

# Histološka analiza obproteznih tkiv ob omajanih sklepni protezah

Histological analysis of the periprosthetic tissue around failed joint arthroplasties

Andrej Cör<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska cesta 31, 6280 Ankaran

<sup>2</sup> Visoka šola za zdravstvo Izola, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6130 Izola

## Korespondenca/

### Correspondence:

prof. dr. Andrej Cör, dr. med., UP, Visoka šola za zdravstvo Izola, Polje 42, 6130 Izola, e-naslov: andrej.coer@vszi.upr.si

## Ključne besede:

histološka analiza, obprotežno tkivo, delci

## Key words:

histological analysis, periprosthetic tissue, particles

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn Supl 2009; 78: II-81-86

Prispelo: 26. nov. 2009,

Sprejeto: 30. nov. 2009

## Izvleček

Zamenjava sklepa s sklepno protezo izboljša kakovost življenja številnim bolnikom, vendar pregled literature kaže, da je pri več kot 10 % teh bolnikov sčasoma potrebna ponovna operacija. Omajanje sklepne proteze je velik medicinski pa tudi socialno-ekonomski problem. Ločimo dve najpogostejši klinični obliki omajanja sklepni protez: septično in aseptično omajanje. Morfološko lahko zanesljivo ugotovimo okužbo s kvantificiranjem nevtrofilnih granulocitov v tkivu periprotetične membrane. Aseptično omajanje lahko klasificiramo s pomočjo histološke analize obrabnih delcev (kovinskih, polietilenskih, keramičnih in cementnih) in določanjem celičnega odgovora na delce (makrofagi, večjedrne velikanke, limfociti). Nadaljnje proučevanje in kombinacija histološke analize s sofisticiranimi molekularnobiološkimi metodami bo osnova za razvoj novih diagnostičnih metod, učinkovitejšega preprečevanja in boljšega zdravljenja bolnikov s periprotetično osteolizo.

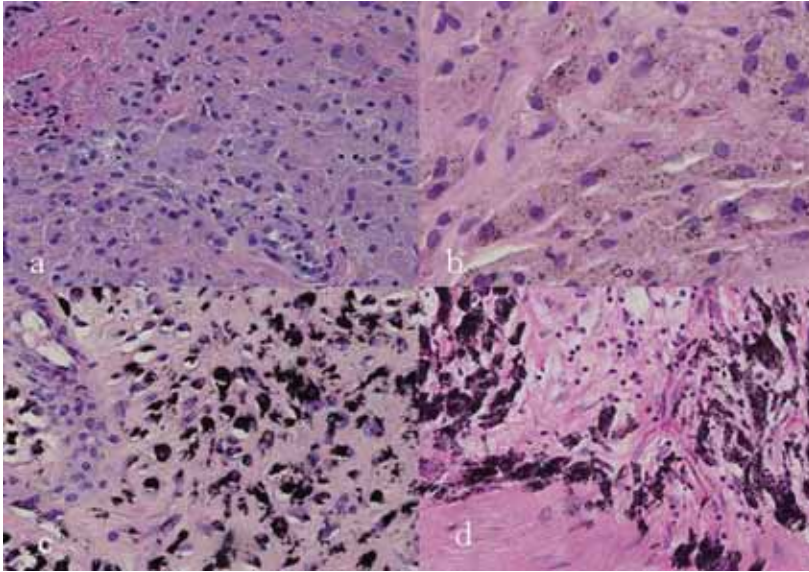
## Abstract

Joint replacement strategies have improved the quality of life for many patients; however, a broad view of the literature shows that over 10% of all implants still have to undergo operative revision. Loosening of orthopedic implants thus represents important medical and socioeconomic problem. There are two major clinical pictures of prosthesis loosening, i.e. "aseptic" and "septic" loosening. Morphologically it is possible to reliably detect an infection by quantification of neutrophilic granulocytes in periprosthetic membrane tissue. Aseptic loosening may be reproducibly classified by the detection of different types of wear particles (polyethylene, metal, ceramic and cement) as well as cellular response characteristics (macrophages, multinucleated giant cells, lymphocytes). Continuous research and a combination of histological and sophisticated molecular methods will provide a rational basis for the development of novel and effective ways of diagnosis, prevention and treatment of periprosthetic osteolysis.

## Uvod

Vsako leto v svetu vstavijo približno 1,5 milijona sklepni protez, projekcije pa kažejo, da se bo incidenca do leta 2050 povečala kar na 6,2 milijona.<sup>1</sup> Sklepne proteze izboljšajo kakovost življenja številnim bolnikom, vendar pregled literature pokaže, da je pri približno 10 % bolnikov z vstavljenimi umetnimi sklepni protezo potrebna revizijska operacija. Osteoliza in s tem omajanje sklepni proteze je problem, ki spremlja sklepno pro-

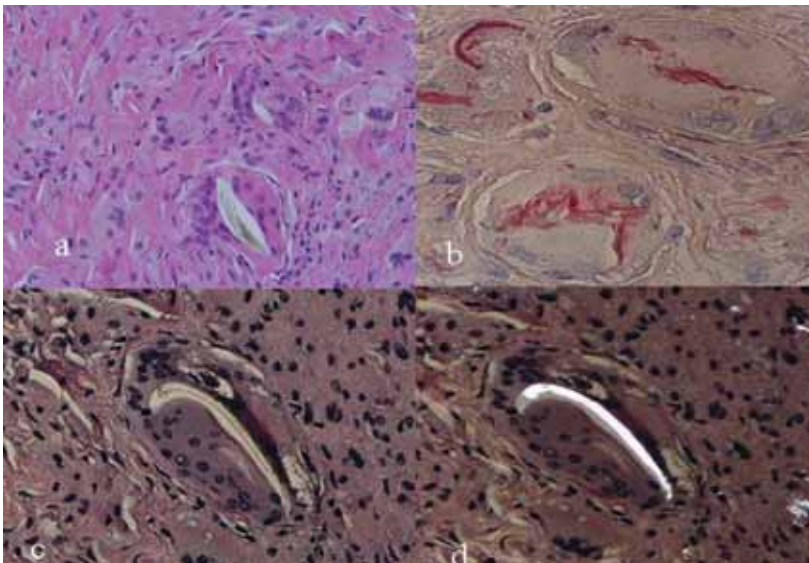
tetiko od njenih začetkov do danes. Najpogostejša oblika omajanja sklepni proteze ali njenih delov je aseptično omajanje, redkejši, a kompleksnejši vzrok omajanja pa je okužba, ki povzroča septično omajanje. V vseh primerih omajanja sklepni proteze med kostjo in vsadkom ali med kostjo in cementom v primerih cementni protez nastane vezivna periprotetična membrana. Med revizijsko operacijo je potrebno periprotetično membrano odstraniti in histološko analizirati. Histološka slika periprotetične membrane je



**Slika 1:** a) Kovinski delci v periprotetičnem tkivu sklepne proteze sivomodro obarvajo citoplazmo makrofagov; b) Jasno vidni posamezni črni delci v makrofagih in medceličnini; c) in d) Makrofagi so zapolnjeni z nešteti črnimi kovinskimi delci.

zelo heterogena. Morawietz in sodelavci so uvedli morfološko klasifikacijo periprotetičnih membran, ki obsega štiri tipe: tip I – povzročena z obrabnimi delci; tip II – povzročena z okužbo; tip III – mešani tip (značilna je mešana histološka slika tako tkivne reakcije na obrabne delce kot infiltracija z granulociti) in tip IV – intermediarni tip (periprotetična membrana, zgrajena predvsem iz

**Slika 2:** a) Veliki polietilenski delci so vidni v večjedrnih celicah velikankah; b) Polietilenski delci se obarvajo z metodo oil-o-rdeče; c) V preparatih, barvanih s hematoksilinom in eozinom, so polietilenski delci prosojni; d) V polarizacijskem mikroskopu so dvolomni.



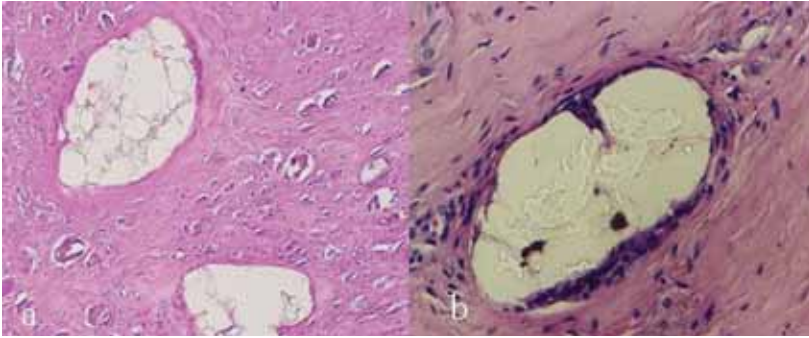
kolagenskih vlaken, vsebuje le malo celic).<sup>2</sup> Klasifikacija temelji na odkrivanju obrabnih delcev, celični sestavi granulomskega tkiva in prisotnosti nevtrofilnih granulocitov.

## Prikaz obrabnih delcev v tkivih aseptično omajanih sklepnih protez

Obrabni delci v obproteznem tkivu so poglavitni začetni dejavnik za nastanek periprotetične osteolize v primerih aseptičnega omajanja, saj je stopnja osteolize povezana z večjim deležem obrabnih delcev v obproteznem tkivu.<sup>3</sup> Obrabni delci (kovinski, polietilenski, keramični) ali kostni cement lahko nastanejo ob obrabi sestavnih delov sklepne proteze. Sproščajo se v sklepno tekočino, kjer se odstranjujejo s fagocitozo z makrofagi in večjedrnimi celicami velikankami, ki nastanejo z zlivanjem makrofagov. V rutinskih histoloških preparatih, barvanih s hematoksilinom in eozinom, in v polarizirani svetlobi lahko prikažemo večje obrabne delce bodisi v makrofagih ali v celicah velikankah ali zunaj celic v medceličnini.

Kovinski delci so v histoloških preparatih vidni kot črna ali rjava zrnca (Slika 1), ki jih v polarizirani svetlobi obdaja tanek dvolomni svetel pas. Številni kovinski delci povzročajo črnkasto obarvanost periprotetičnega tkiva (metaloz). Kovinskim delcem kot vzroku za osteolizo dolgo časa niso posvečali posebne pozornosti, vendar pa se je z uvedbo druge generacije kovinsko-kovinskih sklepnih protez izkazalo, da je večina kovinskih delcev zelo majhnih (nanodelci), ki pa imajo zelo veliko površino in s tem veliko kemično reaktivnost.<sup>4</sup> Sproščeni kovinski ioni lahko tvorijo kovinsko-proteinske komplekse, ki povzročajo osteolizo, perivaskularni limfocitni odgovor in preobčutljivostni odziv.

Polietilenski delci so vidni kot majhni delci v makrofagih ali veliki delci ali luske, ki so obdani z večjedrnimi celicami velikankami. V klasičnih histoloških preparatih so neobarvani (transparentni), v polarizirani svetlobi pa so dvolomni. S specialnim barvanjem (oil-o-red) lahko prikažemo polietilenske delce v histoloških preparatih (Slika 2).

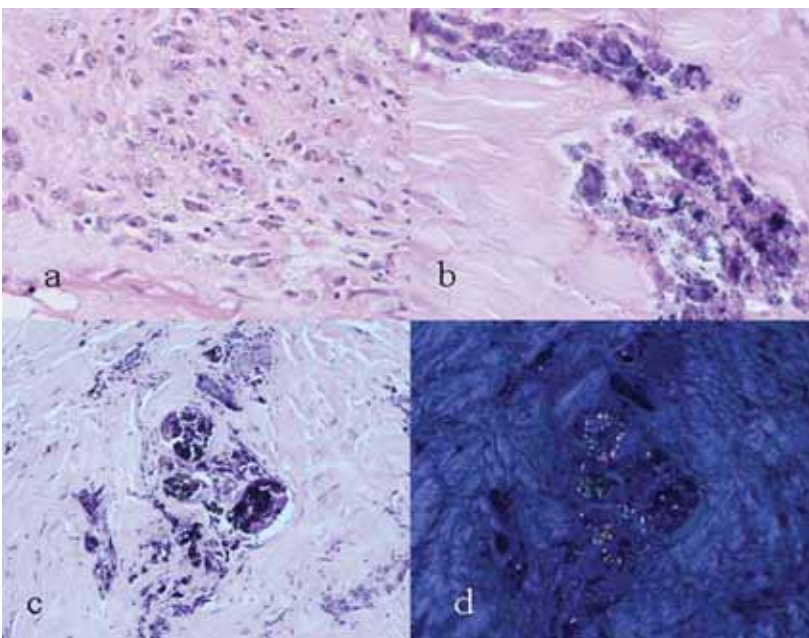


**Slika 3:** a) Kostni cement (polimetilmetakrilat) se je med izdelavo histološkega preparata raztopil. Ostal je prazen prostor, v katerem so drobna zrnca radiološkega kontrastnega sredstva; b) Prostor, kjer je bil kostni cement, obdajajo celice velikanke.

Keramični delci so v preparatih vidni kot poligonálni sivorjavi, rjavi ali črnkasti delci (Slika 3) velikosti do 5  $\mu\text{m}$ , ki so bodisi v makrofagih in celicah velikankah ali pa v zunajceličnem matriksu. Včasih jih je težko ločiti od kovinskih delcev. Obrobje keramičnih delcev kaže v polarizirni svetlobi šibko dvolomnost.

Kostni cement (polimetilmetakrilat) je topen v kemikalijah, ki jih uporabljamo za izdelavo histoloških preparatov, zato so mesta, kjer so bili delci kostnega cementa prisotni, vidni kot prazni prostori, v katerih so drobna, fina zrnca (neraztopljen radiografski

**Slika 4:** a) in b) Keramični delci so vidni kot drobni sivorjavi ali črni delci v makrofagih ali v medceličnini; c) in d) V polarizirani svetlobi kažejo keramični delci šibko dvolomnost.



kontrast, dodan cementu). Prostore obdajajo večjedrne velikanke (cementni globuli) (Slika 4).

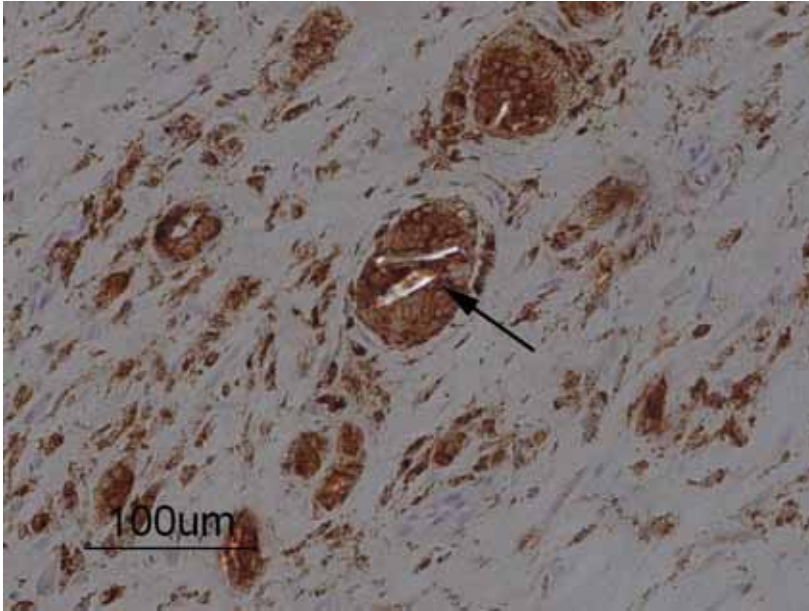
V zadnjih letih pa je postalo jasno, da je večina obrabnih delcev submikroskopskih in jih zato v svetlobnem mikroskopu ne moremo videti,<sup>4,5</sup> vendar se v rutinski analizi delcev v periprotetičnih tkivih elektronskomikroskopska analiza redko uporablja.

## Histološki prikaz celic v obproteznem tkivu aseptično omajane sklepne proteze

Različne vrste celic sodelujejo pri odgovoru na obrabne delce in pri nastanku periprotetične osteolize ter tako tvorijo kompleksno mrežo celične patogeneze.<sup>6</sup> V histoloških preparatih lahko prikažemo posamezne vrste reaktivnih celic, med katerimi so najpomembnejši makrofagi. Makrofagi so povsod, kjer se pojavljajo obrabni delci. Kadar je njihovo število v tkivu ob protezi povečano, tvorijo zadebeljeno, sinoviji podobno plast. Makrofagi in velikanke so v obproteznem tkivu razporejeni bodisi difuzno ali pa so organizirani v skupke, ki spominjajo na granulome.<sup>7</sup>

Celični odgovor na obrabne delce v periprotetičnem tkivu je odvisen od sestave, velikosti in oblike obrabnih delcev. Nespecifični celični odziv sestavljajo makrofagi, večjedrne celice velikanke, fibroblasti in limfociti. Običajna histokemična barvanja za prikaz posameznih vrst celic v periprotetičnem tkivu včasih niso dovolj, saj so morfološke značilnosti celic često zavajajoče. Potrebna so dodatna, zlasti imunohistokemična barvanja za določitev posameznih vrst celic. Monoklonska protitelesa, ki prepoznajo molekule na površini celic ali znotraj celice (epitopi), omogočajo natančnejšo imunohistokemično določitev celic in tudi njihovo funkcionalno aktivnost. CD 68 je transmembranski glikoprotein, prisoten v makrofagih in večjedrnih velikankah. V nekaterih študijah so prikazali tudi funkcionalno aktivnost makrofagov, ki so fagocitirali obrabne delce in izražanje različnih citokinov v njih<sup>8</sup> (Slika 5).

Nekateri citokini (TGF- $\alpha$ , M-CSF) neposredno, drugi pa posredno preko osteobla-

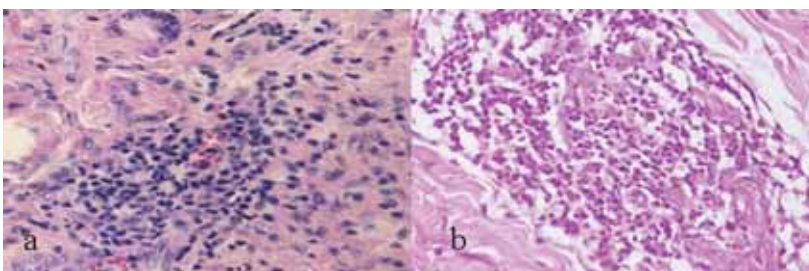


**Slika 5:** Imunohistokemični prikaz makrofagov in celic velikank (CD 68). V celici velikanki so v polarizirani svetlobi vidni polietilenski delci (puščica).

stov (IL-1, IL-6, TGF- $\alpha$ ) vplivajo na tvorbo osteoklastov. Osteoklasti so specializirane celice, odgovorne za razgradnjo kostnine. Zato je pomemben delež zmanjšanja kostnine v področjih osteolize značilen za aseptično omajanje. Povzroči jo aktiviranje osteoklastov preko makrofagov, ki so fagocitirali obrabne delce in se na ta način aktivirali.

Limfocite so sicer opisali v tkivu ob sklepni protezah, vendar jim niso posvečali velike pozornosti, saj so bili redki. Šele z uvedbo druge generacije protez kovina-na-kovino so v številnih študijah ugotavljali, da igrajo limfociti v obproteznih tkivih pomembno vlogo in so jih povezali s preobčutljivostno reakcijo tipa IV.<sup>9,10</sup> Imunohistokemične študije so pokazale, da je večina limfocitov v obproteznih tkivih ob protezah kovina-na-kovino limfocitov T (Slika 7), vendar pa so nekateri avtorji opisali tudi prisotnost limfocitov B in plazmatk<sup>11-13</sup> (Slika 6).

**Slika 6:** Histološka slika tkiva ob protezah kovina-na-kovino. a) Difuzna infiltracija limfocitov; b) Perivaskularni limfni folikel.

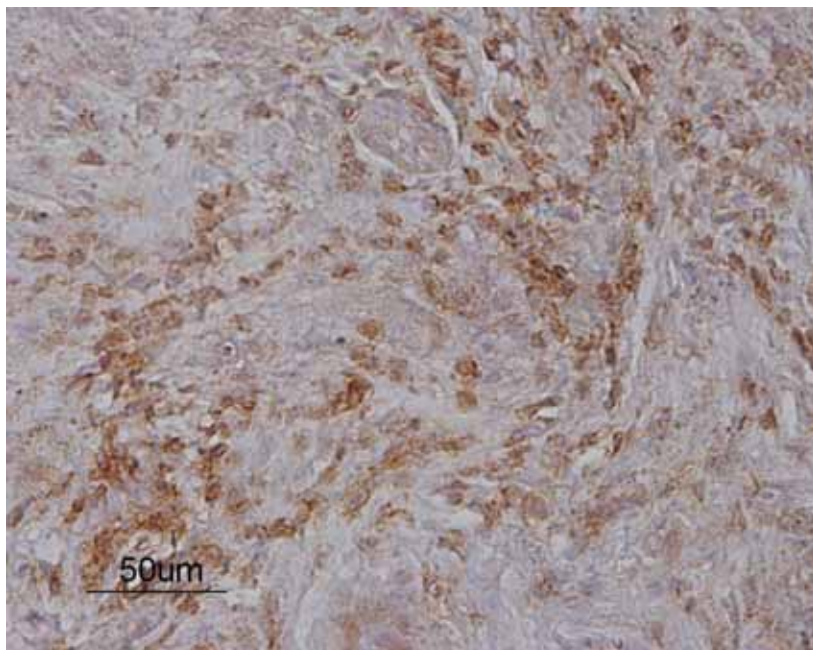


## Histološka diagnoza septično omajane sklepne proteze

Septično omajanje sklepne proteze nastane bodisi zaradi bakterijske kontaminacije med vstavitvijo proteze ali pa zaradi bakterij, ki so v področje vstavljene sklepne proteze prišle hematogeno ali limfogeno. Periprotetično membrano, klasificirano kot tip II ali tip III, uvrščamo med septično omajanje sklepne proteze. Nevtrofilni granulociti so najpomembnejši celični obrambni odgovor organizma na bakterijsko okužbo. V primeru mešanega tipa III so nevtrofilni granulociti razporejeni med celicami granulomskega tkiva (Slika 8). Mnenja o številu nevtrofilnih granulocitov v periprotetični membrani, potrebnih za diagnozo septičnega omajanja, se še vedno razhajajo. Za nekatere je dovolj že en sam nevtrofilni granulocit, za druge sta potrebna dva do pet nevtrofilnih granulocitov, nekateri pa diagnosticirajo septično omajanje, če je prisotno vsaj 10 nevtrofilnih granulocitov v mikroskopskem polju velike povečave.<sup>13-15</sup> Morawietz in sodelavci so ugotovili, da je 23 nevtrofilnih granulocitov v desetih mikroskopskih poljih velike povečave najbolj učinkovita meja za razlikovanje septičnega in aseptičnega omajanja sklepnih protez.<sup>16</sup> Občutljivost metode kvantificiranja nevtrofilnih granulocitov v histoloških preparatih periprotetičnih tkiv je bila v različnih študijah med 50 in 93 %, specifičnost pa med 77 in 100 %.<sup>17</sup>

## Naše izkušnje s histološko analizo obproteznih tkiv

V Ortopedski bolnišnici Valdoltra se je leta 2002 oblikoval multidisciplinarni tim strokovnjakov (ortopedov, kemikov, patologov), ki proučuje mehanizme omajanja sklepnih protez. Do danes so bili zbrani in histološko analizirani tkivni vzorci periprotetičnih tkiv prek 600 bolnikov. Pri vsakem bolniku določimo histološki tip periprotetične membrane ter tako ločimo septično od aseptičnega omajanja sklepne proteze. V primerih aseptično omajanjih sklepnih protez s pomočjo modificirane klasifikacije Mirra semikvantitativno določimo celični odgovor ter obseg nekroze in nekrobioze v



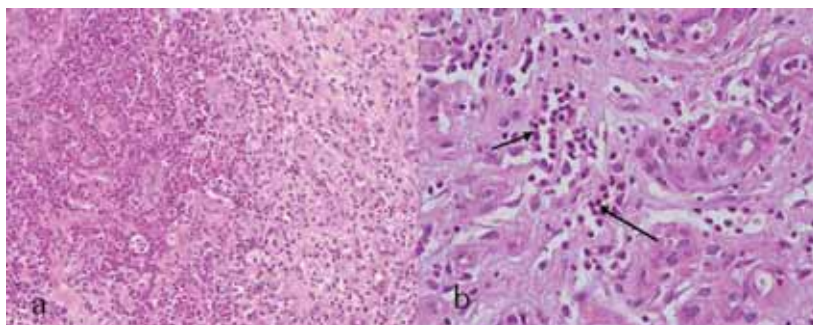
**Slika 7:** Imunohistokemični prikaz CD 3 pozitivnih limfocitov T v obproteznem tkivu ob kovinsko-kovinski sklepni protezi.

periprotetičnih membranah.<sup>18</sup> Tako velika serija vzorcev je dobra osnova za naše raziskovalno delo in številne objavljene članke v uglednejših ortopedskih revijah. V prihodnje želimo vključiti nove, zlasti molekularnobiološke metode v prospektivne klinične raziskave. Nadaljnje proučevanje bioloških mehanizmov omajanja bo osnova za razvoj novih diagnostičnih metod, učinkovitejšega preprečevanja in boljšega zdravljenja bolnikov s periprotetično osteolizo.

## Literatura

1. Drees P, Eckardt A, Gay RE, Huber LC. Mechanisms of disease: molecular insights into

**Slika 8:** a) in b) Številni nevtrofilni granulociti v granulacijskem tkivu pri septičnem omajanju sklepne proteze



2. aseptically loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 165-71.
2. Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, et al. Proposal of histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 2006; 59: 591-7.
3. 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: 649-61.
4. Doorn PE, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res* 1998; 42: 103-11.
5. Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop HA, Schmalzried TP, Amstutz HC. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 127-31.
6. Purdue E, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 454: 251-61.
7. Revel PA. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *J R Soc Interface* 2008; 5: 1263-78.
8. Clarke SA, Revell PA. Integrin expression at the bone/biomaterial interface. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 84-91.
9. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: a clinical and histomorphometrical study. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87: 28-36.
10. Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Laeremont ID, Case CP. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissue around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 18-27.
11. Milošev I, Trebše R, Kovač S, Cör A, Pišot V. Survivorship and retrieval analysis of sikomet metal-on-metal total hip replacements at a mean of seven years. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1173-82.
12. Hercus B, Saeed S, Revell PA. Expression profile of T cell associated molecules in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 13: 1153-6.
13. Athanasou NA, Pandley R, Steigner R, et al. The role of intraoperative frozen section in revision total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79: 1433-4.
14. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissue. *J Clin Pathol* 1999; 52: 118-23.

15. Bant DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 401: 230-8.
16. Del Pozo JL, Patel R. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* 2009; 361: 787-94.
17. Morawietz L, Tiddens , Mueller M, et al. Twenty-three neutrophyl granulocytes in 10 high power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology* 2009; 54: 847-53.
18. Dorn PF, Mirra JM, Campbell PA, Amstutz HC. Tissue reaction to metal on metal total hop prostheses. *Clin Orthop Relat res* 1996; 329S: S187–S205.

**we are supporting orthopaedic surgeon with the best possible product**

