

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

## Immunohistochemical Detection of Mast and Dendritic Cells in Periprosthetic Tissues of Aseptically Loosened Total Prostheses

J. VACULOVÁ<sup>1</sup>, P. HURNÍK<sup>1,3</sup>, J. GALLO<sup>2</sup>, D. ŽIAK<sup>3</sup>, O. MOTYKA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ústav patologie Lékařské fakulty Ostravské univerzity a Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>2</sup> Ortopedická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

<sup>3</sup> CGB laboratoř, a.s., Ostrava

<sup>4</sup> Oddělení anorganické analýzy, Centrum nanotechnologií, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

### ABSTRACT

#### PURPOSE OF THE STUDY

This study deals with the possibilities and application of immunohistochemical methods to detect mast and dendritic cells in periprosthetic tissues in patients with aseptically loosened total joint replacements of the knee and hip. The purpose of the study was to quantify and characterize the distribution of mast and dendritic cells in the examined samples and to study the statistically significant relations between the aforementioned cell populations and selected parameters characterizing the patients, implants or tissue response. Based on the proved findings, a possible relation between mast and dendritic cells and histomorphological patterns of aseptic loosening and the benefit of the applied immunohistochemical methods was evaluated.

#### MATERIAL AND METHODS

Periprosthetic tissues from a total of 31 patients (17 patients after a revision surgery of hip prosthesis, 14 patients after a revision surgery of knee prosthesis) were examined. The collected samples were processed according to the standard protocol for the purposes of histological and immunochemical examination. Antibodies against tryptase and CD117 were used for immunohistochemical detection of mast cells. Dendritic cells were detected by means of S100 and CD1a antibodies. Quantification of both the cell populations was carried out by optical microscopy in 20 high power fields at 400-times magnification. From among the applied methods we picked the more sensitive one for statistical evaluation. It was tryptase in the case of mast cells and S100 in the case of dendritic cells.

#### RESULTS

Mast and dendritic cells were mostly distributed dispersively in periprosthetic tissues; however, they also occurred in groups perivascularly or near necrotic parts. The examined samples showed the presence of 60 mast cells and 50 dendritic cells on average. The increased density of mast and dendritic cells was associated with polypously formed pseudosynovium and cement fixation of prostheses; this relation was statistically significant. It was impossible to prove the correlation between the quantity of the observed cell populations and the nature and the number of the observed particles because wear particles were present dispersely in all the samples. Another statistically significant relation to the type of material or implant fixation or other examined histomorphological patterns was not proved. A strong density of mast cells with a minimum presence of dendritic cells was observed in the control patient group.

#### DISCUSSION

The differences in density of S100 positive dendritic cells between the control and examined group of patients can be caused by the activation of dendritic cells by exogenous or endogenous pathways of immune processes going on after the implantation of endoprosthesis. The statistically significant interrelation of mast cells, polypously formed pseudosynovium and cement wear particles can be explained at least in part as a tissue reaction induced by cement particles.

#### CONCLUSIONS

We proved the presence of two immunologically significant cell populations in periprosthetic tissues. The said findings indicate a conclusion of significant functional participation of mast and dendritic cells in pathogenesis of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis. Nevertheless, this will have to be proved in another way and with the use of another method.

**Key words:** dendritic cells, mast cells, aseptic loosening, total joint replacement, immune reaction, adverse reaction.

## ÚVOD

Aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza patří mezi nejčastější komplikace kloubních náhrad vyžadujících reoperaci. Histologické analýzy periprotetických tkání odebraných během revizí totálních endoprotéz (TEP) potvrzují přítomnost otěrových částic s dominantním obrazem záplavy makrofágů, reakcí okolo cizích těles a fibrózou tkáně. Problematikou histomorfologických změn v periprotetických tkáních včetně kvantifikace a distribuce buněčných populací (např. makrofágů, lymfocytů, fibroblastů, osteoblastů) a stanovení biologických mediátorů (např. cytokinů, chemokinů, růstových faktorů) se zabývá řada prací (5, 7, 12, 13, 15, 16, 21, 24, 28, 30, 31). Jejich výsledky ukazují na dominantní roli (lymfocyto-) monocyto-makrofagického systému, receptorů nespecifické imunity a prozánětlivé signalizace. Překvapivě malá pozornost byla dosud věnována tak významným buňkám, jakými jsou mastocyty a dendritické buňky.

Mastocyty jsou unikátní sekretorické buňky o průměru až 20 µm obsahující různé množství intracytoplazmatických granul ohraničených membránou (19). Hrají zásadní roli při alergických a zánětlivých onemocněních a uplatňují se také při angiogenezi či komunikaci mezi nervovým a imunitním systémem (4). Patologická akumulace mastocytů bývá přítomna u celé řady onemocnění včetně nádorů (10, 33) a patří je i rutinní součástí tkáňové odpovědi na přítomnost kloubních náhrad (17, 26). Aktivací mastocytů dochází k produkci celé škály cytokinů, hydrolytických enzymů, proteoglykanů a biogenních aminů, které se mohou podílet na časně i pozdní tkáňové odpovědi, případně na pozdní alergické odpovědi. Iniciace a následná degranulace mastocytů je možná prostřednictvím vazby antigenu na vysokoafinitní Fc receptory pro IgE, působením anafylatoxinů nebo jejich přímým poškozením, např. léčivy (2). Nezralé mastocyty mají mnoholaločnaté jádro a granula, čímž připomínají bazofilní granulocyty. Mají však odlišné morfologické vlastnosti a obsahují jiné mediátory (histamin, tryptáza, chymáza, katepsin G, karboxypeptidáza), které regulují imunitní odpověď (9). Pro přesnou identifikaci mastocytů lze použít speciální histologické a imunohistochemické metody zaměřené na granulózní mediátory či exprimované receptory.

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

Cílem naší práce bylo vyšetřit periprotetické tkáně a pospat:

- 1) četnost a charakter distribuce mastocytů;
- 2) četnost a charakter distribuce dendritických buněk; resp.

3) najít statisticky významné vztahy mezi denzitou sledovaných buněčných populací a vybranými parametry charakterizujícími pacienta, implantát či tkáňovou odpověď (pohlaví, věk, délka nošení implantátu, BMI (body mass index), typ kloubu, typ fixace, reakce okolo cizích těles, polypózní pseudosynoviální membrána, nekróza, venuly s vysokým endotelem, otěrové částice).

## MATERIÁL A METODIKA

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

### Zpracování vzorků

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

### Imunohistochemické vyšetření

Pro účely imunohistochemického vyšetření byla aplikována polyklonální protilátka Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117 (DAKO, polyklon, synonymum c-kit, tyrozinkinázový 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, viz tabulka 2.

### Histopatologické hodnocení

Všechny preparáty byly hodnoceny v optickém mikroskopu Olympus BX45 při zvětšení 20x–400x (Objektiv UPLFFLN40X – UIS2, UPlanFLN, 40x/0,75, oo/0,17/FN26,5). Kvantifikace jednotlivých buněčných typů

Tab. 1. Seznam pacientů

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

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

Tab. 2. Použité protilátky a protokol ve Ventana Benchmark XT

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

exprimovaných specifickým antigenem byla vyjádřena absolutním počtem ve 20 polích při zvětšení 400x (HPF, high power field).

### Statistická analýza

K analýze obecných trendů a vztahů mezi proměnnými v souboru dat byla použita faktorová analýza smíšených

dat (FAMD) ve statistickém balíčku pro mnohorozměrnou analýzu dat FactoMineR (Sebastien Le, Julie Josse, Francois Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01). Tato metoda byla použita z důvodů kombinovaného charakteru datového souboru, který zahrnoval jak kvalitativní, tak kvantitativní proměnné. Pro hodnocení vztahů mezi jednotlivými proměnnými byla užita analýza variance (ANOVA), případně Studentův t-test v případě analýzy vztahu mezi kvantitativní a kvalitativní proměnnou a Pearsonův korelační koeficient pro analýzu vztahů mezi proměnnými kvantitativními. Všechny analýzy a grafické zpracování výsledků bylo provedeno v prostředí statistického programu R (R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.)

## VÝSLEDKY

### 1. Četnost a charakter distribuce mastocytů

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

### 2. Četnost a charakter distribuce dendritických buněk

Ve všech vyšetřovaných případech byla sledována výrazná jaderná i cytoplazmatická exprese S100 proteinu a cytoplazmatická a/nebo membránová exprese CD1a u DC. Výsledky imunohistochemického vyšetření však ukázaly rozdíly mezi expresí S100 proteinu a antigenu CD1a. Přítomnost CD1a<sup>+</sup> DC byla prokázána pouze u 10 vyšetřovaných pacientů. V kontrolních vzorcích byla detekována minimální přítomnost DC v obou metodách. Blíže jsou výsledky imunohistochemického vyšetření shrnuty v tabulce 3.

U jednoho pacienta (č. 4) byla pozorována záplava S100<sup>+</sup> a CD1a<sup>+</sup> DC nahromaděných v blízkosti aseptické nekrózy. Distribuce S100<sup>+</sup> DC byla převážně disperzní, pouze ojediněle byly DC shromážděny v izolovaných skupinkách. Vztah denzity S100<sup>+</sup> DC k přítomnosti polypózně utvářené pseudosynoviální membrány a cementované fixaci TEP se pohyboval na hranici významnosti (graf 1, 2).

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

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

Tab. 3. Počet pozitivních buněk ve 20 HPF

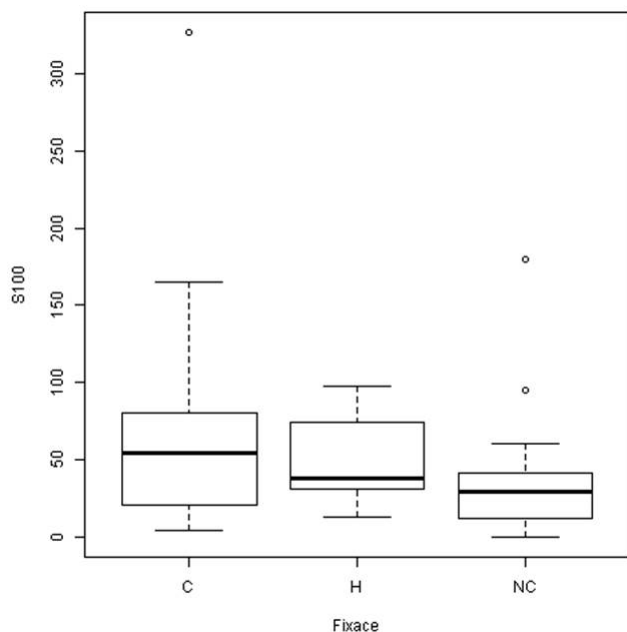
Kvantifikace		Nejnižší počet buněk v jednom preparátu	Nejvyšší počet buněk v jednom preparátu	Průměrný počet buněk u jednoho pacienta
Protilátka				
Revidovaní pacienti	Tryptase +	5	195	60
	CD117 +	1	85	22
	S100 +	1	327	50
	CD1a +	0	420	8
Kontrolní skupina	Tryptase +	74	183	124
	CD117 +	61	170	106
	S100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

Statistická analýza neprokázala žádný významný vztah dendritických buněk k dalším sledovaným znakům (pohlaví, věk, délka nošení implantátu, BMI, typ kloubu, reakce okolo cizích těles, nekróza, venuly s vysokým endotelem, otěrové částice). Mezi denzitou S100<sup>+</sup> DC a tryptáza<sup>+</sup> mastocytů byla zjištěna slabá, ale signifikantní pozitivní korelace (graf 5). Neboli čím více bylo ve vyšetřovaném souboru mastocytů, tím více bylo také DC, což ukazuje na možnou podobnost aktivity těchto buněčných populací. Reprezentativní mikrofotografie znázorňují obrázky 1–8.

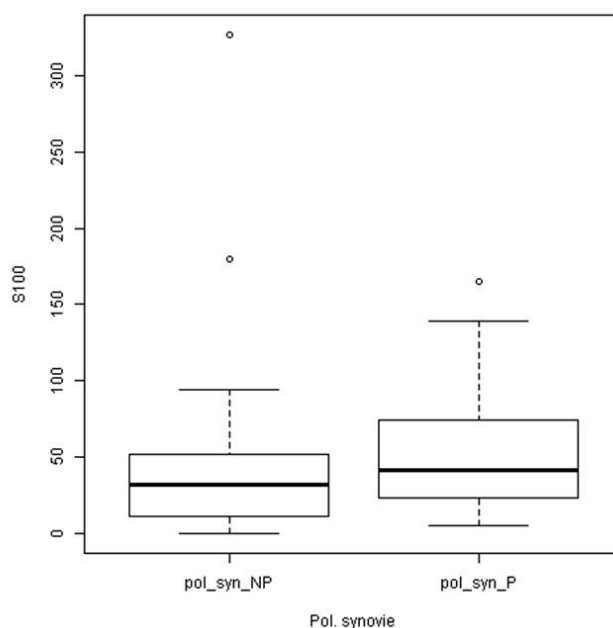
### DISKUSE

V naší studii jsme zjistili přítomnost mastocytů ve všech vyšetřovaných vzorcích periprotetických tkání.

Graf 1. Boxplot hodnot S100 v závislosti na typu fixace. Graf znázorňuje vztah denzity S100 pozitivních DC k typu fixace (cementování vede ke zvýšené expresi S100 pozitivních DC). C = cementovaná, H = hybridní, NC = necementovaná, DC = dendritické buňky



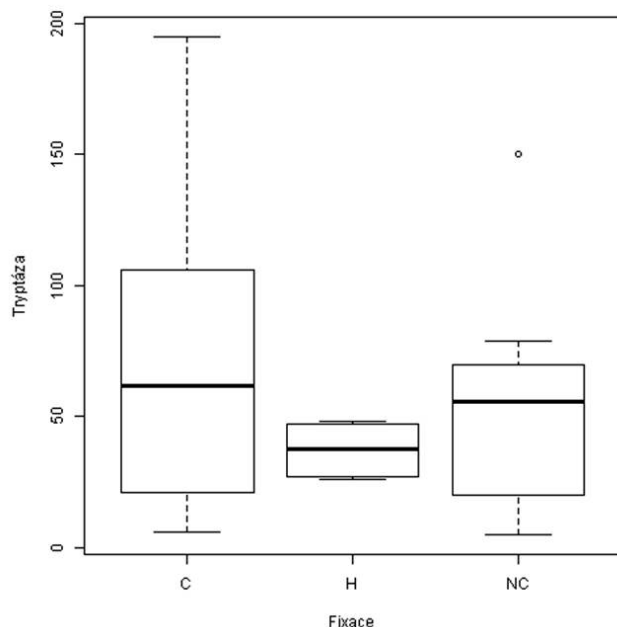
Graf 2. Boxplot hodnot S100 v závislosti na přítomnosti polypózní pseudosynoviální membrány. Vzájemná asociace S100 pozitivních DC k přítomnosti polypózní pseudosynoviální membrány na hranici hladiny významnosti. Pol\_syn\_NP = nepřítomna, pol\_syn\_P = přítomna, DC = dendritické buňky





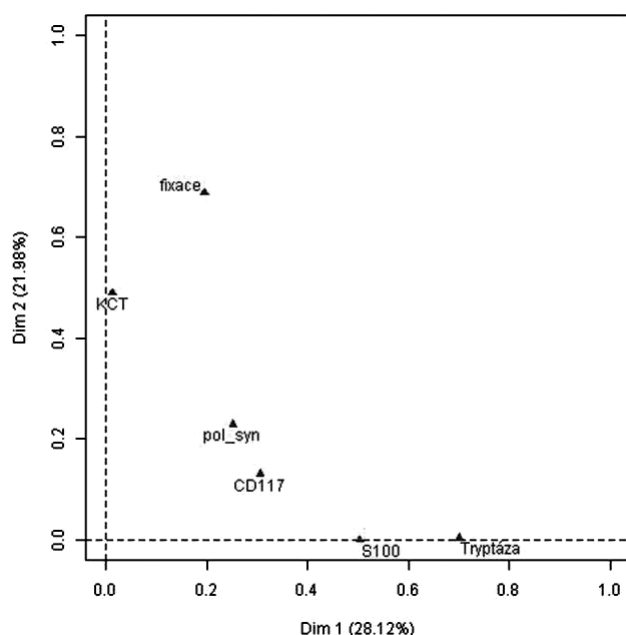
Graf 3. Boxplot hodnot tryptázy v závislosti na typu fixace. Signifikanční závislost exprese tryptázy na typu cementované fixace.

C = cementovaná, H = hybridní, NC = necementovaná



Graf 5. Grafická reprezentace výsledku faktorové analýzy smíšených dat (FAMD). Dvě osy popisují dva základní směry vysvětlitelné variability. Blízkost proměnných naznačuje asociaci v mnohorozměrném prostoru. Asociaci vykazují S100 a tryptáza. Asociace u reakcí kol cizích těles a typu fixace.

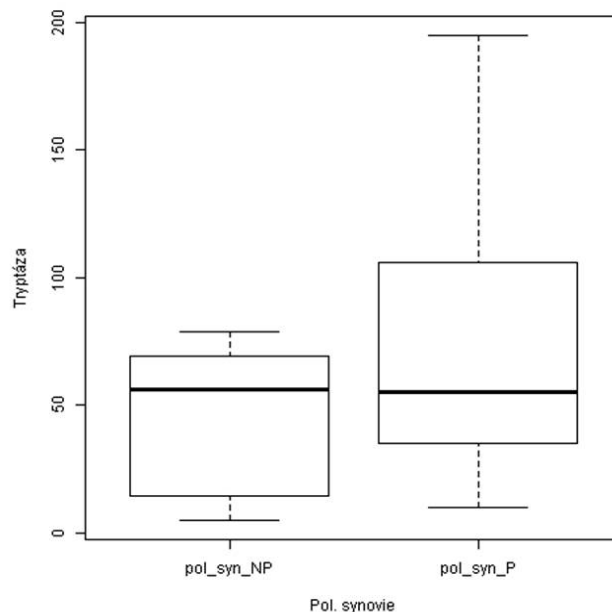
KCT = reakce kolem cizích těles, pol\_syn = polypózní pseudo-synoviální membrána



Celkově byla jejich denzita variabilní, mastocyty byly hodnoceny v rozsahu od velmi řídké, převážně rovnoměrné distribuce až po velmi výrazné zastoupení 195 buněk ve 20 HPF. V kontrolní skupině byla exprese

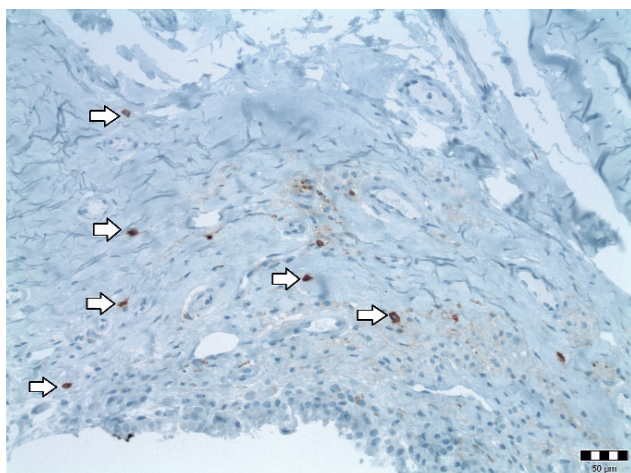
Graf 4. Boxplot hodnot tryptázy v závislosti na přítomnosti polypózní pseudosynoviální membrány. Signifikanční závislost exprese tryptázy na přítomnosti polypózně utvářené pseudo-synoviální membrány.

Pol\_syn\_NP = nepřítomna, pol\_syn\_P = přítomna

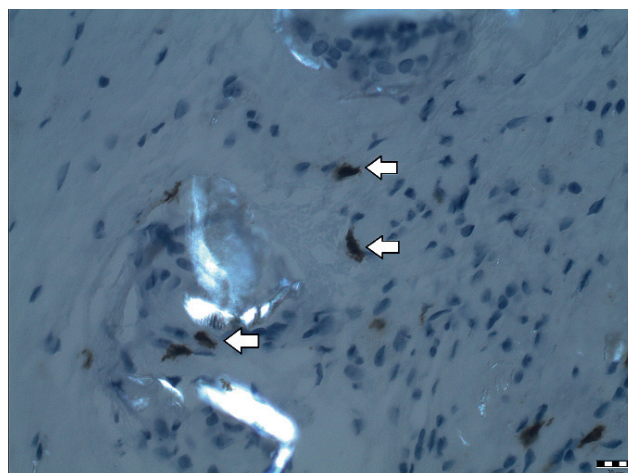


znaků mastocytů vyšší nežli u případů. Neprokládali jsme vztah mezi denzitou mastocytů a typem implantátu či charakteristikami tkáňové odpovědi. Zjistili jsme ale významné rozdíly mezi dvěma imunohistochemickými metodami k průkazu mastocytů (tryptáza x CD117). V případě dendritických buněk byly rozdíly mezi případy a kontrolami výraznější, i když denzita byla v periprotetických tkáních převážně disperzní a neprokládali jsme žádnou významnou asociaci mezi sledovanými parametry a zastoupením dendritických buněk v periprotetických tkáních. Přestože není možné z prostého výskytu mastocytů a dendritických buněk činit závěry pro jejich funkci, je nepochybné, že tyto buňky se spolupodílejí na procesech nežádoucí tkáňové odpovědi na přítomnost implantátu.

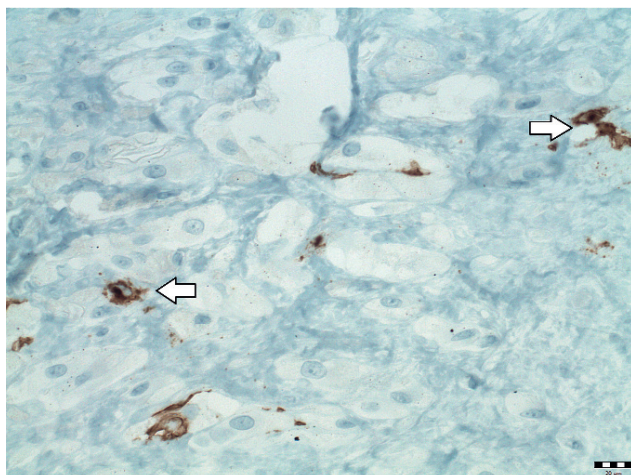
Klíčovou rolí mastocytů a dendritických buněk jsou startovací a imunomodulační funkce v rámci vrozené i adaptivní imunitní odpovědi. Za fyziologických stavů jsou ve tkáni strategicky rozmístěny jako strážci v neaktivovaném, nezralém stavu a jejich aktivace a zvýšená přítomnost ve tkáni bývá odrazem probíhajících patologických změn (19, 33). K jejich detekci lze použít speciální histologické nebo imunohistochemické metody. V naší práci byla zvolena protilátka k průkazu tryptázy, která je přítomna ve všech lidských mastocytech, a proto je považována za vysoce specifický a senzitivní marker mastocytů. Protilátka proti antigenu CD117 je rutinně používána k detekci mastocytů, ale i jiných buněčných populací. Naše výsledky ukázaly pozoruhodné rozdíly mezi těmito dvěma imunohistochemickými metodami k průkazu mastocytů (tryptáza x CD117). V souboru případů byla výrazně vyšší exprese tryptázy než CD117, zatímco v kontrolním souboru výsledky obou metod poměrně dobře korelovaly. Vyšší denzitu tryptáza<sup>+</sup> mas-



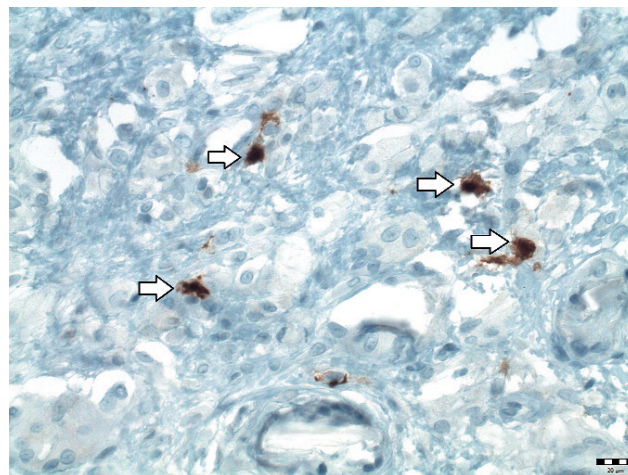
Obr. 1. Pozitivní exprese tryptázy v cytoplasmě mastocytů (šípky). Ve spodní části obrázku superficiální pseudosynoviální vrstva. Pacient č. 3, tryptáza, 200x.



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



Obr. 3. Průkaz dendritických buněk exprimujících CD1a (šípky), ve tkáni volně roztrošeny makrofágy s výraznými jádry. Pacient č. 8, CD1a, 400x.



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

tocytů v kontrolních vzorcích oproti vyšetřovanému souboru potvrzuje i předchozí studie (26). Tryptáza modifikuje řadu koagulačních proteinů a je schopna vyvolat proteolýzu, kolagenolýzu. Slabší než v kontrolním souboru, ale stále dostatečně výrazná distribuce tryptáza<sup>+</sup> mastocytů ve vyšetřovaném souboru by mohla odpovídat aktivaci a následné degranulaci, tedy uvolnění cytokinů a dalších mediátorů ovlivňujících proces aseptického uvolnění. Někteří výzkumníci dokonce hovoří o burn-out v době odběru tkání k histologickému vyšetření (25, 28).

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

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

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

Zatímco tryptáza je výhradním markerem všech aktivovaných mastocytů, CD117 může být produkována hematopoetickými kmenovými buňkami, melanocyty, Cajalovými buňkami, zárodečnými buňkami, buňkami bazálních vrstev kůže a duktálními epitelii prsu (10, 19). Schopnost slabě exprimovat CD117 byla nedávno dokázána i u některých populací dendritických buněk (23). Nízkou expresí CD117 v našem souboru lze vysvětlit tím, že CD117 značí zralé mastocyty, které se v tomto typu tkání téměř nevyskytují. Ačkoli je denzita



mastocytů v periprotetických tkáních vysoká, nemusí být zrovna ve fázi detekovatelné protilátkou CD117. Pro průkaz mastocytů se jako spolehlivější ukazuje metoda s použitím protilátky proti tryptáze, což je znázorněno v tabulce 3, kde je vyjádřen absolutní průměrný počet pozitivních buněk.

Vzhledem k několika typům a stádiím DC je obtížné určit jeden charakteristický marker pro jejich identifikaci. DC jsou funkčně, vývojově i fenotypicky jedinečné buňky, k jejichž aktivaci dochází přes řadu receptorů, nejčastěji TLR (Toll-like receptors). V aseptických periprotetických tkáních byly aktivované TLR popsány u DC, makrofágů, lymfocytů, fibroblastů, osteoblastů a osteoklastů (8, 15). TLR1/2 a TLR6 dendritických buněk jsou aktivovány strukturami polyetylenových částic, ale i vnitřními drahami fagocytózou poškozené buňky a slouží jako induktory zánětu produkující zejména interleukiny (8, 18, 20). K rozpoznání cizorodého biomateriálu však mohou DC použít i jiné receptory (např. CLRs, FcR, CR, integriny a další), z nichž některé nejsou specifické výhradně pro DC. Jedná se například o receptor CCR4 (TH2 lymfocyty, NK lymfocyty, monocyty), CCR6 (T lymfocyty, B lymfocyty), CX3R1 (TH1 lymfocyty, Th17 lymfocyty, NK lymfocyty, monocyty) a CCR2 (T lymfocyty, B lymfocyty, NK lymfocyty, fibroblasty). Stimulace těchto receptorů indukuje tvorbu zánětlivých cytokinů a chemokinů (3, 6, 11). Mnohé z výše uvedených markerů lze detekovat jedinečně průtokovou cytometrií, imunofluorescencí či PCR (polymerázová řetězová reakce) metodami (1). Pro účely imunohistochemie nejsou doposud mnohé markery stále dostupné. Přesto je imunohistochemický průkaz DC nejlepší volbou pro možnost srovnání cytomorfologického obrazu, jejich distribuce a tkáňové denzity. K imunohistochemické detekci DC byly pro naše účely vybrány protilátky S100 a CD1a, jejichž hodnocení bylo založené nejen na pozitivní expresi konkrétních antigenů, ale také na jejich nezaměnitelných cytomorfologických znacích.

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

Vzhledem ke slabé pozitivní korelaci S100<sup>+</sup> DC a tryptáza<sup>+</sup> mastocytů lze usuzovat na jejich vzájemnou součinnost v procesu aseptického uvolnění. Vyšší přítomnost

mastocytů v kontrolní skupině lze vysvětlit jiným typem zánětlivé reakce, která doprovází terminální stadium osteoartrózy. Vedle hlavní role vrozené imunitní reakce se mohou zralé DC jako antigen prezentující buňky účastnit společně s mastocyty také pozdní reakce přecitlivělosti, zejména v případě tkáňové reakce na kovové částice (14). V naší studii se statisticky významná asociace dendritických buněk s kovovými částicemi nepotvrdila. Vztah k přítomnosti cementových částic byl pouze na hranici signifikance.

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

## ZÁVĚR

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

## Literatura

- Breton G, Lee J, Liu K, Nussenzweig MC. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat Protoc.* 2015;10:1407–1422.
- Cildir G, Pant H, Lopez AF, Tergaonkar V. The transcriptional program, functional heterogeneity, and clinical targeting of mast cells. *J Exp Med.* 2017;214:2491–2506.
- Dyskova T, Gallo J, Kriegova E. The role of the chemokine system in tissue response to prosthetic by-products leading to periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. *Front Immunol.* 2017;8:1026.
- Galdiero MR, Varricchi G, Seaf M, Marone G, Levi-Schaffer F, Marone G. Bidirectional mast cell-eosinophil interactions in inflammatory disorders and cancer. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:103.
- Gallo J, Luzna P, Holinka M, Ehrmann J, Zapletalová J, Lošťák J. [Validity of the Morawietz classification for evaluation of periprosthetic tissue]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2015;82:126–134.
- Gallo J, Raska M, Kriegova E, Goodman SB. Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. *J Orthop Translat.* 2017;10:52–67.
- Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, Sibley R. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:531–539.
- Gu Q, Shi Q, Yang H. The role of TLR and chemokine in wear particle-induced aseptic loosening. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:596870.
- Guilarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The mast cell, contact, and coagulation system connection in anaphylaxis. *Front Immunol.* 2017;8:846.
- Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity.* 2012;37:25–33.
- Hallab NJ, Jacobs JJ. Chemokines associated with pathologic responses to orthopedic implant debris. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:5.
- Imai S, Konttinen YT, Junttunen M, Lindy O, Ceponis A, Kempinen P, Sorsa T, Santavirta S, Xu JW, Lopez-Otin C. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:701–710.
- Konttinen YT, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainola M, Li TF, Virtanen I, Liljestrom M, Sakai H, Kobayashi Y, Sorsa T, Lappalainen R, Demulder A, Santavirta S. Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *J Bone Miner Res.* 2001;16:1780–1786.
- Kou PM, Babensee JE. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96:239–260.
- Lahdeoja T, Pajarinen J, Kouri VP, Sillat T, Salo J, Konttinen YT. Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *J Orthop Res.* 2010;28:184–190.
- Landgraef S, Loer F, Heep H, Classen T, Grabellus F, Totsch M, von Knoch M. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b and C-terminal telopeptides of type I collagen as markers for diagnosis of aseptic loosening after total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010;130:441–445.
- Lennox DW, Schofield BH, McDonald DF, Riley LH, Jr. A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit, and biologic ingrowth prostheses. *Clin Orthop Relat Res.* 1987;171–191.
- Maitra R, Clement CC, Scharf B, Crisi GM, Chitta S, Paget D, Purdue PE, Cobelli N, Santambrogio L. Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis. *Mol Immunol.* 2009;47:175–184.
- Marichal T, Tsai M, Galli SJ. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res.* 2013;1:269–279.
- Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao AJ, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen YT, Goodman SB, Gallo J. Macrophages—key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101:3033–3045.
- 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.
- Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol.* 1995;147:564–573.
- Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1183:104–122.
- 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.
- Shanbhag AS, Kaufman AM, Hayata K, Rubash HE. Assessing osteolysis with use of high-throughput protein chips. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:1081–1089.
- Solovieva SA, Ceponis A, Konttinen YT, Takagi M, Suda A, Eklund KK, Sorsa T, Santavirta S. Mast cells in loosening of totally replaced hips. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;322:158–165.
- Thwe PM, Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of dendritic cell immune function. *Cancer Lett.* 2017;412:236–242.
- Tomankova T, Kriegova E, Fillerova R, Luzna P, Ehrmann J, Gallo J. Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in primary knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22:1851–1860.
- Vitte F, Fabiani B, Benet C, Dalac S, Balme B, Delattre C, Vergier B, Beylot-Barry M, Vignon-Pennamen D, Ortonne N, Algros MP, Carlotti A, Samaleire D, Frouin E, Levy A, Laroche L, Theate I, Monnier F, Mugneret F, Petrella T. Specific skin lesions in chronic myelomonocytic leukemia: a spectrum of myelomonocytic and dendritic cell proliferations: a study of 42 cases. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:1302–1316.
- Whitehouse MR, Endo M, Zachara S, Nielsen TO, Greidanus NV, Masri BA, Garbuz DS, Duncan CP. Adverse local tissue reactions in metal-on-polyethylene total hip arthroplasty due to trunnion corrosion: the risk of misdiagnosis. *Bone Joint J.* 2015;97-B:1024–1030.
- Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, Lohmann CH. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:28–36.
- Wu DD, Li T, Ji XY. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *J Immunol Res.* 2017;2017:3591248.
- Zhan HX, Zhou B, Cheng YG, Xu JW, Wang L, Zhang GY, Hu SY. Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett.* 2017;392:83–93.

## 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