

Výpotky asepticky selhávajících TEP kyčlí a kolen nejsou toxické pro osteoblasty

Synovial Fluid from Aseptically Failed Total Hip or Knee Arthroplasty is Not Toxic to Osteoblasts

J. GALLO¹, A. ZDAŘILOVÁ², A. RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ², J. ULRICHOVÁ², L. RADOVÁ³,
M. SMIŽANSKÝ¹

¹ Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc

² Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci

³ Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

A failure of total hip or knee arthroplasty is associated with an increased production of joint fluid. This contains wear particles and host cells and proteins, and is assumed to be involved in the pathogenesis of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis. This study investigated the effect of synovial fluid from patients with aseptically failed joint prostheses on osteoblast cultures.

MATERIAL AND METHODS

Synovial fluid samples were obtained from patients with failed total joint prostheses (TJP; n=36) and from control patient groups (n=16) involving cases without TJP and osteoarthritis, without TJP but with osteoarthritis, and with stable TJP. The samples were treated in the standard manner and then cultured with the SaOS-2 cell line which shows the characteristics and behaviour of osteoblasts. Each fluid sample was also examined for the content of proteins, cells and selected cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL and OPG detected by ELISA). We tested the hypothesis assuming that the fluids from failed joints would show higher cytotoxicity to osteoblast culture and we also expected higher levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and RANKL in patients with TJP failure and/or with more severe bone loss. The statistical methods used included the Kruskal-Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test.

RESULTS

The fluids from failed TJPs showed the highest RANKL and the lowest OPG levels resulting in the highest RANKL/OPG ratio. However, there was no evidence suggesting that the joint fluids from failed TJPs would be more toxic to osteoblast culture than the fluids from control groups. In addition, no correlation was found between the fluid levels of molecules promoting inflammation and osteoclastic activity and the extent of bone loss in the hip (in terms of Saleh's classification) or the knee (AORI classification). In fact, the fluids from failed TJPs had higher protein levels in comparison with the controls, but the difference was not significant.

DISCUSSION

The finding of high RANKL levels and low OPG concentrations is in agreement with the theory of aseptic loosening and periprosthetic osteolysis. The other cytokines, particularly TNF- α and IL-1 β , were found in low levels. This can be explained by the stage of particle disease at which the samples were taken for ELISA analysis. It is probable that the level of signal molecules reflects osteolytic process activity and is therefore not constant. The reason for no correlation found between cytokine levels and the extent of bone loss may also lie in the use of therapeutic classifications of bone defects that is apparently less sensitive to the biological activity of aseptic loosening and/or periprosthetic osteolysis.

CONCLUSIONS

Synovial fluids from failed total hip or knee joint prostheses are not toxic to osteoblast cultures. Cytotoxicity indicators and levels of pro-inflammatory and pro-osteoclastic cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL and OPG) do not correlate well with the extent of periprosthetic bone loss.

Key words: total joint replacement, arthroplasty, aseptic loosening, periprosthetic osteolysis, joint fluid, SaOS-2 cell line, cytotoxicity, cytokines, RANKL, OPG.

ÚVOD

Nejčastějším důvodem selhání totální endoprotézy (TEP) kyčle a kolena je aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza (16). Obě zmíněné komplikace jsou dávány do souvislosti s biologickými a mechanickými faktory, které jsou reakcí na implantát. Biologické selhávání je dáno neschopností periprotetických tkání adaptovat se na stálý přísun částic vznikajících vzájemným protipohybem kloubních ploch endoprotézy (20). Proto se začala tato komplikace označovat rovněž jako „částicová nebo polyetylenová nemoc“ (26).

Částice polyetylenu (ale i jiných materiálů) stimulují makrofágy, dendritické buňky a fibroblasty k expresi prozánětlivých cytokinů/chemokinů. Povrchové synovialocyty kloubního pseudopouzdra (jizvy) jsou následně stimulovány k sekreci výpotku. Kloubní výpotek se dostává k rozhraní kost–endoprotéza, přičemž do této oblasti přináší suspenze částic, enzymů, signálních molekul, reaktivní radikály a další látky, čímž nepřímo zasahuje do lokální tkáňové homeostázy v okolí endoprotézy (4). Tímto způsobem je narušen mimo jiné chod kostní multicelulární jednotky. Předpokládá se totiž, že suspenze mikročástic a regulační molekuly vychýlí rovnováhu této základní stavební jednotky kosti směrem k funkční dominanci osteoklastů. Výsledkem je převaha kostní resorpce nad novotvorbou (osteolýza), (11).

Podle Schmalzrieda a spol. je hlavním dlouhodobým problémem TEP kyčle neschopnost udržet původní velikost kloubního prostoru (24). Při selhávání kloubu dochází obvykle ke zvětšování kloubního objemu na úkor kostního lůžka. Destruované kostní lůžko není schopno dále podepírat endoprotézu a ta se uvolňuje. Oblasti, které jsou přístupné nitrokloubnímu výpotku a látkám v něm obsaženým, označili Schmalzried a spol. jako efektivní kloubní prostor. Manley a spol. následně navrhli termín „nemoc z přístupu ke kosti“ (a disease of access to fixation interface), (18), čímž se pokusili o ještě preciznější vystižení patogenetického mechanismu periprotetické osteolýzy. Podobný scénář se předpokládá také u endoprotézy kolena (13).

Otázka však zní, jakým způsobem působí výpotek? Někteří autoři totiž zpochybňují chemický vliv výpotku a zdůrazňují především jeho hydromechanický význam (4). Experimentálně bylo zjištěno, že opakované působení tlakových vln kapaliny vyvolá kostní nekrózu (3). Nitrokloubní tlak uvnitř kyčle přitom může při určitých aktivitách dosahovat výšky až 776 mm sloupce Hg (15), a tedy několikanásobně překročit tlak, který byl vyvinut na kost v experimentech. K odpovědi na výše položenou otázku je možné přistoupit také doložením chemického působení na jednotlivé buňky kostní multicelulární jednotky. V této souvislosti postulujeme hypotézu o toxickém působení výpotku na osteoblasty, čímž by se usnadnila funkční převaha osteoklastů a vznik osteolýzy. Současně očekáváme, že ve výpotcích ze selhávajících kloubů budou významně vyšší koncentrace pro-zánětlivých a pro-osteoklastických molekul.

Cílem naší studie bylo ověřit výše uvedené hypotézy. Chování kloubních výpotků jsme testovali na standardizovaném biologickém modelu osteoblastů. Současně jsme provedli základní charakterizaci výpotků.

PACIENTI, MATERIÁL A METODIKA

Pacienti

Od ledna 2007 do června 2009 jsme odebrali za přísně aseptických kautel výpotek z 52 kloubů u 51 pacientů. Definice jednotlivých studovaných souborů:

- I – pacienti bez endoprotézy a bez současné artrózy, po artroskopickém výkonu pro rupturu menisku, povrchovou chondropatii nebo po plastice předního zkříženého vazy,
- II – pacienti s artrózou kolenního nebo kyčelního kloubu, avšak bez endoprotézy,
- III – pacienti se stabilní endoprotézou kyčle nebo kolena s minimální osteolýzou,
- IV – pacienti s asepticky selhávající endoprotézou kyčle nebo kolena a s osteolýzou.

Základní charakteristiky jednotlivých souborů jsou uvedeny v tabulce 1.

Skupinu III tvořilo 6 mužů a 2 ženy, jimž bylo implantováno 6 cementovaných kolen a 2 kyčle (necementovaná a cementovaná). Z této skupiny bylo reoperováno 5 pacientů. Důvodem reoperace byla 3krát nestabilita, 1krát femoropatelární bolesti a 1krát byl kloub reoperován pro bolesti nejasného původu. Ze skupiny IV, kterou tvořilo 16 mužů a 20 žen, jimž bylo implantováno 21 kolen a 15 kyčlí, bylo 33 kloubů reoperováno pro aseptické uvolnění a/nebo osteolýzu; zbývajících tři reoperace byly provedeny 2krát pro periprotetickou frakturu femuru a 1krát pro frakturu jamky. Přehled extrahovaných endoprotéz ze skupiny IV je uveden v tabulce 2.

U všech reoperovaných pacientů (sk. III a IV) byly předoperačně provedeny odběry k vyloučení infekce

Tab. 1. Základní charakteristiky jednotlivých souborů.

Parametr	Skupina I (bez TEP, bez artrózy)	Skupina II (bez TEP, s artrózou)	Skupina III (stabilní TEP minimální OL)	Skupina IV (selhání TEP, OL)	p
Počet pacientů	2	6	8	36	NA
Muži/ženy	1/1	3/3	6/2	16/20	
Věk v době odběru (roky)	45,25 (42–49)	67,38 (63–72)	69,88 (60–78)	65,39 (59–74)	<0,19
Kyčle / kolena	0/2	0/6	2/6	15/21	<0,05*
Implantát in situ (roky)			2,28 (0,54–6,25)	10,46 (8,87–11,18)	<10 ⁻⁴
Důvod revize TEP: OL, AU Jiný			5	33 3	<10 ⁻⁴

Legenda: kvantitativní parametry jsou uvedeny jako medián, kvantily 25% –75%; NA = neanalyzováno; * výsledek chí-kvadrát testu maximální věrohodnosti; OL = periprotetická osteolýza; AU = aseptické uvolnění

Tab. 2. Základní údaje o endoprotézách u pacientů ze skupiny IV.

Lokalizace	Protéza
Kyčle (n=15)	Necementovaná: ABG – 12x Balgrist-Zweymuller Hybridní: Chirulen-Wagner Cementovaná: Poldi
Kolena (n=21)	Cementovaná: PFC, Sigma – 11x Search Evolution, Monoblok – 7x Kinemax plus – 3x

jako příčiny selhání implantátu (sedimentace, C-reaktivní protein) a peroperačně tkáně k histologickému a mikrobiologickému vyšetření. Při interpretaci nálezů jsme vycházeli z publikované definice infekce kloubních náhrad (10). U reoperovaných kyčlí byly kostní defekty hodnoceny v kategoriích klasifikace Saleha a spol. (22). Jako závažné kostní defekty byly označeny stupeň 3 a vyšší pro oblast acetabula, resp. stupeň 2 a vyšší pro oblast femuru. V případě TEP kolenního kloubu byla použita klasifikace AORI (Anderson Orthopaedic Research Institute), (8). Zde byl za lehký defekt považován pouze stupeň 1.

Výpotek byl odebírán standardní technikou kloubní punkce. U pacientů, kteří byli reoperováni, proběhl odběr těsně před protětím kloubního pouzdra. Aspirovaný výpotek byl v obou případech transportován ve vychlazeném polystyrenovém boxu na pracoviště spoluautorů, kde byl následně zpracován podle předem daného protokolu.

Studie byla schválena etickou komisí LF UP a FN Olomouc. Všichni pacienti podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

Zpracování výpotku

Aspirovaný výpotek byl po transportu ihned centrifugován (10 min, 2500 rpm, 4 °C), aby došlo k odstranění buněk a jiných částic. Poté byl vzorek rozdělen na alikvoty (2 ml) a zamražen (-80 °C).

Materiál

Buněčná linie odvozená z primárního osteosarkomu (SaOS-2; No. 89050205) byla zakoupena od firmy ECACC (The European Collection of Cell Cultures, Velká Británie). Mc Coy's médium, fetální telecí sérum, stabilizovaný roztok penicilinu se streptomycinem, sterilní dimethylsulfoxid (DMSO), trypsin EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), hovězí albumin – frakce V a Coomassie brilliant blue G-250 byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Specifické imunologické kity pro stanovení IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Quantikine[®]) byly zakoupeny od firmy R&D Systems (USA). Specifické imunologické kity pro stanovení OPG a RANKL byly zakoupeny od firmy BioVendor.

Buněčný model

Buňky SaOS-2 byly kultivovány v růstovém médiu [Mc Coy's médium obsahující fetální telecí sérum (10 %, v/v), penicilin (0,1 mg/ml) a streptomycin

(100 U/ml)] v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂. Růstové médium bylo měněno každých 48–72 h. Po dosažení monovrstvy byly buňky opláchnuty sterilním fosfátovým pufrém, uvolněny 0,25 % roztokem trypsinu s EDTA (1 ml; 2–3 min, 37 °C) a po přidání růstového média centrifugovány (10 min, 1300 rpm, pokojová teplota). Buňky byly následně resuspendovány v 10 ml růstového média a použity do experimentů.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly naředěny růstovým médiem a vysety na 24-jamkové desky v koncentraci 2,6.10⁴ buněk/cm². Po stabilizaci kultury (24 h; 5% CO₂; 37 °C) bylo růstové médium vyměněno za experimentální [Mc Coy's médium, penicilin (0,1 mg/ml), streptomycin (100 U/ml) a L-glutamin (2 mmol.l⁻¹)] obsahující výpotek v koncentračním rozmezí 5 až 15% (v/v). Kontrolní buňky byly inkubovány v experimentálním médiu bez výpotku. Po 24 h inkubaci (5% CO₂, 37 °C) bylo médium odsáto a buněčné poškození bylo sledováno stanovením aktivity intracelulárních dehydrogenáz (MTT test).

Stanovení buněčného poškození (MTT test)

Působení cytotoxické látky (nezávisle na místě nebo mechanismu účinku) narušuje proces dělení buněk, což vede ke snížení růstu, tedy počtu živých buněk narostlých v kultuře. Množství živých buněk v kultuře je stanoveno fotometrickou metodou – MTT test (25).

Princip metody: MTT test je založen na schopnosti živých buněk redukovat 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) na fialové, ve vodě nerozpustné formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm. Množství redukování barviva vyjádřené absorbancí je úměrné metabolické aktivitě a počtu buněk v analyzovaném vzorku. Stupeň cytotoxicity, vyjádřený v %, je vyhodnocen na základě poměru životnosti buněk vystavených působení testované látky a buněk kontrolní kultury.

Provedení: Po inkubaci s výpotkem byly buňky opláchnuty sterilním fosfátovým pufrém a následně bylo aplikováno 0,5 ml čerstvého experimentálního média a 50 μ l roztoku MTT (5 mg.ml⁻¹; fosfátový pufr). Po inkubaci (3 h; 37 °C; 5 % CO₂) bylo médium s MTT odsáto a formazanové barvivo bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO s 1 % amoniaku. Po 5 min byla změřena absorbance při 540 nm (Sunrise, Tecan, Švýcarsko).

Výpočet životnosti kultury: Životnost kultury byla vypočtena z průměrných hodnot absorbancí (A) podle následujícího vztahu

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{(A_v - A_p)}{(A_k - A_p)}$$

A_v ... absorbance vzorku (buňky inkubované s výpotkem);

A_k ... absorbance kontroly (buňky inkubované bez výpotku);

A_p ... absorbance pozadí (DMSO+NH₃).

Hodnocení stupně cytotoxicity:

0	životnost 100–80 %	netoxický
1	životnost 80–60 %	lehce toxický
2	životnost 60–40 %	mírně toxický
3	životnost 40–0 %	silně toxický

Stanovení hladin cytokinů

Koncentrace interleukinu 1 β (IL-1 β), tumor nekrotizujícího faktoru- α (TNF- α), interleukinu 6 (IL-6), osteoprotegerinu (OPG) a ligandu pro receptorem-aktivovaný nukleární faktor kappa beta (RANKL) ve výpotcích byly stanoveny použitím specifických imunologických kitů (R&D Systems, BioVendor). Výrobci deklarují následující detekční limity: IL-1 β (1 pg/ml), IL-6 (0,7 pg/ml), TNF- α (1,6 pg/ml), RANKL (0,2 pmol/l), OPG (0,13 pmol/l). Hladiny pod uvedenými hodnotami byly považovány za nulové. Testy byly provedeny podle protokolů dodaných výrobcem. Výpotek byl vhodně naředěn pufrům, aplikován na 96-jamkové desky pokryté specifickou monoklonální protilátkou. Po inkubaci (2 h, pokojová teplota) byl výpotek odstraněn, jamky opláchnuty promývacím pufrům (3x) a byl aplikován roztok enzymaticky značené sekundární protilátky (2 h, pokojová teplota). Poté byl roztok odstraněn, jamky opláchnuty promývacím pufrům (3x) a byl přidán roztok substrátu. Po inkubaci (30 min, pokojová teplota, tma) byla reakce ukončena zastavovacím roztokem a změřena absorbance vzniklého produktu při 450 nm (Sunrise, Tecan, Švýcarsko).

Stanovení celkových proteinů

Koncentrace bílkovin ve vzorcích výpotků byla stanovena metodou dle Bradfordové (6). K 20 μ l standardu (albuminu)/naředěného výpotku bylo přidáno 200 μ l reakční směsi (Coomassie brilliant blue G-250) a po pro-

míchání byla měřena absorbance při 595 nm (Sunrise, Tecan, Švýcarsko).

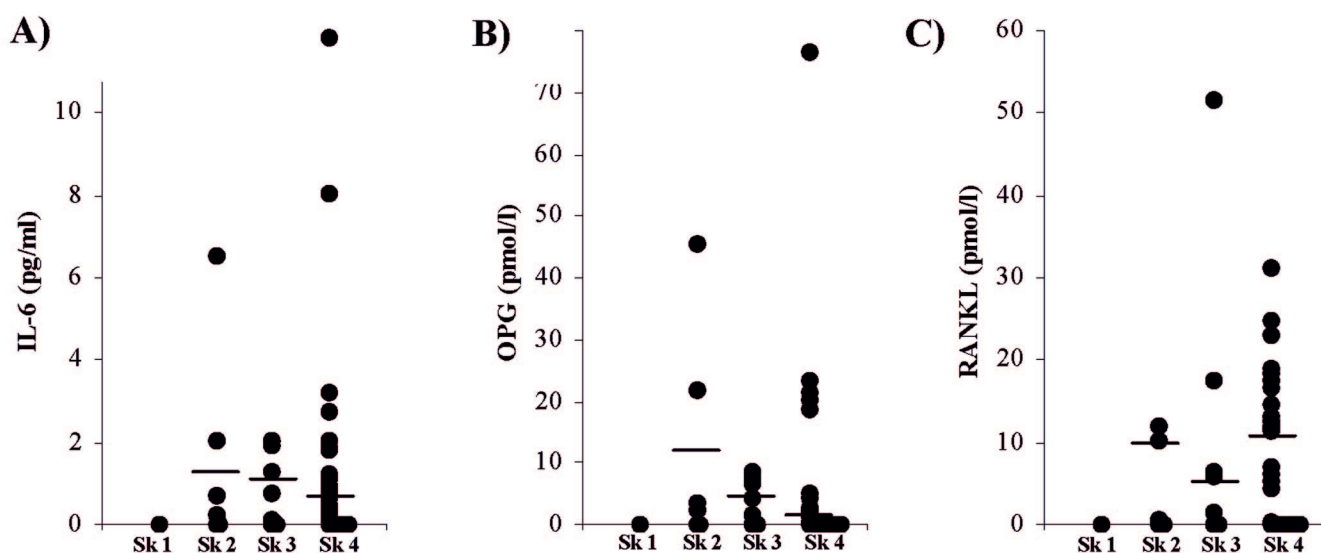
Statistické zpracování

Primárním cílem naší studie bylo zjistit, jak působí výpotek z kloubu s aseptickým uvolněním, resp. s větším kostním defektem na buněčnou linii osteoblastů SaOS-2. V této souvislosti jsme postulovali hypotézu předpokládající vyšší cytotoxicitu těchto výpotků ve srovnání s kontrolními výpotky, čímž by se mohla vysvětlit oslabená kostní novotvorba v kostní multicelulární jednotce. Podobně jsme očekávali vyšší hladiny vybraných mediátorů zánětu (IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL) a nižší hladinu OPG u pacientů se selhávajícím implantátem a závažnějším kostním defektem.

Vzhledem k charakteru dat, které v žádném ze sledovaných parametrů nevykazovaly normalitu, byly ve všech statistických analýzách použity neparametrické testy. Pro stanovení významnosti rozdílů charakteristik výpotku byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA a Mann-Whitneyho test. Hladina významnosti byla $p < 0,05$.

VÝSLEDKY**1. Charakteristiky studovaných souborů**

Celkem jsme měli k dispozici 36 pacientů s asepticky selhávající endoprotézou kyčle nebo kolena (skupina IV; kyčlí 15/kolen 21) a 8 pacientů s funkční endoprotézou (skupina III; 2 kyčle/6 kolen). Předoperační a peroperační vyšetření vylučovalo možnost infekce kloubní náhrady. Pacienti z obou skupin byli věkově srovnatelní a lišili se významně v parametrech doba od primóimplantace k revizi a důvod k revizi, což bylo v souladu s kritérii pro zařazení do souboru. Souhrn údajů pro všechny skupiny, včetně kontrol, je uveden v tabulce 1.



Graf 1. Koncentrace interleukinu-6 (IL-6), osteoprotegerinu (OPG) a ligandu pro receptorem-aktivovaný nukleární faktor kappa beta (RANKL) stanovené ve výpotcích odebraných pacientům: bez TEP, bez artrózy (sk. I), bez TEP, s artrózou (sk. II), stabilní TEP, minimální osteolýza (sk. III), selhání TEP, osteolýza (sk. IV). Hladiny jednotlivých markerů byly stanoveny pomocí komerčně dostupných specifických ELISA kitů. Data (A-C) jsou vyjádřena jako absolutní koncentrace IL-6, OPG a RANKL v jednotlivých vzorcích a je vyznačen medián hodnot (–) pro jednotlivé skupiny pacientů.

Tab. 3. Vybrané vlastnosti výpotku.

	Skupina I (bez TEP, bez artrózy)	Skupina II (bez TEP, s artrózou)	Skupina III (stabilní TEP, minimální OL)	Skupina IV (selhání TEP, OL)	p
IL-1 β [ng/ml]				0,765 (0,303–2,286)	NA
IL-6 [ng/ml]		1,368 (0,241–6,543)	1,300 (0,118–2,027)	0,625 (0,014–11,825)	<0,67
TNF- α [ng/ml]				0,606 (0,449–0,762)	NA
RANKL [pmol/l]		10,081 (0,647–11,887)	6,505 (1,552–51,566)	11,575 (0,027–31,168)	<0,63
OPG [pmol/l]		12,651 (2,296–45,555)	6,419 (1,668–8,357)	2,144 (0,005–76,620)	<0,16
RANKL/OPG		0,221 (0,178–0,549)	1,013 (0,348–10,498)	5,898 (0,054–938,967)	<0,11
Celk. protein [mg/ml]	33,370 (18,42–48,32)	33,405 (28,203–60,85)	35,070 (26,97–46,975)	37,512 (19,66–78)	<0,94
Leukocyty [x 10 ⁹ /l]	0,4 (0,3–0,5)	0,55 (0,5–0,6)	0,65 (0,3–1,6)	0,6 (0,1–2,3)	<0,61
Segmenty [%]	0,1 (0,1)	0,145 (0,07–0,22)	0,68 (0,18–0,92)	0,22 (0,01–0,95)	<0,17
Lymfocyty [%]	0,58 (0,58)	0,48 (0,42–0,54)	0,25 (0,04–0,74)	0,515 (0,01–0,99)	<0,64

Medián (min-max) hodnot v dané skupině pacientů a p-hodnota Kruskal-Wallisova ANOVA testu; NA = neanalyzováno; OL = osteolýza

2. Vlastnosti kloubního výpotku

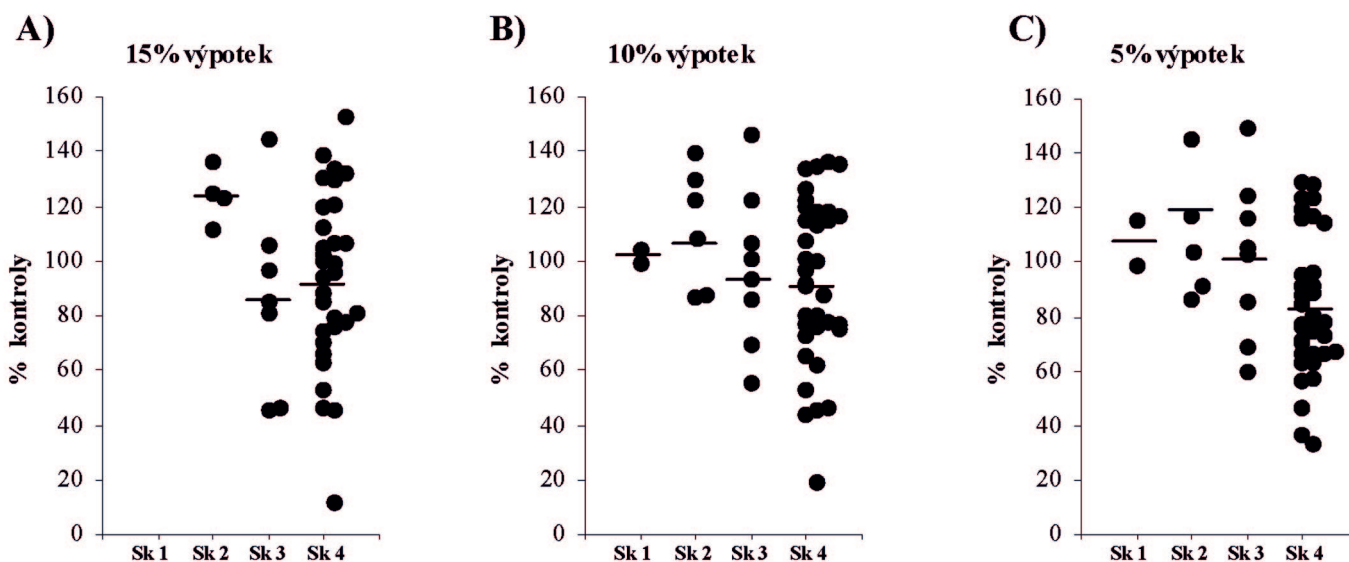
Výpotky odebírané k vyšetření byly aseptické, což mimo jiné dokládá také nízký počet leukocytů zjištěný ve všech testovaných skupinách. Celkový protein byl vyšší u selhávajících endoprotéz (skupina IV) oproti kontrolním skupinám (I, II, III), rozdíl však nebyl statisticky významný ($p=0,59$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Cytokiny

Předpokládali jsme, že kloubní výpotky pacientů se selhávající endoprotézou (skupina IV), resp. s rozvinutou artrózou (sk. II), budou obsahovat vyšší koncentrace mediátorů zánětu. Zvýšené hladiny TNF- α (0,606 ng/ml) a IL-1 β (0,765 ng/ml) byly naměřeny pouze ve skupině IV; u ostatních skupin byly hodnoty pod limitem detekce (tab. 3). Naproti tomu 2krát vyšší koncentrace IL-6 byla naměřena ve skupině II (1,368 ng/ml) v porovnání se skupinou IV (0,625 ng/ml), (graf 1a). Dále jsme očekávali vyšší hladiny OPG a nižší hladiny RANKL u pacientů se stabilním implantátem a minimální osteolýzou (skupina III) v porovnání s pacienty se selhávajícím implantátem/osteolýzou (skupina IV). Podle očekávání byla ve výpotcích ze skupiny III zjištěna téměř 3krát vyšší koncentrace OPG (6,419 pmol/l) nežli ve výpotcích ze skupiny IV (2,144 pmol/l), (graf 1b). Hladina RANKL byla téměř 2krát nižší u skupiny III (6,505 pmol/l) než u skupiny IV (11,575 pmol/l), (graf 1c). Vysoké hodnoty OPG a RANKL byly zjištěny ve výpotcích pacientů s rozvinutou artrózou (skupina II). RANKL/OPG index byl nejvyšší u selhávajících endoprotéz (skupina IV). Přehled všech nálezů je uveden v tabulce 3.

Cytotoxicita

Předpokládali jsme, že kloubní výpotek u selhávajících endoprotéz (skupina IV) bude působit na linii osteoblastů SaOS-2 významně toxičtěji nežli výpotek kontrolních skupin. Zjištěné průměrné hodnoty toxicit sice neukázaly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami, avšak výsledky byly nejednoznačné. Například u skupiny III při 10% ředění výpotku (graf 2b) jsme pozorovali u 2 vzorků zvýšení životnosti SaOS-2, u 2 vzorků snížení a u 4 vzorků žádný vliv. Podobně u sku-



Graf 2. Vliv výpotku na životnost buněčné linie osteoblastů SaOS-2. Buňky byly inkubovány s výpotky (5 až 15% ředění) a po 24 hod byla stanovena životnost buněk MTT testem. Kontrolní buňky byly inkubovány v médiu bez výpotku. Data (A-C) jsou vyjádřena jako % kontroly v jednotlivých vzorcích a je vyznačen medián hodnot (–) pro jednotlivé skupiny pacientů: bez TEP, bez artrózy (sk. I), bez TEP, s artrózou (sk. II), stabilní TEP, minimální osteolýza (sk. III), selhání TEP, osteolýza (sk. IV).

Tab. 4. Toxicita výpotku vyjádřená jako průměr a 95% interval spolehlivosti výsledku MTT testu.

Ředění	Skupina I (bez TEP, bez artrózy)	Skupina II (bez TEP, s artrózou)	Skupina III (stabilní TEP, minimální OL)	Skupina IV (selhání TEP, OL)	p
15 %	NA	123,9 (108,1–139,6)	86,2 (54,2–118,1)	93,3 (81,6–104,9)	<0,10
10 %	101,6 (72,3–131)	112,0 (89,0–134,9)	96,1 (67,7–124,5)	92,1 (81,7–102,5)	<0,48
5 %	107,1 (2,9–211,4)	119,2 (83,6–154,7)	100,7 (71,4–130,1)	84,5 (75,3–93,6)	<0,085
0 %	99,8 (98,3–101,4)	99,9 (99,7–100,1)	100,0 (99,9–100,1)	100,0 (99,9–100)	<0,29
p	p=1	<0,07	<0,48	<0,045	

NA = neanalyzován; OL = osteolýza

piny IV (při stejném ředění výpotku) 13 vzorků životnost buněk zvýšilo, 15 snížilo a 7 nemělo vliv. Obdobné výsledky byly naměřeny i v případě 15% (graf 2a) a 5% (graf 2c) ředění výpotku. V této souvislosti nemůžeme jednoznačně naši pracovní hypotézu potvrdit ani vyvrátit. Přehled výsledků je uveden v tabulce 4.

3. Predikce závažnosti kostních defektů na základě vyšetření kloubního punktátu

K dispozici jsme měli celkem 36 výpotků ze selhávajících kloubů (21 kolen, 15 kyčlí). Ve skupině selhávajících kolen bylo 8/6 případů se závažným defektem na femorální/tibiální straně; ve skupině selhávajících kyčlí bylo 8/2 případů závažných defektů na acetabulární/femorální straně.

Kostní defekt jako funkce cytotoxicity výpotku

Na vzniku kostních defektů se bezpochyby podílí zhoršená kostní novotvorba. Očekávali jsme proto, že by rozsah kostních defektů mohl být sdružen s toxickým působením výpotku na linii osteoblastů. Testováním cytotoxicity kloubního výpotku na našem modelu jsme však nezjistili žádný vztah k rozsahu kostních defektů (tab. 5).

Kostní defekt jako důsledek koncentrace cytokinů ve výpotku

Postulovali jsme hypotézu tvrdící, že rozsah kostních defektů je odrazem zvýšených hladin proosteoklastických molekul v kloubním výpotku. Střední hodnoty koncentrací jednotlivých cytokinů však nekorelovaly s rozsahem kostních defektů. Hladiny RANKL byly dokonce vyšší u méně závažných nežli u závažných kostních defektů, a to jak u TEP kyčle, tak u kolen. Hladiny IL-6 byly sice vyšší u větších kostních defektů nežli u menších, avšak rozdíl nebyl statisticky významný (tab. 6).

DISKUSE

V naší studii jsme na modelu osteoblastů nepotvrdili hypotézu o možném podílu zvýšené cytotoxicity kloubního výpotku na aseptickém selhávání implantátů, resp. o vztahu zvýšené toxicity výpotků k velikosti kostních defektů (rozsahu osteolýzy). Ve výpotcích získaných ze selhávajících implantátů (sk. IV) jsme však naměřili nejvyšší koncentrace RANKL, nejnižší koncentrace OPG, a proto také nejvyšší poměr RANKL/OPG. Tyto parametry jsou proto v souladu s předloženou hypotézou.

Z dosavadního výzkumu je zřejmé, že endoprotézy kyčle a kolena selhávají nejspíše komplexně (11). U některých pacientů může sehrávat zpočátku významnější roli částicová nemoc, zatímco u jiných mechanické faktory, později se však oba patofyziologické směry prolínají a vzájemně potencují. Koncepce částicové nemoci je založena na důkazech o škodlivém působení mikročástic polyetyleny (ale také kovu, keramiky nebo kostního cementu) na lokální homeostázu tkání kolem endoprotézy (26). K tomu dochází již krátce po implantaci endoprotézy, protože kloubní povrchy se od počátku opotřebovávají otěrem. Během každého kroku se může do kloubu uvolnit až několik set tisíc částic polyetyleny, které se rozptýlí v kloubním výpotku, kterým jsou transportovány k makrofágům, fibroblastům povrchového listu pseudosynovialis a k vazivové membráně na rozhraní kost-protéza. Stimulované buňky syntetizují prozánětlivé cytokiny, chemokiny, prostaglandin E2, volné kyslíkové radikály a proteolytické enzymy (27, 28). Povrchové synovialocyty reagují na zánětlivé podněty sekrecí výpotku, který „omývá“ kloub, tím se do něj dostávají další a další částice, mediátory zánětu a celý koloběh se opakuje. Předpokládá se proto, že míra narušení lokální homeostázy, tj. fáze aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy, by se měla odrážet ve složení kloubního výpotku.

Tab. 5. Vztah mezi toxicitou výpotku a velikostí kostních defektů (viz část Pacienti, materiál a metodika) medián a kvantily 25 % – 75 % v dané skupině pacientů; p-hodnota Mann-Whitneyova testu.

Ředění	TEP kyčle			TEP kolena		
	Defekty malé	Defekty velké	p	Defekty malé	Defekty velké	p
15%	95,5 (88,4–130,4)	103,2 (89,1–124,5)	1	100,7 (66,2–111,8)	78,2 (66,5–103,4)	<0,50
10%	90,6 (76,9–135,9)	114,9 (91,3–118,0)	<0,92	93,6 (61,7–119,5)	79,7 (69,0–114,6)	<0,74
5%	72,8 (66,8–128,5)	80,4 (74,5–114,6)	1	85,2 (63,2–117,1)	80,7 (66,2–93,2)	<0,89
0%	100 (99,9–100,1)	100 (99,9–100,0)	<0,36	100 (99,9–100,04)	99,9 (99,9–100)	<0,41

Tab. 6. Závislost mezi velikostí kostního defektu (viz část Pacienti, materiál a metodika) a vybranými vlastnostmi výpotku; medián hodnot v dané skupině pacientů a p-hodnota Mann-Whitneyho testu.

	TEP kyčle			TEP kolena		
	Defekty malé	Defekty velké	p	Defekty malé	Defekty velké	p
IL-1 β		0,5 (0,3–2,3)	NA	1,05*		NA
IL-6	0,7 (0,5–1,8)	1,2 (0,9–2,1)	<0,42	0,4 (0,3–0,6)	0,6 (0,2–1,8)	<0,70
TNF- α			NA	0,45*	0,76*	NA
RANKL	11,6 (6,5–13,0)	4,4 (0,3–11,3)	<0,16	17,6 (11,5–23)	9,2 (5,2–13,5)	<0,095
OPG	5,3 (2,1–0,6)	1,7 (0,8–12,9)	<0,69	0,6 (0,4–5,1)	2,8 (0,2–4,5)	1
RANKL/OPG	2,1 (0,6–194,2)	0,3 (0,1–5,7)	<0,35	23,4 (1,2–46,2)	4,2 (0,6–21,9)	<0,34

* – k dispozici byl pouze jeden údaj; NA – neanalyzováno

Pokud by se výše uvedený předpoklad prokázal, bylo by možné například diagnostikovat aseptické uvolnění, resp. periprotetickou osteolýzu pomocí vyšetření krve a kloubního punktátu (9). Sabokbar a Rushton naměřili významně vyšší hladiny IL-6, IL-8 a PGE₂ ve výpotcích získaných během reoperace TEP kyčle (21). Stejná laboratoř později studii rozšířila o kolena a další molekuly, přičemž prokázala zvýšení všech kandidátních cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) ve výpotcích ze selhávajících kloubů ve srovnání s primárními implantacemi (7). Podobně významnou dominanci IL-6 a IL-8 prokázaly další skupiny (5, 30). Jiným se naopak nepodařilo zvýšené koncentrace IL-6 prokázat, zato však našli u aseptického uvolnění výrazně vyšší hladiny TNF- α (19). Naopak vyšší hladina IL-10 by měla signalizovat odolnost vůči osteolýze, případně aseptickému uvolnění, protože IL-10 působí tlumivě vůči iniciačním a amplifikačním drahám zánětu. Proto Flecher a spol. navrhli vyšetřovat poměr mezi TNF- α a IL-10 v krvi a ve výpotku (9). U pacientů s aseptickým uvolněním by měl být tento poměr zvýšený jak v krvi, tak ve výpotku, především z důvodu dominance TNF- α . Uvedené nálezy je však třeba interpretovat velmi opatrně. Především z toho důvodu, že aseptické selhávání a periprotetická osteolýza jsou dlouhodobé procesy s vlastní dynamikou, nikoliv jednorázově vzniklé stavy. To znamená, že se v jejich uskutečňování projevuje značná časová a individuálně podmíněná variabilita (12). Dokonce i vzorky získané od jednoho pacienta se mohou významně lišit v závislosti na odběrovém místě a době odběru (nepublikovaná data).

Andersson a spol. ověřili, že výpotek z kloubů s uvolněnou TEP, resp. s periprotetickou osteolýzou, stimuluje resorpci intaktní kosti *in vitro*, zatímco výpotky ze zdravých kloubů tuto schopnost nemají (2). Důvodem resorpce je pravděpodobně výrazné narušení regulační osy RANKL/OPG ve prospěch RANKL u pacientů s aseptickým uvolněním/osteolýzou. Důkazem je mimo jiné to, že výpotek z uvolněných endoprotéz silně stimuluje expresi *rankl* mRNA na zvířecím, resp. buněčném modelu (2, 17). Také my jsme zjistili výrazně vyšší koncentrace RANKL ve výpotcích pacientů s aseptickým uvolněním. Zvýšení koncentrace RANKL, resp. nedostatečná protireakce OPG, se podílí na zvýšené diferenciaci a aktivaci osteoklastů, což vede k narušení rovnováhy v kostní multicelulární jednotce. Naru-

šení vztahu mezi expresí RANKL a OPG molekul bylo pozorováno také v periprotetických tkáních (14, 29). Naopak u artrotických kloubů bývají hladiny OPG vyšší než RANKL, což je rovněž ve shodě s naší studií, kde byl medián OPG u artrotických kloubů 12,651 pg/ml (tab. 3). Je také zajímavé, že ačkoliv Andersson a spol. použili k detekci cytokinů komerční ELISA kity (podobně jako my), RANKL v artrotickém kloubu vůbec nede-tektovali (2).

V souvislosti s vystupňovaným zánětem, proliferací pseudosynovialis a vznikem granulomu lze očekávat lokální hypoxii a prostředí, které silně ovlivňuje složení výpotku. Výpotek selhávající TEP by tak mohl přímo ovlivňovat regulační rovnováhu v kostní multicelulární jednotce. Podle konečného výsledku, tj. převahy resorpce nad novotvorbou, by měly být postiženy především osteoblasty. Vliv výpotku ze selhávajících TEP byl již studován na primární kultuře lidských osteoblastů. Andersson a spol. zjistili, že výpotek z asepticky uvolněných endoprotéz tlumil osteoblasty a měl antiproliferační efekt (1). V této souvislosti jsme testovali vliv kloubních výpotků na životnost dobře definované buněčné linie osteoblastů SaOS-2. Přestože toxicita nebyla mezi jednotlivými skupinami signifikantně odlišná, výsledky nelze interpretovat jednoznačně. Ve skupině selhávajících TEP bylo u 15 výpotků zaznamenáno snížení životnosti SaOS-2 při 10% ředění, zatímco 13 vzorků viabilitu naopak zvýšilo (graf 2b). Andersson a spol. uvádějí, že výpotky artrotických pacientů mají převážně stimulační účinek na primární osteoblasty. Jejich výsledky však nejsou také jednoznačné, protože u 10 vzorků došlo ke stimulaci proliferace, zatímco u dvou výpotků došlo naopak k inhibici proliferace (1). Možným vysvětlením je, že celkový účinek výpotku závisí na vzájemném zastoupení různých látek (cytokinů, růstových faktorů apod.), tedy že jeden výpotek může obsahovat vyšší množství stimulujících faktorů a druhý naopak zvýšené množství inhibujících faktorů. Z uvedeného vyplývá, že naši hypotézu nemůžeme jednoznačně potvrdit, ale ani vyvrátit. Možným řešením by bylo rozšířit soubor pacientů a detailněji analyzovat složení výpotků.

Dřívější studie referovaly asociaci mezi tkáňovou expresí cytokinů a periprotetickou osteolýzou (29). Avšak prací, které by korelovaly vztah mezi hladinami cytokinů ve výpotku a rozsahem kostního defektu, je

velmi málo. Například Clarkeová a spol. podobně jako my, nezjistila žádný vztah mezi hladinami vybraných cytokinů a velikostí periprotetické radiolucence (7). Jedním z vysvětlení může být také to, že námi zvolená klasifikace kostních defektů neodráží dostatečně citlivě skutečný objem kostní resorpce, tj. velikost osteolýzy. Obě klasifikace jsou především terapeutické a nemají ambici vyjadřovat přesný rozsah kostních ztrát. Podobně není se závažností kostních defektů totožné radiologické hodnocení rozsahu radiolucence, které obvykle vede k podceňování kostních ztrát. Otázkou také zůstává, jak se projeví na koncentraci cytokinů fáze selhávání TEP, potažmo okamžik odběru. Předpokládá se, že exprese cytokinů není kontinuálně konstantní, spíše jde o jakési vlny a především posloupnost regulačních drah (23). Tak například TNF- α a IL-1 β jsou typické iniciační, startovací cytokiny, zatímco RANKL je klasickou terminální molekulou.

ZÁVĚR

Na základě výsledků naší studie nelze potvrdit hypotézu o přímém toxickém působení výpotku ze selhávající kloubní náhrady na osteoblasty. Vzhledem k některým faktům uvedeným v diskusi však není z naší studie možné vyvozovat ani závěr, že se kloubní výpotek vůbec neuplatňuje chemicky, nýbrž pouze mechanicky. Mnohem pravděpodobnější je vzájemně propojené působení obou složek v neprospěch periprotetické kosti. Naopak koncentrace RANKL a OPG ve výpotku byly v souladu s pracovní hypotézou. Poměr RANKL/OPG v kloubním punktátu je možné považovat za biochemický korelát pokročilé fáze aseptického uvolnění.

Literatura

- ANDERSSON, M. K., ANISSIAN, L., STARK, A., BUCHT, E., FELLANDER-TSAI, L., TSAI, J. A.: Synovial fluid from loose hip arthroplasties inhibits human osteoblasts. *Clin. Orthop.*, 378: 148–154, 2000.
- ANDERSSON, M. K., LUNDBERG, P., OHLIN, A., PERRY, M. J., LIE, A., STARK, A., LERNER, U. H.: Effects on osteoclast and osteoblast activities in cultured mouse calvarial bones by synovial fluids from patients with a loose joint prosthesis and from osteoarthritis patients. *Arthritis Res. Ther.*, 9: R18, 2007.
- ASPENBERG, P., VAN DER VIS, H.: Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis. Particles are not the only thing. *Acta orthop. scand.*, 69: 1–4, 1998.
- ASPENBERG, P., VAN DER VIS, H.: Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin. Orthop.*, 352: 75–80, 1998.
- BERAUDI, A., STEA, S., CREMONINI, S., VISENTIN, M., TONI, A.: Assessment of five interleukins in human synovial fluid as possible markers for aseptic loosening of hip arthroplasty. *Artif. Organs*, 33: 538–543, 2009.
- BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254, 1976.
- CLARKE, S. A., BROOKS, R. A., HOBBY, J. L., WIMHURST, J. A., MYER, B. J., RUSHTON, N.: Correlation of synovial fluid cytokine levels with histological and clinical parameters of primary and revision total hip and total knee replacements. *Acta orthop. scand.*, 72: 491–498, 2001.
- DENNIS, D. A., BERRY, D. J., ENGH, G., FEHRING, T., MacDONALD, S. J., ROSENBERG, A. G., SCUDERI, G.: Revision total knee arthroplasty. *J. Amer. Acad. Orthop. Surg.*, 16: 442–454, 2008.
- FLECHER, X., ROLLAND, C., RIXRATH, E., ARGENSON, J. N., ROBERT, P., BONGRAND, P., WENDLING, S., VITTE, J.: Local and systemic activation of the mononuclear phagocyte system in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *J. Clin. Immunol.*, 29: 681–690, 2009.
- GALLO, J., KOLAR, M., DENDIS, M., LOVECKOVA, Y., SAUER, P., ZAPLETALOVA, J., KOUKALOVA, D.: Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol.*, 31: 97–104, 2008.
- GALLO, J., RASKA, M., MRAZEK, F., PETREK, M.: Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. *Physiol. Res.*, 57: 339–349, 2008.
- GOODMAN, S. B., KNOBLICH, G., O'CONNOR, M., SONG, Y., HUIE, P., SIBLEY, R.: Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*, 31: 421–428, 1996.
- GUPTA, S. K., CHU, A., RANAWAT, A. S., SLAMIN, J., RANAWAT, C. S.: Osteolysis after total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty*, 22: 787–799, 2007.
- HAYNES, D. R., CROTTI, T. N., POTTER, A. E., LORIC, M., ATKINS, G. J., HOWIE, D. W., FINDLAY, D. M.: The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J. Bone Jt Surg.*, 83-B: 902–911, 2001.
- HENDRIX, R. W., WIXSON, R. L., RANA, N. A., ROGERS, L. F.: Arthrography after total hip arthroplasty: a modified technique used in the diagnosis of pain. *Radiology*, 148: 647–652, 1983.
- LANDOR, I., VAVŘÍK, P., JAHODA, D., POKORNÝ, D., POPELKA, S., SOSNA, A.: Ovládné implantáty v problematice revizí totálních náhrad kyčelních kloubů. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 462–472, 2009.
- MANDELIN, J., LILJESTROM, M., LI, T. F., AINOLA, M., HUKKANEN, M., SALO, J., SANTAVIRTA, S., KONTTINEN, Y. T.: Pseudosynovial fluid from loosened total hip prosthesis induces osteoclast formation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 74: 582–588, 2005.
- MANLEY, M. T., D'ANTONIO, J. A., CAPELLO, W. N., EDIDIN, A. A.: Osteolysis: a disease of access to fixation interfaces. *Clin. Orthop.*, 405: 129–137, 2002.
- NIVBRANT, B., KARLSSON, K., KARRHOLM, J.: Cytokine levels in synovial fluid from hips with well-functioning or loose prostheses. *J. Bone Jt Surg.*, 81-B: 163–166, 1999.
- POKORNÝ, D., ŠLOUF, M., DYBAL, J., ZOLOTAREVOVÁ, E., VESELÝ, F., JAHODA, D., VAVŘÍK, P., LANDOR, I., ENTLICHER, G., SOSNA, A.: Nová metoda kvantifikace otěrových částic UHMWPE v okolí kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 374–381, 2009.
- SABOKBAR, A., RUSHTON, N.: Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties. *J. Arthroplasty*, 10: 810–816, 1995.
- SALEH, K. J., HOLTZMAN, J., GAFNI, A., SALEH, L., DAVIS, A., RESIG, S., GROSS, A. E.: Reliability and intraoperative validity of preoperative assessment of standardized plain radiographs in predicting bone loss at revision hip surgery. *J. Bone Jt Surg.*, 83-A: 1040–1046, 2001.
- SHANBHAG, A. S., KAUFMAN, A. M., HAYATA, K., RUBASH, H. E.: Assessing osteolysis with use of high-throughput protein chips. *J. Bone Jt Surg.*, 89-A: 1081–1089, 2007.
- SCHMALZGRIED, 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: 849–863, 1992.

25. SIEUWERTS, A. M., KLIJN, J. G., PETERS, H. A., FOEKENS, J. A.: The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Europ. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 33: 813–823, 1995.
26. SOSNA, A., RADONSKÝ, T., POKORNÝ, D., VEIGL, D., HORÁK, Z., JAHODA, D.: Polyetylenová nemoc. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 70: 6–16, 2003.
27. TAKEI, I., TAKAGI, M., IDA, H., OGINO, T., SANTAVIRTA, S., KONTTINEN, Y. T.: High macrophage-colony stimulating factor levels in synovial fluid of loose artificial hip joints. *J. Rheumatol.*, 27: 894–899, 2000.
28. TAKEI, I., TAKAGI, M., SANTAVIRTA, S., IDA, H., HAMASAKI, M., ISHII, M., FUKUSHIMA, S., OGINO, T., KONTTINEN, Y. T.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *J. Biomed. Mater. Res.*, 45: 175–183, 1999.
29. VEIGL, D., NIEDERLOVA, J., KRYSTUFKOVA, O.: Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiol. Res.*, 56: 455–462, 2007.
30. WANG, C. T., LIN, Y. T., CHIANG, B. L., LEE, S. S., HOU, S. M.: Over-expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials*, 31: 77–82, 2010.

Doc. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz

Studie byla podpořena prostředky z výzkumných závěrů MŠ
č. 6198959223 a MŠM č. 6198959216.