

Metoda MORF pro sledování velikostí a tvarů otěrových mikro- a nanočástic UHMWPE v periprotetických tkáních

MORF Method for Assessment of the Size and Shape of UHMWPE Wear Microparticles and Nanoparticles in Periprosthetic Tissues

P. FULÍN¹, D. POKORNÝ¹, M. ŠLOUF², M. LAPČÍKOVÁ², E. PAVLOVA²,
E. ZOLOTAREVOVÁ³

Na práci spolupracovali: G. Entlicher³, D. Jahoda¹, A. Sosna¹

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

² Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha

³ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

ABSTRACT

PURPOSE OF STUDY

Aseptic loosening of total joint replacement (TJR) due to wear of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) is regarded as one of the major problems in the field of arthroplasty. This work describes a newly developed method, called MORF, which completely describes the morphology of UHMWPE wear particles. The differences in wear particle morphology may help to elucidate individual differences in TJR failures.

MATERIAL AND METHODS

During the years 2002–2010, a set of 47 typical damaged periprosthetic tissues, coming from 16 TJR revisions, was collected. Isolated on polycarbonate (PC) filters were quantified. Quantification of the particles consisted in determination of their concentration and description of their morphology by means of the newly developed MORF method. Firstly, the micrographs of isolated UHMWPE particles were obtained with a scanning electron microscope (Quanta 200 FEG; FEI) at two magnifications: x1200 and x6000. Secondly, both high- and low-magnification micrographs were processed by a standard image analysis software (program NIS Elements; Laboratory Imaging) in order to obtain basic morphological descriptors. Finally, the results from image analysis of high- and low- magnification micrographs were combined by means of our own program MDISTR in order to obtain correct particle sizes and shapes.

RESULTS

In the first stage, the method was applied to 25 samples and yielded an average particle size of 0.51 μm . In the second stage, the method was further improved in order to calculate not only the size of particles but also the shape of descriptors. The improved method was applied to eight samples and gave an average size of particles (equivalent diameter, D) in the range of 0.27 – 0.60 μm , circularity (C) of 0.66–0.85 and elongation (E) of 1.75–1.79, suggesting that the great majority of particles were approximately spherical. Finally, in the third stage, the MORF method was applied to two exceptional samples which contained extremely small wear particles (D = 18.5 nm and 21.2 nm). The shape of these small wear nanoparticles (C = 0.97 and 0.93; E = 1.29 and 1.35) was even more spherical than that of wear microparticles described above. This was one of the first two studies which proved the presence of UHMWPE wear nanoparticles in vivo.

DISCUSSION

Our newly developed MORF method described in this contribution yields both size and shape descriptors of UHMWPE wear particles, with sizes from 0.1 to 10 μm , which are regarded as most biologically active. The main objective of the method is to yield the highest accuracy. This is achieved by parallel analyses of high- and low-magnification micrographs taken of the same sample. In the end, the two analyses are combined together in order to obtain the correct and complete size and shape description of all particles in the sample. The morphology of UHMWPE wear particles influences TJR lifetime both directly (size and shape of the particles is related to their biological activity) and indirectly (for the given total volumetric wear, size and shape of the particles influence their concentration, which is associated with the biological response of the organism).

CONCLUSION

The authors have developed a new method which yields a complete description of the size and shape of UHMWPE wear particles in periprosthetic tissues. The method, which was called MORF, can be applied to studies of TJR failures and also used to evaluate the quality of different UHMWPE components of TJR. The method is quite universal and therefore can be used not only for analyses of wear particles, but also for other types of particles, such as microparticles in polymer blends or inorganic/metallic nanoparticles.

Key words: UHMWPE, wear debris, total joint replacement, morphology of wear particles.

ÚVOD

Vznik polyetylenového agresivního granulomu, který působí osteolýzu a aseptické uvolnění kloubních náhrad, je aktivován přítomností otěrových částic polyetylenu v měkkých periprotetických tkáních. Tvar a velikost UHMWPE částic úzce souvisí s mechanismy jejich vzniku (7, 11, 18, 22, 30). Obecně se předpokládá, že největší schopnost aktivace nežádoucí biologické kaskády (biologickou aktivitu) mají částice o velikosti v rozsahu 0,1–10 µm (5, 15, 21, 23).

Cílem této práce je **popis nové metody**, nazvané MORF (název metody je odvozen od slova morfologie), vyvinuté autory práce, která slouží nejen k určování prosté velikosti částic, ale rovněž k popisu jejich tvaru, který nepochybně značně ovlivňuje jejich biologickou aktivitu (2, 16, 30), a tedy následně i rozsah nežádoucí destrukce kostního lůžka kloubní náhrady (20). Oproti dřívějším metodám umožňuje rychlejší a přesnější analýzu většího počtu vzorků.

MATERIÁL A METODA

Odběry vzorků periprotetických tkání

V letech 2002–2010 bylo na I. ortopedické klinice 1. LF UK při 16 reimplantacích TEP odebráno 47 vzorků periprotetických tkání, které vykazovaly typický vzhled polyetylenového granulomu (4, 30, 31). U všech pacientů, u kterých byl odběr proveden, byla zdokumentována anamnéza a rentgenové snímky operovaného kyčelního kloubu. Odebrané tkáně byly rozděleny u TEP kyčle podle místa odběru tak, aby to odpovídalo rentgenologickým zónám dle Gruena a DeLee (30). U TEP kolena byly tkáně rozděleny na tkáně v okolí femorální komponenty a tibialní komponenty.

Bezprostředně po odběru byly tkáně zmrazeny a následně ve zmraženém stavu předány k izolaci na pracoviště Přírodovědecké fakulty UK a poté ke kvantifikaci na pracoviště Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

Izolace otěrových částic ze vzorků

V této práci popisujeme optimalizovanou verzi našeho izolačního postupu včetně jeho finální modifikace, která umožňuje současně určovat jak celkové množství, tak velikosti a tvary částic.

Všechny kapaliny používané během izolace byly předem filtrovány, aby byly odstraněny nerozpustné nečistoty. Destilovaná voda, 2-propanol (isopropanol, iPrOH) a 65% HNO₃ přes 10 a 0,1 m polykarbonátovou (PC) membránu (Millipore). 12 mol/l KOH byl filtrován přes 10 a 0,1 m teflonovou (PTFE) membránu (Millipore). Zmražené vzorky odebrané tkáně byly nejprve lyofilizovány. Z každého vzorku bylo odebráno 0,3 g suché tkáně a následně dvakrát delipidovány 10 ml směsí chloroform-methanol (2:1, objem/objem) po dobu 12 hod. Po odstranění delipidační směsi byly zbytky rozpouštědel odstraněny sušením při 60°C.

Každý suchý delipidovaný vzorek byl hydrolyzován za občasného promíchání 5 ml 65% HNO₃ při laboratorní teplotě po dobu 24 hod. Vzhledem k tomu, že poly-

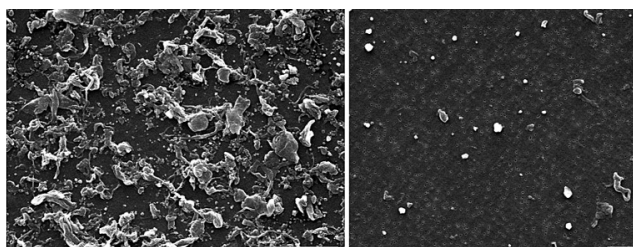
etylenové částice neklesají ke dnu byla pro izolaci vždy odpipetována a použita jen vrchní 2 ml vrstva. Zbylá spodní část suspenze byla odsáta a dále nepracována. Vrchní 2ml vrstva byla poté promyta dvakrát 5ml 65% HNO₃ a pětikrát 8 ml destilované vody. Po každém promytí byla vždy jen vrchní 2ml vrstva použita pro další čištění, spodní vrstva byla odsáta. Všechny vzorky byly před oddělením vrchní 2ml vrstvy promíchány na vortexu (vibrační třepače), homogenizovány ultrazvukem (sonikovány) 2 min (sonikace použita jen při promývání vodou; Ultrasonic Procesor UP 100H Hielscher se sonotrodou Micro tip MS3, podmínky: 30kHz, amplituda 180 m, hustota akustického výkonu 460 W/cm²) a centrifugovány (2000 x g 5 min). Během třetího promývání vodou byly vzorky neutralizovány 12 mol/l KOH.

Výsledné 2 ml suspenze otěrových částic byly smíchány s 2 ml isopropanolu (iPrOH); tyto 4 ml suspenze byly 5 min sonikovány a okamžitě filtrovány přes 10 m PC membránu (Millipore) do kalibrované polypropylenové zkumavky. Původní zkumavka byla dvakrát promyta 0,5 ml iPrOH a takto získaná suspenze byla rovněž filtrována přes stejnou 10 m membránu. Nakonec byla membrána promyta 1 ml iPrOH. Posléze bylo 6 ml filtrátu (suspenze obsahující otěrové částice menší než 10 m) promícháno na vortexu. Z této suspenze byly odebrány 4,5 ml a filtrovány přes 0,1 m PC membránu (Millipore). Membrána byla opět promyta 1 ml iPrOH. Tato membrána se zachycenými částicemi o velikosti 0,1–10 m byla použita ke stanovení koncentrace částic (vzorek A) (17, 28). Ze suspenze obsahující otěrové částice menší než 10 m byly dále odebrány 0,2 ml a filtrovány přes další 0,1 m PC membránu. I tato membrána byla promyta 0,5 ml iPrOH a předána na Ústav makromolekulární chemie AV ČR, kde byla použita pro stanovení morfologie otěrových částic (vzorek B). Zbylých 1,3 ml suspenze bylo ponecháno v záloze, případně použito pro stanovení koncentrace pomocí rozptylových metod (vzorek C), (25, 28).

Kvantifikace otěrových částic

Vstupní vzorky pro kvantifikaci. Výsledkem izolačního postupu jsou izolované částice UHMWPE ve třech formách: (A) PC membrána pokrytá vysokou koncentrací PE částic, (B) PC membrána pokrytá nízkou koncentrací PE částic a (C) zbylé PE částice v suspenzi. Z každé odebrané tkáně tedy máme k dispozici vzorky typu A, B i C pro kvantifikační metody. Díky použitým filtrům vždy zachycujeme částice o velikostech 0,1–10 µm, které jsou považovány za biologicky nejaktivnější (3, 9, 15, 21, 23). V dalším kroku jsme zmíněné vzorky využili ke **kvantifikaci** otěrových částic UHMWPE, neboli k určení **koncentrace** (celkového množství vztaženého na gram suché tkáně) a **morfologie** (velikostí a tvarů) částic.

Stanovení koncentrace otěrových částic. Koncentraci otěrových částic UHMWPE lze nejlépe zjistit analýzou shora popsanych vzorků typu A (tj. PC membrán pokrytých PE částicemi o vysoké koncentraci, obr. 1a) pomocí metod SEMq (12, 25, 33) a IRc (17, 28). Alternativně je možné použít i vzorky typu C (tj. suspenze

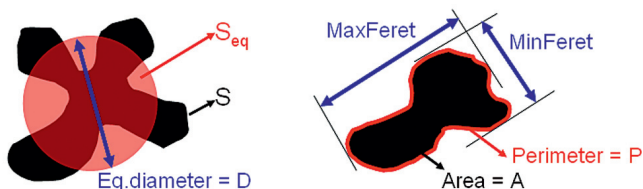


Obr. 1. SEM mikrofotografie PC membrán pokrytých izolovanými otěrovými PE částicemi: a – vzorek A, membrána s vysokou koncentrací PE částic; b – vzorek B, membrána s nízkou koncentrací PE částic.

PE částic) pro metodu LSc (29). Popis všech výše uvedených metod (LSc, SEMq, IRc) pro stanovení koncentrace otěrových částic UHMWPE lze dohledat v našich předchozích studiích (17, 25, 28, 29, 33).

Stanovení morfologie otěrových částic. Morfologii otěrových částic UHMWPE (neboli charakteristiku jejich velikosti a tvaru) lze nejlépe zjistit analýzou shora popsaných vzorků typu B (tj. PC membrán pokrytých PE částicemi o nízké koncentraci, obr. 1b) **pomocí metody MORF.** V prvním kroku byly PC membrány s PE částicemi vodivým lepidlem připevněny na kovový držáček vzorků a pokryty 4nm tenkou vrstvou platiny ve vakuové naprašovačce (Vacuum sputter coater SCD 005, Balzers). Ve druhém kroku byly membrány pozorovány v rastrovacím elektronovém mikroskopu (Quanta 200 FEG, FEI) ve vysokém vakuu (10-3 Pa) za použití detektoru sekundárních elektronů (SE detektor) při urychlovacím napětí 10–30 kV (urychlovací napětí bylo přizpůsobováno podle citlivosti preparátu). Pro každý vzorek byly nasnímány dvě sady SEM mikrofotografií: nejméně 4 mikrofotografie při nízkém zvětšení (1200 x) a nejméně 4 mikrofotografie při vyšším zvětšení (6000 x). Ve třetím kroku byla každá jednotlivá mikrofotografie zpracována standardním komerčním programem pro obrazovou analýzu (NIS Elements, Laboratory Imaging), přičemž pro každou částici byly určeny **tři morfologické deskriptory** (obr. 2):

1. průměr – Equivalent diameter (D);
2. kruhovost – Circularity (C);
3. prodloužení – Elongation (E).



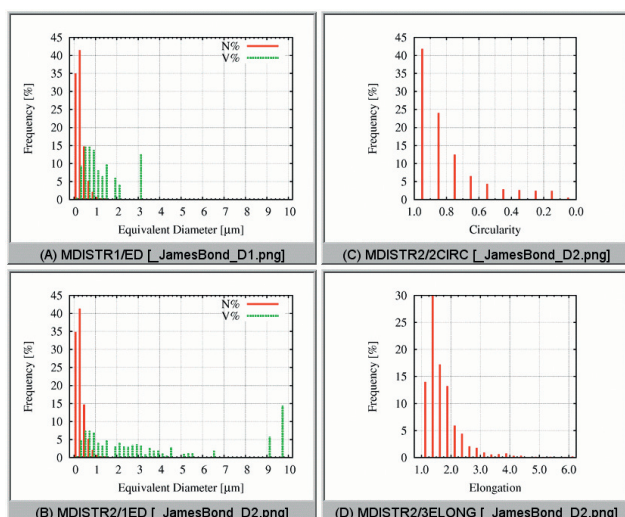
Obr. 2. Morfologické deskriptory otěrových částic. Vpravo: ekvivalentní průměr částice (Equivalent diameter, D) je roven průměru kruhové částice, jejíž plocha (Seq) je ekvivalentní s plochou původní částice (S). Vlevo: kruhovost (C) je definována jako 4π násobek plochy částice (A) lomený druhou mocninou obvodu částice (P). Prodloužení (E) je definováno jako podíl maximálního průměru (MaxFeret) a minimálního průměru (MinFeret) částice (průměr je rozměr částice promítnutý do daného směru).

Stručně lze shrnout, že deskriptor D udává průměrnou velikost částice v μm , zatímco deskriptory C a E charakterizují tvar částice (C nabývá hodnoty 1 pro kruhové částice a nižších hodnot pro částice protažené; deskriptor E nabývá hodnoty 1 pro kruhové částice a vyšších hodnot pro částice protažené).

Ve čtvrtém a posledním kroku byly výsledky jednotlivých obrazových analýz spojeny dohromady pomocí programu MDISTR, konkrétně jeho modulem MORF.PE. Program MDISTR/MORF.PE dokáže matematicky korektním způsobem spojit výsledky standardních obrazových analýz (tj. deskriptory D, C, E) z jednotlivých mikrofotografií (tj. z mikrofotografií s vysokým i nízkým zvětšením), přičemž z mikrofotografií s vysokým zvětšením bere malé částice a z mikrofotografií s nízkým zvětšením bere velké částice. Hranici mezi malými a velkými částicemi lze programu předat jako parametr, pro daná zvětšení se v praxi nejlépe osvědčila hodnota 2 μm . Důvodem oddělení vyhodnocování malých a velkých otěrových částic je skutečnost, že biologicky aktivní částice UHMWPE s velikostmi 0,1–10 μm mají rozsah velikostí dva řády, takže největší částice se na mikrofotografie s vysokým zvětšením téměř nevejdou, zatímco nejmenší částice na mikrofotografiích s nízkým zvětšením prakticky nejsou vidět. Celý výpočetní postup nazýváme **matematická filtrace částic**. Alternativně by bylo možno použít skutečnou, fyzickou filtraci částic, takže bychom vzorek rozdělili filtrací na dvě části, z nichž první by obsahovala jen malé a druhá jen velké částice. Nevýhodou fyzické filtrace částic jsou ovšem experimentální chyby, kterým se u tak malých částic nelze zcela vyhnout. Otěrové částice UHMWPE mají totiž velkou tendenci ulpívat na stěnách nádob při skladování, přelévání i filtracích, jak lze snadno experimentálně ověřit. Celý trik s matematickou filtrací tedy stručně řečeno spočívá ve skutečnosti, že se vyhneme experimentálními chybám spojeným s fyzickou filtrací částic a analyzujeme velké a malé částice v rámci jednoho vzorku prohlédnutého při dvou různých zvětšeních. Nahrazení fyzických filtrací matematickou rovněž výrazně zrychlí celou metodu. Zpracování jednoho vzorku (od odběru až do získání výsledků) trvá přibližně 7 dnů.

VÝSLEDKY

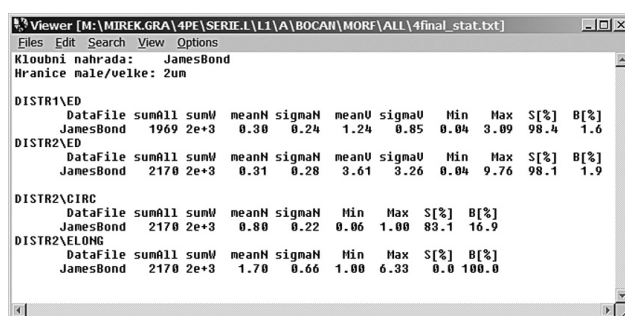
Hlavní grafický výstup programu MDISTR/MORF.PE ukazuje velikosti a tvary částic ve vzorku ve formě histogramů (obr. 3). Histogramy v levé polovině (obr. 3a, b) ukazují číselné distribuce velikostí částic (červené sloupce) a objemové distribuce velikostí částic (zelené sloupce). Číselné distribuce velikostí udávají, jaký je ve vzorku počet částic dané velikosti, zatímco objemové distribuce velikostí udávají, jaký je ve vzorku objem částic dané velikosti. Jelikož větší částice mají podstatně větší objem než částice malé (objem roste se třetí mocninou velikosti), projeví se na číselných distribucích velikostí především částice malé (kterých je v typických vzorcích otěrových částic UHMWPE většina), zatímco na objemových distribucích velikostí se



Obr. 3. První výstup metody MORF: grafický výstup z programu MDISTR/VOL.PE. a – číselná a objemová distribuce velikostí ořetrových částic D, počítaná pouze z mikrofotografií s vysokým zvětšením; b – přesnější číselná a objemová distribuce velikostí ořetrových částic D, počítaná z mikrofotografií s vysokým i nízkým zvětšením; c – číselná distribuce kruhovosti (circularity) ořetrových částic C; d – číselná distribuce prodloužení (elongation) ořetrových částic E. Jméno pacienta, které program automaticky uvádí do popisu obrázků, je fiktivní.

projeví především částice velké (kterých bývá sice méně, ale jejich objem je podstatně větší). Levý horní histogram (obr. 3a) ukazuje výsledky založené pouze na mikrofotografiích s vysokým zvětšením (takový obrázek lze snadno získat i ze standardního komerčního softwaru a program MDISTR/MORF.PE ho počítá jen pro kontrolu). Levý dolní histogram (obr. 3b) ukazuje výsledky založené na kombinaci výsledků z mikrofotografií s vysokým i nízkým zvětšením (na takovém obrázku je na první pohled mnohem přesnější, „neuseknutá“ objemová distribuce velikostí ořetrových částic; jde o hlavní výstup této části programu MDISTR/MORF.PE). Histogramy v pravé polovině (obr. 3c,d) ukazují deskriptory C a E popisující tvary částic, přičemž v obou histogramech jsou rovnou započteny výsledky z mikrofotografií s vysokým i nízkým zvětšením. Oba deskriptory, C a E, popisují podobnou věc – kulatost částic. Pro kulaté částice platí $C = E = 1$. Pro nekulaté se hodnota C postupně snižuje až k nule a hodnota E se zvyšuje až k nekonečnu. Histogramy C (obr. 3c) a E (obr. 3d) tudíž ukazují, jaké je zastoupení kulatých a nekulatých částic ve vzorku.

Hlavní číselný výstup programu MDISTR/VOL.PE (obr. 4) tvoří seznam morfologických deskriptorů, které přísluší histogramům popisujícím velikosti a tvary částic. První odstavec výstupu odpovídá histogramu na obr. 3a (velikost D), druhý histogramu na obr. 3b (přesnější velikost D), třetí histogramu na obr. 3c (kruhovitost–C) a konečně čtvrtý odstavec histogramu na obr. 3d (prodloužení–E). Z (obr. 4) je zřejmé, že dostáváme obsáhlou řadu čísel, která podrobně charakterizují ořetrové částice.



Obr. 4. Druhý výstup metody MORF: číselný výstup z programu MDISTR/VOL.PE. D = ED = průměr částic, C = CIRC = kruhovost, E = ELONG = prodloužení, sumAll = celkový počet analyzovaných částic, sumW = součet statistických vah analyzovaných částic, meanN = střed číselné distribuce, počítaný jako aritmetický průměr číselné distribuce, sigmaN = šířka číselné distribuce, počítaná jako směrodatná odchylka číselné distribuce, meanV = střed objemové distribuce, počítaný jako aritmetický průměr objemové distribuce, sigmaV = šířka objemové distribuce, počítaná jako směrodatná odchylka objemové distribuce, Min = minimální nalezená hodnota, Max = maximální nalezená hodnota, S[%] = procento částic < 1, B[%] = procento částic ≥ 1. Jméno pacienta (DataFile) je fiktivní.

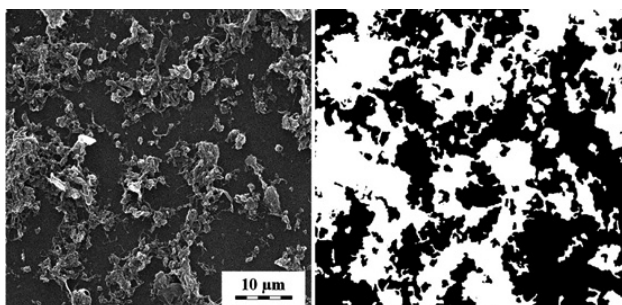
FÁZE VÝVOJE METODY

Fáze A.

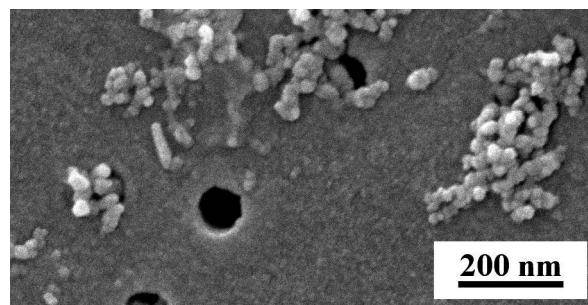
První fáze vývoje metody MORF a SEMq (25) zpracovala sérii, která zahrnovala celkem 6 pacientů, z nichž 3 prodělali revizi TEP kolena a 3 prodělali revizi TEP kyčle. Při revizích byly odebrány poškozené tkáně z celkem 25 různých zón z okolí TEP. Ačkoli zmíněná studie se soustředila na popis izolačních postupů a metody SEMq, v doplňkových experimentech byly studovány též průměrné velikosti (D) izolovaných částic UHMW-PE; morfologické deskriptory C a E, popisující tvary částic, nebyly určeny – naše metodika to v té době ještě neumozňovala. Průměrná velikost částic ve všech 25 zónách činila 0,51 µm, zóna s nejmenšími pozorovanými částicemi vykazovala průměrnou velikost ořetrových částic 0,30 µm a zóna s největšími pozorovanými částicemi poskytla průměrnou velikost částic 0,70 µm. Hlavním výstupem této série vzorků byl nicméně vývoj metody SEMq, jejíž hlavní částí je semi-automatický převod SEM mikrofotografií na černobílé, tzv. binární obrazy, ze kterých lze následně vyhodnotit obsah částic ve vzorku (25, obr. 5). Binární obrazy získané podobným postupem se poté využívaly i v metodě MORF.

Fáze B.

Ve druhé fázi byla metoda MORF dále zdokonalena a zpřesněna, což již umožnilo charakterizovat nejen průměr velikosti částic (D), ale též deskriptory tvaru C a E. Pomocí zdokonalené metody MORF byly popsány ořetrové částice odebrané z celkem 6 revizí TEP kyčelního kloubu a 2 revizí TEP kolenního kloubu (tab. 1). Průměrné velikosti částic D se pohybovaly v rozmezí 0,27–0,60 µm. Hodnoty deskriptoru C se pohybovaly v intervalu 0,66–0,85 a hodnoty deskriptoru E oscilovaly v intervalu 1,55–2,03 (graf 1).



Obr. 5. Konverze SEM mikrofotografie (vlevo) na binární obraz (vpravo), který je vhodný pro softwarové zpracování pomocí metod SEMq a MORF.



Obr. 6. Mikrofotografie PC membrány s UHMWPE částicemi, dokazující přítomnost nanočástic UHMWPE v periprotetické tkáni pacienta s aseptickým uvolněním TEP kyčelního kloubu.

Tab. 1. Přehled souboru 2. fáze vývoje metody MORF. Označení vzorků H-hip, K-knee. D – průměrná velikost částic, C – kruhovost, E – prodloužení.

Vzorek	TEP	In vivo (roky)	D (μm)	C	E
H1	Duraloc/Enduron	11	0,31	0,80	1,70
H2	Poldi	16,6	0,40	0,85	1,55
H3	Poldi	10,1	0,58	0,67	2,03
K1	Walter Motorlet	20,5	0,60	0,69	1,84
H4	ABG (Howmedica)	8,5	0,30	0,67	1,75
H5	ABG (Howmedica)	9	0,27	0,68	1,79
H6	Poldi/Ultima	8	0,33	0,66	1,77
K2	PFC	8	0,31	0,68	1,76

Fáze C.

V průběhu prací na vývoji metody jsme zachytili díky příznivé shodě okolností dva výjimečné případy periprotetických tkání, které obsahovaly neobvykle malé otěrové částice UHMWPE s průměrnou velikostí $<0,05 \mu\text{m}$ (obr.6) (12). V obou našich vzorcích pocházely tkáně z revizí TEP kyčelního kloubu. U všech zmíněných veličin (D, C, E) byl určen střed číselné distribuce velikostí μ (vypočtený jako aritmetický průměr) a šířka číselné distribuce velikostí (vypočtená jako směrodatná odchylka). Pro velikosti částic D vyšly průměrné velikosti $\mu = 18,5$ a $21,2 \text{ nm}$ s poměrně úzkými distribucemi $\sigma = 5,3$ a $8,0 \text{ nm}$, což potvrzovalo neobvykle malé rozměry a nepřítomnost větších otěrových částic ve

vzorku. Pokud jde o tvary částic, průměrné hodnoty deskriptoru C se jen málo lišily od jedné ($\mu = 0,97$ a $0,93$), podobně jako průměrné hodnoty deskriptoru E ($\mu = 1,29$ a $1,35$), což v souladu se SEM mikrofotografiemi ukazovalo, že drtivá většina částic má izometrický, víceméně sférický tvar.

DISKUSE

Velikosti částic

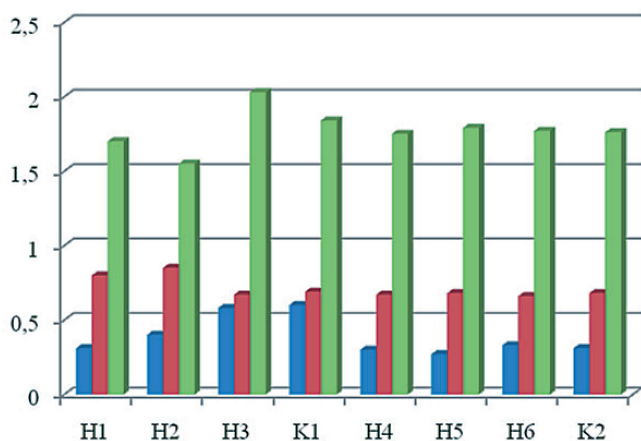
Naměřené hodnoty průměrných velikostí částic jsou v dobré shodě s literaturou (1, 8, 10, 13, 14, 16, 24, 33). Objev otěrových nanočástic UHMWPE in vivo byl poměrně překvapivý a prokázal existenci otěrových nanočástic in vivo jako první na světě, prakticky současně se studií britských výzkumníků (19).

Obtíže spojené s kvantifikací otěrových částic UHMWPE

Pojem kvantifikace otěrových částic UHMWPE v periprotetických tkáních zahrnuje jednak stanovení koncentrace částic (celkové množství částic vztahované na jednotkovou hmotnost tkáně), jednak stanovení morfologie částic (velikosti a tvary otěrových částic). V domácí i cizí literatuře se často hovoří jen o kvantifikaci bez dalšího upřesnění, což zpravidla vede k nejasnostem. V každém případě platí, že při zkoumání vlivu otěrových částic UHMWPE na selhání TEP je třeba vzít do úvahy jak koncentraci částic, tak i morfologii částic (2, 16, 30).

Pokud jde o stanovení morfologie částic, nelze využít světelných mikroskopů (Light microscope, LM) kvůli nepatrným rozměrům částic, které jsou pod rozlišovací schopností LM, ale lze využít elektronových mikroskopů (např. rastrovací elektronový mikroskop – SEM) nebo mikroskopů z rastrovací sondou (např. mikroskop atomárních sil – AFM). V praxi se nejvíce využívá SEM mikroskopů, které v případě otěrových částic UHMWPE dosahují vyšších rychlostí a přesností stanovení. Na mikroskopii SEM je založena i naše metoda MORF, která je popsána výše.

Hlavním smyslem celého postupu MORF je dosáhnout co nejlepší přesnosti, takže namísto rozdělení vzorku skutečnou filtrací na více částí (která je u tak malých částic nevyhnutelně zdrojem chyb), se využívá paralelní analýzy velkých a malých částic v rámci jednoho



Graf 1. Graf výsledků měření 2. fáze vývoje metody MORF. D – průměrná velikost částic, C – kruhovost, E – prodloužení.

vzorku, což lze považovat za jakousi fiktivní, matematickou filtraci částic (která je mnohem přesnější, protože ve skutečnosti pracujeme s jedním a tím samým vzorkem, který nemusíme fyzicky dělit).

Výhody a nevýhody metody MORF

Z hlediska vědecké přesnosti a správnosti výsledků má metoda MORF dvě hlavní výhody:

1. metoda je optimalizována tak, aby v daném vzorku přesně kvantifikovala malé i velké otěrové částice současně;
2. metoda byla vyvinuta tak, aby minimalizovala experimentální chyby, čili se nepokouší fyzicky oddělovat nepatrná množství vzorku, ale místo toho používá matematického postupu, který umožňuje provést analýzu velkých a malých částic současně.

Metoda MORF má i jedno omezení – je optimalizovaná na částice s velikostmi 0,1–10 μm . Toto omezení je dáno způsobem izolace částic, při které používáme polykarbonátové filtry o velikosti pórů 10 μm k odstranění nečistot a polykarbonátové filtry o velikosti pórů 0,1 μm k finálnímu zachycení otěrových částic. Tudíž částice >10 μm jsou odfiltrovány a částice <0,1 μm z větší části filtrem protečou, i když v některých případech se jejich významnou frakci také podaří zachytit (12). Ovšem 0,1 μm a 10 μm filtry nebyly vybrány náhodou. Nepřítomnost částic >10 μm není stěžejní, neboť jejich počet ve vzorku bývá ve srovnání s menšími částicemi naprosto zanedbatelný a navíc mají velké částice mnohem nižší biologickou aktivitu (2, 16, 30), což znamená, že jejich vliv na poškození tkání v okolí TEP je mnohem menší. Nepřítomnost většiny částic <0,1 μm by také neměla hrát zásadní roli a to ze tří důvodů: (a) z praktického hlediska je třeba si uvědomit, že s analýzami takto malých částic se začalo teprve v poslední době (12, 19) a přesto byly dosažené výsledky v zásadě ve shodě s ortopedickými nálezy a (b) práce z poslední doby ukazují, že množství takto malých částic ve vzorcích je velmi malé (12, 19) a navíc na selhání TEP mají vliv spíše mikročástice než nanočástice <0,1 μm (17).

Výstupy pro klinickou praxi

V klinické praxi se denně setkáváme s případy opotřebení artikulárních komponent kloubních náhrad, u některých typů UHMWPE materiálů vidáme opotřebení podstatně dříve ve srovnání s jinými. A současně i mezi typy implantátů, které považujeme na základě klinického pozorování za spolehlivé, se občas vyskytne případ výrazně rychlejšího opotřebení a osteolýzy (4, 6, 32). Není zde třeba opakovat chronicky známé skutečnosti, které mají vliv na opotřebení implantátu. Morfologická analýza otěrových částic MORF však opět zásadně posouvá možnosti jejich definice u větších souborů pacientů (na rozdíl od prostého měření mikroskopického obrazu), různých typů implantátů, aloplastiky různých kloubů, ale i některých výjimečných případů opotřebení.

V současnosti byly naší pracovní skupinou dokončeny metody, umožňující detailní popis vlastností nových i explantovaných UHMWPE komponent. Charakteristiku otěrových částic, získané metodou MORF proto v při-

pravovaných publikacích budeme moci přímo korelovat se zjištěnými vlastnostmi explantovaných komponent konkrétních případů selhání kloubních náhrad.

ZÁVĚR

1. Autoři vyvinuli novou metodu pro určování morfologie otěrových částic UHMWPE v tkáňových vzorcích z okolí TEP. Metoda byla nazvána MORF a zahrnuje pět přesně definovaných kroků: 1) odběry poškozených tkání obsahující otěrové částice UHMWPE, 2) izolace částic UHMWPE z tkáňových vzorků, 3) zobrazení izolovaných částic UHMWPE pomocí elektronové mikroskopie, 4) standardní měření velikostí a tvarů částic na mikrofotografiích a 5) finální zpracování výsledků pomocí programu MDISTR. Výsledkem metody je velmi podrobný popis velikostí i tvarů otěrových částic.

2. Metoda MORF byla vyvíjena a optimalizována několik let. V průběhu vývoje byla aplikována na řadu vzorků poškozených tkání z okolí TEP, odebíraných na pracovišti I. ortopedické kliniky 1. LF UK a FN Motol. Byly detekovány částice o průměrných velikostech kolem 0,5 μm nebo menších, což je v dobré shodě se současnými poznatky. Kromě toho byly pomocí metody MORF vůbec poprvé na světě (12) detekovány i otěrové nanočástice UHMWPE s velikostmi pod 0,05 μm in vivo; přítomnost otěrových nanočástic in vivo byla prakticky současně prokázána i další, nezávislou skupinou výzkumníků (19).

3. Metoda MORF poskytuje komplexní popis velikostí a tvarů otěrových částic UHMWPE v poškozených tkáních v okolí TEP, takže může sloužit jako nástroj k vysvětlení a dalšímu studiu příčin selhání kloubních náhrad. Kromě toho bylo prokázáno, že kromě celkové koncentrace částic (celkového množství uvolněných otěrových částic na gram tkáně) má na spuštění zánětlivých reakcí a tím i na selhání TEP vliv též morfologie otěrových částic (14, 23, 24). Je tudíž pravděpodobné, že pomocí metody MORF bude možno vysvětlit individuální rozdíly při selhání TEP s obdobným celkovým/volumetrickým otěrem.

4. Program MDISTR, který je součástí metody vyvinuté metody MORF, je univerzálně použitelný nejen pro analýzy otěrových částic UHMWPE z poškozených tkání v okolí TEP, ale i pro analýzy dalších typů částic, například částic v polymerních směsích (26) nebo kovových nanočástic (27).

Poděkování

Autoři děkují doc. MUDr. J. Gallovi, Ph.D., z Ortopedické kliniky Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí vzorků granulomů z okolí TEP kyčle Howmedica. Otištění barevné dokumentace je dotováno z prostředků grantového projektu.

Otištění barevné dokumentace je dotováno z prostředků grantového projektu.

Literatura

1. CAMPBELL, P., DOORN, P., DOREY, F., AMSTUTZ, H. C.: Wear and morphology of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles from total hip replacements. *Proc. Inst. Mech. Eng.*, H 210: 167–174, 1996.
2. COLLIER, J. P., MAYOR, M. B., MCNAMARA, J. L., SURPRENANT, V. A., JENSEN, R. E.: Analysis of the Failure of 122 Polyethylene Inserts from Uncemented Tibial Knee Components. *Clin. Orthop.*, 273: 232–242, 1991.
3. FANG, H. W., HO, Y. C., YANG, C. B., LIU, H. L., HO, F. Y., LU, Y. C., MA, H. M., JUANY, C. H.: Preparation of UHMWPE particles and establishment of inverted macrophage cell model to investigate wear particles induced bioactivities. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 68: 175–187, 2006.
4. GALLO J., LANDOR I., ČECHOVÁ I., JAHODA D.: TEP kyčle s hydroxyapatitovým povrchem – porovnání výsledků. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 75: 339–346, 2008.
5. GALLO, J., SLOUF, M., GOODMAN, S. B.: The relationship of polyethylene wear to particle size, distribution, and number: A possible factor explaining the risk of osteolysis after hip arthroplasty. *J. Biomed. Mater. Res., Part B: Appl. Biomater.*, in press; DOI: 10.1002/jbm.b.31638.
6. GALLO J., SMIZANSKÝ M., RADOVÁ L., POTOMKOVÁ J.: Porovnání léčebných postupů používaných v terapii infekce kloubních náhrad kyčle a kolena. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 302–309, 2009.
7. GALLO, J., ZDARILOVÁ, A., RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A., ULRICHOVÁ, L., RADOVÁ, L., SMIZANSKÝ, M.: Výpotky asepticky selhávajících TEP kyčlí a kolenní nejsou toxické pro osteoblasty. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 416–424, 2010.
8. HIRAKAWA, K., BAUER, T. W., STULBERG, B. N., WILDE, A. H.: Comparison and quantification of wear debris of failed total hip and knee arthroplasty. *J. Biomed. Mater. Res.*, 31: 257–263, 1996.
9. INGHAM, E., FISCHER, J.: The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials*, 26: 1271–1286, 2005.
10. KOSEKI, H., MATSUMOTO, T., ITO, S., DOUKAWA, 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.
11. LANDY, M. M., WALKER, P. S.: Wear of Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene Components of 90 Retrieved Knee prostheses. *J. Arthropl.*, 3-Suppl: 73–85, 1988.
12. LAPCIKOVA, M., SLOUF, M., DYBAL, J., ZOLOTAREVOVA, E., ENTLICHER, G., POKORNY, D., GALLO, J., SOSNA, A.: Nanometer size wear debris generated from ultra high molecular weight polyethylene in vivo. *Wear*, 266: 349–355, 2009.
13. MABREY, J. D., AFSAR-KESHMIRI, A., MCCLUNG, G. A., PEMBER, M. A., WOOLDRIDGE, T. M., MAULI AGRAVAL, C.: Comparison of UHMWPE particles in synovial fluid and tissues from failed THA. *J. Biomed. Mater. Res.*, 58: 196–202, 2001.
14. MALONEY, W. J., SMITH, R. L., 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. MATTHEWS, J. B., BESONG, A. A., GREEN, T. R., STONE, M. H., WROBELSKI, B. M., FISHER, J., INGHAM, E.: Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52: 296–307, 2000.
16. McKELLOP, H. A., CAMPBELL, P., PARK, S. H., SCHMALZRIED, T. P., GRIGORIS, P., AMSTUTZ, H. C., SARMIENTO, A.: The Origin of Submicron Polyethylene Wear Debris in Total Hip Arthroplasty. *Clin. Orthop.*, 311: 3–20, 1995.
17. POKORNÝ, D., ŠLOUF, M., VESELÝ, F., FULÍN, P., JAHODA, D., SOSNA, A.: Distribuce otěrových částic UHMWPE v periprotetických tkáních u TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 87–92, 2010.
18. POPELKA S., VAVŘÍK P., LANDOR I., HACH J., PECH J., SOSNA A.: Naše zkušenosti s náhradou hlezna AES. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 24–31, 2010.
19. RICHARDS, L., BROWN, C., STONE, M. H., FISHER, J., INGHAM, E., TIPPER, J. L.: Identification of nanometre-sized ultra-high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved in vivo. *J. Bone Jt Surg.*, 90-B: 1106–1113, 2008.
20. ROTH, A., SANDER, F., LAYHER, F., BABISCH, J., VENBROCKS R.: In Vivo Measurement of Polyethylene Wear in Cementless Total Hip Arthroplasty. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77: 13–17, 2010.
21. 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: 849–863, 1992.
22. SCHMALZRIED, T. P., JASTY, M., ROSENBERG, A., HARRIS, W. H.: Polyethylene Wear Debris And Tissue Reactions in Knee as Compared to Hip Replacement Prostheses. *J. Appl. Biomater.*, 5: 185–190, 1994.
23. SHANBHAG, A. S., JACOBS, J. J., BLACK, J., GALANTE, J. O., GLANT, T. T.: Macrophage/ Particle Interactions: Effect of size, Composition and Surface Area. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28: 81–90, 1994.
24. 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: 60–67, 1994.
25. SLOUF, M., EKLOVA, S., KUMSTATOVA, J., BERGER, S., SYNKOVA, H., SOSNA, A., POKORNY, D., SPUNDOVA, M., ENTLICHER, G.: Isolation, characterization and quantification of polyethylene wear debris from periprosthetic tissues around total joint replacements. *Wear*, 262: 1171–1181, 2007.
26. SLOUF, M., LAPCIKOVA, M., VLKOVA, H., PAVLOVA, E., HROMADKOVA, J.: Morphological characterization of particles with very broad size distributions using program MDIST, 14th European Microscopy Congress, EMC 2008, Germany, 1. 9. 2008–5. 9. 2008, Proceedings Vol. 1, p. 777–8.
27. SLOUF, M., PAVLOVA, E., BHARDWAJ, M., KONAK, C., PLES-TIL, J., ONDERKOVA, H., PHILIMONENKO, A. A., HOZAK, P.: Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size and their conjugation with antibodies. *Mater. Lett.*, submitted.
28. SLOUF, M., POKORNY, D., ENTLICHER, G., DYBAL, J., SYNKOVA, H., LAPCIKOVA, M., FEJFARKOVA, Z., SPUNDOVA, M., VESELY, 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.
29. SLOUF, M., SLOUFOVA, I., ENTLICHER, G., HORAK, Z., KREJCIK, M., STEPANEK, P., RADONSKY, T., POKORNY, D. & SOSNA, A.: New fast method for determination of numbers of UHMWPE wear particles. *J. Mater. Sci.- Mater. Med.*, 15: 1267–1278, 2004.
30. SOSNA, A., RADONSKÝ, T., POKORNÝ, D., VEIGL, D., HORÁK, Z., JAHODA, D.: Polyetylenová choroba. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 70: 6–16, 2003.
31. VESELÝ, F., NOVOTNÝ, K., SOSNA, A.: Záměna masivního heterotopického otěrového granulomu s aneurysmatem arteria iliaca externa. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 509–512, 2009.
32. WEISSINGER, M., HELMREICH, C., PÖLL, G.: Periprotetické zlomeniny v oblasti kyčelního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 76: 179–185, 2009.
33. ZOLOTAREVOVA, E., FEJFARKOVA, Z., ENTLICHER, G., LAPCIKOVA, M., SLOUF, M., POKORNY, D., SOSNA, A.: Can centrifugation affect the morphology of polyethylene wear debris? *Wear*, 265: 1914–1917, 2008.

Korespondující autor:

MUDr. Petr Fulín

1. ortopedická klinika 1. LF UK, FN Motol
V Úvalu 84,

150 06 Praha 5

E-mail: petrfulin@volny.cz

Tato práce vznikla v rámci řešení grantových projektů:
MŠMT 2B06096 a KAN200520704.