

# Metodika sledování distribuce otěrových částic UHMWPE v okolních tkáních u TEP kyčelního kloubu

## Method for Assessment of Distribution of UHMWPE Wear Particles in Periprosthetic Tissues in Total Hip Arthroplasty

D. POKORNÝ<sup>1</sup>, M. ŠLOUF<sup>2</sup>, Z. HORÁK<sup>2</sup>, D. JAHODA<sup>1</sup>, G. ENTLICHER<sup>3</sup>, S. EKLOVÁ<sup>3</sup>, A. SOSNA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup> Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha

<sup>3</sup> Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Práce vznikla v rámci řešení grantových projektů GA ČR 106/04/1118 a IGA AV ČR IAA2000710504.

### ABSTRACT

#### PURPOSE OF THE STUDY

Aseptic loosening of implants is the main complication affecting the longevity of joint prostheses. The highest proportion of loosening occurs due to osteolysis produced by the presence of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear particles smaller than 1  $\mu\text{m}$ . These can be identified by microscopic, spectroscopic or light-scattering methods. Here we describe our method for counting wear particles, based on the principle of light scattering.

#### MATERIAL AND METHODS

Between 2002 and 2004, we collected samples of polyethylene granuloma in 19 patients who underwent revision total hip arthroplasty (THA) for aseptic loosening. The samples were obtained from strictly defined areas corresponding to the radiographic presentation of periprosthetic zones describes by Gruen and DeLee in THA.

The frozen samples were lyophilized and subjected to delipidation and hydrolyzation procedures in 65 %  $\text{HNO}_3$ . The top part of solution containing wear particles was blended with isopropanol, and the mixture was filtered through a 10- $\mu\text{m}$  poly-carbon membrane. Subsequently, the filtrate was filtered through a 0.1- $\mu\text{m}$  membrane. Membranes with trapped particles, 0.1 to 1.0  $\mu\text{m}$  in size, were sent for particle characterization and quantification.

The number of wear particles was measured by the method based on light scattering with calibration (LSC), using a Beckman Coulter LS230 analyzer that can express particle size distribution in a given volume in percent. The method was based on the fact that each particle reflects rays that can be measured. The medium measured contained an unknown number of UHMWPE particles and a known number of calibration glass beads varying in size. The number of UHMWPE particles was calculated from the known number of calibration beads.

#### RESULTS

Because the collected samples were also used to develop the method, comprehensive data was obtained in six patients only.

Particle distribution recorded in the periprosthetic zones in THA varied greatly; up to a five-fold difference in particle concentration was observed between the zones. In five of the six patients, the highest particle concentration was found in zone III.

#### DISCUSSION

Seeking a method that would be exact, quick and cheap and would eliminate particle aggregation remains the subject of study for researchers cooperating with clinical practice. At present methods based on weighing isolated particles are used most frequently. We developed the LSC method that, for quantification, utilizes the ability of particles to disperse light, and allows us to calculate the real numbers of UHMWPE wear particles in a medium containing a known number of calibration particles. Although this is an indirect method, it gives more accurate results than the direct weighing of particles.

The advantages of the LSC method involve less demand on sample purity, greater speed and low limits of detection. The method is useful for statistical evaluation of a larger number of samples. The variation in particle distribution in THA found in this study is in agreement with the relevant literature data; it is also in agreement with our assumptions and clinical findings.

#### CONCLUSIONS

The authors developed an original method for assessment of UHMWPE wear particles in tissue samples, which is quicker than the methods so far used. In the periprosthetic tissues studied, particles about 1  $\mu\text{m}$  in size were detected; their numbers (about  $10^{10}$  particles per gram dry tissue) are in agreement with the literature data. The distribution of particles in periprosthetic zones in THA was uneven. The highest number of particles was found in the neighboring zone III and zone 7, as described by Gruen and DeLee.

**Key words:** wear, polyethylene, total hip arthroplasty, light scattering, aseptic loosening, wear particles.

## ÚVOD

Aseptické uvolnění implantátů je nepochybně hlavní komplikací, která omezuje životnost umělých kloubních náhrad. Součástí aseptického uvolnění bývá destrukce kostního lůžka. Osteolýza se však může vyskytovat i v okolí stabilních implantátů (7). V každém případě jde o složitý patofyziologický proces, který je vyvolán celou řadou faktorů. Nejdůležitějším z nich je přítomnost otěrových částic polyetylenů (UHMWPE) o velikosti pod 1  $\mu\text{m}$  (9, 18, 19, 21, 22). Charakteristiky těchto rizikových částic byly již dříve definovány (4, 16, 22, 20, 23). Intenzivně je studován mechanismus vzniku osteolýzy (24). Na počátku stojí pravděpodobně makrofágy, které se po fagocytóze částic polyetylenů aktivují a spouští kaskádu interakcí, na jejichž konci dochází k destrukci kosti (6). Jsou uvolňovány různé tkáňové faktory - *interleukin* IL-6, IL-1, *tumor necrosis factor* TNF- $\alpha$ , *prostaglandin* PGE2, *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), *transformující růstové faktory* (TGF $\beta$ ), *metaloproteinázy*.

V periprotetických tkáních lze nalézt velmi různorodé částice, např. otěrové částice polyetylenů, otěrové částice keramických částí implantátů ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  z *alumina ceramic*,  $\text{ZrO}_2$  ze *zirconia ceramic*), kovových částí implantátů a částice cementu (u cementovaných komponent) či úlomky kostí. Převážnou většinu však tvoří otěrové částice UHMWPE menší než 4 mikrometry, z nichž více než 90% bývá menších než 1 mikrometr (0,05  $\mu\text{m}$  – 0,3  $\mu\text{m}$ ). K identifikaci částic lze použít řadu metod, zejména mikroskopických, spektroskopických a rozptylových:

1. Světelná mikroskopie v prošlém a polarizovaném světle (zkratky LM a PLM) (15).
2. Rastrovací elektronová mikroskopie (zkratka SEM) (26).
3. Transmisní elektronová mikroskopie (zkratka TEM) (27).
4. Mikroprvková analýza (zkratky EDS či EDAX) (14).
5. Infračervená, popř. Ramanova spektroskopie (zkratky IR a RS) (12).
6. Diferenční skanovací kalorimetrie (zkratka DSC) (25).
7. Metody založené na rozptylu světla LS, DLS, QELS) (5).
8. Další speciální metody založené např. na měření elektrické vodivosti roztoku apod.

Uvolňující se částice jsou pohybem a hydraulickými jevy vtlačovány do štěrbinovitého prostoru, který obklopuje částečně nebo úplně implantát – effective joint space (23). Jeho rozsah je dán kvalitou osteointegrace implantátu. Nedostatečně zpracován je stále proces distribuce částic do uvedeného prostoru a přímá vazba množství a charakteru částic na intenzitu lokální osteolytické reakce. Proto našim cílem bylo provést analýzu distribuce otěrových částic UHMWPE do okolních tkání a vyjádřit vztah koncentrace a charakteru částic na tuto patologickou tkáňovou odezvu.

Určení počtu otěrových částic v poškozených tkáních z okolí implantátu není jednoduché, jak se lze přesvěd-

čit nahlédnutím do zahraničních odborných periodik. Popisované výsledky bývají leckdy rozporné, publikované metody izolací či kvantifikací jsou nejrůznější, obtížně reprodukovatelné nebo přímo nepoužitelné. K úspěšnému počítání či kvantifikaci otěrových částic je třeba zvládnout tři základní kroky:

- definované odběry poškozených tkání při reoperacích kloubních náhrad,
- reprodukovatelné metody izolace částic z poškozených tkání,
- co nejpřesnější techniky pro určení počtů izolovaných částic.

Je dobré připomenout, že částice jako celek mají nepatrnou hmotnost a nelze drtivou většinu rozměrově nepatrných částic pozorovat ani s pomocí světelného mikroskopu. Jedná se tedy o určování počtů částic prakticky neviditelných a nevážitelných. V našem případě se podařilo vyvinout novou, rychlou kvantifikační metodu jen díky úzké spolupráci tří vysoce specializovaných pracovišť: I. ortopedické kliniky 1. LF UK (zajištění odběrů), Přírodovědecké fakulty UK (izolace částic) a Ústavu makromolekulární chemie AV ČR (kvantifikaci otěrových částic).

Dosud známé kvantifikační metody, které umožňují stanovení otěru UHMWPE, nebyly pro náš projekt, jehož cílem je stanovení počtů částic v různých zónách v okolí implantátů, naprosto vhodné. Většina popisovaných metod (3) je založena na měření hmotnosti izolovaných částic, což je dosti nepřesné (navážky se pohybují v desetinách až setinách mg) a navíc velmi náročné na dokonalou čistotu vzorku (i nepatrné nečistoty mohou výsledek ovlivnit, protože stanovovaná hmotnost je velmi nízká). Další část metod (13) je založena na stanovení celkového objemového či hmotnostního úbytku kloubní jamky, což ovšem neumožňuje určit distribuci počtů částic v jednotlivých zónách. Jiné techniky jsou založeny na statistickém vyhodnocování mikrofotografií z rastrovacího elektronového mikroskopu (11), což může být při správném provedení přesné, ale díky extrémní pracnosti jde o metodu obtížně použitelnou pro velká množství vzorků. Některé speciální techniky založené na měření elektrické vodivosti suspenze otěrových částic jsou sice méně pracné, ale nezachycují nejmenší částice (15) a navíc není dotyčné zařízení v ČR k dispozici. Konečně byly zkoušeny i metody založené na měření rozptylu světla ze suspenze otěrových částic ve vhodné kapalině, nejčastěji *isopropanolu* (5). Mezi hlavní výhody těchto metod patří rychlost, schopnost zachytit i velmi malé částice a necitlivost na nečistoty, pokud jsou rozpustné v použité kapalině. Nevýhodou je nutnost použít speciální přístroj a nutnost omezit aglomeraci částic, která velmi zkresluje výsledky.

V této práci jsme použili naši vlastní metodu počítání otěrových částic, založenou na principu rozptylu světla *Light Scattering with calibration (LSc)*. Metoda LSc poskytuje relativní počty částic v okolí implantátů, její modifikace, nazvaná LScm, poskytuje absolutní počty částic. Podrobný popis metody LSc spolu s odhadem přesnosti, je obsahem naší předchozí práce (25). Bylo stanoveno, že chyba ve stanovení relativních počtů čás-

tic pomocí metod LSc činí méně než 15 %. Nižší přesnost techniky je vyvážena její vysokou rychlostí, která nám umožnila zpracovat velké množství testovacích i reálných vzorků. Nejzajímavější výsledky získané pomocí LSc jsou shrnuty v této práci.

## MATERIÁL A METODA

### Odběry vzorků

V letech 2002 – 2004 jsme u 19 pacientů, u kterých prováděl nejzkušenější operátor z týmu autorů (A.S.) reimplantaci TEP kyčelního kloubu pro aseptické uvolnění, odebrali patologické tkáně typického vzhledu polyetylenového granulomu (obr. 1). Odebrané tkáně byly rozděleny podle místa odběru tak, aby to odpovídalo rentgenologickým zónám podle Gruena a DeLeeho (obr. 2) (1,10)). Tyto tkáně pak ve zmraženém stavu byly předány k analýze. Problémem však byla skutečnost, že ne u všech pacientů bylo odebratelné množství vzorku ve všech zónách v okolí jamky a dřívku či jedna z komponent nebyla uvolněná, a tedy ani nebyla měněna.

### Dokumentace vzorků

U všech pacientů, u kterých byl odběr proveden, byla zdokumentována anamnéza a získaná rentgenová dokumentace operovaného kyčelního kloubu.

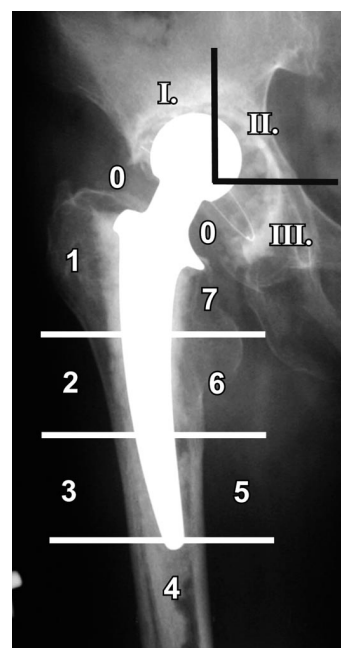
### Izolace otěrových částic ze vzorků

Pro izolaci otěrových částic z odebraných vzorků byly všechny používané roztoky předem čištěny. Veškerá destilovaná voda a izopropanol byly čištěny před použitím filtrací postupně přes 10  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$  polykarbonátovou membránu (Cyclopore, Whatman, UK). 65%  $\text{HNO}_3$  a 12 mol/l KOH byly filtrovány před použitím postupně přes 10  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$  teflonovou membránu (PTFE, Millipore, Irsko).

Zmražené vzorky byly lyofilizovány a delipidovány. Pro delipidaci bylo 0,3 g vzorku nakrájeno na malé kousky a 2krát extrahováno 10 ml směsí chloroform/methanol (2:1, v/v) po 12 hod. Po odstranění druhé části směsi rozpouštědel byly vzorky sušeny proudem filtrovaného vzduchu a pak zahřívány při 60°C po 2 hod. Delipidovaný vzorek (získaný z 0,3 g lyofilizovaného vzorku) byl hydrolyzován 5 ml 65%  $\text{HNO}_3$  po 24 hodin za laboratorní teploty. Pouze horní 2ml vrstva byla použita pro další izolaci, zbývající dolní část byla odstraněna odsátím a likvidována. Výše zmíněná horní vrstva byla 2krát promyta dalšími 5 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a 2krát 8 ml vody stejným způsobem. Před oddělením horní vrstvy byl roztok vždy centrifugován při 500 g po 1 minutu. Promytá 2ml vrstva byla neutralizována 12 mol/l KOH a 2krát promyta vodou stejným způsobem, jak je popsáno shora. Konečná promytá 2ml horní vrstva obsahující otěrové polyetylenové částice byla smíchána se 4 ml izopropanolu a směs byla filtrována přes 10  $\mu\text{m}$  polykarbonátovou membránu (Cyclopore, Whatman, UK). Filtrát byl pak filtrován přes 0,1  $\mu\text{m}$  membránu stejné provenience. Membrány se zachycenými otěrovými částicemi 0,1–10  $\mu\text{m}$



Obr. 1. Typický osteoagresivní granulom



Obr. 2. Použité rozdělení periprotetických zón

byly používány pro charakterizaci a kvantifikaci částic.

### Stanovení relativních počtů otěrových částic metodou LSc

Počty částic byly stanoveny pomocí elastického rozptylu světla (LS = Light Scattering). Jedná se o dvoukrokovou techniku. V prvním, experimentálním kroku se změřil elastický rozptyl světla roztoku, přesněji řečeno suspenze, obsahující neznámé množství otěrových polyetylenových částic, k němuž je přidáno známé množství skleněných kalibračních kuliček. Velikost kalibračních kuliček se musí výrazně lišit od velikosti polyetylenových částic. Ve druhém, matematickém kroku se ze známé hmotnosti vzorku použitého při izolaci částic, zná-





Obr. 3. Analyser Coulter- LS 230, Beckman

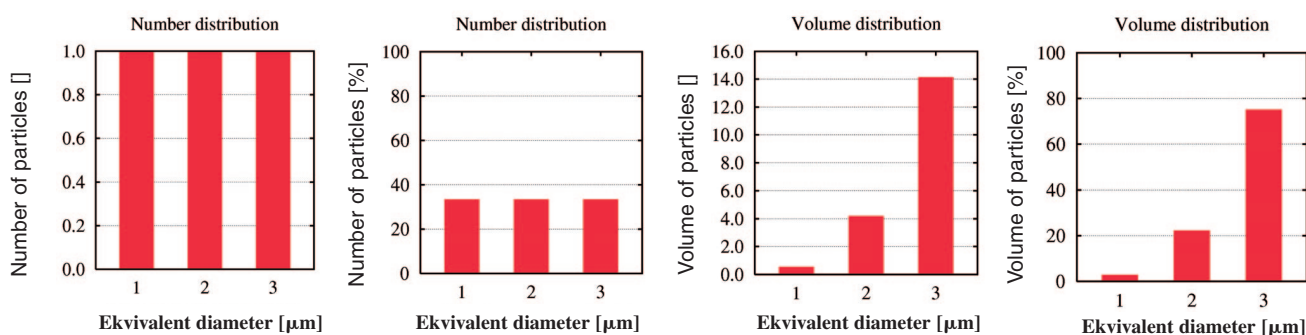
mého objemu měřené suspenze částic a známého množství přidanych kuliček vypočte číslo, které udává relativní počet ořetrových částic vztažený na jeden gram suché tkáně. Termín *relativní počet částic* zde znamená, že toto číslo neudává přímo počet částic, ale rovná se počtu částic vynásobeného jistou neznámou experimentální konstantou. Ta je ovšem pro všechna měření ořetrových částic přibližně stejná, pokud mají ořetrové částice přibližně stejnou velikost.

V prvním kroku metody LSc se měří elastický rozptyl světla pomocí přístroje *Particle Size Analyser Coulter – LS 230, Beckman* (obr. 3).

Do přístroje se napustí 150 ml cirkulačního média (v tomto případě vody s rozpuštěnou povrchově aktivní látkou omezující shlukování částic) a několik mililitrů suspenze izolovaných PE částic. Množství měřených ořetrových částic se liší vzorek od vzorku: suspenze PE částic se přidává tak dlouho, dokud přístroj pomocí automatické kontroly neoznámí, že je dosaženo optimální koncentrace. Dále se k suspenzi přidá známé množství kalibračních skleněných kuliček, které jsou značně větší než měřené částice. V průběhu měření cirkulační médium neustále obíhá v uzavřené trubici uvnitř přístroje, přičemž s sebou unáší měřené ořetrové částice i kalibrační kuličky. V jistém místě přístroje je laser a detektor. Kdykoli se v tomto místě objeví částice uná-

šená cirkulačním médiem, rozptýlí laserové světlo – počet změřených signálů je tedy úměrný počtu částic. Intenzita rozptýleného světla je úměrná šesté mocnině ekvivalentního průměru částice,  $d^6$  – intenzita každého změřeného signálu tudíž dává informaci o velikosti částice. Pojem *ekvivalentní průměr* v podstatě značí, že všechny částice jsou z hlediska měření považovány za sférické. Finálním výstupem z měření je tzv. objemová distribuce PE částic v relativní škále. Pojem *objemová distribuce v relativní škále* lze nejlépe vysvětlit příkladem: Předpokládejme, že měříme vzorek, v němž jsou pouze tři kulové částice s průměry  $d_1 = 1 \mu\text{m}$ ,  $d_2 = 2 \mu\text{m}$  a  $d_3 = 3 \mu\text{m}$ . Pokud bychom naměřili *číselnou distribuci v absolutní škále*, dostali bychom graf na obr. 1a ukazující, že ve vzorku je právě jedna částice s průměrem  $1 \mu\text{m}$ , právě jedna částice s průměrem  $2 \mu\text{m}$  a právě jedna částice s průměrem  $3 \mu\text{m}$ . Pokud bychom získali *číselnou distribuci v relativní škále*, dostali bychom graf 1b říkající, že ve vzorku je právě jedna třetina částic (tj. 33 %) s průměrem  $1 \mu\text{m}$ , právě jedna třetina částic s průměrem  $2 \mu\text{m}$  a právě jedna třetina částic s průměrem  $3 \mu\text{m}$ . Pokud bychom měřili *objemovou distribuci v absolutní škále*, dostali bychom graf 1c, z něhož plyne, celkový objem částic s průměrem  $1 \mu\text{m}$  činí  $0.5 \mu\text{m}^3$  (objem jedné koule o průměru  $d = d_1 = 1 \mu\text{m}$ , vypočtený podle vzorce  $V = 1/6 \times \pi \times d^3$ ), celkový objem částic

Graf 1a, b, c, d. Ilustrace výsledků metody LSc: všechny grafy odpovídají jednomu a tomu samému modelovému vzorku, který by teoreticky obsahoval pouze tři částice s velikostmi 1, 2 a 3 mm; zleva doprava: (a) číselná distribuce v absolutní škále, (b) číselná distribuce v relativní škále, (c) objemová distribuce v absolutní škále, (d) objemová distribuce v relativní škále





a	b	c
d	e	f

Obr. 4a-f. Předoperační rtg-vyšetření  
šesti prezentovaných pacientů

s průměrem  $2\ \mu\text{m}$  činí  $4.2\ \mu\text{m}^3$  (objem jedné koule o průměru  $2\ \mu\text{m}$ ) a celkový objem částic s průměrem  $3\ \mu\text{m}$  činí  $14.1\ \mu\text{m}^3$  (objem jedné koule o průměru  $3\ \mu\text{m}$ ). Pokud by byla výsledkem *objemová distribuce v relativní škále*, dostali bychom graf 1d, který ukazuje, že objem částic s průměrem  $1\ \mu\text{m}$  je 2.8 % celkového objemu částic ve vzorku, objem částic s průměrem  $2\ \mu\text{m}$  je 22.2 % celkového objemu částic a objem částic ve vzorku s průměrem  $3\ \mu\text{m}$  je 75.0 % celkového objemu částic.

V druhém kroku metody LSc se z naměřených *objemových distribucí velikostí částic v relativní škále* (tedy z grafu, který principiálně odpovídá grafu 1d) vypočtou relativní počty částic (tedy graf, který principiálně odpovídá 1a). Z grafu 1a pak snadno určíme celkový počet částic prostým sečtením všech sloupečků, v našem modelovém příkladu na grafu 1a bychom dostali  $1+1+1=3$ . Nicméně výsledný celkový počet částic určený metodou LSc stále není úplně absolutní: jedná se o číslo, které je vynásobeno jistou neznámou experimentální konstantou  $k$ . To lze opět nejlépe vysvětlit příkladem: předpokládejme, že máme dva vzorky A a B, přičemž v prvním je 50 otěrových částic a ve druhém 100 částic. Metoda LSc nám neřekne, kolik je přesně částic ve vzorcích A a B, ale sdělí nám, že poměr množství částic A:B je 1:2, což odpovídá skutečnosti. Přesné odvození a popis výpočtů není komplikované, ale pře-

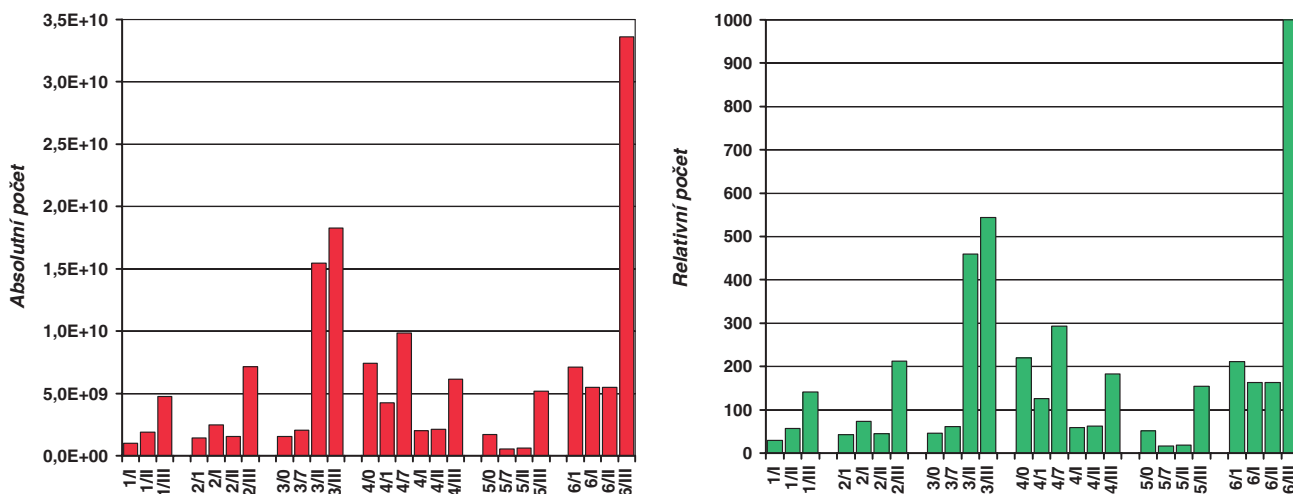
sahuje rámec tohoto sdělení a lze je najít v naší předchozí práci (25).

#### Stanovení absolutních počtů otěrových částic metodou LScm

V předchozím odstavci bylo zmíněno, že metoda LSc poskytuje relativní počty částic, neboť výsledné vypočtené číslo je vynásobeno nějakou neznámou konstantou  $k$ . Podstatou metody LScm je určení této konstanty  $k$ , což následně umožní vypočítat absolutní počty částic. Konstanta  $k$  se určí jedním modelovým experimentem, při kterém použijeme tak velké množství otěrových částic, které je možno přesně zvážit. Odvození a popis metody LScm lze rovněž najít v naší předchozí práci (25).

#### Rozdíl mezi metodami LSc a LScm

Rozdíl lze vyjádřit takto: metoda LSc poskytuje relativní počty částic, zatímco metoda LScm dává absolutní počty částic v jednotlivých zónách. Vysvětlit lze jednoduchým příkladem: mějme pacienta se zónami odběru A, B, C. Předpokládejme, že v zóně A je právě 100 částic, v zóně B je 200 částic a v zóně C je 300 částic. Metoda LSc poskytne relativní hodnoty, tj. poměr počtů částic v zónách A:B:C, který bude v tomto případě 1:2:3. Jinými slovy zjistíme, že v zóně B je dvakrát a v zóně C třikrát více částic než v zóně A. Metoda LScm poskyt-



Graf 2a, b. Výsledky metod LSc (a) a LScm (b) pro vybraných šest pacientů, u nichž bylo možno odebrat vzorek ze zóny III

ne absolutní hodnoty, tj. zjistíme že v zóně A je 100, v zóně B 200 a v zóně C 300 částic, což odpovídá poměru 1:2:3 z metody LSc. Navíc obě metody poskytují základní informaci o velikostech částic.

## VÝSLEDKY

Vyhodnocení ovlivňovaly následující faktory: Jak již bylo zmíněno, zdaleka ne u všech 19 pacientů bylo možné odebrat vzorky ze všech zón. Dále v této první sérii průběžně probíhalo upřesnění technologie zpracování vzorků a měření. Při výsledném rozboru jsme proto pouze u 6 pacientů označili výsledky měření jako objektivní a minimálně zkreslené. Tabulka 1 ukazuje anamnestické údaje uvedených 6 pacientů, předoperační rtg-vyšetření je na obr. 4.

Tab. 1.

Pacient	Věk	Doba od primo-implantace (roky)	Indikace TEP	Implantát	Rok implantace	Odebrané zóny
1	74	8	OA	WM/Poldi	1995	I, II, III
2	78	7	OA	Poldi/Poldi	1996	1, I, II, III
3	79	14	OA	Poldi/Poldi	1989	0, 7, II, III
4	80	27	OA	Poldi/Poldi	1975	0, 1, 7, I, II, III
5	65	9	RA	WM/WM	1994	0, 7, II, III
6	68	11	OA	WM/Poldi	1992	1, I, II, III

Ze všech odebraných vzorků byly izolovány otěrové UHMWPE částice. Jejich relativní počty v jednotlivých zónách byly určeny metodou LSc (graf 2a) a jejich absolutní počty modifikovanou metodou LScm (graf 2b). Grafy 2a a 2b jsou prakticky totožné, pouze u grafu 2a jsou čísla na ose y v relativní a u grafu 2b v absolutní škále. Jinak řečeno, na základě grafu 2a lze pouze říci, kolikrát více či méně částic bylo v jedné zóně než v jiné, zatímco z grafu 2b lze navíc na ose y odečíst i počet částic v jednotlivých zónách. Rozdíl mezi

grafy 1 a 2 spočívá v tom, že graf 1 ukazuje distribuce velikostí částic v *jednom* vzorku, zatímco graf 2 ukazuje celková množství částic vypočtená z těchto distribucí pro *všechny* vzorky.

V zóně III byly opakovaně nalézány vysoké počty částic. Jelikož čísla na ose y mají na grafu 2a pouze relativní povahu, byly výsledky naškálovány na hodnotu 1000. Čísla na ose y u grafu 2b jsou absolutní, uvedená v exponenciální notaci, tj.  $2,0E+10 = 2 \times 10^{10} = 20\,000\,000\,000 = 20$  miliard částic. Jednoduchým výpočtem se lze přesvědčit, že toto ohromné množství polyetylenových částic s velikostmi pod 1 m váží jen pár desetin až setin miligramu, a tudíž nelze částice přesně zvážit ani na analytických váhách.

## DISKUSE

Vzhledem k mimořádnému klinickému významu, je patofyziologie aseptického uvolnění implantátů jedním z nosných témat výzkumů v oblasti umělých kloubních náhrad. V této souvislosti je velmi často citována práce Schmalzrieda (23), který provedl rozbor tkání z okolí uvolněných endoprotéz. Ve své práci poukázal na klíčovou úlohu submikronových částic polyetylenu při rozvoji polyetylenové choroby.

Hledání spolehlivé fungující metody, která by byla dostatečně přesná, eliminovala by zkreslení, plynoucí z koacervace částic, byla by relativně rychlá a levná, zůstává předmětem úsilí vědeckých týmů, navázaných na klinickou bázi. Stručný přehled dosud publikovaných metod spolu s jejich výhodami a nevýhodami je uveden v úvodu této práce. Největší popularitě se těší metody založené na vážení izolovaných částic, zachycených v suchém stavu na membránách, ačkoli jsou značně nepřesné díky zanedbatelně malým hmotnostem izolovaných polyetylenových částic. My jsme vyvinuli vlastní metodu LSc, která ke kvantifikaci využívá jiné vlastnosti částic než je hmotnost, a to jejich schopnosti rozptylovat světlo. Pokud provedeme rozptylový expe-



riment a přidáme známé množství kalibračních částic, můžeme počet otěrových částic určit nepřímo výpočtem, ale paradoxně mnohem přesněji, než bychom to dokázali jejich přímým vážením. Jinak řečeno, i nevážitelné množství částic rozptyluje světlo, a tudíž nelze jejich počet zjistit vážením, ale lze jej alespoň odhadnout z metody LSc.

*Relativní počty částic* v naší studii byly určeny metodou LSc. Bylo prokázáno, že velikosti částic z metody LSc, které se pohybují kolem 0,1 mikrometru, přibližně odpovídají tomu, co je publikováno v naší i zahraniční literatuře (2,11). Nejdůležitějším zjištěním však byla skutečnost, že distribuce počtů částic v jednotlivých zónách kolem TEP je značně nerovnoměrná (graf 2). Největší množství částic bylo opakovaně nacházeno v zóně III. U všech šesti pacientů, u nichž se podařilo odebrat částice ze zóny III, bylo množství částic v této zóně buď nejvyšší (u pěti pacientů) nebo alespoň velmi vysoké ve srovnání se všemi ostatními odebranými zónami. U jednoho pacienta bylo nejvyšší množství částic v zóně 7, která se zónou III sousedí.

*Absolutní počty částic* byly určeny metodou LScm, která je v zásadě pouhou modifikací metody LSc. Ukázalo se, že počty částic se pohybují řádově kolem  $10^{10}$  na jeden gram suché tkáně což lze považovat za číslo víceméně se shodující s literaturou (17). Zde stojí za zmínku, že každá metoda určí množství částic s jistou chybou. Původ chyby tkví už v odběru vzorků – nelze předpokládat, že se operatérovi podaří odebrat vzorek vždy přesně stejným způsobem, ani že ve vzorku budou obsaženy zcela všechny otěrové částice. Další chyby nutně vzniknou při izolaci částic z tkání, protože ani žádná izolační technika není stoprocentně spolehlivá. Chyby vzniknou i při přepočtu jednotlivých čísel na nějakou měřitelnou veličinu, např. na gram suché tkáně – přepočet bude silně ovlivněn druhem tkáně a není třeba podotýkat, že každá poškozená tkáň se trochu liší obsahem vody, úlomků kostí atd. Nakonec se chyba ještě dále zvýší o nepřesnosti dané metodou samotnou, v tomto případě rozptylem světla. Význam ani přesnost absolutních čísel proto nelze přeceňovat.

### Klady a zápory metody LSc

Mezi důležité přednosti metody LSc patří:

- menší náročnost na čistotu vzorků (ve vodě rozpustné nečistoty nejsou na překážku),
- rychlost, která zvláště vynikne při srovnání s metodami založenými na statistickém vyhodnocení mikrofotografií,
- nízká mez detekce (tj. možnost detekovat nevážitelná množství otěrových částic).

*Správnost a přesnost metody LSc.* Správnost prokázána sérií měření na modelových vzorcích: se zvyšující se koncentrací otěrových částic rostl přímo úměrně i naměřený signál. Dalším potvrzením správnosti je tato práce, v níž byly počty částic určeny metodou LSc, přičemž největší množství částic korelovalo s peroperačními nálezy. Pokud jde o přesnost, bylo odhadnuto, že chyba u naměřených hodnot nepřesahuje 15 %, což lze považovat za přijatelné číslo (25).

*Omezení metody LSc* spočívá ve dvou skutečnostech:

- rozptyl světla silně nadhodnocuje velké částice – intenzita signálu je úměrná  $d^6$ , kde  $d$  je průměr částice. To může vést k tomu, že signál příslušející malým částicím může zaniknout v šumu,
- výsledky mohou být zkresleny aglomerací, což plyne z předchozího bodu: pokud dvě částice vytvoří aglomerát o dvojnásobné velikosti, rozptyluje tento světlo mnohem více než ony dvě částice jednotlivě. Pokud k aglomeraci dochází ve větším rozsahu, mohou být výsledky znehodnoceny. Z větší části ji lze bránit přidáním surfaktantu do zkoumaného roztoku.

Výše zmíněné nevýhody metody LSc nás vedly k vývoji dalších nových metod, které mají obdobný princip, ale pravděpodobně vyšší spolehlivost a přesnost. Tyto metody budou publikovány.

### Rozbor výsledků a výstupy pro klinickou praxi

Požadavkem klinické praxe je možnost objektivního hodnocení strukturálních změn a průběhu opotřebení kloubních náhrad. Pravdivé informace lze získat prakticky pouze vědeckou analýzou explantovaných komponent (8) a vzorků okolních tkání.

Odebrané tkáně musí mít vzhled typického polyetylenového granulomu. Jedině tak lze alespoň částečně eliminovat chybu, plynoucí z odběru nehomogenních vzorků. Proto je vhodné, aby odběry prováděla pouze omezená skupina operatérů.

Při analýze tkání je nutno použít metod, které jsou dostatečně přesné a přitom rychlé – jediné tak lze statisticky hodnotit větší množství vzorků. Z tohoto pohledu je vyvinutá metoda mimořádně cenná.

Námi zjištěná nerovnoměrnost distribuce částic v okolí TEP doplňuje a zpřesňuje některé údaje v zahraniční literatuře (5, 11) a současně je v souladu s našimi předpoklady a klinickými nálezy. Absolutní počet částic při měření metodou LScm v granulomu dosahuje  $10^{10}$  na jeden gram suché tkáně. Dalším zajímavým nálezem je průkaz nejvyšší koncentrace kritických částic právě v okolí distálního pólu jamky – v zóně III, kde rentgenologicky i peroperačně byly osteolýza i množství granulomu největší.

Jelikož tato studie sloužila spíše k vyvinutí metody měření, řada vzorků byla použita k dílčím pokusům. Ze stejného důvodu nebyl u prezentovaných šesti pacientů proveden systematický odběr ze všech dostupných zón.

Od roku 2004, kdy je metodika měření již vypracována, jsou zpracovávány vzorky granulomů z reimplantací TEP od dalších pacientů systematictěji, s důrazem na výskyt částic ve všech zónách v okolí implantátu a přesnější vyhodnocení jejich distribuce. Výsledky budou publikovány v nejbližší budoucnosti.

### ZÁVĚR

1. Autoři vyvinuli původní metodu pro určování počtů otěrových částic UHMWPE v tkáňových vzorcích. Metoda poskytla cenné výsledky a stala se prvním krokem ve vývoji dalších a spolehlivějších metod

- založených na obdobném principu, které budou popsány v nejbližší budoucnosti.
2. V studovaných periprotetických tkáních byly detekovány částice velikosti kolem 1  $\mu\text{m}$ , jejichž počty (kolem  $10^{10}$  na 1 g suché tkáně) jsou ve shodě s literaturou.
  3. Bylo zjištěno, že distribuce počtů částic kolem TEP je nerovnoměrná.
  4. Největší počty částic byly zjištěny v sousedících zónách III a 7.

### Literatura

1. AMSTUTZ, H. C., SMITH, R.K.: Total hip replacement following failed femoral hemiarthroplasty. *J. Bone Jt Surg.*, 61-A:1161–6, 1979.
2. BELL, J., TIPPER, J. L., INGHAM, E., STONE, M. H., WROBLEWSKI, B. M., FISHER, J.: Quantitative analysis of UHMWPE wear debris isolated from the periprosthetic femoral tissues from a series of Charnley total hip arthroplasties. *Biomed. Mater. Eng.*, 12:189–201, 2002.
3. BESONG, A. A., TIPPER, J. L., INGHAM, E., STONE, M. H., WROBLEWSKI, B. M., FISHER, J.: Quantitative comparison of wear debris from UHMWPE that has and has not been sterilised by gamma irradiation. *J. Bone Jt Surg.*, 80-B:340–344, 1998.
4. CAMPBELL, P., MA, S., YEOM, B., McKELLOP, H., SCHMALZRIED, T. P., AMSTUTZ, H. C.: Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29:127–31, 1995.
5. ELFICK, A. P., GREEN, S. M., McCASKIE, A. W., BIRCH, M. A.: The nature and dissemination of UHMWPE wear debris retrieved from periprosthetic tissue of THR. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 65-A: 95–108, 2003.
6. GALLO, J., KAMÍNEK, P., TICHÁ, V., ŘIHÁKOVÁ, P., DITMAR, R.: Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: A review. *Biomed. Papers*, 146: 21–28, 2002.
7. GALLO, J., KAMÍNEK, P., ZAPLETALOVÁ, J., NOVOTNÝ, R., ČECHOVÁ, I., DITMAR, R.: Předčasné selhání polyetylenové vložky u TEP kyčelního kloubu ABG I. *Acta Chir.orthop.Traum.čech.*, 70: 343–349, 2003.
8. GALLO, J., HAVRÁNEK, V., ZAPLETALOVÁ, J., MANDAT, D.: Measurement of acetabular polyethylene wear, using a universal measuring microscope, in total hip replacement intra- and inter-observer measurement variability. *Acta Chir.orthop.Traum.čech.*, 73:28–33, 2006.
9. GLANT, T. T., JACOBS, J. J., BOLNAR, G., SHANBHAG, A. S., VALYON, M., GALANTE, J. O.: Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J. Bone Miner. Res.*, 8:1071–9, 1993.
10. GRUEN, T. A., McNEICE, G. M., AMSTUTZ, H. C.: Modes of failure of cemented stem-type femoral components: a radiographic analysis of loosening. *Clin. Orthop.*, 141:17, 1979.
11. KOSEKI, H., MATSUMOTO, T., ITO, S., DOUKAWA, H., ENOMOTO, H., SHINDO, H.: Analysis of polyethylene particles isolated from periprosthetic tissue of loosened hip arthroplasty and comparison with radiographic appearance. *J. Orthop. Sci.*, 10:284–290, 2005.
12. KURTZ, S. M., MURATOGLU, O. K., GSELL, R., GREER, K., SHEN, F. W., COOPER, C., BUCHANAN, F. J., SPIEGELBERG, S., YAU, S. S., EDIDIN, A. A.: Interlaboratory validation of oxidation-index measurement methods for UHMWPE after long-term shelf aging. *J. Biomed. Mater. Res.*, 63:15–23, 2002.
13. LIVERMORE, J., ILSTRUP, D., MORREY, B.: Effect of femoral-head size on wear of the polyethylene acetabular component. *J. Bone Jt Surg.*, 72-A:518–528, 1990.
14. MALONEY, W. J., SMITH, R. I., SCHMALZRIED, T. P., CHIBA, J., HUENE, D., RUBASH, H.: Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J. Bone Jt Surg.*, 77-A:1301–1310, 1995.
15. MARGEVICIUS, K. J., BAUER, T. W., McMAHON, J. T., BROWN, S. A., MERRITT, K.: Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J. Bone Jt Surg.*, 76-A:1664–1675, 1994.
16. McKELLOP, H. A., CAMPBELL, P., PARK, S. H., SCHMALZRIED, T. P., GRIGORIS, P., AMSTUTZ, H. C.: The origin of submicron polyethylene wear debris in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop.*, 311:3–20, 1995.
17. McNIE, C. M., BARTON, D. C., INGHAM, E., TIPPER, J. L., FISHER, J., STONE, M. H.: The prediction of polyethylene wear rate and debris morphology produced by microscopic asperities on femoral heads. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 11:163–174, 2000.
18. MERKEL, K. D., ERDMANN, J. M., McHUGH, K. P., ABU-AMER, Y., ROSS, F. P., TEITELBAUM, S. L.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates orthopedic implant osteolysis. *Amer. J. Pathol.*, 154:203–10, 1999.
19. MURRAY, D. W., RUSHTON, N.: Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J. Bone Jt Surg.*, 72-B:988–92, 1990.
20. PETERS, P. C. Jr., ENGH, G. A., DWYER, K. A., VINH, T. N.: Osteolysis after total knee arthroplasty without cement. *J. Bone Jt Surg.*, 74-A:864–76, 1992.
21. RADER, C. P., STERNER, T., JAKOB, F., SCHUTZE, N., EULERT, J.: Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J. Arthroplasty*, 14:840–8, 1999.
22. SHANBHAG, A. S., JACOBS, J. J., GLANT, T. T., GILBERT, J. L., BLACK, J., GALANTE, J. O.: Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J. Bone Jt Surg.*, 76-B:60–7, 1994.
23. SCHMALZRIED, T. P., JASTY, M., HARRIS, W. H.: Periprosthetic Bone Loss in Total Hip Arthroplasty. Polyethylene Wear Debris and the Concept of the Effective Joint Space. *J. Bone Jt Surg.*, 74-A: 849–63, 1992.
24. SOSNA, A., RADONSKÝ, T., POKORNÝ, D., VEIGL, D., HORÁK, Z., JAHODA, D.: Polyetylenová choroba. *Acta Chir. ortop. Traumat. čech.*, 70:6–16, 2003.
25. ŠLOUF, M., ŠLOUFOVÁ, I., HORÁK, Z., ŠTĚPÁNEK, P., ENTLICHER, G., KREJČÍK, M., RADONSKÝ, T., POKORNÝ, D., SOSNA, A.: New fast method for determination of number of UHMWPE wear particles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15:1–12, 2004.
26. TIPPER, J. L., INGHAM, E., HAILEY, J. L., BESONG, A. A., FISHER, J., WROBLEWSKI, B. M., STONE, M. H.: Quantitative analysis of polyethylene wear debris, wear rate and head damage in retrieved Charnley hip prostheses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 11:117–124, 1999.
27. VORONOV, I., SANTERRE, J. P., HINEK, A., CALLAHAN, J. W., SANDHU, J., BOYNTON, E. L.: Macrophage phagocytosis of polyethylene particulate in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39:40–51, 1998.

As. MUDr. David Pokorný, CSc.,  
I. ortopedická klinika I. LF UK, FN Motol,  
V Úvalu 84,  
150 00 Praha 5  
E-mail: david.pokorny@lf1.cuni.cz

Práce byla přijata 2. 5. 2006.  
Barevná dokumentace byla dotována.