

Nová metoda kvantifikace otěrových částic UHMWPE v okolí kloubních náhrad

New Metod for Quantification of UHMWPE Wear Particles around Joint Replacements

D. POKORNÝ¹, M. ŠLOUF², J. DYBAL², E. ZOLOTAREVOVÁ³, F. VESELÝ¹, D. JAHODA¹,
P. VAVŘÍK¹, I. LANDOR¹, G. ENTLICHER³, A. SOSNA¹

¹ I. ortopedická klinika 1. LF UK, Praha, FN Motol, Praha

² Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha

³ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Počet autorů byl redakcí akceptován.

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

The orthopaedic community has unanimously adopted the view that ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear particles are a very frequent cause of aseptic implant loosening. Some studies have tried to provide objective evidence for this. We have found descriptions of particle distribution or morphology, but no report that would objectively correlate the number of particles in zones surrounding an implant with the extent of damage to these zones. The aim of this study was to develop a method allowing us to evaluate a number of samples with polyethylene abrasive wear large enough to find association between the extent of damage around a THA and the number of biologically active UHMWPE wear particles, 0.1 to 10 µm in size.

MATERIAL AND METHODS

In 28 patients undergoing revision total hip arthroplasty (THA) at the 1st Orthopaedic Clinic, 1st Faculty of Medicine, Charles University, we took samples of typical osteoaggressive granuloma from defined zones around the implant; the zones corresponded to those described by Gruen and DeLee. The extent of tissue damage in each zone was evaluated on the basis of pre-operative radiographs and by the extent of osteolysis and damage to soft tissues actually observed during revision THA. The volume of wear particles in each zone was assessed by the IRc method developed by us; this is based on a quantitative evaluation of infrared spectra. To verify the methodology, a comparison between tissue damage and the number of particles in each zone was made in three randomly selected patients.

RESULTS

We introduced a method of detailed orthopaedic evaluation which enabled us to categorize zones around a revised THA according to the extent of damaged tissue. As a result, a series of zones ranked by the extent of damaged tissue, or an „orthopaedist's statement“ (OS), was obtained. At the same time we adopted a method, based on infrared spectroscopy and termed IRc, by which the number of particles in the samples of damaged tissues and osteoaggressive granulomas collected from the area around a revised THA was determined. The results of evaluation were presented as numerical data that, in a defined way, were converted into a series of zones ranked according to the number of wear particles, i.e., the „result of measurement“ (RM). In this study we verified the methods described above and made a comparison of OSs and RMs for three randomly selected patients. The very good agreement found confirmed the reliability of both methods which will soon be used to evaluate a group of patients large enough to provide statistically significant results.

DISCUSSION

The IRc method determines a total volume of UHMWPE wear particles, 0.1 to 10 µm in size, which are generally considered to be most biologically active. This study suggests that the distribution of particles around a THA is uneven and that relation between tissue damage and the number of wear particles in individual zones surrounding a THA does exist. The major conclusion from the orthopaedic point of view is a confirmation of the assumption that UHMWPE wear particles are one of the chief causes of THA failure. Although this fact is generally accepted, studies correlating the number of particles with tissue damage and osteolysis in individual zones are very scarce.

CONCLUSIONS

The quick and simple IRc method offers a possibility to quantify polyethylene wear particles in soft tissues. The number of 0.1 to 10 µm wear polyethylene particles correlated with pre-operative radiographic findings and orthopaedic evaluation of revision THAs in three randomly selected patients. The confirmed correlation between the extent of tissue damage in individual zones surrounding a THA and the volume of wear particles detected in these zones supports the view that UHMWPE wear particles are one of the main causes of THA failure.

Key words: ultra high-molecular weight polyethylene, total hip arthroplasty, wear, tribology, infrared spectroscopy.

ÚVOD

Předpoklad, že otěrové částice ultravysokomolekulárního polyetylenu (Ultra High Molecular Weight Polyethylene = UHMWPE) jsou jednou z hlavních příčin selhání kloubních náhrad, je již značnou dobu všeobecně přijímán (4, 5, 8, 9, 11, 18, 19). Pro zmíněný předpoklad svědčí minimálně tři experimentálně doložitelné skutečnosti:

1. U kloubních náhrad s UHMWPE artikulačními vložkami, které vykazovaly velký úbytek objemu v důsledku otěru, byla pozorována nižší životnost.
2. V poškozených tkáních z okolí TEP byly prokázány mikroskopické otěrové částice UHMWPE.
3. U otěrových částic UHMWPE byla prokázána biologická aktivita vedoucí mimo jiné ke složitým zánětlivým reakcím a vzniku osteoagresivních granulomů.

Pro výše uvedená tvrzení lze nalézt řadu důkazů (3). Avšak navzdory prokázanému negativnímu vlivu otěru na životnost kloubních náhrad se, přinejmenším podle dostupné literatury (14, 15, 16), dosud nepodařilo přímo jednoznačně prokázat souvislost mezi poškozením tkání a množstvím částic v jednotlivých zónách v okolí TEP. Problematikou rozložení otěrových částic v různých zónách kolem TEP se totiž věnovalo překvapivě málo prací. Řada studií byla zaměřena na **určování velikostí** otěrových částic v různých zónách, ale podstatně méně autorů se zabývalo **určováním množství** otěrových částic. Možným důvodem je skutečnost, že přesné určení množství otěrových částic je mnohem náročnější úkol než určení velikostí a tvarů otěrových částic. Ve zkratce je možno konstatovat, že ke studiu velikostí částic stačí izolovat jakékoli množství částic, zatímco ke studiu množství částic je třeba vyvinout přesné izolační a kvantifikační techniky, které poskytují spolehlivé a reprodukovatelné výsledky, jak je podrobněji rozvedeno a zdůvodněno v našich předchozích studiích (12, 14, 15, 16).

Pokud jde o studium velikostí částic, bylo prokázáno, že velikosti otěrových částic se pohybují ve velmi širokém rozmezí. Největší částice mohou mít více než 100 μm (1), početně nejvíce je však částic s velikostmi pod 1 μm (10, 20). Nedávné práce dokonce ukázaly, že se vyskytují i tzv. nanočástice s velikostmi pod 0,05 μm (10, 13), což je méně než běžná velikost pórů na membránách používaných při izolaci částic. Nicméně většina autorů se shodla na tom, že biologicky neaktivnější částice (neboli částice způsobující nejsilnější zánětlivé reakce v okolí TEP) mají rozměry 0,1–10 μm (6); proto i v této studii byly izolovány a kvantifikovány částice v uvedeném rozsahu velikostí.

Pokud jde o studium množství částic v jednotlivých zónách kolem TEP, v jedné z nemnoha prací ostatních autorů se vyskytuje domněnka, že množství částic ve všech zónách je přibližně stejné (2). Cílem této práce je naopak prokázat náš předpoklad, založený na rozsáhlé ortopedické zkušenosti, který lze shrnout do dvou bodů:

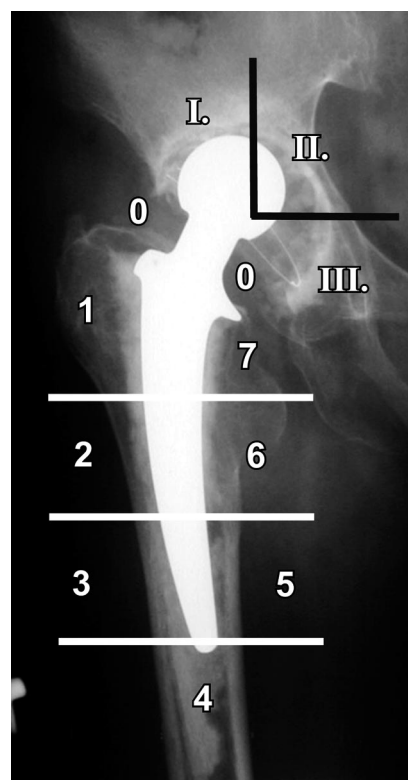
- a) rozložení otěrových částic v jednotlivých zónách v okolí TEP je velmi nerovnoměrné a
- b) množství částic v jednotlivých zónách odpovídá rozsahu kostní destrukce v těchto zónách.

MATERIÁL A METODA

Odběr vzorků polyetylenového granulomu

V rámci zkoušek metody jsme odebrali vzorky typického polyetylenového granulomu při 28 operacích pacientů, u kterých došlo k aseptickému uvolnění komponent TEP kyčelního kloubu. Většina vzorků v této sérii byla použita k ověření jednotlivých kroků, potřebných k izolaci částic UHMWPE- chemická destrukce biologické tkáně, filtrace a měřicí metody.

Pravdivost výroku celé metodiky detekce jsme se rozhodli ověřit u vybraných 3 pacientů s dokonale vedenou anamnézou, s typickým nálezem aseptického uvolnění. Zaznamenán byl předoperační rtg snímek. Při operacích, které prováděl pouze poslední z autorů pro zajištění homogenity odběru, byl odebírán osteoagresivní granulom typického vzhledu ze zón přilehlých k implantátu. Tyto zóny pro snadnou reprodukovatelnost byly rozděleny a očíslovány dle dělení zón na rtg obrazu podle Gruena a DeLee (obr. 1) (7, 12). Ze zón I, II, III, 1, 4 a 7 bylo získáno vždy více než 0,3 g tkáně typického granulomu, pokud možno bez příměsi kostní drtě či fragmentů cementu. Do operační vložky byl podrobně



Obr. 1. Použité rozdělení zón v okolí TEP

zaznamenán nález, zejména rozsah osteolýzy v jednotlivých uvedených zónách. Odebrané vzorky osteoagresivního granulomu byly zmrazeny a předány k izolacím a kvantitativním analýzám UHMWPE částic, jak je popsáno dále.

Ortopedické vyhodnocení poškození tkání

Bezprostředně po reoperaci proběhlo ortopedické vyhodnocení poškození tkání v okolí TEP. Prvním sítím prošli pouze pacienti, u nichž byly odebrány všechny zóny obsahující granulom. Objem granulomu v neodebraných zónách bylo možno považovat za zanedbatelný. Ve druhém kroku proběhlo vlastní vyhodnocení na základě tří pozorovaných skutečností:

- a) rozsahu osteolýzy na předoperačním rtg,
- b) rozsahu osteolýzy pozorovaném při reoperaci a
- c) množství typického granulomu v jednotlivých zónách.

Na základě bodů a), b), c) byl získán co možná nejobjektivnější slovní popis rozsahu poškození tkání v okolí TEP. Získaný slovní popis byl dále převeden na semikvantitativní úroveň tak, že byly zóny uspořádány do řady počínaje zónou s největším rozsahem poškození. V následujícím textu nazýváme slovní popis rozsahu poškození **komplexní ortopedické vyhodnocení** a uspořádanou řadu zón nazýváme „**výrok ortopeda**“ (VO).

Vztah mezi **komplexním ortopedickým vyhodnocením** a finálním **výrokem ortopeda** ukážeme nejlépe na příkladu. Zde je nutno zdůraznit, že jde o příklad čistě fiktivní (skutečné případy z ortopedické praxe jsou uvedeny v části Výsledky), sloužící jen k dokumentaci, jakým způsobem vytvoříme ze slovního popisu ortopeda uspořádanou řadu zón. Mějme tedy *fiktivního pacienta X* po operaci TEP a předpokládejme, že **komplexní ortopedické vyhodnocení** (na základě výše uvedených bodů a-c) znělo ve zkratce následovně: nejvyšší poškození v zóně III, o něco menší v zóně II, zhruba stejné v zóně I a mnohem menší poškození v zóně 7. Pak bychom zapsali finální **výrok ortopeda** v této formě: [III > II = I >> 7]. Z příkladu plyne, že relace >> značí mnohem vyšší poškození, relace > označuje vyšší poškození a relace = indikuje zhruba stejný rozsah poškození v daných zónách.

Izolace otěrových částic UHMWPE pomocí kyselé hydrolýzy

Čištění chemikálií: destilovaná voda a isopropylalkohol (iPrOH) byly před použitím postupně přefiltrovány přes 10 µm a 0,1 µm membránu z polykarbonátu (PC), komerční název Isopore (Millipore, Ireland). Agresivnější chemikálie, jako 65% HNO₃ a 12 mol/l KOH byly postupně přefiltrovány přes 10 µm a 0,1 µm membrány z teflonu (PTFE), komerční název Omnipore (Millipore, Ireland).

Delipidace vzorků: ze zmraženého a lyofilizovaného vzorku poškozené tkáně byla odebrána reprezentativní část o hmotnosti 0,3 g, rozkrájena na malé kousky a dvakrát extrahována směsí chloroform/methanol (10 ml; 2:1, v/v; 12 hodin). Rozpouštědla byla dekantována. Po obou dekantacích byly vzorky vysušeny proudem filtrovaného vzduchu a následně sušeny při 60° C po dobu 2 h.

Kyselá hydrolýza: delipidované vzorky z předchozího kroku byly hydrolýzovány pomocí 5 ml 65% HNO₃ po dobu 24 h za laboratorní teploty a občasného protře-

pání. Pro další izolace byla pak použita jen horní dvoumililitrová vrstva. Spodní vrstva roztoku byla odstraněna odsátím a dále nepoužívána. Horní dvoumililitrová vrstva byla dvakrát promyta 5 ml 65% HNO₃ a pětkrát 8 ml destilované vody. Před každým oddělením horní vrstvy byl vzorek protřepán na vortexu a centrifugován (500x g, 2 min). Během třetího promývání vodou byl vzorek neutralizován 0,2 ml 12 mol/l KOH. Výsledné 2 ml vzorku byly použity pro finální separaci částic filtrací na membránách.

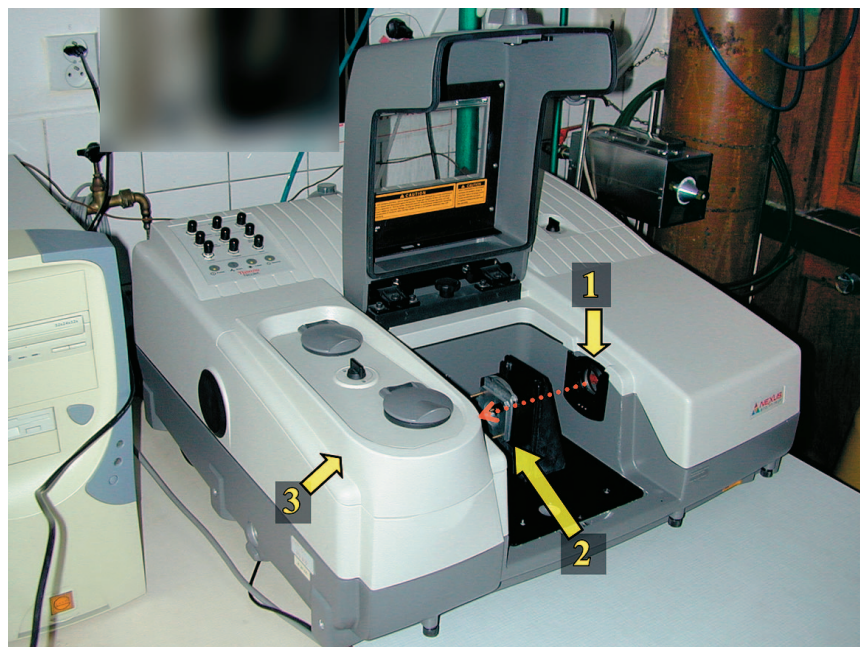
Separace otěrových částic filtrací: 2 ml vzorku z kyselé hydrolýzy byly smíchány se 2 ml iPrOH a přefiltrovány přes 10-um polykarbonátovou (PC) membránu Isopore (Millipore, Ireland) do kalibrované polypropylenové zkumavky. Membrána byla promyta 1 ml iPrOH a filtrát doplněn na 6 ml isopropanolem. Po promíchání filtrátu bylo 4,5 ml suspenze filtrováno přes 0,1 µm PC membránu Isopore. Membrána bylo promyta 1 ml iPrOH a po vysušení byla použita pro kvantifikaci zachycených otěrových částic infračervenou spektroskopií (metody IRc a SEMq- 10,11). Další 0,2 ml suspenze byly filtrovány přes 0,1 µm PC membránu Isopore. Membrána byla promyta 0,5 ml iPrOH; takto připravenou membránu s malou koncentrací otěrových částic lze použít k analýze velikostí a tvarů jednotlivých částic pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (metoda MORF- 15,16). Analýza pomocí metody MORF nicméně nebyla do této práce zahrnuta.

Kvantifikace otěrových částic UHMWPE pomocí metody IRc

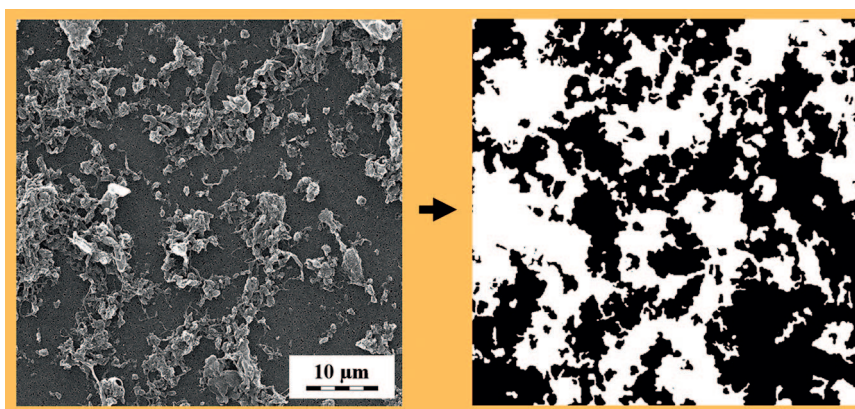
Kontrola čistoty izolovaných PE částic: výsledkem izolace PE částic z poškozených tkání v okolí TEP byly PE částice na PC membránách. Čistota těchto částic byla prověřena pomocí metod rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), energiově-disperzní analýzy paprsků X (EDS) a infračervené spektroskopie (IR). Vstupem pro metody SEM, EDS a IR byly právě PC membrány pokryté izolovanými PE částicemi. SEM mikroskopie membrán prokázala, že částice mají obvyklé tvary a velikosti, EDS mikroanalýza dokázala, že vzorky neobsahují žádné větší nečistoty a IR analýza ukázala, že spektra obsahují pouze píky PE a PC. Všechny tři metody tudíž prokázaly, že námi používaná izolační metoda poskytuje čisté PE částice na PC membránách.

Kvantifikace izolovaných částic pomocí metody IRc: metoda IRc byla podrobně popsána v naší nedávné práci (16), zde tudíž pouze stručně nastíníme princip. Metoda je založena na infračervené spektroskopii (IR; viz též obrázek 2) a vychází ze čtyř skutečností:

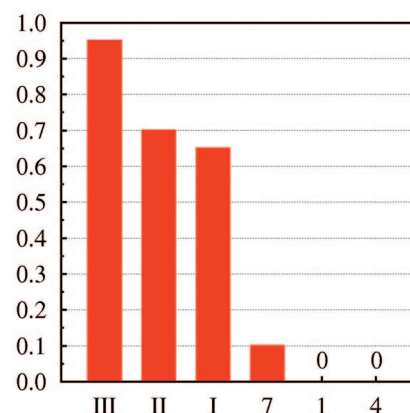
1. Všechny izolace PE částic jsou prováděny stejným způsobem.
2. Při všech izolacích se PE částice zachytávají na stejných PC membránách.
3. V IR spektru PC membrány s PE částicemi se píky PC a PE navzájem nepřekrývají.
4. Výsledné IRc spektrum PC membrány pokryté PE částicemi vykazuje píky příslušející PE, které jsou tím větší, čím větší množství částic je na membráně; plo-



Obr. 2. Přístroj pro měření IRC;
1 – zdroj IR paprsku pro měření; 2 – vzorek = tenká PC membrána, na níž jsou zachycené mikroskopické částice UHMWPE; 3 – detektor záření; červená šipka znázorňuje IR paprsky



Obr. 3. Ilustrace vyhodnocení částic metodou SEMq: vlevo mikrofotografie ze SEM mikroskopu, vpravo binární obraz získaný metodou SEMq – čím větší je bílá plocha, tím více je otěrových částic ve vzorku



Obr. 4. Příklad grafu, získaného měřením metodou IRC – fiktivní výsledek pro prezentaci metody

cha píku PE je tudíž úměrná celkovému objemu částic ve vzorku.

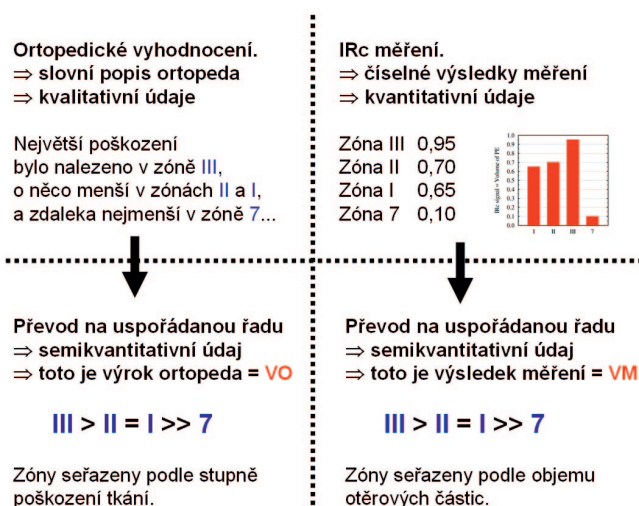
Stručně řečeno, změříme-li IR spektrum čisté PC membrány a následně IR spektrum PC membrány pokryté PE částicemi, můžeme obě spektra navzájem překrýt a odečíst, přičemž na rozdílovém spektru nalezneme pouze píky příslušející PE, jejichž plocha je úměrná objemu izolovaných částic ve vzorku. Za předpokladu stejné velikosti částic ve všech zónách, což je v rámci jednoho pacienta předpoklad poměrně rozumný, je naměřená hodnota úměrná počtu částic v dané zóně. Metoda IRC tedy využívá PC membránu jako kalibrační standard, a proto také byla nazvána IRC (zkratka z IR + calibration); (viz též 15).

Kontrolní kvantifikace izolovaných částic pomocí metody SEMq: náhodně vybrané vzorky byly analyzovány nejen metodou IRC, ale názornější metodou

SEMq (obr. 3), rovněž popsanou v jedné z našich předchozích prací (14). Metoda je založena na rastrovací elektronové mikroskopii (SEM) a vychází ze čtyř skutečností:

1. Všechny izolace PE částic jsou prováděny stejným způsobem.
2. Při všech izolacích se PE částice zachytávají na stejných PC membránách.
3. PE částice na PC membráně se zobrazí pomocí SEM mikroskopie.
4. Na SEM mikrofotografiích PC membrány s izolovanými PE částicemi určíme pomocí obrazové analýzy plochu pokrytou PE částicemi; tato plocha je za daných okolností úměrná celkovému objemu částic ve vzorku.

Metoda IRC je velmi rychlá a hodí se ke zpracování velkých množství vzorků, zatímco metoda SEMq je časově náročnější, ale poskytuje přímou, vizuální, nezá-



Obr. 5. Převod výsledků na uspořádanou řadu výroku ortopeda a výroku měření

vislou kontrolu. Skutečnost, že počty částic určené dvěma nezávislými metodami, SEMq a IRc, spolu velmi dobře korelovaly, potvrdila správnost obou metod současně (15). Jakmile by totiž jedna z obou metod byla nespolehlivá a poskytovala náhodné výsledky, žádná korelace by nemohla existovat.

Finální výsledek metody IRc: Přímým výsledkem metody IRc pro danou TEP je sloupcový graf, udávající celkové objemy otěrových částic UHMWPE s rozměry 0,1–10 µm v jednotlivých zónách. Modelový graf fiktivního pacienta X je ukázán na obrázku 4 a jednotlivé sloupce grafu lze považovat za objemy částic v jednotlivých zónách v relativní škále. V případě našeho modelového grafu to znamená, že poměry objemů částic v zónách III, II, I, 7 (označení zón viz obrázek 1) by byly 95 : 70 : 65 : 10.

Relativní objemy částic lze za jistých okolností převést na absolutní objemy částic nebo dokonce počty částic – viz naše předchozí studie (15). Pro hlavní cíl této práce – srovnání rozsahu poškození tkání v jednotlivých zónách s množstvím částic v těchto zónách – to nicméně není podstatné. Mnohem podstatnější je převést číselné hodnoty z grafu tak, aby mohly být srovnány s ortopedickým vyhodnocením, neboli „výrokem ortopeda“ (VO), jak bylo popsáno výše. Hodnoty z grafu byly tudíž převedeny na uspořádanou řadu zón seřazenou od zóny s nejvyšším objemem otěrových částic k zóně s nejnižším počtem otěrových částic. Takto uspořádaná řada zón je dále nazývána „výsledek měření“ (VM).

Převod grafu na uspořádanou řadu zón se řídí jednoduchými pravidly:

1. Uspořádáme zóny do řady, počínaje zónou s nejvyšším objemem částic.
2. Mezi sousední zóny lišící se o více než dvojnásobek vkládáme znaménko >>.
3. Mezi zóny lišící se o méně než dvojnásobek a více než 1/10 vkládáme znaménko >.

4. Pokud se hodnoty v sousedních zónách liší o méně než 1/10, vkládá se znaménko =.

Nejlépe je vše patrné z příkladu: Mějme fiktivního pacienta X, u kterého jsme dostali graf z metody IRc ukázaný na obrázku 4. Na základě obrázku 4 bychom dostali následující uspořádanou řadu zón = výsledek měření = VM: [III > II = I >> 7]. Výsledek v hranatých závorkách tedy říká: pacient X měl v zóně III největší množství částic, v zónách II a I bylo částic o něco méně, zatímco v zóně 7 je počet částic zdaleka nejmenší.

Srovnání ortopedického vyhodnocení a IRc výsledků

Ortopedické vyhodnocení rozsahu poškození tkání v jednotlivých zónách (neboli výrok ortopeda = VO; viz výše) je principiálně slovní, čili kvalitativní. Naopak IRc měření objemů částic v jednotlivých zónách (výsledky měření = VM; viz výše) poskytují čísla, čili kvalitativní výsledky. Kvůli snadnému srovnání byly tudíž VO i VM převedeny na společnou, semikvantitativní úroveň, neboli uspořádanou řadu zón, jak je podrobně popsáno výše u příslušných metodik.

Uspořádané řady zón pak bylo možno porovnat, jak je dokumentováno v této studii a schematicky naznačeno na obrázku 5. Další výhodou převodu na uspořádané řady zón je možnost definovaného statistického vyhodnocení v případě většího množství zpracovaných vzorků, jak bude demonstrováno v naší následující připravované studii.

VÝSLEDKY

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jestli množství otěrových částic PE v jednotlivých zónách v okolí TEP odpovídá poškození tkání v těchto zónách. Za tím účelem jsme provedli nezávislé ortopedické vyhodnocení rozsahu poškození tkání a měření objemů otěrových částic PE v jednotlivých zónách metodou IRc. Stojí za zdůraznění, že oba typy hodnocení byly zcela nezávislé, protože ortopedické vyhodnocení bylo prováděno na pracovišti prvního a posledního autora této práce (I. ortopedická klinika 1. LF UK) bezprostředně po operaci, zatímco IRc měření byla realizována paralelně na pracovišti druhého autora (ÚMCH AV ČR), přičemž pochopitelně pracovníci ÚMCH neměli přístup ke jménům pacientů, předoperačním rentgenovým snímkům, operačním vložkám a dalším důvěrným informacím.

Vzorky měřené metodou IRc byly označeny pouze pořadovými čísly, čímž byla zaručena maximální možná nezájatost pracovníků při měření IR spekter, která jsou beztak objektivní a nezávislá na obsluze. Srovnání výsledků pro tři dále uvedené, náhodně vybrané pacienty proběhlo až na společné schůzce řešitelů projektu z I. ortopedické kliniky a ÚMCH AV ČR. Jak je dále dokumentováno, toto srovnání dopadlo příznivě a korelace mezi množstvím částic a rozsahem poškození v zónách byla nalezena. Proto jsme v naší předchozí práci detailně popsali použitou metodiku (15) a pokračo-

vali statistickým vyhodnocováním všech dosud zpracovaných případů revize TEP.

Celkové srovnání výroků ortopedů (VO) a výsledků měření (VM) je ukázáno v tabulce 1. Převod ortopedického vyhodnocení na VO a IRc měření na VM je podrobně vysvětleno v experimentální části. Detailní komentář k jednotlivým pacientům je obsahem následujících odstavců.

Podrobnější popis pro pacienta 1 (první řádek tabulky 1). Předoperační rentgenový snímek a výsledky metody IRc jsou ukázány na obrázku 6.

Pacientka 11 let po TEP kyčelního kloubu Poldi, pro bolesti indikována revize, reimplantace. Při výkonu rozsáhlý granulom v zóně 7, menší množství v zóně III, minimální množství granulomu i v zóně I, II i v oblasti okolí krčku endoprotézy. Jinde granulom makroskopicky nepřítomen.

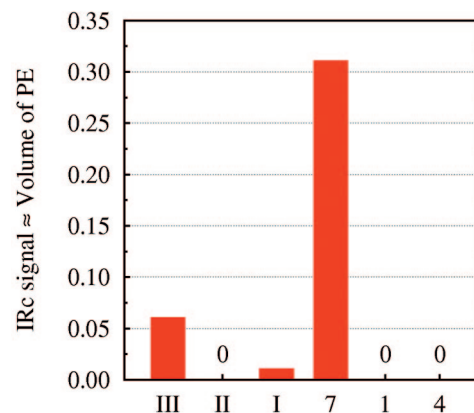
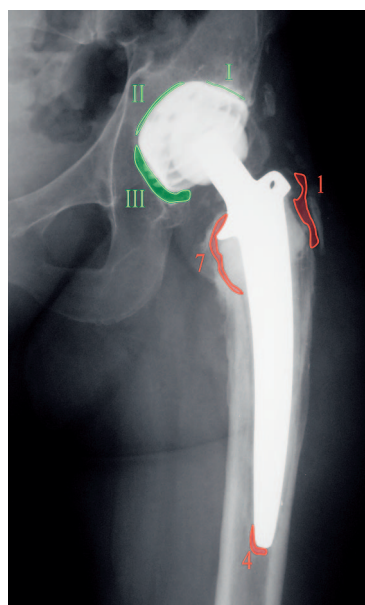
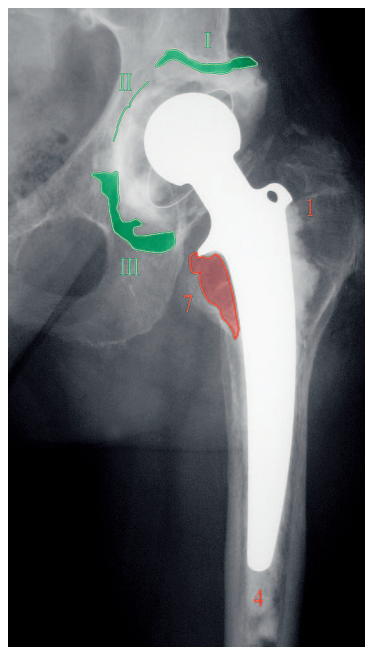
Výsledky metody IRc (obr.6) lze komentovat následovně: zdaleka nejvyšší množství PE částic bylo nalezeno v zóně 7, podstatně menší v zóně III a téměř zanedbatelné množství částic bylo v zóně I.

Souhrnné srovnání VO a VM je v prvním řádku tabulky T1. Lze konstatovat, že byla nalezena velmi dobrá shoda. Celkové pořadí zón je stejné. Dle VO byl nalezen poněkud nižší rozdíl mezi zónami 7 a III. Zóna II vykazovala tak malé množství poškozené tkáně, že ji nebylo možno spolehlivě odebrat a následně metodou IRc měřit, což je vcelku ve shodě s VO.

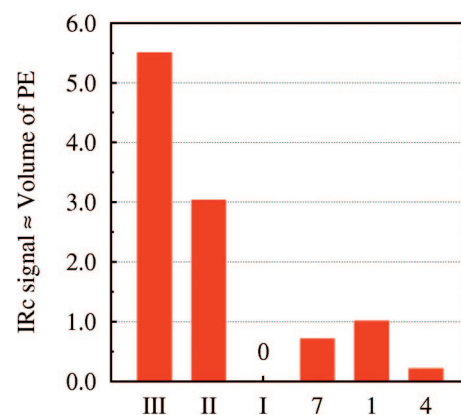
Podrobnější popis pro pacienta 2 (druhý řádek tabulky 1). Předoperační rentgenový snímek je ukázán na obrázku 7, výsledky metody IRc na obrázku rovněž.

Komplexní ortopedické vyhodnocení předoperačního rtg a rozsahu poškození zón pozorované při reoperaci TEP bylo následující:

Pacientka po konverzi artrodézy kyčelního kloubu na TEP. Pro uvolnění dříku po 5 letech reimplantace. Odebrán ale granulom v zóně III, kde jeho největší množ-



Obr. 6. Vlevo rtg pacienta 1, zeleně vyznačeny zóny v okolí jamky, červeně zóny v okolí dříku; vpravo graf získaný měřením metodou IRc



Obr. 7. Vlevo rtg pacienta 2, vpravo graf získaný měřením metodou IRc

Tab. 1. Výsledky u třech dokumentovaných pacientů

	Ortopedické vyhodnocení	Vyhodnocení měření
1.	7 > III >> II = I = 0	7 >> III >> II = I = 0
2.	III > II > I = 7 = 4	III > II > I >> 7 >> 4
3.	III = 0 = II = I >> I = 4 = 7	III > 0 > II > I

ství. V zóně II pod jamkou jen tenká vrstva granulomu, minimální množství v zóně 1, 7 a 4.

Výsledky metody IRc (obr. 7) lze komentovat následovně: Nejvyšší množství PE částic bylo nalezeno v acetabulárních zónách, a to v pořadí III > II. Množství částic ve femorálních zónách bylo podstatně menší: relativně nejvíce částic bylo v zóně 1, o něco méně v zóně 7 a v zóně 4 bylo množství částic velmi malé.

Souhrnné srovnání VO a VM je ve druhém řádku tabulky 1. Mezi ortopedickým vyhodnocením a IRc měřením byla zjištěna dobrá shoda. Obě nezávislé metodiky ukázaly nejvyšší poškození (dle VO) a současně nejvyšší množství částic (dle VM) v acetabulárních zónách III a II (v uvedeném pořadí). Na základě VO bylo dále možno konstatovat, že poškození ve femorálních zónách je menší a navzájem srovnatelné. Metoda IRc potvrdila ve všech acetabulárních zónách značné množ-

ství částic (nejvyšší hodnota IRc signálu ze všech tří zkoumaných pacientů), zatímco ve femorálních zónách bylo množství částic podstatně menší (IRc signál téměř o řád nižší). U femorálních zón IRc měření našlo drobné rozdíly, které u ortopedického vyhodnocení nebyly patrné. Celkové pořadí zón bylo podle obou metodik stejné.

Podrobnější popis pro pacienta 3 (třetí řádek tabulky 1). Předoperační rentgenový snímek je ukázán na obrázku 8, výsledky metody IRc na obrázku rovněž.

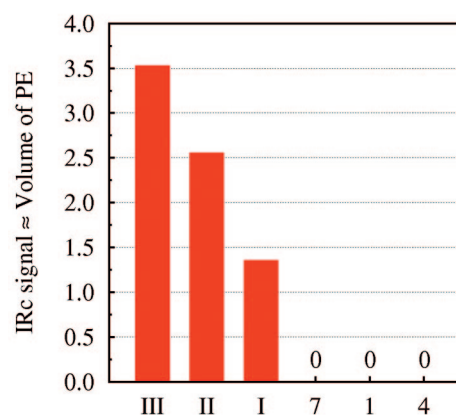
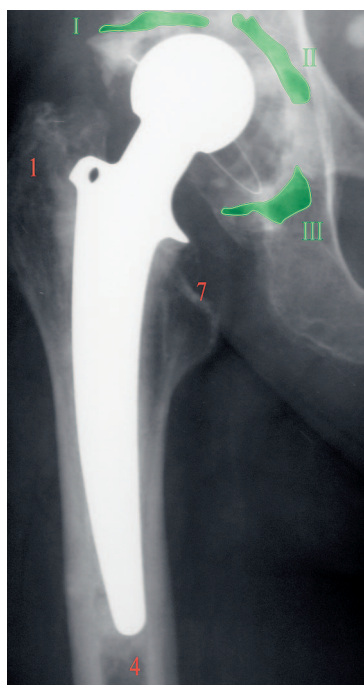
Komplexní ortopedické vyhodnocení předoperačního rtg a rozsahu poškození zón pozorované při reoperaci TEP bylo následující: Uvolněná jamka Poldi po 14 letech. V oblasti zón 0, III, II a I velké množství typického granulomu. V zónách 1, 4 a 7 překvapivě minimum granulmu.

Výsledky metody IRc (obr.8) lze komentovat následovně: V acetabulárních zónách (III, II, I) bylo nalezeno poměrně vysoké množství částic, které plynule klesalo v pořadí III > II > I.

Souhrnné srovnání VO a VM je ve třetím řádku tabulky 1. Shoda mezi ortopedickým vyhodnocením a IRc měřením je téměř dokonalá: největší poškození a současně největší počty částic byly prokázány v zónách III, II, I v uvedeném pořadí. U ortopedického vyhodnocení bylo pozorováno i jisté poškození tkání ve femorálních zónách, ale šlo o tak malá množství poškozené tkáně, že ani nedostačovala pro analýzu.

DISKUSE

V naší předchozí práci bylo prokázáno, že množství PE otěrových částic v poškozených tkáních v okolí TEP lze určovat jak pomocí námi vyvinuté metody SEMq (14), tak pomocí novější a rychlejší IRc (15). Na tomto místě stojí za zdůraznění, že všechny kvantifikační metody, včetně SEMq a IRc, sestávají ze tří klíčových kroků: reprodukovatelného odběru vzorků (ortopedická problematika), přesně definované techniky izolace otěrových částic PE z poškozených tkání (biochemická problematika) a vlastního určení množství izolovaných částic, které jsou okem neviditelné a prakticky nevažitelné (polymerní problematika). Jen za předpokladu úspěšného zvládnutí všech tří kroků lze získávat spolehlivé výsledky. Pravděpodobně právě kvůli této komplexní a mezioborové povaze problému v dostupné literatuře prakticky nelze nalézt práce zabývající se problematikou korelací mezi množstvím částic a poškozením tkání. Dále stojí za připomenutí, že metody SEMq i IRc určují celkový objem UHMWPE otěrových částic o rozměrech 0,1–10 µm, které jsou všeobecně považovány za biologicky neaktivnější (6).



Obr. 8. Vlevo rtg pacienta 3, vpravo graf získaný měřením metodou IRc

Naše výše zmíněné studie popisující metody SEMq (14) a IRc (15) rovněž indikovaly, že rozložení částic v okolí TEP je nerovnoměrné a že souvislost mezi poškozením tkání a množstvím otěrových částic v jednotlivých zónách kolem TEP skutečně existuje. Zde prezentované výsledky tyto závěry dále podporují. Tím je i zpětně podpořena správnost našich kvantifikačních metod SEMq a IRc – kdyby metody dávaly náhodné výsledky, žádná korelace by se nemohla najít.

Hlavním ortopedickým závěrem je nicméně experimentální potvrzení našeho předpokladu, že PE otěrové částice jsou jednou z hlavních příčin selhání TEP. Tato skutečnost je sice všeobecně přijímána, ale práci, které by korelovaly množství částic s poškozením tkání a osteolýzou v jednotlivých zónách, je v dostupné literatuře velmi málo. Vzhledem k našemu zjištění, že u všech 3 náhodně vybraných pacientů byla nalezena velmi dobrá shoda mezi rozsahem poškození zón (výrokem ortopeda) a objemy otěrových částic v jednotlivých zónách (výrokem měření), bude uvedená metoda užita u většího počtu případů a její platnost bude statisticky ověřena v připravované studii.

ZÁVĚR

Uvedená studie dokazuje, že:

1. Rychlá a jednoduchá metoda IRc nabízí možnost kvantifikace otěrových částic polyetyleny v měkkých tkáních.
2. Množství otěrových částic polyetyleny o velikosti 0,1 až 10 µm koreluje u všech 3 náhodně vybraných pacientů s předoperačním rtg nálezem.
3. Prokázaná korelace mezi rozsahem poškození tkání v jednotlivých zónách v okolí TEP a objemem otěrových částic v těchto zónách potvrzuje, že otěr je jednou z hlavních příčin selhání kloubních náhrad.

Literatura

1. 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. *Bio-medical materials and engineering*, 12:189–201, 2002.
2. ELFICK, A. P. D., GREEN, S. M., KRIKLER, S., UNSWORTH, A.: The nature and dissemination of UHMWPE wear debris retrieved from periprosthetic tissue of THR. *J. Biomed. Mater. Res.*, 65-A:95–108, 2003.
3. Weight Polyethylene. In proceedings of: UHMWPE for arthroplasty, Torino, Italy, 87–96, 2005.
4. GALLO, J., LANDOR, I., ČECHOVÁ, I., JAHODA, D.: Comparison of Hydroxyapatite-Coated Stems in Total Hip Arthroplasty after a Minimum 10-Years Follow-up. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 75:339–346, 2008.
5. GALLO, J., MRÁZEK, F., PETŘEK, M.: Podíl imunogenetických faktorů na vzniku a rozvoji periprotetické osteolýzy. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 74:247–252, 2007.
6. GREEN, T. R., FISHER, J., STONE, M., WROBLEWSKI, B. M., INGHAM, E.: Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Bio-materials*, 19:2297–2302, 1998.
7. 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.
8. HRUBINA, M., BÉHOUNEK, J., SKOTÁK, M.: Střednědobé výsledky necementované jamky TEP kyčelního kloubu Ultima u primóimplantací. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 75:205–211, 2008.
9. KOVANDA, M., HAVLÍČEK, V., HUDEC, J.: Předčasné aseptické uvolňování dřívku CF 30. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 74:59–64, 2007.
10. LAPCIKOVÁ, M., ŠLOUF, M., DYBAL, J., ZOLOTAREVOVA, E., ENTLICHER, G., POKORNÝ, D., GALLO, J., SOSNA, A.: Nanometer size wear debris generated from ultra high molecular weight polyethylene in vivo. *Wear*, 266:349–355, 2009.
11. LETOCHA, J., BÉHOUNEK, J., SKOTÁK, M.: Zkušenosti s použitím necementované jamky Beznoska typu „ježek“ na ortopedickém oddělení Nemocnice Pelhřimov. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 74:195–201, 2007.
12. POKORNÝ D., ŠLOUF M., HORÁK Z., JAHODA D., ENTLICHER G., EKLOVÁ S., SOSNA A.: Metodika sledování distribuce otěrových částic UHMWPE v okolních tkáních u TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir. ortop. Traum. čech.*, 73:243–250, 2006.
13. RICHARDS, L., BROWN, C., STONE, M. H., FISHER, J., INGHAM, E., TIPPER, J. L.: Identification of nanometer-sized ultra-high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved in vivo. *J. Bone Jt Surg.*, 90-B:1106–13, 2008.
14. ŠLOUF, M., EKLOVÁ, S., KUMSTATOVÁ, J., BERGER, S., SYNKOVÁ, H., SOSNA, A., POKORNÝ, D., SPUNDOVÁ, M., ENTLICHER, G.: isolation, Characterization and Quantification of Polyethylene Wear Debris from Periprosthetic Tissues around Total Joint Replacements. *Wear*, 262:1171–1181, 2007.
15. ŠLOUF, M., POKORNÝ, D., ENTLICHER, G., DYBAL, J., SYNKOVÁ, H., LAPCIKOVÁ, M., FEJFARKOVÁ, Z., SPUNDOVÁ, M., VESELÝ, F., SOSNA, A.: Quantification of UHMWPE wear debris in periprosthetic tissues of hip arthroplasty: description of a new method based on IR and comparison with radiographic appearance. *Wear*, 265: 674–684, 2008.
16. ŠLOUF, M., ŠLOUFOVÁ, I., ENTLICHER, G., HORÁK, Z., KREJČÍK, M., ŠTĚPÁNEK, P., RADONSKÝ, T., POKORNÝ, D., SOSNA, A.: New fast method for determination of numbers of UHMWPE wear particles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15:1267–1278, 2004.
17. 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.
18. VEIGL, D., NIEDERLOVÁ, J., KRYŠTŮFKOVÁ, O.: Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiol. Res.*, 56:455–62, 2007.
19. WRIGHT, T. M., GOODMAN, S. B. (Eds.): *Implant Wear in Total Joint Replacement*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Illinois, USA, 5–8, 2001.
20. ZOLOTAREVOVÁ, E., FEJFÁRKOVÁ, Z., ENTLICHER, G., LAPCIKOVÁ, M., ŠLOUF, M., POKORNÝ, D., SOSNA, A.: Can centrifugation affect the morphology of polyethylene wear debris? *Wear*, 265:1914–1917, 2008.

Doc. MUDr. David Pokorný, CSc.,
I. ortopedická klinika I. LF UK, FN Motol,
V úvalu 84,
Praha 5
E-mail: david.pokorny@LF1.cuni.cz

Práce vznikla v rámci řešení grantového projektu
MŠMT 2B06096.

Otištění barevné dokumentace je uhrazeno nakladatelství z prostředků grantu.