

Přínos Morawietzovy klasifikace k hodnocení periprotetických tkání

Validity of the Morawietz Classification for Evaluation of Periprosthetic Tissue

J. GALLO¹, P. LUŽNÁ², M. HOLINKA¹, J. EHRMANN², J. ZAPLETALOVÁ³, J. LOŠTÁK¹

¹ Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc

² Ústav histologie a embryologie, LF UP v Olomouci

³ Ústav lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

A consensual classification of the periprosthetic interface membrane obtained at revision total joint arthroplasty was published by Morawietz et al. in 2006. Based on histomorphological criteria, four types of periprosthetic membrane were proposed: type I, aseptic failure; type II, septic failure; type III, combined type (carrying signs of both type I and II); and type IV, indeterminate type. The aim of this study was to find out whether and to what extent the Morawietz system would be suitable for use at an independent institution involved in the evaluation of periprosthetic membranes for a long time. Should it appear that the institution achieved an equally good or even better agreement between the clinical diagnosis and the histopathological finding, this consensus classification could be recommended for routine use.

MATERIAL AND METHODS

The samples of periprosthetic tissue evaluated in this study were obtained during surgery from the following groups of patients: 66 patients with aseptic loosening of total hip (THA) or knee arthroplasty, 15 patients with infection of THA, 16 patients with THA without any signs of aseptic loosening, osteolysis or infection; 8 patients with hip osteoarthritis and 8 patients with knee osteoarthritis. Sample collection and processing (for purposes of histomorphological evaluation and immunohistochemical staining) was performed according to the established protocol. The tissue samples evaluation was made by an experienced pathologist hand in hand with the method described in the original paper by Morawietz et al. For a more detailed tissue analysis, selected antibodies (CD4, CD8, CD20, IFN- γ and Hsp-60) were visualized by immunohistochemistry.

RESULTS

The majority of samples from aseptic reoperations were classified as membranes of the type I (79%) and III (16%). Specimens retrieved from septic cases were mostly classified as membranes of type II and III (60% together). The septic membranes showed a significantly higher expression of CD20 protein when compared with both the aseptic ($p < 0.0001$) and control THA samples ($p = 0.003$). The membranes retrieved from the surroundings of a stable THA without osteolysis and infection had lower expression levels of Hsp60 and IFN- γ , when compared with those from both aseptic and septic loosening. Finally, Hsp-60 expression was significantly higher in osteoarthritic tissue than in samples from stable THA ($p = 0.041$).

DISCUSSION

Morawietz et al. proposed a standardized classification system for evaluation of periprosthetic tissue. As any attempt at generalization of a complex issue, this proposal has certain shortcomings. One of these is poor detection of chronic and low-grade infections. A method that would improve the conventional counting of polymorphonuclear leukocytes is still being sought. In this connection, immunostaining for CD20 combined with an assessment of antimicrobial peptides may be a promising option. The supplementary specimen staining showed that pseudosynovial tissue is much more active in patients carrying infection and the least active in samples from stable THA in which certain tolerance and thus tissue homeostasis might be expected.

CONCLUSIONS

1. In this study the distribution of findings classified according to the Morawietz system was similar to the results published in the original study from 2006.
2. The definition of an aseptic membrane (type I) in the Morawietz system meets the requirements of clinical practice (agreement, about 80%).
3. An increased sensitivity for infectious membrane detection can be achieved by using supplementary immunohistochemical staining effective particularly in chronic and low-grade infections.
4. Painless and stable THAs typically have very low expression levels of CD4, CD20 and Hsp-60 proteins, and interferon- γ (IFN- γ) as well.

Key words: total hip arthroplasty, total knee arthroplasty, aseptic loosening, prosthetic joint infection, tissue analysis, membranes, CD receptors, Hsp-60 protein, IFN- γ .

ÚVOD

Aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza se dávají do příčinné souvislosti s uvolňováním otěrových částic do okolí kloubu (6). Infekce vzniká na podkladě kolonizace povrchů TEP či jejího okolí bakteriemi. V obou případech reaguje imunitní aparát v okolí TEP na přítomnost cizorodých těles a vytváří se přitom periprotetické membrány, které vidíme při reoperacích. Z uvedeného vyplývá, že periprotetické tkáně jsou mimořádně užitečné, protože obsahují informace o předchozí historii TEP. Jinou otázkou je, nakolik umíme tyto informace z odebraných tkání extrahovat. V předchozích letech bylo publikováno relativně velké množství studií, které referují o jednotlivých vlastnostech pseudosynoviální membrány a membrány rozhraní protéza-kost u aseptického uvolnění a infekce (8). Infekční selhání charakterizuje přítomnost vysokého počtu polymorfonukleárních (PMN) leukocytů, čehož se využívá v diagnostice (2). Histopatologická analýza není ovšem nijak jednoduchá a stále existuje určitá pravděpodobnost falešně negativního výsledku. Výsledek vyšetření mimo jiné závisí na zkušenosti patologa. Navíc se děle než 10 let diskutuje o případném podílu bakterií o velmi nízké virulenci na patogenezi „septického“ uvolnění TEP (9), což by mohlo alespoň částečně vysvětlit prolínání aseptických a septických obrazů tkáňové reakce.

Morawietz a spol. definovali čtyři typy periprotetických membrán (18): první nazvali membránou indukovanou otěrovými částicemi; druhý typ označili jako membránu infekční; třetí typ nazvali jako smíšený, protože obsahoval znaky aseptického a infekčního selhání; naopak 4. typ nebylo možné zařadit do žádného z předchozích typů („indeterminate“ membrane). Stejný tým uvedenou klasifikaci periprotetických membrán rozšířil o známky přecitlivělosti a kostní patologii (tab. 1; obr. 1), (14). Autoři postupovali konsenzuálně a deklarují, že jejich interpretační rámec by mohl být klinicky užitečný a univerzálně použitelný.

Naše studie měla dva základní cíle. Za prvé jsme chtěli v prospektivní zaslepené studii ověřit, jakou klinickou hodnotu má interpretační schéma podle Morawietze a spol. (18). Za druhé nás zajímalo, jestli může specifické barvení na vybrané povrchové/intracelulární markery zvýšit diagnostickou cenu zmíněné klasifikační směrnice.

SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA

Pacienti

Do studie bylo zahrnuto celkem 113 pacientů, z nichž bylo 36 mužů (31,9 %) a 77 žen (68,1 %). Reoperace proběhly mezi červnem 2009 a prosincem 2012. Důvodem k reoperaci bylo aseptické uvolnění ($n = 66$) u TEP kyčle ($n = 51$), TEP kolena ($n = 15$), resp. periprotetická infekce TEP kyčle/kolena ($n = 9/6$). Kontrolní skupinu s TEP tvořili pacienti reoperovaní z jiného důvodu. Tito pacienti měli klinicky a radiologicky stabilní TEP kyčle ($n = 10$) nebo kolena ($n = 6$). Kontrolní skupinu bez TEP tvořili pacienti s pokročilou osteoartrózou

kyčle ($n = 8$) nebo kolena ($n = 8$), jejichž tkáně jsme odebrali při primoimplantaci TEP (obr. 2). Všechny operace proběhly za standardních podmínek. Pacienti předem odsouhlasili perioperační odběr tkání. Studie probíhala v rámci řešení grantového projektu se souhlasem příslušné etické komise.

Infekce kloubní náhrady byla klinicky určena podle dříve publikovaných kritérií (7). Jako aseptické uvolnění byly definovány ty případy, které nesplňovaly kritéria pro infekční selhání. Do studie jsme zařadili pouze české občany kavkazské rasy.

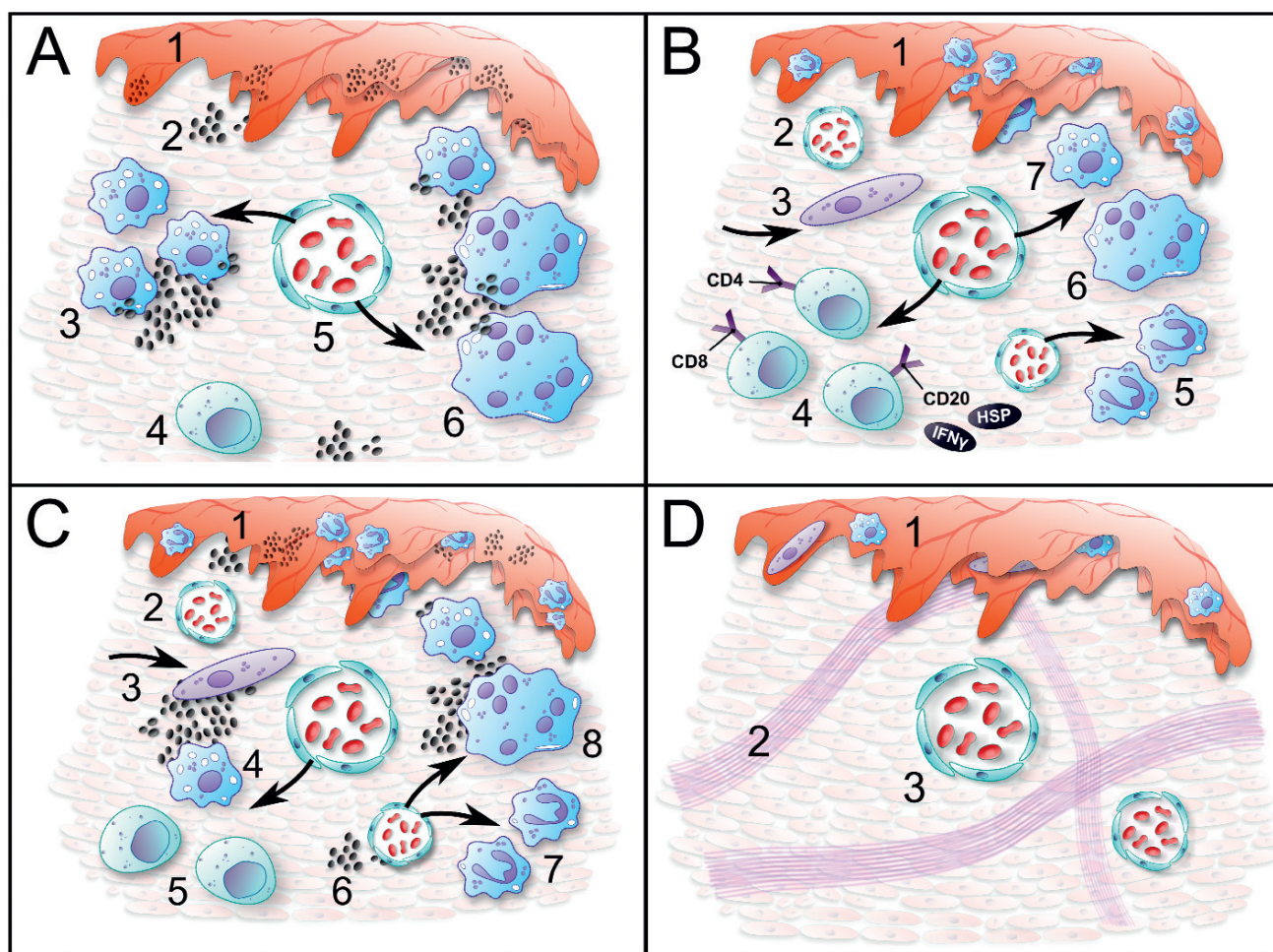
Odběry, zpracování a barvení periprotetických tkání

Velmi tenký vzorek pseudosynoviální tkáně byl odebrán okamžitě po protěti pouzdra reoperovaného kloubu. Všechny odběry provedl jeden operátor. Vzorek byl ihned vložen do 4% formalínu a odeslán k histologickému zpracování do spolupracující laboratoře. Všechny biotické vzorky se zpracovávaly a obarvovaly podle standardního postupu, který byl již dříve popsán (25). K vyšetření podle Morawietze a spol. byly z parafinových bloků připraveny řezy o tloušťce 3 až 5 μm , které se poté obarvovaly hematoxylin-eozinem. K další charakterizaci vyšetřovaných tkání (vybraní zástupci ze všech studovaných skupin) bylo použito barvení CD4 (T lymfocyty), CD8 (T lymfocyty), CD20 (B lymfocyty), Hsp-60 (alarmin) a IFN- γ (prozánětlivý cytokin) nepřímou dvoustupňovou imunohistochemickou metodou. Byly použity následující monoklonální primární protilátky: myši CD4 (klon 1F6, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK); myši CD8 (klon 1A5, Leica Biosystems, Nussloch, Německo); myši CD20cy (klon L26, Dako, Glostrup, Dánsko); myši Hsp-60 (klon SPM253, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); myši IFN- γ (klon LLO6Z, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Revitalizace antigenů ve vysokotlakém histoprocessoru HistosPro (Milestone, MI, USA) byla pro všechny antigeny provedena v 10 mM citrátovém pufru, pH 6 při 120 °C. EnVision™ systém (Dako, Glostrup, Dánsko) se následně používal k vizualizaci pozitivní reakce. Všechny primární protilátky byly testovány na adekvátních pozitivních kontrolních tkáních.

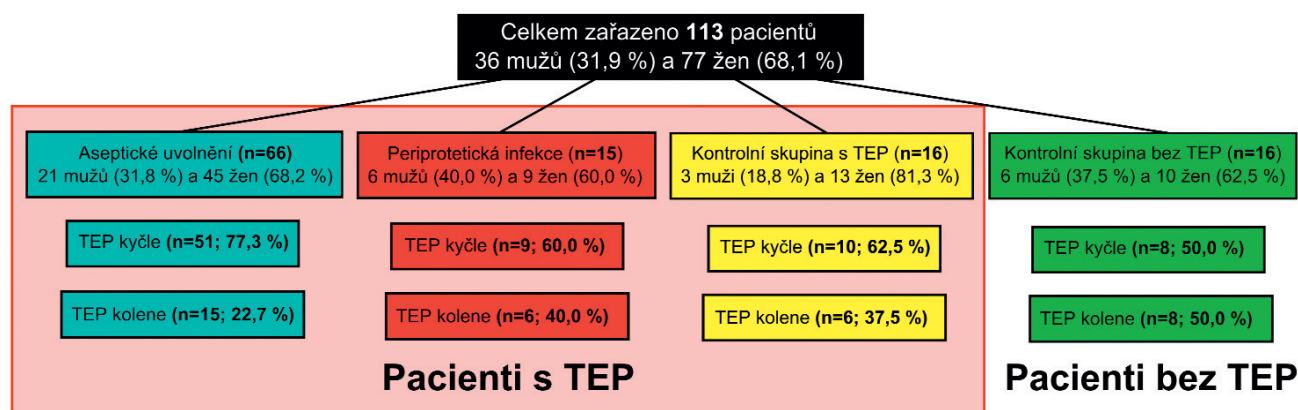
Výběr studovaných molekul

Jako cílové molekuly jsme vybrali povrchové receptory CD4, CD8 a CD20, které jsou typické pro následující skupiny lymfocytů: Th lymfocyty (T helper cell, CD4⁺), Tc lymfocyty (T cytotoxic cell, CD8⁺) a B lymfocyty (CD20⁺). Tyto buněčné elementy se podílejí na prezentaci antigenu a imunitních reakcích vůči bakteriím (obr. 3).

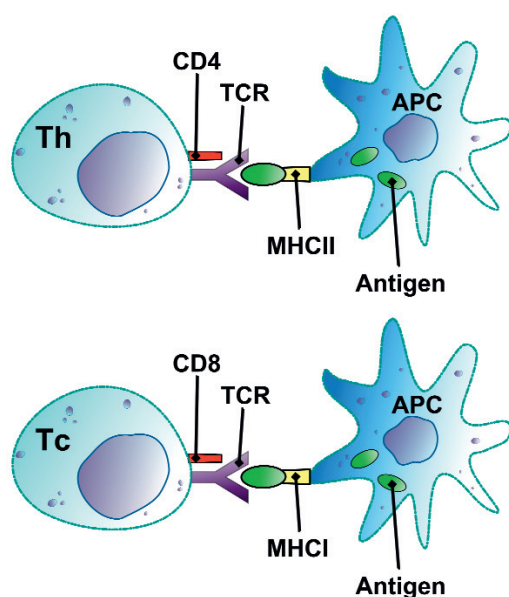
Tzv. heat shock protein 60 (Hsp-60) patří do rodiny proteinů, které se podílejí na ochraně buněčných bílkovin v případě stresové reakce, jako je například zánět, a dále na aktivaci buněčných elementů realizujících zánětlivé reakce (1). Interferon gama (IFN- γ) je klíčovým mediátorem zánětlivé imunitní odpovědi, podílí se mimo jiné na polarizaci tkáňových makrofágů (M1)



Obr. 1. A) Schéma histologického obrazu periprotetické membrány při aseptickém selhání: 1 – periprotetická membrána s depozity otěrových částic, 2 – otěrové částice, 3 – vcestované makrofágy z přilehlých cév, 4 – ojedinělé lymfocyty, 5 – krevní céva, 6 – obrovské mnohobuněčné buňky. B) Schéma histologického obrazu periprotetické membrány při infekčním selhání: 1 – zánětlivě infiltrovaná periprotetická membrána, 2 – krevní céva, 3 – aktivované fibroblasty z okolního stromatu, 4 – vcestované CD4+ Th lymfocyty, CD8+ Tc lymfocyty a CD20+ B lymfocyty a 5 – neutrofilní granulocyty z přilehlých cév, 6 – obrovské mnohobuněčné buňky, 7 – ojedinělé makrofágy. Cytokiny zapojené do zánětlivé reakce proti infektu IFN- γ a HSP-60 byly stejně jako výše jmenované CD receptory cílem imunohistochemického barvení. C) Schéma kombinovaného histologického obrazu s nálezem známek aseptického selhání a infektu: 1 – periprotetická membrána s depozity otěrových částic, 2 – krevní céva, 3 – aktivované fibroblasty z okolního stromatu, 4 – vcestované makrofágy a 5 – lymfocyty z přilehlých cév, 6 – otěrové částice, 7 – vcestované neutrofily a 8 – obrovské mnohobuněčné buňky. D) Schéma histologického obrazu neodpovídajícího žádnému z předchozích typů dle Morawietzovy klasifikace, tzv. „indeterminate“ (nejednoznačný) typ membrány: 1 – periprotetická membrána s fibroblasty, makrofágy a fibrinem ojediněle na jejím povrchu, 2 – kolagenní vlákna, 3 – krevní céva.



Obr. 2. Diagram znázorňující rozdělení pacientů ve studii.



Obr. 3. Antigen prezentující buňky (APC) stimulují Th a Tc lymfocyty prostřednictvím hlavních histokompatibilních komplexů (MHC I. a II. třídy) a specifického T-buněčného receptoru (TCR), které vedou k jejich dozrávání. Povrchové koreceptory CD 4 a CD 8 asistují T-buněčnému receptoru v prezentaci antigenu.

směrem k zánětu, na imunitních reakcích Th a Tc lymfocytů, zvyšuje adhezi a migraci leukocytů a urychluje prezentaci antigenů (22).

Histopatologické hodnocení

Obarvené vzorky prohlížel zkušený hodnotitel (JE) a interpretoval je podle kritérií, které popsali Morawietz a spol. (18). Výstupem vyšetření bylo přiřazení některého ze čtyř typů periprotetických membrán (tab. 1) ke každé hodnocené tkáni. Imunohistochemické značení jsme vyhodnocovali pomocí tzv. histoskóre, které je násobkem pozitivitu (kategorie 0, 1, 2 a 3) a intenzity barvení (stupeň 1, 2, 3). Kategorie 0 je určena pro pozitivitu 0–5 % buněk, kategorie 1 odpovídá pozitivitě 5–25 % buněk, kategorie 2 znamená 26–60 % pozitivních buněk a kategorie 3 je pro více než 60 % pozitivních buněk ve vzorku. Intenzita barvení je stupně 1 (slabé), 2 (střední) nebo 3 (silné). Histoskóre tudíž dosahovalo hodnot 0, 1, 2, 3, 4, 6 nebo 9. Všechny primární protilátky byly testovány na doporučených kontrolních tkáních, jako negativní kontrola byla použita Mouse Isotype Control (1:100, Abcam, Cambridge, UK).

Design studie

Jde o prospektivní studii, v níž byl závěr každého histopatologického vyšetření přímo porovnán s klinic-

Tab. 1. Histopatologická klasifikace periprotetické membrány dle Morawietze et al. 2006 a její revidovaná verze Krenn et al. 2013

Morawietz 2006		Krenn 2013	
Typ I (indukovaný otěrovými částicemi)	<ul style="list-style-type: none"> – převaha makrofágů a obrovských mnohojaderných buněk – řídký výskyt lymfocytů – přítomnost otěrových částic 	Alergická reakce	<ul style="list-style-type: none"> – lymfocytární infiltrace – pozitivita alergických testů
		Typ I (indukovaný otěrovými částicemi)	<ul style="list-style-type: none"> – převaha makrofágů a obrovských mnohojaderných buněk – přítomnost otěrových částic, – řídký výskyt lymfocytů – přítomnost otěrových částic
		Typ I + nekróza	– přítomnost otěrových částic, kov x
Typ II (infekční)	<ul style="list-style-type: none"> – převaha neutrofilních granulocytů – přítomnost aktivovaných fibroblastů, lymfocytů, plazmatických buněk – řídký výskyt makrofágů a obrovských mnohojaderných buněk – proliferace malých cév s edémem okolní pojivové tkáně 	Typ II (infekční)	<ul style="list-style-type: none"> – převaha neutrofilních granulocytů – přítomnost aktivovaných fibroblastů, lymfocytů, plazmatických buněk – řídký výskyt makrofágů a obrovských mnohojaderných buněk – proliferace malých cév s edémem okolní pojivové tkáně
Typ III (kombinovaný)	<ul style="list-style-type: none"> – kombinace histopatologických změn typu I a II – převládající obraz záleží na oblasti, kde dominují změny indukované částicemi nebo bakteriemi 	Typ III (kombinovaný)	<ul style="list-style-type: none"> – kombinace histopatologických změn typu I a II – převládající obraz záleží na oblasti, kde dominují změny indukované částicemi nebo bakteriemi
Typ IV (nejednoznačný)	<ul style="list-style-type: none"> – fibroblasty, makrofágy a fibrin ojedinele na povrchu periprotetické membrány – bohatá přítomnost pojivové tkáně a kolagenních vláken 	Typ IV (nejednoznačný)	<ul style="list-style-type: none"> – fibroblasty, makrofágy a fibrin ojedinele na povrchu periprotetické membrány – bohatá přítomnost pojivové tkáně a kolagenních vláken
		Artrofibróza	– dominuje fibróza, pozitivita na β -katenin
		Kostní patologie	– osteomyelitida, osteonekróza, osifikace, osteopenie

kou diagnózou příčiny reoperace. Zkušený patolog prohlížel sklíčka několikrát, přičemž v době prohlížení neznal klinickou diagnózu. Výsledný typ periprotetické membrány zapsal do tabulky v Excelu k příslušnému označení pacienta. Klinici participující na studii doplnili k pořadovému číslu pacienta výsledek klinické diagnózy bez znalosti závěru histopatologického vyšetření. Konečné zpracování dat provedl biostatistik.

Statistické zpracování

K porovnání popisných kvantitativních dat byl použit neparametrický Kruskalův-Wallisův test a jako post hoc test jsme aplikovali Mannův-Whitneyův U test s Bonferroniho korekcí signifikance na mnohonásobné porovnávání. Fisherův přesný test jsme použili k porovnání četností jednotlivých výsledků. Data jsme analyzovali pomocí statistického programu SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hodnota $p < 0,05$ byla považována za signifikantní.

K celkovému posouzení přínosu Morawietzovy klasifikace jsme použili následující pravidla: vynikající výsledek = shoda mezi typem membrány (závěrem patologa) a klinickou diagnózou v 90 a více %; dobrý výsledek = shoda v 80 a více %; neuspokojivý výsledek = méně než 80% shoda (tzn. metoda generuje více než 20 % nesprávných výsledků).

Doplňkovým kritériem byla četnost tzv. nezařaditelné membrány 4. typu. Domníváme se, že podíl tohoto závěru by neměl překročit 10 %, protože jde o klinicky neužitečný závěr.

Roli pěti specifických barvení (CD4, CD8, CD20, Hsp-60 a IFN- γ) jsme posuzovali jednak v kontextu zvýšení přesnosti finální klinické diagnózy, jednak nás zajímala tkáňová exprese těchto molekul jako biomarkerů sterilního zánětu (v kontextu částicové nemoci).

VÝSLEDKY

Charakteristiky pacientů

V souboru s aseptickým uvolněním a osteolýzou ($n = 66$) bylo hlavním důvodem k reoperaci uvolnění alespoň jednoho implantátu ($n = 34$ pacientů), osteolýza kolem stabilního implantátu ($n = 31$) a periprotetická fraktura s osteolýzou typu B3 ($n = 1$).

Z hlediska lokalizace obsahoval soubor 51 reoperací kyčle a 15 reoperací kolena. Přehled typů kostních defektů ukazuje tabulka 2. U kyčlí jsme naměřili průměrný lineární otěr polyetyleny 1,762 mm (0,119–6,8; SD 1,33), u extrahovaných vložek TEP kolenního kloubu jsme měření otěru neprováděli. Nejčastěji reoperovanou endoprotézou kyčle byla ABG ($n = 17$; 33 %; dřík ABG byl kombinován navíc se dvěma jinými typy jamky). Následovaly TEP s Bicon jamkou ($n = 9$; 17,6 %; kombinována s dvěma typy dříků), Balgrist košíkem ($n = 7$; 13,7 %; v kombinaci s 5 typy dříků) a Duraloc jamkou ($n = 5$; 9,8 %; v kombinaci s dvěma typy dříků). U TEP kolen jsme nejčastěji reoperovali endoprotézu PFC ($n = 5$; 33,3 %). Kinemax plus a Search Evolution byly reoperovány 3x (20 %), Evolution a Sigma jsme reoperovali 2x (13 %).

Tab. 2. Rozdělení podle závažnosti osteolýzy u TEP kyčelního kloubu (Salehova klasifikace) a TEP kolenního kloubu (AORI klasifikace) ve skupině pacientů s aseptickým selháním TEP. Saleh klasifikace – M (mild, mírná), S (severe, vážná)

TEP kyčelního kloubu			
acetabulum		femur	
nehodnoceno	0	nehodnoceno	1 (2,0 %)
M (Saleh 1–2)	32 (62,7 %)	M (Saleh 0–1)	26 (51,0 %)
S (Saleh 3–5)	19 (37,3 %)	S (Saleh > 2)	24 (47,1 %)
TEP kolenního kloubu			
femur		tibia	
F1	10 (66,7 %)	T1	7 (46,7 %)
F2A	2 (13,3 %)	T2A	8 (53,3 %)
F2B	3 (20,0 %)	T2B	0
F3	0	T3	0

Kontrolní skupinu s TEP bez známek aseptického uvolnění a bez patrné periprotetické osteolýzy tvořilo 16 pacientů (10 kyčlí/6 kolen). Důvodem k reoperaci byl syndrom bolestivé kyčle po TEP (bolesti po TEP bez zjevné příčiny; $n = 6$), nestabilní TEP ($n = 3$), periprotetická fraktura typu B1 ($n = 2$), otěr polyetyleny ($n = 2$), recidivující výpotky ($n = 2$) a heterotopické osifikace ($n = 1$). Nejčastěji reoperovanou endoprotézou kyčle byla TEP s Bicon jamkou ($n = 5$), následovaná TEP ABG ($n = 2$). U kolen jsme reoperovali nejčastěji endoprotézu Emotion ($n = 2$). Ostatní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 3.

Soubor infekčních reoperací ($n = 15$) tvořilo 8 chronických pooperačních infekcí, 4x došlo k rozšíření infekce z okolí kloubu (např. v kontextu erysipelu), u jednoho pacienta jsme průběh vyhodnotili jako hematogenní infekci a u dvou pacientů jsme odebírali tkáň před definitivní reimplantací. V kontextu klasifikace podle Cierneho a Madera (3) bylo 6 pacientů typu A a 9 pacientů typu B. Infekci způsobily 5x stafylokoky, 2x streptokoky, 2x mykobakterie, 1x *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides frag.* a *Peptostreptococcus micros*. Průměrná předoperační sedimentace byla $58,9 \pm 37,2$ mm/hod. (medián 46,0 mm/hod.) a CRP bylo $150,6 \pm 152,3$ (medián 74,6). U těchto pacientů byla endoprotéza stabilní 9x, 4x byla uvolněná. U dvou pacientů se infekce řešila ve fázi píštěle. Pacienti v souboru „infekce“ byli signifikantně starší oproti pacientům s aseptickým selháním ($p = 0,005$). Ostatní vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 3.

Hodnocení pseudosynoviální tkáně podle Morawietze a spol.

Pokud jsme reoperovali pacienta s aseptickým uvolněním a odebrané tkáň interpretovali podle doporučení Morawietze, bylo vysoce pravděpodobné ($p < 0,0001$; Fisherův exaktní test s Bonferroniho korekcí), že membránu klasifikujeme jako I. typ (78,8 %; 95% interval spolehlivosti: 67,0 %–87,9 %). Připočteme-li k tomu další čtyři vzorky, které byly určeny jako membrána III. typu (smíšená), což není v rozporu s diagnózou aseptického uvolnění, shodovala se zjištění klinika a patologa v 85 % hodnocených případů. Ani jednou nedošlo k záměně aseptické membrány za septickou (tj. falešně

Tab. 3. Základní charakteristiky čtyř základních skupin pacientů rozdělených na základě příčiny revizní operace. V tabulce je na příslušných místech uvedena hodnota mediánu s odpovídajícím rozpětím nejvyšší a nejnižší hodnoty; OA = osteoartróza

	Aseptické uvolnění (n = 66)	Periprotetická infekce (n = 15)	Kontrolní skupina s TEP (n = 16)	Kontrolní skupina bez TEP (n = 16)	p
primární diagnóza					
primární OA	34 (51,5 %)	9 (60 %)	10 (62,5 %)	9 (56,3 %)	0,541
posttraumatická OA	5 (7,6 %)	1 (6,7 %)	1 (6,3 %)	3 (18,8 %)	
postdysplastická kyčel	17 (25,8 %)	3 (20 %)	1 (6,3 %)	1 (6,3 %)	
ischemická nekróza	5 (7,6 %)	1 (6,7 %)	3 (18,8 %)	1 (6,3 %)	
závažné onemocnění	1 (1,5 %)	1 (6,7 %)	1 (6,3 %)	1 (6,3 %)	
zlomenina krčku	4 (6,1 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (6,3 %)	
věk v době primoimplantace	51 (26–80)	70 (40–83)	57 (31–83)	62 (24–77)	0,001
věk v době revizní operace	65 (40–89)	71 (27–84)	64 (45–88)	–	0,502
výška (cm)	165 (150–186)	168 (158–188)	168 (158–186)	171 (157–186)	0,356
váha (kg)	78 (48–110)	84 (62–120)	80 (60–105)	85 (51–150)	0,606
BMI	28,1 (19,2–41,4)	29,4 (23,7–37,5)	28,6 (21,3–34,4)	28,1 (19,2–49,0)	0,404
KSS bolest	40 (20–61)	46,5 (30–70)	54,0 (25–92)	49,0 (46–63)	0,123
KSS funkce	40 (0–50)	47,5 (20–66)	42,5 (15–70)	50,0 (30–70)	0,181
HHS	59,0 (14–99)	48,0 (12–58)	46,5 (20–80)	59,5 (34–77)	0,051
kuřák					
ne	48 (72,7 %)	10 (66,7 %)	11 (68,8 %)	10 (62,5 %)	0,931
ex-kuřák	10 (15,2 %)	2 (13,3 %)	2 (12,5 %)	3 (18,8 %)	
ano	8 (12,1 %)	3 (20,0 %)	3 (18,8 %)	3 (18,8 %)	

pozitivní výsledek). Na obrázcích 4 a 5 jsou uvedeny příklady z našich vyšetření.

Mnohem větší rozptyl jsme měli u infekčních případů – pouze 3 vzorky byly určeny jako membrány II. typu. Membránu II. nebo III. typu jsme u infekcí určili v 60 % případů (95% interval spolehlivosti: 32,3 %–83,7 %). Ostatní výsledky lze najít v tabulce 4.

Z uvedeného je zřejmé, že interpretace histologických nálezů pomocí Morawietzovy klasifikace byla v kontextu hodnocení aseptických membrán uspokojivá (79% shoda mezi klinickou a patologickou interpretací) až dobrá (85% shoda pro kombinaci membrán I. a III. typu). Naopak velký rozptyl jsme zjistili u infekčních tkání, kde bylo 40 % vzorků označeno jako aseptické (falešně negativní výsledek) nebo se nedalo zařadit. Četnost nezařaditelných nálezů (membrán IV. typu) byla vysoká (ve všech hodnocených skupinách byla vyšší než 10 %).

Barvení tkání na CD4, CD8, CD20, Hsp-60, IFN- γ

Signifikantně vyšší výskyt positivity CD20 jsme zjistili ve skupině infekce (57,1 %) ve srovnání se skupinou s aseptickým uvolněním (1,6 %) a kontrolou s TEP ($p < 0,0001$; resp. $p = 0,003$; Fisherův exaktní test s Bonferroniho korekcí). Expres CD8 (78,6 %) byla vysoká v souboru infekčních membrán (obr. 6). Ve všech hodnocených skupinách s výjimkou infekcí (33,3 %) byla velmi nízká exprese IFN- γ . Za zajímavé také považujeme, že nejnižší exprese CD4, CD20, Hsp-60 i IFN- γ byly zaznamenány v membránách kontrol se stabilní TEP bez známek osteolýzy. Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

DISKUSE

V naší studii jsme zjistili dobré diagnostické vlastnosti interpretační směrnice vytvořené Morawietzem a Krennem k posuzování pseudosynoviální tkáň odebrané během reoperací TEP kyčlí a kolen. Z klinického hle-

Tab. 4. Výsledky histopatologického vyšetření dle Morawietzovy klasifikace

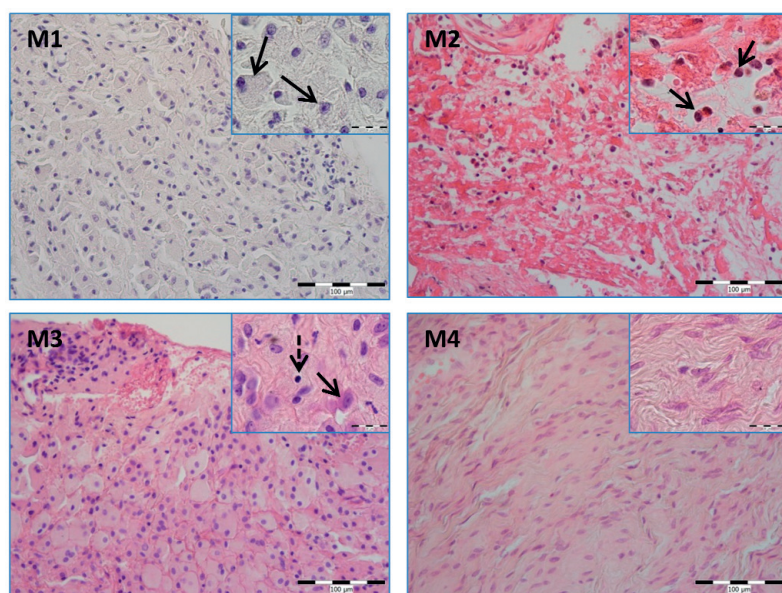
Morawietzova klasifikace	Aseptické uvolnění	Periprotetická infekce	Kontrolní skupina s TEP	Kontrolní skupina bez TEP
Typ I	52 (78,8 %)	3 (20 %)	10 (62,5 %)	3 (18,8 %)
Typ II	0 (0 %)	3 (20 %)	0 (0 %)	1 (6,3 %)
Typ III	4 (6,1 %)	6 (40 %)	4 (25,0 %)	5 (31,3 %)
Typ IV	10 (15,2 %)	3 (20 %)	2 (12,5 %)	7 (43,8 %)

Tab. 5. Shrnutí výsledků barvení tkání na protilátky proti povrchovým CD receptorům a cytokinům

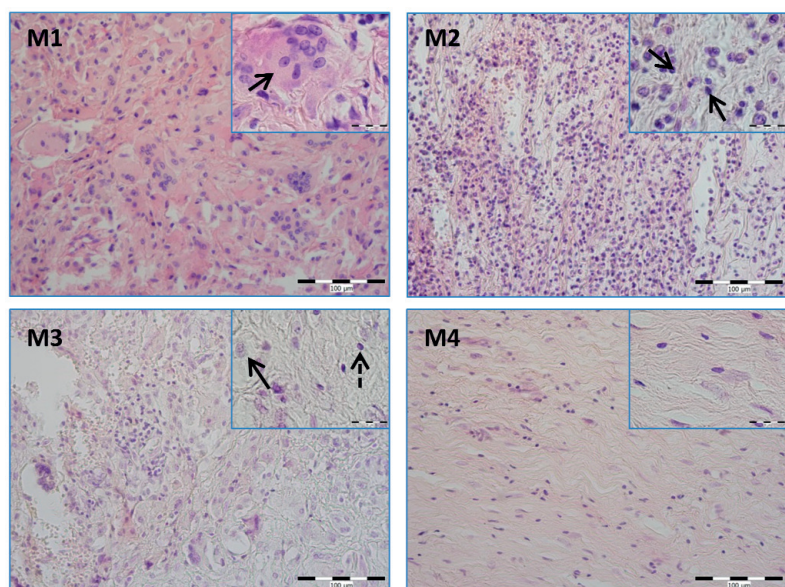
	Aseptické uvolnění (n = 66)	Periprotetická infekce (n = 15)	Kontrolní skupina s TEP (n = 16)	Kontrolní skupina bez TEP (n = 16)	p
CD20	1 z 64 (1,6 %)	8 z 14 (57,1 %)	0 (0 %)	4 z 16 (25,0 %)	< 0,0001
CD4	1 z 65 (1,5 %)	2 z 15 (13,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0,101
CD8	31 z 64 (48,4 %)	11 z 14 (78,6 %)	8 z 16 (50 %)	6 z 16 (37,5 %)	0,129
Hsp-60	18 z 63 (28,6 %)	3 z 15 (20,0 %)	0 (0 %)	7 z 16 (43,8 %)	0,017
IFN gamma	9 z 52 (17,3 %)	2 z 6 (33,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0,268

diska je sice důležité, že jsme neoznačovali tkáň získané při aseptických reoperacích za membrány infekční, shoda v infekčních případech však byla menší. Jako překvapivě nízká se ukázala pozitivita barvení na IFN- γ u aseptických tkání. Většina doplňkových barvení byla silnější u infekčních tkání ve srovnání s aseptickými.

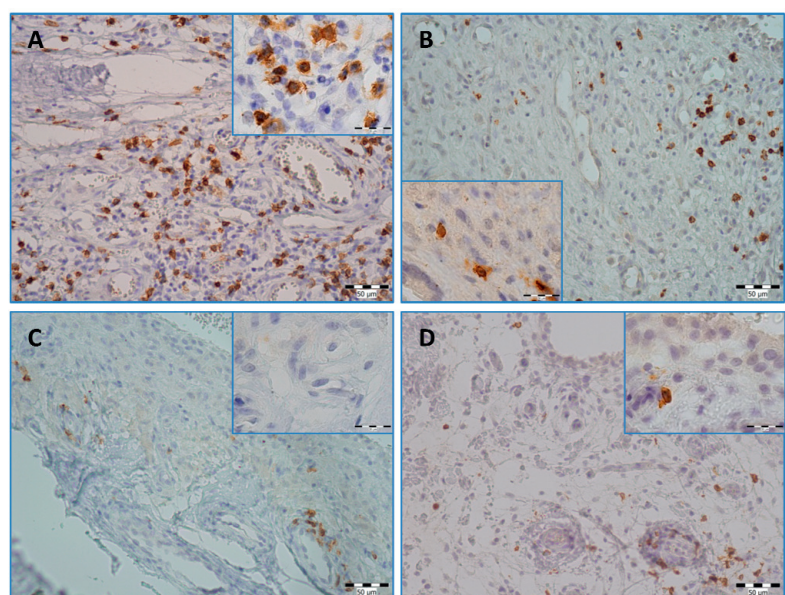
Morawietz a spol. publikovali svůj konsenzuální návrh mimo jiné proto, aby zlepšili komunikaci mezi ortopedy a patologi (18). Ve stejné práci tvrdí, že jejich popis membrán je použitelný nejen k rutinní diagnostice, ale i k výzkumným účelům (je srozumitelný, jednoznačný, jednoduchý, reprodukovatelný). V jiné recentní práci z Německa (11) se tvrdí, že histopatologická typologie periprotetických membrán podle Morawietze a Krenna je všeobecně akceptovaná a klinicky užitečná. My jsme však v literatuře nedokázali najít žádnou práci, která by nezávisle ověřila klinický přínos zmíněné tkáňové typologie. Přitom ověření jakéhokoliv biolo-



Obr. 4. Histologické vzorky periprotetických membrán z oblasti kyčelního kloubu barvené HE a hodnocené podle Morawietzovy klasifikace. M1 reprezentuje membránu typu I s predominujícími makrofágy (šipka), M2 reprezentuje septický typ membrány s masivní infiltrací leukocyty (šipky), M3 je kombinovaná membrána se znaky M1 i M2 typu (makrofág – šipka, lymfocyt – přerušovaná šipka), M4 typ membrány je bohatý především na pojivovou tkáň včetně vláknité složky.



Obr. 5. Histologické vzorky periprotetických membrán z oblasti kolenního kloubu barvené HE a hodnocené podle Morawietzovy klasifikace. M1 reprezentuje membránu typu I s predominujícími makrofágy (v tomto případě šipka poukazuje na jednu z mnohoaderných obrovských buněk – multinucleated giant cell, jejichž přítomnost byla mnohem hojnější v případě membrány z okolí asepticky uvolněného kolenního kloubu v porovnání s kyčlí), M2 reprezentuje septický typ membrány s masivní infiltrací leukocyty (šipky), M3 je kombinovaná membrána se znaky M1 i M2 typu (makrofág – šipka, lymfocyt – přerušovaná šipka), M4 typ membrány je reprezentován pojivovou tkání včetně její vláknité složky.



Obr. 6. Imunohistochemické barvení CD8 antigenu:

A – septický typ membrány (M2), kde byla pozorována největší pozitivita CD8; B – vzorek aseptického selhání (M1), kde je zastoupení CD8 antigenu podstatně nižší; C – membrána reoperované kyčle bez osteolýzy; D – vzorek pacienta s osteoartrózou.

gického závěru je naprosto nezbytné, neboť podle jedné z nejcitovanějších prací současnosti vykazuje patrně větší výsledků v biomedicíně falešnou pozitivitu (10). Původní práce (18) popisuje shodu mezi klinickou a patologickou diagnózou v 89,7 % hodnocených membrán, shoda mezi různými hodnotiteli (5 patologů) pak byla 87,1 % (korelační koeficient pro shodu mezi histologií a mikrobiologickou diagnózou byl 0,767). Vezme-li v úvahu data z recentní publikace (11), na níž se spolupodílel jeden z autorů koncepce Morawietze a spol. (Krenn), zjistíme, že stejně jako v naší studii nebyl ani jeden aseptický případ interpretován jako membrána II. typu. Ovšem podobně jako v naší studii byla infekční membrána 2x popsána jako aseptická a jedna infekční membrána se nedala zařadit. U nás se vyskytly tři takové případy. Jinými slovy: senzitivita vyšetření (za předpokladu, že správný výsledek u infekcí = membrána II. nebo III. typu) by měla být podle jejich studie 87 % (specifita 100 % a negativní prediktivní hodnota 90 %). Naše horší výsledky (senzitivita 75% pro správný výsledek = membrána II. nebo III. typu) je možné alespoň částečně vysvětlit tím, že u dvou pacientů jsme tkáň odebrali před reimplantací TEP ve dvojdobém rytmu. V této fázi by měla být aktivita infekčního zánětu nízká.

Klasická tkáňová diagnostika infekcí kloubních náhrad se od studie Mirry a spol. (16) soustředí na počítání PMN leukocytů v periprotetických tkáních při pozorování v poli o vysokém rozlišení (zvětšení 400–500x). Tento přístup se opírá o základní výzkum infekčního zánětu, který spojuje přítomnost bakterií ve tkáních s invazí PMN leukocytů (čím více PMN leukocytů, tím vyšší pravděpodobnost, že jde o infekci). Studovaly se zmrazené řezy, klasické řezy z parafinových bloků barvených hematoxylin-eozinem i další postupy (27). Jako diagnostické kritérium bylo postupně navrženo průměrně 5 a 10 PMN v 5 pozorovaných polích (21). Morawietz se také podílel na návrhu, který doporučil používat pro infekční diagnózu nález 23 leukocytů v 10 pozorovaných polích (19). Jiní autoři kombinovali histologické kritérium s jinými diagnostickými metodami ve snaze zlepšit senzitivitu a uchovat specifitu vyšetření (11).

Na základě studia literatury jsme navrhli přídatná barvení, která by teoreticky mohla zvýšit spolehlivost a přesnost histopatologické analýzy periprotetických tkání. Mysleli jsme především na kontext částicové nemoci, kterou charakterizuje mimo jiné destruktivní tkáňová reakce (Hsp-60) a polarizace tkáňových makrofágů směrem k M1 populaci (IFN- γ). Ukázalo se však, že všechny navržené znaky se intenzivněji exprimují především ve tkáních postižených infekčním zánětem. Velmi zajímavé bylo zjištění, že se téměř všechna barvení (kromě CD8) ukázala jako negativní, pokud se aplikovala u tkání, které jsme získali během reoperace TEP z jiných důvodů, nežli je aseptické uvolnění nebo infekce kloubní náhrady. To by naznačovalo, že v určité fázi po implantaci TEP se ve tkáních rozvinulo něco, čemu bychom mohli říkat adaptace nebo tolerance (26). Z naší studie není možné určit, jaké konkrétní mechanismy či dráhy odpovídají za pozorované navození a udržení dlouhodobého stavu tkáňové adaptace.

Nepřítomnost zvýšené exprese prozánětlivých markerů ve tkáních získaných od pacientů s aseptickým uvolněním může souviset s pozdní fází odpovědi hostitele na přítomnost degračních produktů, případně nestabilní TEP. Tato část naší studie se shoduje s literaturou (13, 23). Zajímavý nález představuje velmi slabá až středně intenzivní přítomnost CD20 (transmembránový protein charakteristický pro B lymfocyty), CD4 a CD8 (molekulární znaky T lymfocytů) pozitivních buněk v aseptických periprotetických tkáních. Ty sice byly již dříve pozorovány perivaskulárně v membránách získaných z rozhraní protéza-kost (5), avšak nikoliv na povrchu pseudosynoviálních tkání, což by poukazovalo na určitou roli specifické imunitní odpovědi v pozdních fázích aseptického uvolnění. Zde je však třeba uvést, že někteří autoři studující kloubní pár kov-polyetylen zjistili velmi nízké koncentrace lymfokinů v periprotetických tkáních a na tomto základě uvažují spíše o nevýznamném podílu lymfocytů na vzniku aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy (15). Naopak podíl lymfocytů na tkáňové odpovědi vůči infekci je všeobecně akceptován (4).

Podle některých autorů by také aseptické uvolnění mohlo probíhat mnohem rychleji a důrazněji (9), pokud by se na něm podílely bakterie, nebo alespoň jejich součásti (např. proteiny buněčné stěny, kyselina teichoová či endotoxiny). Ve prospěch uvedené koncepce svědčí zatím převážně experimentální práce, nepočítáme-li několik prací s nestejnorodým klinickým materiálem (tkáň, kultivace, sonikace extrahovaných implantátů s PCR), (17, 24). Hodnoceno čistě kvantitativně a na základě naší definice infekce kloubní náhrady, byla u všech námi vyšetřovaných molekul výrazně vyšší exprese u septických selhání ve srovnání s aseptickými případy a kontrolami s TEP, což by svědčilo spíše proti této teorii.

Naše studie má několik metodologických omezení. Jako nejvýznamnější se na první pohled jeví přítomnost pouze jednoho hodnotitele, zatímco většina podobných studií má dva a více hodnotitelů histologických preparátů. V běžné klinické praxi se ovšem také musíme často spolehnout na stanovisko jednoho spolupracujícího patologa. Dále jsme do ní zařadili relativně heterogenní soubor infekčních pacientů, včetně dvou pacientů před reimplantací TEP. V neposlední řadě je možné diskutovat o reprezentativnosti pseudosynoviální tkáň. Podle našeho názoru jde o tkáň, která má neomezený a plný kontakt s degračními a otěrovými produkty endoprotézy stejně jako s bakteriemi indukovanou signalizací. Byla použita rovněž v několika předchozích klinických studiích (12, 20).

ZÁVĚR

V naší studii jsme zjistili relativně dobrou shodu mezi klinickou příčinou reoperace a histologickým hodnocením periprotetických tkání podle Morawietze a spol. Doporučujeme proto její zavedení do běžné klinické praxe v novější verzi obsahující také možnost odečítat eventuelní známky alergické reakce na implantát a doprovodnou kostní patologii.

Stanovení exprese CD20 zvyšovalo pravděpodobnost správného určení infekční membrány. Vyšší exprese byly v souboru infekcí také v případě CD4, CD8 a IFN- γ barvení, avšak bez podstatného ovlivnění diagnostické přesnosti.

U pacientů bez aseptického uvolnění, periprotetické osteolýzy a bez infekce se patrně periprotetické tkáně nachází dlouhou dobu ve vztahu adaptace na endoprotézu a její odpadové produkty.

Literatura

1. BELLAYE, P. S., BURG, O., CAUSSE, S., GARRIDO, C., BONNIAUD, P.: Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacol. Ther.*, 143: 119–132, 2014.
2. BORI, G., MUNOZ-MAHAMUD, E., GARCIA, S., MALLOFRE, C., GALLART, X., BOSCH, J., GARCIA, E., RIBA, J., MENSA, J., SORIANO, A.: Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Mod. Pathol.*, 24: 579–584, 2011.
3. CIERNY, G., 3RD, MADER, J. T., PENNING, J. J.: A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 414: 7–24, 2003.
4. DAPUNT, U., GIESE, T., PRIOR, B., GAIDA, M. M., HAN-SCH, G. M.: Infectious versus non-infectious loosening of implants: activation of T lymphocytes differentiates between the two entities. *Int. Orthop.*, 38: 1291–1296, 2014.
5. FUJISHIRO, T., MOOJEN, D. J., KOBAYASHI, N., DHERT, W. J., BAUER, T. W.: Perivascular and diffuse lymphocytic inflammation are not specific for failed metal-on-metal hip implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 469: 1127–1133, 2011.
6. FULÍN, P., POKORNÝ, D., ŠLOUF, M., VACKOVÁ, T., DYBAL, J., SOSNA, A.: [Effect of sterilisation with formaldehyde, gamma irradiation and ethylene oxide on the properties of polyethylene joint replacement components]. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 81: 33–39, 2014.
7. 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.*, 31: 97–104, 2008.
8. GALLO, J., VACULOVA, J., GOODMAN, S. B., KONTTINEN, Y. T., THYSSEN, J. P.: Contributions of human tissue analysis to understanding the mechanisms of loosening and osteolysis in total hip replacement. *Acta Biomater.*, 10: 2354–2366, 2014.
9. GREENFIELD, E. M., BI, Y., RAGAB, A. A., GOLDBERG, V. M., NALEPKA, J. L., SEABOLD, J. M.: Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 72: 179–185, 2005.
10. IOANNIDIS, J. P.: Why most published research findings are false. *PLoS Med.*, 2: e124, 2005.
11. JANZ, V., WASSILEW, G. I., HASART, O., MATZIOLIS, G., TOHTZ, S., PERKA, C.: Evaluation of sonicate fluid cultures in comparison to histological analysis of the periprosthetic membrane for the detection of periprosthetic joint infection. *Int. Orthop.*, 37: 931–936, 2013.
12. KONTTINEN, Y. T., XU, J. W., WARIS, E., LI T. F., GOMEZ-BARRENA, E., NORDSLETTEN, L., SANTAVIRTA, S.: Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 20: 485–490, 2002.
13. KOULOUVARIS, P., LY, K., IVASHKIV, L. B., BOSTROM, M. P., NESTOR, B. J., SCULCO, T. P., PURDUE, P. E.: Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *J. Orthop. Res.*, 26: 106–116, 2008.
14. KRENN, V., MORAWIETZ, L., KIENAPFEL, H., ASCHERL, R., MATZIOLIS, G., HASSENPLUG, J., THOMSEN, M., THOMAS, P., HUBER, M., SCHUH, C., KENDOFF, D., BAUMHOER, D., KRUKEMEYER, M. G., PERINO, G., ZUSTIN, J., BERGER, I., RUTHER, W., POREMBA, C., GEHRKE, T.: [Revised consensus classification. Histopathological classification of diseases associated with joint endoprostheses]. *Z. Rheumatol.*, 72: 383–392, 2013.
15. LI, T. F., SANTAVIRTA, S., WARIS, V., LASSUS, J., LINDROOS, L., XU, J. W., VIRTANEN, I., KONTTINEN, Y. T.: No lymphokines in T-cells around loosened hip prostheses. *Acta Orthop. Scand.*, 72: 241–247, 2001.
16. MIRRA, J. M., AMSTUTZ, H. C., MATOS, M., GOLD, R.: The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 117: 221–240, 1976.
17. MOOJEN, D. J., VAN HELLEMONDT, G., VOGELY, H. C., BURGER, B. J., WALENKAMP, G. H., TULP, N. J., SCHREURS, B. W., DE MEULEMEESTER, F. R., SCHOT, C. S., VAN DE POL, I., FUJISHIRO, T., SCHOOLS, L. M., BAUER, T. W., DHERT, W. J.: Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta Orthop.*, 81: 667–673, 2010.
18. MORAWIETZ, L., CLASSEN, R. A., SCHRODER, J. H., DYNBIL, 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., KONIG, A., STROBEL, P., RADER, C. P., 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.*, 59: 591–597, 2006.
19. MORAWIETZ, L., TIDDENS, O., MUELLER, M., TOHTZ, S., GANSUKH, T., SCHROEDER, J. H., PERKA, C., KRENN, V.: Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*, 54: 847–853, 2009.
20. NYGAARD, M., BASTHOLM, L., ELLING, F., SOBALLE, K., BORGWARDT, A.: Can ultrastructural particle location predict aseptic loosening? A biopsy study of nonloose hip implants one year postoperative using three bearing material combinations. *J. Long Term Eff. Med. Implants.*, 17: 321–334, 2007.
21. PANDEY, R., DRAKOULAKIS, E., ATHANASOU, N. A.: An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J. Clin. Pathol.*, 52: 118–123, 1999.
22. RAUCH, I., MULLER, M., DECKER, T.: The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT*, 2: e23820, 2013.
23. SHANBHAG, A. S., KAUFMAN, A. M., HAYATA, K., RUBASH, H. E.: Assessing osteolysis with use of high-throughput protein chips. *J. Bone Jt Surg.*, 89-A: 1081–1089, 2007.
24. SIERRA, J. M., GARCIA, S., MARTINEZ-PASTOR, J. C., TOMAS, X., GALLART, X., VILA, J., BORI, G., MACULE, F., MENSA, J., RIBA, J., SORIANO, A.: Relationship between the degree of osteolysis and cultures obtained by sonication of the prostheses in patients with aseptic loosening of a hip or knee arthroplasty. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 131: 1357–1361, 2011.
25. TAKACOVA, S., SLANY, R., BARTKOVA, J., STRANECKY, V., DOLEZEL, P., LUZNA, P., BARTEK, J., DIVOKY, V.: DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo. *Cancer Cell.*, 21: 517–531, 2012.
26. THOMAS, P., IGLHAUT, G., WOLLENBERG, A., CADOSCH, D., SUMMER, B.: Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients. *Biomed. Res. Int.*, 2013: 539834, 2013.
27. TSARAS, G., MADUKA-EZE, A., INWARDS, C. Y., MABRY, T., ERWIN, P. J., MURAD, M. H., MONTORI, V. M., WEST, C. P., OSMON, D. R., BERBARI, E. F.: Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J. Bone Jt Surg.*, 94-A: 1700–1711, 2012.

Korespondující autor:

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