, který může tvořit pár kov-polyetylen, keramika-polyetylen, případně keramika-keramika (dříve se uváděl i kov-kov). Přes veškerý pokrok v metalurgii je zřejmé, že neexistuje

implantát, který by do svého okolí neuvolňoval alespoň minimální množství kovů, z nichž je vyroben. Řada studií prokazuje přítomnost kovů uvolněných z kloubních náhrad v periprotetických tkáních a výpotku (7, 32) a v některých případech i v místech od kloubu značně vzdálených (28).

Kontinuální přísun zejména těžkých kovů může v těle vyvolávat nežádoucí účinky. Protože se na světě každý rok implantuje několik milionů endoprotéz kyčlí, kolen a dalších náhrad, jde nepochybně o potenciální populační riziko. Přitom je zřejmé,

že se jednotlivé kloubní náhrady mezi sebou budou navzájem lišit také v parametru „uvolňování kovových částic či iontů“. Ten se ovšem nedá vyčíst z registrů kloubních náhrad ani z klinických studií hodnotících výsledky operace. Proto je nutné se potenciálně škodlivým účinkům kovů uvolňujícím se z povrchů endoprotéz věnovat.

Cílem našeho sdělení je sumarizovat aktuální poznatky v této oblasti a nabídnout ortopedům ucelený pohled na problematiku, které se běžně nevěnují, která však může ovlivnit život jejich pacientů.

Slitina	Ni	N	Co	Cr	Ti	Mo	Al	Fe	Mn	Cu	W	C	Si	V
Nerez ocel														
(ASTM F138)	10,0–15,5	<0,5	†	17,0–19,0	†	2,0 – 4,0	†	61,0–68,0	†	<0,5	<2,0	<0,06	<1,0	†
CoCrMo slitiny														
(ASTM F75)	<2,0	†	61,0–66,0	27,0–30,0	†	4,5 – 7,0	†	<1,5	<1,0	†	†	<0,35	<1,0	†
(ASTM F90)	9,0–11,0	†	46,0–51,0	19,0–20,0	†	†	†	<3,0	<2,5	†	14,0–16,0	<0,15	<1,0	†
Ti slitiny														
CP Ti (ASTM F67)	†	†	†	†	99,0	†	†	0,2–0,5	†	†	†	<0,1	†	†
Ti-6Al-4V (ASTM F136)	†	†	†	†	89,0–91,0	†	5,5–6,5	†	†	†	†	<0,08	†	3,5–4,5

Tab. 1 Nejčastěji používané slitiny v ortopedii a váhové zastoupení jejich složek dle standardů American Society for Testing and Materials (ASTM vol. 13.01.) (30): Ni – nikl, N – dusík, Co – kobalt, Cr – chrom, Ti – titan, Mo – molybden, Al – aluminium, Fe – železo, Mn – mangan, Cu – měď, W – wolfram, C – uhlík, Si – křemík, V – vanad; † představuje <0,05 %

Kovové biomateriály pro endoprotetiku

Nejčastěji se setkáme se třemi skupinami materiálů: chirurgická ocel (obvykle 316L, vyrobeno dle standardu ASTM F138/F139), chromkobaltová slitina (CoCr) včetně modifikací nebo čistý titan (CP Ti, commercially pure titanium) či jeho slitiny s hliníkem, vanadem, niobem a ostatními kovy. Cementované implantáty jsou obvykle z CoCr slitiny, případně z oceli, necementované bývají obvykle vyrobeny z titanu a jeho slitin. CoCr slitina nabízí dobrou abrazivní odolnost a superhladký povrch, proto z ní bývají vyrobeny hlavice pro TEP kyčle anebo femorální komponenty TEP kolena (51). Naopak titan a jeho slitiny vykazují horší tribologickou odolnost (58), avšak poskytují dobré podmínky pro osteointegraci a mají elasticitu blízkou spongiózní kosti (59).

Mechanismy degradace kovových povrchů *in vivo*

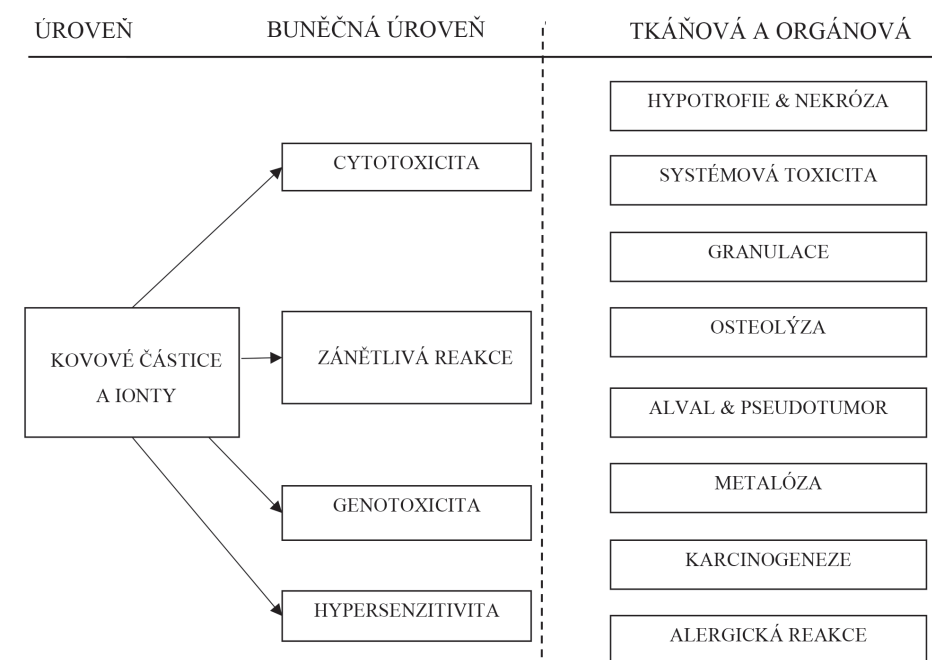
Dosud bylo popsáno několik mechanismů vedoucích k uvolnění kovů ve formě nanočástic či iontů z povrchu kovových částí TEP, přičemž dominující jsou koroze a ořez (14). *In vivo* je implantát obklopen tkáněmi, které spolu s tkáňovým mokem mohou působit jako elektrolyt. Dále na povrch TEP přímo působí buňky imunitního systému, které ještě mohou měnit pH a tvořit volné radikály. To podporuje korozivní procesy, kterými jsou do okolí uvolňovány kovové ionty (21). Kromě ušlechtilých kovů je každá slitina na povrchu pokryta vrstvičkou svých oxidů (tzv. pasivace), která ji chrání před další korozi. Pasivační vrstva může být mechanicky poškozena, což vede k obnažení

povrchu a progresi koroze. Právě rychlost repasivace určuje odolnost daného materiálu vůči korozi – titanové slitiny mají mnohem rychlejší repasivaci než nerezavějící ocel, a jsou tedy mnohem odolnější vůči korozi (29). Dále dochází k tvorbě kovových mikročástic cestou ořezu v oblasti artikulárních povrchů. Tento jev je typický zejména pro endoprotézy typu kov-kov (MoM, metal-on-metal), avšak je prokázán i u kombinace kov-polyetylen (6). Tyto částice dosahují většinou velikosti do 0,05 μm, detaily jsou popsány jinde (2). Zvláštním případem je trunionóza, což je souběh mechanického ořezu a několika korozivních mechanismů

v oblasti modulárních spojů typu kov-kov či kov-keramika, nejčastěji u TEP kyčle (41). Jednak zde dochází k mikropohybům v oblasti spoje, což abraduje povrch a rozrušuje pasivační vrstvu, jednak se implantát nachází v hypoxickém prostředí, kde alterované pH a lokální elektrochemické rozdíly podporují galvanickou korozi (9, 14).

Základní typy biologického působení kovů na jejich okolí

Přehled biologických efektů kovů na buněčné úrovni a relevantních klinických projevů je popsán v obrázku 1. Kovové částice



Obr. 1 Biologické působení kovů na buněčné úrovni a indukované klinické projevy

a ionty mohou působit cytotoxicky, indukovat oxidativní stres, poškozovat DNA a vyvolávat imunitní odpověď (21). Uvolněné ionty jsou vázány na proteiny, s nimiž tvoří antigenní komplex, který vyvolává imunitní odpověď na lokální nebo i systémové úrovni (19). Tato imunitní reakce je jak specifická, zaměřená přímo na antigen daného kovu, tak i nespecifická, reagující na kovové částice jako na cizí těleso. Oba typy reakce na kovy se do jisté míry podílí na indukcii periprotetické osteolýzy (38). V souvislosti s lokální reakcí na kovy se objevilo několik termínů: ARMD (Adverse Reaction to Metal Debris), který všeobecně pokrývá celé spektrum výše popsaných dějů, a jeho podskupinou jsou ALTR (Adverse Local Tissue Reaction), popisující pouze lokální reakci na kovy přítomné ve tkáních, a v této skupině je tradičně veden pseudotumor, osteolýza s aseptickým uvolněním a ALVAL (Aseptic Lymphocyte-dominated Vasculitis-Associated Lesion). Jedním z přímých následků lokální cytotoxicity kolem implantátu s pravděpodobným podílem hypersensitivitu je nekróza (39).

Ostatní jevy jako systémová toxicita či genotoxicita jsou přímým důsledkem vyšší systémové zátěže a především fyzikálně-chemického působení těžkých kovů na cílové tkáni (14).

Alergie na kovy

Okolnosti a význam alergické reakce na endoprotézu jsou recentním tématem a jde o stále neuzavřenou oblast. Koncepce alergie jako příčiny předčasného selhání TEP má sice stále řadu svých zastánců, avšak většinou je spíše zpochybňována pro nedostatek důkazů a doložení jednoznačného patofyziologického mechanismu (40).

Patofyziologie. Existuje totiž rozdíl v patofyziologii kožní alergické reakce, která je zprostředkována Langerhansovými buňkami jakožto kožními antigen-prezentujícími buňkami (APB), a v tkáňové reakci na antigenní komplex kov-protein, kterou zprostředkovávají lokální APB (makrofágy, dendritické a epiteloidní buňky) (53). Jednotlivé APB následně prezentují antigen CD4+ T-lymfocytům, které spouštějí další průběh reakce (1). V tomto případě jde o tzv. hypersensitivitu IV. typu.

Incidence. Ačkoli je v běžné populaci poměrně vysoká prevalence kontaktní alergie na kovy a dle epikutánních a sérologických testů se vyskytuje reakce na Ni v 13 %, Co ve 2 % a Cr v 1 % populace (48), počet prokázaných selhání endoprotézy z důvodu alergické reakce je poměrně nízký a příčinnou souvislost je

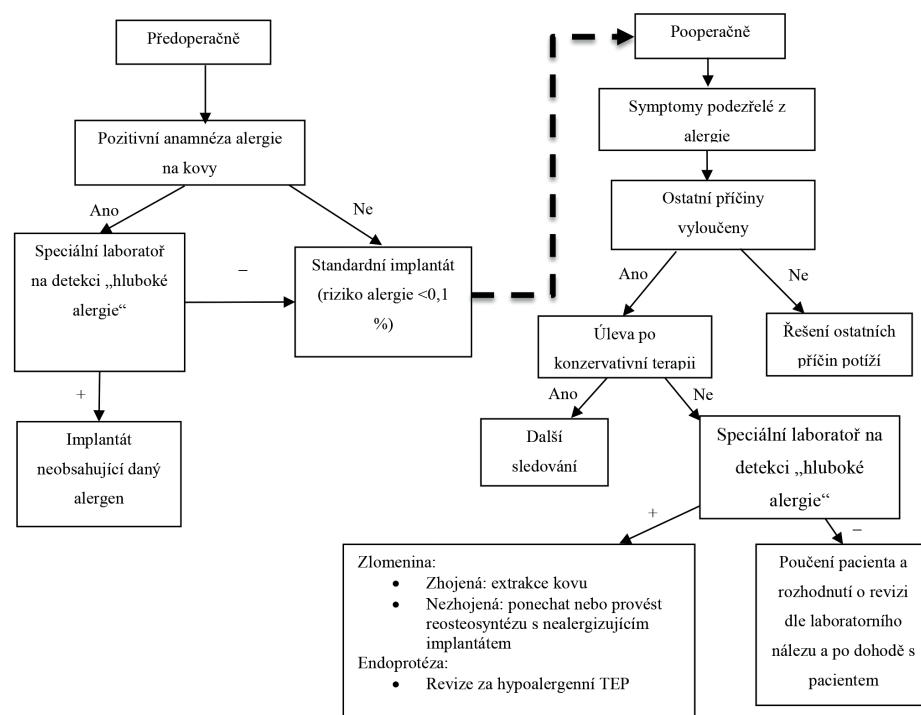
stále velmi obtížné dokázat (52). Po implantaci TEP byla pozorována jak senzitivace na dané kovy u stabilní a zejména u selhávající endoprotézy (18), tak i desenzitivace dle před- a pooperačních kožních testů (47). Zde opět narážíme na význam alergie a rozdílnou patofyziologii kožní a tkáňové reakce (53).

Symptomatologie. Klinicky se alergie může projevit jako lokalizovaná, vzácněji celotělová vyrážka, porucha hojení rány, setrvalé bolesti, otok, synovialitida s recidivujícími výpotky, ztuhlost operovaného kloubu, nebo naopak jeho nestabilita, případně až uvolnění TEP. Tyto symptomy se většinou vyvinou během prvního roku po implantaci (37). Lokalizovaná vyrážka je častěji popisována u TEP kolene, zatímco u TEP kyčle nebývá obvyklá (1), což může být vysvětleno hlubším tkáňovým uložením.

Diagnostika. Protože stále nemáme k dispozici diagnostický test, který by uměl jednoznačně určit, zda se jedná o alergickou reakci, zůstává tato diagnóza postavena jako *per exclusionem*, tzn. po vyloučení infekce, aseptického uvolnění a dalších komplikací TEP (33). I dnes se můžeme setkat s tím, že k diagnostice je doporučován epikutánní test, ačkoli se ví, že není způsobilý reflektovat hlubokou tkáňovou situaci kolem implantátu. Přesto bývá součástí klinických doporučení (viz obr. 2), avšak pro zmíněnou diskrepanci a nízkou senzitivitu i specifitu by neměl být používán jako rutinní předoperační metoda

(37). K dispozici máme další imunologické testy, jako je lymfocytární transformační test (LTT), modifikovaný lymfocytární stimulační test (mLST) nebo test na leukocytární inhibiční faktor (LIF) (16). LTT hodnotí míru proliferace specifických T-lymfocytů v reakci na daný antigen, v tomto případě kov, a ilustruje tedy systémovou alergickou reakci. Ačkoli nabízí vyšší senzitivitu než epikutánní testy, nevykazuje dostatečnou specifitu a žádný z těchto testů není spolehlivý v predikci vzniku alergické reakce po implantaci TEP (37). Jediným jasným nálezem tedy zůstává úleva od potíží po reimplantaci hypoalergenního implantátu, tedy *ex post* kritérium.

Terapie. Zřejmá alergická reakce po implantaci TEP je po pečlivém zvážení a vyloučení ostatních příčin selhání indikována k reimplantaci hypoalergenního implantátu. Pacient by měl být současně informován o tom, že stále nemáme k dispozici ověřené klinické doporučení k řešení této komplikace. Ve snaze vyhnout se alergizujícím kovům u TEP kyčle volíme jamku a dřík z titanové slitiny, hlavičku keramickou nebo oxiniovou. U TEP kolene existují rovněž revizní implantáty se speciálními bariérovými vrstvami z Ti, Nb, případně dalších kovů (1, 33). V případě diagnostické nejistoty nebo pokud nemůžeme provést reimplantaci, můžeme kožní vyrážku léčit topickými kortikosteroidy, které jsou v některých případech efektivní (12). Jedno ze schémat pro doporučený postup je popsáno v obrázku 2.



Obr. 2 Algoritmus řešení alergie na kovy v ortopedii volně dle Christensena (26). TEP – totální endoprotéza

Koncentrace chloridu daného kovu potřebná k vyvolání toxicity (mM)							
Test	Al	Cr	Co	Fe	Mo	Ni	V
Osteoblast							
Viabilita	5	>10	1	0,3	7	0,5	0,05
Proliferace	10	10	1	5	10	1,0	0,1
Morfologie	10	10	0,5	10	10	0,5	0,1
Průměr ± SD	8,3 ± 2,9	10 ± 0	0,8 ± 0,3	5,1 ± 4,9	9,0 ± 1,7	0,7 ± 0,3	0,1 ± 0,1
Fibroblast							
Viabilita	2	10	2	1	10	2	1
Proliferace	50	10	0,01	10	10	2	0,05
Morfologie	5	5	0,5	5	1	0,5	0,05
Průměr ± SD	19 ± 26	8,3 ± 2,9	0,8 ± 1,0	5,3 ± 4,5	7 ± 5,2	1,5 ± 0,9	0,3 ± 0,5

Tab. 2 Stanovení koncentrace chloridu daného kovu potřebné k vyvolání toxicity s kritériem 50% poklesu viability nebo proliferace daných buněk dle Hallaba, zkráceno (20)

U pacientů s předoperačně prokázanou alergií na kovy obsažené v implantátu (zvláště pokud už proběhla alergická reakce na jiném kloubu) bychom měli automaticky indikovat „hypoalergenní“ implantáty.

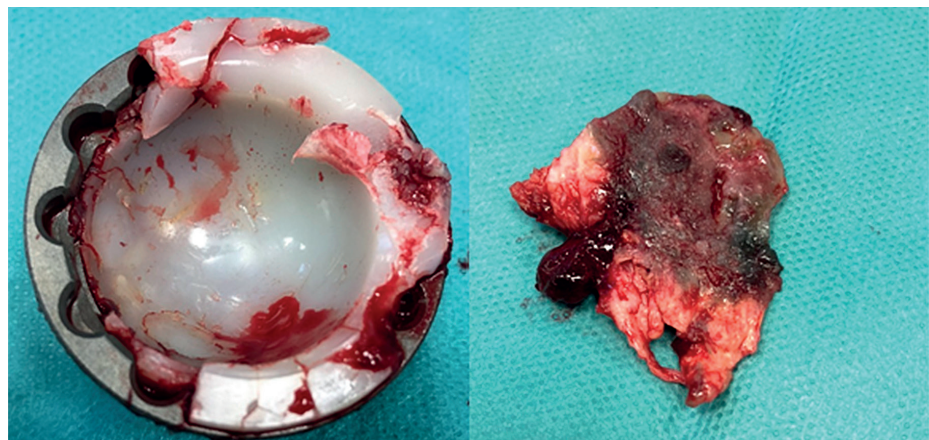
Podíl kovů na periprotetické osteolýze

Periprotetická osteolýza (PPOL) je chápána jako důsledek chronické zánětlivé reakce indukované mikro- a nanoprodukty vznikajícími při používání TEP kyčle a kolena. Nejvíce se sice píše o ošetrných částicích polyetyleny, avšak je nepochybné, že určitou roli hrají i kovy (11, 17). PPOL může vzniknout kolem všech typů kloubních náhrad, včetně páru keramika-keramika, i když v porovnání s ostatními páry velmi vzácně (38).

V případě PPOL působí kovy přes aktivaci RANK-ligandu (po předchozím zvýšení exprese TNF-, IL-6 a PGE2). Jejím prostřednictvím je v periprotetické kostní multicelulární jednotce narušena rovnováha mezi osteoblasty a osteoklasty ve prospěch kost resorbujících osteoklastů. U iontů Co, Cr a Mo je popsána i aktivace inflammasomů (38). Kovy také zhoršují kostní metabolismus – nejtoxičtější na osteoblasty působí V, Mn, Fe a Ni, naopak nejméně toxické jsou pro ně Co a Cr (22). Cytotoxický potenciál jednotlivých kovů je uveden v tabulce 2. V rámci snahy o konzervativní terapii osteolýzy byla testována protizánětlivá léčba jako například Etanercept (anti-TNF protilátka) (54), či RANKL inhibitor (50), avšak zatím jedinou efektivní metodou zůstává revize a reimplantace uvolněné endoprotézy.

Metalóza

Termín metalóza je pouze popisný a označuje široké spektrum zabarvení peri-



Obr. 3 Peroperační vzorky z revize TEP kyčle pro aseptické uvolnění jamky. Masivní ošetr polyetylenové vložky, kdy došlo ke kontaktu hlavičky s kovovou jamkou. Granulace odebrané z okolí jamky s masivní metalózou

protetické tkáně od jemné šedi až po jasně černou či šedočernou, často rozředlou tkáň. Zdrojem metalózy může být povrchová koroze, včetně šterbinové koroze a ošetr. Nejvýrazněji a nejčastěji se však objevuje při prošlapání či fraktuře některé z artikulárních komponent, jak je uvedeno na obrázku 3. Obrovské množství kovu indukuje reakci IV. typu a makrofágy se přeměňují v mnohojaderné Langhansovy buňky a tvoří granulace. Metalóza se může klinicky projevit bolestmi, někdy dokonce i s tmavou pigmentací kůže kolem postiženého kloubu (46), v pokročilých případech s tvorbou pseudotumoru. U těchto pacientů bychom měli monitorovat sérové hladiny relevantních kovů z důvodu jejich rizika intoxikace a protézu včas revidovat (15).

ALVAL a pseudotumory

Tyto jednotky jsou klasicky popisovány u MoM endoprotéz, avšak mohou se vyskytnout i u ostatních artikulárních párů. Typicky jsou spojeny s bolestivými projevy kolem TEP (45).

ALVAL popisuje periprotetickou zánětlivou

reakci podobnou hypersenzitivní reakci IV. typu probíhající kolem MoM implantátu (31). Histologicky je charakterizována difúzní perivaskulární lymfocytární infiltrací, doprovázenou plasmatickými buňkami, eozinofilními granulomy, venulami s vysokým endotelem, krvácením, fibrinovou exsudací, nekrózou a makrofágy s kapkovitými inkluzemi (57).

Pseudotumor je rozsáhlý cystický útvar, mající podobný imunologický podklad jako ALVAL, avšak s výraznějším tkáňovým objemem, větší lymfocytární infiltrací a nekrózou. Kromě bolesti se může projevit hmatnou rezistencí například v třísele, parézou nervu či spontánní luxací kloubu (14).

Incidence. Incidence pseudotumorů u MoM implantátů je udávána 0,3 %. U ALVAL a/nebo pseudotumorů se odhaduje na 0,6 % (56).

Diagnostika. Při diagnostice ALTR bychom vždy měli nejdříve vyloučit komplikace, jako jsou infekce, luxace, periprotetická zlomenina, patologie svalových úponů či aseptické uvolnění. Začínáme klinickým a RTG vyšetřením, standardně provádíme krevní testy (krevní obraz, CRP, IL-6). U pacientů s vyšší předtesto-

vou pravděpodobností infekce (při pozitivě testů první linie) je indikována punkce (někdy k ní přistupujeme bez ohledu na výsledky předchozích testů). V aspirátu stanovujeme počet leukocytů a jejich rozpočet, dále provádíme biochemické vyšetření. Rutinně kovy v séru a výpotku nestanovujeme.

V souvislosti s MoM náhradami je důležité si připomenout, že hodnoty CRP a sedimentace erytrocytů zde bývají méně specifické, protože mohou být zvýšené jak u infekce, tak i u ALTR. Rovněž automatická cytologie z punktátu může mít u MoM zkrácené hodnoty v celkovém počtu leukocytů i v podílu polymorfonukleárů, proto je vhodnější manuální odečet (9). Ze zobrazovacích metod je pro reakci typu ALTR za zlatý standard považována magnetická rezonance s tzv. MARS sekvencí (Metal Artifact Reduction Sequence), která zvládne zobrazit i periprotetické tkáně jinak zakryté artefakty implantátu (10, 36). Toto vyšetření však zatím není vzhledem ke své nákladnosti a horší dostupnosti použitelné pro rutinní screening. Proto bylo navrženo ultrazvukové vyšetření jako levnější screeningová metoda se 100% senzitivitou záchytu pseudotumorů (13).

Terapie. Symptomatický pseudotumor či ALVAL jsou indikací k revizi TEP a extirpaci pseudotumoru, v případě MoM s výměnou za jiný artikulární pár (23).

Systémová toxicita

U pacientů se selhávající (ale i dobře fungující!) endoprotézou můžeme najít zvýšené sérové hladiny kovů, z nichž je protéza vyrobena. Tyto se následně akumulují zejména v myokardu, ledvinách, játrech, slezině a v lymfatických uzlinách (22). Vysoké sérové hladiny kovů najdeme typicky u selhávající MoM endoprotézy, avšak paradoxně ještě vyšší hladiny byly popsány po revizi selhané keramické endoprotézy s použitím kovové hlavičky (3), kde byl její otěr akcelerován zbylými keramickými částicemi rozptýlenými v reoperovaném kloubu (44). Za systémovou toxicitu je nejvíce zodpovědný kobalt, konkrétně jeho dvojmocný iont (Co^{2+}) (35). Naopak titanové slitiny jsou velmi málo toxické a indukují pouze mírnou zánětlivou odpověď (14). Mechanismus toxicity kobaltu je složitý a vysvětluje se indukcí tvorby volných radikálů, peroxidací lipidů, poruchou mitochondriální funkce, poruchou homeostázy vápníku a železa, interakcí s erythropoézou, poruchou transportu jódu do štítné žlázy a genotoxicitou (43). Klinicky se tedy intoxikace projevuje kardiomyopatií, hypotyreózní strumou, neurotoxicitou s poruchou sluchu,

zrakem a poruchami centrální a periferní nervové soustavy (4). Jsou popsány jednotlivé případy kobaltem indukované polycytémie a vzácně i hepatotoxicita (25). Sérové koncentrace kobaltu jsou v běžné populaci do $0,6 \mu\text{g/l}$, u většiny pacientů s dobře fungující MoM endoprotézou v rozsahu $0,2$ až $10 \mu\text{g/l}$. Prahem pro lokální komplikace (viz ARMD) je dle různých zdrojů 4 až $7 \mu\text{g/l}$ a rizikové hladiny pro intoxikaci začínají nad $20 \mu\text{g/l}$. Zdá se však, že tato hodnota není pro klinickou praxi užitečná a klinické relevance toxicity dosahují až mnohem vyšší hladiny (35). Proto je doporučeno klinicky sledovat pacienty s hladinami nad $100 \mu\text{g/l}$ (43) a při projevech intoxikace, které jsou zpočátku reverzibilní, včas protézu revidovat. Je nutno podotknout, že systémová intoxikace kovy z totální endoprotézy je velmi vzácným jevem, proto se nedoporučuje její plošné vyhledávání. Do roku 2014 bylo v systematickém přehledu studií popsáno pouze 8 případů (3). U pacientů s rizikovým implantátem či rizikovou anamnézou je však odběr krve na stanovení kovů z kloubních náhrad indikován.

Riziko karcinogeneze

Částice a ionty Cr, Co, Ti, Al a V indukují *in vitro* tvorbu volných radikálů, které poškozují vlákna DNA a způsobují mutace, aneuploidii a chromozomální aberace v závislosti na jejich koncentraci (5). Povaha iontů chromu závisí na jejich valenci: korozivními procesy se z implantátu uvolňuje šestimocný chrom, který je klasifikován jako karcinogen skupiny 1 dle IARC (International Agency for Research on Cancer) a způsobuje karcinom plic, avšak je rychle v erytrocytech redukován na chrom třímocný, který je méně škodlivý (49, 14). Systematické přehledy klinických studií (55) ani data z ortopedických registrů (27, 42) neprokazují celkově zvýšené riziko karcinogeneze u konvenčních endoprotéz z CoCr či Ti slitin s kloubním párem kov-polyetylen, keramika-polyetylen, keramika-keramika. Avšak při identifikaci jednotlivých diagnóz bylo v jedné z metaanalýz nalezeno vyšší riziko karcinomu prostaty a maligního melanomu (Standardized Incidence Ratio (SIR) 1,12 resp. 1,43 s 95% CI; 1,08–1,16 resp. 1,13–1,79) (42).

Data pro MoM endoprotézy jsou poněkud odlišná v závislosti na zdroji. Britský a finský registr kloubních náhrad u těchto implantátů celkově zvýšené riziko karcinogeneze neprokazují (24, 8). Některé studie vyšší riziko v porovnání s konvenčními endoprotézami ale připouští, Levašič v kohortové studii našel vyšší incidenci karcinomu prostaty u pacientů

s MoM endoprotézou (SIR = 1,35), stejně jako u necementovaných implantátů (SIR = 1,40) a endoprotéz s Ti slitinou (SIR = 1,41) (34). Z uvedeného tedy vyplývá, že endoprotézy nejsou spjaty se zvýšeným celkovým rizikem karcinogeneze, ale existuje mírně vyšší riziko karcinomu prostaty, zejména u MoM endoprotéz, kterým je vhodné se vyhnout mimo jiné také z tohoto důvodu.

Závěr

Kovové implantáty jsou a ještě nějakou dobu budou základními materiály v endoprotetice kyčlí a kolen. Pokud se nepoužije implantát s kloubním párem kov-kov, je riziko závažných, kovy indukovaných nežádoucích událostí poměrně vzácné. Přesto je nutné na tuto možnost v klinické praxi myslet a v případě podezření na závažné poškození kovového povrchu je správné včas indikovat odběr krve na jednotlivé kovy obsažené v implantátech. Velmi nízké koncentrace uvolňující se do periprotetického prostoru mohou vyvolat a udržovat chronický periprotetický zánět, někdy s projevy mírné ALTR. Podstatné je, že při těchto nízkých koncentracích je prakticky zcela možné vyloučit karcinogenní efekt a systémovou toxicitu. Diskuze vedou o alergizujícím účinku kovů uvolněných z kloubní náhrady.

Studie byla podpořena z prostředků MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892); LF_2019_001.

Literatura:

1. Akil S, Newman JM, Shah NV, Ahmed N, Deshmukh AJ, Maheshwari AV. Metal hypersensitivity in total hip and knee arthroplasty: Current concepts. *J Clin Orthop Trauma* 2018;9:3–6.
2. Amanatullah DF, Sucher MG, Bonadurer GF, 3rd, Pereira GC, Taunton MJ. Metal in Total Hip Arthroplasty: Wear Particles, Biology, and Diagnosis. *Orthopedics* 2016;39:371–9.
3. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)* 2014;52:837–47.
4. Catalani S, Rizzetti MC, Padovani A, Apostoli P. Neurotoxicity of cobalt. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:421–37.
5. Daley B, Doherty AT, Fairman B, Case CP. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:598–606.
6. de Villiers D, Traynor A, Collins SN, Shelton JC. The increase in cobalt release in metal-on-polyethylene hip bearings in tests with third body abrasives. *Proc Inst Mech Eng H* 2015;229:611–8.
7. Dobbs HS, Minski MJ. Metal ion release after total hip replacement. *Biomaterials* 1980;1:193–8.
8. Ekman E, Laaksonen I, Eskelinen A, Pulkkinen

- P, Pukkala E, Makela K. Midterm risk of cancer with metal-on-metal hip replacements not increased in a Finnish population. *Acta Orthop* 2018;89:575–9.
9. Fehring KA, Fehring TK. Modes of failure in metal-on-metal total hip arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 2015;46:185–92.
 10. Fritz J, Fritz B, Thawait GK, et al. Advanced metal artifact reduction MRI of metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty implants: compressed sensing acceleration enables the time-neutral use of SEMAC. *Skeletal Radiol* 2016;45:1345–56.
 11. Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Raska M. Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun* 2013;19:213–24.
 12. Gao X, He RX, Yan SG, Wu LD. Dermatitis associated with chromium following total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2011;26:665 e13–6.
 13. Garbuz DS, Hargreaves BA, Duncan CP, et al. The John Charnley Award: Diagnostic Accuracy of MRI Versus Ultrasound for Detecting Pseudotumors in Asymptomatic Metal-on-Metal THA. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:417–23.
 14. Gibon E, Amanatullah DF, Loi F, et al. The biological response to orthopaedic implants for joint replacement: Part I: Metals. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017;105:2162–73.
 15. Gogna P, Paladini P, Merolla G, Augusti CA, Maddalena F, Porcellini G. Metallosis in shoulder arthroplasty: an integrative review of literature. *Musculoskelet surg* 2016;100:3–11.
 16. Granchi D, Cenni E, Giunti A, Baldini N. Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br* 2012;94:1126–34.
 17. Gustafson K, Jakobsen SS, Lorenzen ND, et al. Metal release and metal allergy after total hip replacement with resurfacing versus conventional hybrid prosthesis. *Acta Orthop* 2014;85:348–54.
 18. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:428–36.
 19. Hallab NJ. Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris. *Spine (Phila Pa 1976)* 2016;41 Suppl 7:S30–1.
 20. Hallab NJ, Anderson S, Caicedo M, Brasher A, Mikecz K, Jacobs JJ. Effects of soluble metals on human peri-implant cells. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:124–40.
 21. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2009;67:182–8.
 22. Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;60:420–33.
 23. Harrington K, Phelan E, Torreggiani WC, Doody O. The Management of the Symptomatic Patient With a Metal-on-Metal Hip Prosthesis. *Can Assoc Radiol* 2016;67:76–81.
 24. Hunt LP, Blom AW, Matharu GS, Porter ML, Whitehouse MR. The risk of developing cancer following metal-on-metal hip replacement compared with non metal-on-metal hip bearings: Findings from a prospective national registry “The National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man”. *PLoS One* 2018;13:e0204356.
 25. Cheung AC, Banerjee S, Cherian JJ, et al. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 – history, mechanism, measurements, and pathophysiology. *Bone Joint J* 2016;98-b:6–13.
 26. Christensen TJ, Samant SA, Shin AY. Making Sense of Metal Allergy and Hypersensitivity to Metallic Implants in Relation to Hand Surgery. *J Hand Surg Am* 2017;42:737–46.
 27. Christian WV, Oliver LD, Paustenbach DJ, Kreider ML, Finley BL. Toxicology-based cancer causation analysis of CoCr-containing hip implants: a quantitative assessment of genotoxicity and tumorigenicity studies. *J Appl Toxicol* 2014;34:939–67.
 28. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, et al. Metal Release in Patients Who Have Had a Primary Total Hip Arthroplasty. A Prospective, Controlled, Longitudinal Study*. *JBJS* 1998;80:1447–58.
 29. Karov J, Sinclair A, Hinberg I. Repassivation of a high chromium stainless steel orthopaedic alloy. *Biomed Mater Eng* 2002;12:375–86.
 30. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:567–73.
 31. Kolatat K, Perino G, Wilner G, et al. Adverse local tissue reaction (ALTR) associated with corrosion products in metal-on-metal and dual modular neck total hip replacements is associated with upregulation of interferon gamma-mediated chemokine signaling. *J Orthop Res* 2015;33:1487–97.
 32. Kuba M, Gallo J, Pluhacek T, Hobza M, Milde D. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:454–62.
 33. Lachiewicz PF, Watters TS, Jacobs JJ. Metal Hypersensitivity and Total Knee Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg* 2016;24:106–12.
 34. Levasic V, Milosev I, Zadnik V. Risk of cancer after primary total hip replacement: The influence of bearings, cementation and the material of the stem. *Acta Orthop* 2018;89:234–9.
 35. Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology* 2017;387:43–56.
 36. Lindgren K, Anderson MB, Peters CL, Pelt CE, Gililand JM. The Prevalence of Positive Findings on Metal Artifact Reduction Sequence Magnetic Resonance Imaging in Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty* 2016;31:1519–23.
 37. Lohmann CH, Hameister R, Singh G. Allergies in orthopaedic and trauma surgery. *Orthop Traumatol Surg Res* 2017;103:S75–S81.
 38. Magone K, Luckenbill D, Goswami T. Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2015;135:683–95.
 39. 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.
 40. Middleton S, Toms A. Allergy in total knee arthroplasty: a review of the facts. *Bone Joint J* 2016;98-B:437–41.
 41. Mistry JB, Chughtai M, Elmallah RK, et al. Trunnionosis in total hip arthroplasty: a review. *J Orthop Traumatol* 2016;17:1–6.
 42. Onega T, Baron J, MacKenzie T. Cancer after total joint arthroplasty: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1532–7.
 43. Paustenbach DJ, Tvermoes BE, Unice KM, Finley BL, Kerger BD. A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit Rev Toxicol* 2013;43:316–62.
 44. Peters RM, Willemse P, Rijk PC, Hoogendoorn M, Zijlstra WP. Fatal Cobalt Toxicity after a Non-Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Case Rep Orthop* 2017;2017:9123684.
 45. Pivec R, Meneghini RM, Hozack WJ, Westrich GH, Mont MA. Modular taper junction corrosion and failure: how to approach a recalled total hip arthroplasty implant. *J Arthroplasty* 2014;29:1–6.
 46. Pritchett JW. Adverse reaction to metal debris: metallosis of the resurfaced hip. *Curr Orthop Pract* 2012;23:50–8.
 47. Rooker GD, Wilkinson JD. Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement. A prospective study. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62-B:502–5.
 48. Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 2001;56:1192–6.
 49. Scharf B, Clement CC, Zolla V, et al. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity. *Sci Rep* 2014;4:5729.
 50. Skoldenberg O, Rysinska A, Eisler T, Salemyr M, Boden H, Muren O. Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17:174.
 51. Sonntag R, Reinders J, Kretzer JP. What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement. *Acta Biomater* 2012;8:2434–41.
 52. Thomas P, Summer B. Implant allergy. *Allergologie select* 2017;1:59–64.
 53. Thomas P, von der Helm C, Schopf C, et al. Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. *Biomed Res Int* 2015;2015:910156.
 54. Vasudevan A, DiCarlo EF, Wright T, et al. Cellular response to prosthetic wear debris differs in patients with and without rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1005–14.
 55. Visuri T, Pulkkinen P, Paavolainen P, Pukkala E. Cancer risk is not increased after conventional hip arthroplasty. *Acta Orthop* 2010;81:77–81.
 56. Wiley KF, Ding K, Stoner JA, Teague DC, Yousuf KM. Incidence of pseudotumor and acute lymphocytic vasculitis associated lesion (ALVAL) reactions in metal-on-metal hip articulations: a meta-analysis. *J Arthroplasty* 2013;28:1238–45.
 57. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, 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.
 58. Witt JD, Swann M. Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:559–63.
 59. Zhang Y, Wang J, Wang P, et al. Low elastic modulus contributes to the osteointegration of titanium alloy plug. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;101:584–90.

MUDr. Martin Hobza
Ortopedická klinika
FN Olomouc

V Olomouci 5.5.2020

Vážený pane doktore,

sděluji Vám, že práce autorů Martin Hobza, David Milde, Zuzana Slobodova, Jiri Gallo. **The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: A role of metallic byproducts?**”, byla přijata k otištění v Biomedical Papers, ISSN 1213-8118, eISSN 1804-7521.



Jana Nováková

redaktorka

The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: A role of metallic byproducts?

Martin Hobza^a, David Milde^b, Zuzana Slobodova^c, Jiri Gallo^a

Background. The objective of the study was to determine the association between periprosthetic concentrations of selected metals and changes induced in periprosthetic tissues (PT).

Methods. PT from 24 patients with a metal-on-polyethylene or ceramic-on-polyethylene total joint replacements (TJRs) were examined. Samples underwent histological examination including quantification of cellular populations. Determination of metals was performed according to the published methodology. Results were processed using correlation analysis and Principal Component Analysis (PCA), respectively.

Results. Growing concentration of metals in the PT was found as a function of length of exposure (LoE). Differences in Ti, Co, Cr and V concentrations (per $\alpha = 0.05$) depended on the type of alloy the implants were made from. On the contrary, the implant composition did not reflect in the different numbers of immune cells per 1 high power field, not even in distribution of the membrane type according to the Krenn classification. PCA revealed several clusters in dependence on the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. High representation of lymphocytes in the PT was typical for clusters with the longest LoE while a higher representation of neutrophils was typical for a shorter time to reoperation.

Conclusions. Correlation between the LoE and concentrations of metals in its surroundings was demonstrated. However, the tissue image analysis cannot differentiate finer, potentially metal-induced tissue changes. Importantly, the tissues become more similar with an increasing LoE. We draw a conclusion about predominantly non-specific stimulation of the PT jointly by metal and polyethylene particles in non-metal-on-metal TJRs.

Key words: total joint replacement, aseptic loosening, metal debris, adverse local tissue response, Krenn classification; lymphocytes

Received: March 13, 2020; Revised: April 8, 2020; Accepted: April 27, 2020

<https://doi.org/10.5507/bp.2020.019>

© 2020 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

^aDepartment of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00, Czech Republic

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 3, Olomouc, Czech Republic

Corresponding author: Jiri Gallo, e-mail: jiri.gallo@volny.cz

BACKGROUND

Osteoarthritis of the hip and knee is the most frequent joint disease in adults that can substantially deteriorate the patient's locomotion, independence and self-sufficiency and quality of life. Total hip and knee arthroplasties (THA, TKA) are the accepted standard for treatment of end-stage hip and knee diseases. These implants are designed for long-term use in the human body¹. There is strong evidence confirming eligibility of total joint arthroplasty in both the localisations to achieve and maintain long-term results^{2,3}. On the other hand, it is clear that these interventions have limited survivorship⁴. The reasons for their failure differ at least in part for both anatomical locations. However, the main long-lasting problem is aseptic loosening which means a complete loss of connection between the implant and bone bed⁵. This is a consequence of long-term maladaptation of the implant-bone

interface to chronic inflammation induced by prosthetic byproducts released from THA/TKA in combination with continual mechanical load^{6,7}.

A number of studies demonstrate that the surrounding tissues response to prosthetic byproducts by inflammation of low intensity⁸. This subsequently results in accumulation of stimulated osteoclasts at the border between the bone and implant. A vast body of evidence shows that polyethylene micro- and nanoparticles are the main inducers of debris-induced inflammation⁵. Recently, an attention has been drawn to metallic byproducts, particularly in relation to premature failure of metal-on-metal (MoM) prostheses⁹. Metals are released from all metallic implants by the mechanism of corrosion or tribocorrosion^{7,10,11}. Several studies reported concentrations of selected metals in the periprosthetic tissues, joint fluid, or peripheral blood range¹²⁻¹⁵. The character of the tissue response to the presence of metals has been also studied¹⁶⁻¹⁸. New

terms, such as adverse local tissue reactions or adverse reactions to metal debris, have been introduced for more exact communication of the pathologist with an orthopaedic surgeon^{19,20}. Hypersensitivity to metallic byproducts has been also examined in association with premature failure of THA or TKA (ref.²¹).

Importantly, it is assumed that non-MoM THAs and TKAs, i.e. metal-on-polyethylene (MoP), ceramic-on-polyethylene (CoP), or ceramic-on-ceramic (CoC), are exposed to a load of metals too. The objective of this study was to examine tissue samples from adjacent places simultaneously for metallic content (i.e. concentration of metals/1 g of the tissue) as well as for the histopathological changes in non-MoM prostheses. We assumed that the structure of the periprosthetic membranes as well as representation of particular immune cells in this membrane would change in reoperated patients with a different time elapsed from the primary surgery and/or metallic load. This analysis should provide a further piece of evidence on the long-term behaviour of metallic implants inside human bodies.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Between April 2018 and April 2019 81 patients underwent reoperations of THA or TKA (58 THAs, 23 TKAs) at our department. Of these 24 were included into the study. Patients were divided into a subgroup with an implant from a cobalt-chromium (Co-Cr) alloy (n = 11) and subgroup with an implant containing titanium or its alloy (n = 13). The subgroup of patients with total joint arthroplasty containing Ti was reoperated after 13.5 years on average with a range from 0.1 to 22.8 years, whereas the subgroup of patients with total joint arthroplasty without Ti was reoperated after 7.8 years on average with a range of from 2.1 to 23.4 years. Periprosthetic tissues were collected from a previously specified collection site during revision THA (n = 16; 6 males and 10 females) and TKA (n = 8; 4 males and 4 females). Patient characteristics are shown in Table 1. Tissue collection was performed by the same surgeon (JG).

Written informed consent about the use of periprosthetic tissues for the purpose of this study was obtained from each subject prior to inclusion in the study. The Ethics Committee for the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and the University Hospital Olomouc approved the study in accordance with the Helsinki Declaration (Ministry of Health, VES16-31852A).

Sample collection

Tissue samples of 24 patients were collected immediately after opening of the joint from the internal surface of the pseudocapsule. A superficial layer of pseudosynovial tissue on an area of approximately 1 x 2 cm was taken for histological examination. A similarly large sample was collected from the vicinity of the previous sample for later determination of concentration of selected metals. The first

sample was fixed with 10% formalin immediately after collection and was subsequently sent for histopathological examination. The second collection was deeply frozen.

Histopathological examination

The samples were oriented, additionally cut and processed using a standard histological technique with embedding to paraffin blocks after macroscopic assessment at the Institute of Clinical and Molecular Pathology. Two to three representative blocks were selected from each sample after primary hematoxylin – eosin staining and immunohistochemical methods were applied to prepared sections with a thickness of 3 to 4 µm.

Polyclonal antibodies Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 (DAKO, polyclone, c-kit synonym, tyrosine kinase receptor) and Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase (DAKO, clone AA1), which represents the enzymatic equipment of all human mastocytes, were used for purposes of the immunohistochemical examination.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a (DAKO, clone 010) and Polyclonal Rabbit Anti-S100 (DAKO, polyclone) antibodies were used for detection of dendritic cells. CD1a are among MHC class I-related superficial glycoproteins, and they indicate immature dendritic and Langerhans cells and cortical lymphocytes with various intensity. S100 protein indicates Langerhans and dendritic cells, but also adipocytes, chondrocytes, melanocytes and glial cells of the neural tissue.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3 (DAKO, clone F7.2.38) antibody was used for detection of T lymphocytes and monoclonal Mouse Anti-Human CD20 (DAKO, clone L26) was used for detection of B lymphocytes. Histocytes were detected with Mouse Anti-Human CD68 (DAKO, clone PG-M1) antibody.

Immunohistochemistry was performed using an optimised protocol in the Ventana Benchmark XT automated system during final brown staining of the nuclei/cytoplasm and/or membrane of positive cells.

Histopathological evaluation

All preparations were evaluated in an optical microscope Olympus BX45 during 20x – 400x magnification (Objective UPLFFLN40X – UIS2, UPlanFLN, 40x/0.75, oo/0.17/FN26.5). Quantification of particular cellular types expressed by a specific antigen was formulated by an absolute count in 20 fields at 400x magnification (HPF). Determination of the membrane type was performed according to the classification of Krenn et al.²²

Determination of metals

The determination of Co, Cr, Ti and V in tissue samples was carried out by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) after microwave digestion with a mixture of HNO₃ and H₂O₂. The detailed measurement procedure including sample pretreatment and measures taken to assure quality of results is described in detail in our previous study¹²

Table 1. Patient and implant characteristics.

Patient number	Prosthesis locality	Sex	BMI	Age	Primary diagnosis	Diabetes mellitus	Indication for revision	HHS	KSS	KSS-f	Years of implant in situ	Bearing type	Fixation type	Endo-prosthesis alloy type	Metallosis
1	knee	female	26.2	76.1	Primary osteoarthritis	no	Femoropatellar pain	-	56	55	2.1	MoP	C	CoCr	no
2	knee	female	30.5	76.4	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	45	5	4.1	MoP	C	CoCr	no
3	hip	female	26.7	77.7	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	14.7	MoP	C	CoCr	no
4	knee	male	27.3	74.4	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	64	60	23.4	MoP	C	CoCr	no
5	hip	female	27.5	73.9	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	4	-	-	0.3	MoP	C	CoCr	no
6	hip	female	38.3	74.8	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	2.4	MoP	C	CoCr	no
7	knee	female	29.7	72.0	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	50	55	55	7.6	MoP	C	CoCr	no
8	knee	male	29.8	72.6	Primary osteoarthritis	yes	Infection	-	44	40	15.6	MoP	C	CoCr	no
9	hip	female	27.0	76.6	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	36	-	-	11.2	MoP	C	CoCr	no
10	knee	male	35.5	72.8	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	70	40	2.1	MoP	C	CoCr	no
11	knee	male	43.0	58.5	Ankylosing spondylarthritis	no	Infection	-	38	20	2.7	MoP	C	CoCr	no
12	hip	male	29.3	59.2	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	51	-	-	2.6	MoP	CL	Ti	no
13	hip	male	29.4	75.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	55	-	-	22.7	MoP	CL	Ti	yes
14	hip	male	30.5	61.6	Primary osteoarthritis	no	Infection	52	-	-	9.3	MoP	CL	Ti	no
15	hip	female	32.7	71.3	Primary osteoarthritis	no	Polyethylene wear	69	-	-	16.3	MoP	H	Ti	no
16	hip	female	24.3	78.8	Posttraumatic arthritis	yes	Aseptic loosening	31	-	-	2.3	MoP	H	Ti	no
17	knee	female	30.9	57.0	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	76	40	0.1	MoP	C	Ti	no
18	hip	male	30.5	80.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	16.2	CoP	CL	Ti	no
19	hip	female	27.5	73.3	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	48	-	-	22.8	MoP	CL	Ti	no
20	hip	female	20.8	74.8	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	31	-	-	21.5	CoP	H	Ti	yes
21	hip	male	32.1	78.1	Primary osteoarthritis	no	Heterotopic ossification	56	-	-	5.2	MoP	CL	Ti	no
22	hip	female	22.0	59.0	Periprosthetic fracture	no	Aseptic loosening	34	-	-	21.9	CoP	CL	Ti	yes
23	hip	male	31.9	78.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	15	-	-	13.5	MoP	CL	Ti	no
24	hip	female	21.4	70.3	Primary osteoarthritis	no	Pain	79	-	-	20.5	CoP	CL	Ti	no

HHS – Harris hip score; KSS – Knee society score; KSS-f – Knee society score, function; C – cemented implant; CL – cementless implant; H – hybrid fixation; BMI – body mass index; MoP – metal on polyethylene; CoP – ceramics on polyethylene

Table 2. Periprosthetic membrane type determination according to Krenn et al and frequency of particular cell populations.

Patient number	Krenn membrane type	Histiocytes/ HPF	Dendritic cells/ HPF	Giant cells/ HPF	B lymphocytes/ HPF	Plasmatic cells/ HPF	T lymphocytes/ HPF	Mast cells/HPF	Eosinophils/ HPF	Neutrophils/ HPF
1	IV	7.7	-	-	0.6	-	11.2	3.1	-	-
2	I	59.5	0.3	2.6	-	-	83.8	3.1	-	-
3	III	52.8	-	18.3	-	-	24.3	1.6	-	-
4	I	227.6	-	15.5	0.4	-	23.6	5.1	-	-
5	II	79.7	-	0.5	-	-	10.2	4.8	2.7	36.6
6	IV	1.0	-	-	-	-	2.8	3.7	-	-
7	I	200.9	1.2	18.5	-	-	18.8	2.7	-	-
8	III	71.2	3.1	8.8	0.5	3.8	35.4	0.4	-	-
9	I	85.1	-	4.2	-	-	5.6	2.0	-	3.0
10	IV	5.8	0.4	1.2	40.9	1.8	87.4	1.1	-	-
11	III	171.7	1.7	5.7	-	-	32.3	1.9	-	9.7
12	IV	1.2	-	-	-	-	4.5	1.5	4.3	4.9
13	I	224.9	1.7	5.6	-	-	121.7	0.3	-	-
14	III	225.4	0.8	2.5	2.5	-	157.0	4.3	-	300.0
15	I	195.5	1.4	1.4	-	-	13.4	2.2	-	-
16	IV	2.2	-	-	36.6	-	6.0	15.0	-	1.9
17	II	12.1	0.5	0.5	2.8	3.9	35.3	2.6	0.3	2.1
18	IV	3.9	-	-	-	-	3.0	5.0	-	-
19	III	75.0	-	5.9	-	-	42.0	0.6	-	1.2
20	I	203.6	1.8	3.7	-	-	70.3	5.2	-	0.9
21	II	28.9	0.7	0.7	2.4	-	9.7	2.7	0.7	164.1
22	I	202.8	0.9	0.9	-	-	57.6	4.7	-	-
23	I	189.1	1.1	0.7	-	-	5.3	-	0.4	-
24	I	241.9	1.6	1.8	-	-	34.4	11.1	1.2	4.9

HPF – high power field; Krenn classification: I – Particle type; II – Infectious type; III – Combined type; IV – Indifferent type

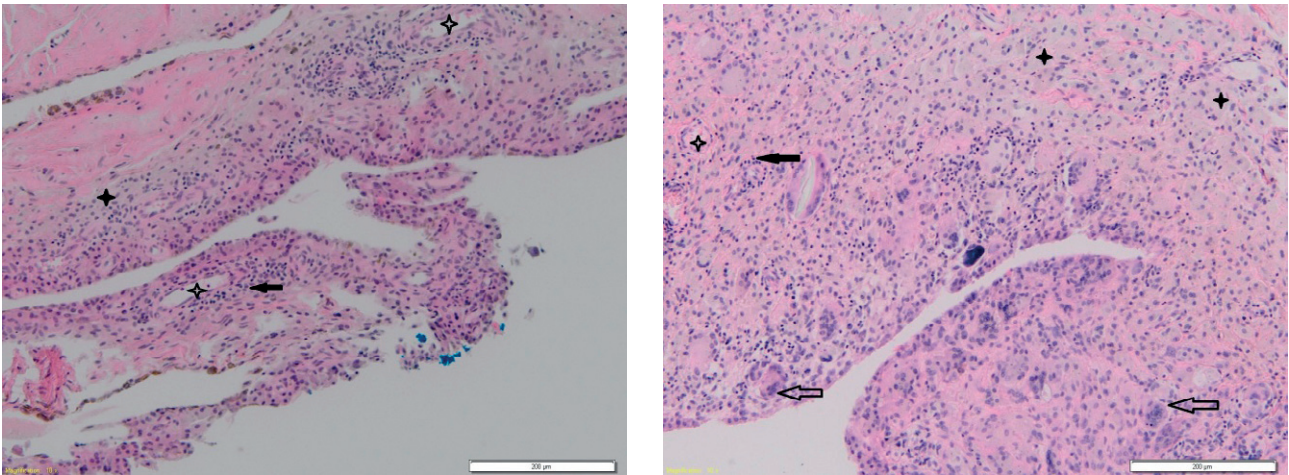


Fig. 1. Pseudosynovial membrane around CoCr implants.

A. Type I membrane according to Krenn and Morawietz – early reaction: Inflammatory infiltration creates a narrow rim of lymphocytes in perivascular localisation with a minimal count of lymphocytes between histiocytes. The figure contains histiocytes and perivascular lymphocytes, giant cells are not present. Wear particles are minimally present, they can be found in superficial areas of the sample. **B.** Type I membrane according to Krenn and Morawietz – late reaction: Inflammatory infiltration is extensive here, dominated by histiocytes and giant cells. In addition to the perivascular area, lymphocytes are present diffusely among histiocytes. Wear material is abundant in all the parts of the sample.

Pictograms:

★ histiocytes, ★✦ blood vessels, ← lymphocytes, ⇐ giant cells, △ necrosis

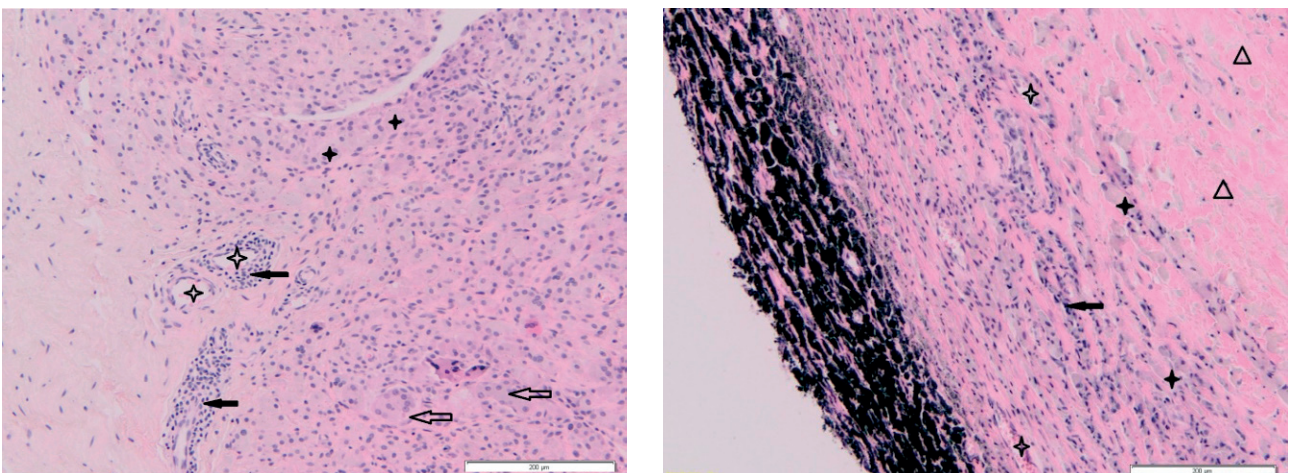


Fig. 2. Pseudosynovial membrane around Ti implants.

A. Type I membrane according to Krenn and Morawietz – early reaction: The inflammatory infiltrate creates a well-defined rim of histiocytes with addition of giant cells and lymphocytes in the perivascular area with sparse lymphocytes between histiocytes. Wear material is less prominent and mostly situated in superficial areas. **B.** Type I membrane according to Krenn and Morawietz – late reaction: Extensive inflammatory reaction dominated by histiocytes and giant cells. Lymphocytes are more present in deeper parts of the sample comparing to the perivascular area and they become more dispersed among histiocytes. Wear material is richly present in all the parts of the sample. Necrosis is found in the upper right corner.

Pictograms:

★ histiocytes, ★✦ blood vessels, ← lymphocytes, ⇐ giant cells, △ necrosis

Statistical analysis

For statistical data treatment, the following software packages were used: NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA) where the Mann-Whitney test was evaluated, and QC.Expert 3.2 (Trilobyte Ltd., Czech Republic) where correlation analysis and principal component analysis (PCA) were elaborated. Considering that we had a

multivariate dataset, an advanced statistical technique (i.e., PCA) was applied to examine the true relationships among our data.

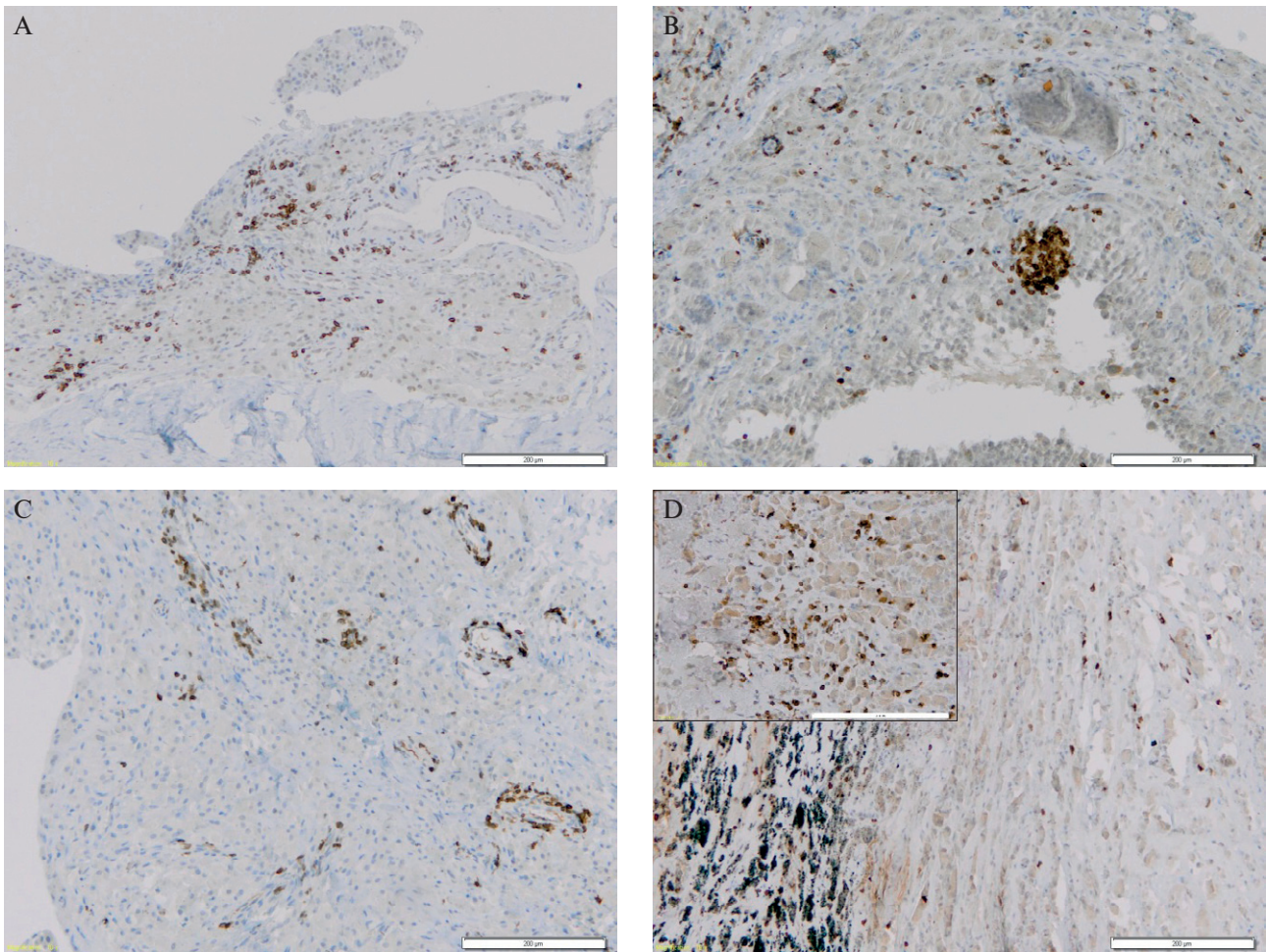


Fig. 3. Immunohistochemical staining of CD3⁺ T lymphocytes in the membrane. A. CoCr implant – early revision: Lymphocytes are mainly in the perivascular area; B. CoCr implant – late revision: Lymphocytes are present not only in the perivascular area, in addition they are dispersed among histiocytes. C. Ti implant – early revision: Lymphocytes in the perivascular area with a small amount of lymphocytes between histiocytes. D. Ti implant – late revision: The superficial area contains small amount of lymphocytes among histiocytes. Inserted figure displays a deeper area, where the lymphocytes are more frequent with a disperse infiltration among histiocytes, conversely, they are less present in the perivascular area.

RESULTS

Histopathological examination results

Results of the histological examination, i.e. determination of the membrane type according to Krenn et al.²² and frequency of particular cellular populations per 1 HPF are reported in Table 2.

A non-parametric test (Mann-Whitney, $\alpha = 0.05$) confirmed that there was no statistically significant difference in the levels of histiocytes, dendritic cells, T lymphocytes, mastocytes, neutrophils or membrane type between both the basic subgroups. Thus, no differences were confirmed among the observed histological parameters and reported subgroups, which leads to a conclusion that the analysis of clear histological parameters does not reveal significant differences between the subgroups of patients with the titanium and non-titanium implants. Other histological parameters were not subject to the statistical test due to predominance of zero levels.

However, the morphological image of both the groups is changing with the duration of implantation. The extent and intensity of inflammatory infiltration was lower in both the groups during a short period from implantation and gradually increased with a growing period from implantation (Fig. 1 and 2). Necrosis occurs more frequently together with an increasing extent of the inflammatory response. Histiocytes form narrow rims below the synovial cover at first, then with the extending interval from implantation they form lamellar to nodular infiltrations. The number of giant cells rises as well as the content of foreign material, which shows its highest volume in the area of contact with the implant. The number of lymphocytes and their distribution also change in time (Fig. 3). Infiltrations are only perivascular and in the vicinity of the surface at first. With a growing period from implantation, higher migration of lymphocytes is seen from perivascular localisations to the areas of inflammatory infiltration. These changes are more expressed in the group with Ti total joint arthroplasty (Fig. 3C and D).

Determination of the metal levels in periprosthetic tissues

Results of a sample analysis for the presence of metals (Ti, V, Co and Cr) in the layer most adjacent to total joint arthroplasty are reported in Table 3. With statistical testing of consistency we evaluated the differences among the levels of metals in patients, who had total joint arthroplasty in the evaluated joint from a titanium alloy, and in patients with total joint arthroplasty with no Ti. The non-parametric Mann-Whitney test confirmed the differences in Ti, Co, Cr and V (per $\alpha = 0.05$). Difference in the levels of titanium explains why we performed dividing into two groups, separately for the following correlation and PCA analysis.

Correlation analyses

For evaluation of relations among particular metals (groups of metals) and histological findings, or for evaluation of relation between the time between primary and revision surgery ("length of exposure"; LoE) and concentrations of metals, we used a correlation analysis using the Pearson correlation coefficient and testing of its statistical significance ($\alpha = 0.05$).

Testing within the group with implants without Ti:

Statistically significant correlation (for $\alpha = 0.05$) between the length of exposure and Cr level ($r = 0.727$) and further between the Co and Cr levels ($r = 0.772$) was demonstrated. Correlation between Co and Cr is easily explainable, since both the metals can be found in total joint arthroplasty. Correlation between the LoE and Cr level is also easily explainable - the longer the implant is in the body, the more metal is released to the surrounding tissue. Co-Cr implants have a small layer of Cr_2O_3 on their surface, therefore correlation between LoE and Cr level, not the Co level, was confirmed.

Testing within the group with Ti implants:

Statistically significant correlations (for $\alpha = 0.05$) between the LoE and Ti concentration ($r = 0.577$), LoE and V concentration ($r = 0.560$) and for Ti and V ($r = 0.714$), respectively, were demonstrated. Both metals can be found in titanium total joint arthroplasties and it is a fact - as in total joint arthroplasties from a CoCrMo alloy - that Ti and V concentrations in the surrounding periprosthetic tissue are growing with the LoE.

Table 3. Metal concentrations in periprosthetic tissues.

Patient number	Endoprosthesis alloy type	Years of implant in situ	Ti (mg/kg)	V (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)
1	CoCr	2.1	0.35	0.02	24.59	6.50
2	CoCr	4.1	0.69	0.04	7.72	0.03
3	CoCr	14.7	0.53	0.01	3.46	0.83
4	CoCr	23.4	6.07	0.31	386.48	24.99
5	CoCr	0.3	2.26	0.04	4.45	1.19
6	CoCr	2.4	2.83	0.01	0.56	0.02
7	CoCr	7.6	2.20	0.01	6.67	6.60
8	CoCr	15.6	20.24	0.85	24.48	34.14
9	CoCr	11.2	2.69	0.01	9.53	14.50
10	CoCr	2.1	0.37	0.03	7.06	0.06
11	CoCr	2.7	30.81	1.28	6.77	0.92
12	Ti	2.6	34.88	0.64	4.69	3.09
13	Ti	22.7	3492.69	215.89	37.40	43.23
14	Ti	9.3	8.94	0.04	169.19	279.57
15	Ti	16.3	8.14	0.05	24.81	8.37
16	Ti	2.3	2.22	0.02	1.86	0.03
17	Ti	0.1	2.27	0.04	7.29	5.79
18	Ti	16.2	29.42	0.02	0.80	0.02
19	Ti	22.8	11.38	0.25	5.72	8.54
20	Ti	21.5	87.11	0.16	162.29	18.37
21	Ti	5.2	5.11	0.01	4.59	6.73
22	Ti	21.9	239.09	11.30	2.76	0.09
23	Ti	13.5	17.99	0.08	39.65	68.66
24	Ti	20.5	12.95	0.01	0.59	0.03

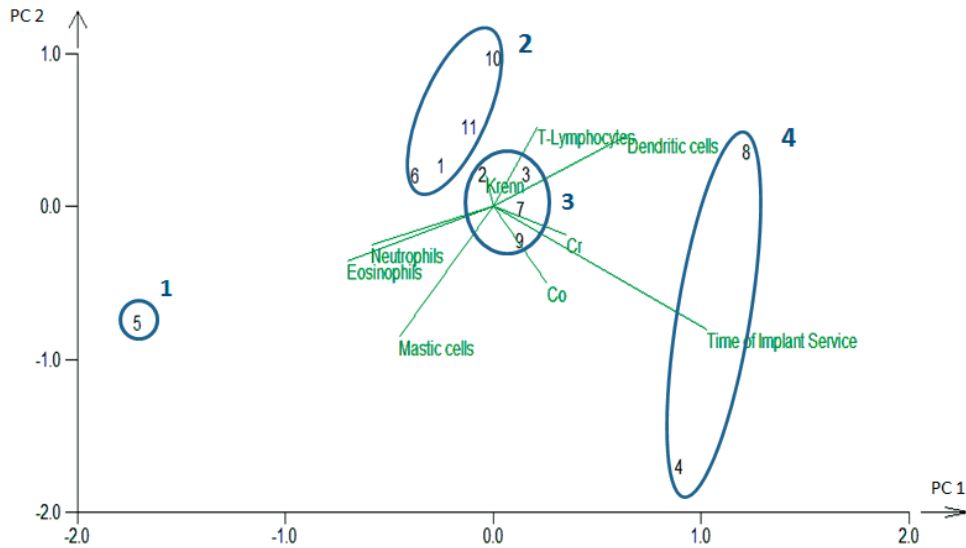


Fig. 4. PCA analysis biplot for the CoCr implant group (n = 11). The first and second main components explain 61.9 % of variability presented in the data. The largest influence is given by the length of exposition, which can be identified as the main component (x axis); PCA – Principal Component Analysis; n – number.

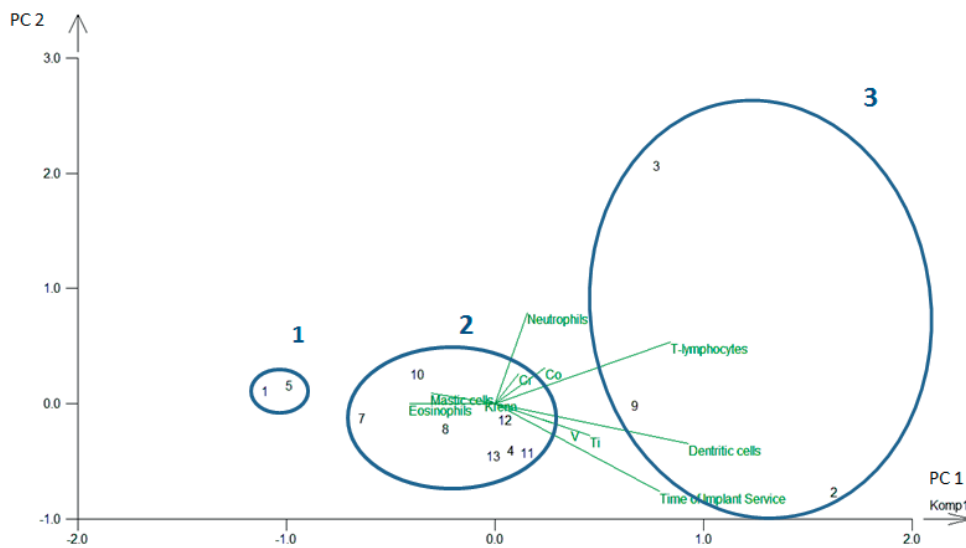


Fig. 5. PCA analysis biplot for the Ti implant group (n = 12). The first and second main components explain 61.1 % of variability presented in the data. The largest influence is given by the length of exposition, which can be identified as the main component (x axis); PCA – Principal Component Analysis; n – number.

Principle component analysis

We mapped each group separately with regard to a small number of subjects and variability in the findings between the titanium (n = 12; one patient with a very short period of implant survival of 0.1 year was excluded from the PCA analysis, since he did not fall to any cluster; “there was no time for metals to be released into the surrounding area”) and cobalt-chromium (n = 11 patients) implants. The following variables were included to the PCA: LoE, dendritic cells, T lymphocytes, mastocytes, eosinophils, neutrophils, membrane type and metals (4.A: Co and Cr; 4.B: Co, Cr, Ti, V). We identified several sub-

groups (cluster) in both the groups in dependence on the LoE.

PCA analysis for the group with implants without Ti (Co and Cr included in the PCA from metals):

PCA could determine several clusters, which differed in the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. Results are shown in Fig. 4 and tell us: i) short LoE, type IV membrane and higher presence of neutrophils were determining for the first aggregation; ii) moderate LoE (2.1–2.7 years) was determining for the second cluster; membrane type was not determining, as

well as any of evaluated cellular populations; iii) the longest LoE (5 and more years), high Co-Cr concentrations were determining for the third cluster, membrane type was not determining, T lymphocytes were predominant among cells.

Group with titanium implants

(Ti, V included in the PCA from metals):

Also in this group the PCA could determine several clusters, which differed in the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. Results are shown in Fig. 5: i) short exposure, type IV membrane, low levels of metals and zero dendritic cells were determining for the first cluster; ii) moderate to longer exposure and lower levels of metals were determining for the second cluster; on the contrary, no membrane type, not even any of evaluated cellular populations were determining; iii) long period of exposure, high levels of released metals in the tissues and high T lymphocyte levels were determining for the third cluster.

DISCUSSION

In this paper we evaluated the histological type of the periprosthetic membrane including representation of immune cells in relation to tissue concentrations of metals released from the MoP or CoP total joint arthroplasty. We found out that time that elapsed from the index surgery (LoE) is the main determining factor. With its growing length, the concentrations of metals originating from the implant increase. Growing T lymphocyte frequency or changing type of their distribution corresponded to high concentrations of metals in the tissues and can be therefore associated with late failure. On the contrary, the membrane type according to Krenn was not determining from the perspective of detected metal concentrations.

It has been previously demonstrated that joint arthroplasties from metallic alloys are not inert, and the surrounding tissues response to released metallic particles and ions by an inflammatory reaction²³. This response may result in failure of MoM implants²⁴ and it probably even contributes to failure of MoP implants²⁵. According to our best knowledge a relation between the concentration of metals in periprosthetic tissues and the type of tissue response in the MoP and CoP total joint arthroplasty has not yet been published in the literature. Relations of the histological finding with tissue metals have been reported in more details in MoM THA, where multivalent results have been published – on one hand, an unspecified immune response with plenty of macrophages in correlation with high tissue concentration of metals and lymphocytic infiltration in the tissues associated with low concentration of metals were demonstrated²⁶. On the other hand, Lohmann found an opposite relation, thus low concentrations of metals with macrophage infiltration and high tissue concentrations of metals associated with lymphocytic infiltration, which is more consistent with our results¹⁵. No clear correlation in dependence on

concentration of metals has been found in a recent study comparing the histopathological finding in relation to concentrations of metals in MoM total joint arthroplasties and resurfacing²⁷. Growing concentration of metals released in periprosthetic tissues with increasing length of implant service has been found in both the groups of our patients, which is in agreement with our previous work¹². We did not measure the serum levels of metals, since no correlation between the tissue and serum levels, not even their significance for failure of total joint arthroplasty were demonstrated^{12,15}. Increased levels of Cr and Co were found in some of the samples from the Ti group, this is given by the use of a CoCr head. Fretting corrosion at the trunnion may be the source of these metals here²⁸. On the contrary, low levels of V (and as well Nb – unpublished data) in this group are given by their low percentage representation in the alloy.

Tissue response to the presence of the implant and its byproducts is gradually becoming unanimous after longer exposition and takes a quite uniform character. Except for the period of membrane formation and maturation, when higher neutrophil concentration was present, the membrane type according to Krenn²² did not determine its host into one of the studied groups according to metal type and tissue metal contents respectively. There are at least two possible explanations. The first one is related to an unspecific response to the presence of prosthetic byproducts, from which only a part is formed by metals. The second explanation could be associated with relative insensitivity of the classification according to Krenn to the presence of different types of byproducts (their concentrations) in the tissues. This classification was originally designed for differentiation of basic peri-implant pathologies²⁹. In its reviewed version²², it contains even an algorithm for assessment of particles (according to material, size and quantity), which should induce tissue changes. However, based on it, the response to abrasion should include the abrasion-induced type of membrane, membrane of the combined type, and also membrane of the fibrous type²². Since there is a certain discrepancy in this area and not even our study could differentiate tissue changes more finely in dependence on concentrations of metals, replication studies should be performed at different sites by experienced pathologists.

Metal debris is not considered as the main initiator of the inflammatory tissue response to prosthetic presence, but there is a stronger pathophysiologic connection to T lymphocytes when compared with the reaction to polyethylene particles as a foreign body. A non-specific foreign body reaction primarily includes macrophages, giant cells, fibroblasts and occasional lymphocytes and small calibre blood vessels, whereas in type IV reaction a main role is played by T lymphocytes in sustaining the chronic inflammatory reaction³⁰. Higher frequency of T lymphocytes was present in our study in the tissues around titanium and also non-titanium non-MoM THAs and TKAs. A high number of T lymphocytes in periprosthetic tissues rising with time point out to an increasing contribution of specific immune response (delayed-type

IV reactions) (ref.^{31,32}) as well as the development of tolerance³³, apparently in dependence on increasing concentration of metals.

Importantly, the activation of T lymphocytes during an immune response triggers a series of events/pathways leading together to a reaction to stimuli. However, their role is strictly integrated to a particular situation in the tissue they work in³⁴. In later revisions (i.e. with longer LoE) we observed both a higher count of T lymphocytes and change of their distribution in the area of inflammation. Higher accumulation of lymphocytes was already previously reported in the tissues around MoM THA (ref.³⁵), where the levels of metals are significantly much higher than in case of MoP or CoP bearing pairs. In fact, higher frequency of T lymphocytes is not only a domain of MoM pairs, it was also observed in the tissues around MoP total joint arthroplasties^{36,37}. Modular connections, where fretting corrosion develops, are the main source of metallic particles and ions in non-MoM total joint arthroplasties^{7,38}. A higher presence of CD4+ T lymphocytes was seen in dual modular neck hip prostheses³⁹. Despite the fact that the way how metallic particles and ions stimulate the immune apparatus of the host was described^{23,40,41}, it is not clear if this is a way common for all metals and what is the threshold amount of metals, which may induce this "specific" response. The gap in our understanding of biotribocorrosion may be filled in the future for example by new tests allowing simultaneous assessment of tribocorrosion in the presence of cells and tissues⁴².

Our study is limited by a low number of cases from two different localities and heterogeneous metal composition of implants, which is further decreasing the provided sample size for each group. On the other hand, a variety of environments for adverse reaction to metals has been a subject of the study. We collected the samples in a standard way, but in a relatively low volume of the periprosthetic tissue, therefore, we cannot rule out that we would come to different findings at another collecting site. We studied this option in the previous paper and we drew a conclusion that variability in the tissue response in one host is relatively low⁴³. A certain bias may have developed even by the fact that the implants from the Ti group had CoCr heads, which resulted in "admixture" of these metals in the final analysed material. On the contrary, it is less probable that concentrations of metals in a membrane tightly adjacent to the implant could affect serum concentrations of metals from other anatomical areas, particularly if we take into account the fact that in the previous study we demonstrated minimal serum concentrations of metals in those, who had MoP, CoP, or CoC joint pairs, and no association between serum and tissue concentration¹². During the tissue analysis, we were unable to control the effect of the following variables in the tissue reaction: i) chronic mechanic stresses (including hydromechanics of fluids), developing during each step; ii) ageing of the periprosthetic tissues and implant-bone connections; and iii) polyethylene debris. This provides opportunity for future research, where a reaction to PE debris is directly compared to reaction to metals given

as a function of their respective concentration, ideally including a cytokine profile study in the same localities.

CONCLUSIONS

Current research shows that the use of TKA and THA is associated with continual release of polyethylene particles and even metals, which significantly contributes to the periprosthetic tissue reaction. We also start to understand more exactly the relation between the immune apparatus and prosthetic byproducts, which stimulate the sensors of innate and adaptive immunity. As a result, pathological debris-induced inflammation subsequently develops in some patients. This paper confirms the ability of tissues to accumulate released metals from THA and TKA and change their character in relation to the length of exposure regardless of whether the implant is of cobalt-chromium or titanium alloy. T lymphocytes play a special role; their incidence grows in relation to concentration of metals and length of the implant *in situ* regardless of material composition of total joint arthroplasty. In contrast, variability in concentration of metals is apparently not reflected in frequency of other types of immune cells (histiocytes, dendritic cells, mastocytes, eosinophils and neutrophils). Classification of periprosthetic membranes cannot predict concentrations of metals in these tissues.

Ethics approval and consent to participate

The local Ethics Committee approved this study in accordance with the Helsinki Declaration; all the enrolled patients agreed with the use of anonymized data for the research purpose of this study.

Acknowledgement: The study was supported from the resources of the Ministry of Health of the Czech Republic – Development of a Research Organization (University Hospital Olomouc, 00098892) and the grant no. NV16-31852A.

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no competing interests regarding publication of this article.

Author contributions: MH, collection of clinical data, tissue sampling, data analysis, writing; DM, determination of metal contents in clinical materials, statistics and information analysis, writing; ZS, histopathological analysis, writing; JG, conceptualization, study design, data interpretation; writing, editing. All the authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Stepanovska J, Matejka R, Rosina J, Bacakova L, Kolarova H. Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia 2020;164(1):23-33. doi: 10.5507/bp.2019.062
2. Evans JT, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more

- than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019;393:647-54. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31665-9
3. Evans JT, Walker RW, Evans JP, Blom AW, Sayers A, Whitehouse MR. How long does a knee replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019;393:655-63. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32531-5
 4. Chang JS, Haddad FS. Long-term survivorship of hip and knee arthroplasty. *The bone & joint journal* 2020;102-B:401-2. doi: 10.1302/0301-620X.102B4.BJJ-2020-0183
 5. Dyskova T, Kriegova E, Slobodova Z, Zehnalova S, Kudelka M, Schneiderova P, Fillerova R, Gallo J. Inflammation time-axis in aseptic loosening of total knee arthroplasty: A preliminary study. *PLoS One* 2019;14:e0221056. doi: 10.1371/journal.pone.0221056
 6. Pajarinen J, Gallo J, Takagi M, Goodman SB, Mjoberg B. Particle disease really does exist. *Acta Orthop* 2018;89:133-6. doi: 10.1080/17453674.2017.1402463
 7. Urish KL, Giori NJ, Lemons JE, Mihalko WM, Hallab N. Trunnion Corrosion in Total Hip Arthroplasty-Basic Concepts. *Orthop Clin North Am* 2019;50:281-8. doi: 10.1016/j.joc.2019.02.001
 8. Goodman SB, Gallo J, Gibon E, Takagi M. Diagnosis and management of implant debris-associated inflammation. *Expert Rev Med Devices* 2019;1-16. doi: 10.1080/17434440.2020.1702024
 9. Laaksonen I, Galea VP, Connelly JW, Matuszak SJ, Marega L, Madanat R, Muratoglu O, Malchau H. Progression of adverse local tissue reaction in ASR metal-on-metal hip arthroplasty: a longitudinal MARS-MRI study at mid- to long-term. *Hip Int* 2019 Dec 23;1120700019894668. doi: 10.1177/1120700019894668 [Epub ahead of print]
 10. Dundon JM, Ramkumar PN, Lajam C. Tribocorrosion in Total Hip Arthroplasty. *JBJS Rev* 2017;5(3). pii: 01874474-201703000-00002. doi: 10.2106/JBJS.RVW.16.00055
 11. Diomidis N, Mischler S, More NS, Roy M. Tribo-electrochemical characterization of metallic biomaterials for total joint replacement. *Acta Biomater* 2012;8:852-9. doi: 10.1016/j.actbio.2011.09.034
 12. Kuba M, Gallo J, Pluhacek T, Hobza M, Milde D. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:454-62. doi: 10.1002/jbm.b.34137
 13. Lehtovirta L, Reito A, Lainiala O, Parkkinen J, Hothi H, Henckel J, Hart A, Eskelinen A. Host-specific factors affect the pathogenesis of adverse reaction to metal debris. *BMC musculoskeletal disorders* 2019;20:195. doi: 10.1186/s12891-019-2578-0
 14. Lehtovirta L, Reito A, Parkkinen J, Peraniemi S, Vepsäläinen J, Eskelinen A. Association between periprosthetic tissue metal content, whole blood and synovial fluid metal ion levels and histopathological findings in patients with failed metal-on-metal hip replacement. *PLoS One* 2018;13:e0197614. doi: 10.1371/journal.pone.0197614
 15. Lohmann CH, Meyer H, Nuechtern JV, Singh G, Junk-Jantsch S, Schmotzer H, Morlock MM, Pfluger G. 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. doi: 10.2106/JBJS.L.01273
 16. Salib CG, Lewallen EA, Paradise CR, Tibbo ME, Robin JX, Trousdale WH, Morrey LM, Xiao J, Turner TW, Limberg AK, Jay AG, Thaler R, Dudakovic A, Sanchez-Sotelo J, Morrey ME, Berry DJ, Lewallen DG, van Wijnen AJ, Abdel MP. Molecular pathology of adverse local tissue reaction caused by metal-on-metal implants defined by RNA-seq. *Genomics* 2019;111:1404-11. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.09.013
 17. Campbell PA, Kung MS, Hsu AR, Jacobs JJ. Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions? *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:3718-27. doi:10.1007/s11999-014-3893-2
 18. 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
 19. Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth 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. doi: 10.2106/JBJS.C.00949
 20. Lohmann CH, Singh G, Willert HG, Buchhorn GH. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J Orthop* 2014;5:660-6. doi: 10.5312/wjo.v5.i5.660
 21. Samelko L, Caicedo MS, Jacobs J and Hallab NJ. Transition from metal-DTH resistance to susceptibility is facilitated by NLRP3 inflammasome signaling induced Th17 reactivity: Implications for orthopedic implants. *PLoS One* 2019;14:e0210336. doi: 10.1371/journal.pone.0210336
 22. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Natsu S, Boettner F, Zustin J, Kolbel B, Ruther W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow R, Soder S, Muller S, Parvizi J, Illgner U, Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 2014;210:779-86. doi: 10.1016/j.prp.2014.09.017
 23. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 2009;67:182-8.
 24. Reito A, Lainiala O, Elo P, Eskelinen A. Prevalence of Failure due to Adverse Reaction to Metal Debris in Modern, Medium and Large Diameter Metal-on-Metal Hip Replacements--The Effect of Novel Screening Methods: Systematic Review and Metaregression Analysis. *PLoS One* 2016;11:e0147872. doi: 10.1371/journal.pone.0147872
 25. 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. *Bone Joint J* 2015;97-b:1024-30. doi: 10.1302/0301-620x.97b8.34682
 26. Campbell P, Ebramzadeh 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. doi: 10.1007/s11999-010-1372-y
 27. Lehtovirta L, Reito A, Parkkinen J, Peräniemi S, Vepsäläinen J, Eskelinen A. Association between periprosthetic tissue metal content, whole blood and synovial fluid metal ion levels and histopathological findings in patients with failed metal-on-metal hip replacement. *PLoS one* 2018;13:e0197614-e0197614. doi: 10.1371/journal.pone.0197614
 28. Sultan AA, Cantrell WA, Khlopas A, Berger RJ, Sodhi N, Molloy RM, Krebs VE and Mont MA. Evidence-Based Management of Trunnionosis in Metal-on-Polyethylene Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review. *J Arthroplasty* 2018;33:3343-53. doi: 10.1016/j.arth.2018.05.035
 29. Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, Neidel J, Gehrke T, Frommelt L, Hansen T, Otto M, Barden B, Aigner T, Stiehl P, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Strobel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Bos I, Hendrich C, Kriegsmann J, Krenn V. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 2006;59:591-7. doi: 10.1136/jcp.2005.027458
 30. Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 2007;28:5044-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.035
 31. Lohmann CH, Hameister R, Singh G. Allergies in orthopaedic and trauma surgery. *Orthop Traumatol Surg Res* 2017;103:575-581. doi: 10.1016/j.otsr.2016.06.021
 32. Roberts TT, Haines CM, Uhl RL. Allergic or Hypersensitivity Reactions to Orthopaedic Implants. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25:693-702. doi: 10.5435/JAAOS-D-16-00007
 33. McCarville JL, Ayres JS. Disease tolerance: concept and mechanisms. *Curr Opin Immunol* 2018;50:88-93. doi: 10.1016/j.coi.2017.12.003
 34. Peterson EJ, Maltzman JS. T-cell activation and tolerance. In: Rich RR (ed) *Clinical immunology: Principles and practice*. Elsevier, 2019, pp.183-196.
 35. 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 Orthop* 2017;88:642-8. doi: 10.1080/17453674.2017.1362774
 36. von Domarus 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. doi: 10.3109/17453674.2011.625534
 37. Ng VY, Lombardi AV, Jr., 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. doi 10.1007/s11999-010-1570-7
38. Wang Q, Eltit F, Garbuz D, Duncan C, Masri B, Greidanus N, Wang R. CoCrMo metal release in metal-on-highly crosslinked polyethylene hip implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020;108(4):1213-28. doi:10.1002/jbm.b.34470
39. 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
40. Mishra PK, Palma M, Buechel B, Moore J, Davra V, Chu N, Millman A, Hallab NJ, Kanneganti TD, Birge RB, Behrens EM, Rivera A, Beebe KS, Benevenia J, Gause WC. Sterile particle-induced inflammation is mediated by macrophages releasing IL-33 through a Bruton's tyrosine kinase-dependent pathway. *Nat Mater* 2019;18:289-97. doi: 10.1038/s41563-018-0271-6
41. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity. *J Orthop Res* 2009;27:847-54. doi: 10.1002/jor.20826
42. Radice S, Holcomb T, Pourzal R, Hallab NJ, Laurent MP, Wimmer MA. Investigation of CoCrMo material loss in a novel bio-tribometer designed to study direct cell reaction to wear and corrosion products. *Biotribology (Oxf)* 2019;18:pii: 100090. doi: 10.1016/j.biotri.2019.100090
43. Vaculova J, Gallo J, Hurnik P, Motyka O, Goodman SB, Dvorackova J. 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* 2018;106:2008-2018. doi: 10.1002/jbm.b.33990

Aktuální postavení perorálních chrupavku ovlivňujících látek v prevenci a terapii kloubních nemocí

Martin Hobza, Jiří Gallo

Ortopedická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Poruchy metabolismu chrupavky a zánětlivé změny kloubní výstelky hrají zásadní roli ve vývoji degenerativních a dalších kloubních onemocnění. Na tyto procesy cílí substance podávané perorálně k léčbě kloubní symptomatologie při chondropatiích a osteoartróze. Některé z nich stimulují obnovu mezibuněčné hmoty chrupavky, podílí se na regulaci jejího metabolismu a do určité míry tlumí zánětlivé procesy. Mají pomalý nástup účinku, působí symptomaticky a někdy je u nich uváděn i efekt zpomalující průběh onemocnění. Nejrozšířenější a také nejvíce prostudované jsou chondroitinsulfát a glukosaminsulfát, mnohem méně informací máme o klinickém efektu diacereinu, piascledinu či metylsulfonylmetanu. Shoda ohledně jejich klinické užitečnosti se stále hledá. Většina odborných společností zabývajících se terapií osteoartrózy podávání těchto látek doporučuje. Jednotlivá doporučení se však liší ve stupni ocenění intervence. Obecně platí, že s narůstající závažností klesá efekt podávání nutraceutik.

Klíčová slova: chrupavka, osteoartróza, chondroitinsulfát, glukosaminsulfát, diacerein, piascledin, metylsulfonylmetan.

Chondroitin, glucosamine, diacerein, piascledine, and methylsulphonylmethane in the prevention and treatment of joint diseases

Metabolic disorders and inflammatory processes in cartilage tissue have a pivotal role in the course of degenerative and other joint diseases. These processes are aimed at by orally administered medication for treatment of osteoarthritis and joint symptoms. Some of these substances stimulate recovery of the extracellular matrix in the cartilage, take part in its metabolic regulation and suppress inflammatory changes to a certain extent. These drugs have a slow onset of effect, alleviate symptoms and are thought to have a disease-modifying effect. Chondroitin sulfate and glucosamine sulfate are most commonly used and best studied; less information is available for diacerein, piascledine and methylsulphonylmethane. An agreement on their clinical usefulness is yet to be found. Most of the clinical societies involved in osteoarthritis treatment recommend administering these substances. However, significance of this intervention can differ in various guidelines.

Key words: cartilage, osteoarthritis, chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, diacerein, piascledine, methylsulphonylmethane

Úvod

Kloubní chrupavka je považována za klíčovou strukturu umožňující hladké asymptomatické fungování kloubu. Její zachování či regenerace jsou proto považovány za důležitý cíl léčebné intervence. Kloubní chrupavku poškozují jednorázové větší úrazy (nitrokloubní zlomeniny) i menší

opakované úrazy, metabolické nemoci či vrozené vady. Zejména se však v souvislosti s chrupavkou uvádí osteoartróza, přestože nejde o onemocnění postihující pouze chrupavku. Jde však o nejčastější kloubní onemocnění v dospělosti.

Velmi atraktivním a společensky závažným tématem je prevence rozvoje degenerativních

kloubních nemocí. Je třeba říci, že zatím neznáme žádnou látku, která by dokázala zabránit vzniku osteoartrózy. Vášnivě se diskutuje o zpomalovacím účinku, protože i tento efekt má potenciálně vysokou klinickou i společenskou hodnotu. V našem sdělení se pokusíme velmi stručně shrnout aktuální poznatky o podávání

Tab. 1. Příklady klinických instrumentů určených ke sledování efektu konzervativní terapie osteoartrózy váhonosných kloubů

Název měřicího nástroje	Základní vlastnosti
Lequesne index	Index závažnosti osteoartrózy kyčelního kloubu používaný ke zhodnocení efektu léčby. Řeší bolest, vzdálenost, kterou pacient ujde, a schopnost provádět běžné denní činnosti.
WOMAC index	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index hodnotí pacientem vyplněný dotazník pro osteoartrózu kyčle a kolenního kloubu. Otázky se zabývají bolestí, ztuhlostí kloubu a funkcí při běžných denních aktivitách.
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score je další variantou dotazníku pro kolenní kloub. Je určen pro hodnocení po úrazech kolene, které mohou vyústit v posttraumatickou artrózu, ale může být použit i u primární osteoartrózy.

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis, KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score

některých perorálních látek ovlivňujících kloubní mikroprostředí.

Současné poznatky o hojení a regeneraci chrupavky

Chrupavka se jako pojivová tkáň skládá z převažující extracelulární matrix, která vytváří charakteristické mechanické vlastnosti chrupavky, z chondrocytů, které matrix syntetizují, a regulují tím metabolismus chrupavky, a směsí povrchových molekul, které garantují excelentní tribologické vlastnosti přirozeného a zdravého kloubu.

Mezibuněčná hmota se skládá z vody, kolagenních vláken a amorfni složky tvořené glykosaminoglykany (kyselina hyaluronová (HA), chondroitinsulfát (CS), keratansulfát), proteoglykany a strukturálními glykoproteiny. Proteoglykany se váží na povrch molekuly kyseliny hyaluronové, a tvoří tak agregáty proteoglykanů (agregan), které jsou schopny vázat velké množství vody a chrupavce poskytují charakteristickou pružnost, hladkost a klouzavost.

Při degenerativním postižení chrupavky dochází postupně k převaze katabolických dějů, což má za následek nejen poruchy její architektury (až nakonec její úbytek), ale také narušení unikátních a pro fyziologii kloubu nezastupitelných vlastností. Osteoartrózu dnes vnímáme jako komplexní onemocnění postihující celý kloub, okolní měkké tkáně i pohybové řetězce, v nichž je pohybový segment zapojen (1). Součástí onemocnění je rovněž různě intenzivní zánětlivá reakce, které se účastní celá řada mediátorů a lytických enzymů (2, 3). V chrupavce postupně ubývá podíl proteoglykanů, a klesá tedy mimo jiné její schopnost vázat vodu. Chrupavka ztrácí pružnost a pevnost a začne se rozvláknovat, delaminovat a podléhat mechanickým vlivům, což vyúsťuje v její postupný úbytek (obr. 1) Právě na tyto patologické procesy původně měla cílit zde uváděná léčiva, dokonce

jako prekursori nebo zástupci extracelulární složky. Situace je však složitější.

SYSADOA, DMOADs a sledování klinického efektu

Dnešní klinickou praxi si neumíme představit bez systematického sledování účinku léčebných strategií. Historicky se v souvislosti s perorálně užívanými látkami postupně navrhlo a opustilo několik koncepcí. Aktuálně se jim přiznává statut látek s pomalým nástupem účinku, který by však měl být déletrvajícím (SYSADOA = Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis). Efekt takové léčby můžeme sledovat pomocí různých skórovacích systémů (tab. 1).

Část výzkumníků je přesvědčena o tom, že některé z perorálních chrupavku ovlivňujících látek by mohly mít tzv. strukturu modifikující efekt. To znamená, že by mohly zpomalovat nebo dokonce zastavit rozvoj osteoartrózy, což dokládají pomocí moderních zobrazovacích metod (zvláště NMR – nukleární magnetická rezonance) anebo pomocí klinického kritéria, jakým je například oddálení potřeby implantace TEP (totální endoprotézy). Takové látky by směly být zařazeny do skupiny DMOADs (Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs). Avšak do dnešních dnů není známa ani jedna, na které by se autority v dané oblasti shodly.

Volba léčebné a preventivní strategie – doporučené léčebné postupy

V dnešní době se požaduje, aby lékař či fyzioterapeut postupoval u každého pacienta s ohledem na jeho individualitu, resp. s ohledem na „jeho konkrétní“ osteoartrózu. Odborné společnosti mu nabízí rozříděný seznam léčebných intervencí, které mohou být s určitým zjednodušením rozděleny na konzervativní léčbu, tedy režimová opatření, farmakologickou terapii a využití pomůcek a léčbu operační.

Obr. 1. Pyramida léčebných intervencí

Látky potenciálně ovlivňující kloubní mikroprostředí a chrupavku patří do skupiny „farmakologické terapie“, přestože jsou v řadě zemí považovány pouze za doplňky stravy (nutraceutika), a nikoli léčiva. Léčivé přípravky obvykle obsahují jen jednu účinnou látku (oproti mnohdy více-složkovým doplňkům stravy), zato procházejí procesem schválení pro klinické využití, a mají tak mimo jiné průkazné množství účinné látky v balení. Pacienti si většinou tento rozdíl neuvědomují.

Látky k perorálnímu užití s potenciálně pozitivním vlivem na chrupavku a kloubní prostředí

Chondroitinsulfát

Chondroitinsulfát (CS) je jednou z hlavních složek mezibuněčné hmoty chrupavky a je obsažen v agregátech proteoglykanů, které udávají mechanické vlastnosti chrupavky. Zástupcem je léčivý přípravek Condrosulf, který je podáván v denní dávce 800 mg po dobu 3 měsíců. Následuje tříměsíční pauza, po které je možno léčbu opakovat. Vstřebané součásti CS se akumulují v oblasti kloubní chrupavky, inhibují aktivitu katabolických enzymů, stimuluje biosyntetické děje, a tím zlepšují mecha-

Obr. 2. Arroskopický obraz chondropatie při osteoartróze kolena



nicko-elastické vlastnosti chrupavky. Některé studie ukazují, že CS inhibuje mediátory zánětlivého procesu při osteoartróze (3, 4). CS má tedy jak symptomatické účinky – úleva od bolesti, omezení počtu exsudativních epizod a zlepšení funkce kloubu, tak i účinky strukturu ovlivňující, jak dokumentuje Hochberg ve své metaanalýze (5). Data z dvouletého sledování více než 1 000 pacientů ukazují snížení úbytku kloubní chrupavky na rentgenovém snímku v porovnání s placebem o 0,13 mm (95 % CI = 0,06, 0,19) (P = 0,0002). Pelletierova studie (6) s dvouletým sledováním úbytku kloubní chrupavky magnetickou rezonancí prokazuje lepší účinnost CS v porovnání s celecoxibem. Z toho vyplývá závěr, že CS má nejen symptomatický, ale částečně i strukturu ovlivňující (DMOADs) efekt. Řada dalších studií však zpochybňuje význam klinického efektu léčby a zejména příslušnost k DMOADs (7).

Glukosaminsulfát

Glukosaminsulfát (GS) je solí glukosaminu fyziologicky přítomného v lidském těle. Glukosamin je k dispozici v několika formách: glukosaminsulfát, glukosamin-hydrochlorid nebo N-acetylglukosamin. V terapii osteoartrózy se ukazuje jako nejlepší jeho forma krystalického sulfátu (8). Na našem trhu je k dispozici např. jako Dona nebo Gool. Denní dávka je 1 500 mg a terapie trvá 1–3 měsíce. Komplexní mechanismus účinku ještě není zcela objasněn, avšak víme, že GS podporuje chondrocyty k tvorbě mezibuněčné hmoty a zároveň má antiflogistické účinky na kloub inhibicí IL-1 β (interleukin 1 beta), čímž tlumí syntézu metaloproteináz, cyklooxygenázy-2 a dalších proteolytických enzymů (9).

Pro preskripci je v klinické praxi důležité mít na paměti, že užívání glukosaminu spolu s warfarinem může potencovat účinek tohoto kumari-

nového preparátu, a zvýšit tak INR (International normalized ratio) na rizikové hodnoty, jak dokumentují některé kazuistiky (10).

Existují studie prokazující analgetický efekt glukosaminsulfátu u gonartrózy (11), další studie naopak vyvracejí efektivitu GS jak samostatně, tak ve spojení s CS. Studie GAIT z roku 2006 uvádí, že jednotlivé léky ani jejich kombinace neposkytují příliš účinnou léčbu bolesti artrotického kolena (12). Ukázala však, že skupina se střední až závažnou bolestí může z kombinace těchto látek do určité míry profitovat. V jedné randomizované dvojitě zaslepené kontrolované studii dokonce prokázali nižší efekt kombinace CS a GS při šestiměsíční léčbě bolesti artrotického kolena v porovnání s placebem (13). Další dvouletá dvojitě zaslepená kontrolovaná studie prokázala prospěšné účinky kombinace CS a GS na bolest, ale tyto výsledky opět nedosáhly statistické významnosti (7). Heterogenita výsledků v klinických studiích se vysvětluje mimo jiné i technologickým postupem používaným při výrobě GS. Výrobky Rottapharm/Madaus dosahují ve většině studií lepších výsledků nežli výrobky ostatních firem (14). V současnosti se však zdá, že ani GS nespĺňuje nároky látky, která by vedla alespoň ke střednímu efektu terapie u pacientů s osteoartrózou kolena či kyčle (15), případně v jiných anatomických lokalitách.

Diacerein

Diacerein je výtažek z rebarbory, který je v České republice prodáván jako Artrodar. Doporučená denní dávka je 50 mg dvakrát denně. Účinek diacereinu je podobný jako u glukosaminsulfátu: inhibuje produkci a aktivitu IL-1 β , dále pak podporuje produkci růstových faktorů, jako je TGF- β (transformující růstový faktor beta), a tím stimuluje syntézu látek mezibuněčné hmoty chrupavky. Aktualizovaná metaanalýza Cochrane z roku 2014 hodnotící terapeutický efekt diacereinu u celkem 2 210 pacientů s osteoartrózou prokázala pouze malý klinický efekt na léčbu bolesti a omezený vliv na rychlost degenerace chrupavky (16). Oproti ostatním chondroprotektivům má diacerein častější výskyt závažnějších nežádoucích účinků, jako je hepatotoxicita nebo silné průjemy. Z tohoto důvodu vydal v roce 2014 Farmakovigilanční výbor Evropské lékové agentury doporučení

pro omezení používání diacereinu: ten by měl být používán jen k terapii pomalu progredující osteoartrózy kyčle a kolene u pacientů mladších 65 let, bez jaterního onemocnění, léčba by měla být započata poloviční dávkou a ukončena v případě výskytu průjmů či zhoršení jaterních funkcí (17).

Piascledine

Piascledine je přípravek obsahující extrakt z avokáda a sójových bobů ve formě nezmýdelnitelných látek označovaných jako ASU (avocado-soybean unsaponifiables). Dávkování je 300 mg denně po dobu 3 měsíců, účinek by měl přetrvávat ještě po dobu dalších dvou měsíců. ASU snižují produkci IL-1, stimuluje tvorbu kolagenu, zvyšují expresi PAI-1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru) a podporují tvorbu TGF- β , jak dokumentují in vitro studie (18, 19). Maheu v klinické studii dokonce prokazuje strukturu modifikující efekt na koxartrózu (20). Metaanalýza randomizovaných kontrolovaných studií zahrnující 664 pacientů s osteoartrózou favorizuje ASU vůči placebu v terapii bolesti s velikostí efektu 0,39 (95 % CI = 0,01–0,76, P = 0,04), prokázán byl rovněž i vliv na funkční skóre (21). Použití Piascledinu pro léčbu osteoartrózy váhonosných kloubů může být doporučeno i vzhledem k jeho dobré toleranci a absenci výskytu závažných nežádoucích účinků.

Metylsulfonylmetan

Metylsulfonylmetan (MSM) je látka, která je přítomna v pojivové tkáni. Její podávání je tudíž velmi bezpečné, uvádí se, že je možné podávat až 4 g denně (22). Má velmi zajímavou historii a v současnosti prožívá „boom“ v prevenci a terapii kloubních i mimokloubních nemocí pohybového aparátu, zvláště těch spojených s větší mechanickou zátěží.

Podle některých prací by MSM mohl ovlivňovat až 4 transkripční faktory a skrze ně se podílet nejen na regulaci metabolismu pojiva, zánětu či aktivity proteolytických enzymů, ale dokonce i při útlumu osteoklastogeneze (22, 23). Na druhou stranu existuje jen málo kvalitních klinických studií, které by podávání této látky, ať už samostatně, nebo ve směsi, doporučovalo (24). Proto nelze podávání této látky všeobecně doporučovat a bude nutné vyčkat na další kvalitně vedené studie.

Současné postavení látek, které potenciálně cílí na kloubní chrupavku

Perorální látky ovlivňující kloubní mikroprostředí jsou vítanou možností terapie kloubních onemocnění zejména vzhledem k dobré snášenlivosti a nízkému výskytu nežádoucích účinků i při dlouhodobém podávání. Jak dokumentují četné

klinické studie a jejich metaanalýzy, je však jejich klinický efekt omezený a zdaleka ne u všech pacientů přináší očekávanou úlevu. Přesto zůstávají nadále součástí komplexní doporučené terapie. Tyto látky je tedy možno zařadit do konzervativní léčby osteoartrózy ve všech jejích stupních a klinických projevech, avšak obecně se očekává, že z těchto látek budou spíše profitovat pacienti

s klinicky počínající či středně závažnou osteoartrózou, zatímco pacienti s výrazně pokročilou osteoartrózou a těžkou symptomatologií budou vědeckými kandidáty na kloubní náhradu či jiné definitivní operační řešení. Chybí také dostatečně silné a homogenní důkazy o tom, že by dlouhodobé podávání těchto látek bránilo vzniku či rozvoji degenerativních kloubních změn.

LITERATURA

- Gallo J. Osteoartróza. Praha: Maxdorf, 2014: 150.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 2009; 14: 913–925.
- Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 14–18.
- Monfort J, Nacher M, Montell E, Vila J, Verges J, Benito P. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500–730 kDa) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res* 2005; 31: 71–76.
- Hochberg MC. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 28–31.
- Pelletier J, Raynaud J, Beaulieu A, et al. SAT0454 In A Two-Year Double-Blind Randomized Controlled Multicenter Study, Chondroitin Sulfate Was Significantly Superior To Celecoxib at Reducing Cartilage Loss with Similar Efficacy at Reducing Disease Symptoms In Knee Osteoarthritis Patients. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 836.
- Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, et al. Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1459–1464.
- Saengnipanthkul S, Waikakul S, Rojanasthien S, et al. Differentiation of patented crystalline glucosamine sulfate from other glucosamine preparations will optimize osteoarthritis treatment. *Int J Rheum Dis*, v tisku.
- Shahine E, Elhadidi A. AB0776 Efficacy of Glucosamine Sulfate in Lowering Serum Level of Interleukin-1 β in Symptomatic Primary Knee Osteoarthritis: Clinical and Laboratory Study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1061.
- Knudsen JF, Sokol GH. Potential glucosamine-warfarin interaction resulting in increased international normalized ratio: case report and review of the literature and MedWatch database. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 540–548.
- Kongtharvonskul J, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Woratanarat P, Thakkinstian A. Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis. *Eur J Med Res* 2015; 20: 24.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 795–808.
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G. CS/GS Combined Therapy Study Group. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis: A Six-Month Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69: 77–85.
- Kucharz EJ, Kovalenko V, Szántó S, Bruyère O, Cooper C, Reginster JY. A review of glucosamine for knee osteoarthritis: why patented crystalline glucosamine sulfate should be differentiated from other glucosamines to maximize clinical outcomes. *Curr Med Res Opin* 2016; 32: 997–1004.
- Wandel S, Jüni P, Tendal B, et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ* 2010; 341: 4675.
- Fidelix TS, Macedo CR, Maxwell LJ, Fernandes Moça Trevisani V. Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 2: CD005117.
- Oddělení farmakovigilance, Státní ústav pro kontrolu léčiv. Diacerein – další informace, 2014. Online. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/diacerein-dalsi-informace>
- Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guillou GB, Pujol JP. Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 148–156.
- Henrotin YE, Sanchez C, Deberg MA, et al. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol* 2003; 30: 1825–1834.
- Maheu E, Cadet C, Marty M, et al. Randomised, controlled trial of avocado–soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 376–384.
- Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 399–408.
- Butawan M, Benjamin RL, Bloomer RJ. Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. *Nutrients* 2017; 9: 290.
- Joung YH, Darvin P, Kang DY, et al. Methylsulfonylmethane Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF- κ B and STAT3 Activities. *PLoS One* 2016; 11: e0159891.
- Gallagher B, Tjoumakaris FP, Harwood MI, Good RP, Ciccotti MG, Freedman KB. Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents. *Am J Sports Med* 2015; 43: 734–744.

Opotřebení a drsnost artikulačního povrchu u extrahovaných polyetylenů jamky Bicon-Plus

Wear and Roughness of Bearing Surface in Retrieved Polyethylene Bicon-Plus Cups

M. RANUŠA¹, J. GALLO², M. HOBZA², M. VRBKA¹, D. NEČAS¹, M. HARTL¹

¹ Ústav konstruování, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně

² Ortopedická klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

By 7th December 2016, 4,755 Bicon-Plus cups in total were implanted in the Czech Republic. Some of them have been continuously re-operated, while the most frequent reason of failure is polyethylene wear and aseptic loosening. The present study is focused on surface analysis of retrieved polyethylene Bicon-Plus cups and the determination of the roughness of their bearing surfaces.

MATERIAL AND METHODS

In this study, we had 13 high molecular weight polyethylene cups with the average time *in situ* of 8.11 years (3.6–13.7, SD 3.2) before the retrieval. The study population was composed of 3 men, 10 women, with the mean age of 53.31 years. An optical scanning method, based on the principle of active triangulation, was used to determine wear rate. The rate of wear was identified by means of an obtained scan subsequently processed with the use of the GOM Inspect software. The roughness of surfaces was analysed with the application of Contour GT-X8 profiler using the principle of phase shifting interferometry. Measurements of surface topography of the retrieved cups were performed on the entire bearing surfaces. For the individual surface changes, a typical range of surface roughness, describing the particular wear character, was determined. By means of morphology analysis of the tested implants, three areas were identified: unworn area; area representing the worn part of the cup; and the area roughened by parallel grooving. The total surface roughness was evaluated as an arithmetic mean of the measured values. Subsequently, the values were sorted based on frequency and were classified into categories defining the particular wear mechanisms.

RESULTS

Wear rate of the retrieved acetabular cups was evaluated based on the wear direction vector and the size of linear wear. The average linear wear was equal to 0.13 mm/year (ranging from 0.26 to 2.29 mm/year), and the mean value of total volumetric material loss was 44.37 mm³/year (the range being from 51.80 to 1,119.7 mm³/year). Using the optical profilometer, a map of roughness distribution of the individual cups was obtained. For each implant, 76 values of roughness were evaluated. With the respect to average roughness, the samples were sorted to various categories describing: surface polishing; abrasive-adhesive wear; surfaces with preserved grooving; substantial plastic deformation.

DISCUSSION

The results clearly showed an increase of wear depending on implant survival; however, the tendency is not linear. This fact can be attributed to a larger amount of abrasive particles, causing an increase of wear or occurrence of surface wear in terms of micro cracks and oxidation degradation of polyethylene. This study indicates that geometry, positioning, and cup alignment during the implantation have a fundamental impact on the cup durability. Further correlation, which was observed in the case of the cup with prevailing roughness in the range from 0.1 to 0.3 µm, is a relatively wide wear vector angle determined with the use of the optical method. Considering the implants with the longest survival time with no loosening of the acetabular cup, the mean angle of direction vector was 56.8° (SD 2.1°).

CONCLUSIONS

The present study provides the results of morphology analysis of the retrieved Bicon-Plus cups. In general, relatively high wear rate, mainly of abrasive-adhesive character was identified. The dependence between wear and implant *in situ* longevity was not clearly linear, which suggests the influence of other parameters on the polyethylene wear rate. An important role of implant positioning on survival was also revealed. Moreover, it seems that it can be a more important parameter than the characteristics of the patient.

Key words: total hip arthroplasty, Bicon-Plus cup, retrieval analysis, surface analysis, wear measurement, roughness, deformation, survivorship.

ÚVOD

Bikonická titanová šroubovací jamka byla uvedena do praxe koncem roku 1993 (Bicon-Plus®; Plus Orthopedics AG, Rotkreuz, Switzerland). Charakteristickým konstrukčním rysem této jamky jsou tenký plášť, lamelární závit a dvojitý kónus, který v porovnání s jednoduchým kónusem, například u jamky Alloclassic, šetří kost při frézování acetabula. Jamka má verzi standardní a tzv. porózní s rozšířeným povrchem zdrsňelého titanu. Podle firemních údajů jí bylo implantováno několik set tisíc. V literatuře lze nalézt studie s 10- a víceletým sledováním tohoto implantátu s výbornými klinickými výsledky a vynikajícím přežitím k 10. roku od operace (20, 28, 37). V české literatuře se jí věnovalo několik autorských týmů (2, 5, 24). Implantát se stále používá, a proto má smysl věnovat se výzkumu jeho výsledků.

Jamku Bicon používáme na naší klinice nepřetržitě od roku 1998 v primární a revizní indikaci, v posledních letech s polyetylenem RexPol (s vysokým stupněm síťování). V poslední době se setkáváme s aseptickým uvolněním implantátů, které jsme operovali v první dekádě tohoto století. Setkali jsme se také několikrát s její frakturou. Měření otěru polyetylenu se věnujeme dlouhodobě, vyvinuli jsme postupně kontaktní (9) i bezkontaktní metody (27) ke stanovení jeho míry na extrahovaných jamkách. Cílem této studie bylo změřit opotřebení extrahovaných polyetylenů u jamek Bicon-Plus a stanovit drsnost jejich artikulárního povrchu.

MATERIÁL A METODIKA

Pacienti

V letech 2010 až 2016 jsme reoperovali 51 jamek Bicon-Plus. Důvod k reoperaci byl 46x aseptický (aseptické uvolnění včetně centrální migrace jamky (obr. 1), opotřebení polyetylenu, periprotetické zlomeniny) a 5x byla kyčel reoperována pro infekci. Do studie s měřením ex-



Obr. 1. Aseptické uvolnění jamky Bicon.

trahovaného polyetylenu jsme mohli zařadit 13 vyjmutých komponent od 13 pacientů, kterým jsme extrahovali polyetylenovou vložku TEP kyčle s jamkou Bicon-Plus. U ostatních byl povrch polyetylenu při vyprošťování z kovové části jamky buď výrazně poškozen, anebo se jamku nepodařilo archivovat podle níže uvedeného protokolu. Základní informace o pacientech shrnuje tabulka 1.

Tab. 1. Základní klinické informace o pacientech

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	BMI	Strana	Datum implantace	Věk v době implantace	Primární diagnóza	Abdukční úhel [°]	Přežití implantátu [roky]	Stabilita implantátu	Důvod revize
01	m	1947	24,24	pravá	9. 1. 2003	55	PA	50,6	12,08	1	PPFF
02	ž	1963	19,23	pravá	15. 4. 2001	37	PD	35,5	10,5	1	asymptomatické, uvolnění dríku
03	ž	1957	27,55	levá	5. 4. 2002	45	PA	35,7	10	1	bolesti
04	ž	1952	24,01	pravá	30. 9. 2002	50	PA	48	10,96	2	bolesti
05	m	1960	32,51	pravá	8. 11. 2005	45	AVN	46,4	6,25	0	bolesti
06	ž	1936	34,38	pravá	13. 1. 2010	73	PA	46	4,04	2	bolesti
07	m	1940	30,86	levá	4. 1. 2006	66	PA	48	7,46	1	bolesti
08	ž	1966	21,05	levá	15. 1. 2003	36	PD	34	7,68	2	fraktura pláště jamky
09	ž	1950	23,31	pravá	3. 3. 2000	50	PA	51	13,67	0	bolesti
10	ž	1960	26,77	pravá	7. 4. 2010	49	PD	35,5	4,47	2	bolesti
11	ž	1944	26,96	levá	13. 1. 2009	64	PA	63	5,16	2	bolesti
12	ž	1933	22,04	pravá	14. 2. 2007	73	PA	40	3,58	2	bolesti
13	ž	1951	29,05	levá	3. 10. 2001	50	PA	39	9,55	1	bolesti

m = muž, ž = žena; * 0 = obě komponenty stabilní, 1 = stabilní jamka, nestabilní dríček, 2 = uvolněná jamka; AVN = avaskulární nekróza hlavičky femuru; BMI = body mass index; PA = primární artróza; PD = postdysplastická artróza; PPFF = periprotetická fraktura femuru.

Polyetylenová vložka do jamky Bicon-Plus

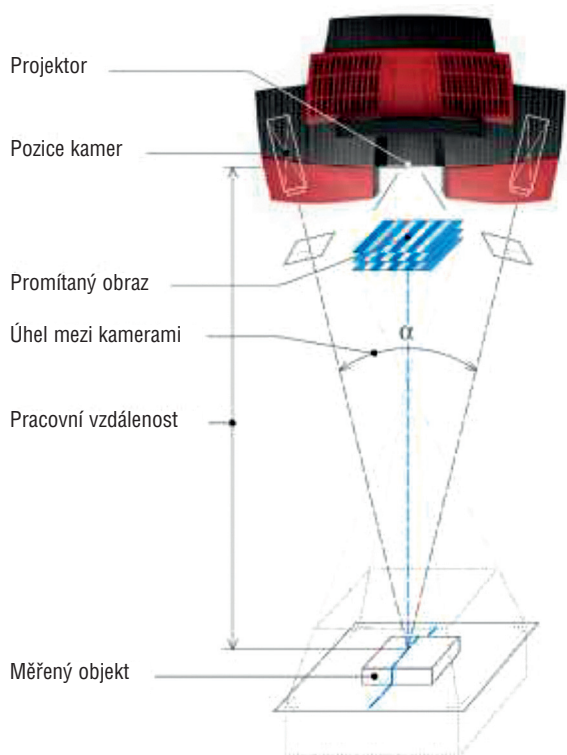
Acetabulární vložka z vysokomolekulárního polyetylenu GUR 1020 (Ticona) byla vyrobena technologií „compression molded“ podle normy ISO 5834-2. Sterilizace probíhala gama zářením (2,5 Mrad; 1 rad = 0,01 Gy) v inertním prostředí dusíku. Zámek vložky fungoval výborně. Polyetylenová vložka artikulovala s keramickou hlavíci.

Extrakce a archivování

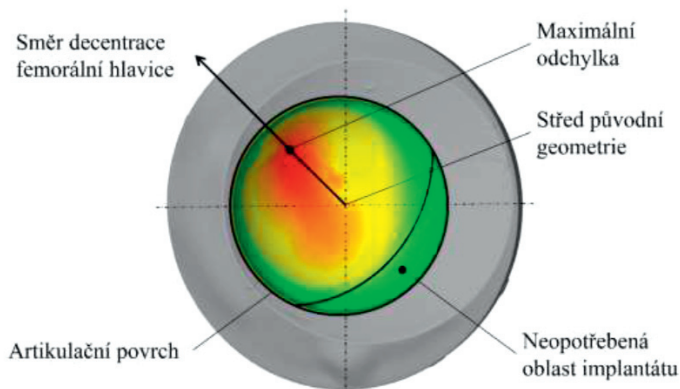
Extrahované polyetyleny byly ihned po vyjmutí z těla mechanicky očištěny a sterilizovány v roztoku Sekusept Aktiv (Ecolab GmbH, Düsseldorf, Německo). Po vysušení a zabalení byly jamky archivovány za standardní pokojové teploty. Následně byly poslány do laboratoře spoluautorů k měření otěru.

Metodika měření otěru

Pro stanovení otěru u artikulačních povrchů extrahovaných polyetylenových vložek byla použita optická skenovací metoda (21). Měření bylo realizováno s využitím skeneru ATOS Triple Scan od společnosti GOM. Princip metody je založený na aktivní triangulaci. Analyzovaný objekt je nasvícený úzkopásmovým modrým světlem, přičemž se využívá takzvaná proužková projekce. Využívaná technologie se nazývá „blue light technology“. Jednou z výhod této technologie je nezávislost na okolních světelných podmínkách (10). Obrazce promítané na objekt jsou snímány dvěma kamerami, které jsou uloženy ve skenovací hlavě. Ze získaných obrazů a na základě znalosti úhlu mezi snímacími kamerami je možné pomocí triangulačních algoritmů získat prostorové souřadnice jednotlivých bodů na skenovaném objektu



Obr. 2. Schéma principu optického skenování.



Obr. 3. Odchylová mapa opotřebovaného implantátu.

(obr. 2). Výsledkem skenovacího procesu je tak získání velkého počtu bodů na povrchu objektu. V případě skenování acetabulární jamky s průměrem 28 mm je na jejím artikulačním povrchu získáno přibližně 200 000 bodů. Hustota bodů poskytuje možnost přesnější vizualizace povrchu.

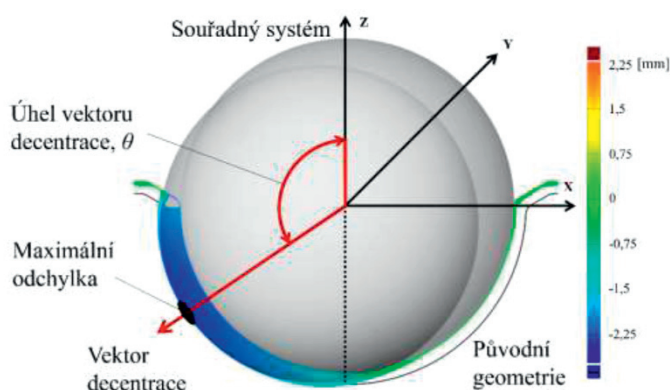
Následně jsou data polygonizována za pomoci software GOM Inspect, čímž je získána geometrie povrchu jamky. Tuto geometrii je možné dále editovat. V prvním kroku byla odstraněna všechna poškození způsobená chirurgem při explantaci, která do objemového úbytku jamky v těle pacienta nesmí být započítána. V dalším kroku byla odstraněna nadbytečná data, jako je například okolí analyzované jamky. K analýze byl zachován jen artikulační povrch explantátu a jeho blízké okolí. Následně jsou povrchová data transformována na objemové těleso.

Získaná geometrie byla následně proložena ideální koulí, takzvaným primitivem, o nominálním průměru odpovídajícím průměru neopotřebované části jamky. Tím bylo možné stanovit odchylku od ideální geometrie v jednotlivých směrech, a následně tak definovat neopotřebovanou oblast acetabulární jamky a směr nárůstu opotřebování. Na základě definovaného neopotřebovaného povrchu byla softwarově vytvořena rekonstrukce původní geometrie implantátu (obr. 3).

Model skenu extrahovaného implantátu byl následně porovnán s rekonstruovanou původní geometrií. Tímto postupem je možné stanovit množství úbytku materiálu v těle pacienta, směr nárůstu opotřebování a velikost decentrace femorální hlavice. Jedním z parametrů, který definuje rozsah opotřebování, je směrový vektor opotřebování, často také označovaný jako vektor decentrace, který je určen maximální odchylkou opotřebované artikulační oblasti vůči původní geometrii. Tento vektor svírá s vertikální osou jamky (osa z) takzvaný úhel vektoru decentrace (obr. 4), (26).

Metodika měření drsnosti

Pro stanovení drsnosti povrchu extrahovaných jamek byl využit profilometr Contour GT-X8 od společnosti Bruker. Optický profilometr pracuje na principu interferometrie s řízenou změnou fáze. Profilometr využívá vlnovou délku světla pro porovnání optických drah světla mezi analyzovaným povrchem a referenčním po-



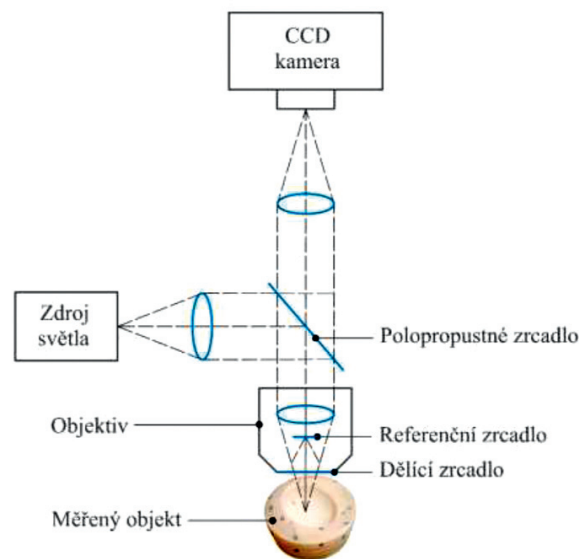
Obr. 4. Stanovení vektoru decentrace femorální hlavičky.

vrchem. Vyzařovaný světelný paprsek je rozdělen, přičemž jedna jeho část se odrazí od testovaného povrchu po průchodu objektivem a druhá část se odrazí od referenčního zrcadla. Na základě interference paprsků je možné následně vyhodnotit topografii povrchu, přičemž výsledný interferogram (obrazec interferujících paprsků) je snímán CCD kamerou (obr. 5).

Metoda poskytuje měření topografie povrchu s rozlišením až 0,1 nm. Pro skenování povrchu byl použit objektiv s 20násobným zvětšením snímané plochy o velikosti 0,22 mm², což je dostatečné pro účely námi prováděných měření. U acetabulární jamky o průměru 28 mm docházelo při měření drsnosti v určitých bodech ke kolizi mezi jamkou a objektivem. Nutností tak bylo měřené jamky rozřezat na čtyři části a po měření data následně složit do komplexní mapy popisující topografii povrchu. Pro definici jednotlivých měřených bodů na povrchu jamky byl navržený polohovací přípravek umožňující natočení vzorku do konkrétní definované polohy, přičemž se využívá takzvaný polární souřadnicový systém.

Výsledkem měření na optickém profilometru je mapa rozložení drsností u jednotlivých explantátů. U každé čtvrtiny jamky bylo provedeno měření v 19 definovaných místech rovnoměrně rozložených podle stanovené souřadnicové mapy měření (obr. 6). Celkem tak bylo získáno 76 hodnot drsností pro každý extrahovaný implantát.

U jednotlivých povrchových změn bylo na základě struktury povrchu stanoveno typické rozmezí drsností popisující konkrétní charakter opotřebení. Analýzou morfologie povrchu testovaných náhrad byly stanoveny tři oblasti lišící se úrovní drsnosti povrchu. Jednu z oblastí lze popsat jako neopotřebovanou. V této oblasti jsou jasně viditelné stopy po výrobním nástroji. Pověštinou se přitom jeví jako neopotřebované, případně bylo pozorováno jen jejich velmi omezené opotřebení. Drsnost této oblasti dosahuje hodnot nižších, než bylo naměřeno u jamek před opotřebením,



Obr. 5. Schéma principu optické profilometrie.

což naznačuje, že v důsledku artikulace náhrady došlo k určitému vyhlazení povrchu (6, 13). Další dvě oblasti popisují opotřebovanou oblast jamky a oblast zdrsněnou paralelním rýhováním způsobeným kontaktem jamky s povrchem hlavičky. Z pozorování opotřebované oblasti bylo identifikováno zvlnění povrchu jamky a případná delaminace, která je přisuzována plastické deformaci (30). Měřená drsnost povrchu jamek byla popsána parametrem drsnosti Ra, tedy střední aritmetickou úchytkou profilu. Jednotlivé hodnoty drsnosti u každého explantovaného vzorku byly zařazené do rozmezí drsností (obr. 6).

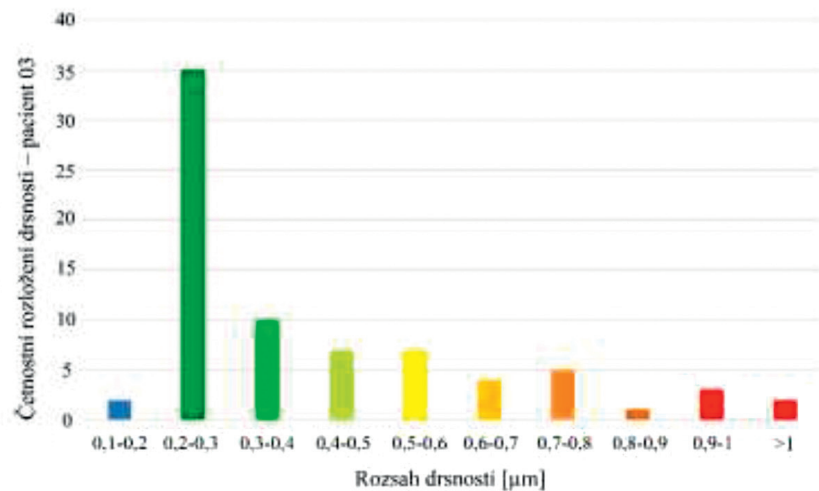
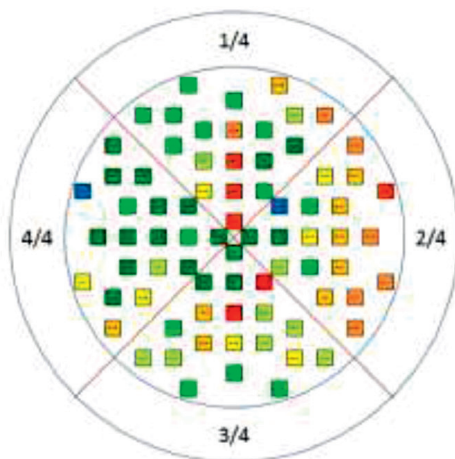
VÝSLEDKY

Opotřebení povrchu

Na základě měření za pomoci optické skenovací metody byl u třinácti extrahovaných acetabulárních jamek stanoven směrový vektor opotřebení, velikost lineárního opotřebení a celkový objemový úbytek materiálu. Výsledky těchto parametrů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Geometrická analýza extrahovaných implantátů

Číslo pacienta	Velkost implantátu	Lineární opotřebení [mm]	Lineární opotřebení [mm/rok]	Úhel vektoru opotřebení [°]	Objemové opotřebení [mm ³]	Objemové opotřebení [mm ³ /rok]
01	4/28	2,27	0,19	63,4	1119,7	92,66
02	5/28	1,39	0,13	59,3	528,97	50,38
03	4/28-Antilux.	0,43	0,04	-	99,81	9,98
04	4/28	1,60	0,15	13,8	752,02	68,63
05	6/28	0,66	0,11	-	170,98	27,36
06	4/28	0,48	0,12	42,6	162,63	40,24
07	5/28	0,90	0,12	-	299,66	40,18
08	4/28-Antilux.	2,24	0,30	59,3	966,92	125,85
09	3/28	2,29	0,17	53,0	584,86	42,79
10	5/28-Antilux.	0,26	0,06	62,9	69,46	15,55
11	4/28-Antilux.	0,47	0,09	20,8	152,98	29,66
12	7/28	0,31	0,09	33,1	51,80	14,46
13	4/28	0,92	0,10	67,8	182,05	19,06



Obr. 6. Měření drsnosti povrchu – pacient 03.

Měření bylo u každého vzorku třikrát zopakováno a z naměřených hodnot byl stanoven aritmetický průměr. Průměrná rychlost lineárního otěru u měřených jamek byla 0,13 mm/rok (směrodatná odchylka, angl. standard deviation (SD) = 0,06 mm/rok). Průměrná hodnota objemového otěru byla 44,37 mm³/rok (SD = 32,45 mm³/rok). Získaná data byla porovnána s klinickými daty jednotlivých pacientů. Graf 1 popisuje závislost rychlosti lineárního opotřebení v závislosti na době přežití implantátu v těle pacienta. Na elementární úrovni lze očekávat, že opotřebení bude narůstat přímo úměrně s časem, po který je implantát přítomný v těle pacienta. Na základě výsledků uvedených v grafu 1 se však ukazuje, že závislost mezi rychlostí otěru a délkou používání implantátu lineární není. Podobně jsme stanovili závislost mezi rychlostí otěru, délkou implantátu in situ a body mass indexem (BMI), (graf 2, 3).

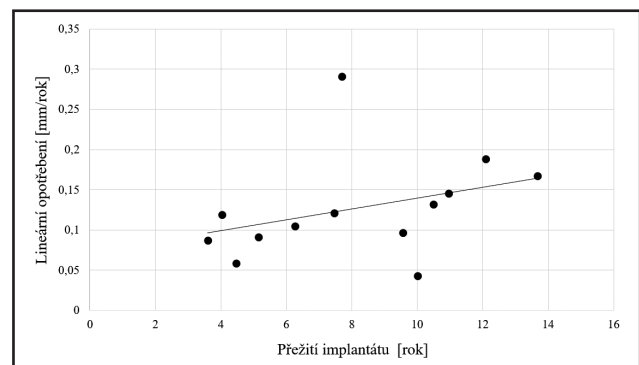
Drsnost povrchu

Měření topografie povrchu na extrahovaných jamkách bylo realizované rovnoměrně po celém artikulačním povrchu. Celková drsnost povrchu byla stanovena aritmetickým průměrem naměřených hodnot. Následně byly hodnoty seřazeny podle četnosti a byly zařazeny do kategorie definující jednotlivé mechanismy opotřebení (tab. 3). Tímto způsobem je možné definovat vzorky, u kterých došlo k výraznému vyhlazení povrchu abrazivně adhezním opotřebením (obr. 7a), povrchy se zachovanými rýhami po výrobním nástroji (obr. 7b) a vzorky s výrazným plastickým poškozením (obr. 7c).

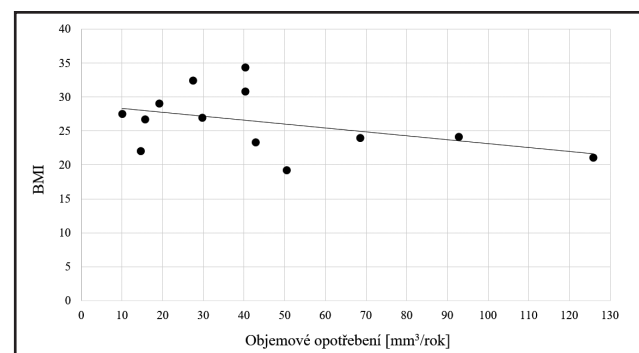
DISKUSE

U souboru 13 vzorků extrahovaných implantátů Bicon s průměrnou délkou přežití 8,1 roku (SD 3,2 roku) byly analyzovány geometrické a topografické změny artikulačních povrchů. Získané výsledky byly následně hodnoceny v porovnání s dostupnými klinickými daty pacientů.

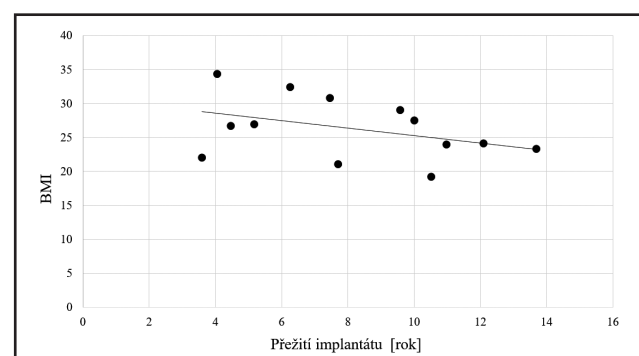
Graf 1. Závislost lineárního opotřebení na době přežití implantátu



Graf 2. Závislost objemového opotřebení na BMI



Graf 3. Závislost přežití implantátu na BMI



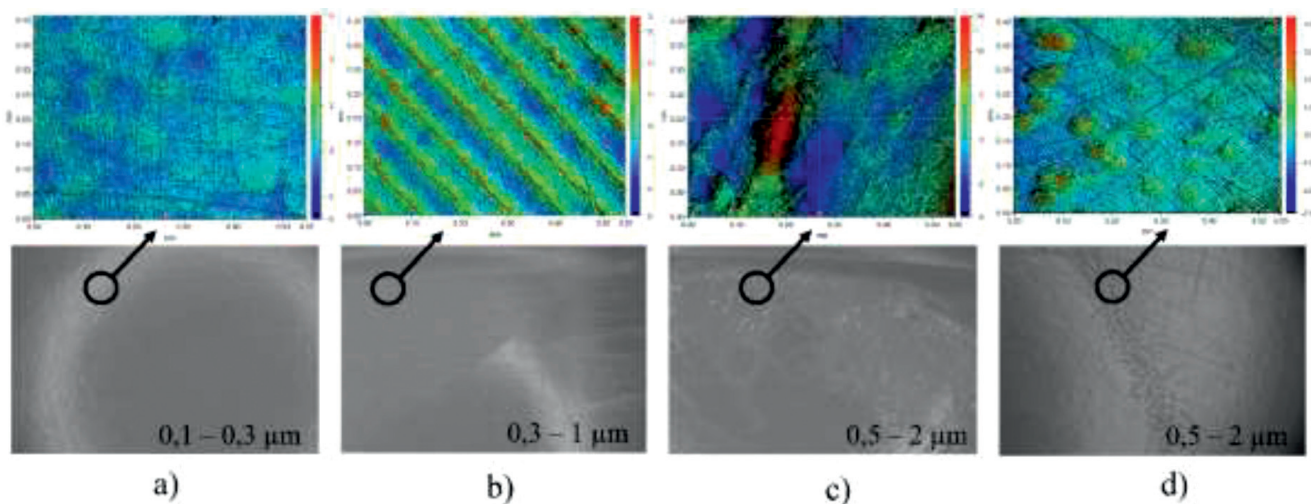
Tab. 3. Vyhodnocení drsností artikulárních povrchů u extrahovaných jamek

Číslo pacienta	Průměrná drsnost [μm]	Drsnost artikulujícího povrchu [μm]								
		0,1–0,3	0,3–0,4	0,4–0,5	0,5–0,6	0,6–0,7	0,7–0,8	0,9–1	1 <	
		Vyhlaz.	Znatelné rýhy po nástroji				Výrazné rýhy po nástroji			
		Plastické deformace, znatelné poškození								
01	0,33	58 %	17 %		12 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
02	0,53	30 %	14 %	18 %						Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
03	0,42	46 %	13 %		9 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, pitting
04	1,46				9 %	14 %			55 %	Vyhlazení, výrazné plastické deformace
05	0,42	43 %	18 %						11 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, počátek pittingu
06	0,46		30 %	37 %	24 %					Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, trhliny
07	0,75		18 %	13 %					26 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, trhliny
08	–									Delaminace povrchu, hranové poškození
09	0,63	34 %	33 %						28 %	Vyhlazení, stopy po obrábění, delaminace povrchu
10	0,70			13 %	37 %	28 %				Vyhlazení, stopy po obrábění, plastické deformace, delaminace, hranové poškození
11	0,45	20 %	25 %	24 %						Vyhlazení, stopy po obrábění
12	0,37	25 %	53 %			9 %				Vyhlazení, stopy po obrábění, delaminace, hranové poškození
13	0,51	41 %	22 %					21 %		Vyhlazení, stopy po obrábění

Jednou z porovnávaných veličin je rychlost lineárního opotřebení implantátu stanovená jako rychlost vnoření femorální hlavice do polyetylenové jamky vyjádřená v mm/rok, případně mm^3/rok . Z literatury i z vlastní zkušenosti víme, že hodnocený implantát má vynikající přežití (tab. 4), (12, 16, 20, 29, 31, 37). V naší práci jsme zjistili průměrnou rychlost otěru polyetylenu vyšší než 0,1 mm/rok a převážně abrazivně adhezní typ otěru. Také další autoři změřili na rentgenových snímcích rychlost otěru vyšší než 0,1 mm/rok (tab. 5), což by měla být hodnota sružená s vyšší pravděpodobností výskytu periprotetické osteolýzy a aseptického uvolnění (4). Jinými slovy, tento implantát se zjevně dokázal ubránit rozvoji osteolýzy, přestože základní podmínka rozvoje této reakce byla splněna. Přesto doporučujeme

pacienty s jamkou Bicon-Plus a starším polyetylenem pravidelně kontrolovat, a to zejména po desátém roce od operace.

Z výsledků je jasně pozorovatelný nárůst opotřebení s délkou přežití implantátu, kdy se však nejedná o závislost lineární (graf 1). Tento jev může být způsoben vyšším počtem abrazivních částic způsobujících zvýšení tření, případně výskyt povrchového opotřebení ve formě mikrotrhlin a oxidační degradace polyetylenu (6, 7). Procesy opotřebení může ovlivňovat také různá velikost a tvar otěrových částic (36). Je však třeba zdůraznit, že bylo analyzováno pouze 13 vzorků, což nemusí být pro vyvození jasných závěrů dostatečné množství. Nejvyšší odchylky od lineárního trendu nárůstu opotřebení v porovnání s dobou přežití byly pozorovány u pacientů



Obr. 7. Typy opotřebení na explantovaných vzorcích.

Tab. 4. Přehled studií referujících přežití TEP Bicon-Plus

Autor	Počet kyčlí	Délka sledování (roky)	Přežití k 10. roku od operace	Výskyt AU	Výskyt PPOL
Zweymuller, 2007	232	10	99,3 % (96,9 – 99,8 %) *#	0	1/232; 0,43 %
Veen, 2016	125	7	99,2 % # **	1/125; 0,80 %	–
Topolovec, 2014	587	11	96,1 % (94,3 – 97,9 %) *#	13/587; 2,21 %	13/587; 2,21 % §
Milošev, 2012	200	10	98,4 % (96,6 – 100 %) *#	1/200; 0,5 %	0 §
Korovessis, 2011	153	11	97,5 % (94,0 – 99,0 %) *	4/153; 2,61 %	6,54 %
Schmolders, 2016	81	13,5	96,8 % (90,5 – 98,9 %) *#	4/81; 4,94 %	12/81; 14,81 %
Ottink, 2015	218	14,4	97 % (0,95 – 0,99 %) *#	7/218; 3,21 %	–

AU = aseptické uvolnění, PPOL = periprotetická osteolýza, # = reoperace z jakéhokoliv důvodu, * = v závorce je uveden 95% interval spolehlivosti, ** = přežití k 7. roku, § = osteolýza hodnocena jen u revidovaných pacientů.

Tab. 5. Rychlost otěru polyetylen u jamky Bicon-Plus

Autor	Počet kyčlí	Délka sledování (roky)	Kloubní pár	Průměr hlavičky	Metoda měření	Lineární otěr (mm)	Lineární otěr (mm/R)
Zweymuller, 2007	232	10	Ker-PE	?	Hall	1,33 ± 0,66	0,13
Ottink, 2015	218	14,4	Ker-PE	32 mm	Rogan-Delft software	1,80	0,12
Korovessis, 2011	153	11	Ker-PE	28 mm	Diagnostic PRO Advantage	–	0,059 ± 0,06

Ker = keramika; PE = polyetylen; R = rok; ? = není explicitně uvedeno.

s menším abdukčním úhlem náhrady, přičemž však i u těchto jamek je hodnota abdukčního úhlu v rozsahu 30°–50°, kdy by na základě studií (14, 15, 35) mělo docházet k nejmenšímu opotřebení artikulační vložky. Uložení mimo optimální rozsah je spjato s vyšší rychlostí otěru, případně s poškozením jamky frakturou.

Mnohem méně víme o reálném rozložení a velikosti síly působící na kloub při zátěži a o způsobu zatěžování jednotlivými pacienty. Tento fakt do velké míry ovlivňuje přežití náhrady v důsledku opotřebením, případně jejího uvolnění. Doposud však nebyla publikována práce, která by porovnávala reálné parametry zatěžování kloubní soustavy při běžných aktivitách v souvislosti s objemovým opotřebením implantátu. Jedná se pouze o simulace jednotlivých stavů za pomoci numerických metod. Tato studie se snaží poukázat na fakt, že geometrie, poloha a způsob uložení jamky při její implantaci mají zásadní vliv na její životnost. Dalšími parametry, které rovněž nelze opomenout, je konkrétní materiálová kombinace, případně velikost implantátu (33).

Následně byla data rozšířena o porovnání topografie artikulačního povrchu. U těchto výsledků je nutné poukázat na vzorky, kde byla zaznamenána největší četnost drsností v rozsahu 0,1–0,3 μm (tab. 3). Tato hodnota drsnosti je vykazována u povrchů, kde došlo v důsledku proběhlé artikulace k výraznému vyhlazení povrchu oproti drsnosti dosažené při výrobě jamky. Jde přitom o mechanismus abrazivně adhezního opotřebením s přítomností významných paralelních rýh od kovové femorální hlavičky (25). V našem souboru však polyetylen artikuloval s keramickou hlavičkou. Toto opotřebením bylo pozorováno výhradně u pacientů, kde nedošlo k uvolnění jamky, a ve vícero případech předcházelo vzniku mikrotrhlin – pittingu (obr. 7d) či odlupování větších povrchových vrstev (obr. 7c). Tento jev je možné pozorovat u implantátů s průměrnou dobou přežití 10,5 roku (SD 2,5 roku). Avšak plastická deformace a dela-

minace materiálu mohou souviset také s uvolněním jamky. U tohoto typu selhání je možné předpokládat změny směru zatěžování, které mohou způsobovat tento důsledek a případně vést až ke kolizi okraje jamky s krčkem femorální hlavičky, což se projevilo u některých našich pacientů (konkrétně u pacientů č. 08, 10, 12). Změna rozložení tlaku vlivem natočení vložky je popsána v několika studiích (11, 23).

Další korelací, která je identifikována u jamek s převážující drsností v rozsahu 0,1–0,3 μm, je poměrně velký úhel vektoru opotřebením stanovený za pomoci optické metody. U implantátů s nejdelší dobou přežití, u kterých současně nedošlo k uvolnění acetabulární jamky, byl stanovený průměrný úhel směrového vektoru 56,8° (SD 2,1°). Tyto výsledky jsou unikátní, a nemůžeme je proto porovnat s literárními údaji. Z hlediska biotribologických procesů vyplývajících z pozorování je přežití implantátu spojené tedy i se strukturou povrchu. V běžných podmínkách, kdy je implantát uložený do těla v rozmezí doporučovaných abdukčních úhlů, a za předpokladu stability implantátu dochází k rovnoměrnému opotřebením a vyhlazování povrchu.

Metody schopné testovat parametry konkrétního souboru extrahovaných implantátů můžeme v uvedeném kontextu chápat jako nezbytné analytické nástroje pro zpětné hodnocení procesů opotřebením TEP kyčle. Z hlediska geometrie náhrady hraje dále velmi podstatnou roli i velikost průměrové vřle. Studie (1) se zabývala vlivem velikosti vřle na koeficient tření mezi povrchy, kdy byl pozorován trend snižujícího se tření se snižující se vřlí mezi komponentami. Stejně chování bylo popsáno i v další literatuře (3), kdy byl zaznamenán pokles opotřebením u dvojic s menší vřlí. Tento efekt byl pozorován jak v případě 36 mm, tak 54 mm implantátu. S ohledem na vliv průměru tak autoři konstatovali, že velikost implantátu by měla být co možná největší při zachování co možná nejmenší průměrové vřle. V této souvislosti je

třeba také zmínit problematiku mazání, která má bezpochyby na opotřebení implantátů zásadní vliv. Z tohoto pohledu je rozhodující především tloušťka mazacího filmu (32) a adsorpce proteinů na třecí povrchy (22). Přitom bylo v literatuře poukázáno na fakt, že utváření proteinového mazacího filmu mezi komponentami náhrady je ovlivněno jak materiálovou kombinací (18, 19), tak geometrií (34), a především pak velikostí náhrady a průměrovou vůlí (17). Rovněž je třeba vzít v úvahu složení synoviální kapaliny, která se liší v závislosti na mnoha faktorech, jako je pohlaví, věk, zdravotní stav apod. (8).

Pokud jde o limitace provedené studie, je třeba zmínit zejména malý soubor analyzovaných implantátů. Dále by bylo nepochybně vhodné doplnit povrchové analýzy o stanovení oxidačního indexu extrahovaných polyetylenů. Tuto metodu však v současné době nemáme k dispozici.

ZÁVĚR

V této práci předkládáme výsledky morfologické analýzy extrahovaných jamek Bicon-Plus. Zjistili jsme relativně vysokou rychlost otěru, který byl převážně abrazivně adhezivního typu. Závislost mezi otěrem a délkou implantátu *in situ* nebyla jednoznačně lineární, což ukazuje na vliv dalších parametrů na rychlost opotřebení polyetyleny. Přesto doporučujeme pacienty s tímto implantátem pravidelně sledovat, zvláště po 10. roce od operace. Důležitý vliv na celkové přežití implantátu má také jeho poloha po implantaci. Zdá se dokonce, že jde o významnější parametr, nežli jsou charakteristiky pacienta. Z optických měření je možné pozorovat vliv směrového vektoru opotřebení na topografii povrchu. Při vyšších úhlech byla celková stanovená drsnost menší, což se projevilo hlavně na stabilitě jamky, a tím i na jejím přežití po implantaci.

Literatura

1. Brockett CL, Harper P, Williams S, Issac GH, Dwyer-Joyce RS, Jin Z, Fisher J. The influence of clearance on friction, lubrication and squeaking in large diameter metal-on-metal hip replacements. *J Mater Sci Mater M*. 2008;19:1575–1579.
2. Cichy Z. [Treatment of dysplastic acetabulum using total hip arthroplasty: our intermediate-term results]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2006;73:340–344.
3. Dowson D, Hardaker C, Flett M, Isaac GH. A hip joint simulator study of the performance of metal-on-metal joints – Part II: Design. *J Arthroplasty*. 2004;19:124–130.
4. Dumbleton JH, Manley MT, Edidin AA. A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2002;17:649–661.
5. Dungl P, Stedry V, Hajny P. [Medium-term Experience with Zweymuller's Bicon Plus Cup in the Treatment of Postdysplastic Osteoarthritis of the Hip Joint.]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2000;67:88–92.
6. Edidin AA, Rinnac CM, Goldgber VM, Kurtz SM. Mechanical behavior, wear surface morphology, and clinical performance of UHMWPE acetabular components after 10 years of implantation. *Wear*. 2001;250:152–158.
7. Fulín P, Pokorný D, Šlouf M, Nevalová M, Vacková T, Dybal J, Kaspíková N, Landor I. [Analysis of Oxidative Damage to Components Removed from Beznoska/Poldi Total Hip Replacements]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2016;83:155–162.
8. Galandáková A, Ulrichová J, Langová K, Hanáková A, Vrbka M, Hartl M, Gallo J. Characteristics of synovial fluid required for optimization of lubrication fluid for biotribological experiments. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2016.
9. Gallo J, Havranek V, Cechova I, Zapletalova J. Wear measurement of retrieved polyethylene ABG 1 cups by universal-type measuring microscope and X-ray methods. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150:321–326.
10. GOM. GOM mbH, ATOS - Industrial 3D Scanning Technology. Available at: <http://www.gom.com/metrology-systems/3d-scanner.html>.
11. Korhonen RK, Koistinen A, Kontinen YT, Santavirta SS, Lappalainen R. The effect of geometry and abduction angle on the stresses in cemented UHMWPE acetabular cups - Finite element simulations and experimental tests. *Biomed Eng Online*. 2005;4:32.
12. Korovessis P, Repantis T, Zafirooulos A. High medium-term survivorship and durability of Zweymuller-Plus total hip arthroplasty. *Arch Orthop Traum Su*. 2011;131:603–611.
13. Kurtz SM, Turner J, Herr M, Edidin AA, Rinnac CM. Assessment of surface roughness and waviness using white light interferometry for short-term implanted, highly crosslinked acetabular components. In: Kurtz SM, Gsell, RA, Martell, J, (eds). *Crosslinked and thermally treated ultra-high molecular weight polyethylene for joint replacements*. ASTM International, West Conshohocken, 2004, pp 41–56.
14. Little NJ, Busch CA, Gallagher JA, Rorabeck CH, Bourne RB. Acetabular Polyethylene Wear and Acetabular Inclination and Femoral Offset. *Clin Orthop Relat R*. 2009;467:2895–2900.
15. McBride A, Flynn J, Miller G, Barnes M, Mackie S. Body mass index and acetabular component position in total hip arthroplasty. *ANZ J Surg*. 2013;83:171–174.
16. Milosev I, Kovac S, Trebse R, Levasic V, Pisot V. Comparison of ten-year survivorship of hip prostheses with use of conventional polyethylene, metal-on-metal, or ceramic-on-ceramic bearings. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94:1756–1763.
17. Nečas D, Vrbka M, Urban F, Křupka I, Hartl M. The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements. *J Mech Behav Biomed*. 2016;55:295–307.
18. Nečas D, Vrbka M, Křupka I, Hartl M, Galandáková A. Lubrication within hip replacements - Implication for ceramic-on-hard bearing couples. *J Mech Behav Biomed*. 2016;61:371–383.
19. Nečas D, Vrbka M, Urban F, Křupka I, Hartl M. The effect of lubricant constituents on lubrication mechanisms in hip joint replacements. *J Mech Behav Biomed*. 2015;55:295–307.
20. Ottink K, Barnaart L, Westerbeek R, van Kampen K, Bulstra S, van Jonbergen HP. Survival, clinical and radiological outcome of the Zweymuller SL/Bicon-Plus total hip arthroplasty: a 15-year follow-up study. *Hip Int* 2015;25:204–208.
21. Palousek D, Omasta M, Koutny D, Bednar J, Koutecky T, Dokoupil F. Effect of matte coating on 3D optical measurement accuracy. *Opt Mater*. 2015;40:1–9.
22. Parkes M, Myant C, Cann PM, Wong JSS. The effect of buffer solution choice on protein adsorption and lubrication. *Tribol Int*. 2014;72:108–117.
23. Patil S, Bergula A, Chen PC, Colwell JR, CW, D'Lima DD. Polyethylene wear and acetabular component orientation. *J Bone Joint Surg A*. 2003;85:56–63.
24. Pavelka T, Linhart M, Houček P. [Hip joint arthroplasty following surgical treatment of acetabular fracture]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2006;73:268–274.
25. Pruitt LA, Chakravartula AM. *Mechanics of biomaterials: Fundamental principles for implant design*. Cambridge University Press, New York, 2011.
26. Ranuša M, Gallo J, Vrbka M, Hobza M, Paloušek D, Křupka I, Hartl M. Wear analysis of extracted polyethylene acetabular cups using a 3D optical scanner. *Tribol Trans*. 2017;60:437–447.
27. Rossler T, Mandat D, Gallo J, Hrabovsky M, Pochmon M, Havranek V. Optical 3D methods for measurement of prosthetic wear of total hip arthroplasty: principles, verification and results. *Opt Express*. 2009;17:12723–12730.
28. Schmolders J, Amvrazis G, Pennekamp PH, Strauss AC, Friedrich MJ, Wimmer MD, Rommelspacher Y, Wirtz DC, Wallny T. Thirteen year follow-up of a cementless femoral stem and a threaded

- acetabular cup in patients younger than fifty years of age. *Int Orthop.* 2017;41:39–45.
29. Topolovec M, Milosev I. A comparative study of four bearing couples of the same acetabular and femoral component: a mean follow-up of 11.5 years. *J Arthroplasty.* 2014;29:176–180.
30. Trommer RM, Maru MM, Oliveira Filho WL, Nykanen VPS, Gouvea CP, Archanjo BS, Martins Ferreira EH, Silva RF, Achete CA. Multi-scale evaluation of wear in UHMWPE-metal hip implants tested in a hip joint simulator. *Biotribology.* 2015;4:1–11.
31. Veen EJ, Schrier JC, Van'T Riet E, Breslau MJ, Barnaart AF. Outcome of the cementless Zweymuller BICON-PLUS Cup and SL-PLUS stem in the very elderly individuals. *Geriatr Orthop Surg Rehabil.* 2016;7:74–80.
32. Vrbka M, Návrat T, Křupka I, Hartl M, Šperka P, Gallo J. Study of film formation in bovine serum lubricated contacts under rolling/sliding conditions. *P I Mech Eng J-J Eng Tribol.* 2013;227:459–475.
33. Vrbka M, Nečas D, Bartoščík J, Hartl M, Křupka I, Galandáková A, Gallo J. [Determination of a friction coefficient for THA bearing couples]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2015;82:341–347.
34. Vrbka M, Nečas D, Hartl M, Křupka I, Urban F, Gallo J. Visualization of lubricating films between artificial head and cup with respect to real geometry. *Biotribology.* 2015;1–2:61–65.
35. Wan Z, Boutary M, Dorr LD. The Influence of Acetabular Component Position on Wear in Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2008;23:51–56.
36. Zolotarevova E, Entlicher G, Pavlova E, Slouf M, Pokorný 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;6:3595–3600.
37. Zweymuller KA, Steindl M, Schwarzingler U. Good stability and minimal osteolysis with a biconical threaded cup at 10 years. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;463:128–137.

Korespondující autor:

prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP a FNOL
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz



Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner

Matůš Ranuša, Jiří Gallo, Martin Vrbka, Martin Hobza, David Paloušek, Ivan Křupka & Martin Hartl

To cite this article: Matůš Ranuša, Jiří Gallo, Martin Vrbka, Martin Hobza, David Paloušek, Ivan Křupka & Martin Hartl (2017) Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner, Tribology Transactions, 60:3, 437-447, DOI: [10.1080/10402004.2016.1176286](https://doi.org/10.1080/10402004.2016.1176286)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10402004.2016.1176286>



Accepted author version posted online: 09 May 2016.
Published online: 25 Aug 2016.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 229



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 9 [View citing articles](#)

Wear Analysis of Extracted Polyethylene Acetabular Cups Using a 3D Optical Scanner

Matúš Ranuša^a, Jiří Gallo^b, Martin Vrbka^a, Martin Hobza^b, David Paloušek^a, Ivan Křupka^a, and Martin Hartl^a

^aFaculty of Mechanical Engineering, Institute of Machine and Industrial Design, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic; ^bDepartment of Orthopaedics, University Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

ABSTRACT

Wear analysis of total hip replacements (THRs) is considered one of the most relevant research areas helping to improve the longevity and overall design of THRs. The coordinate machine method (CMM) and Fourier profilometry are the most common methods for measuring THR wear. This article presents optical scanner digitalization as a new method for measuring the wear of polyethylene (PE) acetabular cups. The aim of this article is to explore the potential of this method for the PE wear measurements. Optical scans for the purposes of this study were produced using an ATOS Triple Scan 3D optical scanner. The optical scanner is efficient and it can measure a large number of points for polygonization and for further development of the preworn models. In this study, the scanner first generated point clouds on a sample of 13 retrieved ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) acetabular cups. Next, volumetric models of the cups were created by polygonizing the point clouds. Reverse engineering was used to develop models of the original acetabular cups using the geometry of the unworn parts of the retrieved cups. A comparison of the two models then showed the total volume of the PE debris. The optical scanning method was validated against the gravimetric method using three new acetabular cups that were worn out on a hip pendulum simulator. Validation shows that the optical scanning method is a valid method for wear analysis of the retrieved UHMWPE acetabular cups.

ARTICLE HISTORY

Received 15 December 2015
Accepted 5 April 2016

KEYWORDS

Total hip replacement; polyethylene; wear measurement; optical digitalization; volumetric wear

Introduction

Total hip replacement (THR) is currently the most effective treatment of a number of hip afflictions that helps to alleviate pain and improve quality of life. This surgical procedure consists of removing the damaged joint surfaces and replacing them with artificial ones—an acetabular cup articulating surface with femoral head on a femoral stem. The most common combination of bearing materials is a polyethylene (PE) acetabular cup articulating with a metal or ceramic head.

Along with a growing number of THRs, there is a growing need for revision surgeries due to prosthesis failure. Projected estimates made for the United States show that by 2030 the demand for primary THA will grow by 174% for primary surgery and 137% for revision surgery compared to the levels in 2005 (Kurtz, et al. (1)). By far, the main reason for a revision surgery is aseptic loosening followed by infection and dislocation. Aseptic loosening is causally associated with liberation of huge amount of prosthetic wear particles from the bearing surfaces. These particles stimulate the receptors of innate immunity to trigger a foreign body host response driven predominantly by macrophages and fibrocytes (Gallo, et al. (2)). That is why manufacturers and researchers are motivated to develop bearing materials with increased resistance to wear.

In order to measure the amount and rate of prosthetic wear, various in vivo and in vitro methods have been developed offering clinicians as well as researchers the ability to determine

damage to the prosthetic cup liner (Patel, et al. (3)). In vivo wear measurement methods rely on the assumption that a definite relationship exists between a quantifiable X-ray penetration of the prosthetic head in the cup and the true amount of wear. However, this article focuses only on in vitro methods. Gravimetric methods are suitable for evaluation of the cups tested under repetitive load cycle in special hip joint simulators when the pretest weight of a cup is known. The gravimetric method is also suitable for assessment of artificially worn components in experimental settings. The approach is defined by international standards ISO 14242 (Affatato, et al. (4)). The accuracy of this method is a minimum of 0.1 mg according to ISO 14242–2 (5).

However, this method is not useful for the analysis of extracted hip implants because the weight of the original cup in a preworn stage is not known. Therefore, development of alternative methods allowing the measurement of volumetric wear in a retrieved cup without knowledge of its weight before its use is needed (Bills, et al. (6)).

One of these methods is the analysis of surface geometry by a coordinate measurement machine (CMM). It is the most common method for measuring the geometry in manufacturing practice for control of the shape and dimensions of product elements. Use of this method has also become a correct standard method for the measurement of THR volumetric wear during in vitro tests (Bills, et al. (7); Martell, et al. (8)). A precise description of

this method is clearly summarized in ISO 14242-2 (5), where a particular focus is dedicated to the maximum axial position error of measurement, which is described as $D = 4 + 4l \times 10^{-6}$ (D = volumetric position error in micrometers, and l = measuring length of the work envelope in millimeters). A location change of specimen must affect the volume by no more than 0.05%, and the point mesh spacing should be <1 mm. This standard offers a fundamental basis for the volumetric wear analysis with defined uncertainty of THR measurement (ISO 14242-2 (5)).

There are many studies describing the uncertainty and postprocessing algorithm related to this method. Kothari, et al. (9) published one of the first studies discussing the use of a CMM method to evaluate 22 retrieved THR components. Three hundred and twenty-five points were measured on the surface of a sample. The analysis was carried out in vitro and the examined implants were from metal material (Kothari, et al. (9)). The declared accuracy of this method was $\pm 5 \mu\text{m}$, with the definition described in geometrical product specification for CMM system declaration by ISO 10360-2 (10). Becker and Dirix (11) evaluated the precision of this method in the study comparing two CMM methods with a standard precision of $2.6 \mu\text{m}$ and a high precision of $1.2 \mu\text{m}$. Lord, et al. (12) assessed metal-on-metal THR components, analyzing 32 femoral heads and 22 acetabular cups. The aim was to evaluate the effectiveness of the CMM method against a conventional gravimetric method. To determine the volumetric wear, a program using mathematical software was created. This program aimed to identify the origin of the spherical components from as wide an area of the articulating surface as possible. Then the worn area was localized. Results of this study were verified by the gravimetric method. A validation procedure compared the mathematical and the gravimetric method. In Lord, et al. (12), three stages of mean absolute error—0.53, 0.50, and 0.24 mm^3 —were reported for metal components. Another study examined distribution of the scan lines. The results deal with the impact of the scanning method (polar, planar, etc.), distances between the scan lines, and distribution of points along a single scan line (Bills, et al. (6)).

An innovative surface analysis methodology is the optical method. A noncontact analysis provides simplification of measurements and postprocessing analysis. On the other hand, it offers new possibilities for postprocessing the scanned geometry. The main method used for complex analysis of THR geometry is based on reflectivity of the surface. Reflection of the incident beam is processed by an active or passive triangulation.

One of the studies focused on the use of a noncontact scanning method using Fourier profilometry (Rossler, et al. (13)). The study deals with a sinusoidal grating projector that creates an optical pattern on the object. This pattern is deformed by refraction on the surface, which is reflected in changes of its phase. The image is recorded by a digital camera. Information about the geometry and topographic depth is obtained by the image processing and by the mathematical algorithm computing the phase shift toward the reference plane. A relative percentage difference of this method compared to the gravimetric method is approximately 6.3% depending on the rate of volumetric wear (Rossler, et al. (13)).

Another approach, called scanning profilometry, uses only a one-strip projection. For the analysis of all surfaces, the object is rotated. The sensitivity and accuracy of this method depends on the size of the angle of object rotation. As a result, the whole profile is created by connecting the individual linear scans. The third coordinate is determined from the equal compared reference plane and the plane of refraction. The relative percentage difference of this method compared to the gravimetric method is about 10% (Pochmon, et al. (14)).

Zou, et al. (15) studied the macrostructure surface of acetabular cups. To establish an accurate method for digitizing a convex hemispherical shape, a laser probe fitted on a CMM machine is used. The principle of this optical method is based on triangulation. The surface was digitized at 0.1-mm intervals in X and Y directions divided into six scans. Then discrete points were merged into one surface data. Reproducibility of the method shows a volumetric difference of 1.411 mm^3 (Zou, et al. (15)).

Yun, et al. (16) used 3D optical scanning for validation of the reliability of a power point method to recognize volumetric wear in vivo from radiographs. This method is applied on 17 retrieved PE acetabular cups. A 3D laser scanner used for the analysis of the cup has a resolution of 2.0 megapixels and precision less than 0.01 mm. Data are postprocessed using special software (Geomagic, Morrisville, NC). The mean wear volume achieved by the 3D laser scanning method is $1,146.72 \pm 576.59 \text{ mm}^3$. The main message is to show that the power point method correlated well with the 3D scanning method (Yun, et al. (16)).

The aim of this article is to demonstrate the optical method as a method suitable for determination of volumetric wear and material loss. This method is applicable for retrieved PE acetabular cups at various stages of wear. The data obtained from the 3D digitizing process by the optical scanner are processed and evaluated using computer-aided design (CAD). Using a post-processing algorithm, it is possible to determine the amount of volumetric wear. A particular focus is given to validation of this method by the standard gravimetric method. This method ranks among the most innovative methods in the respective field to determine the volumetric wear of PE acetabular cups. Information on volumetric wear can be used to suggest an effective modification of geometry that would lower the friction and wear by effectively moving the lubrication regime away from the boundary regime toward the mixed and hydrodynamic lubrication regimes (Dougherty, et al. (17); Choudhury, et al. (18)).

As indicated above, the CMM and the gravimetric method are the two most widely used methods for determining the volumetric wear on acetabular cups in vitro. These methods are very precise and have high confidence levels. In recent years, these methods have been supplemented with optical methods to obtain a more comprehensive and time-efficient analysis. The main advantage of the approach described in this article is its ability to reconstruct the unworn geometry of the cup. The analysis of geometry is made on the basis of a large number of points forming the point clouds. This advantage opens new opportunities for analytic and statistical approaches for determination of volumetric wear.

Table 1. Characteristics of the patients enrolled in the study.

Patient	Gender	Weight (kg)	Body ms index	Age (years)	Side	Date of revision	Duration (months)	Type of patient ^a	Reason for revision
1	M	66	24.24	67	Right	January 27, 2015	145	B	Periprosthetic fracture, wear
2	F	48	19.23	48	Right	October 10, 2011	126	B	Aseptic loosening ^b
3	F	75	27.55	55	Left	November 5, 2012	120	B	Aseptic loosening–stem
4	F	63	24.01	61.5	Right	September 11, 2013	131.5	B	Aseptic loosening
5	M	103	32.51	52	Right	January 30, 2012	75	A	Painful hip
6	F	88	34.38	77	Right	January 22, 2014	48.5	B	Aseptic loosening
7	M	100	30.86	73	Left	May 14, 2013	89.5	A	Aseptic loosening–stem
8	F	58	21.05	43	Left	October 20, 2010	92.2	B	Fracture of the cup
9	F	56	23.31	63	Right	October 30, 2013	164	B	Aseptic loosening
10	F	72	26.77	53	Right	September 24, 2014	53.6	A	Aseptic loosening
11	F	77	26.96	69	Left	March 12, 2014	61.9	A	Aseptic loosening
12	F	60	22.04	77	Right	September 14, 2010	43	B	Aseptic loosening
13	F	68	29.05	59	Left	April 20, 2011	114.6	B	Aseptic loosening

^aThe Charnley classification tries to estimate the level of walking capacity, with class A having no disturbance in locomotion, class B with bilateral hip disease (or hip and knee) and normal findings in other weight-bearing joints, and class C with severe compromise of locomotion due to multiple joint involvement.

^bBoth components.

Materials and methods

Components

The new method of wear evaluation was demonstrated on 13 acetabular cups with a diameter of 28 mm (Table 1). All extracted acetabular cups were part of the Bicon-plus cup (Plus Endoprothetik AG, Rotkreuz, Switzerland; later Smith and Nephew). Ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) was made of RCH-1000 Chirulen (Quadrant PHS Deutschland GmbH, Vreden, Germany) according to ISO 5834-2 and ASTM F648. The UHMWPE liner was gamma radiation sterilized (cobalt-60) while sealed in a threefold pouch in a nitrogen atmosphere. The dose adopted was between a minimum of 25 kGy and a maximum of 37 kGy (Milosev, et al. (19)). There is a consistent agreement in clinical studies that the UHMWPE represents an improvement in wear over conventional PE (Williams, et al. (20)). The extracted cups were produced in two designs. The first design was a standard acetabular cup and the second design was an acetabular cup with an elevated rim (the so-called antiluxation modification). Retrieved prostheses were obtained at revision surgeries between 2010 and 2015. All surgeries were performed by one surgeon. The component's survival time in situ was on average 97.29 months (range = 43–145, SD = 37.83 months). After prosthesis extraction, all of the PE liners were mechanically cleaned, immersed in a disinfectant for 24 h, and then sterilized routinely for 2 h. All retrieved cups were obtained under standard conditions with written informed patient consent, and the study was approved by the local Ethics Committee (as a part of project NT11049-5, Ministry of Health, Czech Republic).

New acetabular cups with a diameter of 28 mm were used as reference samples for validation of the method. The new acetabular cups were Durasul Low Profile Cups produced by Zimmer (size 50/28). Validation was replicated on three independent samples to eliminate measurement and manufacturing random errors.

Optical scanning method

Acetabular cups were measured using an 3D ATOS Triple Scan optical scanner (Fig. 1). This optical system is based on active fringe projection and triangulation. The ATOS Triple Scan uses

blue light technology in three viewing angles between the stereo camera and projector. With this approach, the measurements are not dependent on environmental factors and therefore it is not necessary to maintain constant environmental conditions during the measurements. A fringe pattern is projected on the object to be measured and the image is acquired using a two-camera system (Fig. 2). The final scan is composed of multiple partial scans that are aligned according to the reference points detected by software.

For measurement of the acetabular cups, the reference points with a diameter of 0.8 mm were positioned on the surface of the cups outside their evaluated areas (GOM (21)). The measurement was carried out with MV170 lenses with a measurement volume of 170 × 130 × 130 mm calibrated in a small object arrangement. The lenses complied with VDI/VDE2634-3 (22). Further parameters of the measuring equipment are shown in Table 2.

The scanner was calibrated according to the procedures as defined by the producer. Results of calibration are shown in Table 3.

The surface of PE acetabular cups was too transparent for scanning and it was necessary to apply a layer of TiO₂ coating. An airbrush system was used to apply an approximately 3 μm coating (Palousek, et al. (23)). The acetabular cup was fixed in the middle of a rotary measurement table. The scanner was focused on the center of the acetabular cup at a scanning

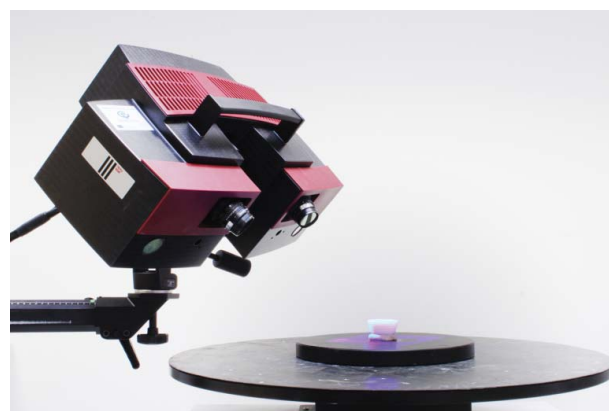


Figure 1. Measuring by ATOS III Triple Scan 3D optical scanner.

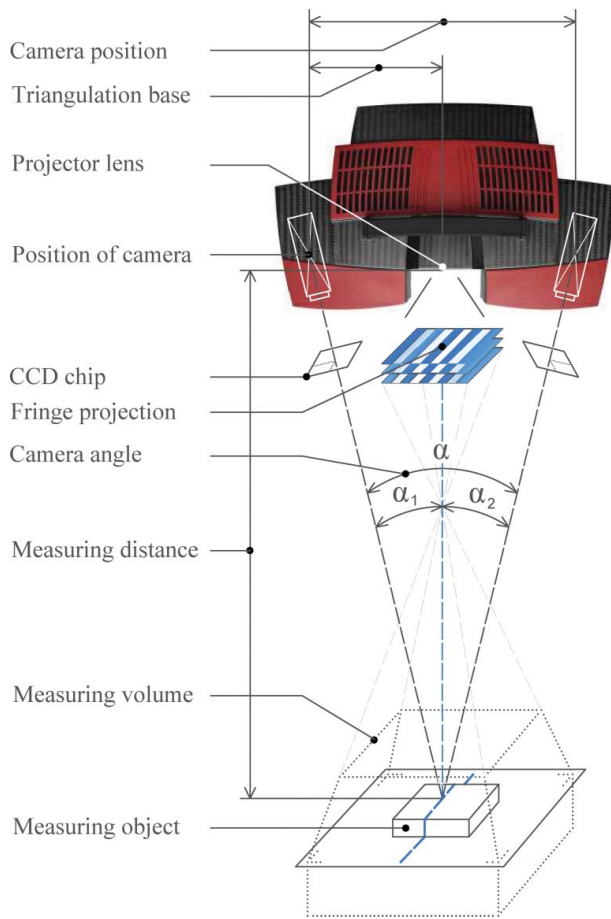


Figure 2. Principle of ATOS 3D optical system.

distance of 490 mm. Each individual scan consists of a large number of isolated points, technically described as a point cloud. Approximately six partial scans were used for the final scan to be used in postprocessing.

Polygonization and definition of coordinate system

After the measurement, the data were postprocessed using the software GOM Inspect (GOM mbH). First, the scan was polygonized. For the purpose of further analysis, only the articulating surface and its close surroundings were necessary; redundant data were removed. Next, the polygonized object was reconstructed by removing and filling in damage caused by the surgeon during extraction of THR components (Fig. 3). Surgical damage was identified after analyzing and considering

Table 2. Parameters of GOM ATOS III Triple Scan 3D scanner (Palousek, et al. (23)).

Parameters	ATOS Triple Scan
Camera pixels (Mpx)	2 × 8
Measuring volume (mm)	170 × 130 × 130
Measuring distance (mm)	490
Lamp	LED
Focal length camera lenses (mm)	40
Focal length projector lens (mm)	60
Point distance (mm)	0.055
Reference points diameter (mm)	0.8
Camera position	Small object

Table 3. Results of calibration.

Parameters	Results of calibration
Deviation of calibration (pixels)	0.033
Optimized deviation of calibration (pixels)	0.020
Calibration of projector (pixels)	0.118
Optimized calibration of projector (pixels)	0.019
Angles of cameras (°)	27.2
Temperature (°C)	24
Type of calibration object	CP40-170-40346

the procedures used for extracting of THR implants. After these modifications, the polygonized geometry was smoothed with a surface tolerance of 3 μm to remove the surface roughness and possible coating defects that could distort the measurements.

A reference coordinate system for cup geometry was created using three fitting elements: a line, a point, and a plane.

The line represented the direction of the wear path (also described as a wear scar) and was used to identify the unworn parts of the samples. The 3D model was created on the basis of the nominal value of the acetabulum diameter. The direction of the wear scar was obtained by an initial comparison of the measured data with the nominal data of the new acetabular cup using the best-fit function of GOM Inspect. This comparison rendered a map of deviations that enabled us to infer the final direction of the wear scar (Fig. 4).

The point was defined by the center of a sphere with a diameter corresponding to the original dimensions of the acetabular cup. The sphere itself was created using the Gaussian best-fit method on a cloud of points of the unworn region. A selection of points defining the unworn region is made manually according to the deviations from the ideal model. Cups with higher wear volumes have a clearly identifiable line between the worn and unworn regions. The selected points were then evaluated with three sigma statistical criteria enabling use of 99.73% of the points.

The plane was defined by the rim of the acetabular cup. A selection of points was performed automatically. A different method of point selection was used for antiluxation cups where the definition points were located only on the outer edge of the rim.

Polygonal data with the defined coordinate system were then used to determine the wear vector as a vector originating from the center of the unworn cup geometry to the most worn point on the inner surface of the cup. The center of the unworn region is defined by the point in the center of the coordinate system as described above. The center of the worn region is defined by the best-fit function applied to the selection of data in the direction of the wear scar. This can be calculated using the basic linear algebra equation for the angle between the two vectors (Fig. 5; Uddin (24)).

The surface of the original acetabular cup was defined by fitting the primitives on unworn parts of the extracted acetabular cup as described above (Fig. 6d). The original unworn model was created on the basis of the dimensions of the primitives from the unworn parts of the samples by means of reverse engineering (Fig. 6e). This method assumed that the original unworn surface was truly spherical and without roughness after machining.

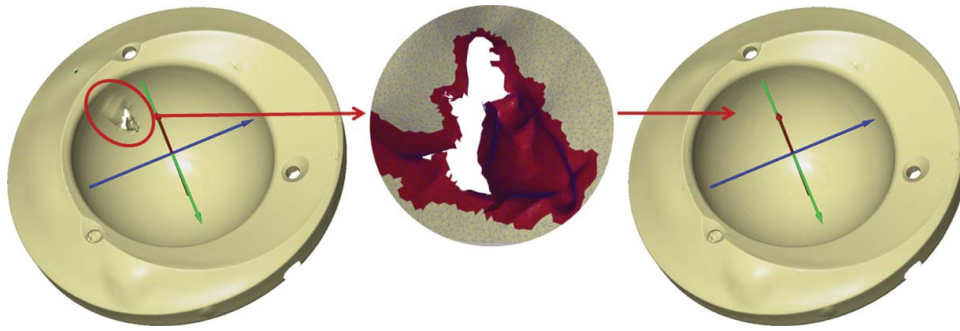


Figure 3. Reconstruction of extracted acetabular cup (GOM Inspect).

Surface and volume creation

Polygonal data were exported to STL (STereoLithography) format for further postprocessing with Geomagic Design X (3D Systems GmbH) software (Fig. 6b). First, the surface model was generated from the polygonal data using the Geomagic auto-surface tool. The quality of this transformation was evaluated by comparing the rendered surface model with the polygonal data. This comparison showed a maximum deviation of $2 \mu\text{m}$, which is a negligible uncertainty (Fig. 7).

Next, the scanned geometry was trimmed and closed with a cylindrical geometry. Dimensions of the geometry were specified with respect to the extent of the volumetric wear. The cylindrical geometry had to include the whole articulation surface showing any material loss. The resulting surface model was suitable for transformation to the volumetric model using Geomagic tools (Fig. 6c).

In the next step, the volumetric model was compared with the model of the original acetabular cup. The resulting comparison shows the volume of material released to a human body during the life cycle of the cup (Fig. 6f).

Validation of method

The 3D scanning method was validated by a gravimetric comparison. Wear of the extracted cups was simulated simply by removing the material from new cups. The method specification

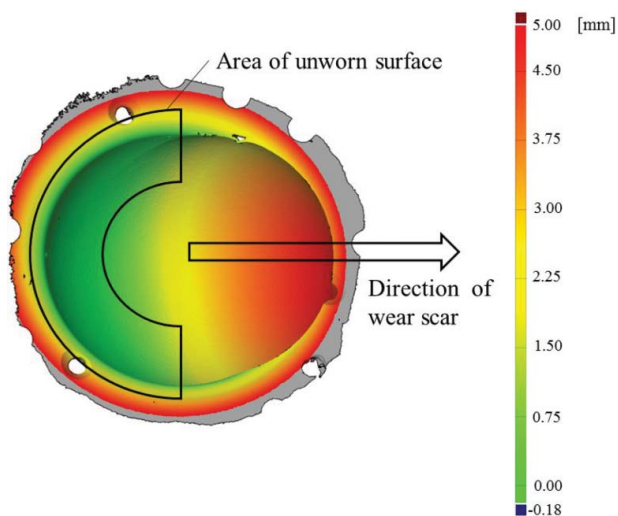


Figure 4. Definition of wear scar direction and coordinate system.

and preparation of specimen can be found in ISO 14242-2 (5). The samples were cleaned of the PE particles to avoid loosening of the particles during scanning.

A Kern ABS 320-4N analytic balance was used to determine the weight loss. Reproducibility of the balance was 0.2 mg and the linearity was ± 0.3 mg. The resolution was ± 0.1 mg, which results in the volumetric uncertainty of $\pm 0.106 \text{ mm}^3$ for PE analysis. Gravimetric measurements were performed at temperatures between 22 and 23°C at a constant humidity level. Gravimetric measurements were taken five times in order to reduce a random error. The average of the measurements was used for the gravimetric comparison.

The volume of the acetabular cup was multiplied by the density of UHMWPE (0.940 g/cm^3 ; McKellop, et al. (25)). The validation samples consisted of three noncemented new acetabular cups with a size of 50/28.

Wear was carried out on a hip pendulum composed of two main parts: a base frame with an acetabular cup and a pendulum with a femoral head. The pendulum was allowed to oscillate freely in the flexion–extension plane. The simulator setup is described in detail elsewhere (Vrbka, et al. (26)). The parameter of weight loss was defined as the decisive parameter for validation. The articulating surface of the metal (CoCrMo) femoral head was scratched to increase the material loss (Fig. 8). One test of volumetric wear lasted 1.5 h with a frequency of approximately 0.48 Hz. The test was performed without lubrication. Weights on pendulum arms ensured a total load of 2,080 N. The weight loss of the cups was measured in six cycles. The average weight loss after the sixth cycle was 0.075 g (80 mm^3). This material loss simulates the wear rate as discussed in previous research (Dumbleton, et al. (27)).

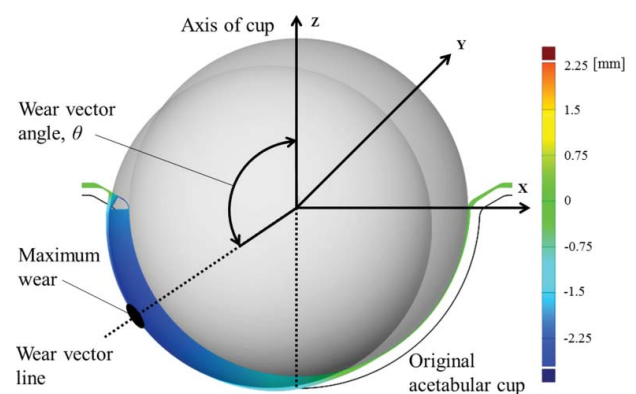


Figure 5. Determination of wear vector.

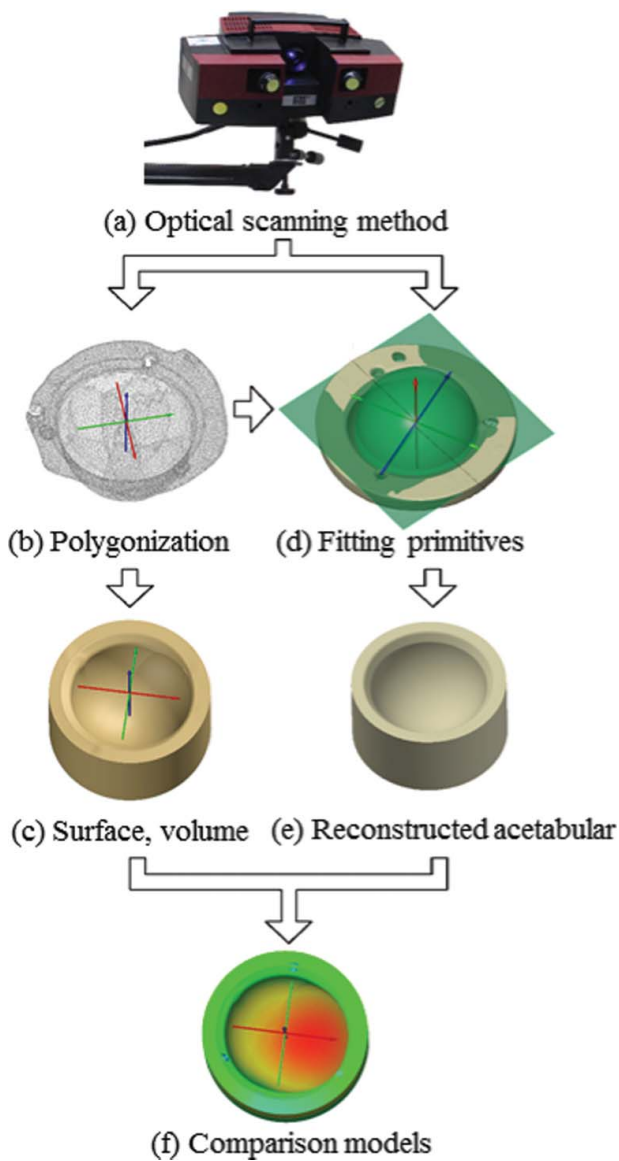


Figure 6. Process of evaluation of volumetric wear.

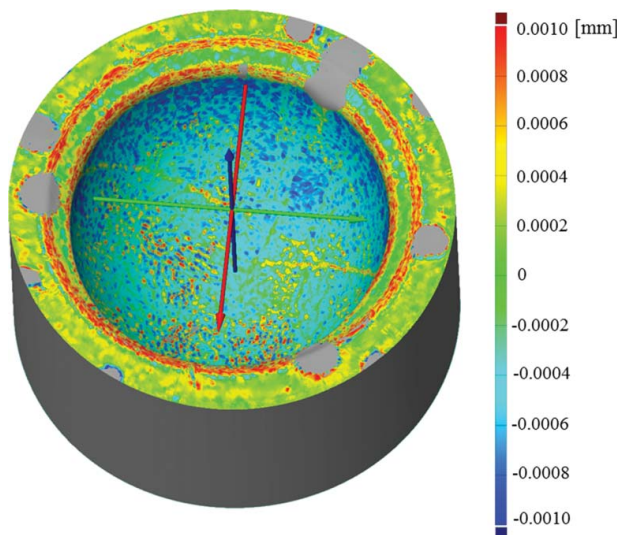


Figure 7. Comparison of 3D scan and reconstructed geometry.



Figure 8. Validation test by hip pendulum.

The sample was weighed before and after testing. In order to mount the acetabular cup on the hip pendulum, it was necessary to fix the outer rim into the epoxy resin mixture. All tests were performed with this fixation; each cup was thoroughly cleaned before weighing and scanning.

Results

Validation of 3D scanning method by gravimetric method

The material loss of the cups was measured in six cycles using both the gravimetric and 3D optical methods. Each cycle lasted 15 min and the process was replicated on three cups. Validation results are shown in Figs. 9a–9c. As can be seen, the mean difference between the reference gravimetric method and the optical scanning method was

- -0.0040 g (range -0.0352 to 0.0089 g) for cup 1 (Fig. 9a).
- -0.0021 g (range -0.0159 to 0.0051 g) for cup 2 (Fig. 9b).
- -0.0029 g (range -0.0286 to 0.0067 g) for cup 3 (Fig. 9c).

A significant difference in volumetric wear values measured with the gravimetric method and optical scanning method was present after the first 15-min cycle. This difference may have occurred due to the plastic deformation process. Polygonal data for each measurement were created on average from 191,500 points. This number of points ensures a high quality of surface transformation with deviations less than 0.002 mm as shown in Fig. 7. A volume calculation based on surface data was carried out using the CAD system calculation algorithm. The calculation was replicated using three independent software systems. The difference was less than 0.1 mm^3 ; hence, the deviation of the calculation algorithm is considered negligible.

In order to demonstrate the time efficiency of the method, the duration of each step in the measurement process was recorded. Results are shown in Table 4.

Analysis of extracted acetabular cups

This study analyzed 13 extracted acetabular cups using the optical scanning method based on the principle of fringe

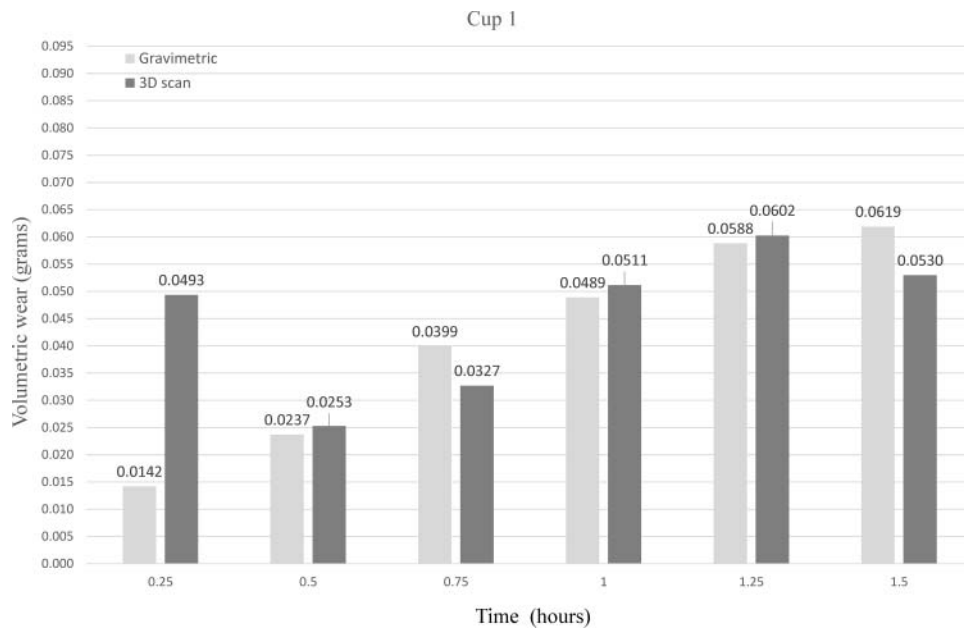


Figure 9a. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 1.

projection and triangulation. The cups were scanned using the ATOS III Triple scan to create digital representations of articulating surfaces of cups. Results of measurements and the analysis of 13 extracted UHMWPE bearing cups are shown in Table 5.

The nominal inner diameter of the extracted acetabular cups was 28 mm. The outer diameter varied; however, this had no influence on the results. Acetabular cups exhibited a mean volumetric wear of 395.53 mm³ (range = 51.80–1,119.70 mm³). The mean wear rate was 44.37 mm³/year (range = 9.98–125.85 mm³, SD = 32.45 mm³). Each measurement was replicated twice in order to eliminate scanning errors. Small differences between the measurements had no impact on quantification of volumetric wear. This can be supported by the

repeatability analysis of measurement. The results were supported by a study of survival of replacements produced by Bicon-plus where the mean linear wear of the Bicon-plus PE was 1.8 mm, which corresponds to 0.12 mm/year (Ottink, et al. (28)). Another study validates the results of the scanning method with a widely used radiographic method where the volumetric wear of the failed replacement ranged from 730 to 813 mm³ (Ilchmann, et al. (29)).

A new acetabular cup produced by the same producer as the extracted cups (Endoplus GmbH) was used as a reference sample for repeatability of the optical scanning method. Results of the repeatability test are shown in the graph below (Fig. 10). Repeatability was evaluated on the basis of the software-determined value of the inner diameter using the best-fit function.

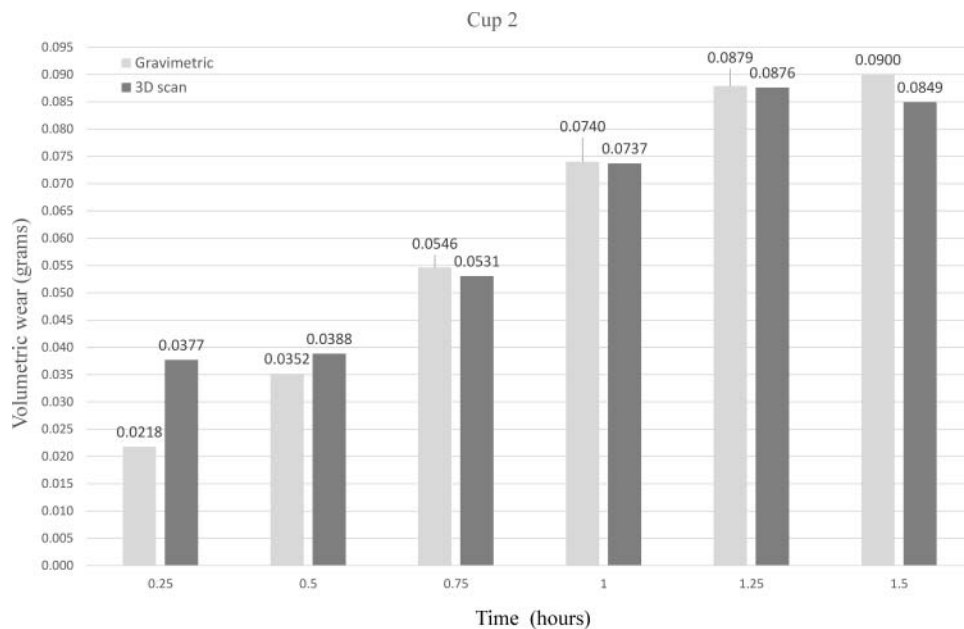


Figure 9b. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 2.

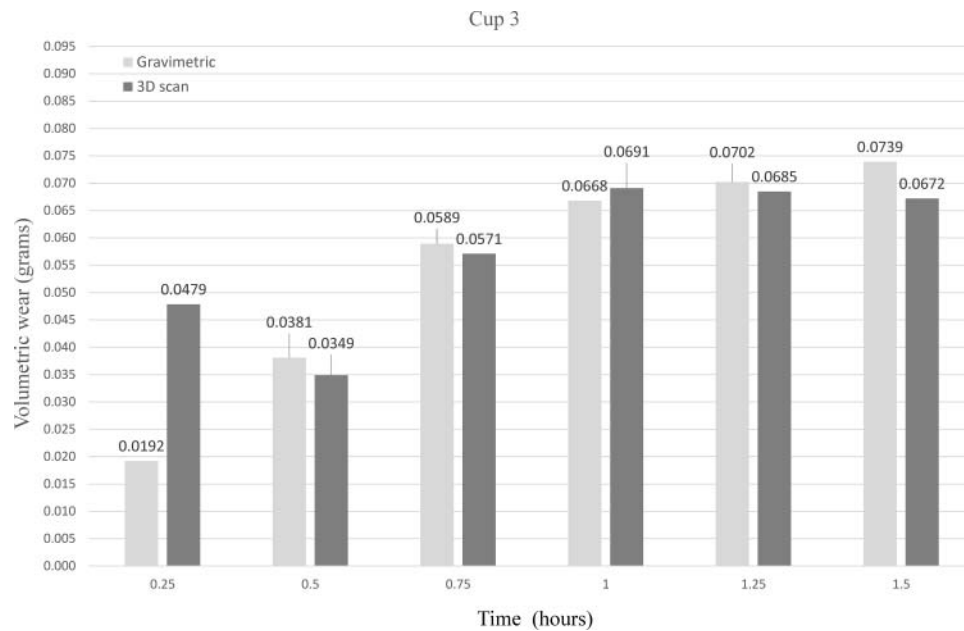


Figure 9c. Comparison of validation test results of 3D scan and gravimetric method—Cup 3.

The method was set to the Gaussian statistic method using point filtration three sigma. Measurements were replicated 10 times. Results of measurement were obtained only from the articulating surface; the rim and the outer diameter were not taken into account when determining the volumetric wear. Roughness and roundness of the measured object were neglected. The mean variation of the inner diameter was 0.005 mm (range = 28.624–28.643 mm, SD = 0.005 mm).

Discussion

The results show that the 3D optical method is suitable for measuring the THR wear of PE acetabular cups and thus it represents an effective alternative to the CMM method, which has, in some cases, reached the limits of its use.

One of the major limitations of the CMM method is a limited number of measured points collected for designing the geometry. Collecting a larger number of surface points using the CMM method is relatively time consuming. However, larger numbers of collected points are crucial for credible reconstruction of the unworn geometry and hence for a more precise analysis of wear. Previous studies showed that the mesh definition and performance of the meshing algorithms can significantly influence the obtained results (Bills, et al. (6); Lord, et al. (12); Carmignato, et al. (30)).

Table 4. Time efficiency of scanning method.

Operation	Approximate time (min)
Cleaning of acetabular cup	10
Application of titanium coating	15
Placement of a reference points	10
Scanning process	12
Polygonization	5
Repair of geometry	10 (depends on rate of damage)
Transformation on surface	20
Transformation on volume	8
Total	90

This limitation of the CMM method can be solved by the optical scanning method, which allows for collecting a larger number of points in a shorter time. Approximately 191,500 points collected on a single 28-mm acetabular cup can help to create a better surface visualisation. The resulting close point spacing solves the problem of curvature of the elements (Lu and McKellop (31)) and the problems related to the latitudinal and longitudinal mesh pattern (Bills, et al. (6)). Moreover, the ability to produce fully three-dimensional wear contours allows us to locate the wear scar with high reliability. The direction of the wear scar helps to define the unworn area of the acetabular cup. A right selection of points in the unworn area can then have a significant influence on the obtained result.

It is therefore important to carefully select the measured points of the unworn area to create the original geometry and to define the diameter. One of the options is to use GOM Inspect software. This approach was used in this study, taking advantage of compatibility of the results with the CAD software for further analysis. Another option is to use a fitting histogram for a precise selection of the unworn area points (Uddin (24)).

Table 5. Quantification of volumetric wear explanted acetabular cup.

Patient	Duration (months)	Size of implants	Type of implant	Material loss (mm ³)	Material loss per year (mm ³)
1	145	4/28	PE insert standard	1,119.7	92.66
2	126	5/28	PE insert standard	528.97	50.38
3	120	4/28	PE insert antiluxation	99.81	9.98
4	131.5	4/28	PE insert standard	752.01	68.63
5	75	6/28	PE insert standard	170.98	27.36
6	48.5	4/28	PE insert standard	162.63	40.24
7	89.5	5/28	PE insert standard	299.66	40.18
8	92.2	4/28	PE insert antiluxation	966.92	125.84
9	164	3/28	PE insert standard	584.86	42.80
10	536	5/28	PE insert antiluxation	69.46	15.55
11	61.9	4/28	PE insert antiluxation	152.98	29.66
12	43	7/28	PE insert standard	51.80	14.46
13	114.6	4/28	PE insert standard	182.05	19.06

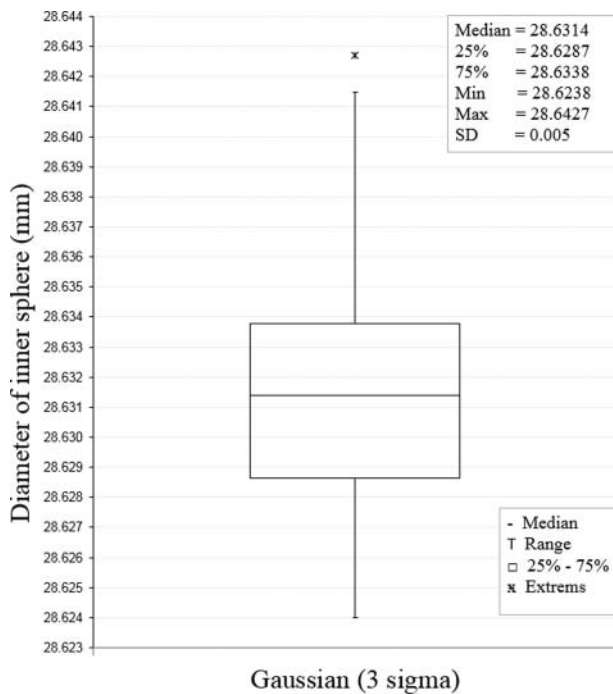


Figure 10. Repeatability of 3D scanning measurement.

Another advantage of the optical 3D method is the ability to define the wear vector on the basis of decentration of the worn region position against the original, software-generated geometry (Fig. 5). Parameters of the resulting wear vector can be then compared with the results obtained by medical methods (Dai, et al. (32)).

Data collected through the optical scanning method can be also suitable as input parameters for finite element prediction models (Uddin and Zhang (33)).

Despite the clear advantages of the optical scanning method, this method poses some challenges and limitations. The main limitation is the precision of the optical 3D scanner, which was established by repeatability of the measurement and parameters of the device. The optical scanning precision as established for the purposes of this study did not reach the levels of accuracy of the CMM method. The maximum accuracy of CMM is approximately $\pm 1 \mu\text{m}$. An evaluation of measurement method uncertainty, following ISO/IEC98-3 (34), is fundamental for both establishing a metrological traceability and allowing a proper comparison to the reference gravimetric method. The CMM method finds its application for the analysis of small amounts of material loss. Therefore, it is often used for metal femoral heads, which have a wear rate of approximately 1–40 mm³ (Bills, et al. (6); Lu and McKellop (31)). The method of measurement is defined by standard ISO 14242-2 (5).

The lower precision of the optical scanning method makes the method inadequate for the analysis of hard components. On the other hand, the accuracy of the optical scanning method is fully acceptable when it comes to the analysis of PE components.

When evaluating the quantitative wear of PE acetabular cups by volume loss, it is also necessary to consider the cold flow phenomenon. This process takes place in the first few months of implant use and results in plastic deformation of PE cup

without generation of wear debris (McKellop (35)). This phenomenon and effect of radial clearance of hard prostheses can be analyzed and specified by the finite element method (Shankar and Nithyaprakash (36)).

The analysis of PE components using the optical scanning method poses the problem of the correct selection of the unworn area of the components, which is important for further reconstruction of the original geometry as stated above. The optical scanning method takes into account neither the problem of the surface roughness nor the problem of nonsphericity of the cups. This issue is particularly evident in the initial phases after implanting the acetabulum when the material loss is relatively low as simulated during the first cycle of our validation, where there was a significant difference in volumetric wear values measured with the gravimetric method and optical scanning method, probably due to the plastic deformation process.

Because there is a wide selection of THRs on the market, some cups are nonspherical in their original geometry as produced by the manufacturers; other cups are originally spherical but can be deformed later. Nonsphericity of the cups is one of the limitations of the presented method and opens up the possibilities for further research aimed at developing an evaluation algorithm to correct the manufacturing tolerance and the nonspherical shape of the cup.

Despite these shortcomings, the 3D optical method is a fast and effective measurement method that simplifies further data processing. It is particularly suitable for the analysis of PE acetabular cups where the volumetric wear is more significant than in the case of metal and ceramic bearing components.

Conclusion

This article presents a new method of determining volumetric wear using an optical 3D scanner. This method was demonstrated on 13 extracted UHMWPE acetabular cups with various ranges of wear.

The study consists of three parts: (1) description of the optical method used for volumetric wear analysis, (2) validation of the methodology, and (3) application of methodology on the extracted acetabular cups.

1. The optical 3D scanner was used to investigate the volume loss of an acetabular cup. This method is less time consuming than the conventionally used CMM method. Another advantage of the method is the ability to develop a complex geometry built on a large number of points. This approach enables us to reconstruct the most accurate original geometry. A comparison of the extracted cup scans with models of their original geometry reconstructed on the basis of these scans can determine the volumetric wear for PE acetabular cups with satisfying results. The obtained data can be further processed by CAD software.
2. The optical scanning method was validated with the gravimetric method as defined by the standard ISO 14242-2 (5). The mean difference between the methods in quantifying the volume for three cups was -0.0040 , -0.0021 , and -0.0029 g. Repeatability of the scanning method was 0.005 mm on the evaluated diameter.

3. This method was demonstrated on a series of 13 extracted UHMWPE acetabular cups with known clinical history. Here, all components showed volumetric wear that exceeds the uncertainty of measurement. This method allows for an efficient analysis of acetabular cups.

Basically, there are contact and noncontact methods of volumetric wear measurement. Selection of the most suitable wear measurement method usually depends on various characteristics of the measured samples. This article introduces a new optical scanning method using the ATOS Triple Scan and evaluates its advantages and disadvantages in the context of the conventional CMM method.

Previous research shows that CMM enables more accurate measurements suitable for metal and ceramic components. This article suggests that the scanning method enables more efficient data collection and a more variable geometry processing, which is particularly useful for PE extracted acetabular cups.

Acknowledgements

The authors thank A. Příkryl for optical scanning of acetabular cups and V. Trulíková for help with editing the article.

Funding

This research was carried out under the project NETME CENTRE PLUS (LO1202) with financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports under the National Sustainability Programme I. This research was also supported by the project “The Influence of Joint Fluid Composition on Formation of Lubricating Film in THA” (NT/14267-3/2013) financed by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- (1) Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., and Halpern, M. (2007), “Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, **89**(4), pp 780–785.
- (2) Gallo, J., Goodman, S. B., Konttinen, Y. T., and Raska, M. (2013), “Particle Disease: Biologic Mechanisms of Periprosthetic Osteolysis in Total Hip Arthroplasty,” *Innate Immunity*, **19**(2), pp 213–224.
- (3) Patel, A., Pavlou, G., Mujica-Mota, R. E., and Toms, A. D. (2015), “The Epidemiology of Revision Total Knee and Hip Arthroplasty in England and Wales: A Comparative Analysis with Projections for the United States. A Study Using the National Joint Registry Dataset,” *Bone & Joint*, **97**(8), pp 1076–1081.
- (4) Affatato, S., Zavalloni, M., Taddei, P., Di Foggia, M., Fagnano, C., and Viceconti, M. (2008), “Comparative Study on the Wear Behaviour of Different Conventional and Cross-Linked Polyethylenes for Total Hip Replacement,” *Tribology International*, **41**(8), pp 813–822.
- (5) International Organization for Standardization (ISO) 14242-2. (2000), “Implants for Surgery—Wear of Total Hip-Joint Prostheses,” Geneva, Switzerland.
- (6) Bills, P. J., Racasan, R., Underwood, R. J., Cann, P., Skinner, J., Hart, A. J., Jiang, X., and Blunt, L. (2012), “Volumetric Wear Assessment of Retrieved Metal-on-Metal Hip Prostheses and the Impact of Measurement Uncertainty,” *Wear*, **274–275**, pp 212–219.
- (7) Bills, P., Blunt, L., and Jiang, X. (2007), “Development of a Technique for Accurately Determining Clinical Wear in Explanted Total Hip Replacements,” *Wear*, **263**(7–12), pp 1133–1137.
- (8) Martell, J. M., Leopold, S. S., and Liu, X. L. (2000), “The Effect of Joint Loading on Acetabular Wear Measurement in Total Hip Arthroplasty,” *Journal of Arthroplasty*, **15**(4), pp 512–518.
- (9) Kothari, M., Bartel, D. L., and Booker, J. F. (1996), “Surface Geometry of Retrieved McKee-Farrar Total Hip Replacements,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **329**, pp S141–S147.
- (10) International Organization for Standardization (ISO) 10360-2. (2009), “Geometrical Product Specifications (GPS)—Acceptance and Reverification Tests for Coordinate Measuring Machines (CMM),” Geneva, Switzerland.
- (11) Becker, A. and Dirix, Y. (2009), “Wear Measurements on Retrieved Metal-on-Metal Bearings: A High Accuracy 3D Measurement Approach,” *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, Poster No. 2270, Smith & Nephew Orthopaedics AG: Aarau, Switzerland.
- (12) Lord, J. K., Langton, D. J., Nargol, A. V. F., and Joyce, T. J. (2011), “Volumetric Wear Assessment of Failed Metal-on-Metal Hip Resurfacing Prostheses,” *Wear*, **272**(1), pp 79–87.
- (13) Rossler, T., Mandat, D., Gallo, J., Hrabovsky, M., Pochmon, M., and Havranek, V. (2009), “Optical 3D Methods for Measurement of Prosthetic Wear of Total Hip Arthroplasty: Principles, Verification and Results,” *Optics Express*, **17**(15), pp 12723–12730.
- (14) Pochmon, M., Rossler, T., Mandat, D., Gallo, J., and Hrabovsky, M. (2007), “Verification of Abrasion Measurement of Juncture Implants Using Fourier Profilometry,” *15th Czech-Polish-Slovak conference on Wave and Quantum Aspect of Contemporary Optics*, 9780819467485, p. 6609.
- (15) Zou, L., Samarawickrama, D. Y. D., Jovanovski, V., and Shelton, J. C. (2001), “Measurements of Sequential Impressions of Acetabula Cups from a Total Hip Joint Replacement Using a Non-Contact Measurement System,” *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, **41**(13–14), pp 2023–2030.
- (16) Yun, H. H., Shon, W. Y., Yoon, J. R., Yang, J.-H., and Lim, D.-S. (2012), “Reliability of a PowerPoint Method for Wear Measurement After Total Hip Arthroplasty: A Retrieval Study Using 3-Dimensional Laser Scanning,” *The Journal of Arthroplasty*, **27**(8), pp 1530–1537.
- (17) Dougherty, P. S. M., Srivastava, G., Onler, R., Ozdoganlar, O. B., and Higgs, C. F., III. (2015), “Lubrication Enhancement for UHMWPE Sliding Contacts through Surface Texturing,” *Tribology Transactions*, **58**(1), pp 79–86.
- (18) Choudhury, D., Ghosh, S., Ali, F., Vrbka, M., Hartl, M., and Krupka, I. (2015), “The Influence of Surface Modification on Friction and Lubrication Mechanism under a Bovine Serum Lubricated Condition,” *Tribology Transactions*, **59**, pp 1–28.
- (19) Milosev, I., Kovac, S., Trebse, R., Levasic, V., and Pisot, V. (2012), “Comparison of Ten-Year Survivorship of Hip Prostheses with Use of Conventional Polyethylene, Metal-on-Metal, or Ceramic-on-Ceramic Bearings,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, **94**(19), pp 1756–1763.
- (20) Williams, P. A., Yamamoto, K., Masaoka, T., Oonishi, H., and Clarke, I. C. (2007), “Highly Crosslinked Polyethylenes in Hip Replacements: Improved Wear Performance or Paradox?,” *Tribology Transactions*, **50**(2), pp 277–290.
- (21) GOM mbH. Available at: <http://www.gom.com/metrology-systems/3d-scanner.html>. (accessed October 16, 2015).
- (22) VDI/VDE2634-3. (2008), “Optical 3D-Measuring Systems-Multiple view systems based on area scanning,” Fachbereich Fertigungsmesstechnik: Dusseldorf, Germany.
- (23) Palousek, D., Omasta, M., Koutny, D., Bednar, J., Koutecky, T., and Dokoupil, F. (2015), “Effect of Matte Coating on 3D Optical Measurement Accuracy,” *Optical Materials*, **40**, pp 1–9.
- (24) Uddin, M. S. (2014), “Wear Measurement and Assessment of Explanted Cross-Linked PE Acetabular Cups Using a CMM,” *Tribology Transactions*, **57**(5), pp 767–777.
- (25) McKellop, H. A., Campbell, P., Park, S. H., Schmalzried, T. P., Grigoris, P., Amstutz, H. C., and Sarmiento, A. (1995), “The Origin of Submicron Polyethylene Wear Debris in Total Hip-Arthroplasty,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **311**, pp 3–20.
- (26) Vrbka, M., Nečas, D., Hartl, M., Krupka, I., Urban, F., and Gallo, J. (2015), “Visualization of Lubricating Films between Artificial Head and Cup with Respect to Real Geometry,” *Biotribology*, **1–2**, pp 61–65.
- (27) Dumbleton, J. H., Manley, M. T., and Edidin, A. A. (2002), “A Literature Review of the Association between Wear Rate and Osteolysis in Total Hip Arthroplasty,” *Journal of Arthroplasty*, **17**(5), pp 649–661.

- (28) Ottink, K., Barnaart, L., Westerbeek, R., van Kampen, K., Bulstra, S., and van Jonbergen, H. P. (2015), "Survival, Clinical and Radiological Outcome of the Zweymuller SL/Bicon-Plus Total Hip Arthroplasty: A 15-Year Follow-Up Study," *Hip International*, **25**(3), pp 204–208.
- (29) Ilchmann, T., Lüem, M., Pannhorst, S., and Clauss, M. (2012), "Acetabular Polyethylene Wear Volume after Hip Replacement: Reliability of Volume Calculations from Plain Radiographs," *Wear*, **282–283**, pp 69–75.
- (30) Carmignato, S., Spinelli, M., Affatato, S., and Savio, E. (2011), "Uncertainty Evaluation of Volumetric Wear Assessment from Coordinate Measurements of Ceramic Hip Joint Prostheses," *Wear*, **270** (9–10), pp 584–590.
- (31) Lu, Z. and McKellop, H. A. (2014), "Accuracy of Methods for Calculating Volumetric Wear from Coordinate Measuring Machine Data of Retrieved Metal-on-Metal Hip Joint Implants," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers - Part H: Journal of Engineering in Medicine*, **228**(3), pp 237–249.
- (32) Dai, X. S., Omori, H., Okumura, Y., Ando, M., Oki, H., Hashimoto, N., and Baba, H. (2000), "Serial Measurement of Polyethylene Wear of Well-Fixed Cementless Metal-Backed Acetabular Component in Total Hip Arthroplasty: An over 10 Year Follow-Up Study," *Artificial Organs*, **24**(9), pp 746–751.
- (33) Uddin, M. S. and Zhang, L. C. (2013), "Predicting the Wear of Hard-on-Hard Hip Joint Prostheses," *Wear*, **301**(1–2), pp 192–200.
- (34) International Organization for Standardization (ISO)/IEC98-3. (2008), "Uncertainty of Measurement," Geneva, Switzerland.
- (35) McKellop, H. A. (2007), "The Lexicon of Polyethylene Wear in Artificial Joints," *Biomaterials*, **28**(34), pp 5049–5057.
- (36) Shankar, S. and Nithyaprakash, R. (2014), "Effect of Radial Clearance on Wear and Contact Pressure of Hard-on-Hard Hip Prostheses Using Finite Element Concepts," *Tribology Transactions*, **57**(5), pp 814–820.

Review

Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection

Jiri Gallo ^{1,*}, Ales Panacek ², Robert Pucek ², Eva Kriegova ³, Sarka Hradilova ², Martin Hobza ¹ and Martin Holinka ¹

¹ Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, I. P. Pavlova 6, Olomouc 779 00, Czech Republic; martin.hobza@gmail.com (M.H.); mholinka@seznam.cz (M.H.)

² Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, Czech Republic; ales.panacek@upol.cz (A.P.); robert.pucek@upol.cz (R.P.); sarka.hradilova@upol.cz (S.H.)

³ Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, Olomouc 779 00, Czech Republic; eva.kriegova@email.cz

* Correspondence: jiri.gallo@volny.cz; Tel.: +420-588-443-548

Academic Editor: Fernão D. Magalhães

Received: 31 March 2016; Accepted: 27 April 2016; Published: 5 May 2016

Abstract: Prosthetic joint infection (PJI) is a feared complication of total joint arthroplasty associated with increased morbidity and mortality. There is a growing body of evidence that bacterial colonization and biofilm formation are critical pathogenic events in PJI. Thus, the choice of biomaterials for implanted prostheses and their surface modifications may significantly influence the development of PJI. Currently, silver nanoparticle (AgNP) technology is receiving much interest in the field of orthopaedics for its antimicrobial properties and a strong anti-biofilm potential. The great advantage of AgNP surface modification is a minimal release of active substances into the surrounding tissue and a long period of effectiveness. As a result, a controlled release of AgNPs could ensure antibacterial protection throughout the life of the implant. Moreover, the antibacterial effect of AgNPs may be strengthened in combination with conventional antibiotics and other antimicrobial agents. Here, our main attention is devoted to general guidelines for the design of antibacterial biomaterials protected by AgNPs, its benefits, side effects and future perspectives in PJI prevention.

Keywords: prosthetic joint infection; biomaterial-associated infection; anti-adhesive; anti-biofilm; antibacterial surface treatment; silver nanocoating; silver nanoparticles

1. Introduction

Prosthetic joint infection (PJI) is a feared complication of modern orthopaedic surgery that substantially increases morbidity and even mortality following total joint arthroplasty (TJA) [1,2]. Generally, PJI leads to implant removal and long-term antibiotic therapy with a permanent, increased risk for PJI development in affected patients [3].

Current estimates suggest that up to 3% of primary hip and knee arthroplasties [4], up to 15.4% of revision hip and 25% of knee arthroplasties are complicated by PJI respectively [5]. According to some authors, these numbers are not only underestimated but they are also on the rise [6]. The annual cost of infected revisions in hospitals of the United States of America (USA) could increase from \$566 million in 2009 to \$1.62 billion by 2020 [7]. As a result, therapy of PJI continues to be associated with enormous costs.

The first postoperative months are the most typical period of PJI manifestation [8] with the incidence rate of late PJI in hip and knee arthroplasty at about 0.07% per prosthesis-year and a higher risk in knee arthroplasties when compared to hip [9].

The leading causes of PJIs are *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci followed by streptococci and enterococci (all of these account for approximately 10% of PJI cases) [10,11]. Importantly, the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in PJI is increasing, especially in the USA [12]. In addition, polymicrobial infections can occur in up to 15% of cases [13] despite the fact that some authors reported a substantial increase in the yearly occurrence of polymicrobial infections over the period of six years (2004 to 2010) with a greater increase in the proportion of gram-negative bacteria during the same period [14].

2. Pathogenesis of PJI

The distribution of PJI in time strongly points to the causative link towards surgery and the early postoperative period. A basic prerequisite for PJI development is the size of the bacterial load influencing the operating wound, immune response and the implant. The last two decades were under strong dominance of Gristina's concept of "race for the surface" [15]. Accordingly, host and bacterial cells compete in determining the ultimate fate of the implant, when host cells colonize the implant surface first, the probability of attachment of bacterial cells is very low and vice versa. However, Gristina's model is not able to predict PJI in "less clear" situations when the host cell coverage of an implant surface is incomplete and thus offering some places for bacteria adhesion. In addition, some prosthetic surfaces, either articulating or non-articulating, preclude host cell adhesion and development of a protective host film. This model can also be criticized for static conditions because fluid waves occurring many times per hour are typical for TJA. Finally, immune and host tissue responses contribute to the protection of an implant surface to a greater extent than only in terms of simple mechanistic competition for an implant surface. Despite the fact that not all the critical pathogen and host steps/factors have been elucidated to date [16], for instance an infection dose no doubt plays an important role. A higher bacterial load of *S. aureus* could alter the host immune response and accelerate biofilm formation [17] while a low level of "appropriate" bacterial contamination might even serve as a potent immunomodulatory factor preventing the development of PJI ("implant infection paradox") [18]. Some evidence also suggests the role of genetic susceptibility [19,20]. Taken together, instead of Gristina's metaphor, a specific local immunologic and tissue constellation type of pathogen as well as bacterial load interplay with each other and influence the implant-tissue interactions, either towards non-infective or infective statuses.

The most destabilizing factor is the basic yet highly successful survival strategy of bacteria in general: their ability to adhere and survive on virtually all natural and synthetic surfaces (Figure 1) [21,22]. The bacterial cell membrane contains various types of adhesins for a wide range of biomaterial surface receptor sites, members of the family of Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) [23]. Environmental and surface characteristics of a biomaterial such as surface roughness, hydrophobicity and electrostatic charge play only conditional roles [24]. A reservoir of receptors for bacterial adhesive ligands mediating adhesion of free-floating bacteria to the surface of the biomaterial, offers a conditional protein film covering the implant immediately after its placement into the host body [25]. The spectrum of binding molecules depends at least partly on the particular type of biomaterials attracting an exact set of host proteins and lipids [26–28].

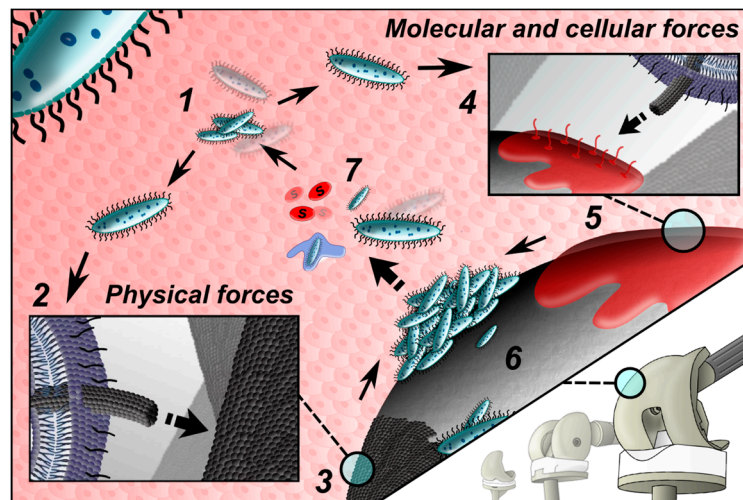


Figure 1. Free-floating bacteria (1) come close to the implant surface, here they interact via a set of chemical and physical mechanisms with a biomaterial surface covered by host cells/proteins. The majority of bacterial pathogens express specific surface adhesion molecules called adhesins (bacteria may have multiple adhesins for different surfaces); bacterial adhesion can be described as having an initial reversible, predominantly physically driven phase (2) and a time-dependent and irreversible molecular and cellular phase (4). The former is realized by Brownian motion, van der Waals attraction forces, gravitational forces, surface electrostatic charge and hydrophobic interactions (3); the latter employs a selective bridging function of bacterial surface polymeric structures, which include capsules, fimbriae or pili and slime; intermolecular interactions are facilitated by a protein film covering an implant immediately after its placement into the host body (5). Firm sticking of bacteria to the biomaterial surface allows them to create colonies (6) with biofilm formation, which is associated with a continuous release of free floating bacteria and signaling molecules (7).

Conceptually, the process of bacterial adhesion can be divided into two basic phases: reversible, and irreversible [29,30]. The former is mechanically and biologically less stable than the latter. The explanation lies partly in the origin of nonspecific interactions between the implant surface characteristics and bacterial surface adhesins, followed by molecular and cellular interactions closely associated with expression of biofilm specific gene clusters in reversibly attached bacteria [31]. At least four distinct classes of surface proteins have been identified to participate on firm adhesion of *S. aureus* micro-colonies to a biomaterial and to each other [32]. The adhesion phase is followed by gene expression for secretion of protective slime. This process makes bacteria extremely resistant to both the host immune system and antibiotic diffusion [30,33]. The transition between the reversible and irreversible phases of biofilm formation coupled with a phenotypical change, is the last window of opportunity for clinically reasonable preventative measures. Other parameters of biofilm formation are described in detail elsewhere [34], as well as the ability of bacteria to combine different pathogenic strategies [35].

In the host site, the details of tissue integration of a biomaterial are still poorly understood [36,37]. It is believed that immune as well as tissue resident cells recognize an implant surface and orchestrate the processes, leading to periprosthetic bone/soft-tissue regeneration and remodeling, preventing the development of biofilm in the majority of patients [38,39]. However, neither osseointegration nor fibrous tissue encapsulation of large non-fixation parts of an implant can eliminate long-term survivorship of bacterial micro-colonies. Moreover, the peri-implant fibrous barrier impedes contact between the host immunity sentinel cells and bacterial molecules. This interaction is critical for host immune responses dependent on recognition of bacterial pattern-recognition receptors (PRRs; also microbe associated molecular patterns = MAMPs). Importantly, it has been demonstrated

that implantation of a medical device impairs the innate local host response and may facilitate the development of PJI [40,41].

As the majority of operating rooms are contaminated within the first few hours of service [42,43], most surgeries are not performed in a bacterial-free environment. All patients are exposed to the same environment within a particular operating room. The question therefore arises as to why some patients go on to have infections and others do not. There is a growing body of evidence that PJI results from a relatively unclear and perhaps unique combination of environmental and genetic factors. The environmental ones could be linked to immune and non-immune factors affecting host response to bacterial load (age, gender, malnutrition, weight, diabetes mellitus, smoking *etc.*); the factors related specifically to implant facilitating for instance, adhesion of bacteria and those related to the surgeon and surgery (operating skills, operating room parameters, surgical time *etc.*). The host genetics strongly influences an individual's susceptibility to infectious diseases and there is some evidence available for genetic susceptibility to PJI [19].

As a result, there is a strong need for intrinsic implant surface antibacterial functionality that can protect the implant surface from a perioperative attack of pathogenic bacteria as well as help to overcome implant-induced defects in the local immune response.

3. Rationale and Basic Concepts of PJI Prevention

Strategies relying on a decreased bacterial load and creating a bacteria-free environment around an implant during the perioperative period are widely implemented in clinical practice [44,45]. There is sufficient evidence supporting systemic [46] and in some cases local *antibiotic prophylaxis* [47]. However, the optimal protocol for individual clinical situations is not known yet. At present, antibiotics are administered to all the patients undergoing TJA regardless of the individual risk for PJI development, at least in terms of the beginning, the type of antibiotic and the duration of antibiotic prophylaxis. With regard to the latter, the 24 h regime does not cover the time needed for early wound stabilization, or the period of time the suction drain is in contact with joint and deep tissues. In addition, the increasing occurrence of antibiotic resistance has been recognized to be a global problem. There is also some evidence for selecting antibiotic-resistant staphylococci in relation to wide-range antibiotic prophylaxis [48].

Attempts at formulating evidence-based standards for good clinical and logistic practice in orthopaedic *operating rooms* have been made [45,49]. There is a growing pressure on surgeons to improve their surgical skills in order to minimize the surgery-related factors. Educational programs aimed at educating/training orthopaedic surgeons (and all staff) in perioperative strategies of PJI prevention are under way [50].

Finally, strategies based on *identification of risk patients and optimization of their conditions* to decrease the probability of PJI development have been proposed. Even though modifiable PJI risk factors have been identified and well-described [50,51], it is often not possible to avoid operating "risk" patients who are not "optimized". For instance, significant obesity precluded the indication for total hip or knee arthroplasty in some countries several years ago. However, it is unethical to reject surgery in these patients today, despite the fact that they have an increased risk for PJI [52]. Research testing is assessing whether the risk for PJI could be decreased after preoperative immunization of the patients at-risk, by a vaccine that targets either the most frequent pathogen as *S. aureus*, or the key molecules of bacterial adhesion and biofilm formation [53].

Taking into account the weaknesses associated with all the current preventative strategies, leaders in the field recommend a multistep preventative concept (Figure 2) covering simultaneously all the well-known targets, including the "anti-infective implant" [54–56].

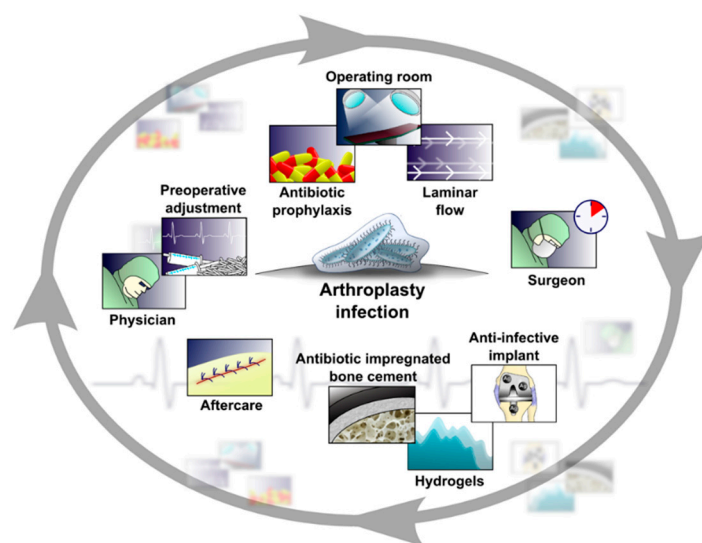


Figure 2. Prevention of PJI consists of a list of measurements optimizing host status/preparedness for surgery (identification of host risk factors, determination of host comorbidities; local antibacterial activities); reducing bacterial load during the surgery (intravenous antibiotic prophylaxis, operating room environment/traffic/management, surgical experience, measurements/tools preventing deliberation of bacteria from the surgeon/operating room personnel, protection of the implant from bacterial contamination/adhesion) and minimizing the chance for postoperative bacterial contamination (wound care strategy, rapid optimization of postoperative immune and metabolic conditions, early ambulance, experienced physiotherapy, eradication of local infections and haematogenous sources of bacteria).

4. Indications for Implants with Antibacterial Surface Treatment

In accordance with the evidence-based medical rules, it would be relevant to calculate the number of PJIs prevented, by usage of implants with an antibacterial surface. Theoretically, all the patients undergoing TJA are at risk for PJI. Revision cases carry an increased risk, partly due to the prolonged operating time during revision surgeries, in conjunction with a suboptimal local tissue environment [57]. Moreover, there is some evidence that the risk of PJI across the board in orthopaedic surgery, is on the rise [6]. As a result, one could argue that all patients should benefit from implants coated with a proven anti-infective surface. On the other hand, the risk for PJI is not homogeneously distributed among arthroplasty patients [50]. Therefore, it might be convincing to implant “biofilm resistant” prostheses only in patients at an increased risk of PJI [51,58]. However, a validated tool for screening patients for an increased risk of PJI does not currently exist. Taken together, the preventative strategy involving all the patients undergoing primary and revision TJA seems to be more justifiable than a more restrictive approach targeting the high-risk patients. However, prior to implementation of such devices, it is necessary to demonstrate the significant reduction of PJI in a well-done, population-based, cost-benefit analysis [38]. An important consideration in designing implants with antibacterial coating relates to the characterization of reasonable and justifiable costs.

5. Recommendations for Construction of Implants with Anti-Infective Surfaces

A wide spectrum of substances and technological approaches has been proposed and tested for antibacterial features in orthopaedics (Table 1). In order to fully discuss and evaluate surface treatment technologies it is essential to review the strict criteria related generally to the process of innovation in this field. The requested parameters are as follows:

1. **biocompatibility** (the ability of a material to work efficiently with an appropriate host response in specific applications) [59];

2. **strong evidence of anti-infective efficiency** (the anti-bacterial efficiency should be demonstrated *in vitro*, *in vivo* and also in an appropriate model of PJI) [60–62];
3. **fixation properties cannot be compromised** (the antibacterial coating must not compromise long-term stable implant osseointegration or cement fixation);
4. **durability of the anti-infective effect** (while clear recommendations are lacking the epidemiological viewpoint suggests that at least two years would be appreciated) [63,64];
5. **mechanical characteristics of the antibacterial coating** (resistance to mechanical stresses and strains either during surgery or postoperatively) [65].

Table 1. Examples of anti-infective strategies proposed for treating of surfaces used in orthopaedic implants.

Strategy	Features	Examples	References
Prevention in adhesion and adsorption		Anti-adhesive polymers	[66–68]
		Albumin	[69]
		Super-hydrophobic surfaces	[70–72]
		Nano-patterned surface	[73–77]
		Hydrogels	[78–81]
Methods to kill bacteria	Inorganic	Silicon nitride ceramics	[82,83]
		Silver, silver-oxide	[84–86]
		Silver nanoparticles	[87–94]
		Gold nanoparticles	[95,96]
		Titanium dioxide	[97–99]
		Selenium ions	[100–102]
		Copper ions/nanoparticles	[103,104]
		Zinc ions	[105,106]
		Iodine coating	[107]
		Bioactive glass	[108,109]
	Graphene oxide	[110,111]	
	Organic	Coated or covalently linked antibiotics	[112–116]
		Chitosan derivatives	[117–120]
Signaling, inhibiting and antimicrobial peptides		[121–123]	
Other	Cytokines	[124]	
	Enzymes	[125,126]	
Combined	Non-antibiotic bactericidal substances	[127]	
	Multilayer coating	[128–132]	
	Synergy material intensification	[133–135]	
Multi-functional and smart coating	Positively charged polymers	[136]	
	Passive	Nanostructured “smart” materials	[68,137–140]
Alternative approach	Active	Concept: sensors conjoined to nanocontainers	[141–146]
		Lytic bacteriophages	[147]
		Surface-adaptive anti-biofilm nanocarriers	[148]

Recently, a new classification of the implant-related antibacterial strategies has been proposed distinguishing:

1. **passive surface finishing/modification** (PSM);
2. **active surface finishing/modification** (ASM);
3. **perioperative antibacterial local carriers or coatings** (LCCs) [56].

If the active substance is released from the surface of the implant, over time it may lead to its exhaustion and thereby, a loss of efficiency. It is therefore extremely relevant to design surface

modifications with minimal but effective release of active substances into the surrounding tissue, thereby achieving a long, or even indefinite period of effectiveness. This approach may ensure antibacterial protection throughout the life of the implant. A specific set of problems are related to fluid dynamics and adhesion of host proteins, lipids, cells to “active” implant surfaces, limiting their antibacterial efficacy.

6. General Remarks on Prosthetic Implant Surface Modifications

Polyethylene, a modern generation of zirconia treated ceramic, stainless steel, cobalt-chrome and titanium alloys are the most commonly used materials in TJA implants. In TJA, each material/surface modification has its specific role (e.g., an articulating or a fixation surface) and can occupy a different place in the bulk implant (Figure 3). These parameters together, define the requirements for particular surface modifications in specific implant sites.

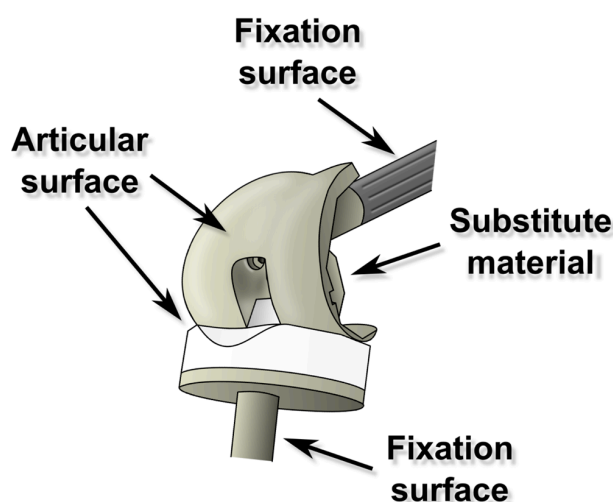


Figure 3. Total joint arthroplasty has several types of surfaces according to their locations and functions; ideally the whole implant should be covered via application of an antibacterial strategy; however, in practice the antibacterial strategy for a particular kind of surface has to respect its critical characteristics (for example the strategy for an articulating surface, let’s say a polyethylene one, has to be different from a non-articulating metallic one).

A number of principles from basic research have been proposed for translation into technologies potentially suitable for antibacterial treatment of orthopaedic implants [149]. It is easy to distinguish between technologies offering *anti-adhesive properties*, those working as *antimicrobial agents* and those *combining the above-mentioned approaches*. Anti-infective surfaces can be classified as “*contact killing*” and *antimicrobial agent eluting* respectively [150].

Antibacterial surface technologies can employ *metals* (silver, zinc, copper, zirconium *etc.*), *non-metal elements* (e.g., selenium), *organic substances* (antibiotics, anti-infective peptides, chitosan, other substances) and *their combinations*. Antibacterial activity of the majority of metal coatings is closely linked to the ionic or nano-form, rather than to the bulk material [151]. *Nanostructured surfaces and coatings* (either of inorganic or organic origin) are therefore of great interest. Consequently, the nanoscale surface patterning methods have been applied to fabricate different nanopatterns (e.g., ordered stripes, pits, pillars or squares). Several studies have demonstrated that nanopatterning in conjunction with other surface treatment can inhibit bacterial adhesion [152,153].

In terms of functionality, one may divide surfaces as *mono-functional and multi-functional*. The latter are expected to target multiple biological tasks simultaneously (Figure 4), orchestrating early/long-term tissue adaptation to an implant, facilitating osseointegration and regulating the anti-infective immune response, all in addition to the “intrinsic” antibacterial surface effect [154].

Smart surface could be a completely different methodology designed to be a self-responsive multitask micro-machine that releases antimicrobial (and other) substances, after stimulation by microbial (or other) signals [155].

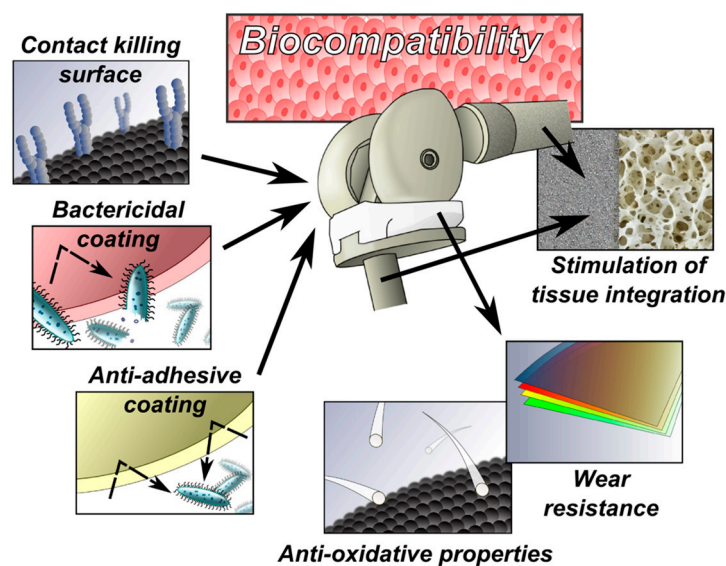


Figure 4. A particular implant surface has to address several implant-related tasks simultaneously and continuously (in the ideal case), therefore engineers have to solve the problem of how to bind (attract, fix) often contradictory functionalities via specific modifications/treatments in the particular surface location.

7. Why Silver Nanoparticle Technologies on the Implant Surfaces?

Currently, AgNP technology is receiving much interest in its use on implant surfaces, mainly for its antimicrobial properties and strong anti-biofilm potential together with relatively low cytotoxicity to mammalian cells. *AgNPs effectively inhibit the growth of bacteria* including highly resistant strains at very low concentrations in units of mg/L [92,156–162], whereas such concentrations do not exhibit an acute cytotoxic effect, which was proved at the concentrations higher than 20 mg/L [163–165].

Moreover, in the case of AgNPs, bacterial resistance has not been reported up to now, despite the fact that resistance to ionic silver has been observed. The multilevel antimicrobial (broad target attack) mode of AgNPs ensures that resistance cannot be easily acquired by single point mutations in contrast to antibiotics. Having *a very low risk of development of bacterial resistance* it is therefore relevant to know the antibacterial effects of AgNPs. This is an extremely valuable effect especially today, when we are facing growing antibacterial resistance observed in antibiotics and other antibacterial substances. Some experts even refer to the current state as to a “worldwide calamity” or “antibiotic resistance crisis”. Therefore, a joint multilevel and global interdisciplinary action including substituting antibiotics by non-antibiotic approaches could decrease the range and rate of bacterial resistance.

Moreover, AgNPs have a *strong anti-biofilm potential* [162,166–179]. Therefore, these are potentially very attractive for surface protection of orthopaedic implants since PJI is biofilm driven in the majority of clinical cases. As a result, silver is the most prevalent metal used in biomedical applications for antibacterial coating of prosthetic metal implants [180–190]. Both uncoated and coated AgNPs on various surfaces, such as titanium surfaces or catheter surfaces, thoroughly inhibit both planktonic and biofilm-forming bacteria [94,167,191,192]. Saleh *et al.* reported that biofilm and planktonic *E. coli* and *P. aeruginosa* cells showed very similar tolerance to AgNPs upon exposure [191]. Agarwala *et al.* reported high antimicrobial activity on catheters loaded with AgNPs towards planktonic as well as biofilm-forming cells [167]. Similarly, Zhong *et al.* and Harraser *et al.* reported that AgNP-loaded titanium can kill planktonic and adherent bacteria during 1, 4 and 12 days with

similar effectiveness [94,192]. On the other side, several studies showed that biofilms decreased susceptibility to AgNPs compared to planktonic cells [193,194]. Choi *et al.* found that biofilms were four times less susceptible to AgNP exposure than planktonic cells were [194]. Starch-coated NPs reduced *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilm growth but completely inactivated planktonic cells at the same AgNP concentrations [195]. It is known that both planktonic and biofilm-forming bacteria produce extracellular polymeric substances (EPS), which has been proved to lower the diffusion rate of NPs [196]. EPS production is much greater in biofilms compared to planktonic bacteria and therefore may provide some protection to biofilm-forming cells from NPs.

8. Synthesis of Silver Nanoparticles on the Implant Surface

There are several approaches to synthesize the AgNPs on the implant surface. In the study [87], TiO₂ (titanium dioxide) nanotubes (NT) on a titanium (Ti) surface were prepared by anodization of the Ti surface and consequently AgNTs were generated on the NT surface by ultraviolet reduction of silver ions. The TiO₂-NTs loaded with Ag (silver) exhibited a strong antibacterial activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, ATCC43300) *in vitro* for 30 days.

The cathodic arc silver plasma immersion ion implantation process can serve as another method of preparation and immobilization of AgNPs on a Ti surface. The immobilized AgNPs offered good defense against multiple cycles of bacteria (*S. epidermidis*) attacks *in vitro* and the mechanism was independent of silver release [197].

Also Pulse DC magnetron sputtering can be utilized for a generation of AgNPs on a Ti surface, where nanostructured Ti-Ag coatings with different Ag contents (1.2% to 21.6%) are able to kill *S. aureus* effectively during the first few days and remain moderately antibacterial after immersion for 75 days. Compared to pure Ti, the Ti-Ag coatings show good cytocompatibility as indicated by good osteoblast adhesion, proliferation, intracellular total protein synthesis and alkaline phosphatase activity [198].

AgNPs with the size of 50 nm can also be incorporated into a dopamine-modified alginate/chitosan (DAL/CHI) polyelectrolyte multilayer to modify titanium alloy surfaces. The polyelectrolyte multilayer coating enhanced wet ability of titanium alloy and promoted the fibroblast proliferation significantly, which could be attributed to the excellent biocompatibility of DAL/CHI [199]. Despite the slight fall of L929 cell activity after AgNP incorporation, AgNP-DAL/CHI multilayer inhibited the growth of both *E. coli* and *S. aureus* [199].

Hexagonal closed-packed TiO₂ nanotubes with the diameter of 30–100 nm were prepared by anodization of a Ti foil, where the size of nanotubes was dependent on the parameters of anodization [200]. The size and shape of the generated AgNPs (12–40 nm) on TiO₂ nanotubes by UV (ultraviolet) irradiation depends mainly on the size of TiO₂ nanotubes and silver ion concentration. The highest antibacterial activity was obtained for TiO₂ nanotubes with the opening diameter of about 100 nm and AgNPs with an average size of 20 nm, whereas good cell viability using osteoblast MG63 cells was remained [200]. The Ti/TiO₂ nanotubes/AgNPs composites can also be prepared with the assistance of quaternary ammonium salt (QAS, 3-trimethoxysilyl-propyldimethyloctadecyl-ammonium chloride). The Ag nanoparticle loaded and QAS coated TiO₂ nanotube substrates demonstrated long-term antibacterial effect and displayed good biocompatibility [201].

9. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles

The effects of silver, either as a metal (AgNPs) or in compounds is known to be non-specific, influencing many bacterial structures and metabolic processes at the same time (Figure 5). Among these are the following: inactivation of bacterial enzymes [202,203], disruption of bacterial metabolic processes [204–206] and the bacterial cell wall, accumulation in the cytoplasmic membrane and increase of its permeability [167,203,207], collapse the plasma membrane potential [206], interaction with DNA (deoxyribonucleic acid) [202] and generation of reactive oxygen species [208–210], which damage biomacromolecules [211]. Thanks to their multi-level mode of action, AgNPs destroy or inhibit the growth of pathogenic microorganisms including highly resistant bacterial strains at low concentrations

from a few to several tens of mg/L [92,160,162,167,175,207]. Importantly, no relevant data describing bacterial resistance to AgNPs or inactivation of antibacterial action of AgNPs (nanoparticles) have been reported yet. Bacterial resistance to silver is driven only with the ionic form of silver and apart from others, was deeply researched by Silver *et al.* [212,213]. Bacterial resistance to ionic silver originated from clinical environments [214] and also from naturally occurring strains [215]. Besides reduction of Ag⁺ to a less toxic oxidation state, the probable Ag⁺ resistance mechanism involves an active efflux from the cell, by either P-type ATPases (adenosine triphosphatase) or chemiosmotic Ag⁺/H⁺ antiporters [216–218].

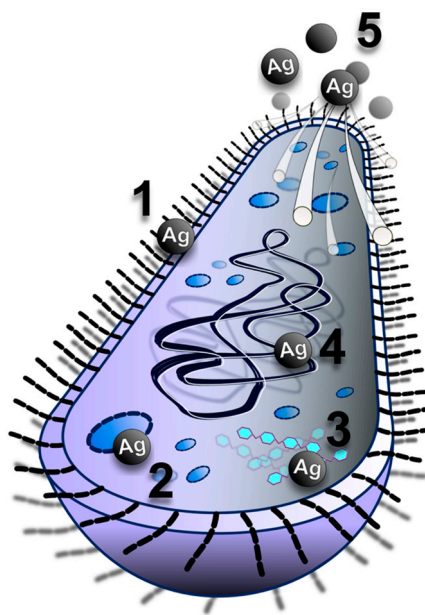


Figure 5. Silver nanoparticles simultaneously target bacteria via the destruction of their wall, inactivation of their enzymes, disrupting of critical metabolic pathways and interaction with bacterial DNA.

In recent years, a synergistic effect between AgNPs and various antibacterial agents has been investigated. Potara *et al.* studied antimicrobial activity of chitosan-coated AgNPs against two strains of *S. aureus* [219] and revealed that minimum inhibitory concentrations (MICs) of the composites were ten times lower than those of AgNPs and chitosan alone respectively. Another capping agent, myramistin increased activity of AgNPs against *E. coli* up to 20 times [220]. Combined treatments with a lactoferrin/xylitol hydrogel and silver-based wound dressings acted synergistically against the forming of biofilms of clinical wound isolates of methicillin-resistant *S. aureus* and *P. aeruginosa* [221]. Synergy of AgNPs and antimicrobial peptides polymyxin B and gramicidin S was reported also against different Gram-negative bacteria [222].

Recently several studies have indicated that AgNPs may strengthen the antibacterial effects of conventional antibiotics (beta-lactam antibiotics, macrolides, lincosamides, aminoglycosides) either additively or synergistically [223–229]. The synergistic effect of antibiotics and AgNPs was reported even at concentrations below their own effectiveness (*i.e.*, below MICs) [225,230–233]. Brown *et al.* showed a synergistic effect of AgNPs functionalized with ampicillin, even against multiple-antibiotic-resistant isolates of *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* and methicillin-resistant *S. aureus* [234]. Also Smekalova *et al.* and Panacek *et al.* proved enhancement of the antibacterial effect of antibiotics in combination with AgNPs against several animal and human pathogens and resistant bacterial strains [235–237]. These findings clearly showed that it is possible to find an effective combination of antibiotics and AgNPs or another antimicrobial with a multi-level mode of action, resulting in a synergistic antimicrobial effect allowing efficient inhibition of bacterial pathogens including

highly resistant bacterial strains using significantly lower doses as compared to an antibiotic alone. Replacement of frequently used antibiotics by AgNPs or a combination of these antibiotics with AgNPs represent a promising tool on how to kill bacteria without the development of antibiotic resistance [238].

10. Potential Side Effects of Silver Nanoparticles

The main problem by using AgNPs on biomaterials is that they are considered toxic not only for bacteria, but also to human host cells. Toxicity of silver nanoparticles to mammalian cells is considerably lower in comparison with antibacterial effective concentrations also due to the fact that eukaryotic cells have an antioxidant cellular mechanism that protects them [239,240]. The extended use of AgNPs can lead to a number of health problems from argyria [241] to silver accumulation in human liver and kidney. Although silver and its derivatives are already in clinical use, evidence of serious health problems [242] and high toxicity are rare [243].

A number of *in vitro* studies have been performed exploring the effects of AgNPs on a variety of cell types [88,239,244–253]. The most common mechanisms of toxicity from nanosized silver particles, as well as silver ions released from them [245,254] are: oxidative stress [246,255], Trojan-horse mechanisms [256,257] and DNA damage [163].

The question arises as to what determines if silver nanoparticles are toxic or not. In general, toxicity is determined by many factors, either on the side of the nanoparticles or on the side of the body that they are in contact with. Regarding nanoparticles, these are mainly size, shape [258], charge, surface modification, tendency to release ions, dose and exposure time. The role of the particle size is more important than concentration or dose [259,260] because smaller nanoparticles have a higher surface/volume ratio leading to higher oxidation and dissolution, accompanied by higher silver ion release [261]. Therefore, smaller AgNPs may show higher toxicity due to their larger specific surface area and associated faster Ag⁺ release compared to larger AgNPs [260]. However, that does not necessarily mean higher toxicity in a particular material and situation. Silver ion release is controlled by surface modification/stabilization and can be further influenced by other compounds presented in biological environment. Moreover, Ag⁺ release is also dependent on the formation of a protective oxidized silver layer that prevents full oxidation and dissolution of AgNPs [262]. Likewise, it is known that spherical nanoparticles are less toxic than wires [263] and negatively charged NPs exhibit low toxicity [264,265].

On the host side, the potential toxicity of AgNPs is determined by patient health status, routes of exposure, gender and other factors. In some organs (liver, kidney), silver is accumulated soon after application, while in others (brain, lung) higher concentrations are detected after a prolonged period [266–269]. Pauksch *et al.* [270] investigated the effect of AgNPs on human osteoblasts and it turned out that AgNPs were toxic at concentrations higher than 10 µg/g. The authors suggested that there is a gap between the toxic and antibacterial doses of AgNPs. This statement was confirmed by Necula *et al.* [271] who tested the antibacterial efficacy and toxicity towards the human osteoblastic cell line. They demonstrated that the antibacterial dose is by an order of magnitude lower than that having a toxic effect on human cells. These observations support the promising usage of presence of a therapeutically useful window for the application of AgNPs in orthopaedics.

11. Protocol for Testing of Silver Nanoparticle Coating Technologies Intended for Usage in Orthopaedics

There is no doubt that nanotreatment of biomaterial surfaces offers new opportunities for PJI prevention. On the other hand, the main obstacles preventing broader usage of such technologies are cytotoxicity and resultant decreased biocompatibility. It should be cautioned that nanotechnologies can also induce unintended inflammatory responses related to activation of immune cells such as dendritic cells, macrophages and others. Concern also exists over the mechanical properties of implant nanocoatings since damage may occur during surgical implantation, especially in cementless implants

inserted via press-fit methods. In addition, creating a coating-substrate interface robust enough to sustain the mechanical stresses involved in surgical implant insertion and ultimate loading once *in vivo* remains a challenge. Lastly, the risk of remote effects of absorbed nanosilver is still a potential problem.

Therefore, a set of *in vitro* tests (followed by *in vivo* experiments) is required to characterize in detail antibacterial efficacy, as well as biocompatibility and safety of such material modifications. The latter means to examine the cytotoxicity, cancerogenicity, interactions with osteoblasts and other cells and the potential of adverse stimulation of an immune response. As a result, specialists in nano-toxicology (esp. nano-genotoxicology, cytotoxicity, immunotoxicity), *in vitro* pharmacokinetics, pharmacodynamics and kinetics of particles are needed to collaborate in the development, preclinical testing and approval of any material modifications for clinical usage.

11.1. Demonstration of Antibacterial Efficacy

A critical step in progress lies in the demonstrating that newly developed biomaterials, or surface modifications possess antibacterial efficacy [272]. To date there is no widely accepted methodology available that could precisely and reproducibly demonstrate antibacterial behaviour of the proposed anti-infective technologies. Major criticisms are levelled at the static “closed” testing system, whereas *in vivo*, the implant has to face a dynamic, continuously changing, mechanically unstable and predominantly fluid environment [273]. As a result, the majority of studies to date have used inappropriate and insufficient protocols.

Controllable, standardized testing conditions that closely mimic the human *in vivo* environment are needed in order to overcome the aforementioned issues [273]. PJIs develop under low shear conditions and a multidirectional low-pressure fluid flow. A variety of testing tools have been proposed that attempt to simulate conditions of continuous or intermittent fluid-displacement in both the low and high shear conditions [274]. Protocols for cultivation of particular species (multispecies) biofilms under controllable, constant and reproducible conditions have been also described [275]. Finally, representative *in vitro* and *in vivo* models to test bacterial adhesion and biofilm formation on biomaterials for each particular clinical situation (*i.e.*, total joint arthroplasty, internal, external fixation) should be further developed and appropriately validated. Given the large variability of antibacterial strategies, it is likely that testing methods must be better tailored to match the specific proposed strategy at hand [150].

11.2. Testing of Cytotoxicity

Although many studies presented new nanoparticle surface treatments proving *in vitro* safety [271], others demonstrated the potential danger of such materials [276]. Nanoparticles have different effects on human health depending on the bulk material from which they have been produced [277]. In addition to the elemental composition, factors like nanoparticle dose, size, shape, exposure time and surface chemistry can affect its biological behaviour. Regarding the shape, silver nanowires showed the strongest cytotoxicity and immunological responses, whereas spherical silver particles had negligible effects on cells when tested in human cells [278]. Liu *et al.* found that 5 nm AgNPs were more toxic than 20 and 50 nm AgNPs in four cell lines (A549, HepG2, MCF-7, SGC-7901), indicating a size-dependent effect on cell viability [253]. It should be noted that some cell lines (PC-12 and NIH-3T3) exhibit greater sensitivity to AgNPs than another mammalian cell lines [279]. The rate of ion release and its variation in different media should be taken in consideration as well. All this concludes that cytotoxicity testing should be always suited exactly for the proposed implant coating (*i.e.*, exact nanoparticle size, concentration, shape, fixation method *etc.*) and its intended use in a specific tissue. In addition, a level of cytotoxicity can be dependent on the assay technique and a difference between extraction-based and direct contact assays has been found [280].

When testing new materials or surface modifications, the cytotoxicity testing is performed first and other tests (anti-bacterial, immunoreactivity *etc.*) are advanced only after the biomaterial is classified as biologically not harmful. Cytotoxicity testing is rapid, sensitive and inexpensive. Another

big advantage of cytotoxicity testing is the standardization of the procedure, ISO 10993 and the FDA (Food and Drug Administration) blue book memorandum (#G95-1) and its suitability for the testing of biomaterial from any part of the medical device (*i.e.*, TJA, internal, external fixation). This test is commonly performed using a mouse fibroblasts cell-line as target cells, following the exposure with the material (direct contact) as well as the extract of the material. Cells are very sensitive to biologically harmful extractables in certain quantities resulting in visible signs of toxicity, such as changes in cell morphology, vacuolization, or detachment. A different way of testing the nanotoxicity was described by Liu *et al.* via evaluation of induction of apoptosis [281].

Regarding novel anti-infective treatments with silver nanoparticles, a recent study reported that the BALB/c 3T3 cell line is 1000 times more sensitive for testing the toxicity of silver NPs than the *in vivo* animal models [282]. Although some studies showed a dose-dependent cytotoxic effect of nano-silver, new types of nano-silver were proven to be not cytotoxic [283], or it was shown that combination of a low amount of nano-silver with antibiotics provides an effective antibacterial action with negligible cytotoxic effect [236].

11.3. Testing of Immunoreactivity

Sensitization testing represents another part of the testing battery for new biomaterials, establishing the potential of a biomaterial to elicit immunogenic and allergenic responses (immunoreactivity). Currently, the most commonly used tests for novel materials and those medical devices that contact deep tissue, is the guinea pig maximization test (GPMT) where the extract of a biomaterial together with an adjuvant, is intradermally injected in model animals (Biological Evaluation of Medical Devices). Alternatively, a mouse local lymph node assay (LLNA) requiring less material than GPMT but needed to harvest the lymph nodes from sacrificed animals may be used with some precautions, such as a high number of false positives.

However, all animal tests are expensive and take days (weeks) to get results. It is therefore of great interest to replace or drastically reduce the utilization of tests based on experimental animals with suitable cell-based assays which exhibit required reliability, accuracy and importantly correlate to human reactivity. Several studies have shown great potential in the use of the MUTZ-3 human dendritic-cell cell-line for assessing *in vitro* sensitizing potency of chemicals and biomaterials, using a genomic biomarker signature [284–286]. Besides the MUTZ-3 assay, other tests are investigated for their potential to predict sensibilisation in humans as well [287]. However, it is likely that new testing methods must be validated and standardized to match the requirements for accuracy and ability, to be sensitive to the whole spectrum of molecules, with allergenic potential including nanosilver.

12. Time to Translation?

In the field of orthopaedics, there are no implants protected with silver nanotreatment available for clinical usage to date. At least two manufacturers already produce TJA treated by galvanic deposition of elementary silver on request (Implantcast GmbH–Medizintechnik, Buxtehude, Germany; Stanmore Implants, Borehamwood, UK). Initial clinical experiences with these “tailored” implants have been promising [288]. In addition, at least one study examined clinical usage of thermal-sprayed silver oxide in hydroxyapatite coating for total hip implants [84].

The situation is a little better in the field of indwelling medical devices protected by surface treatment with AgNPs. Again, in contrast to extensive experimental research, only several clinical studies have been conducted to demonstrate reduction of infections associated with the AgNP coating in these devices (left within a bodily organ for a limited time). For instance, the usage of external ventricular drainage catheters treated with AgNPs decreased the infection rate [289] while the venous catheters tailored with AgNPs failed to lower infection rates [290]. However, together these data preclude making any conclusions in support of their widespread clinical usage.

Examination of global grants and published studies of this topic suggests a striking discrepancy between proposed strategies of antibacterial surface treatment and ultimate completion of *in vitro* and

in vivo experimentation. In fact, we believe that very little progress has actually been made in the translation of the aforementioned modalities into clinically useful technologies. Barriers to translational medicine in this area are not only related to economic, medicolegal and biotechnological issues but with major problems in the demonstration of the safety of clinical trials. Concerns about long-term durability of such new implants as compared to traditional implants are also realistic. Leaders in this field have recently proposed that in order for some of these obstacles to be overcome, we must improve efficiency and effectiveness amongst all the partners involved. Patients will benefit from these technologies only by improving collaborative efforts among governments, regulatory agencies, industry leaders and health care payers [291]. While pressures exist worldwide to diminish the incidence of PJIs, surprisingly there is not a single large clinical study examining the role of broad-range implementation of implants containing antibacterial surface treatments.

13. Future Developments

The ideal implant surface modification using whatever approach, should provide antibacterial protection throughout the life of the implant with minimal side effects. In relation to AgNPs and their usage in modification of implants, there are three crucial future developments. The first one is synthesis of AgNPs with defined optimal size, ensuring high antibacterial activity and concurrently low cytotoxicity to mammalian cells; that means good biocompatibility with tissues without acute or long-term adverse effects. The second is the development of a new coating technique, or improvement and optimization of a current one ensuring reliable formation of compact, continuous and durable layer of AgNPs. The third concerns the elimination of an inhibitory effect of human lipids and proteins preventing AgNPs from implementing their intended antibacterial effect. These substances cover surfaces of TJA immediately after an implant is placed into the human body. To meet this challenge, recent advances in the field of surface chemistry, fluid mechanics, fluid mechanobiology, bio-inspired materials and/or endogenous mechanisms of immune stimulation should be utilized.

Another important issue related to antibacterial efficiency of AgNPs is connected with the possible development of bacterial resistance to silver NPs. It can be expected that with increasing use of AgNPs in killing bacteria or in the prevention of bacterial colonization in clinical medicine, the bacterial resistance to AgNPs could develop. As a result, strategies combining AgNPs with other antibacterial substances/approaches (either composite or nanocomposite layers), in order to achieve additive/synergistic effects are highly reasonable and should be investigated.

Finally, further investigation should be carried out in the field of strategies combining AgNPs with approaches restoring/maintaining local tissue homeostasis and modulating the immunologic surveillance and patrolling. This concept might comply with a wide variety of clinical situations ranging from residual low dose bacterial load during the surgery, to late haematogenic spreading of infection.

14. Conclusions

There is no doubt that prevention is the best response to the growing problem of orthopaedic implant infections. Engineers believe they are able to develop reliable, durable, non-toxic and safe biomaterials preventing bacterial adhesion and formation of biofilm on surfaces. Strategies incorporating nanopatterning and other nanotechnologies show great promise. Research in the field of antibacterial surface treatment has demonstrated *in vitro* and *in vivo* effectiveness of the technologies based on AgNPs, combining a strong antibacterial effect with relative inertness to the inner environment of a patient. On the other hand, issues relating to the mechanical properties of these technologies and the potential for detrimental side effects, such as toxicity and interference with osseointegration require further investigation.

Acknowledgments: Funding was obtained from the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A).

Author Contributions: J.G. gave the ideas, designed the review and wrote relevant parts of the manuscript. A.P., R.P., S.H. are responsible for the parts of the manuscript related to silver nanoparticles. E.K. contributed especially to the part on the methods appropriate to testing of silver nanocoating. M.Hob. read the literature and contributed to the orthopaedic parts of the manuscript. M.Hol. drew all the figures in the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: All the authors certify that they have no commercial associations that may pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Ag	silver
AgNP	silver nanoparticle
ATPase	adenosine triphosphatase
DAL/CHI	dopamine-modified alginate/chitosan
DNA	deoxyribonucleic acid
EPS	extracellular polymeric substances
FDA	Food and Drug Administration
GPMT	guinea pig maximization test
LCC	local carriers or coating
LLNA	local lymph node assay
MAMP	microbe associated molecular pattern
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule
NP	nanoparticle
NT	nanotube
PJI	prosthetic joint infection
PRR	pattern-recognition receptor
QAS	3-trimethoxysily-propyldimethyloctadecyl-ammonium chloride
QAS	quaternary ammonium salt
Ti	titanium
TiO ₂	titanium dioxide
TJA	total joint arthroplasty
USA	United States of America
UV	ultraviolet

References

1. Berend, K.R.; Lombardi, A.V., Jr.; Morris, M.J.; Bergeson, A.G.; Adams, J.B.; Sneller, M.A. Two-stage treatment of hip periprosthetic joint infection is associated with a high rate of infection control but high mortality. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2013**, *471*, 510–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. De Angelis, G.; Mutters, N.T.; Minkley, L.; Holderried, F.; Tacconelli, E. Prosthetic joint infections in the elderly. *Infection* **2015**, *43*, 629–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bedair, H.; Goyal, N.; Dietz, M.J.; Urish, K.; Hansen, V.; Manrique, J.; Hamilton, W.; Deirmengian, G. A history of treated periprosthetic joint infection increases the risk of subsequent different site infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 2300–2304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Voigt, J.; Mosier, M.; Darouiche, R. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of antibiotics and antiseptics for preventing infection in people receiving primary total hip and knee prostheses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6696–6707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kamath, A.F.; Ong, K.L.; Lau, E.; Chan, V.; Vail, T.P.; Rubash, H.E.; Berry, D.J.; Bozic, K.J. Quantifying the burden of revision total joint arthroplasty for periprosthetic infection. *J. Arthroplast.* **2015**, *30*, 1492–1497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Witso, E. The rate of prosthetic joint infection is underestimated in the arthroplasty registers. *Acta Orthop.* **2015**, *277*–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kurtz, S.M.; Lau, E.; Watson, H.; Schmier, J.K.; Parvizi, J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the united states. *J. Arthroplast.* **2012**, *27*, 61–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lindgren, V.; Gordon, M.; Wretenberg, P.; Karrholm, J.; Garellick, G. Deep infection after total hip replacement: A method for national incidence surveillance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2014**, *35*, 1491–1496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huotari, K.; Peltola, M.; Jansen, E. The incidence of late prosthetic joint infections: A registry-based study of 112,708 primary hip and knee replacements. *Acta Orthop.* **2015**, *86*, 321–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tande, A.J.; Patel, R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 302–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. 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*, 97–104. [[PubMed](#)]
12. Aggarwal, V.K.; Bakhshi, H.; Ecker, N.U.; Parvizi, J.; Gehrke, T.; Kendoff, D. Organism profile in periprosthetic joint infection: Pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in europe and in the united states. *J. Knee Surg.* **2014**, *27*, 399–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bemmer, P.; Plouzeau, C.; Tande, D.; Leger, J.; Giraudeau, B.; Valentin, A.S.; Jolivet-Gougeon, A.; Vincent, P.; Corvec, S.; Gibaud, S.; *et al.* Evaluation of 16s rRNA gene pcr sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: A prospective multicenter cross-sectional study. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3583–3589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Benito, N.; Franco, M.; Coll, P.; Galvez, M.L.; Jordan, M.; Lopez-Contreras, J.; Pomar, V.; Monllau, J.C.; Mirelis, B.; Gurgui, M. Etiology of surgical site infections after primary total joint arthroplasties. *J. Orthop. Res.* **2014**, *32*, 633–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gristina, A.G.; Naylor, P.; Myrvik, Q. Infections from biomaterials and implants: A race for the surface. *Med. Prog. Technol.* **1988**, *14*, 205–224. [[PubMed](#)]
16. Nishitani, K.; Sutipornpalangkul, W.; de Mesy Bentley, K.L.; Varrone, J.J.; Bello-Irizarry, S.N.; Ito, H.; Matsuda, S.; Kates, S.L.; Daiss, J.L.; Schwarz, E.M. Quantifying the natural history of biofilm formation *in vivo* during the establishment of chronic implant-associated staphylococcus aureus osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J. Orthop. Res.* **2015**, *33*, 1311–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vidlak, D.; Kielian, T. Infectious dose dictates the host response during *S. Aureus* orthopedic biofilm infection. *Infect. Immun.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yue, C.; Zhao, B.; Ren, Y.; Kuijjer, R.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.; Rochford, E.T. The implant infection paradox: Why do some succeed when others fail? Opinion and discussion paper. *Eur. Cells Mater.* **2015**, *29*, 303–310.
19. Zhou, X.; Yishake, M.; Li, J.; Jiang, L.; Wu, L.; Liu, R.; Xu, N. Genetic susceptibility to prosthetic joint infection following total joint arthroplasty: A systematic review. *Gene* **2015**, *563*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Navratilova, Z.; Gallo, J.; Mrazek, F.; Lostak, J.; Petrek, M. Mbl2 gene variation affecting serum mbl is associated with prosthetic joint infection in czech patients after total joint arthroplasty. *Tissue Antigens* **2012**, *80*, 444–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Busscher, H.J.; van der Mei, H.C. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Costerton, W.; Veeh, R.; Shirtliff, M.; Pasmore, M.; Post, C.; Ehrlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1466–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eichenberger, E.M.; Thaden, J.T.; Sharma-Kuinkel, B.; Park, L.P.; Rude, T.H.; Ruffin, F.; Hos, N.J.; Seifert, H.; Rieg, S.; Kern, W.V.; *et al.* Polymorphisms in fibronectin binding proteins a and b among staphylococcus aureus bloodstream isolates are not associated with arthroplasty infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, Y.; Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Norde, W. Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 5065–5070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chagnot, C.; Zorgani, M.A.; Astruc, T.; Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: Bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Thevenot, P.; Hu, W.; Tang, L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 270–280. [[PubMed](#)]
27. Roach, P.; Eglin, D.; Rohde, K.; Perry, C.C. Modern biomaterials: A review—Bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1263–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wilson, C.J.; Clegg, R.E.; Leavesley, D.I.; Pearcy, M.J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Stoodley, P.; Ehrlich, G.D.; Sedghizadeh, P.P.; Hall-Stoodley, L.; Baratz, M.E.; Altman, D.T.; Sotereanos, N.G.; Costerton, J.W.; Demeo, P. Orthopaedic biofilm infections. *Curr. Orthop. Pract.* **2011**, *22*, 558–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Laverty, G.; Gorman, S.P.; Gilmore, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 509–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Foster, T.J.; Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K.; Hook, M. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of staphylococcus aureus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fux, C.A.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Stoodley, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Ehrlich, G.D.; Montanaro, L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *830*, 29–46. [[PubMed](#)]
35. Spaan, A.N.; Surewaard, B.G.; Nijland, R.; van Strijp, J.A. Neutrophils *versus* staphylococcus aureus: A biological tug of war. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 629–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gardner, A.B.; Lee, S.K.; Woods, E.C.; Acharya, A.P. Biomaterials-based modulation of the immune system. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 732182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pajarinen, J.; Lin, T.H.; Sato, T.; Yao, Z.; Goodman, S. Interaction of materials and biology in total joint replacement—Successes, challenges and future directions. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **2014**, *2*, 7094–7108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Subbiahdoss, G.; Jutte, P.C.; van den Dungen, J.J.; Zaat, S.A.; Schultz, M.J.; Grainger, D.W. Biomaterial-associated infection: Locating the finish line in the race for the surface. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 153rv10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yue, C.; van der Mei, H.C.; Kuijper, R.; Busscher, H.J.; Rochford, E.T. Mechanism of cell integration on biomaterial implant surfaces in the presence of bacterial contamination. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103*, 3590–3598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Higgins, D.M.; Basaraba, R.J.; Hohnbaum, A.C.; Lee, E.J.; Grainger, D.W.; Gonzalez-Juarrero, M. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 161–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zimmerli, W.; Sendi, P. Pathogenesis of implant-associated infection: The role of the host. *Semin. Immunopathol.* **2011**, *33*, 295–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. An, Y.H.; Friedman, R.J. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J. Hosp. Infect.* **1996**, *33*, 93–108. [[CrossRef](#)]
43. Humphreys, H. Surgical site infection, ultraclean ventilated operating theatres and prosthetic joint surgery: Where now? *J. Hosp. Infect.* **2012**, *81*, 71–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McHugh, S.M.; Hill, A.D.; Humphreys, H. Laminar airflow and the prevention of surgical site infection. More harm than good? *Surgeon* **2015**, *13*, 52–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mejia, E.; Williams, A.; Long, M. Decreasing prosthetic joint surgical site infections: An interdisciplinary approach. *AORN J.* **2015**, *101*, 213–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Thornley, P.; Evaniew, N.; Riediger, M.; Winemaker, M.; Bhandari, M.; Ghert, M. Postoperative antibiotic prophylaxis in total hip and knee arthroplasty: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ Open* **2015**, *3*, E338–E343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wang, J.; Zhu, C.; Cheng, T.; Peng, X.; Zhang, W.; Qin, H.; Zhang, X. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. McMurray, C.L.; Hardy, K.J.; Verlander, N.Q.; Hawkey, P.M. Antibiotic surgical prophylaxis increases nasal carriage of antibiotic-resistant staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 1489–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Illingworth, K.D.; Mihalko, W.M.; Parvizi, J.; Sculco, T.; McArthur, B.; el Bitar, Y.; Saleh, K.J. How to minimize infection and thereby maximize patient outcomes in total joint arthroplasty: A multicenter approach: Aaos exhibit selection. *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **2013**, *95*, e50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Florschutz, A.V.; Fagan, R.P.; Matar, W.Y.; Sawyer, R.G.; Berrios-Torres, S.I. Surgical site infection risk factors and risk stratification. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2015**, *23*, S8–S11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Maoz, G.; Phillips, M.; Bosco, J.; Slover, J.; Stachel, A.; Inneh, I.; Iorio, R. The otto aufranc award: Modifiable versus nonmodifiable risk factors for infection after hip arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ma, Z.; Guo, F.; Qi, J.; Xiang, W.; Zhang, J. Meta-analysis shows that obesity may be a significant risk factor for prosthetic joint infections. *Int. Orthop.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alijanipour, P.; Heller, S.; Parvizi, J. Prevention of periprosthetic joint infection: What are the effective strategies? *J. Knee Surg.* **2014**, *27*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rezapoor, M.; Parvizi, J. Prevention of periprosthetic joint infection. *J. Arthroplast.* **2015**, *30*, 902–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Getzlaf, M.A.; Lewallen, E.A.; Kremers, H.M.; Jones, D.L.; Bonin, C.A.; Dudakovic, A.; Thaler, R.; Cohen, R.C.; Lewallen, D.G.; van Wijnen, A.J. Multi-disciplinary antimicrobial strategies for improving orthopaedic implants to prevent prosthetic joint infections in hip and knee. *J. Orthop. Res.* **2016**, *34*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Romano, C.L.; Scarponi, S.; Gallazzi, E.; Romano, D.; Drago, L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: A classification proposal in an evolving panorama. *J. Orthop. Surg. Res.* **2015**, *10*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tsaras, G.; Osmon, D.R.; Mabry, T.; Lahr, B.; St Sauveur, J.; Yawn, B.; Kurland, R.; Berbari, E.F. Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: A population-based study, olmsted county, minnesota, 1969–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2012**, *33*, 1207–1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhu, Y.; Zhang, F.; Chen, W.; Liu, S.; Zhang, Q.; Zhang, Y. Risk factors for periprosthetic joint infection after total joint arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 82–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ratner, B.D.; Schoen, F.J. The concept and assessment of biocompatibility. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed.; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 1, pp. 588–592.
60. Bernthal, N.M.; Stavrakis, A.I.; Billi, F.; Cho, J.S.; Kremen, T.J.; Simon, S.I.; Cheung, A.L.; Finerman, G.A.; Lieberman, J.R.; Adams, J.S.; et al. A mouse model of post-arthroplasty staphylococcus aureus joint infection to evaluate *in vivo* the efficacy of antimicrobial implant coatings. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Scherr, T.D.; Lindgren, K.E.; Schaeffer, C.R.; Hanke, M.L.; Hartman, C.W.; Kielian, T. Mouse model of post-arthroplasty staphylococcus epidermidis joint infection. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1106*, 173–181. [[PubMed](#)]
62. Gatin, L.; Saleh-Mghir, A.; Massin, P.; Cremieux, A.C. Critical analysis of experimental models of periprosthetic joint infection. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2015**, *101*, 851–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Corvec, S.; Portillo, M.E.; Pasticci, B.M.; Borens, O.; Trampuz, A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 923–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kapadia, B.H.; Berg, R.A.; Daley, J.A.; Fritz, J.; Bhawe, A.; Mont, M.A. Periprosthetic joint infection. *Lancet* **2016**, *387*, 386–394. [[CrossRef](#)]
65. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S. Physicochemical surface modifications of materials used in medicine. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press (Elsevier): Waltham, MA, USA, 2013; Volume 1, pp. 259–276.
66. Follmann, H.D.; Martins, A.F.; Gerola, A.P.; Burgo, T.A.; Nakamura, C.V.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of tmc/heparin complexes. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3711–3722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Neoh, K.G.; Kang, E.T. Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: Relevance to marine and medical applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2808–2819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Muszanska, A.K.; Rochford, E.T.; Gruszka, A.; Bastian, A.A.; Busscher, H.J.; Norde, W.; van der Mei, H.C.; Herrmann, A. Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and rgd peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2019–2026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. An, Y.H.; Stuart, G.W.; McDowell, S.J.; McDaniel, S.E.; Kang, Q.; Friedman, R.J. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating *in vitro*. *J. Orthop. Res.* **1996**, *14*, 846–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Zhu, H.; Guo, Z.; Liu, W. Adhesion behaviors on superhydrophobic surfaces. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3900–3913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Stallard, C.P.; McDonnell, K.A.; Onayemi, O.D.; O’Gara, J.P.; Dowling, D.P. Evaluation of protein adsorption on atmospheric plasma deposited coatings exhibiting superhydrophilic to superhydrophobic properties. *Biointerphases* **2012**, *7*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Poncin-Epaillard, F.; Herry, J.M.; Marmey, P.; Legeay, G.; Debarnot, D.; Bellon-Fontaine, M.N. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface—A potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 1152–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Shida, T.; Koseki, H.; Yoda, I.; Horiuchi, H.; Sakoda, H.; Osaki, M. Adherence ability of staphylococcus epidermidis on prosthetic biomaterials: An *in vitro* study. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 3955–3961.
74. Singh, A.V.; Vyas, V.; Patil, R.; Sharma, V.; Scopelliti, P.E.; Bongiorno, G.; Podesta, A.; Lenardi, C.; Gade, W.N.; Milani, P. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ivanova, E.P.; Truong, V.K.; Wang, J.Y.; Berndt, C.C.; Jones, R.T.; Yusuf, I.I.; Peake, I.; Schmidt, H.W.; Fluke, C.; Barnes, D.; *et al.* Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2010**, *26*, 1973–1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Truong, V.K.; Lapovok, R.; Estrin, Y.S.; Rundell, S.; Wang, J.Y.; Fluke, C.J.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3674–3683. [[PubMed](#)]
77. Filova, E.; Fojt, J.; Kryslova, M.; Moravec, H.; Joska, L.; Bacakova, L. The diameter of nanotubes formed on ti-6al-4v alloy controls the adhesion and differentiation of saos-2 cells. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 7145–7163.
78. Pandit, V.; Zuidema, J.M.; Venuto, K.N.; Macione, J.; Dai, G.; Gilbert, R.J.; Kotha, S.P. Evaluation of multifunctional polysaccharide hydrogels with varying stiffness for bone tissue engineering. *Tissue Eng. A* **2013**, *19*, 2452–2463.
79. Zhao, C.; Li, X.; Li, L.; Cheng, G.; Gong, X.; Zheng, J. Dual functionality of antimicrobial and antifouling of poly(n-hydroxyethylacrylamide)/salicylate hydrogels. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2013**, *29*, 1517–1524.
80. Zan, X.; Kozlov, M.; McCarthy, T.J.; Su, Z. Covalently attached, silver-doped poly(vinyl alcohol) hydrogel films on poly(l-lactic acid). *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1082–1088.
81. Drago, L.; Boot, W.; Dimas, K.; Malizos, K.; Hansch, G.M.; Stuyck, J.; Gawlitta, D.; Romano, C.L. Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation *in vitro*? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2014**, *472*, 3311–3323.
82. Bock, R.M.; McEntire, B.J.; Bal, B.S.; Rahaman, M.N.; Boffelli, M.; Pezzotti, G. Surface modulation of silicon nitride ceramics for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 318–330.
83. Webster, T.J.; Patel, A.A.; Rahaman, M.N.; Sonny Bal, B. Anti-infective and osteointegration properties of silicon nitride, poly(ether ether ketone), and titanium implants. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 4447–4454. [[PubMed](#)]
84. Eto, S.; Kawano, S.; Someya, S.; Miyamoto, H.; Sonohata, M.; Mawatari, M. First clinical experience with thermal-sprayed silver oxide-containing hydroxyapatite coating implant. *J. Arthroplast.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Guimond-Lischer, S.; Ren, Q.; Braissant, O.; Gruner, P.; Wampfler, B.; Maniura-Weber, K. Vacuum plasma sprayed coatings using ionic silver doped hydroxyapatite powder to prevent bacterial infection of bone implants. *Biointerphases* **2016**, *11*, 011012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Unosson, E.; Rodriguez, D.; Welch, K.; Engqvist, H. Reactive combinatorial synthesis and characterization of a gradient ag-ti oxide thin film with antibacterial properties. *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Cheng, H.; Li, Y.; Huo, K.; Gao, B.; Xiong, W. Long-lasting *in vivo* and *in vitro* antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102*, 3488–3499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Gao, A.; Hang, R.Q.; Huang, X.B.; Zhao, L.Z.; Zhang, X.Y.; Wang, L.; Tang, B.; Ma, S.L.; Chu, P.K. The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4223–4235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Mei, S.; Wang, H.; Wang, W.; Tong, L.; Pan, H.; Ruan, C.; Ma, Q.; Liu, M.; Yang, H.; Zhang, L.; *et al.* Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4255–4265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dong, W.; Zhu, Y.; Zhang, J.; Lu, L.; Zhao, C.; Qin, L.; Li, Y. Investigation on the antibacterial micro-porous titanium with silver nano-particles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 6782–6786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Panacek, A.; Balzerova, A.; Pucek, R.; Ranc, V.; Vecerova, R.; Husickova, V.; Pechousek, J.; Filip, J.; Zboril, R.; Kvitek, L. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of ag/pdda-diatomite nanocomposite. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *110*, 191–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kvitek, L.; Panacek, A.; Soukupova, J.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R.; Holecova, M.; Zboril, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (nps). *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5825–5834. [[CrossRef](#)]
93. Knetsch, M.L.W.; Koole, L.H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* **2011**, *3*, 340–366. [[CrossRef](#)]
94. Harrasser, N.; Jussen, S.; Banke, I.J.; Kmeth, R.; von Eisenhart-Rothe, R.; Stritzker, B.; Gollwitzer, H.; Burgkart, R. Antibacterial efficacy of titanium-containing alloy with silver-nanoparticles enriched diamond-like carbon coatings. *AMB Express* **2015**, *5*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Bai, Y.; Bai, Y.; Wang, C.; Gao, J.; Ma, W. Fabrication and characterization of gold nanoparticle-loaded tio2 nanotube arrays for medical implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ahmed, R.A.; Fadelallah, S.A.; El-Bagoury, N.; El-Rab, S.M.F.G. Improvement of corrosion resistance and antibacterial effect of niti orthopedic materials by chitosan and gold nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *292*, 390–399. [[CrossRef](#)]
97. Koseki, H.; Asahara, T.; Shida, T.; Yoda, I.; Horiuchi, H.; Baba, K.; Osaki, M. Clinical and histomorphometrical study on titanium dioxide-coated external fixation pins. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 593–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Haenle, M.; Fritsche, A.; Zietz, C.; Bader, R.; Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Gollwitzer, H. An extended spectrum bactericidal titanium dioxide (tio2) coating for metallic implants: *In vitro* effectiveness against mrsa and mechanical properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 381–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Yue, C.; Kuijjer, R.; Kaper, H.J.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J. Simultaneous interaction of bacteria and tissue cells with photocatalytically activated, anodized titanium surfaces. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2580–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Holinka, J.; Pilz, M.; Kubista, B.; Presterl, E.; Windhager, R. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth. *Bone Jt. J.* **2013**, *95-B*, 678–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Tran, P.A.; Webster, T.J. Selenium nanoparticles inhibit staphylococcus aureus growth. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 1553–1558.
102. Rodriguez-Valencia, C.; Lopez-Alvarez, M.; Cochon-Cores, B.; Pereiro, I.; Serra, J.; Gonzalez, P. Novel selenium-doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 853–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. LewisOscar, F.; MubarakAli, D.; Nithya, C.; Priyanka, R.; Gopinath, V.; Alharbi, N.S.; Thajuddin, N. One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (cunps) against clinical strains of pseudomonas aeruginosa. *Biofouling* **2015**, *31*, 379–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hoene, A.; Prinz, C.; Walschus, U.; Lucke, S.; Patrzyk, M.; Wilhelm, L.; Neumann, H.G.; Schlosser, M. *In vivo* evaluation of copper release and acute local tissue reactions after implantation of copper-coated titanium implants in rats. *Biomed. Mater.* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Elizabeth, E.; Baranwal, G.; Krishnan, A.G.; Menon, D.; Nair, M. Zno nanoparticle incorporated nanostructured metallic titanium for increased mesenchymal stem cell response and antibacterial activity. *Nanotechnology* **2014**, *25*, 115101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. Hu, H.; Zhang, W.; Qiao, Y.; Jiang, X.; Liu, X.; Ding, C. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of zn-incorporated tio2 coatings on titanium. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 904–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Tsuchiya, H.; Shirai, T.; Nishida, H.; Murakami, H.; Kabata, T.; Yamamoto, N.; Watanabe, K.; Nakase, J. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J. Orthop. Sci.* **2012**, *17*, 595–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bellucci, D.; Sola, A.; Cannillo, V. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 1030–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Durgalakshmi, D.; Balakumar, S.; Raja, C.A.; George, R.P.; Mudali, U.K. Structural, morphological and antibacterial investigation of ag-impregnated sol-gel-derived 45s5 nanobioglass systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 4285–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Shi, Y.Y.; Li, M.; Liu, Q.; Jia, Z.J.; Xu, X.C.; Cheng, Y.; Zheng, Y.F. Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan-hydroxyapatite nanocomposite coatings on ti substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Richtera, L.; Chudobova, D.; Cihalova, K.; Kremplova, M.; Milosavljevic, V.; Kopel, P.; Blazkova, I.; Hynek, D.; Adam, V.; Kizek, R. The composites of graphene oxide with metal or semimetal nanoparticles and their effect on pathogenic microorganisms. *Materials* **2015**, *8*, 2994–3011. [[CrossRef](#)]
112. Antoci, V., Jr.; Adams, C.S.; Parvizi, J.; Ducheyne, P.; Shapiro, I.M.; Hickok, N.J. Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, *461*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Antoci, V., Jr.; King, S.B.; Jose, B.; Parvizi, J.; Zeiger, A.R.; Wickstrom, E.; Freeman, T.A.; Composto, R.J.; Ducheyne, P.; Shapiro, I.M.; *et al.* Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 858–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Walter, M.S.; Frank, M.J.; Satue, M.; Monjo, M.; Ronold, H.J.; Lyngstadaas, S.P.; Haugen, H.J. Bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers *in vitro* and *in vivo*. *Dent. Mater.* **2014**, *30*, 200–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Chennell, P.; Feschet-Chassot, E.; Devers, T.; Awitor, K.O.; Descamps, S.; Sautou, V. *In vitro* evaluation of tio2 nanotubes as cefuroxime carriers on orthopaedic implants for the prevention of periprosthetic joint infections. *Int. J. Pharm.* **2013**, *455*, 298–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Hickok, N.J.; Shapiro, I.M. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1165–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Norowski, P.A.; Courtney, H.S.; Babu, J.; Haggard, W.O.; Bumgardner, J.D. Chitosan coatings deliver antimicrobials from titanium implants: A preliminary study. *Implant Dent.* **2011**, *20*, 56–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Chen, X.N.; Gu, Y.X.; Lee, J.H.; Lee, W.Y.; Wang, H.J. Multifunctional surfaces with biomimetic nanofibres and drug-eluting micro-patterns for infection control and bone tissue formation. *Eur. Cells Mater.* **2012**, *24*, 237–248.
119. Renoud, P.; Toury, B.; Benayoun, S.; Attik, G.; Grosogeat, B. Functionalization of titanium with chitosan via silanation: Evaluation of biological and mechanical performances. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Tan, H.; Ma, R.; Lin, C.; Liu, Z.; Tang, T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: Antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1854–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Yazici, H.; O'Neill, M.B.; Kacar, T.; Wilson, B.R.; Oren, E.E.; Sarikaya, M.; Tamerler, C. Engineered chimeric peptides as antimicrobial surface coating agents toward infection-free implants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 5070–5081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Rapsch, K.; Bier, F.F.; Tadros, M.; von Nickisch-Roseneck, M. Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 308–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Zheng, D.; Neoh, K.G.; Shi, Z.; Kang, E.T. Assessment of stability of surface anchors for antibacterial coatings and immobilized growth factors on titanium. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *406*, 238–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

124. Li, B.; McKeague, A.L. Emerging ideas: Interleukin-12 nanocoatings prevent open fracture-associated infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 3262–3265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Thallinger, B.; Prasetyo, E.N.; Nyanhongo, G.S.; Guebitz, G.M. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Chua, P.H.; Neoh, K.G.; Kang, E.T.; Wang, W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and rgd for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1412–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C.M.; Jouenne, T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1670–1684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. He, T.; Chan, V. Covalent layer-by-layer assembly of polyethyleneimine multilayer for antibacterial applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95*, 454–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Fu, J.; Ji, J.; Fan, D.; Shen, J. Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Zhou, B.; Li, Y.; Deng, H.; Hu, Y.; Li, B. Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *116*, 432–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Huang, W.; Li, X.; Xue, Y.; Huang, R.; Deng, H.; Ma, Z. Antibacterial multilayer films fabricated by lbl immobilizing lysozyme and htcc on nanofibrous mats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *53*, 26–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Min, J.; Braatz, R.D.; Hammond, P.T. Tunable staged release of therapeutics from layer-by-layer coatings with clay interlayer barrier. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2507–2517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Rizzello, L.; Pompa, P.P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem. Soc. Rev.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zhang, M.; Zhao, Y.; Yan, L.; Peltier, R.; Hui, W.; Yao, X.; Cui, Y.; Chen, X.; Sun, H.; Wang, Z. Interfacial engineering of bimetallic ag/pt nanoparticles on reduced graphene oxide matrix for enhanced antimicrobial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 8834–8840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Funao, H.; Nagai, S.; Sasaki, A.; Hoshikawa, T.; Tsuji, T.; Okada, Y.; Koyasu, S.; Toyama, Y.; Nakamura, M.; Aizawa, M.; *et al.* A novel hydroxyapatite film coated with ionic silver via inositol hexaphosphate chelation prevents implant-associated infection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Gottenbos, B.; van der Mei, H.C.; Klatter, F.; Grijpma, D.W.; Feijen, J.; Nieuwenhuis, P.; Busscher, H.J. Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2707–2710. [[CrossRef](#)]
137. Braem, A.; De Cremer, K.; Delattin, N.; De Brucker, K.; Neirinck, B.; Vandamme, K.; Martens, J.A.; Michiels, J.; Vleugels, J.; Cammue, B.P.; *et al.* Novel anti-infective implant substrates: Controlled release of antibiofilm compounds from mesoporous silica-containing macroporous titanium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *126*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Yu, Q.; Cho, J.; Shivapooja, P.; Ista, L.K.; Lopez, G.P. Nanopatterned smart polymer surfaces for controlled attachment, killing, and release of bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 9295–9304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Holzapfel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Noth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Huttmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 581–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Cipriano, A.F.; Miller, C.; Liu, H. Anodic growth and biomedical applications of tio2 nanotubes. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 2977–3003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Parvizi, J.; Antoci, V., Jr.; Hickok, N.J.; Shapiro, I.M. Selfprotective smart orthopedic implants. *Expert Rev. Med. Devices* **2007**, *4*, 55–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Mastronardi, E.; Foster, A.; Zhang, X.; Derosa, M.C. Smart materials based on DNA aptamers: Taking aptasensing to the next level. *Sensors* **2014**, *14*, 3156–3171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Ehrlich, G.D.; Stoodley, P.; Kathju, S.; Zhao, Y.; McLeod, B.R.; Balaban, N.; Hu, F.Z.; Sotereanos, N.G.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; *et al.* Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2005**, *437*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

144. Shchukin, D.G.; Mohwald, H. Self-repairing coatings containing active nanoreservoirs. *Small* **2007**, *3*, 926–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Shchukin, D.; Mohwald, H. Materials science. A coat of many functions. *Science* **2013**, *341*, 1458–1459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Keller, L.; Wagner, Q.; Offner, D.; Eap, S.; Musset, A.M.; Arruebo, M.; Kelm, J.M.; Schwinte, P.; Benkirane-Jessel, N. Integrating microtissues in nanofiber scaffolds for regenerative nanomedicine. *Materials* **2015**, *8*, 6863–6867. [[CrossRef](#)]
147. Yilmaz, C.; Colak, M.; Yilmaz, B.C.; Ersoz, G.; Kutateladze, M.; Gozlugol, M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: An experimental study. *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **2013**, *95*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Liu, Y.; Busscher, H.J.; Zhao, B.; Li, Y.; Zhang, Z.; van der Mei, H.C.; Ren, Y.; Shi, L. Surface-adaptive, antimicrobially loaded, micellar nanocarriers with enhanced penetration and killing efficiency in staphylococcal biofilms. *ACS Nano* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Yu, Q.; Wu, Z.; Chen, H. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomater.* **2015**, *16*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Zaborowska, M.; Welch, K.; Branemark, R.; Khalilpour, P.; Engqvist, H.; Thomsen, P.; Trobos, M. Bacteria-material surface interactions: Methodological development for the assessment of implant surface induced antibacterial effects. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Lemire, J.A.; Harrison, J.J.; Turner, R.J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 371–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Ketabchi, A.; Komm, K.; Miles-Rossouw, M.; Cassani, D.A.; Variola, F. Nanoporous titanium surfaces for sustained elution of proteins and antibiotics. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Hizal, F.; Zhuk, I.; Sukhishvili, S.; Busscher, H.J.; van der Mei, H.C.; Choi, C.H. Impact of 3d hierarchical nanostructures on the antibacterial efficacy of a bacteria-triggered self-defensive antibiotic coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 20304–20313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Tian, B.; Chen, W.; Yu, D.; Lei, Y.; Ke, Q.; Guo, Y.; Zhu, Z. Fabrication of silver nanoparticle-doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *61*, 345–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Gallo, J.; Holinka, M.; Moucha, C.S. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 13849–13880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D.J.; Shah, S.I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *5*, 244–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Chen, C.Y.; Chiang, C.L. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 3607–3609. [[CrossRef](#)]
158. Martinez-Castanon, G.A.; Nino-Martinez, N.; Martinez-Gutierrez, F.; Martinez-Mendoza, J.R.; Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 1343–1348. [[CrossRef](#)]
159. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Panacek, A.; Kvitek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V.K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Sharma, V.K.; Yngard, R.A.; Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 83–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S.; Saquib, Q.; Musarrat, J. Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of pseudomonas aeruginosa. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54*, 688–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. AshaRani, P.V.; Mun, G.L.K.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *Acs Nano* **2009**, *3*, 279–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Hess, K.L.; Jones, R.L.; Schlager, J.J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13608–13619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

165. Hussain, S.M.; Hess, K.L.; Gearhart, J.M.; Geiss, K.T.; Schlager, J.J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. In Proceedings of the 13th International Workshop on *in Vitro* Toxicology, Zegrze, Poland, 8–11 September 2004; pp. 975–983.
166. Afkhami, F.; Pourhashemi, S.J.; Sadegha, M.; Salehi, Y.; Fard, M.J.K. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against enterococcus faecalis. *J. Dent.* **2015**, *43*, 1573–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Agarwala, M.; Barman, T.; Gogoi, D.; Choudhury, B.; Pal, A.R.; Yadav, R.N.S. Highly effective antibiofilm coating of silver-polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1223–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Alberto Perez-Diaz, M.; Boegli, L.; James, G.; Velasquillo, C.; Sanchez-Sanchez, R.; Martinez-Martinez, R.-E.; Alejandro Martinez-Castanon, G.; Martinez-Gutierrez, F. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against streptococcus mutans and their cytotoxic effect. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *55*, 360–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Ali, K.; Ahmed, B.; Dwivedi, S.; Saquib, Q.; Al-Khedhairi, A.A.; Musarrat, J. Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with eucalyptus globulus leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Besinis, A.; De Peralta, T.; Handy, R.D. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 745–754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Fufa, O.; Andronescu, E.; Grumezescu, V.; Holban, A.M.; Mogoanta, L.; Mogosanu, G.D.; Socol, G.; Iordache, F.; Chifiriuc, M.C.; Grumezescu, A.M. Silver nanostructured surfaces prepared by maple for biofilm prevention. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2015**, *5*, 1011–1017.
172. Ghosh, S.; Jagtap, S.; More, P.; Shete, U.J.; Maheshwari, N.O.; Rao, S.J.; Kitture, R.; Kale, S.; Bellare, J.; Patil, S.; *et al.* Dioscorea bulbifera mediated synthesis of novel aucoreagshell nanoparticles with potent antibiofilm and antileishmanial activity. *J. Nanomater.* **2015**. [[CrossRef](#)]
173. Jaiswal, S.; Bhattacharya, K.; McHale, P.; Duffy, B. Dual effects of beta-cyclodextrin-stabilised silver nanoparticles: Enhanced biofilm inhibition and reduced cytotoxicity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 5367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Palanisamy, N.K.; Ferina, N.; Amirulhusni, A.N.; Mohd-Zain, Z.; Hussaini, J.; Ping, L.J.; Durairaj, R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against pseudomonas aeruginosa. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Rajiv, S.; Drilling, A.; Bassiouni, A.; James, C.; Vreugde, S.; Wormald, P.-J. Topical colloidal silver as an anti-biofilm agent in a staphylococcus aureus chronic rhinosinusitis sheep model. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 283–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Taglietti, A.; Arciola, C.R.; D’Agostino, A.; Dacarro, G.; Montanaro, L.; Campoccia, D.; Cucca, L.; Vercellino, M.; Poggi, A.; Pallavicini, P.; *et al.* Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials* **2014**, *35*, 1779–1788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Taraszkiwicz, A.; Fila, G.; Grinholc, M.; Nakonieczna, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed. Res. Int.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Thomas, R.; Soumya, K.R.; Mathew, J.; Radhakrishnan, E.K. Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of coagulase negative staphylococci. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *149*, 68–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Wu, D.; Fan, W.; Kishen, A.; Gutmann, J.L.; Fan, B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against enterococcus faecalis biofilm. *J. Endod.* **2014**, *40*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Xie, C.M.; Lu, X.; Wang, K.F.; Meng, F.Z.; Jiang, O.; Zhang, H.P.; Zhi, W.; Fang, L.M. Silver nanoparticles and growth factors incorporated hydroxyapatite coatings on metallic implant surfaces for enhancement of osteoinductivity and antibacterial properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8580–8589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Rodriguez-Cano, A.; Pacha-Olivenza, M.A.; Babiano, R.; Cintas, P.; Gonzalez-Martin, M.L. Non-covalent derivatization of aminosilanized titanium alloy implants silver-enhanced coating of antibacterial organics. *Surf. Coat. Technol.* **2014**, *245*, 66–73. [[CrossRef](#)]
182. Zhao, C.J.; Feng, B.; Li, Y.T.; Tan, J.; Lu, X.; Weng, J. Preparation and antibacterial activity of titanium nanotubes loaded with ag nanoparticles in the dark and under the uv light. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *280*, 8–14. [[CrossRef](#)]

183. Wang, Z.; Sun, Y.; Wang, D.; Liu, H.; Boughton, R.I. *In situ* fabrication of silver nanoparticle-filled hydrogen titanate nanotube layer on metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implantation. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 2903–2916.
184. Saidin, S.; Chevallerier, P.; Kadir, M.R.A.; Hermawan, H.; Mantovani, D. Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 4715–4724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. De Giglio, E.; Cafagna, D.; Cometa, S.; Allegretta, A.; Pedico, A.; Giannossa, L.C.; Sabbatini, L.; Mattioli-Belmonte, M.; Iatta, R. An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: Development and analytical characterization. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 805–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Secinti, K.D.; Ozalp, H.; Attar, A.; Sargon, M.F. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* **2011**, *18*, 391–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Cao, H.L.; Liu, X.Y.; Meng, F.H.; Chu, P.K. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials* **2011**, *32*, 693–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Della Valle, C.; Visai, L.; Santin, M.; Cigada, A.; Candiani, G.; Pezzoli, D.; Arciola, C.R.; Imbriani, M.; Chiesa, R. A novel antibacterial modification treatment of titanium capable to improve osseointegration. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 864–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Ionita, D.; Grecu, M.; Ungureanu, C.; Demetrescu, I. Antimicrobial activity of the surface coatings on tialzr implant biomaterial. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 630–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Brennan, S.A.; Ni Fhoghlu, C.; Devitt, B.M.; O'Mahony, F.J.; Brabazon, D.; Walsh, A. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *Bone Jt. J.* **2015**, *97-B*, 582–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Saleh, N.B.; Chambers, B.; Aich, N.; Plazas-Tuttle, J.; Phung-Ngoc, H.N.; Kirisits, M.J. Mechanistic lessons learned from studies of planktonic bacteria with metallic nanomaterials: Implications for interactions between nanomaterials and biofilm bacteria. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Zhong, X.; Song, Y.J.; Yang, P.; Wang, Y.; Jiang, S.Y.; Zhang, X.; Li, C.Y. Titanium surface priming with phase-transited lysozyme to establish a silver nanoparticle-loaded chitosan/hyaluronic acid antibacterial multilayer via layer-by-layer self-assembly. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Fabrega, J.; Renshaw, J.C.; Lead, J.R. Interactions of silver nanoparticles with pseudomonas putida biofilms. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 9004–9009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Choi, O.Y.; Yu, C.P.; Fernandez, G.E.; Hu, Z.Q. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* **2010**, *44*, 6095–6103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Mohanty, S.; Mishra, S.; Jena, P.; Jacob, B.; Sarkar, B.; Sonawane, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 916–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Peulen, T.O.; Wilkinson, K.J. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 3367–3373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Qin, H.; Cao, H.L.; Zhao, Y.C.; Zhu, C.; Cheng, T.; Wang, Q.J.; Peng, X.C.; Cheng, M.Q.; Wang, J.X.; Jin, G.D.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9114–9125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Bai, L.; Hang, R.Q.; Gao, A.; Zhang, X.Y.; Huang, X.B.; Wang, Y.Y.; Tang, B.; Zhao, L.Z.; Chu, P.K. Nanostructured titanium-silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *355*, 32–44. [[CrossRef](#)]
199. Zhang, X.M.; Li, Z.Y.; Yuan, X.B.; Cui, Z.D.; Bao, H.J.; Li, X.; Liu, Y.D.; Yang, X.J. Cytotoxicity and antibacterial property of titanium alloy coated with silver nanoparticle-containing polyelectrolyte multilayer. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 2816–2820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Esfandiari, N.; Simchi, A.; Bagheri, R. Size tuning of ag-decorated TiO₂ nanotube arrays for improved bactericidal capacity of orthopedic implants. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102*, 2625–2635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Chen, X.Y.; Cai, K.Y.; Fang, J.J.; Lai, M.; Li, J.H.; Hou, Y.H.; Luo, Z.; Hu, Y.; Tang, L.L. Dual action antibacterial TiO₂ nanotubes incorporated with silver nanoparticles and coated with a quaternary ammonium salt (QAS). *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *216*, 158–165. [[CrossRef](#)]
202. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Duan, S.S.; Ouyang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on staphylococcus aureus. *Biometals* **2011**, *24*, 135–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

203. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Zeng, H.Y.; Ou-Yang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1115–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Cui, L.; Chen, P.Y.; Chen, S.D.; Yuan, Z.H.; Yu, C.P.; Ren, B.; Zhang, K.S. *In situ* study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5436–5443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Lara, H.H.; Ayala-Nunez, N.V.; Turrent, L.D.I.; Padilla, C.R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 615–621. [[CrossRef](#)]
206. Lok, C.N.; Ho, C.M.; Chen, R.; He, Q.Y.; Yu, W.Y.; Sun, H.Z.; Tam, P.K.H.; Chiu, J.F.; Che, C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 916–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. SonDI, I.; Salopek-SonDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E-coli* as a model for gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Choi, O.; Hu, Z.Q. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4583–4588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 95–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Xu, H.Y.; Qu, F.; Xu, H.; Lai, W.H.; Wang, Y.A.; Aguilar, Z.P.; Wei, H. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* o157:H7. *Biometals* **2012**, *25*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. CabiscoL, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **2000**, *3*, 3–8. [[PubMed](#)]
212. Silver, S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 341–353. [[CrossRef](#)]
213. Silver, S.; Phung, L.T.; Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 627–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Kremer, A.N.; Hoffmann, H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the enterobacter cloacae complex. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3249–3257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Haefeli, C.; Franklin, C.; Hardy, K. Plasmid-determined silver resistance in *pseudomonas-stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* **1984**, *158*, 389–392. [[PubMed](#)]
216. Gupta, A.; Matsui, K.; Lo, J.F.; Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in salmonella. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 183–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Li, X.Z.; Nikaido, H.; Williams, K.E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6127–6132. [[PubMed](#)]
218. Nies, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 313–339. [[CrossRef](#)]
219. Potara, M.; Jakab, E.; Damert, A.; Popescu, O.; Canpean, V.; Astilean, S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on staphylococcus aureus. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Vertelov, G.K.; Krutyakov, Y.A.; Efremenkova, O.V.; Olenin, A.Y.; Lisichkin, G.V. A versatile synthesis of highly bactericidal myramistin (r) stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Ammons, M.C.B.; Ward, L.S.; James, G.A. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int. Wound J.* **2011**, *8*, 268–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Ruden, S.; Hilpert, K.; Berditsch, M.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3538–3540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Birla, S.S.; Tiwari, V.V.; Gade, A.K.; Ingle, A.P.; Yadav, A.P.; Rai, M.K. Fabrication of silver nanoparticles by phoma glomerata and its combined effect against *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* and staphylococcus aureus. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Fayaz, A.M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P.T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

225. Ghosh, S.; Patil, S.; Ahire, M.; Kitture, R.; Kale, S.; Pardesi, K.; Cameotra, S.S.; Bellare, J.; Dhavale, D.D.; Jabgunde, A.; *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using dioscorea bulbifera tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 483–496.
226. Muhsin, T.M.; Hachim, A.K. Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles and their activity against some human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2081–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M.I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S.; Ali, N. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 3187–3195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Sathiyarayanan, G.; Kiran, G.S.; Selvin, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine bacillus subtilis MSBN17. *Colloid Surface B* **2013**, *102*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Shahverdi, A.R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 168–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Hwang, I.S.; Hwang, J.H.; Choi, H.; Kim, K.J.; Lee, D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1719–1726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Li, P.; Li, J.; Wu, C.Z.; Wu, Q.S.; Li, J. Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1912–1917. [[CrossRef](#)]
232. Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Krawczyk, K.; Wrobel, I.; Wolska, K.I. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in pseudomonas aeruginosa by silver nanoparticles. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 849–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Singh, R.; Wagh, P.; Wadhvani, S.; Gaidhani, S.; Kumbhar, A.; Bellare, J.; Chopade, B.A. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from acinetobacter calcoaceticus and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4277–4289.
234. Brown, A.N.; Smith, K.; Samuels, T.A.; Lu, J.R.; Obare, S.O.; Scott, M.E. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of pseudomonas aeruginosa and enterobacter aerogenes and methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2768–2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Smekalova, M.; Aragon, V.; Panacek, A.; Pucek, R.; Zboril, R.; Kvitek, L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet. J.* **2016**, *209*, 174–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Panacek, A.; Smekalova, M.; Kilianova, M.; Pucek, R.; Bogdanova, K.; Vecerova, R.; Kolar, M.; Havrdova, M.; Plaza, G.A.; Chojniak, J.; *et al.* Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* **2015**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Panáček, A.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Bogdanová, K.; Röderová, M.; Kolář, M.; Kilianová, M.; Hradilová, Š.; Froning, J.P.; Havrdová, M.; *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant enterobacteriaceae. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *142*, 392–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* **2015**, *20*, 8856–8874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *236*, 310–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Scavone, M.; Armentano, I.; Fortunati, E.; Cristofaro, F.; Mattioli, S.; Torre, L.; Kenny, J.M.; Imbriani, M.; Arciola, C.R.; Visai, L. Antimicrobial properties and cytocompatibility of plga/ag nanocomposites. *Materials* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
241. Kwon, H.B.; Lee, J.H.; Lee, S.H.; Lee, A.Y.; Choi, J.S.; Ahn, Y.S. A case of argyria following colloidal silver ingestion. *Ann. Dermatol.* **2009**, *21*, 308–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Mayr, M.; Kim, M.J.; Wanner, D.; Helmut, H.; Schroeder, J.; Mihatsch, M.J. Argyria and decreased kidney function: Are silver compounds toxic to the kidney? *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *53*, 890–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Drake, P.L.; Hazelwood, K.J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann. Occup. Hyg.* **2005**, *49*, 575–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

244. Shahbazzadeh, D.; Ahari, H.; Motalebi, A.A.; Anvar, A.A.; Moaddab, S.; Asadi, T.; Shokrgozar, M.A.; Rahman-Nya, J. *In vitro* effect of nanosilver toxicity on fibroblast and mesenchymal stem cell lines. *Iran. J. Fish. Sci.* **2011**, *10*, 487–496.
245. Mukherjee, S.G.; O’Clonadh, N.; Casey, A.; Chambers, G. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 238–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Kim, S.; Choi, J.E.; Choi, J.; Chung, K.H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D.Y. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 1076–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Kawata, K.; Osawa, M.; Okabe, S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 6046–6051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Avalos Funez, A.; Isabel Haza, A.; Mateo, D.; Morales, P. *In vitro* evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. *Toxicol. Mech. Methods* **2013**, *23*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Asare, N.; Instanes, C.; Sandberg, W.J.; Refsnes, M.; Schwarze, P.; Kruszewski, M.; Brunborg, G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* **2012**, *291*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Albers, C.E.; Hofstetter, W.; Siebenrock, K.A.; Landmann, R.; Klenke, F.M. *In vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 30–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Frankova, J.; Pivodova, V.; Vagnerova, H.; Juranova, J.; Ulrichova, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Galandakova, A.; Frankova, J.; Ambrozova, N.; Habartova, K.; Pivodova, V.; Zalesak, B.; Safarova, K.; Smekalova, M.; Ulrichova, J. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, C.; Li, H.C.; Wang, T.; Liao, C.Y.; Cui, L.; Zhou, Q.F.; Yan, B.; Jiang, G.B. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 319–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. De Matteis, V.; Malvindi, M.A.; Galeone, A.; Brunetti, V.; De Luca, E.; Kote, S.; Kshirsagar, P.; Sabella, S.; Bardi, G.; Pompa, P.P. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of ag- ion release in the cytosol. *Nanomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 731–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Chairuangkitti, P.; Lawanprasert, S.; Roytrakul, S.; Aueviriyavit, S.; Phummiratch, D.; Kulthong, K.; Chanvorachote, P.; Maniratanachote, R. Silver nanoparticles induce toxicity in a549 cells via ros-dependent and ros-independent pathways. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 330–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Hsiao, I.L.; Hsieh, Y.K.; Wang, C.F.; Chen, I.C.; Huang, Y.J. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 3813–3821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Park, E.J.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Park, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a trojan-horse type mechanism. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 872–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
258. Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.F.; Zhang, H.S.; Xi, Z.G. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 69–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med. J.* **2014**, *55*, 283–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
260. Park, M.; Neigh, A.M.; Vermeulen, J.P.; de la Fonteyne, L.J.J.; Verharen, H.W.; Briede, J.J.; van Loveren, H.; de Jong, W.H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9810–9817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
261. Liu, J.Y.; Sonshine, D.A.; Shervani, S.; Hurt, R.H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6903–6913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
262. Molleman, B.; Hiemstra, T. Surface structure of silver nanoparticles as a model for understanding the oxidative dissolution of silver ions. *Langmuir* **2015**, *31*, 13361–13372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Stoehr, L.C.; Gonzalez, E.; Stampfl, A.; Casals, E.; Duschl, A.; Puentes, V.; Oostingh, G.J. Shape matters: Effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Kasemets, K.; Suppi, S.; Mantecca, P.; Kahru, A. Charge and size-dependent toxicity of silver nanoparticles to yeast cells. *Toxicol. Lett.* **2014**, *229*, S193–S194. [[CrossRef](#)]

265. Schlinkert, P.; Casals, E.; Boyles, M.; Tischler, U.; Hornig, E.; Tran, N.; Zhao, J.; Himly, M.; Riediker, M.; Oostingh, G.J.; *et al.* The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *J. Nanobiotechnol.* **2015**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
266. Dziendzikowska, K.; Gromadzka-Ostrowska, J.; Lankoff, A.; Oczkowski, M.; Krawczynska, A.; Chwastowska, J.; Sadowska-Bratek, M.; Chajduk, E.; Wojewodzka, M.; Dusinska, M.; *et al.* Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32*, 920–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Loeschner, K.; Hadrup, N.; Qvortrup, K.; Larsen, A.; Gao, X.Y.; Vogel, U.; Mortensen, A.; Lam, H.R.; Larsen, E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Van der Zande, M.; Vandebriel, R.J.; Van Doren, E.; Kramer, E.; Rivera, Z.H.; Serrano-Rojero, C.S.; Gremmer, E.R.; Mast, J.; Peters, R.J.B.; Hollman, P.C.H.; *et al.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7427–7442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
269. Garza-Ocanas, L.; Ferrer, D.A.; Burt, J.; Diaz-Torres, L.A.; Ramirez Cabrera, M.; Tamez Rodriguez, V.; Lujan Rangel, R.; Romanovicz, D.; Jose-Yacamán, M. Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats. *Metallomics* **2010**, *2*, 204–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
270. Pauksch, L.; Hartmann, S.; Rohnke, M.; Szalay, G.; Alt, V.; Schnettler, R.; Lips, K.S. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 439–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Necula, B.S.; van Leeuwen, J.P.T.M.; Fratila-Apachitei, L.E.; Zaat, S.A.J.; Apachitei, I.; Duszczyk, J. *In vitro* cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 4191–4197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
272. Campoccia, D.; Cangini, I.; Selan, L.; Vercellino, M.; Montanaro, L.; Visai, L.; Arciola, C.R. An overview of the methodological approach to the *in vitro* study of anti-infective biomaterials. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 800–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
273. Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L.; Costerton, B.; DeMeo, P.; Shirtliff, M.; Gawalt, E.; Kathju, S. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Academic Press (Elsevier): Waltham, MA, USA, 2013; Volume 1, pp. 565–583.
274. Barros, J.; Grenho, L.; Manuel, C.M.; Ferreira, C.; Melo, L.F.; Nunes, O.C.; Monteiro, F.J.; Ferraz, M.P. A modular reactor to simulate biofilm development in orthopedic materials. *Int. Microbiol.* **2013**, *16*, 191–198. [[PubMed](#)]
275. Ludecke, C.; Jandt, K.D.; Siegismund, D.; Kujau, M.J.; Zang, E.; Rettenmayr, M.; Bossert, J.; Roth, M. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84837.
276. Rujanapun, N.; Aueviriyavit, S.; Boonrungsiman, S.; Rosena, A.; Phummiratch, D.; Riolueang, S.; Chalaow, N.; Viprakasit, V.; Maniratanachote, R. Human primary erythroid cells as a more sensitive alternative *in vitro* hematological model for nanotoxicity studies: Toxicological effects of silver nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 1982–1992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Albrecht, M.A.; Evans, C.W.; Raston, C.L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem* **2006**, *8*, 417–432. [[CrossRef](#)]
278. Nunez-Anita, R.E.; Acosta-Torres, L.S.; Vilar-Pineda, J.; Martinez-Espinosa, J.C.; de la Fuente-Hernandez, J.; Castano, V.M. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3999–4006.
279. Sambale, F.; Wagner, S.; Stahl, F.; Khaydarov, R.R.; Scheper, T.; Bahnemann, D. Investigations of the toxic effect of silver nanoparticles on mammalian cell lines. *J. Nanomater.* **2015**. [[CrossRef](#)]
280. Sussman, E.M.; Casey, B.J.; Dutta, D.; Dair, B.J. Different cytotoxicity responses to antimicrobial nanosilver coatings when comparing extract-based and direct-contact assays. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 631–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
281. Liu, Y.; Li, X.; Bao, S.; Lu, Z.; Li, Q.; Li, C.M. Plastic protein microarray to investigate the molecular pathways of magnetic nanoparticle-induced nanotoxicity. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 175501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

282. Zou, J.; Feng, H.; Mannerstrom, M.; Heinonen, T.; Pyykko, I. Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Chan, E.L.; Zhang, C.; Cheung, G.S. Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic irrigant. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2015**, *7*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
284. Albrekt, A.S.; Johansson, H.; Borje, A.; Borrebaeck, C.; Lindstedt, M. Skin sensitizers differentially regulate signaling pathways in mutz-3 cells in relation to their individual potency. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *15*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
285. Johansson, H.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A.; Lindstedt, M. The gard assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 1163–1169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
286. Johansson, H.; Lindstedt, M.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based *in vitro* alternative to animal tests. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
287. Wong, C.L.; Ghassabian, S.; Smith, M.T.; Lam, A.L. *In vitro* methods for hazard assessment of industrial chemicals—Opportunities and challenges. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
288. Wafa, H.; Grimer, R.J.; Reddy, K.; Jeys, L.; Abudu, A.; Carter, S.R.; Tillman, R.M. Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: Case-control study. *Bone Jt. J.* **2015**, *97*, 252–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
289. Lemcke, J.; Depner, F.; Meier, U. The impact of silver nanoparticle-coated and antibiotic-impregnated external ventricular drainage catheters on the risk of infections: A clinical comparison of 95 patients. *Acta Neurochir. Suppl.* **2012**, *114*, 347–350. [[PubMed](#)]
290. Antonelli, M.; De Pascale, G.; Ranieri, V.M.; Pelaia, P.; Tufano, R.; Piazza, O.; Zangrillo, A.; Ferrario, A.; De Gaetano, A.; Guaglianone, E.; *et al.* Comparison of triple-lumen central venous catheters impregnated with silver nanoparticles (agrive(r)) *vs.* conventional catheters in intensive care unit patients. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *82*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
291. Grainger, D.W.; van der Mei, H.C.; Jutte, P.C.; van den Dungen, J.J.; Schultz, M.J.; van der Laan, B.F.; Zaat, S.A.; Busscher, H.J. Critical factors in the translation of improved antimicrobial strategies for medical implants and devices. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9237–9243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty

Martin Kuba,¹ Jiří Gallo ,² Tomáš Pluháček ,¹ Martin Hobza,² David Milde ¹

¹Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

²Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Received 16 August 2017; revised 14 March 2018; accepted 23 March 2018

Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.34137

Abstract: This prospective study examined the content of metals released from total joint arthroplasty into joint fluid, whole blood and periprosthetic tissues. We determined the levels of Ti, V, Nb, Co, Cr, and Mo, using inductively coupled plasma mass spectrometry, in samples from patients who underwent reoperation of total hip or knee arthroplasty. All of the patients ($n = 117$) included in the study had either metal on polyethylene or ceramic on polyethylene-bearing pairs. First, our results conclusively showed that the majority of released metals were deposited in periprosthetic tissues. In this context, the bloodstream turned out to be an ineffective biomarker of the effects occurring in local tissues. Second, there was a clear time-dependent nature of metallic

accumulation. Based on our extensive dataset, we found significantly elevated levels of the released metals in joint fluid and periprosthetic tissues originating from loosened implants compared to stable ones, as well as recognizable differences between the groups with stable implants and aseptic loosening. Finally, it was proved that the concentrations of metals decreased dependent on the distance of the tissue from the implant. © 2018 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B: 000–000, 2018.

Key Words: inductively coupled plasma mass spectrometry, total joint replacement, metal release, periprosthetic tissue, joint fluid

How to cite this article: Kuba M, Gallo J, Pluháček T, Hobza M, Milde D 2018. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res Part B* 2018;00B:000–000.

INTRODUCTION

One of the main and still unresolved problems of total joint arthroplasty is continual exposure of periprosthetic tissues to metal particles released from the bearing/non-bearing surfaces of total hip arthroplasty (THA) and knee arthroplasty (TKA). These particles contribute to the local adverse reaction to the implant, as well as to remote effects, by spreading throughout the body via blood and lymphoreticular dissemination.¹ The latter effects are still poorly understood despite several methods having been applied in various clinical and epidemiological studies.^{2,3} Therefore, it should still be considered an unproven hypothesis that these particles have potentially harmful effects on the immune system, liver, kidneys, and central nervous system.^{4–6}

Locally, metal particles and ions are toxic⁷ and potentially carcinogenic³ depending on concentrations. Finally, metal particles are well-known inducers of allergic hypersensitivity reactions.⁸ All of the aforementioned and other

metal-related side effects are now the center of attention. Metallic debris has been associated with pseudotumor formation, early aseptic loosening, and aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesions.⁹ Some studies have also demonstrated that the type of local tissue response depends on the metal content in the evaluated tissues.¹⁰

A considerable number of papers have addressed the concentrations of metals in body fluids, such as blood, serum or urine, looking for metals as markers of total joint arthroplasty (TJA) failure.¹¹ In contrast, less attention has been paid to other clinical materials, especially synovial fluid^{12,13} and periprosthetic tissues as representative samples to observe the total load of locally released metals.^{14,15}

The primary aim of the current study was to present the metal content (Ti, V, Nb, Co, Cr, Mo) in the joint fluid, periprosthetic tissues and peripheral blood of patients with other than metal-on-metal bearings to provide an insight into the total metallic load in patients with this type of TJA implant. The secondary aim was to associate the metal

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: D. Milde; e-mail: david.milde@upol.cz

Contract grant sponsor: Univerzita Palackého v Olomouci; contract grant number: PrF_2018_027

Contract grant sponsor: Grant Agency of the Ministry of Health; contract grant number: 16-31852A

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Youth and Sports; contract grant number: LO 1305

content in a particular body compartment with types of implants and their lengths of implant service. We hypothesized in this context that (1) implants with a longer time in service (i.e., length of implant service) would show higher tissue concentrations of particular metals, compared to those with a shorter period; (2) the metal content would be higher in periprosthetic tissues compared to joint fluid, indicating the chronic uptake and accumulation of metal particles and ions released from metallic surfaces; (3) the metal content would be higher in surface tissues than in deeper ones; and (4) there would be a difference in the metal content between total hip and knee arthroplasties. Whereas most of the published studies have been based on small sample sets, in our research, we studied a group of 117 subjects with a wide range of implanted replacements and 43 patients without any implants. Our study provided detailed insight into the distribution of metal particles across several body compartments, as well as information about the potential exposure of periprosthetic tissues to implant-related metals in this population of patients. The design of our study was pragmatic and strongly based on the epidemiologically analytical approach, and the samples were enrolled chronologically as the patients underwent surgery and regarding their individual conditions during the relatively long duration of the study. We believe that our complex approach could provide a better understanding of the topic of chronic exposition of the local and systemic environment to TJA metallic by-products.

MATERIAL AND METHODS

Laboratory instrumentation

All of the measurements were performed with an Agilent 7700x inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) (Agilent Technologies, Japan), equipped with an octopole reaction system (He mode, flow rate 4.3 mL min^{-1}). The typical operating conditions were: RF power 1550 W, plasma gas flow rate 15 L min^{-1} , auxiliary gas flow rate 0.9 L min^{-1} , and nebulizer gas flow rate 1.07 L min^{-1} . The following isotopes were selected for the determination: ^{47}Ti , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{59}Co , ^{93}Nb , and ^{95}Mo .

Reagents, standards, and certified reference materials

Single element certified reference materials (CRMs) with $1.000 \pm 0.002 \text{ g L}^{-1}$ (water calibration solutions, Analytika, Ltd., Czech Republic) for all of the measured elements were diluted to the required concentrations. A multielemental calibration solution containing Bi, In, Sc, Tb, and Y served as an internal standard. Three CRMs—TM-15.2 (EC, Canada), TORT-2 (NRC-CNRC, Canada) and Seronorm trace elements whole blood level 3 (Sero AS, Billingstad, Norway)—were used to validate the method, as well as for quality control of the ICP-MS measurements. The results for the method validation, as well as the limit of detection and concentration levels of CRMs, are presented in supplementary files (Tables S2 and S3). Nitric acid (AnalaPure, Analytika Ltd., Czech Republic) and hydrogen peroxide (analytical grade+, Analytika, Czech Republic) were utilized for the sample decomposition and preparation of calibration standards. Deionized

ultrapure water with resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ obtained from a Milli-Q water system (Millipore, France) was used for dilutions and rinsing.

Sample collection

Peripheral blood samples were collected in 10 mL polypropylene tubes. The joint fluid samples were aspirated into 5 mL tubes before incision of a joint capsule. A thin surface layer of the tissue covering the inner side of the joint capsule was collected after the incision of the knee/hip joint capsule. This layer (here called 1) was designated as the pseudosynovial membrane since it resembles the synovial membrane, and it was in a direct physical contact with the implant and prosthetic by-products (wear particles, metal ions, and so forth) contained in the joint fluid, in contrast to the tissue lying above (layer 2). Regarding the thickness of the tissue layer, the tissue layer 1 thickness was within 5 mm, while the thickness of tissue layer 2 was determined intraoperatively with the intention of not damaging the healthy periprosthetic tissues. As a result, the thickness of the tissue layer varied from 2 to 10 mm depending on the location of sampling and other local factors (layer 2 could not be sampled in a small number of the patients). The tissue samples were placed into sterile containers separately and deeply frozen at -80°C immediately after sampling.

Sample preparation

Prior to the decomposition step, the deeply frozen tissue samples were lyophilized (ALPHA 1–2 LD plus freeze drier, CHRIST, Germany) according to the lyophilization program composed of: main drying $3.5 \text{ h}/-25^\circ\text{C}/0.63 \text{ mbar}$; and final drying $0.5 \text{ h}/-76^\circ\text{C}/0.001 \text{ mbar}$; and it was subsequently divided into three separate aliquots. Each sample was warmed to the laboratory temperature. One milliliter of joint fluid, 1 mL of peripheral blood or 200 mg of periprosthetic tissue were utilized for microwave-assisted digestion, followed by the ICP-MS analysis of the implant-related metals. Microwave digestion of all of the samples was performed in a power controlled microwave digestion system MLS 1200 mega system (Milestone, Italy) with the addition of concentrated HNO_3 (2–4 mL) and H_2O_2 (1–2 mL), depending on the weight of the sample and the material under study. Subsequently, a microwave digestion program was used: 2 min/250 W, 5 min/400 W, 2 min/500 W, and 6 min/600 W, with 2 min/0 W of waiting between each step and a 30-min cooling interval after the end of the process. All of the tubes and containers used during sample preparation in the laboratory were pre-treated in 5% (v/v) HNO_3 for 24 h and then rinsed with deionized ultrapure water.

Subjects

The study included Czech Caucasian patients operated on between September 2008 and February 2014 by a single surgeon (JG) at a single institution. Our data reflected the total load of metals in the exposed population in our region during the period of enrollment. Samples of peripheral blood, joint fluid, and periprosthetic tissues were obtained from 43 controls without TJA and 117 subjects with TJA.

TABLE I. Patient Characteristics

	Patients (<i>n</i> = 117)	Controls (<i>n</i> = 43)
Age	39–92 (\bar{x} = 67.4)	53–82 (\bar{x} = 67.1)
Sex	Males 45/ females 72	Males 21/ females 22
Localization	73 hips/44 knees	11 hips/32 knees
<i>In situ</i> (months)	1–274 (\bar{x} = 130.7)	-
Height (cm)	143–189 (\bar{x} = 167.2)	158–182 (\bar{x} = 169.4)
Weight (kg)	50–120 (\bar{x} = 80.6)	60–118 (\bar{x} = 88.7)
Primary diagnosis	Primary OA—73 Secondary OA—44	Primary OA—38 Secondary OA—5
Reasons for revision	AL = 42 Inf = 13 Inst = 9 OL = 31 PJ = 15 PPF = 7	-

n, number of patients; \bar{x} , sample mean; OA, osteoarthritis; AL, aseptic loosening; Inf, infection; Inst, instability; OL, osteolysis; PJ, painful joint; PPF, periprosthetic fracture.

From this group, 42 patients were reoperated on for aseptic loosening of total hip arthroplasty (THA; *n* = 30) and total knee arthroplasty (TKA; *n* = 12), and 75 patients were reoperated on for other reasons and had stable implants at the time of surgery (THA: *n* = 43, TKA: *n* = 32). The same types of materials were collected from 43 patients with primary osteoarthritis undergoing THA (*n* = 11) and TKA (*n* = 32). This latter group served as control subjects without a TJA at the site of interest. For the patients' detailed characteristics, see Table I; a summary of the TJA materials is shown in the supplementary files (Table S1).

Limitations

Whereas our study was performed over a long period of time (2008–2014), several elements were included in the study (Mo, Nb) after the first series of experiments; collection of peripheral blood and joint fluid started later during the study as well, which resulted in different numbers of samples for individual elements, as well as materials under study. In addition, it was not always possible to sample the layer 2 tissue. Not all of the patients reoperated on during the period of study could be included, which might have incurred selection bias. The number of patients in the groups of particular implants was not identical, which could have affected the variability of the observed metal content at least partially. Some of the patients also had other TJAs than those that were included into the study, which could have affected the blood concentrations of the particular metals. The exact information about the metallic content of a particular implant was limited (only partly based on exact information from manufacturers). Some inaccuracy in tissue sampling could have occurred especially in relation to layer 2. To minimize the inter-surgeon differences in tissue sampling, the only surgeon (JG) obtained all of the samples in this study, including tissue samples.

Statistical analysis

The NCSS 2007 statistical software package (NCSS LLC) and the Statistica software package, version 12.0 (StatSoft), were used for the statistical analysis. Non-parametric two-tailed tests were used for hypothesis testing (level of significance $p = 0.01$). EffiValidation software package 3.0 (Effichem, Czech Republic) was used for limit of detection (LOD) calculation.

RESULTS

Method validation and quality control

The entire measurement procedure was validated with certified reference materials and the following parameters: LOD, linearity, precision and trueness. To ensure the quality of long-term measurements, the entire method was continuously monitored by measuring of the CRMs TM-15.2 and Seronorm trace elements whole blood (level 3). The results of the method validation, as well as the long-term measurement validation parameters, were appropriate for our purposes, and all of the details are presented in the supplementary files (Tables S2 and S3).

Descriptive statistics

The samples of 117 patients and 43 controls were analyzed, and descriptive statistics for all of the determined elements (Ti, V, Cr, Co, Nb, and Mo) in joint fluid, peripheral blood and periprosthetic tissues were calculated and are summarized in Table II. The mass concentration of the metals in $\mu\text{g kg}^{-1}$ was calculated based on the weight of the original samples. The descriptive statistics revealed a large dispersion of the data, especially in the tissue samples of the patient group. This dispersion is caused at least in part by the natural heterogeneity of our data, that is, different joints, reasons for revisions, months *in situ*, and types of implants compared. When the data of the patients and the controls were compared separately for each sampled material under study, we revealed significant differences for Ti, V, Cr, and Co in joint effusions and periprosthetic tissue samples but not in whole blood.

Comparison of the patient and control groups

The Mann-Whitney test was applied to compare all of the elements in all of the matrices. There were no statistically significant differences for the studied metals in the peripheral blood samples. Statistically significant differences were found only for Ti, V, Cr, and Co in the joint effusion and periprosthetic tissue samples, while no differences were found for Mo and Nb. An indicative comparison of all of the analyzed elements and matrices is presented in Figure 1. It is important to emphasize that only the samples originating from patients with metal present at the place of sampling (joint fluid, tissue) or with replacements made from this metal anywhere in the body (peripheral blood) were included for all of the statistics. Considering that significantly higher concentrations were found in periprosthetic tissues, all of the following statistical evaluations focused on this matrix.

TABLE II. Concentration of Metals in Control and Patient Groups for Joint Fluid, Peripheral Blood and Periprosthetic Tissue

Element	n		Mean ± SD (µg kg ⁻¹)		Median (µg kg ⁻¹)	
	Control	Patients	Control	Patient	Control	Patient
Joint Fluid						
Ti	36	71	11 ± 5	963 ± 5045	11	22
V	36	40	1 ± 0.2	10 ± 30	1	1
Cr	36	79	10 ± 28	59 ± 167	1	11
Co	36	77	3 ± 6	22 ± 48	1	6
Nb	36	26	1 ± 0.2	7 ± 16	1	1
Mo	25	49	6 ± 13	3 ± 3	2	2
Peripheral Blood						
Ti	15	70	29 ± 13	26 ± 14	27	24
V	16	42	1 ± 0	3 ± 10	1	1
Cr	13	77	8 ± 22	2 ± 2	1	1
Co	14	75	1 ± 0	1 ± 1	1	1
Nb	18	30	1 ± 0	1 ± 0	1	1
Mo	18	62	2 ± 2	4 ± 12	1	2
Periprosthetic Tissue (In Patient Group—Layer 1)						
Ti	22	76	367 ± 957	27,330 ± 100,900	124	2349
V	22	42	15 ± 41	234 ± 430	5	47
Cr	22	68	381 ± 575	8876 ± 26,880	170	1079
Co	22	77	45 ± 109	6522 ± 16,380	11	709
Nb	22	22	7 ± 11	228 ± 614	4	4
Mo	21	56	27 ± 27	682 ± 1637	16	44
Periprosthetic Tissue (In Patient Group—Layer 2)						
Ti	n/a	49	n/a	22,050 ± 140,600	n/a	851
V	n/a	26	n/a	34 ± 43	n/a	15
Cr	n/a	47	n/a	3527 ± 8969	n/a	825
Co	n/a	43	n/a	1841 ± 8636	n/a	90
Nb	n/a	18	n/a	39 ± 103	n/a	4
Mo	n/a	38	n/a	215 ± 941	n/a	21

n, number of patients; SD, standard deviation; n/a, not available.

Difference in the metal content between total hip and knee arthroplasties

The Mann-Whitney test was used to compare the total concentration levels of metals released from the hip and knee. Statistically significant differences were found only for Ti and V (higher concentrations were found in the hip), while none were found for Cr, Co and Mo. Niobium was not compared because none of the patients in our study group had knee replacements containing alloy of Nb.

Comparison of obtained tissue layers

Wilcoxon's signed-rank test was used for the comparison of the metal concentrations between two layers of the

periprosthetic tissue as a matter of distance from the joint cavity. Acetabular/femoral components, made from Ti, Ti-Al-V, Co-Cr, and Co-Cr-Mo, were compared. Significant differences between these layers for all of the studied elements were observed with the exception of Nb. As a result, we believe that the layer 1 tissues should reflect more closely the total load of metals than the layer 2 tissues.

Principal component analysis

Considering that we had a multivariate dataset, an advanced statistical technique (i.e., principal component analysis (PCA)) was applied to examine the true relationships among our data. This approach allowed us to reveal strong patterns

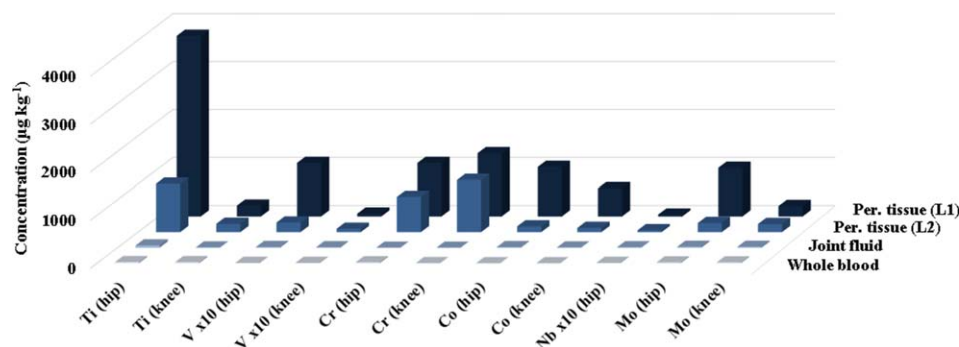


FIGURE 1. Indicative comparison of all the analyzed elements and matrices, presented by medians. L2, periprosthetic tissue layer 2; L1, periprosthetic tissue layer 1.

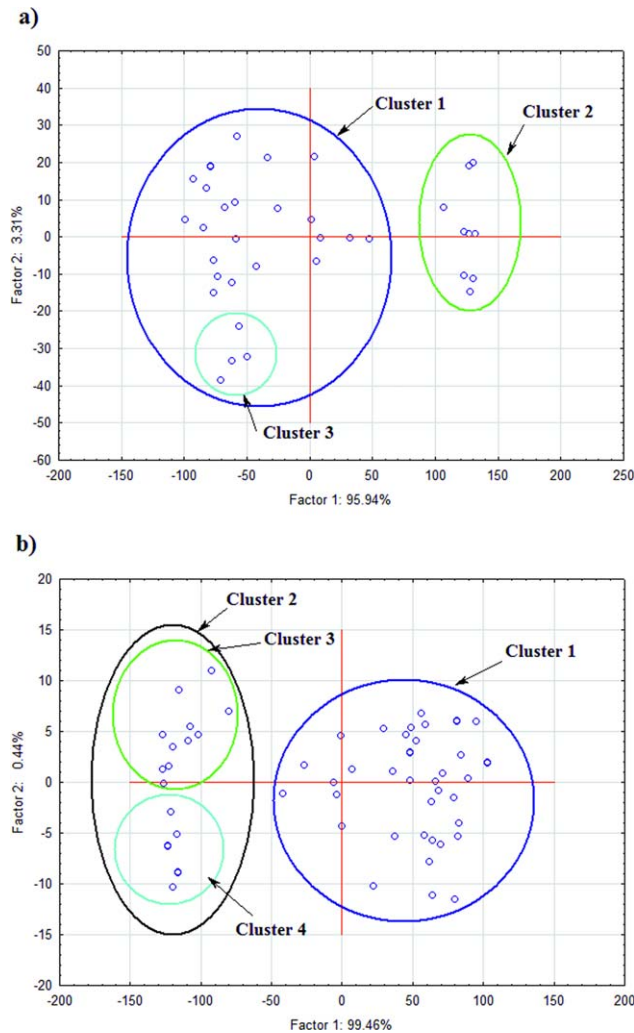


FIGURE 2. Components loadings plot for Ti-Al-V (a) and Co-Cr-Mo (b).

existing in the dataset. Statistical testing was performed on the data derived from tissue samples from joints where one of the components made of the most frequently used alloys, such as Ti-Al-V ($n = 40$) and Co-Cr-Mo ($n = 60$). The following original variables were included in the PCA model: analyzed metals (Ti, V/Co, Cr, Mo); reason for surgery; joint (hip/knee); months *in situ* (overall 1–274); sex (male/female); and BMI (body mass index), which was calculated instead of using of the patients' height and weight. Box-Cox transformation was applied to the dataset prior to PCA. For the analysis of the Ti-Al-V group, 95.94% of the variability could be explained by the first principal component, which was strongly correlated with the variable of months *in situ* according to the factor coordinate variables. The components loadings plot [Figure 2(a)] revealed two main, clearly recognizable clusters. Cluster 2 was recognized as the group of patients with a short period of replacement *in situ* ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 13.5$) and cluster 1 as the group of patients with a long period of replacement *in situ* ($n = 29$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 182.8$). A small group of 4 points (cluster 3) was identified at the bottom side of cluster 1. What these

subjects had in common is that they had a high BMI ($n = 4$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 35.5$). Moreover, cluster 2 had higher BMI ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 34.0$) than the others ($n = 33$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 26.5$). For Co-Cr-Mo alloys, 99.46% of variability could be explained by the first principal component, which was strongly correlated with the variable of months *in situ* according to the factor coordinate variables. The components loadings plot also revealed two main, clearly recognizable groups [Figure 2(b)], similarly to the PCA for Ti-Al-V. Cluster 2 was recognized as the group of patients with a short period of replacement *in situ* ($n = 19$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 27.6$) and cluster 1 as the group of patients with a long period of replacement *in situ* ($n = 41$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 179.2$). Higher BMI in the patients with a short period of replacement *in situ* was not clearly confirmed: $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 30.1$, compared to the patients with a long term $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 27.1$. However, cluster 2 could be additionally divided into cluster 3 ($n = 11$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 25.5$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 37.0$) and cluster 4 ($n = 8$, $\bar{x}_{(\text{BMI})} = 36.5$, $\bar{x}_{(\text{months in situ})} = 43.5$).

Comparison between reasons for surgery

The patients included in this study were reoperated on either for aseptic loosening of at least one component of total joint arthroplasty, or they had the whole implant stable at the time of surgery. We speculated that the former group could have increased levels of particular metals compared to the latter due to direct mechanical damage to the metallic surface of the TJA. The results for the aforementioned groups are graphically expressed by the medians and are compared with the control group in Figure 3.

Length of implant service

To show the total metallic burden over time, it is necessary to choose suitable "time windows" for the entire group of patients/implants. Ideally, the NICE (National Institute for health and Care Excellence) criteria might be used as in clinical practice. However, the design of the study (accidental enrollment, ethical rules, and so forth) precluded the use of strictly predefined checkpoints during the follow-up. Instead, the patients (implants) were classified according to outcomes resulting directly from PCA, in which the first principal component was strongly correlated with the variable "months *in situ*". As a result, the first group consisted of patients reoperated on within 75 months after the index surgery, while in the second group, the length of implant service was between 76 and 274 months. The median for each group was calculated for the hip and knee joints separately, and the results are summarized in Table III. Box and whisker plots for Ti (hip) and Cr (knee) are shown in Figure 4 (for the remainder of the elements, see the supplementary information file—Figures S1–S9 online). There was a visually distinguishable trend for the majority of the elements.

DISCUSSION

Although the clinical benefits of articular replacements are unexceptionable, the release of metals from implants may be associated with adverse health effects in some patients.

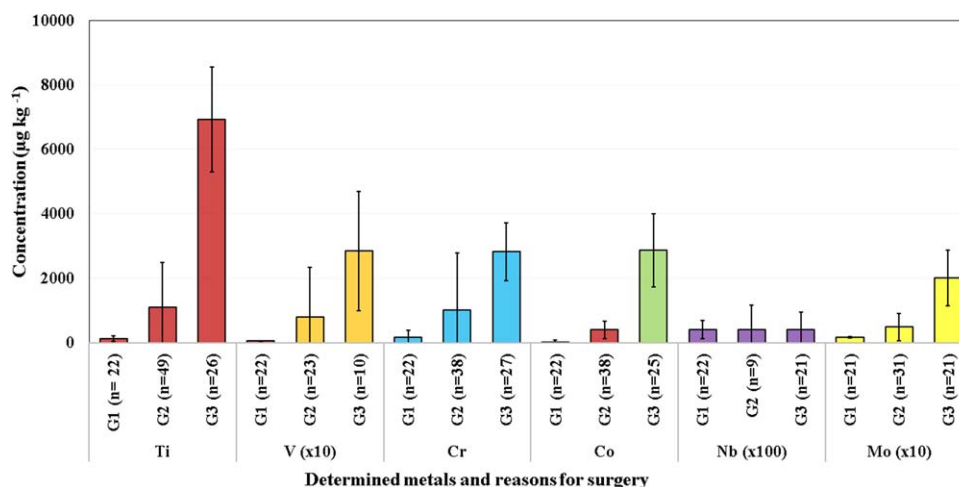


FIGURE 3. Indicative comparison of metals concentrations related to reasons for surgery, presented by median. G1, control group; G2, stable implants; G3, aseptic loosening; n, number of patients.

On the other hand the permanent release of metals is not necessarily a substantial problem in the majority of patients with TJA. As described in the literature, various releasing mechanisms and procedures can occur¹¹ during the lifetime of the implant in the body, considering that no metal or alloy is fully inert.¹⁵ The interactions of these metals with biomolecules,¹⁶ toxicity to T-cells, cancer risk,³ chromosomal damage¹⁷ and potentially adverse effects⁷ continue to be widely discussed.

In our study, the metal content in joint fluid, periprosthetic tissues and peripheral blood was investigated in a large set of patients. The results of our study can be formulated as two leading conclusions, which are supported by further results as well. First, our results conclusively showed that the majority of released metals were deposited in periprosthetic tissues. Second, there was a clearly time-dependent manner of metallic accumulation. All of the results are discussed in detail in following paragraphs.

The concentration levels found in peripheral blood in the control group that we report on were comparable with the published studies worldwide,¹⁸⁻²⁰ and in our region.²¹ Only a slightly higher concentration of titanium was observed. Unfortunately, in the majority of cases, the concentration levels in the control group were not reported for periprosthetic tissues in the literature and only rarely for joint fluid.¹³ The concentration levels in joint fluid and whole blood in the patient group were comparable with the levels reported in reviews addressing ion concentrations after implantation.^{11,14} Similarly, elevated concentrations for metals in tissues were reported.¹⁴ The authors of this study note that it is difficult to compare these values reported directly with the data presented in this article because of the great variety of factors influencing the results. This study showed that the bloodstream is relatively protected from the accumulation of substantial concentrations of released metals regardless of the relatively large number of

TABLE III. Concentration of Metals Related to Survivorship of Total Hip and Knee Replacements.

Element	Control Group		Months <i>In Situ</i>			
	n	Median (µg kg ⁻¹)	0-75		76-274	
			n	Median (µg kg ⁻¹)	n	Median (µg kg ⁻¹)
Hip						
Ti	22	124	8	1127	47	4313
V	22	5	4	13	26	125
Cr	22	17	9	1047	37	1155
Co	22	11	9	985	34	1197
Nb	22	4	6	4	19	4
Mo	22	16	8	101	34	171
Knee						
Ti	22	124	13	129	8	2304
V	22	5	10	5	4	10
Cr	22	17	18	723	15	2895
Co	22	11	18	338	15	3511
Mo	22	16	7	16	10	78

n, number of patients.

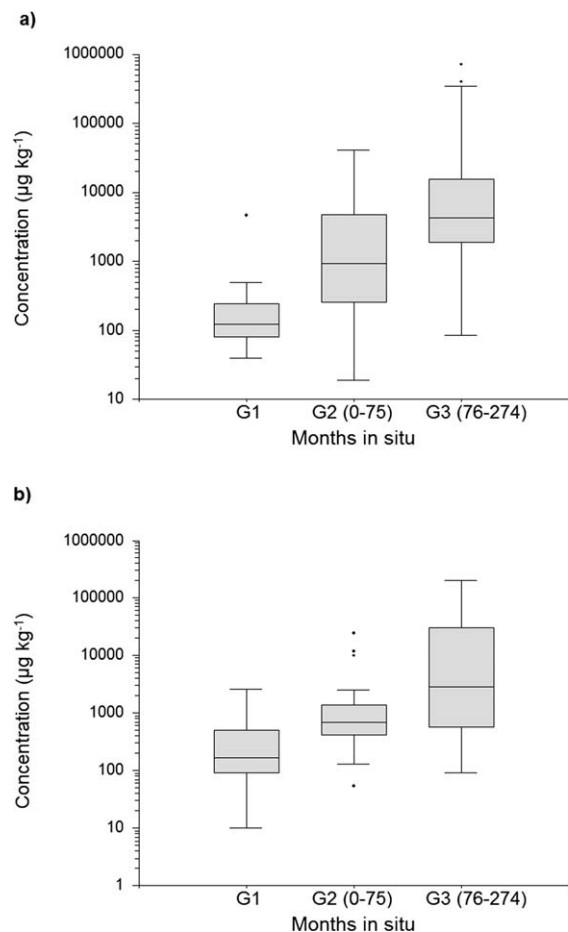


FIGURE 4. Concentration of Ti in periprosthetic tissues in hip (a) and Cr in knee (b) related to survivorship of implants. G1, control group; G2, short period of replacement *in situ* (0–75 months); G3, long period of replacement *in situ* (76–274 months).

implants used in the patients under study and for different time periods. Other variables, such as reasons for failure, sex and BMI, did not affect the blood concentrations of the examined metals either. Importantly, this study involved only implants combining polyethylene with metallic or ceramic counterparts. Significant differences in the concentrations of metals coming from TJA in the peripheral blood have been described in the literature for metal-on-metal bearings,^{22–24} as well as other articulating pairs.²⁵ Therefore, it must be assumed that the bloodstream participates in metallic dissemination to the organs. Thus, finding substantial metal concentrations in the plasma indicates that the clearance capacity of the blood system must be overcome at the time of sampling, which could be caused by a higher burden of metallic by-products in the patients whom an increased concentration was detected in. Thus, the mentioned discrepancy could lie at least partially in different dynamics of metal release from the implant surface. On the other hand, our results agree with literature to some extent where statistically significant differences for several elements in synovial fluids were also found.^{12,13,26} Our results showed that the bloodstream is not an effective biomarker

of the effects occurring in local tissues due to non-metal-on-metal bearing. Nevertheless, this finding does not exclude individual cases in which monitoring of the bloodstream could be a useful indicator of implant malfunction,²⁷ and several researchers have reported that the serum metal ion level did not exclude this diagnosis.²⁴

As we hypothesized, the metallic burden in patients with TJA should increase over time, depending on the time in service of the implants under study. We found a visually distinguishable trend for the majority of elements, confirming this prediction. The only exceptions were chromium and cobalt in the hip, for which the concentrations in the short-term group were outside of the predicted trend. Our data presented in Table III show that the proportions of released Co and Cr did not agree with their theoretical alloy compositions. Our results showed that Cr was the predominantly released metal in patients with short-term replacement *in situ*. In contrast, in patients with long-term replacement *in situ*, the proportions of Cr and Co were closer to the alloy compositions. This phenomenon could be explained by Co-Cr-Mo-based alloys being covered with a thin layer of Cr₂O₃, increasing alloy bio-resistance.^{28,29} Differences in this proportion were especially recognizable from the results of knee arthroplasty.

Unfortunately, in the majority of the cases, there were no statistically significant differences because of the great spread of the data. The results of Mo and Nb were affected by values very close to the limit of detection, likely due to their low content in the used alloys. Time-dependent changes in metal concentrations have been discussed in several studies, describing a stagnant concentration plateau for whole blood or serum after the first months/years after implantation if the prosthesis is functioning well.³⁰ In contrast, with these studies, our results found a continually increasing metallic burden after the initial load in periprosthetic tissues, which could be associated with both the continuous pressure of corrosive factors and/or inefficiency in creating an effective barrier on the implant surface to prevent metallic ions from being released.³¹ Simultaneously, there is information about periprosthetic tissues not having a powerful mechanism of clearance, such as blood plasma does. The most affected tissues are in direct contact with metallic surfaces.

The results of our study also confirmed our hypothesis about the concentration gradient of released metals in surrounding tissues. Both the layers of periprosthetic tissues were statistically compared, and the dependence of the concentration on the distance from the joint cavity was confirmed. To the authors' best knowledge, similar results have not yet been published. Based on our findings, we can conclude that the "permeability" of the pseudosynovial tissue for metallic by-products is relatively low; thus, this membrane protects the organism at least partially from unregulated dissemination of metals released from the implant surface.

It is not clear whether metals are released more from THA or TKA. Looking at the absolute figures, the differences seem small. A role could be played by differences in

particular surface metallurgy, the size of the implant surface from which a particular metal might be released into the joint fluid or differences related to the construction list of an implant (type of bearings, modular or non-modular nature, head-neck interface, additional screw fixation, and so forth). In Table III, it can also be observed that there were differences between the quantities of early reoperated patients with hip and knee arthroplasties. We found higher concentrations of Ti and V in hip samples relative to their content in THA. In contrast, no statistically significant differences were observed for Cr, Co, and Mo; thus, we are not able to conclusively confirm that there were differences in the metal contents between total hip and knee arthroplasties. Similarly, although we analyzed an enormous dataset, we were not able to conclusively determine which type (manufacturer) of implant burdens the patient with metal more than others because of the very small numbers of patients with particular type of implant.

We were able to evaluate additional conclusions, which were not hypothesized before the start of study, owing to the large dataset. First, the patients included in the study were reoperated on for several reasons. The patients with loosened implants had higher levels of metals compared to those with stable implants due to motion between the implant and its firm surroundings, resulting in accelerated surface damage (Figure 3). Studies investigating the mechanisms of metallic release suggested contributions of both particles and ions.²⁸ We found a trend toward higher concentrations in the patients reoperated on for aseptic loosening, supporting the above assumptions. These results were in partial agreement with some studies focusing on metal concentrations after implant loosening in whole blood, serum or urine,^{19,32} and elevated metal concentrations after aseptic loosening in serum were also published.³³ In addition, similar results were reported in which well-functioning and malfunctioning implants were compared by means of synovial fluid, serum and pseudocapsule.^{12,34} Our data confirmed that metals were continuously released in the human body, especially to surrounding tissues, regardless of whether the implant was stable or not. Finally, we analyzed whether a higher risk of early reoperation could be associated with relevant changes in the metallic profiles in patients with higher BMI because heavier patients could induce greater stress on the implant surfaces/interfaces. The concentrations of Ti and V did not differ in relation to BMI in this study, but only a small number of subjects were available here, and a future study will be needed. A different situation was observed with Co-Cr-based alloys, with which statistically higher concentrations of Cr were determined in the higher BMI patient group, compared to lower BMI subjects. According to our best knowledge, this study was the first that revealed the relationship between Cr concentrations and BMI.

CONCLUSIONS

We successfully developed and validated a measurement procedure for simultaneous multielemental determination of

selected metals (Ti, V, Cr, Co, Nb, Mo) in various clinical samples. This procedure was subsequently applied to a large sample of clinical patients with TJA. Very low concentrations of released metals were found in whole blood and joint fluid. Regarding the bloodstream, we found that the systemic metallic burden driven by metal-on-polyethylene and ceramic-on-polyethylene TJAs was very low across a wide spectrum of implant types and time periods. In contrast, we found increased concentrations of particular metals in periprosthetic tissues. Tissues accumulated particular metals relative to the time and distance from TJA. Moreover, patients with aseptic loosening had higher concentrations of metals in tissues than patients with stable implants and the controls. Finally, it is clear that the metals released from TJA surfaces accumulate in the body (esp. the tissues around the implant) over the time elapsing since surgery. However, the levels of released metals were not extremely high, compared with those found in studies of metal-on-metal implants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pavol Buňa, M.D., and Jiří Lošťák, M.D., Ph.D. for their contribution to collection of data from clinical database.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The written informed consent about the use of blood, joint fluid, and periprosthetic tissues for the purpose of this study was obtained from each subject, and this study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Olomouc and the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc (reference number 168/09) as a part of research projects IGA Ministry of Health, Czech Republic; NS10260, NT11049. All the methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations valid for the Teaching Hospitals in the Czech Republic and in accordance with the current regulatory practice for clinical research in the Czech Republic.

REFERENCES

1. Novak CC, Hsu AR, Della Valle CJ, Skipor AK, Campbell P, Amstutz HC, Jiranek WA, Onyike A, Pombar XF, Jacobs JJ. Metal ion levels in maternal and placental blood after metal-on-metal total hip arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2014;43(12):E304–E308.
2. Visuri T, Borg H, Pulkkinen P, Paavolainen P, Pukkala E. A retrospective comparative study of mortality and causes of death among patients with metal-on-metal and metal-on-polyethylene total hip prostheses in primary osteoarthritis after a long-term follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:78.
3. Brewster DH, Stockton DL, Reekie A, Ashcroft GP, Howie CR, Porter DE, Black RJ. Risk of cancer following primary total hip replacement or primary resurfacing arthroplasty of the hip: A retrospective cohort study in Scotland. *Br J Cancer* 2013;108(9):1883–1890.
4. Gunaratnam M, Grant MH. The interaction of the orthopaedic metals, chromium VI and nickel, with hepatocytes. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(10–12):945–948.
5. Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, Perka C, Schulze F, Ode A. Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro. *Biomaterials* 2016;98:31–40.

6. Pearson MJ, Williams RL, Floyd H, Bodansky D, Grover LM, Davis ET, Lord JM. The effects of cobalt-chromium-molybdenum wear debris in vitro on serum cytokine profiles and T cell repertoire. *Biomaterials* 2015;67:232–239.
7. Gill HS, Grammatopoulos G, Adshead S, Tsiologiannis E, Tsiridis E. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty. *Trend Mol Med* 2012;18(3):145–155.
8. 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(1):172–180.
9. 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.
10. C H Lohmann, H Meyer, J V Nuechtern, G Singh, S Junk-Jantsch, H Schmotzer, M M Morlock, G Pflüger, 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(17):1561–1568.
11. Matusiewicz H. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles—A systematic analytical review. *Acta Biomater* 2014;10(6):2379–2403.
12. Brien WW, Salvati EA, Betts F, Bullough P, Wright T, Rimnac C, Buly R, Garvin K. Metal levels in cemented total hip arthroplasty—A comparison of well-fixed and loose implants. *Clin OrthopRelat Res* 1992(276):66–74.
13. Beraudi A, Catalani S, Montesi M, Stea S, Sudanese A, Apostoli P, Toni A. Detection of cobalt in synovial fluid from metal-on-metal hip prosthesis: Correlation with the ion haematic level. *Biomarkers* 2013;18(8):699–705.
14. Sargeant A, Goswami T. Hip implants—Paper VI—Ion concentrations. *Mater Des* 2007;28(1):155–171.
15. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Filgueira L. Metal is not inert: Role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening—Current concepts. *J Biomed Mater Res Part A* 2009;91A(4):1252–1262.
16. Nuevo-Ordóñez Y, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Paz-Aparicio J, Raimundez JD, Tejerina JM, Peña MA, Sanz-Medel A. Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(9):2747–2754.
17. Daley B, Doherty AT, Fairman B, Case CP. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br Vol* 2004;86B(4):598–606.
18. Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz-Jiménez J, Sanz-Medel A. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal Bioanal Chem* 2008;391(7):2583–2589.
19. Liu TK, Liu SH, Chang CH, Yang RS. Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty. *Tohoku J Exp Med* 1998;185(4):253–262.
20. Antoniou J, Zukor DJ, Mwale F, Minarik W, Petit A, Huk OL. Metal ion levels in the blood of patients after hip resurfacing: A comparison between twenty-eight and thirty-six-millimeter-head metal-on-metal prostheses. *J Bone Joint Surg Am Vol* 2008;90A:142–148.
21. Kuera J, Bencko V, Sabbioni E, Vandervenne M. Review of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evaluation of their possible use as reference values. *Sci Total Environ* 1995;166(1):211–234.
22. Nuevo Ordóñez Y, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Paz-Jiménez J, Tejerina-Lobo JM, Peña-López JM, Sanz-Medel A. Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins. *J Anal Atomic Spectrom* 2009;24(8):1037–1043.
23. Dunstan E, Sanghrajka AP, Tilley S, Unwin P, Blunn G, Cannon SR, Briggs TWR. Metal ion levels after metal-on-metal proximal femoral replacements—A 30-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br Vol* 2005;87B(5):628–631.
24. Grammatopoulos G, Munemoto M, Pollalis A, Athanasou NA. Correlation of serum metal ion levels with pathological changes of ARMD in failed metal-on-metal-hip-resurfacing arthroplasties. *Arch Orthop Trauma Surg* 2017;137(8):1129–1137.
25. Kreibich DN, Moran CG, Delves HT, Owen TD, Pinder IM. Systemic release of cobalt and chromium after uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78(1):18–21.
26. Lugowski SJ, Smith DC, McHugh AD, Vanloon JC. Determination of chromium, cobalt and molybdenum in synovial fluid by GFAAS. *J Trace Elements Electrol Health Dis* 1991;5(1):23–29.
27. Fox KA, Phillips TM, Yanta JH, Abesamis MG. Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components. *Clin Toxicol (Phila)* 2016;54(9):874–877.
28. Liao YF, Hoffman E, Wimmer M, Fischer A, Jacobs J, Marks L. CoCrMo metal-on-metal hip replacements. *Phys Chem Chem Phys* 2013;15(3):746–756.
29. Lewis AC, Heard PJ. The effects of calcium phosphate deposition upon corrosion of CoCr alloys and the potential for implant failure. *J Biomed Mater Res Part A* 2005;75A(2):365–373.
30. Jacobs JJ, Skipor AK, Campbell PA, Hallab NJ, Urban RM, Amstutz HC. Can metal levels be used to monitor metal-on-metal hip arthroplasties? *J Arthrop* 2004;19(8):59–65.
31. Ryu JJ, Shrotriya, P. Synergistic mechanisms of biotribocorrosion in medical implants. In: Yan Y, editor. *Bio-tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing; 2013. p 25–44.
32. Leopold SS, Berger RA, Patterson L, Skipor AK, Urban RM, Jacobs JJ. Serum titanium level for diagnosis of a failed, metal-backed patellar component. *J Arthrop* 2000;15(7):938–943.
33. Lazennec JY, Boyer P, Poupon J, Rousseau MA, Roy C, Ravaud P, Catonne Y. Outcome and serum ion determination up to 11 years after implantation of a cemented metal-on-metal hip prosthesis. *Acta Orthop* 2009;80(2):168–173.
34. Hallab NJ, Mikecz K, Vermes C, Skipor A, Jacobs JJ. Orthopaedic implant related metal toxicity in terms of human lymphocyte reactivity to metal-protein complexes produced from cobalt-base and titanium-base implant alloy degradation. *Mol Cell Biochem* 2001;222(1–2):127–136.

Klinické aspekty dlouhodobé přítomnosti kloubní náhrady v lidském těle: zátěž kovy

Clinical aspects of long-term presence of total joint arthroplasties in human body: metal load

Martin Hobza, Jiří Gallo

Ortopedická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, tel.: 588 443 607, e-mail: jiri.gallo@volny.cz

Souhrn:

V souvislosti s neúspěchem TEP kyčle typu kov-kov se oživil zájem o problematiku dlouhodobé akumulace kovů pocházejících z kloubní náhrady. Přitom je známo, že kovy se uvolňují také z ostatních typů kloubních náhrad, zejména mechanismem koroze. Kovy se dostávají do výpotku a do tkání, působí cytotoxicky, mohou indukovat změny DNA a stimulovat imunitní systém. Pravděpodobně nejdiskutovanějším tématem v souvislosti s kovy je alergická reakce a její podíl na předčasném selhání implantátu. Přes veškerý výzkum nepanuje v této otázce shoda. Některé vlivné odborné společnosti dokonce roli pozdní přecitlivělosti na kovy marginalizují a připouští pouze jako diagnózu per exclusionem. Obavy panují také z dlouhodobé akumulace kovů v těle, zejména u mladých pacientů. Nepodařilo se však prokázat ani genotoxický, ani karcinogenní efekt. Některé experimentální studie dokládají, že by se kovy uvolněné z povrchu kloubní náhrady mohly připojit k ostatním materiálům (polyetylen, kostní cement) při stimulaci nespecifické zánětlivé odpovědi, která se podílí na vzniku aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy. V článku jsou shrnuty současné pohledy na problematiku působení kovů na periprotetické tkáně i důsledky systémové zátěže.

Klíčová slova: totální endoprotéza, kovy, alergie, koroze, toxicita, karcinogeneze

Summary:

In the context of metal-on-metal hip replacement failure, concerns regarding long-term accumulation of metals originating from joint replacement have been raised again. It is known at the same time that metals are released from other implant types as well, mainly by corrosion. Metals are released into surrounding tissues and joint fluid, produce cytotoxicity, stimulate immune reaction and can induce a DNA change. The most discussed topic regarding metals in joint arthroplasty probably is the allergic reaction and its contribution to premature implant failure. There still is no consensus on this topic despite all the research that has been made. Some clinical societies even marginalise the significance of late hypersensitivity and acknowledge the allergy only as a diagnosis of exclusion. So far, there is no definite evidence for a genotoxic or carcinogenic effect. Some experimental studies suggest that released metals in addition to other materials (polyethylene, bone cement) can take part in the innate immune response leading to periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. This article summarises current views on the metal load effect on periprosthetic tissues and systemic metal burden effects.

Key words: total joint replacement, metal, allergy, corrosion, toxicity, carcinogenesis

Ortopedie 2020;1:23–28

Úvod

V současnosti narůstá počet primárních totálních endoprotéz (TEP) kyčlí a kolen. Důvody souvisí nejen s populační dynamikou, ale i s tím, že pro pokročilé formy osteoartrózy stále nemáme klinicky užitečnou léčebnou alternativu. Obecně se kloubní náhrada skládá z těla, které bývá obvykle vyrobeno z kovové slitiny, a kloubního povrchu, který může tvořit pár kov-polyetylen, keramika-polyetylen, případně keramika-keramika (dříve se uváděl i kov-kov). Přes veškerý pokrok v metalurgii je zřejmé, že neexistuje

implantát, který by do svého okolí neuvolňoval alespoň minimální množství kovů, z nichž je vyroben. Řada studií prokazuje přítomnost kovů uvolněných z kloubních náhrad v periprotetických tkáních a výpotku (7, 32) a v některých případech i v místech od kloubu značně vzdálených (28).

Kontinuální přísun zejména těžkých kovů může v těle vyvolávat nežádoucí účinky. Protože se na světě každý rok implantuje několik milionů endoprotéz kyčlí, kolen a dalších náhrad, jde nepochybně o potenciální populační riziko. Přitom je zřejmé,

že se jednotlivé kloubní náhrady mezi sebou budou navzájem lišit také v parametru „uvolňování kovových částic či iontů“. Ten se ovšem nedá vyčíst z registrů kloubních náhrad ani z klinických studií hodnotících výsledky operace. Proto je nutné se potenciálně škodlivým účinkům kovů uvolňujícím se z povrchů endoprotéz věnovat.

Cílem našeho sdělení je sumarizovat aktuální poznatky v této oblasti a nabídnout ortopedům ucelený pohled na problematiku, které se běžně nevěnují, která však může ovlivnit život jejich pacientů.

Slitina	Ni	N	Co	Cr	Ti	Mo	Al	Fe	Mn	Cu	W	C	Si	V
Nerez ocel														
(ASTM F138)	10,0–15,5	<0,5	†	17,0–19,0	†	2,0 – 4,0	†	61,0–68,0	†	<0,5	<2,0	<0,06	<1,0	†
CoCrMo slitiny														
(ASTM F75)	<2,0	†	61,0–66,0	27,0–30,0	†	4,5 – 7,0	†	<1,5	<1,0	†	†	<0,35	<1,0	†
(ASTM F90)	9,0–11,0	†	46,0–51,0	19,0–20,0	†	†	†	<3,0	<2,5	†	14,0–16,0	<0,15	<1,0	†
Ti slitiny														
CP Ti (ASTM F67)	†	†	†	†	99,0	†	†	0,2–0,5	†	†	†	<0,1	†	†
Ti-6Al-4V (ASTM F136)	†	†	†	†	89,0–91,0	†	5,5–6,5	†	†	†	†	<0,08	†	3,5–4,5

Tab. 1 Nejčastěji používané slitiny v ortopedii a váhové zastoupení jejich složek dle standardů American Society for Testing and Materials (ASTM vol. 13.01.) (30): Ni – nikl, N – dusík, Co – kobalt, Cr – chrom, Ti – titan, Mo – molybden, Al – aluminium, Fe – železo, Mn – mangan, Cu – měď, W – wolfram, C – uhlík, Si – křemík, V – vanad; † představuje <0,05 %

Kovové biomateriály pro endoprotetiku

Nejčastěji se setkáme se třemi skupinami materiálů: chirurgická ocel (obvykle 316L, vyrobeno dle standardu ASTM F138/F139), chromkobaltová slitina (CoCr) včetně modifikací nebo čistý titan (CP Ti, commercially pure titanium) či jeho slitiny s hliníkem, vanadem, niobem a ostatními kovy. Cementované implantáty jsou obvykle z CoCr slitiny, případně z oceli, necementované bývají obvykle vyrobeny z titanu a jeho slitin. CoCr slitina nabízí dobrou abrazivní odolnost a superhladký povrch, proto z ní bývají vyrobeny hlavice pro TEP kyčle anebo femorální komponenty TEP kolena (51). Naopak titan a jeho slitiny vykazují horší tribologickou odolnost (58), avšak poskytují dobré podmínky pro osteointegraci a mají elasticitu blízkou kosti (59).

Mechanismy degradace kovových povrchů *in vivo*

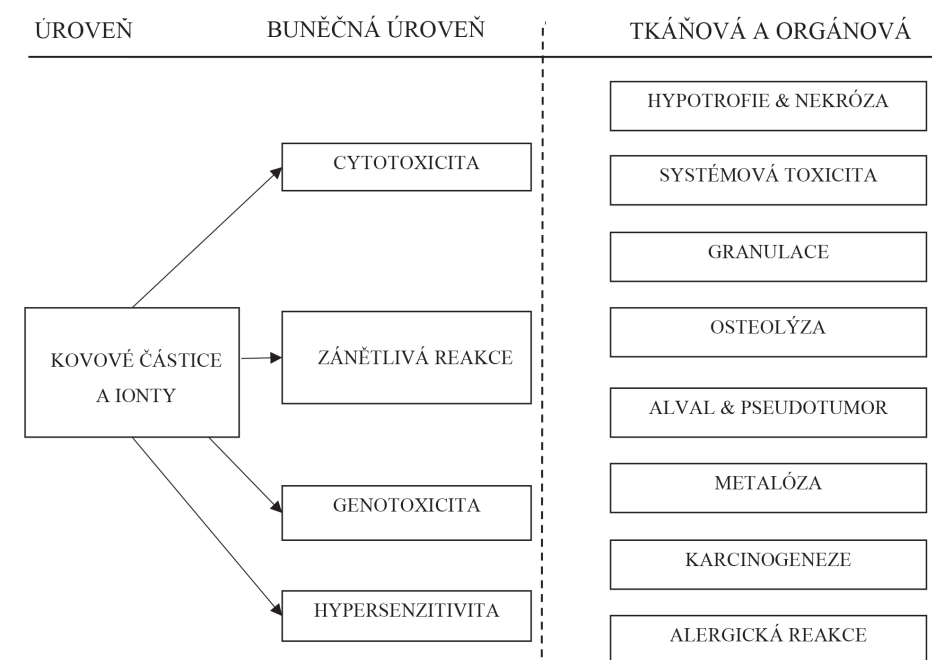
Dosud bylo popsáno několik mechanismů vedoucích k uvolnění kovů ve formě nanočástic či iontů z povrchu kovových částí TEP, přičemž dominující jsou koroze a otěr (14). *In vivo* je implantát obklopen tkáněmi, které spolu s tkáňovým mokem mohou působit jako elektrolyt. Dále na povrch TEP přímo působí buňky imunitního systému, které ještě mohou měnit pH a tvořit volné radikály. To podporuje korozivní procesy, kterými jsou do okolí uvolňovány kovové ionty (21). Kromě ušlechtilých kovů je každá slitina na povrchu pokryta vrstvičkou svých oxidů (tzv. pasivace), která ji chrání před další korozi. Pasivační vrstva může být mechanicky poškozena, což vede k obnažení

povrchu a progresi koroze. Právě rychlost repasivace určuje odolnost daného materiálu vůči korozi – titanové slitiny mají mnohem rychlejší repasivaci než nerezavějící ocel, a jsou tedy mnohem odolnější vůči korozi (29). Dále dochází k tvorbě kovových mikročástic cestou otěru v oblasti artikulacních povrchů. Tento jev je typický zejména pro endoprotézy typu kov-kov (MoM, metal-on-metal), avšak je prokázán i u kombinace kov-polyetylen (6). Tyto částice dosahují většinou velikosti do 0,05 μm, detaily jsou popsány jinde (2). Zvláštním případem je trunionóza, což je souběh mechanického otěru a několika korozivních mechanismů

v oblasti modulárních spojů typu kov-kov či kov-keramika, nejčastěji u TEP kyčle (41). Jednak zde dochází k mikropohybům v oblasti spoje, což abraduje povrch a rozrušuje pasivační vrstvu, jednak se implantát nachází v hypoxickém prostředí, kde alterované pH a lokální elektrochemické rozdíly podporují galvanickou korozi (9, 14).

Základní typy biologického působení kovů na jejich okolí

Přehled biologických efektů kovů na buněčné úrovni a relevantních klinických projevů je popsán v obrázku 1. Kovové částice



Obr. 1 Biologické působení kovů na buněčné úrovni a indukované klinické projevy

a ionty mohou působit cytotoxicky, indukovat oxidativní stres, poškozovat DNA a vyvolávat imunitní odpověď (21). Uvolněné ionty jsou vázány na proteiny, s nimiž tvoří antigenní komplex, který vyvolává imunitní odpověď na lokální nebo i systémové úrovni (19). Tato imunitní reakce je jak specifická, zaměřená přímo na antigen daného kovu, tak i nespecifická, reagující na kovové částice jako na cizí těleso. Oba typy reakce na kovy se do jisté míry podílí na indukcii periprotetické osteolýzy (38). V souvislosti s lokální reakcí na kovy se objevilo několik termínů: ARMD (Adverse Reaction to Metal Debris), který všeobecně pokrývá celé spektrum výše popsaných dějů, a jeho podskupinou jsou ALTR (Adverse Local Tissue Reaction), popisující pouze lokální reakci na kovy přítomné ve tkáních, a v této skupině je tradičně veden pseudotumor, osteolýza s aseptickým uvolněním a ALVAL (Aseptic Lymphocyte-dominated Vasculitis-Associated Lesion). Jedním z přímých následků lokální cytotoxicity kolem implantátu s pravděpodobným podílem hypersensitivitu je nekróza (39).

Ostatní jevy jako systémová toxicita či genotoxicita jsou přímým důsledkem vyšší systémové zátěže a především fyzikálně-chemického působení těžkých kovů na cílové tkáni (14).

Alergie na kovy

Okolnosti a význam alergické reakce na endoprotézu jsou recentním tématem a jde o stále neuzavřenou oblast. Koncepce alergie jako příčiny předčasného selhání TEP má sice stále řadu svých zastánců, avšak většinou je spíše zpochybňována pro nedostatek důkazů a doložení jednoznačného patofyziologického mechanismu (40).

Patofyziologie. Existuje totiž rozdíl v patofyziologii kožní alergické reakce, která je zprostředkována Langerhansovými buňkami jakožto kožními antigen-prezentujícími buňkami (APB), a v tkáňové reakci na antigenní komplex kov-protein, kterou zprostředkovávají lokální APB (makrofágy, dendritické a epiteloidní buňky) (53). Jednotlivé APB následně prezentují antigen CD4+ T-lymfocytům, které spouštějí další průběh reakce (1). V tomto případě jde o tzv. hypersensitivitu IV. typu.

Incidence. Ačkoli je v běžné populaci poměrně vysoká prevalence kontaktní alergie na kovy a dle epikutánních a sérologických testů se vyskytuje reakce na Ni v 13 %, Co ve 2 % a Cr v 1 % populace (48), počet prokázaných selhání endoprotézy z důvodu alergické reakce je poměrně nízký a příčinnou souvislost je

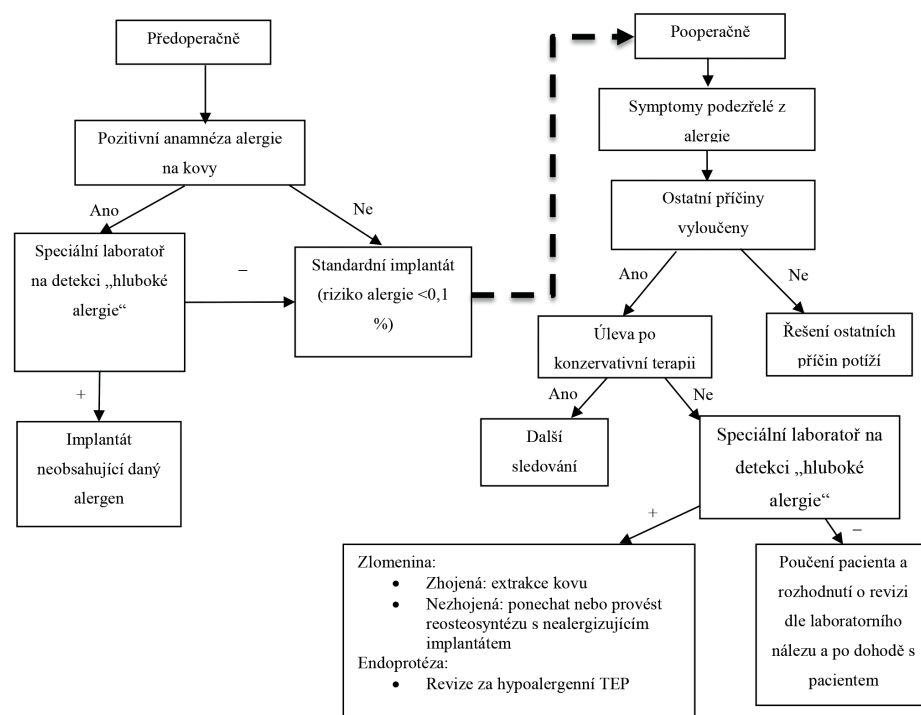
stále velmi obtížné dokázat (52). Po implantaci TEP byla pozorována jak senzitivace na dané kovy u stabilní a zejména u selhávající endoprotézy (18), tak i desenzitivace dle před- a pooperačních kožních testů (47). Zde opět narážíme na význam alergie a rozdílnou patofyziologii kožní a tkáňové reakce (53).

Symptomatologie. Klinicky se alergie může projevit jako lokalizovaná, vzácněji celotělová vyrážka, porucha hojení rány, setrvalé bolesti, otok, synovialita s recidivujícími výpotky, ztuhlost operovaného kloubu, nebo naopak jeho nestabilita, případně až uvolnění TEP. Tyto symptomy se většinou vyvinou během prvního roku po implantaci (37). Lokalizovaná vyrážka je častěji popisována u TEP kolene, zatímco u TEP kyčle nebývá obvyklá (1), což může být vysvětleno hlubším tkáňovým uložením.

Diagnostika. Protože stále nemáme k dispozici diagnostický test, který by uměl jednoznačně určit, zda se jedná o alergickou reakci, zůstává tato diagnóza postavena jako *per exclusionem*, tzn. po vyloučení infekce, aseptického uvolnění a dalších komplikací TEP (33). I dnes se můžeme setkat s tím, že k diagnostice je doporučován epikutánní test, ačkoli se ví, že není způsobilý reflektovat hlubokou tkáňovou situaci kolem implantátu. Přesto bývá součástí klinických doporučení (viz obr. 2), avšak pro zmíněnou diskrepanci a nízkou senzitivitu i specifitu by neměl být používán jako rutinní předoperační metoda

(37). K dispozici máme další imunologické testy, jako je lymfocytární transformační test (LTT), modifikovaný lymfocytární stimulační test (mLST) nebo test na leukocytární inhibiční faktor (LIF) (16). LTT hodnotí míru proliferace specifických T-lymfocytů v reakci na daný antigen, v tomto případě kov, a ilustruje tedy systémovou alergickou reakci. Ačkoli nabízí vyšší senzitivitu než epikutánní testy, nevykazuje dostatečnou specifitu a žádný z těchto testů není spolehlivý v predikci vzniku alergické reakce po implantaci TEP (37). Jediným jasným nálezem tedy zůstává úleva od potíží po reimplantaci hypoalergenního implantátu, tedy *ex post* kritérium.

Terapie. Zřejmá alergická reakce po implantaci TEP je po pečlivém zvážení a vyloučení ostatních příčin selhání indikována k reimplantaci hypoalergenního implantátu. Pacient by měl být současně informován o tom, že stále nemáme k dispozici ověřené klinické doporučení k řešení této komplikace. Ve snaze vyhnout se alergizujícím kovům u TEP kyčle volíme jamku a dřík z titanové slitiny, hlavičku keramickou nebo oxiniovou. U TEP kolene existují rovněž revizní implantáty se speciálními bariérovými vrstvami z Ti, Nb, případně dalších kovů (1, 33). V případě diagnostické nejistoty nebo pokud nemůžeme provést reimplantaci, můžeme kožní vyrážku léčit topickými kortikosteroidy, které jsou v některých případech efektivní (12). Jedno ze schémat pro doporučený postup je popsáno v obrázku 2.



Obr. 2 Algoritmus řešení alergie na kovy v ortopedii volně dle Christensena (26). TEP – totální endoprotéza

Koncentrace chloridu daného kovu potřebná k vyvolání toxicity (mM)							
Test	Al	Cr	Co	Fe	Mo	Ni	V
Osteoblast							
Viabilita	5	>10	1	0,3	7	0,5	0,05
Proliferace	10	10	1	5	10	1,0	0,1
Morfologie	10	10	0,5	10	10	0,5	0,1
Průměr ± SD	8,3 ± 2,9	10 ± 0	0,8 ± 0,3	5,1 ± 4,9	9,0 ± 1,7	0,7 ± 0,3	0,1 ± 0,1
Fibroblast							
Viabilita	2	10	2	1	10	2	1
Proliferace	50	10	0,01	10	10	2	0,05
Morfologie	5	5	0,5	5	1	0,5	0,05
Průměr ± SD	19 ± 26	8,3 ± 2,9	0,8 ± 1,0	5,3 ± 4,5	7 ± 5,2	1,5 ± 0,9	0,3 ± 0,5

Tab. 2 Stanovení koncentrace chloridu daného kovu potřebné k vyvolání toxicity s kritériem 50% poklesu viability nebo proliferace daných buněk dle Hallaba, zkráceno (20)

U pacientů s předoperačně prokázanou alergií na kovy obsažené v implantátu (zvláště pokud už proběhla alergická reakce na jiném kloubu) bychom měli automaticky indikovat „hypoalergenní“ implantáty.

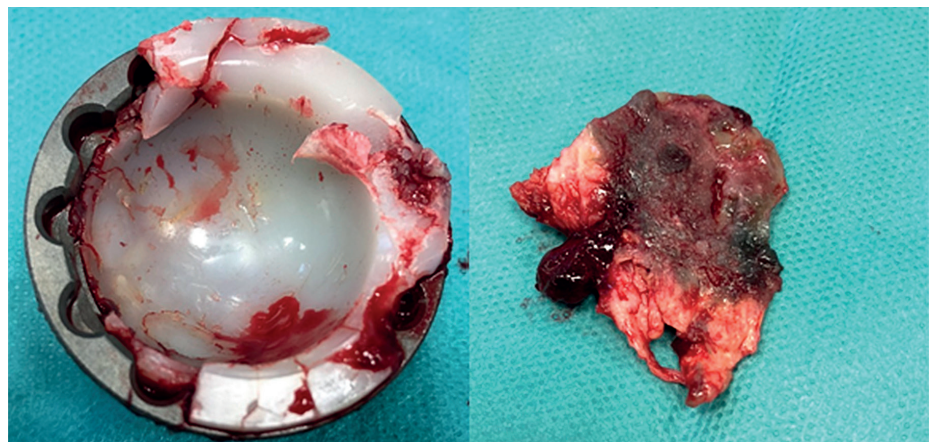
Podíl kovů na periprotetické osteolýze

Periprotetická osteolýza (PPOL) je chápána jako důsledek chronické zánětlivé reakce indukované mikro- a nanoprodukty vznikajícími při používání TEP kyčle a kolena. Nejvíce se sice píše o ošetrných částicích polyetyleny, avšak je nepochybné, že určitou roli hrají i kovy (11, 17). PPOL může vzniknout kolem všech typů kloubních náhrad, včetně páru keramika-keramika, i když v porovnání s ostatními páry velmi vzácně (38).

V případě PPOL působí kovy přes aktivaci RANK-ligandu (po předchozím zvýšení exprese TNF-, IL-6 a PGE2). Jejím prostřednictvím je v periprotetické kostní multicelulární jednotce narušena rovnováha mezi osteoblasty a osteoklasty ve prospěch kost resorbujících osteoklastů. U iontů Co, Cr a Mo je popsána i aktivace inflammasomů (38). Kovy také zhoršují kostní metabolismus – nejtoxičtější na osteoblasty působí V, Mn, Fe a Ni, naopak nejméně toxické jsou pro ně Co a Cr (22). Cytotoxický potenciál jednotlivých kovů je uveden v tabulce 2. V rámci snahy o konzervativní terapii osteolýzy byla testována protizánětlivá léčba jako například Etanercept (anti-TNF protilátka) (54), či RANKL inhibitor (50), avšak zatím jedinou efektivní metodou zůstává revize a reimplantace uvolněné endoprotézy.

Metalóza

Termín metalóza je pouze popisný a označuje široké spektrum zabarvení peri-



Obr. 3 Peroperační vzorky z revize TEP kyčle pro aseptické uvolnění jamky. Masivní ošetr polyetylenové vložky, kdy došlo ke kontaktu hlavičky s kovovou jamkou. Granulace odebrané z okolí jamky s masivní metalózou

protetické tkáně od jemné šedi až po jasně černou či šedočernou, často rozbrědlou tkáň. Zdrojem metalózy může být povrchová koroze, včetně šterbinové koroze a ošetr. Nejvýrazněji a nejčastěji se však objevuje při prošlapání či fraktuře některé z artikulárních komponent, jak je uvedeno na obrázku 3. Obrovské množství kovu indukuje reakci IV. typu a makrofágy se přeměňují v mnohojaderné Langhansovy buňky a tvoří granulace. Metalóza se může klinicky projevit bolestmi, někdy dokonce i s tmavou pigmentací kůže kolem postiženého kloubu (46), v pokročilých případech s tvorbou pseudotumoru. U těchto pacientů bychom měli monitorovat sérové hladiny relevantních kovů z důvodu jejich rizika intoxikace a protézu včas revidovat (15).

ALVAL a pseudotumory

Tyto jednotky jsou klasicky popisovány u MoM endoprotéz, avšak mohou se vyskytnout i u ostatních artikulárních párů. Typicky jsou spojeny s bolestivými projevy kolem TEP (45).

ALVAL popisuje periprotetickou zánětlivou

reakci podobnou hypersenzitivní reakci IV. typu probíhající kolem MoM implantátu (31). Histologicky je charakterizována difúzní perivaskulární lymfocytární infiltrací, doprovázenou plasmatickými buňkami, eozinofilními granulomy, venulami s vysokým endotelem, krvácením, fibrinovou exsudací, nekrózou a makrofágy s kapkovitými inkluzemi (57).

Pseudotumor je rozsáhlý cystický útvar, mající podobný imunologický podklad jako ALVAL, avšak s výraznějším tkáňovým objemem, větší lymfocytární infiltrací a nekrózou. Kromě bolesti se může projevit hmatnou rezistencí například v třísele, parézou nervu či spontánní luxací kloubu (14).

Incidence. Incidence pseudotumorů u MoM implantátů je udávána 0,3 %. U ALVAL a/nebo pseudotumorů se odhaduje na 0,6 % (56).

Diagnostika. Při diagnostice ALTR bychom vždy měli nejdříve vyloučit komplikace, jako jsou infekce, luxace, periprotetická zlomenina, patologie svalových úponů či aseptické uvolnění. Začínáme klinickým a RTG vyšetřením, standardně provádíme krevní testy (krevní obraz, CRP, IL-6). U pacientů s vyšší předtesto-

vou pravděpodobností infekce (při pozitivě testů první linie) je indikována punkce (někdy k ní přistupujeme bez ohledu na výsledky předchozích testů). V aspirátu stanovujeme počet leukocytů a jejich rozpočet, dále provádíme biochemické vyšetření. Rutinně kovy v séru a výpotku nestanovujeme.

V souvislosti s MoM náhradami je důležité si připomenout, že hodnoty CRP a sedimentace erytrocytů zde bývají méně specifické, protože mohou být zvýšené jak u infekce, tak i u ALTR. Rovněž automatická cytologie z punktátu může mít u MoM zkrácené hodnoty v celkovém počtu leukocytů i v podílu polymorfonukleárů, proto je vhodnější manuální odečet (9). Ze zobrazovacích metod je pro reakci typu ALTR za zlatý standard považována magnetická rezonance s tzv. MARS sekvencí (Metal Artifact Reduction Sequence), která zvládne zobrazit i periprotetické tkáně jinak zakryté artefakty implantátu (10, 36). Toto vyšetření však zatím není vzhledem ke své nákladnosti a horší dostupnosti použitelné pro rutinní screening. Proto bylo navrženo ultrazvukové vyšetření jako levnější screeningová metoda se 100% senzitivitou záchytu pseudotumorů (13).

Terapie. Symptomatický pseudotumor či ALVAL jsou indikací k revizi TEP a extirpaci pseudotumoru, v případě MoM s výměnou za jiný artikulární pár (23).

Systémová toxicita

U pacientů se selhávající (ale i dobře fungující!) endoprotézou můžeme najít zvýšené sérové hladiny kovů, z nichž je protéza vyrobena. Tyto se následně akumulují zejména v myokardu, ledvinách, játrech, slezině a v lymfatických uzlinách (22). Vysoké sérové hladiny kovů najdeme typicky u selhávající MoM endoprotézy, avšak paradoxně ještě vyšší hladiny byly popsány po revizi selhané keramické endoprotézy s použitím kovové hlavičky (3), kde byl její otěr akcelerován zbylými keramickými částicemi rozptýlenými v reoperovaném kloubu (44). Za systémovou toxicitu je nejvíce zodpovědný kobalt, konkrétně jeho dvojmocný iont (Co^{2+}) (35). Naopak titanové slitiny jsou velmi málo toxické a indukují pouze mírnou zánětlivou odpověď (14). Mechanismus toxicity kobaltu je složitý a vysvětluje se indukcí tvorby volných radikálů, peroxidací lipidů, poruchou mitochondriální funkce, poruchou homeostázy vápníku a železa, interakcí s erythropoézou, poruchou transportu jódu do štítné žlázy a genotoxicitou (43). Klinicky se tedy intoxikace projevuje kardiomyopatií, hypotyreózní strumou, neurotoxicitou s poruchou sluchu,

zrakem a poruchami centrální a periferní nervové soustavy (4). Jsou popsány jednotlivé případy kobaltem indukované polycytémie a vzácně i hepatotoxicita (25). Sérové koncentrace kobaltu jsou v běžné populaci do $0,6 \mu\text{g/l}$, u většiny pacientů s dobře fungující MoM endoprotézou v rozsahu $0,2$ až $10 \mu\text{g/l}$. Prahem pro lokální komplikace (viz ARMD) je dle různých zdrojů 4 až $7 \mu\text{g/l}$ a rizikové hladiny pro intoxikaci začínají nad $20 \mu\text{g/l}$. Zdá se však, že tato hodnota není pro klinickou praxi užitečná a klinické relevance toxicity dosahují až mnohem vyšší hladiny (35). Proto je doporučeno klinicky sledovat pacienty s hladinami nad $100 \mu\text{g/l}$ (43) a při projevech intoxikace, které jsou zpočátku reverzibilní, včas protézu revidovat. Je nutno podotknout, že systémová intoxikace kovy z totální endoprotézy je velmi vzácným jevem, proto se nedoporučuje její plošné vyhledávání. Do roku 2014 bylo v systematickém přehledu studií popsáno pouze 8 případů (3). U pacientů s rizikovým implantátem či rizikovou anamnézou je však odběr krve na stanovení kovů z kloubních náhrad indikován.

Riziko karcinogeneze

Částice a ionty Cr, Co, Ti, Al a V indukují *in vitro* tvorbu volných radikálů, které poškozují vlákna DNA a způsobují mutace, aneuploidii a chromozomální aberace v závislosti na jejich koncentraci (5). Povaha iontů chromu závisí na jejich valenci: korozivními procesy se z implantátu uvolňuje šestimocný chrom, který je klasifikován jako karcinogen skupiny 1 dle IARC (International Agency for Research on Cancer) a způsobuje karcinom plic, avšak je rychle v erytrocytech redukován na chrom třímocný, který je méně škodlivý (49, 14). Systematické přehledy klinických studií (55) ani data z ortopedických registrů (27, 42) neprokazují celkově zvýšené riziko karcinogeneze u konvenčních endoprotéz z CoCr či Ti slitin s kloubním párem kov-polyetylen, keramika-polyetylen, keramika-keramika. Avšak při identifikaci jednotlivých diagnóz bylo v jedné z metaanalýz nalezeno vyšší riziko karcinomu prostaty a maligního melanomu (Standardized Incidence Ratio (SIR) 1,12 resp. 1,43 s 95% CI; 1,08–1,16 resp. 1,13–1,79) (42).

Data pro MoM endoprotézy jsou poněkud odlišná v závislosti na zdroji. Britský a finský registr kloubních náhrad u těchto implantátů celkově zvýšené riziko karcinogeneze neprokazují (24, 8). Některé studie vyšší riziko v porovnání s konvenčními endoprotézami ale připouští, Levašič v kohortové studii našel vyšší incidenci karcinomu prostaty u pacientů

s MoM endoprotézou (SIR = 1,35), stejně jako u necementovaných implantátů (SIR = 1,40) a endoprotéz s Ti slitinou (SIR = 1,41) (34). Z uvedeného tedy vyplývá, že endoprotézy nejsou spjaty se zvýšeným celkovým rizikem karcinogeneze, ale existuje mírně vyšší riziko karcinomu prostaty, zejména u MoM endoprotéz, kterým je vhodné se vyhnout mimo jiné také z tohoto důvodu.

Závěr

Kovové implantáty jsou a ještě nějakou dobu budou základními materiály v endoprotetice kyčlí a kolen. Pokud se nepoužije implantát s kloubním párem kov-kov, je riziko závažných, kovy indukovaných nežádoucích událostí poměrně vzácné. Přesto je nutné na tuto možnost v klinické praxi myslet a v případě podezření na závažné poškození kovového povrchu je správné včas indikovat odběr krve na jednotlivé kovy obsažené v implantátech. Velmi nízké koncentrace uvolňující se do periprotetického prostoru mohou vyvolat a udržovat chronický periprotetický zánět, někdy s projevy mírné ALTR. Podstatné je, že při těchto nízkých koncentracích je prakticky zcela možné vyloučit karcinogenní efekt a systémovou toxicitu. Diskuze vedou o alergizujícím účinku kovů uvolněných z kloubní náhrady.

Studie byla podpořena z prostředků MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892); LF_2019_001.

Literatura:

1. Akil S, Newman JM, Shah NV, Ahmed N, Deshmukh AJ, Maheshwari AV. Metal hypersensitivity in total hip and knee arthroplasty: Current concepts. *J Clin Orthop Trauma* 2018;9:3–6.
2. Amanatullah DF, Sucher MG, Bonadurer GF, 3rd, Pereira GC, Taunton MJ. Metal in Total Hip Arthroplasty: Wear Particles, Biology, and Diagnosis. *Orthopedics* 2016;39:371–9.
3. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)* 2014;52:837–47.
4. Catalani S, Rizzetti MC, Padovani A, Apostoli P. Neurotoxicity of cobalt. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:421–37.
5. Daley B, Doherty AT, Fairman B, Case CP. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:598–606.
6. de Villiers D, Traynor A, Collins SN, Shelton JC. The increase in cobalt release in metal-on-polyethylene hip bearings in tests with third body abrasives. *Proc Inst Mech Eng H* 2015;229:611–8.
7. Dobbs HS, Minski MJ. Metal ion release after total hip replacement. *Biomaterials* 1980;1:193–8.
8. Ekman E, Laaksonen I, Eskelinen A, Pulkkinen

- P, Pukkala E, Makela K. Midterm risk of cancer with metal-on-metal hip replacements not increased in a Finnish population. *Acta Orthop* 2018;89:575–9.
9. Fehring KA, Fehring TK. Modes of failure in metal-on-metal total hip arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 2015;46:185–92.
 10. Fritz J, Fritz B, Thawait GK, et al. Advanced metal artifact reduction MRI of metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty implants: compressed sensing acceleration enables the time-neutral use of SEMAC. *Skeletal Radiol* 2016;45:1345–56.
 11. Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Raska M. Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun* 2013;19:213–24.
 12. Gao X, He RX, Yan SG, Wu LD. Dermatitis associated with chromium following total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2011;26:665 e13–6.
 13. Garbuz DS, Hargreaves BA, Duncan CP, et al. The John Charnley Award: Diagnostic Accuracy of MRI Versus Ultrasound for Detecting Pseudotumors in Asymptomatic Metal-on-Metal THA. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:417–23.
 14. Gibon E, Amanatullah DF, Loi F, et al. The biological response to orthopaedic implants for joint replacement: Part I: Metals. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017;105:2162–73.
 15. Gogna P, Paladini P, Merolla G, Augusti CA, Maddalena F, Porcellini G. Metallosis in shoulder arthroplasty: an integrative review of literature. *Musculoskelet surg* 2016;100:3–11.
 16. Granchi D, Cenni E, Giunti A, Baldini N. Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br* 2012;94:1126–34.
 17. Gustafson K, Jakobsen SS, Lorenzen ND, et al. Metal release and metal allergy after total hip replacement with resurfacing versus conventional hybrid prosthesis. *Acta Orthop* 2014;85:348–54.
 18. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:428–36.
 19. Hallab NJ. Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris. *Spine (Phila Pa 1976)* 2016;41 Suppl 7:S30–1.
 20. Hallab NJ, Anderson S, Caicedo M, Brasher A, Mikecz K, Jacobs JJ. Effects of soluble metals on human peri-implant cells. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:124–40.
 21. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2009;67:182–8.
 22. Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;60:420–33.
 23. Harrington K, Phelan E, Torreggiani WC, Doody O. The Management of the Symptomatic Patient With a Metal-on-Metal Hip Prosthesis. *Can Assoc Radiol* 2016;67:76–81.
 24. Hunt LP, Blom AW, Matharu GS, Porter ML, Whitehouse MR. The risk of developing cancer following metal-on-metal hip replacement compared with non metal-on-metal hip bearings: Findings from a prospective national registry “The National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man”. *PLoS One* 2018;13:e0204356.
 25. Cheung AC, Banerjee S, Cherian JJ, et al. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 – history, mechanism, measurements, and pathophysiology. *Bone Joint J* 2016;98-b:6–13.
 26. Christensen TJ, Samant SA, Shin AY. Making Sense of Metal Allergy and Hypersensitivity to Metallic Implants in Relation to Hand Surgery. *J Hand Surg Am* 2017;42:737–46.
 27. Christian WV, Oliver LD, Paustenbach DJ, Kreider ML, Finley BL. Toxicology-based cancer causation analysis of CoCr-containing hip implants: a quantitative assessment of genotoxicity and tumorigenicity studies. *J Appl Toxicol* 2014;34:939–67.
 28. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, et al. Metal Release in Patients Who Have Had a Primary Total Hip Arthroplasty. A Prospective, Controlled, Longitudinal Study*. *JBJS* 1998;80:1447–58.
 29. Karov J, Sinclair A, Hinberg I. Repassivation of a high chromium stainless steel orthopaedic alloy. *Biomed Mater Eng* 2002;12:375–86.
 30. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:567–73.
 31. Kolatat K, Perino G, Wilner G, et al. Adverse local tissue reaction (ALTR) associated with corrosion products in metal-on-metal and dual modular neck total hip replacements is associated with upregulation of interferon gamma-mediated chemokine signaling. *J Orthop Res* 2015;33:1487–97.
 32. Kuba M, Gallo J, Pluhacek T, Hobza M, Milde D. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:454–62.
 33. Lachiewicz PF, Watters TS, Jacobs JJ. Metal Hypersensitivity and Total Knee Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg* 2016;24:106–12.
 34. Levasic V, Milosev I, Zadnik V. Risk of cancer after primary total hip replacement: The influence of bearings, cementation and the material of the stem. *Acta Orthop* 2018;89:234–9.
 35. Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology* 2017;387:43–56.
 36. Lindgren K, Anderson MB, Peters CL, Pelt CE, Gililland JM. The Prevalence of Positive Findings on Metal Artifact Reduction Sequence Magnetic Resonance Imaging in Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *J Arthroplasty* 2016;31:1519–23.
 37. Lohmann CH, Hameister R, Singh G. Allergies in orthopaedic and trauma surgery. *Orthop Traumatol Surg Res* 2017;103:S75–S81.
 38. Magone K, Luckenbill D, Goswami T. Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2015;135:683–95.
 39. 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.
 40. Middleton S, Toms A. Allergy in total knee arthroplasty: a review of the facts. *Bone Joint J* 2016;98-B:437–41.
 41. Mistry JB, Chughtai M, Elmallah RK, et al. Trunnionosis in total hip arthroplasty: a review. *J Orthop Traumatol* 2016;17:1–6.
 42. Onega T, Baron J, MacKenzie T. Cancer after total joint arthroplasty: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1532–7.
 43. Paustenbach DJ, Tvermoes BE, Unice KM, Finley BL, Kerger BD. A review of the health hazards posed by cobalt. *Crit Rev Toxicol* 2013;43:316–62.
 44. Peters RM, Willemse P, Rijk PC, Hoogendoorn M, Zijlstra WP. Fatal Cobalt Toxicity after a Non-Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Case Rep Orthop* 2017;2017:9123684.
 45. Pivec R, Meneghini RM, Hozack WJ, Westrich GH, Mont MA. Modular taper junction corrosion and failure: how to approach a recalled total hip arthroplasty implant. *J Arthroplasty* 2014;29:1–6.
 46. Pritchett JW. Adverse reaction to metal debris: metallosis of the resurfaced hip. *Curr Orthop Pract* 2012;23:50–8.
 47. Rooker GD, Wilkinson JD. Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement. A prospective study. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62-B:502–5.
 48. Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 2001;56:1192–6.
 49. Scharf B, Clement CC, Zolla V, et al. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity. *Sci Rep* 2014;4:5729.
 50. Skoldenberg O, Rysinska A, Eisler T, Salemyr M, Boden H, Muren O. Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17:174.
 51. Sonntag R, Reinders J, Kretzer JP. What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement. *Acta Biomater* 2012;8:2434–41.
 52. Thomas P, Summer B. Implant allergy. *Allergologie select* 2017;1:59–64.
 53. Thomas P, von der Helm C, Schopf C, et al. Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. *Biomed Res Int* 2015;2015:910156.
 54. Vasudevan A, DiCarlo EF, Wright T, et al. Cellular response to prosthetic wear debris differs in patients with and without rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1005–14.
 55. Visuri T, Pulkkinen P, Paavolainen P, Pukkala E. Cancer risk is not increased after conventional hip arthroplasty. *Acta Orthop* 2010;81:77–81.
 56. Wiley KF, Ding K, Stoner JA, Teague DC, Yousuf KM. Incidence of pseudotumor and acute lymphocytic vasculitis associated lesion (ALVAL) reactions in metal-on-metal hip articulations: a meta-analysis. *J Arthroplasty* 2013;28:1238–45.
 57. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, 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.
 58. Witt JD, Swann M. Metal wear and tissue response in failed titanium alloy total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:559–63.
 59. Zhang Y, Wang J, Wang P, et al. Low elastic modulus contributes to the osteointegration of titanium alloy plug. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;101:584–90.

MUDr. Martin Hobza
Ortopedická klinika
FN Olomouc

V Olomouci 5.5.2020

Vážený pane doktore,

sděluji Vám, že práce autorů Martin Hobza, David Milde, Zuzana Slobodova, Jiri Gallo. **The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: A role of metallic byproducts?**”, byla přijata k otištění v Biomedical Papers, ISSN 1213-8118, eISSN 1804-7521.



Jana Nováková

redaktorka

The number of lymphocytes increases in the periprosthetic tissues with increasing time of implant service in non-metal-on-metal total joint arthroplasties: A role of metallic byproducts?

Martin Hobza^a, David Milde^b, Zuzana Slobodova^c, Jiri Gallo^a

Background. The objective of the study was to determine the association between periprosthetic concentrations of selected metals and changes induced in periprosthetic tissues (PT).

Methods. PT from 24 patients with a metal-on-polyethylene or ceramic-on-polyethylene total joint replacements (TJRs) were examined. Samples underwent histological examination including quantification of cellular populations. Determination of metals was performed according to the published methodology. Results were processed using correlation analysis and Principal Component Analysis (PCA), respectively.

Results. Growing concentration of metals in the PT was found as a function of length of exposure (LoE). Differences in Ti, Co, Cr and V concentrations (per $\alpha = 0.05$) depended on the type of alloy the implants were made from. On the contrary, the implant composition did not reflect in the different numbers of immune cells per 1 high power field, not even in distribution of the membrane type according to the Krenn classification. PCA revealed several clusters in dependence on the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. High representation of lymphocytes in the PT was typical for clusters with the longest LoE while a higher representation of neutrophils was typical for a shorter time to reoperation.

Conclusions. Correlation between the LoE and concentrations of metals in its surroundings was demonstrated. However, the tissue image analysis cannot differentiate finer, potentially metal-induced tissue changes. Importantly, the tissues become more similar with an increasing LoE. We draw a conclusion about predominantly non-specific stimulation of the PT jointly by metal and polyethylene particles in non-metal-on-metal TJRs.

Key words: total joint replacement, aseptic loosening, metal debris, adverse local tissue response, Krenn classification; lymphocytes

Received: March 13, 2020; Revised: April 8, 2020; Accepted: April 27, 2020

<https://doi.org/10.5507/bp.2020.019>

© 2020 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

^aDepartment of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00, Czech Republic

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 3, Olomouc, Czech Republic

Corresponding author: Jiri Gallo, e-mail: jiri.gallo@volny.cz

BACKGROUND

Osteoarthritis of the hip and knee is the most frequent joint disease in adults that can substantially deteriorate the patient's locomotion, independence and self-sufficiency and quality of life. Total hip and knee arthroplasties (THA, TKA) are the accepted standard for treatment of end-stage hip and knee diseases. These implants are designed for long-term use in the human body¹. There is strong evidence confirming eligibility of total joint arthroplasty in both the localisations to achieve and maintain long-term results^{2,3}. On the other hand, it is clear that these interventions have limited survivorship⁴. The reasons for their failure differ at least in part for both anatomical locations. However, the main long-lasting problem is aseptic loosening which means a complete loss of connection between the implant and bone bed⁵. This is a consequence of long-term maladaptation of the implant-bone

interface to chronic inflammation induced by prosthetic byproducts released from THA/TKA in combination with continual mechanical load^{6,7}.

A number of studies demonstrate that the surrounding tissues response to prosthetic byproducts by inflammation of low intensity⁸. This subsequently results in accumulation of stimulated osteoclasts at the border between the bone and implant. A vast body of evidence shows that polyethylene micro- and nanoparticles are the main inducers of debris-induced inflammation⁵. Recently, an attention has been drawn to metallic byproducts, particularly in relation to premature failure of metal-on-metal (MoM) prostheses⁹. Metals are released from all metallic implants by the mechanism of corrosion or tribocorrosion^{7,10,11}. Several studies reported concentrations of selected metals in the periprosthetic tissues, joint fluid, or peripheral blood range¹²⁻¹⁵. The character of the tissue response to the presence of metals has been also studied¹⁶⁻¹⁸. New

terms, such as adverse local tissue reactions or adverse reactions to metal debris, have been introduced for more exact communication of the pathologist with an orthopaedic surgeon^{19,20}. Hypersensitivity to metallic byproducts has been also examined in association with premature failure of THA or TKA (ref.²¹).

Importantly, it is assumed that non-MoM THAs and TKAs, i.e. metal-on-polyethylene (MoP), ceramic-on-polyethylene (CoP), or ceramic-on-ceramic (CoC), are exposed to a load of metals too. The objective of this study was to examine tissue samples from adjacent places simultaneously for metallic content (i.e. concentration of metals/1 g of the tissue) as well as for the histopathological changes in non-MoM prostheses. We assumed that the structure of the periprosthetic membranes as well as representation of particular immune cells in this membrane would change in reoperated patients with a different time elapsed from the primary surgery and/or metallic load. This analysis should provide a further piece of evidence on the long-term behaviour of metallic implants inside human bodies.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Between April 2018 and April 2019 81 patients underwent reoperations of THA or TKA (58 THAs, 23 TKAs) at our department. Of these 24 were included into the study. Patients were divided into a subgroup with an implant from a cobalt-chromium (Co-Cr) alloy (n = 11) and subgroup with an implant containing titanium or its alloy (n = 13). The subgroup of patients with total joint arthroplasty containing Ti was reoperated after 13.5 years on average with a range from 0.1 to 22.8 years, whereas the subgroup of patients with total joint arthroplasty without Ti was reoperated after 7.8 years on average with a range of from 2.1 to 23.4 years. Periprosthetic tissues were collected from a previously specified collection site during revision THA (n = 16; 6 males and 10 females) and TKA (n = 8; 4 males and 4 females). Patient characteristics are shown in Table 1. Tissue collection was performed by the same surgeon (JG).

Written informed consent about the use of periprosthetic tissues for the purpose of this study was obtained from each subject prior to inclusion in the study. The Ethics Committee for the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and the University Hospital Olomouc approved the study in accordance with the Helsinki Declaration (Ministry of Health, VES16-31852A).

Sample collection

Tissue samples of 24 patients were collected immediately after opening of the joint from the internal surface of the pseudocapsule. A superficial layer of pseudosynovial tissue on an area of approximately 1 x 2 cm was taken for histological examination. A similarly large sample was collected from the vicinity of the previous sample for later determination of concentration of selected metals. The first

sample was fixed with 10% formalin immediately after collection and was subsequently sent for histopathological examination. The second collection was deeply frozen.

Histopathological examination

The samples were oriented, additionally cut and processed using a standard histological technique with embedding to paraffin blocks after macroscopic assessment at the Institute of Clinical and Molecular Pathology. Two to three representative blocks were selected from each sample after primary hematoxylin – eosin staining and immunohistochemical methods were applied to prepared sections with a thickness of 3 to 4 µm.

Polyclonal antibodies Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 (DAKO, polyclone, c-kit synonym, tyrosine kinase receptor) and Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase (DAKO, clone AA1), which represents the enzymatic equipment of all human mastocytes, were used for purposes of the immunohistochemical examination.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD1a (DAKO, clone 010) and Polyclonal Rabbit Anti-S100 (DAKO, polyclone) antibodies were used for detection of dendritic cells. CD1a are among MHC class I-related superficial glycoproteins, and they indicate immature dendritic and Langerhans cells and cortical lymphocytes with various intensity. S100 protein indicates Langerhans and dendritic cells, but also adipocytes, chondrocytes, melanocytes and glial cells of the neural tissue.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3 (DAKO, clone F7.2.38) antibody was used for detection of T lymphocytes and monoclonal Mouse Anti-Human CD20 (DAKO, clone L26) was used for detection of B lymphocytes. Histocytes were detected with Mouse Anti-Human CD68 (DAKO, clone PG-M1) antibody.

Immunohistochemistry was performed using an optimised protocol in the Ventana Benchmark XT automated system during final brown staining of the nuclei/cytoplasm and/or membrane of positive cells.

Histopathological evaluation

All preparations were evaluated in an optical microscope Olympus BX45 during 20x – 400x magnification (Objective UPLFFLN40X – UIS2, UPlanFLN, 40x/0.75, oo/0.17/FN26.5). Quantification of particular cellular types expressed by a specific antigen was formulated by an absolute count in 20 fields at 400x magnification (HPF). Determination of the membrane type was performed according to the classification of Krenn et al.²²

Determination of metals

The determination of Co, Cr, Ti and V in tissue samples was carried out by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) after microwave digestion with a mixture of HNO₃ and H₂O₂. The detailed measurement procedure including sample pretreatment and measures taken to assure quality of results is described in detail in our previous study¹²

Table 1. Patient and implant characteristics.

Patient number	Prosthesis locality	Sex	BMI	Age	Primary diagnosis	Diabetes mellitus	Indication for revision	HHS	KSS	KSS-f	Years of implant in situ	Bearing type	Fixation type	Endo-prosthesis alloy type	Metallosis
1	knee	female	26.2	76.1	Primary osteoarthritis	no	Femoropatellar pain	-	56	55	2.1	MoP	C	CoCr	no
2	knee	female	30.5	76.4	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	45	5	4.1	MoP	C	CoCr	no
3	hip	female	26.7	77.7	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	14.7	MoP	C	CoCr	no
4	knee	male	27.3	74.4	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	64	60	23.4	MoP	C	CoCr	no
5	hip	female	27.5	73.9	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	4	-	-	0.3	MoP	C	CoCr	no
6	hip	female	38.3	74.8	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	2.4	MoP	C	CoCr	no
7	knee	female	29.7	72.0	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	50	55	55	7.6	MoP	C	CoCr	no
8	knee	male	29.8	72.6	Primary osteoarthritis	yes	Infection	-	44	40	15.6	MoP	C	CoCr	no
9	hip	female	27.0	76.6	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	36	-	-	11.2	MoP	C	CoCr	no
10	knee	male	35.5	72.8	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	70	40	2.1	MoP	C	CoCr	no
11	knee	male	43.0	58.5	Ankylosing spondylarthritis	no	Infection	-	38	20	2.7	MoP	C	CoCr	no
12	hip	male	29.3	59.2	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	51	-	-	2.6	MoP	CL	Ti	no
13	hip	male	29.4	75.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	55	-	-	22.7	MoP	CL	Ti	yes
14	hip	male	30.5	61.6	Primary osteoarthritis	no	Infection	52	-	-	9.3	MoP	CL	Ti	no
15	hip	female	32.7	71.3	Primary osteoarthritis	no	Polyethylene wear	69	-	-	16.3	MoP	H	Ti	no
16	hip	female	24.3	78.8	Posttraumatic arthritis	yes	Aseptic loosening	31	-	-	2.3	MoP	H	Ti	no
17	knee	female	30.9	57.0	Primary osteoarthritis	no	Instability	-	76	40	0.1	MoP	C	Ti	no
18	hip	male	30.5	80.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	7	-	-	16.2	CoP	CL	Ti	no
19	hip	female	27.5	73.3	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	48	-	-	22.8	MoP	CL	Ti	no
20	hip	female	20.8	74.8	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	31	-	-	21.5	CoP	H	Ti	yes
21	hip	male	32.1	78.1	Primary osteoarthritis	no	Heterotopic ossification	56	-	-	5.2	MoP	CL	Ti	no
22	hip	female	22.0	59.0	Periprosthetic fracture	no	Aseptic loosening	34	-	-	21.9	CoP	CL	Ti	yes
23	hip	male	31.9	78.5	Primary osteoarthritis	no	Aseptic loosening	15	-	-	13.5	MoP	CL	Ti	no
24	hip	female	21.4	70.3	Primary osteoarthritis	no	Pain	79	-	-	20.5	CoP	CL	Ti	no

HHS – Harris hip score; KSS – Knee society score; KSS-f – Knee society score, function; C – cemented implant; CL – cementless implant; H – hybrid fixation; BMI – body mass index; MoP – metal on polyethylene; CoP – ceramics on polyethylene

Table 2. Periprosthetic membrane type determination according to Krenn et al and frequency of particular cell populations.

Patient number	Krenn membrane type	Histiocytes/ HPF	Dendritic cells/ HPF	Giant cells/ HPF	B lymphocytes/ HPF	Plasmatic cells/ HPF	T lymphocytes/ HPF	Mast cells/HPF	Eosinophils/ HPF	Neutrophils/ HPF
1	IV	7.7	-	-	0.6	-	11.2	3.1	-	-
2	I	59.5	0.3	2.6	-	-	83.8	3.1	-	-
3	III	52.8	-	18.3	-	-	24.3	1.6	-	-
4	I	227.6	-	15.5	0.4	-	23.6	5.1	-	-
5	II	79.7	-	0.5	-	-	10.2	4.8	2.7	36.6
6	IV	1.0	-	-	-	-	2.8	3.7	-	-
7	I	200.9	1.2	18.5	-	-	18.8	2.7	-	-
8	III	71.2	3.1	8.8	0.5	3.8	35.4	0.4	-	-
9	I	85.1	-	4.2	-	-	5.6	2.0	-	3.0
10	IV	5.8	0.4	1.2	40.9	1.8	87.4	1.1	-	-
11	III	171.7	1.7	5.7	-	-	32.3	1.9	-	9.7
12	IV	1.2	-	-	-	-	4.5	1.5	4.3	4.9
13	I	224.9	1.7	5.6	-	-	121.7	0.3	-	-
14	III	225.4	0.8	2.5	2.5	-	157.0	4.3	-	300.0
15	I	195.5	1.4	1.4	-	-	13.4	2.2	-	-
16	IV	2.2	-	-	36.6	-	6.0	15.0	-	1.9
17	II	12.1	0.5	0.5	2.8	3.9	35.3	2.6	0.3	2.1
18	IV	3.9	-	-	-	-	3.0	5.0	-	-
19	III	75.0	-	5.9	-	-	42.0	0.6	-	1.2
20	I	203.6	1.8	3.7	-	-	70.3	5.2	-	0.9
21	II	28.9	0.7	0.7	2.4	-	9.7	2.7	0.7	164.1
22	I	202.8	0.9	0.9	-	-	57.6	4.7	-	-
23	I	189.1	1.1	0.7	-	-	5.3	-	0.4	-
24	I	241.9	1.6	1.8	-	-	34.4	11.1	1.2	4.9

HPF – high power field; Krenn classification: I – Particle type; II – Infectious type; III – Combined type; IV – Indifferent type

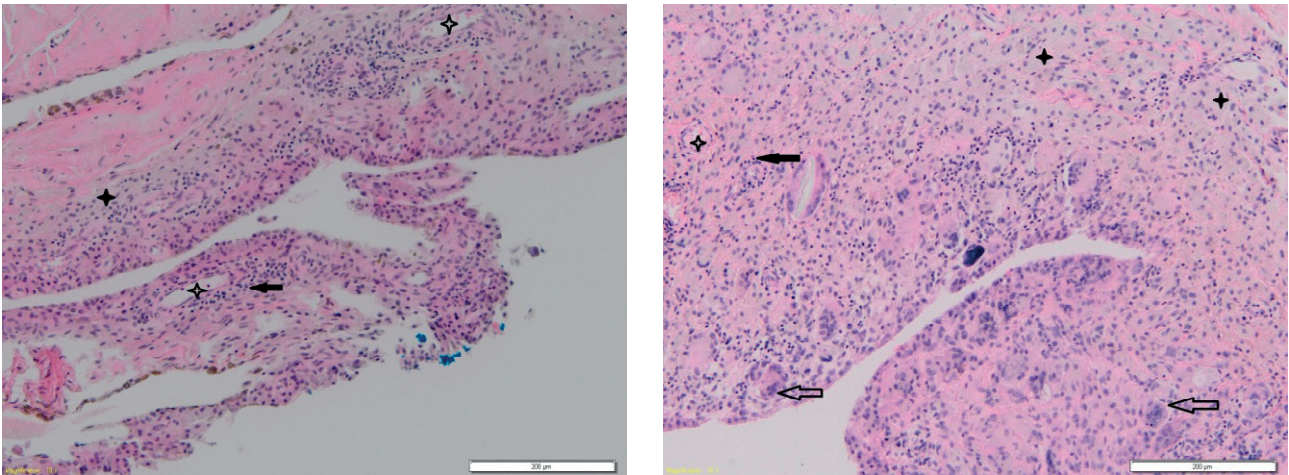


Fig. 1. Pseudosynovial membrane around CoCr implants.

A. Type I membrane according to Krenn and Morawietz – early reaction: Inflammatory infiltration creates a narrow rim of lymphocytes in perivascular localisation with a minimal count of lymphocytes between histiocytes. The figure contains histiocytes and perivascular lymphocytes, giant cells are not present. Wear particles are minimally present, they can be found in superficial areas of the sample. **B.** Type I membrane according to Krenn and Morawietz – late reaction: Inflammatory infiltration is extensive here, dominated by histiocytes and giant cells. In addition to the perivascular area, lymphocytes are present diffusely among histiocytes. Wear material is abundant in all the parts of the sample.

Pictograms:

✦ histiocytes, ✧ blood vessels, ← lymphocytes, ⇐ giant cells, △ necrosis

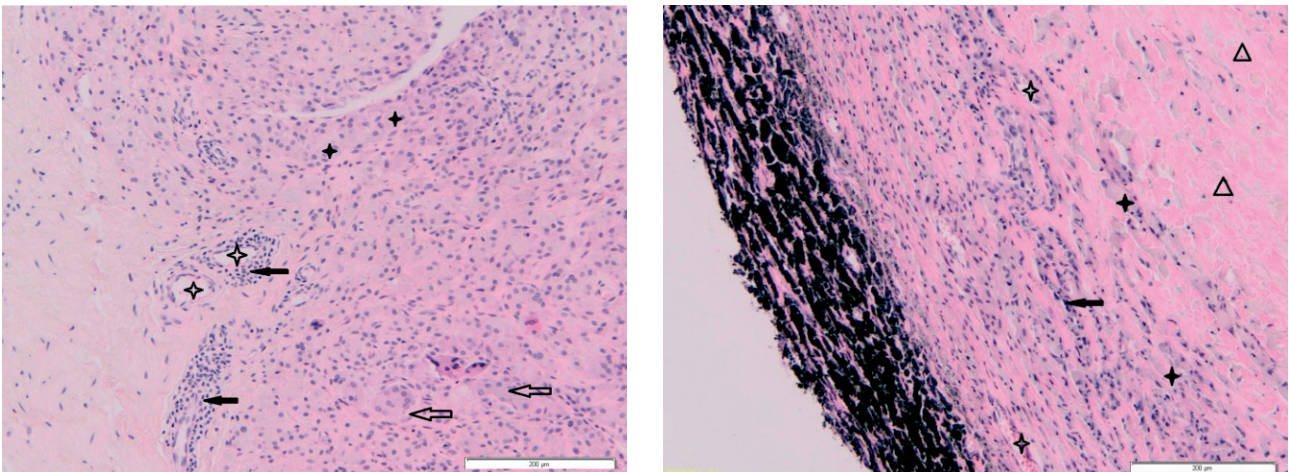


Fig. 2. Pseudosynovial membrane around Ti implants.

A. Type I membrane according to Krenn and Morawietz – early reaction: The inflammatory infiltrate creates a well-defined rim of histiocytes with addition of giant cells and lymphocytes in the perivascular area with sparse lymphocytes between histiocytes. Wear material is less prominent and mostly situated in superficial areas. **B.** Type I membrane according to Krenn and Morawietz – late reaction: Extensive inflammatory reaction dominated by histiocytes and giant cells. Lymphocytes are more present in deeper parts of the sample comparing to the perivascular area and they become more dispersed among histiocytes. Wear material is richly present in all the parts of the sample. Necrosis is found in the upper right corner.

Pictograms:

✦ histiocytes, ✧ blood vessels, ← lymphocytes, ⇐ giant cells, △ necrosis

Statistical analysis

For statistical data treatment, the following software packages were used: NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA) where the Mann-Whitney test was evaluated, and QC.Expert 3.2 (Trilobyte Ltd., Czech Republic) where correlation analysis and principal component analysis (PCA) were elaborated. Considering that we had a

multivariate dataset, an advanced statistical technique (i.e., PCA) was applied to examine the true relationships among our data.

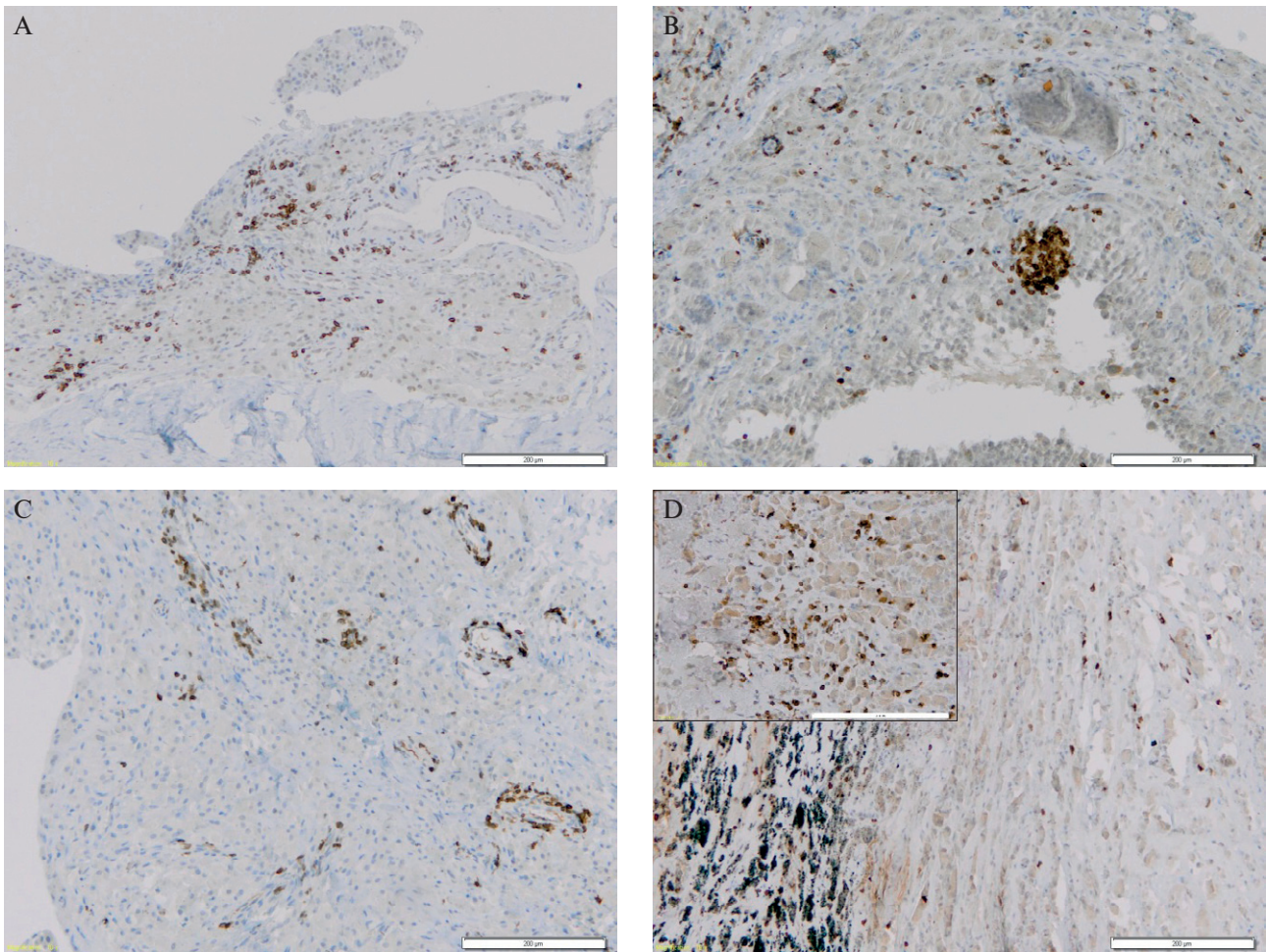


Fig. 3. Immunohistochemical staining of CD3⁺ T lymphocytes in the membrane. A. CoCr implant – early revision: Lymphocytes are mainly in the perivascular area; B. CoCr implant – late revision: Lymphocytes are present not only in the perivascular area, in addition they are dispersed among histiocytes. C. Ti implant – early revision: Lymphocytes in the perivascular area with a small amount of lymphocytes between histiocytes. D. Ti implant – late revision: The superficial area contains small amount of lymphocytes among histiocytes. Inserted figure displays a deeper area, where the lymphocytes are more frequent with a disperse infiltration among histiocytes, conversely, they are less present in the perivascular area.

RESULTS

Histopathological examination results

Results of the histological examination, i.e. determination of the membrane type according to Krenn et al.²² and frequency of particular cellular populations per 1 HPF are reported in Table 2.

A non-parametric test (Mann-Whitney, $\alpha = 0.05$) confirmed that there was no statistically significant difference in the levels of histiocytes, dendritic cells, T lymphocytes, mastocytes, neutrophils or membrane type between both the basic subgroups. Thus, no differences were confirmed among the observed histological parameters and reported subgroups, which leads to a conclusion that the analysis of clear histological parameters does not reveal significant differences between the subgroups of patients with the titanium and non-titanium implants. Other histological parameters were not subject to the statistical test due to predominance of zero levels.

However, the morphological image of both the groups is changing with the duration of implantation. The extent and intensity of inflammatory infiltration was lower in both the groups during a short period from implantation and gradually increased with a growing period from implantation (Fig. 1 and 2). Necrosis occurs more frequently together with an increasing extent of the inflammatory response. Histiocytes form narrow rims below the synovial cover at first, then with the extending interval from implantation they form lamellar to nodular infiltrations. The number of giant cells rises as well as the content of foreign material, which shows its highest volume in the area of contact with the implant. The number of lymphocytes and their distribution also change in time (Fig. 3). Infiltrations are only perivascular and in the vicinity of the surface at first. With a growing period from implantation, higher migration of lymphocytes is seen from perivascular localisations to the areas of inflammatory infiltration. These changes are more expressed in the group with Ti total joint arthroplasty (Fig. 3C and D).

Determination of the metal levels in periprosthetic tissues

Results of a sample analysis for the presence of metals (Ti, V, Co and Cr) in the layer most adjacent to total joint arthroplasty are reported in Table 3. With statistical testing of consistency we evaluated the differences among the levels of metals in patients, who had total joint arthroplasty in the evaluated joint from a titanium alloy, and in patients with total joint arthroplasty with no Ti. The non-parametric Mann-Whitney test confirmed the differences in Ti, Co, Cr and V (per $\alpha = 0.05$). Difference in the levels of titanium explains why we performed dividing into two groups, separately for the following correlation and PCA analysis.

Correlation analyses

For evaluation of relations among particular metals (groups of metals) and histological findings, or for evaluation of relation between the time between primary and revision surgery ("length of exposure"; LoE) and concentrations of metals, we used a correlation analysis using the Pearson correlation coefficient and testing of its statistical significance ($\alpha = 0.05$).

Testing within the group with implants without Ti:

Statistically significant correlation (for $\alpha = 0.05$) between the length of exposure and Cr level ($r = 0.727$) and further between the Co and Cr levels ($r = 0.772$) was demonstrated. Correlation between Co and Cr is easily explainable, since both the metals can be found in total joint arthroplasty. Correlation between the LoE and Cr level is also easily explainable - the longer the implant is in the body, the more metal is released to the surrounding tissue. Co-Cr implants have a small layer of Cr_2O_3 on their surface, therefore correlation between LoE and Cr level, not the Co level, was confirmed.

Testing within the group with Ti implants:

Statistically significant correlations (for $\alpha = 0.05$) between the LoE and Ti concentration ($r = 0.577$), LoE and V concentration ($r = 0.560$) and for Ti and V ($r = 0.714$), respectively, were demonstrated. Both metals can be found in titanium total joint arthroplasties and it is a fact - as in total joint arthroplasties from a CoCrMo alloy - that Ti and V concentrations in the surrounding periprosthetic tissue are growing with the LoE.

Table 3. Metal concentrations in periprosthetic tissues.

Patient number	Endoprosthesis alloy type	Years of implant in situ	Ti (mg/kg)	V (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)
1	CoCr	2.1	0.35	0.02	24.59	6.50
2	CoCr	4.1	0.69	0.04	7.72	0.03
3	CoCr	14.7	0.53	0.01	3.46	0.83
4	CoCr	23.4	6.07	0.31	386.48	24.99
5	CoCr	0.3	2.26	0.04	4.45	1.19
6	CoCr	2.4	2.83	0.01	0.56	0.02
7	CoCr	7.6	2.20	0.01	6.67	6.60
8	CoCr	15.6	20.24	0.85	24.48	34.14
9	CoCr	11.2	2.69	0.01	9.53	14.50
10	CoCr	2.1	0.37	0.03	7.06	0.06
11	CoCr	2.7	30.81	1.28	6.77	0.92
12	Ti	2.6	34.88	0.64	4.69	3.09
13	Ti	22.7	3492.69	215.89	37.40	43.23
14	Ti	9.3	8.94	0.04	169.19	279.57
15	Ti	16.3	8.14	0.05	24.81	8.37
16	Ti	2.3	2.22	0.02	1.86	0.03
17	Ti	0.1	2.27	0.04	7.29	5.79
18	Ti	16.2	29.42	0.02	0.80	0.02
19	Ti	22.8	11.38	0.25	5.72	8.54
20	Ti	21.5	87.11	0.16	162.29	18.37
21	Ti	5.2	5.11	0.01	4.59	6.73
22	Ti	21.9	239.09	11.30	2.76	0.09
23	Ti	13.5	17.99	0.08	39.65	68.66
24	Ti	20.5	12.95	0.01	0.59	0.03

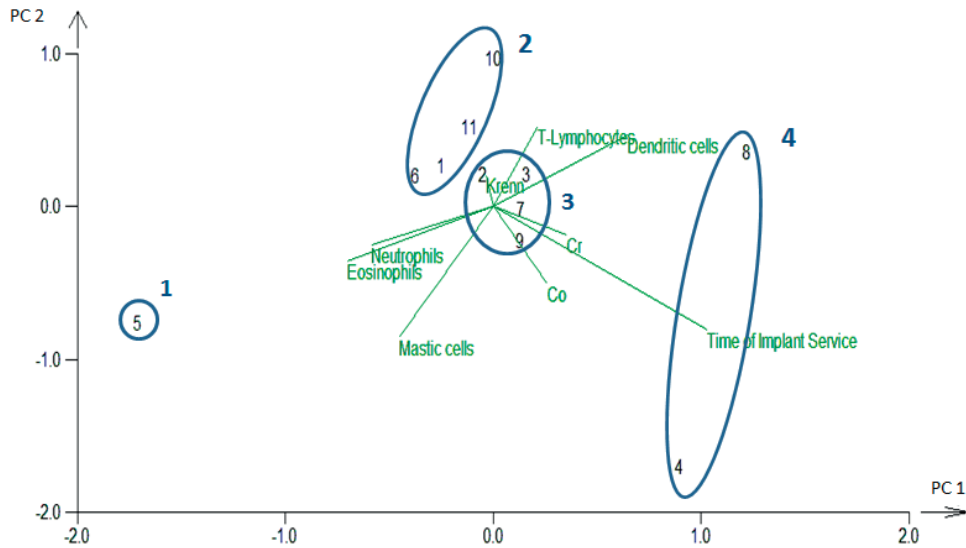


Fig. 4. PCA analysis biplot for the CoCr implant group (n = 11). The first and second main components explain 61.9 % of variability presented in the data. The largest influence is given by the length of exposition, which can be identified as the main component (x axis); PCA – Principal Component Analysis; n – number.

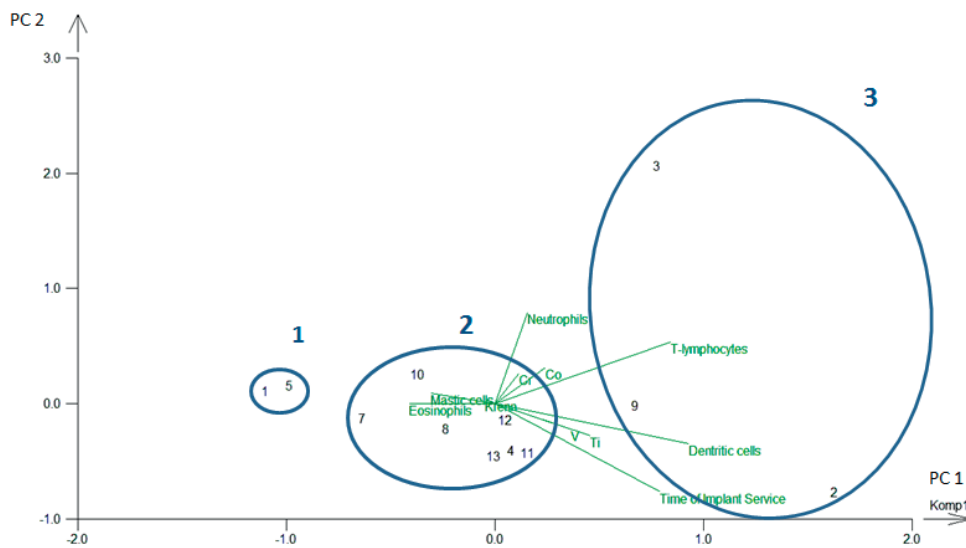


Fig. 5. PCA analysis biplot for the Ti implant group (n = 12). The first and second main components explain 61.1 % of variability presented in the data. The largest influence is given by the length of exposition, which can be identified as the main component (x axis); PCA – Principal Component Analysis; n – number.

Principle component analysis

We mapped each group separately with regard to a small number of subjects and variability in the findings between the titanium (n = 12; one patient with a very short period of implant survival of 0.1 year was excluded from the PCA analysis, since he did not fall to any cluster; “there was no time for metals to be released into the surrounding area”) and cobalt-chromium (n = 11 patients) implants. The following variables were included to the PCA: LoE, dendritic cells, T lymphocytes, mastocytes, eosinophils, neutrophils, membrane type and metals (4.A: Co and Cr; 4.B: Co, Cr, Ti, V). We identified several sub-

groups (cluster) in both the groups in dependence on the LoE.

PCA analysis for the group with implants without Ti (Co and Cr included in the PCA from metals):

PCA could determine several clusters, which differed in the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. Results are shown in Fig. 4 and tell us: i) short LoE, type IV membrane and higher presence of neutrophils were determining for the first aggregation; ii) moderate LoE (2.1–2.7 years) was determining for the second cluster; membrane type was not determining, as

well as any of evaluated cellular populations; iii) the longest LoE (5 and more years), high Co-Cr concentrations were determining for the third cluster, membrane type was not determining, T lymphocytes were predominant among cells.

Group with titanium implants

(Ti, V included in the PCA from metals):

Also in this group the PCA could determine several clusters, which differed in the LoE, type of the membrane and presence of immune cells. Results are shown in Fig. 5: i) short exposure, type IV membrane, low levels of metals and zero dendritic cells were determining for the first cluster; ii) moderate to longer exposure and lower levels of metals were determining for the second cluster; on the contrary, no membrane type, not even any of evaluated cellular populations were determining; iii) long period of exposure, high levels of released metals in the tissues and high T lymphocyte levels were determining for the third cluster.

DISCUSSION

In this paper we evaluated the histological type of the periprosthetic membrane including representation of immune cells in relation to tissue concentrations of metals released from the MoP or CoP total joint arthroplasty. We found out that time that elapsed from the index surgery (LoE) is the main determining factor. With its growing length, the concentrations of metals originating from the implant increase. Growing T lymphocyte frequency or changing type of their distribution corresponded to high concentrations of metals in the tissues and can be therefore associated with late failure. On the contrary, the membrane type according to Krenn was not determining from the perspective of detected metal concentrations.

It has been previously demonstrated that joint arthroplasties from metallic alloys are not inert, and the surrounding tissues response to released metallic particles and ions by an inflammatory reaction²³. This response may result in failure of MoM implants²⁴ and it probably even contributes to failure of MoP implants²⁵. According to our best knowledge a relation between the concentration of metals in periprosthetic tissues and the type of tissue response in the MoP and CoP total joint arthroplasty has not yet been published in the literature. Relations of the histological finding with tissue metals have been reported in more details in MoM THA, where multivalent results have been published – on one hand, an unspecified immune response with plenty of macrophages in correlation with high tissue concentration of metals and lymphocytic infiltration in the tissues associated with low concentration of metals were demonstrated²⁶. On the other hand, Lohmann found an opposite relation, thus low concentrations of metals with macrophage infiltration and high tissue concentrations of metals associated with lymphocytic infiltration, which is more consistent with our results¹⁵. No clear correlation in dependence on

concentration of metals has been found in a recent study comparing the histopathological finding in relation to concentrations of metals in MoM total joint arthroplasties and resurfacing²⁷. Growing concentration of metals released in periprosthetic tissues with increasing length of implant service has been found in both the groups of our patients, which is in agreement with our previous work¹². We did not measure the serum levels of metals, since no correlation between the tissue and serum levels, not even their significance for failure of total joint arthroplasty were demonstrated^{12,15}. Increased levels of Cr and Co were found in some of the samples from the Ti group, this is given by the use of a CoCr head. Fretting corrosion at the trunnion may be the source of these metals here²⁸. On the contrary, low levels of V (and as well Nb – unpublished data) in this group are given by their low percentage representation in the alloy.

Tissue response to the presence of the implant and its byproducts is gradually becoming unanimous after longer exposition and takes a quite uniform character. Except for the period of membrane formation and maturation, when higher neutrophil concentration was present, the membrane type according to Krenn²² did not determine its host into one of the studied groups according to metal type and tissue metal contents respectively. There are at least two possible explanations. The first one is related to an unspecific response to the presence of prosthetic byproducts, from which only a part is formed by metals. The second explanation could be associated with relative insensitivity of the classification according to Krenn to the presence of different types of byproducts (their concentrations) in the tissues. This classification was originally designed for differentiation of basic peri-implant pathologies²⁹. In its reviewed version²², it contains even an algorithm for assessment of particles (according to material, size and quantity), which should induce tissue changes. However, based on it, the response to abrasion should include the abrasion-induced type of membrane, membrane of the combined type, and also membrane of the fibrous type²². Since there is a certain discrepancy in this area and not even our study could differentiate tissue changes more finely in dependence on concentrations of metals, replication studies should be performed at different sites by experienced pathologists.

Metal debris is not considered as the main initiator of the inflammatory tissue response to prosthetic presence, but there is a stronger pathophysiologic connection to T lymphocytes when compared with the reaction to polyethylene particles as a foreign body. A non-specific foreign body reaction primarily includes macrophages, giant cells, fibroblasts and occasional lymphocytes and small calibre blood vessels, whereas in type IV reaction a main role is played by T lymphocytes in sustaining the chronic inflammatory reaction³⁰. Higher frequency of T lymphocytes was present in our study in the tissues around titanium and also non-titanium non-MoM THAs and TKAs. A high number of T lymphocytes in periprosthetic tissues rising with time point out to an increasing contribution of specific immune response (delayed-type

IV reactions) (ref.^{31,32}) as well as the development of tolerance³³, apparently in dependence on increasing concentration of metals.

Importantly, the activation of T lymphocytes during an immune response triggers a series of events/pathways leading together to a reaction to stimuli. However, their role is strictly integrated to a particular situation in the tissue they work in³⁴. In later revisions (i.e. with longer LoE) we observed both a higher count of T lymphocytes and change of their distribution in the area of inflammation. Higher accumulation of lymphocytes was already previously reported in the tissues around MoM THA (ref.³⁵), where the levels of metals are significantly much higher than in case of MoP or CoP bearing pairs. In fact, higher frequency of T lymphocytes is not only a domain of MoM pairs, it was also observed in the tissues around MoP total joint arthroplasties^{36,37}. Modular connections, where fretting corrosion develops, are the main source of metallic particles and ions in non-MoM total joint arthroplasties^{7,38}. A higher presence of CD4+ T lymphocytes was seen in dual modular neck hip prostheses³⁹. Despite the fact that the way how metallic particles and ions stimulate the immune apparatus of the host was described^{23,40,41}, it is not clear if this is a way common for all metals and what is the threshold amount of metals, which may induce this “specific” response. The gap in our understanding of biotribocorrosion may be filled in the future for example by new tests allowing simultaneous assessment of tribocorrosion in the presence of cells and tissues⁴².

Our study is limited by a low number of cases from two different localities and heterogeneous metal composition of implants, which is further decreasing the provided sample size for each group. On the other hand, a variety of environments for adverse reaction to metals has been a subject of the study. We collected the samples in a standard way, but in a relatively low volume of the periprosthetic tissue, therefore, we cannot rule out that we would come to different findings at another collecting site. We studied this option in the previous paper and we drew a conclusion that variability in the tissue response in one host is relatively low⁴³. A certain bias may have developed even by the fact that the implants from the Ti group had CoCr heads, which resulted in “admixture” of these metals in the final analysed material. On the contrary, it is less probable that concentrations of metals in a membrane tightly adjacent to the implant could affect serum concentrations of metals from other anatomical areas, particularly if we take into account the fact that in the previous study we demonstrated minimal serum concentrations of metals in those, who had MoP, CoP, or CoC joint pairs, and no association between serum and tissue concentration¹². During the tissue analysis, we were unable to control the effect of the following variables in the tissue reaction: i) chronic mechanic stresses (including hydromechanics of fluids), developing during each step; ii) ageing of the periprosthetic tissues and implant-bone connections; and iii) polyethylene debris. This provides opportunity for future research, where a reaction to PE debris is directly compared to reaction to metals given

as a function of their respective concentration, ideally including a cytokine profile study in the same localities.

CONCLUSIONS

Current research shows that the use of TKA and THA is associated with continual release of polyethylene particles and even metals, which significantly contributes to the periprosthetic tissue reaction. We also start to understand more exactly the relation between the immune apparatus and prosthetic byproducts, which stimulate the sensors of innate and adaptive immunity. As a result, pathological debris-induced inflammation subsequently develops in some patients. This paper confirms the ability of tissues to accumulate released metals from THA and TKA and change their character in relation to the length of exposure regardless of whether the implant is of cobalt-chromium or titanium alloy. T lymphocytes play a special role; their incidence grows in relation to concentration of metals and length of the implant *in situ* regardless of material composition of total joint arthroplasty. In contrast, variability in concentration of metals is apparently not reflected in frequency of other types of immune cells (histiocytes, dendritic cells, mastocytes, eosinophils and neutrophils). Classification of periprosthetic membranes cannot predict concentrations of metals in these tissues.

Ethics approval and consent to participate

The local Ethics Committee approved this study in accordance with the Helsinki Declaration; all the enrolled patients agreed with the use of anonymized data for the research purpose of this study.

Acknowledgement: The study was supported from the resources of the Ministry of Health of the Czech Republic – Development of a Research Organization (University Hospital Olomouc, 00098892) and the grant no. NV16-31852A.

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no competing interests regarding publication of this article.

Author contributions: MH, collection of clinical data, tissue sampling, data analysis, writing; DM, determination of metal contents in clinical materials, statistics and information analysis, writing; ZS, histopathological analysis, writing; JG, conceptualization, study design, data interpretation; writing, editing. All the authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Stepanovska J, Matejka R, Rosina J, Bacakova L, Kolarova H. Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia 2020;164(1):23-33. doi: 10.5507/bp.2019.062
2. Evans JT, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more

- than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019;393:647-54. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31665-9
3. Evans JT, Walker RW, Evans JP, Blom AW, Sayers A, Whitehouse MR. How long does a knee replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *Lancet* 2019;393:655-63. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32531-5
 4. Chang JS, Haddad FS. Long-term survivorship of hip and knee arthroplasty. *The bone & joint journal* 2020;102-B:401-2. doi: 10.1302/0301-620X.102B4.BJJ-2020-0183
 5. Dyskova T, Kriegova E, Slobodova Z, Zehnalova S, Kudelka M, Schneiderova P, Fillerova R, Gallo J. Inflammation time-axis in aseptic loosening of total knee arthroplasty: A preliminary study. *PLoS One* 2019;14:e0221056. doi: 10.1371/journal.pone.0221056
 6. Pajarinen J, Gallo J, Takagi M, Goodman SB, Mjoberg B. Particle disease really does exist. *Acta Orthop* 2018;89:133-6. doi: 10.1080/17453674.2017.1402463
 7. Urish KL, Giori NJ, Lemons JE, Mihalko WM, Hallab N. Trunnion Corrosion in Total Hip Arthroplasty-Basic Concepts. *Orthop Clin North Am* 2019;50:281-8. doi: 10.1016/j.ocl.2019.02.001
 8. Goodman SB, Gallo J, Gibon E, Takagi M. Diagnosis and management of implant debris-associated inflammation. *Expert Rev Med Devices* 2019;1-16. doi: 10.1080/17434440.2020.1702024
 9. Laaksonen I, Galea VP, Connelly JW, Matuszak SJ, Marega L, Madanat R, Muratoglu O, Malchau H. Progression of adverse local tissue reaction in ASR metal-on-metal hip arthroplasty: a longitudinal MARS-MRI study at mid- to long-term. *Hip Int* 2019 Dec 23;1120700019894668. doi: 10.1177/1120700019894668 [Epub ahead of print]
 10. Dundon JM, Ramkumar PN, Lajam C. Tribocorrosion in Total Hip Arthroplasty. *JBJS Rev* 2017;5(3). pii: 01874474-201703000-00002. doi: 10.2106/JBJS.RVW.16.00055
 11. Diomidis N, Mischler S, More NS, Roy M. Tribo-electrochemical characterization of metallic biomaterials for total joint replacement. *Acta Biomater* 2012;8:852-9. doi: 10.1016/j.actbio.2011.09.034
 12. Kuba M, Gallo J, Pluhacek T, Hobza M, Milde D. Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total joint arthroplasty. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:454-62. doi: 10.1002/jbm.b.34137
 13. Lehtovirta L, Reito A, Lainiala O, Parkkinen J, Hothi H, Henckel J, Hart A, Eskelinen A. Host-specific factors affect the pathogenesis of adverse reaction to metal debris. *BMC musculoskeletal disorders* 2019;20:195. doi: 10.1186/s12891-019-2578-0
 14. Lehtovirta L, Reito A, Parkkinen J, Peraniemi S, Vepsäläinen J, Eskelinen A. Association between periprosthetic tissue metal content, whole blood and synovial fluid metal ion levels and histopathological findings in patients with failed metal-on-metal hip replacement. *PLoS One* 2018;13:e0197614. doi: 10.1371/journal.pone.0197614
 15. Lohmann CH, Meyer H, Nuechtern JV, Singh G, Junk-Jantsch S, Schmotzer H, Morlock MM, Pfluger G. 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. doi: 10.2106/JBJS.L.01273
 16. Salib CG, Lewallen EA, Paradise CR, Tibbo ME, Robin JX, Trousdale WH, Morrey LM, Xiao J, Turner TW, Limberg AK, Jay AG, Thaler R, Dudakovic A, Sanchez-Sotelo J, Morrey ME, Berry DJ, Lewallen DG, van Wijnen AJ, Abdel MP. Molecular pathology of adverse local tissue reaction caused by metal-on-metal implants defined by RNA-seq. *Genomics* 2019;111:1404-11. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.09.013
 17. Campbell PA, Kung MS, Hsu AR, Jacobs JJ. Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions? *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:3718-27. doi:10.1007/s11999-014-3893-2
 18. 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
 19. Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth 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. doi: 10.2106/JBJS.C.00949
 20. Lohmann CH, Singh G, Willert HG, Buchhorn GH. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J Orthop* 2014;5:660-6. doi: 10.5312/wjo.v5.i5.660
 21. Samelko L, Caicedo MS, Jacobs J and Hallab NJ. Transition from metal-DTH resistance to susceptibility is facilitated by NLRP3 inflammasome signaling induced Th17 reactivity: Implications for orthopedic implants. *PLoS One* 2019;14:e0210336. doi: 10.1371/journal.pone.0210336
 22. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Natsu S, Boettner F, Zustin J, Kolbel B, Ruther W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow R, Soder S, Muller S, Parvizi J, Illgner U, Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 2014;210:779-86. doi: 10.1016/j.prp.2014.09.017
 23. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 2009;67:182-8.
 24. Reito A, Lainiala O, Elo P, Eskelinen A. Prevalence of Failure due to Adverse Reaction to Metal Debris in Modern, Medium and Large Diameter Metal-on-Metal Hip Replacements--The Effect of Novel Screening Methods: Systematic Review and Metaregression Analysis. *PLoS One* 2016;11:e0147872. doi: 10.1371/journal.pone.0147872
 25. 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. *Bone Joint J* 2015;97-b:1024-30. doi: 10.1302/0301-620x.97b8.34682
 26. Campbell P, Ebramzadeh 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. doi: 10.1007/s11999-010-1372-y
 27. Lehtovirta L, Reito A, Parkkinen J, Peräniemi S, Vepsäläinen J, Eskelinen A. Association between periprosthetic tissue metal content, whole blood and synovial fluid metal ion levels and histopathological findings in patients with failed metal-on-metal hip replacement. *PLoS one* 2018;13:e0197614-e0197614. doi: 10.1371/journal.pone.0197614
 28. Sultan AA, Cantrell WA, Khlopas A, Berger RJ, Sodhi N, Molloy RM, Krebs VE and Mont MA. Evidence-Based Management of Trunnionosis in Metal-on-Polyethylene Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review. *J Arthroplasty* 2018;33:3343-53. doi: 10.1016/j.arth.2018.05.035
 29. Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, Neidel J, Gehrke T, Frommelt L, Hansen T, Otto M, Barden B, Aigner T, Stiehl P, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Strobel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Bos I, Hendrich C, Kriegsmann J, Krenn V. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 2006;59:591-7. doi: 10.1136/jcp.2005.027458
 30. Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 2007;28:5044-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.035
 31. Lohmann CH, Hameister R, Singh G. Allergies in orthopaedic and trauma surgery. *Orthop Traumatol Surg Res* 2017;103:575-581. doi: 10.1016/j.otsr.2016.06.021
 32. Roberts TT, Haines CM, Uhl RL. Allergic or Hypersensitivity Reactions to Orthopaedic Implants. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25:693-702. doi: 10.5435/JAAOS-D-16-00007
 33. McCarville JL, Ayres JS. Disease tolerance: concept and mechanisms. *Curr Opin Immunol* 2018;50:88-93. doi: 10.1016/j.coi.2017.12.003
 34. Peterson EJ, Maltzman JS. T-cell activation and tolerance. In: Rich RR (ed) *Clinical immunology: Principles and practice*. Elsevier, 2019, pp.183-196.
 35. 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 Orthop* 2017;88:642-8. doi: 10.1080/17453674.2017.1362774
 36. von Domarus 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. doi: 10.3109/17453674.2011.625534
 37. Ng VY, Lombardi AV, Jr., 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. doi 10.1007/s11999-010-1570-7
38. Wang Q, Eltit F, Garbuz D, Duncan C, Masri B, Greidanus N, Wang R. CoCrMo metal release in metal-on-highly crosslinked polyethylene hip implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020;108(4):1213-28. doi:10.1002/jbm.b.34470
39. 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
40. Mishra PK, Palma M, Buechel B, Moore J, Davra V, Chu N, Millman A, Hallab NJ, Kanneganti TD, Birge RB, Behrens EM, Rivera A, Beebe KS, Benevenia J, Gause WC. Sterile particle-induced inflammation is mediated by macrophages releasing IL-33 through a Bruton's tyrosine kinase-dependent pathway. *Nat Mater* 2019;18:289-97. doi: 10.1038/s41563-018-0271-6
41. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity. *J Orthop Res* 2009;27:847-54. doi: 10.1002/jor.20826
42. Radice S, Holcomb T, Pourzal R, Hallab NJ, Laurent MP, Wimmer MA. Investigation of CoCrMo material loss in a novel bio-tribometer designed to study direct cell reaction to wear and corrosion products. *Biotribology (Oxf)* 2019;18:pri: 100090. doi: 10.1016/j.biotri.2019.100090
43. Vaculova J, Gallo J, Hurnik P, Motyka O, Goodman SB, Dvorackova J. 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* 2018;106:2008-2018. doi: 10.1002/jbm.b.33990