

# Tollin kaltaiset reseptorit lonkan totaaliproteesien septisessä ja aseptisessä irtoamisessa – mahdollinen vaste vaarasignaaleihin?

Jukka Pajarinen<sup>1,2,3</sup>, Elisabetta Cenni<sup>4</sup>, Lucia Savarino<sup>4</sup>, Enrique Gomez-Barrena<sup>5</sup>, Yasunobu Tamaki<sup>6</sup>, Michiaki Takagi<sup>6</sup>, Jari Salo<sup>2</sup>, Yrjö T. Konttinen<sup>1,7,8</sup>

1. Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY
2. Ortopedian ja traumatologian klinikka, Kliininen laitos, HY
3. Anatomian osasto, Biolääketieteenlaitos, HY
4. Laboratory for Pathophysiology of Orthopedic Implants, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna, Italy
5. Bone and Joint Research Laboratory, Fundación "Jiménez Díaz" Hospital, Autónoma University of Madrid, Madrid, Spain
6. Department of Orthopaedic Surgery, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan
7. Sairaala ORTON
8. Tekonivelsairaala COXA

Toll-like receptors (TLRs) recognize both endogenous necrotic cell-derived alarmins and exogenous microbe-derived pathogen-associated molecular patterns. These danger signals are crucial mediators in the activation of both innate and adaptive immunity. It was speculated that TLRs might play a role in aseptic and septic loosening of totally replaced hip prosthesis by recognizing their respective ligands. Bacterial culture-negative, aseptic (n=5) and culture-positive, septic (n=10) synovial-membrane-like interface tissues were compared to osteoarthritis synovial membrane (n=5) for the presence of various inflammatory cells stained with specific markers and two key TLRs, TLR-4 and -9, by immunohistochemical staining using specific antibodies. Both TLR-4 and -9 were expressed in aseptic and septic tissue samples and number of TLR positive cells was greatly increased when compared to osteoarthritic synovium. Interestingly, septic synovial membranes also contained neutrophil and lymphocyte infiltrates in addition to monocyte/macrophage infiltrates, which dominated in foreign body synovitis in aseptic loosening. In contrast, in osteoarthritis TLR-positive cells were mainly found in vascular endothelium and synovial lining. It is concluded that in aseptic cases a straightforward wear debris-macrophage interaction predominates, perhaps related to a local release of intracellular alarmins upon cell death and tissue necrosis. In septic cases TLR-4 and -9 positive neutrophils and lymphocytes are recruited and engaged, probably by pathogen-associated molecular patterns and antigens, respectively. Thus the observed TLR histopathology might reflect the mode of prosthesis loosening and might be useful diagnostic tool in distinguishing aseptic from septic prosthesis loosening.

## Johdanto

Kaksi keskeisintä lonkan totaaliproteesin revisioleikkauksen aihetta ovat kulumapartikkeleiden aikaansaama aseptinen irtoaminen sekä proteesin infektoituminen (septinen irtoaminen), joista ensimmäisen esiintyvyyttä on yliarvioitu jälkimmäisen kustannuksella (1-3). Tärkein syy proteesi-infektioiden alidiagnostiikkaan vaikuttaisi olevan biofilmin muodostuminen proteesin pinnalle: vita minimaa erittämänsä ekstrasellulaari matriksin suojassa elävien bakteerien osoittaminen tavanomaisilla bakteeriviljelymenettelyillä on haasteellista (4). Poistetun proteesin sonikaation on osoitettu vähentävän vääriä negatiivisi viljelyitä, mutta siitä huolimatta merkittävä osa proteesi-infektioista ja kroonisista, osteolyysiin johtavista periproteettisista tulehduksista saatetaan yhä diagnosoida väärin aseptiseksi irtoamiseksi (5, 6).

Nykykäsitöksen mukaan sekä luonnollisen, että hankitun immuunijärjestelmän aktivaation aloittaa vaaran aistiminen itulinjaan koodatuilla kymmenellä eri Tollin kaltaisilla reseptoreilla (TLR) sekä muilla luonnollisen immunitetin solujen ilmentämällä molekyyli muodontunnistusreseptoreilla (7-9). Endogeeniset alarmiinit (neuroottisten solujen vapauttama, kiteytymään pyrkivä uraatti) sekä eksogeeniset patogeeniin liittyvät molekyyli muodot (stafylokokkien soluseinän lipoteikohappo) ovat esimerkkejä näistä TLR:n tunnistamista vaarasignaaleista (10, 11). Näin myös periproteettisessa kudoksessa vapautuvat endotai eksogeeniset vaarasignaalit houkuttelevat paikalle runsaasti immuunijärjestelmän eri soluja.

TLR:ien läsnäolo aseptisessä periproteettisessa kudoksessa on vastikään osoitettu ja bakteeriperäisten rakenteiden osuutta aseptisen irtoamisen patogeneesissä laajalti epäilty (12, 13). Nyt oletettiin, että TLR:iä on läsnä myös septisessä periproteettisessa kudoksessa, jossa ne todennäköisesti toimivat patogeenien tai neuroottisten solujen tunnistuksessa. Lisäksi oletettiin, että TLR postitiivisten solujen tarkempi profilointi solutyypispesifisillä merkkiaineilla nivelrikkoisessa, aseptisessä ja septisessä nivelkalvossa antaisi vihjeen siitä, minkä tyyppisestä irtoamisesta on kyse.

## Menetelmät

### Potilaat ja näytteet

Viisi nivelkalvon kaltaista kudoksenäytettä kerättiin periproteettisesta kudoksesta lonkan totaaliproteesin

aseptisen irtoamisen vuoksi suoritettua revisioleikkauksesta. Bakteeri- ja sieniviljelyt olivat negatiivisia. Kymmenen nivelkalvon kaltaista kudoksenäytettä kerättiin periproteettisesta kudoksesta lonkan totaaliproteesin septisen irtoamisen vuoksi suoritettua revisioleikkauksesta. Viidessä tapauksessa viljelyssä kasvoi *Staphylococcus epidermidis*, neljässä *Propionibacterium acnes* ja yhdessä alfa hemolyyttinen streptokokki. ”Terveiksi” kontrolleiksi kerättiin viisi nivelkalvon kudoksenäytettä primaarisen nivelrikon vuoksi suoritettua lonkan totaaliproteesi leikkauksesta.

### Immunohistopatologia

Kudoksenäytteet fiksoitiin 30 % formaliiniin, jonka jälkeen suoritettiin dehydraatio etanolissa, kirkastus ksyleenissä ja petaus parafiinissä. Näyteblokeista valmistettiin 5 µm leikkeitä, jotka deparafinisoitiin ja rehydroitiin. Antigeenit paljastettiin käyttäen 10 mM sitraattipuskuria, pH 6.0, Milostone Mega T/T mikroaltauunissa, 98 °C:ssa, 24 minuutin ajan. Solumarkkereiden varsinainen värjäys suoritettiin TechMate Horizon värjäysrobotilla MSIP-protokollan mukaan kun taas TLR 4 ja TLR 9 värjättiin käsin; Ensimmäinen endogeeninen peroksidaasi salvattiin käyttäen 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja epäspesifistä värjäytymistä vähennettiin inkubaatiolla 10% vuohen normaaliseerumissa. Primaari vasta-aineinkubaatio tehtiin yli yön 4 °C ja sekundaarivasta-aine inkubaatio 1h huoneenlämmössä. Antigeeni-vasta-ainereaktio visualisoitiin käyttäen avidiini-biotiini-peroksidaasi-kompleksimetodia. Vastavärjäys tehtiin hematoksyleenillä. Jokaisen askelen välissä leikkeet pestiin fysiologisella keittosuolalla. Käyttämämme primaarivasta-aineet olivat: anti-CD3 (T-lymfosyytti) IgG 5 µg/ml, anti-CD20 (B-lymfosyytit) IgG2ak 0.7 µg/ml, anti-CD68 (makrofagit) IgG1k 0.85 µg/ml, anti-CD138 (plasmalut) IgG1k 1.25 µg/ml, anti-CD163 (makrofagit) IgG1k 1:50, anti-neutrofiili elastaasi (neutrofiilit) IgG1k 0.65 µg/ml, anti-HSP47 (fibroblastit) IgG2b 1 µg/ml, anti-TLR 4 IgG 1.3 µg/mL ja anti-TLR 9 IgG 0.5 µg/mL. Vasta-aineista CD3, TLR4 ja TLR9 olivat jäniksen polyklonaalisia anti-humaaneja vasta-aineita, loput hiiren monoklonaalisia anti-humaaneja vasta-aineita. Värjäytyneiden solujen määrä arvioitiin asteikoilla: ei positiivisia soluja (-); satunnaisia positiivisia soluja (±); joitain positiivisia soluja (+); runsaasti positiivisia soluja (++) ja suuri määrä positiivisia soluja (+++).

## Tulokset

### Nivelrikko

Nivelrikkoisen nivelkalvon histologisessa tarkastelussa todettiin kudoksen olevan löyhää, hyvin verisuonitettua ja lievästi ödemistä sidekudosta, jossa HSP47 positiiviset fibroblastit olivat pääasiainen solutyyppe. Myös yksittäisiä CD68 ja CD163 positiivisia monosyyti/makrofageja havaittiin. Joitain hajanaisia CD3 positiivisia T-lymfosyyttejä sekä pieniä CD20 positiivisia B-lymfosyytti joukkoja nähtiin, kun taas yhtään CD138 positiivista plasmakalvua ei voitu varmuudella tunnistaa. Niin ikään neutrofiilit olivat harvassa ja enimmäkseen intravaskulaarisia (Taulukko 1). TLR immunovärjäytyvyys keskittyi verisuonten endoteeliin sekä nivelkalvon pintasolukkuun, joskin joitain yksittäisiä TLR positiivisia pyöreitä monosyytti/makrofagin kaltaisia soluja sekä pitkulaisia fibroblastinkaltaisia soluja havaittiin myös nivelkalvon stroomassa (Kuva 1, paneelit A ja B). Perättäisissä leikkeitä tarkastelemalla TLR 4 positiiviset solut todettiin pääsääntöisesti myös TLR 9 positiivisiksi (Taulukko 2).

### Aseptinen irtoaminen

Aseptisen nivelkalvon kaltaisen interfaasikudoksen mikroskooppisessa tarkastelussa todettiin intensiivinen vierasesinereaktio. Suuria CD68 ja CD163 positiivisia monosyyti/makrofagi infitratteja, vierasesinejättisoluja ja –granulomia, sekä solunsisäisiä, fagosytoituja kulumapartikkeleita nähtiin runsaasti (Kuva 1, paneli C). Joitain hajanaisia CD3 positiivisia T soluja sekä HSP47 positiivisia fibroblasteja nähtiin makrofagi ja

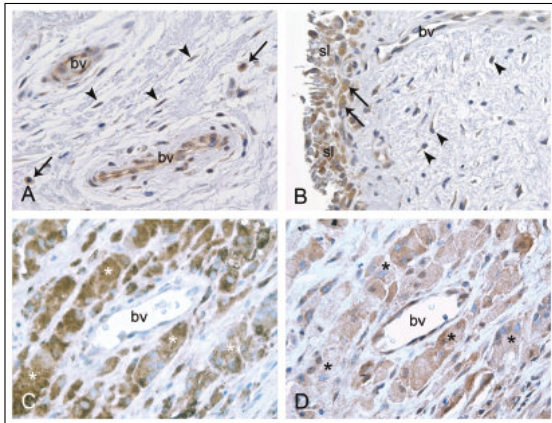
**Taulukko 1. Solumarkkerivärjäysten vertailu nivelrikon, aseptisen ja septisen nivelkalvon välillä. Huomaa nivelrikon nivelkalvon (OA) soluköyhyys, aseptisen nivelkalvon suuri makrofagiinfiltraatti ja septisen nivelkalvon suuri ja heterogeeninen tulehdussoluinfiltraatti. Gradeeraus: ei positiivisia soluja (-); satunnaisia positiivisia soluja (±); joitain positiivisia soluja (+); runsaasti positiivisia soluja (++) ja suuri määrä positiivisia soluja (+++).**

Solumarkkeri	OA	Aseptic	Septic
HSP 47	++	+	++
NE	-	-	++
CD 68	+	+++	++
CD 163	+	+++	++
CD 3	±	+	++
CD 20	+	-	++
CD 138	-	-	+

jättisolu infiltraattien seassa. Käytännössä kaikki nähdyt neutrofiilit olivat intravaskulaarisia ja CD20 positiiviset B solut sekä CD138 positiiviset plasmakalvut olivat hyvin harvassa (Taulukko 1). TLR immunovärjäytyvyys oli hyvin intensiivistä ja oli keskittynyt monosyytti/makrofagi infiltraatteihin, jotka perättäisiä leikkeitä tarkastellessa todettiin sekä TLR 4, että TLR 9 positiivisiksi (Kuva 1, paneli D). Verisuonten endoteeli sekä nivelkalvon pintasolukku olivat nivelrikon tapaan TLR positiivisia (Taulukko 2).

**Taulukko 2. TLR 4 ja TLR 9 positiivisten solujen määrän ja lokalisaation vertailu nivelrikon, aseptisen ja septisen nivelkalvon välillä. Nivelrikkoisessa (OA) nivelkalvossa verisuonten endoteeli sekä nivelkalvon pintasolukko vastaavat suurimmasta osasta havaitusta TLR immunoreaktiivisuudesta kun taas aseptisessä ja septisessä nivelkalvossa TLR positiivisuus on keskittynyt eri tulehdussoluihin. Näissä kudoksessa myös endoteeli sekä kudoksen fibroblastit värjäytyvät voimakkaammin, heijastaen mahdollisesti tulehduksen indusoimaa TLR proteiinien lisäsyn- teesiä. Gradeeraus: ei positiivisia soluja (-); satunnaisia positiivisia soluja (±); joitain positiivisia soluja (+); runsaasti positiivisia soluja (++) ja suuri määrä positiivisia soluja (+++).**

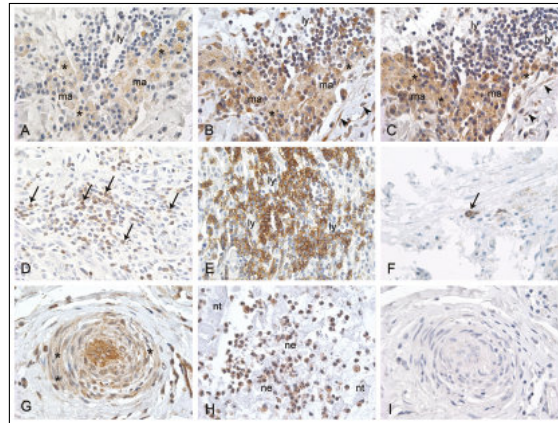
TLR 4	OA	Aseptic	Septic	TLR 9	OA	Aseptic	Septic
Endoteeli	++	+	+++	Endoteeli	+	+	++
Fibroblastit	+	+	+++	Fibroblastit	±	+	++
Neutrofiilit	-	-	++	Neutrofiilit	-	-	++
Makrofagit	+	+++	+++	Makrofagit	+	++	++
Lymfosyytit	-	-	+	Lymfosyytit	-	-	+



Kuva 1. Tollin kaltaiset reseptorit sekä nivelkalvon solut nivelrikossa sekä lonkan totaaliproteesien aseptisessä irtoamisessa.

A- TLR 4 värjäys, nivelrikkoinen nivelkalvo. Nähdään lievästi tulehtunutta ja ödemistä löyhää sidekudosta. Jotkin fibroblastin-kaltaisista soluista (nuolenpäät) sekä monosyytti/makrofagin-kaltaisista soluista (nuolet) ovat TLR 4 positiivisia. Myös verisuonen endoteeli on TLR 4 positiivista. B- TLR 9 värjäys, nivelrikkoinen nivelkalvo. Verisuonten endoteelin sekä strooman fibroblastin- (nuolenpäät) ja monosyytti/makrofagin -kaltaisten (nuolet) solujen lisäksi nivelkapselin pintasolukko on TLR positiivista. C- CD 68värjäys, aseptinen nivelkalvon kaltainen interfaasikudos. Nähdään massiivinen makrofagi-infiltraatti sekä useita vierasesinejättisoluja (asteriskit). D- TLR 4 värjäys, aseptinen nivelkalvon kaltainen interfaasikudos. Tarkasteltaessa tätä paneli C:n rinnakkaisleikettä, todetaan, että CD68 positiiviset makrofagit ja jättisolut (asteriskit) ovat myös TLR 4 positiivisia.

Immunohistokemiallinen värjäys, vastavärjäys hematoksyleenillä. Suurennos 400x. Lyhenteet: bv – verisuoni, sl – nivelkapselin pintasolukko.



Kuva 2. Tollin kaltaiset reseptorit ja nivelkalvon solut lonkan totaaliproteesin infektoituneessa interfaasikudoksessa.

A-I Immunohistokemiallisia värjäyksiä septisestä interfaasikudoksen, jota karakterisoi bakteeriviljely positiivisuus sekä löyhän sidekudoksen infiltroituminen erilaisilla tulehdussoluilla. A- CD163 värjäys. Huomaa CD163 positiiviset makrofagit (asteriskit) sekä prominentit lymfositit infiltraatit. B- TLR 4 värjäys. Tästä panelin A rinnakkaisleikkeestä nähdään, että CD163 positiiviset makrofagit ovat myös TLR 4 positiivisia (asteriskit) ja vastaavat suurimmasta osasta havaittua TLR 4 immunoreaktiivisuutta tässä kudoksessa. Suurin osa lymfositteista on TLR 4 negatiivisia. Joitain TLR 4 positiivisia fibroblasteja (nuolenpäät) voidaan nähdä. C- TLR 9 värjäys. Tämä paneelin A ja B rinnakkaisleike demonstroi että CD163 ja TLR 4 positiiviset makrofagit ovat myös TLR 9 positiivisia (asteriskit) kun taas lymfositit värjäytyvät myös TLR 9 suhteen hyvin heikosti. Fibroblastit ovat heikosti TLR 9 positiivisia (nuolenpäät). D- CD 3 värjäys. Lukuisten CD3 positiivisten lymfositien diffuusi-infiltraatti (osa merkitty nuolilla), nähdään tässä näkökentässä. E- CD20 värjäys. Nodulaarisia, CD20 positiivisten B solujen joukkoja nähtiin diffuusien CD 3 positiivisten T solu kertymien läheisyydessä. F- CD 138 värjäys. Myös joitain CD138 positiivisia plasmakomplekseja (nuoli) voitiin havaita. G- TLR 4 värjäys. Satunnaisia granulomia nähtiin. Muutamia TLR 4 positiivisia epitelioidi makrofagaja on merkitty (asteriskit). H- TLR 4 värjäys. Laaja TLR 4 positiivisten neutrofiilien infiltraatio nekroottisen kudoksen ja soludebriksen joukossa. I- Negatiivinen värjäyskontrolli. Panelin G granuloman värjäys jäniksen normaali IgG:llä.

Immunohistokemiallinen värjäys, vastavärjäys hematoksyleenillä. Suurennos 400x. Lyhenteet: ma - makrofagi infiltraatti, ly – lymfositit infiltraatti, ne – neutrofiili infiltraatti, nt – nekroottista kudosta.

## Septinen irtoaminen

Histologiset näytteet infektoituneista nivelkalvon kaltaisista interfaasikudoksista olivat edellä mainittuja monimuotoisempia. Suuria nekroottisia ja fibroottisia alueita todettiin joissain näytteissä, kun taas toiset näytteet koostuivat löyhästä sidekudoksesta, jossa nähtiin voimakas tulehdusreaktio sekä runsaasti erilaisia solupopulaatioita. Aseptisten näytteiden tapaan, suuria mutta alueittaisia CD68 ja CD163 positiivisia monosyytti/makrofagi infiltraatteja (Kuva 2, paneeli A) sekä satunnaisia vierasesinejättisoluja ja –granulomia nähtiin (Kuva 2, paneeli G), samoin solunsisäisiä kulumapartikkelikertymiä. Suuria neutrofilikertymiä nähtiin nyt myös kudoksen stroomassa (Kuva 2, paneeli H). Suuria määriä diffuusisti sijoittuneita CD3 positiivisia T soluja havaittiin (Kuva 2, paneeli D), kuten myös nodulaarisia CD20 positiivisia B solu kertymiä (Kuva 2, paneeli E). Jotkut B soluista olivat aktivoituneet myös CD138 positiivisiksi plasmakalviksi, joita nähtiin etenkin B solu kertymien yhteydessä (Taulukko 1; Kuva 2, paneeli F). Intensiivinen TLR immunovärjäytyvyys nähtiin etenkin monosyytti/makrofagi kertymissä, mutta myös neutrofileissä ja verisuonten endoteelissä. Tarkasteltaessa perättäisiä leikkeitä em. Solut vaikuttivat sekä TLR 4 että TLR 9 positiivisilta (Taulukko 2; Kuva 2, paneelit B, C, G ja H).

## Pohdinta

Nivelrikkoisessa nivelkalvossa TLR:iä löytyi pääasias- sa verisuonten endoteelistä ja nivelkapselin pintasolu- kosta. Lukuunottamatta näitä epiteliaalisia kudoksia, vain muutamia TLR positiivisia makrofagin tai fibroblastin kaltaisia soluja nähtiin nivelkalvon stroo- massa. Tunnistettaessa ja torjuttaessa niveleen pyrkiviä patogeneenejä ovat epiteliaaliset kudokset luonnollisesti strategisesti kriittisissä paikoissa ja havaittu TLR pro- fiili edustaakin todennäköisesti terveenkin nivelkalvon ensilinjan puolustusta hematogeenisiä tai intra-artiku- laarisia patogeneenejä vastaan. Koska TLR aktivaatio on olennaista sekä luonnollisen, että adaptiivisen immu- niteetin käynnistymistä on näiden reseptoreiden run- sas esiintyvyys epiteliaalisissa kudoksissa helppo ym- märtää.

Aseptisessä nivelkalvossa yleisin solutyyppi oli TLR positiivinen monosyytti/makrofagi. Laajalti on hyväksytty, että totaaliproteesien aseptinen irto- aminen johtuu pääasiassa implantin liukupinnoilta (yleensä metalli-UHMW polyetyleni) irtoavista ku-

lumapartikkelista (14). Jokainen otettu askel johtaa yli 105 polyetyleni partikkelin muodostumiseen (15). Kudokseen rekrytoitunut makrofagi fagosytoivat näitä partikkeleita ja reagoivat huonosti sulavaan materiaan erittämällä monia tulehdusvälittäjäaineita, jotka puo- lestaan stimuloivat kudoksen stroman soluja (osteob- lasteja, fibroblasteja) ilmentämään RANK ligandia, voimakasta osteoklastogeenista kasvutekijää, joka to- dennäköisesti on vastuussa aseptisen irtoamisen yhteydessä kudoksissa nähdyistä kasvaneesta osteoklasti- ja jättisolumuodostuksesta sekä viimekädessä osetolyy- sistä (16, 17). Tämän ”partikkelitaudin” lisäksi viime- vuosina on pohdittu vähäoireisten bakteeri-infektioi- den sekä proteesin tai kulumapartikkeleiden pintaan kiinnittyvien bakteerijäänteiden mahdollista osuutta tekoniivelen irtoamisessa (13, 18, 19). Koska aseptises- sa nivelkalvossa oli runsaasti TLR positiivisia makro- fageja, se lienee hyvin reaktiivista kudosta näitä TLR ligandeja kohtaan.

Eroksi aseptisesti irtoavasta implantista, septises- sä nivelkalvossa oli runsaasti erilaisia valkosoluja myös lymfosyytti- ja neutrofilikertymiä. Huomattava on, että neutrofiilit elävät kudoksissa vain 1-3 päivää (20). Siksi niiden läsnäolo periproteettisessa kudoksessa viittaa käynnissä olevaan bakteeri-infektioon ja uusien solujen jatkuvaan rekrytointiin nivelkalvoon. Riittä- vän suurina neutrofilikertymiä onkin aiemmin pidetty septisen irtoamisen histopatologisenä merkinä (21). Tutkimustulostemme mukaan myös imusolukertymät voivat viitata bakteerien osuuteen irtoamisessa. Septis- sessä nivelkalvossa oli siis myös T- ja B-solukertymiä sekä vasta-aineita tuottavia plasmakalviksi. Osa näh- dyistä lymfosyyteistä edustanee pitkäikäisiä muisti- soluja, jotka jäävät partioimaan nivelkalvoon ja ovat valmiita reagoimaan kroonisen infektion aktivoitumi- seen. Lymfosyyttien läsnäolo viittaa myös siihen, että bakteerit eivät jakaudu eksponentiaalisesti vaan pii- lottelevat implantin pinnalle syntyneessä biofilmissä. Johtuen biofilmin bakteerien matalasta metabolisesta asteesta sekä monien molekyylien huonosta pääsystä matriksiin, ovat biofilmit hyvin resistenttejä sekä im- muunijärjestelmää että antibiootteja vastaan ja ovat myös hankalia osoittaa tavanomaisella bakteerivilje- lyllä (4).

Johtopäätöksenä todetaan, että banaankärpäselältä perityvät Tollin kaltaiset reseptorit voivat antaa uu- den työkalun tekoniivelen irtoamisen diagnostiikkaan ja aseptisen ja septisen irtoamisen erotusdiagnoistiik- kaan.

## Kiitos

*Kiitämme Bioanalyttikko Eija Kailaa ja Erkki Hännistä teknisestä avusta. Ortopedian ja Traumatologian tutkimussäätiö, evo, Sigrid Juseliuksen säätiö, Finska Läkaresällskapet, Wilhelm och Else Stockmannin säätiö, Invalidisäätiö ja TEKES ovat rahoittaneet tutkimusta.*

## Kirjallisuus:

1. Goodman SB: Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials*. 2007;28:5044-5048.
2. Goodman SB, Gómez Barrena E, Takagi M, Konttinen YT: Biocompatibility of total joint replacements: A review. *J Biomed Mater Res A*. Published Online First: 28 May 2008. doi:10.1002/jbm.a.32063
3. Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS: Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005;437:25-30.
4. Dunne WM Jr: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:155-166.
5. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, ym: Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357:654-663.
6. Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R: Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol*. 2008;46:488-492.
7. Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296:301-305.
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
9. Miyake K: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007;19:3-10.
10. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440:237-241.
11. Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1-5.
12. Takagi M, Tamaki Y, Hasegawa H, Takakubo Y, Konttinen L, Tiainen VM, ym: Toll-like receptors in the interface membrane around loosening total hip replacement implants. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81:1017-1026.
13. Nalepka JL, Lee MJ, Kraay MJ, Marcus RE, Goldberg VM, Chen X, ym: Lipopolysaccharide found in aseptic loosening of patients with inflammatory arthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;451:229-235.
14. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM: The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;460:240-252.
15. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Glant TT, Gilbert JL, Black J, Galante JO: Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 1994;76-B:60-67.
16. Mandelin J, Li TF, Liljeström M, Kroon ME, Hanemaaijer R, Santavirta S, ym: Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85-B:1196-1201.
17. Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP: The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;454:251-261.
18. Ragab AA, Van De Motter R, Lavish SA, Goldberg VM, Ninomiya JT, Carlin CR, ym: Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res*. 1999;17:803-809.
19. Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Nalepka JL, Seabold JM: Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72:179-185.
20. Bainton DF: Neutrophil granules. *Brit J Haematol*. 1975;29:17-22.
21. Athanasou NA, Pandey R, de Steiger R, Crook D, Smith PM: Diagnosis of infection by frozen section during revision arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77-B:28-33.