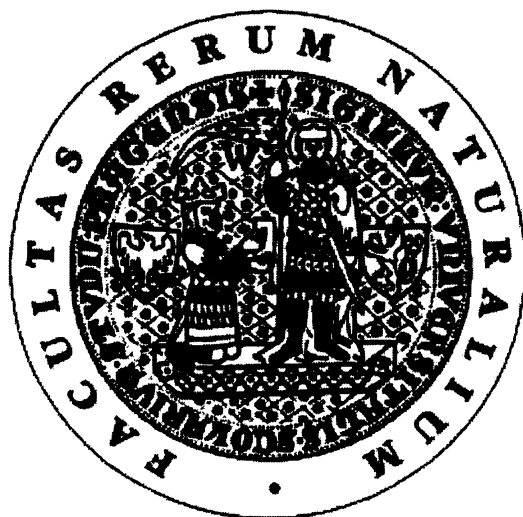


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE**



**IZOLACE A CHARAKTERIZACE  
POLYETHYLENOVÝCH OTĚROVÝCH ČÁSTIC**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Eva Zolotarevová

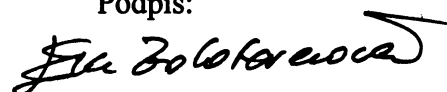
Školitelka: RNDr. Simona Eklová

PRAHA 2006

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky:  
RNDr. Simony Eklové a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 6.6.2006

Podpis:

Handwritten signature in black ink, appearing to read "Jana Zolotarevová". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Simoně Eklové z katedry biochemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy za pomoc a vedení při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Filipu Kaftanovi a Zlatě Fejfarkové za pomoc při izolaci částic a poskytnutí řady cenných informací.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat paní Marcelě Špundové z katedry biochemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy za ochotu a pomoc.

Tato práce byla vytvořena v rámci grantu GA 106/04/1118 s názvem „Sledování a minimalizace otěru ultravysokomolekulárního polyethylenu (UHMWPE) používaného pro kloubní náhrady“ poskytnutého Grantovou agenturou České republiky.

## **Cíl práce**

Cílem práce bylo podat ucelený přehled o možných způsobech izolace polyethylenových otěrových částic získaných při reoperacích endoprotéz kyčelního a kolenního kloubu, seznámit se s biologickými aktivitami polyethylenových částic v organismu a připravit tak teoretický základ pro následný vědecký výzkum v této oblasti. Dalším cílem bylo praktické provedení vybrané metody izolace spolu s navržením případných modifikací.

## Obsah

1.	Úvod	6
2.	Historie	6
3.	Typy endoprotéz	7
4.	Indikace aloplastiky kyčelního kloubu	9
4.1.	Koxartróza	10
4.2.	Ostatní indikace	11
5.	Materiály endoprotéz	12
5.1.	Kovy	12
5.1.1.	Reakce organismu na kov	12
5.2.	Keramika	12
5.3.	Plasty	13
5.3.1.	PTFE	13
5.3.2.	PETF	13
5.3.3.	PE	14
5.3.3.1.	UHMWPE	14
6.	Kostní cement	16
7.	Biologické aktivity	17
7.1.	Osteoklasty a osteoblasty	18
7.2.	Úloha makrofágů	20
7.2.1.	Odpověď makrofágů na otěrové částice „in vivo“	21
7.2.2.	Odpověď makrofágů na otěrové částice „in vitro“	25
7.2.3.	Velikost a tvar polyethylenových částic	26
8.	Analýza polyethylenových částic	28
8.1.	Rentgenová analýza	28
8.2.	Světelná mikroskopie	29
8.3.	Transmisní elektronová mikroskopie	29
8.4.	Infračervená spektroskopie	30
8.5.	Přehled izolací polyethylenových částic	31
9.	Izolace polyethylenových částic	35
10.	Výsledky	36
11.	Diskuse	39
12.	Závěr	40

## **Chemikálie**

Hydroxid sodný ( Lachema)

Chloroform (Lachema)

Kyselina dusičná (Lachema)

Methanol (Lachema)

Isopropanol (Lach-Ner)

## **Přístroje a materiály**

Filtrační zařízení skleněné FG25S (Whatman)

Membránová vývěva VM-20D (MEZ)

Polykarbonátové membrány 10,0  $\mu\text{m}$  (Whatman)

Polykarbonátové membrány 0,10  $\mu\text{m}$  (Whatman)

Vzorky granulomů (FN Motol, FN Olomouc)

## 1. Úvod

Možnost náhrady poškozeného kyčelního kloubu endoprotézou znamená pro milióny lidí na celém světě často jediný způsob, jak se vrátit zpět do normálního života bez bolesti a bez výrazných pohybových obtíží. Zejména v posledních letech vznikají nové typy endoprotéz, vyráběné novými špičkovými technologiemi. I operační technika se neustále zdokonaluje a je zároveň předmětem vědeckých diskusí. Rozšiřuje se škála kloubních postižení, která lze náhradou kloubu vyřešit. Se vzrůstajícím počtem pacientů s kloubní náhradou však narůstá také počet nutných reoperací endoprotéz. Tyto výkony se provádějí v případě selhání endoprotézy, jejího uvolnění z kostního lůžka či v případě infekční komplikace.

Polyethylenový otěr je v posledních desetiletích jednou z nejvíce diskutovaných otázek souvisejících se životností totálních náhrad kyčelního kloubu.

## 2. Historie

Autorem první náhrady kyčelního kloubu bývá uváděn Gluck (1890), který navrhl slonovinu k náhradě kyčelního kloubu a k fixaci kalafunu smíšenou s pemzou či sádrou. Při hledání vhodných materiálů byly postupně s různým úspěchem vyzkoušeny: zlaté fólie, „čepičky“ ze stříbra, magnezia, zinku a slonové kosti, „čepičky“ ze skla, pyrexového skla, viskaloidu a bakelitu, a „čepička“ z vitalia (chrom-kobaltová slitina). Vitalium bylo léta používáno pro výrobu Smith-Petersonovy „čepičky“. Tato slitina je i dnes využívána při výrobě hlaviček endoprotéz. Snahou však bylo nahradit celou hlavici i s krčkem jiným materiálem. Objevily se proto pokusy se slonovinou, ocelí, osakrylem, vitaliem a titanem. V této souvislosti však vyvstal problém vhodného ukotvení náhrady ve femuru. Byly vyzkoušeny dva způsoby. Buď byla nahrazena jen hlavice femuru a ukotvena v krčku (bratři R. aj. Judetové, 1946), nebo byl krčkový dřík ukotven navíc pomocnou dlahou k laterální části femuru ( P. Wiles, 1938, G. K. McKee, 1940), či do intermedulárně umístěného hřebu (R. K. Lippmann, 1951). Vývoj komponent, které se zavádějí do dutiny femuru, zahájili A. T. Moore a H. R. Bohlman (1940). A. T. Moore pak v roce 1951 zavedl velmi úspěšnou necementovanou cervikokapitální endoprotézu (nahrazena jen hlavice stehenní kosti), která měla otvory v dříku, do kterých vrůstala kostní tkáň a tím zabezpečovala přiměřenou stabilitu. Ve stejné době se začala vyvíjet endoprotéza, jež měla na kovovou femorální komponentu nasazenu plastovou hlavici (J.

Gosset, M. Lange, H. Rettig, 1950). Plastová hlavice měla zajistit snížení opotřebení kloubní chrupavky. Použitý polyetylen byl však nevhodný. G. K. McKee v roce 1940 navrhl první typ necementované náhrady s párováním kov-kov. [1, 2, 3]

Nový trend nastartoval v 60.letech J. Charnley, který použil párování kov-plast. Femorální komponenta byla z nerezavějící oceli a jamka z teflonu. Teflon Charnley v roce 1962 šťastně nahradil nízkotlakým vysokomolekulárním polyethylenem, který se používá dodnes.

V Čechách byly v 50.letech zpočátku aplikovány osakrylové endoprotézy bratří Judetů, teprve později Smithovy-Petersonovy „čepičky“ a necementované endoprotézy Moorovy. V 70.letech se začala rozvíjet technika endoprotéz především zásluhou profesora O. Čecha. V roce 1972 byla podle jeho návrhu vyrobena v Poldi SNOB Kladno první série totální náhrady kyčelního kloubu. Konstrukce této náhrady vycházela z Charnleyova typu. Byla řešena jako kombinace kov-vysokomolekulární polyetylen a určena k fixaci kostním cementem. V roce 1974 byla zahájena výroba druhé a v roce 1980 třetí generace tohoto typu. V roce 1974 byla poprvé vyrobena v sérii cervikokapitální náhrada v celokovovém provedení z kobaltové slitiny a souběžně tentýž typ z korozi-vzdorné oceli. Počátkem sedmdesátých let navrhl Pavlanský nový typ cervikokapitální náhrady kyčelního kloubu s pružným dříkem. Tato náhrada je určena k bezcementové fixaci. Hlavice je navržena z plastu a je točně uložena na krčku.

[1, 2, 3]

### **3. Typy používaných endoprotéz**

Každá endoprotéza kyčelního kloubu se skládá z tzv. dříku, který je zaveden do dřeňového kanálu stehenní kosti. Na krček tohoto dříku je nasazována hlavice. Ta musí vykazovat maximální hladkost, aby nezpůsobovala opotřebení polyetylenové vložky v kloubní jamce.

Umělé náhrady kyčelního kloubu můžeme z hlediska rozsahu náhrady rozdělit na čtyři skupiny:

1. povrchové, které nahrazují jen povrchovou kontaktní plochu hlavice stehenní kosti
2. cervikokapitální, kdy je nahrazena hlavice stehenní kosti jako jedna ze dvou komponent kyčelního kloubu



3. totální, která nahrazuje obě části kyčelního kloubu, tj. hlavici stehenní kosti (femuru) i pánevní jamku (acetabulum)
4. anatomické, nahrazující kromě hlavice ještě určitou část stehenní kosti

V současné době se zvyšuje spíše počet totálních náhrad. Především však záleží na celkovém zdravotním stavu operovaného a jeho schopnosti snést o něco větší operační zákrok.

Z hlediska použitého materiálu a způsobu ukotvení pak můžeme totální náhrady kyčelního kloubu rozdělit na dvě skupiny:

1. náhrady, které mají kluzné plochy vyrobeny z jednoho druhu materiálu:

- a) celokovové (tyto náhrady jsou na ústupu, neboť vykazují vysoký koeficient tření)
- b) keramické (jamka i hlavice jsou zhotoveny z oxidové keramiky, nevýhodou je nízká vrubová houževnatost a vysoký modul pružnosti)

2. náhrady kombinované:

- a) hlavice s dříkem je kovová a jamka je z plastu
- b) na kovovém dříku je nasazena hlavice z oxidové keramiky, jamka je z plastu
- c) dřík je vyroben z plastu a je vyztužen kovovým jádrem, na krčku je nasazena hlavice z kovu nebo oxidové keramiky, jamka je z plastu
- d) úplná celokovová náhrada, ale kovová jamka má vystýlku z plastu

Dalším rozlišujícím faktorem je způsob fixace endoprotézy ke kostnímu lůžku:

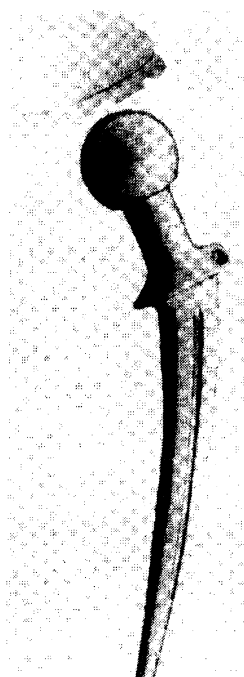
1. cementované, u kterých se používá tzv. kostní cement (methylmetakrylát)
2. necementované, jejichž povrchová úprava v místech kontaktu s kostí umožní fixaci bez cementu.

Se způsobem fixace souvisí také typ použité jamky. Jamky ukotvené pomocí cementu se skládají pouze z jedné, polyethylenové části; jamky bezcementové se skládají z kovové kotvící části, do které je vložena vložka z vysokomolekulárního polyethylenu. U necementovaných jamek kónického tvaru je pak fixace zajištěna lamelami, které na obvodu kotvící části tvoří závit a do acetabula jsou zašroubovány. U necementovaných

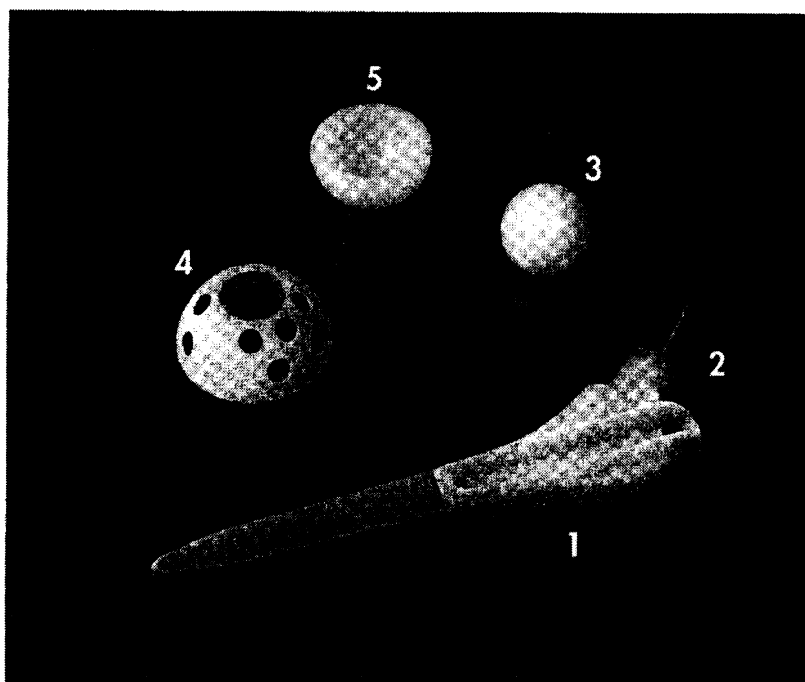
jamek sférického tvaru je kotvící část pevně zaražena do kostního lůžka, které musí být velmi přesně vyfrézováno. Povrch těchto jamek je navíc opatřen některým typem speciálního nástřiku, který zajistí postupný vrůst kostní tkáně. [1, 2, 4]

Obr.1.

A



B



Obr.1. : A: Klasická necementovaná endoprotéza, výrobce: firma Beznoska-Meditech

B: Necementovaná endoprotéza, výrobce: firma Walter

1-dřík, 2-krček dříku, 3-hlavička nasazovaná na krček, 4-umělá jamka-kotvící kovová část, 5-polyethylenová vložka [4]

#### 4. Indikace aloplastiky kyčelního kloubu

Mezi současné indikace cervikokapitálních endoprotéz patří:

1. zlomeniny a poúrazové stavy v oblasti krčku femuru u starších pacientů
2. tumory postihující hlavicí femuru

3. dočasné náhrady při komplikacích, které vznikly během implantace totální endoprotézy kyčle (zejména při náhlém zhoršení celkového stavu pacienta během operace)

Totální endoprotézy jsou indikovány u bolestivých nedostatečností a destrukcí kyčelního kloubu, u kterých jsou tyto nálezy:

1. primární koxartrosy (viz další odstavec)
2. druhotné koxarthrosy u vrozených a získaných vad a u nekrotické hlavičky
3. stavy zánětlivé i pozánětlivé: artritida, m.Bechtěrev
4. pouhrazové stavy
5. kostní nádory a jim podobné útvary

#### **4.1. Koxartróza**

Artróza kyčelního kloubu se nazývá koxartróza. Příčiny jejího vzniku je nejčastěji chronické přetížení a dědičné predispozice. Může postihovat jeden nebo oba kyčelní klouby. Projevuje se zpočátku námahovou bolestí, později bolestí při obvyklé zátěži chůzí, zejména jako bolest na začátku pohybu. Postupně je omezena rotace kyčelního kloubu a přidává se i bolest klidová.

Koxartróza může být tzv. primární nebo sekundární. Artróza je nejvýznamnějším onemocněním hyalinní chrupavky. Ta je u zdravého člověka složena z buněk – chondrocytů a kolagenních a elastických vláken a amorfní mezibuněčné hmoty. Chondrocyty syntetizují a produkují vláknitou mezibuněčnou hmotu. Hyalinní chrupavka je bělavě průhledná a ze 40 % se sestává z kolagenu (typu II), který tvoří kolagenní fibrily zalité v základní nestrukturované hmotě (matrix). Ty interagují s proteoglykany obsahujícími glykosaminoglykany (chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát a keratan sulfát). Glykosaminoglykany jsou kovalentně vázány k osovým proteinům proteoglykanů a současně jsou nekovalentně vázány k dlouhým molekulám kyseliny hyaluronové, které se nacházejí v základní hmotě. Vznikají tak proteoglykanové agregáty. Glukosaminoglykany se chovají jako polyanionty a tudíž jsou vysoce hydrofilní. Hydratované molekuly proteoglykanů fungují za normálního stavu jako perfektní biomechanická pružina. Příčinou primární osteoartrózy je metabolická porucha syntetické aktivity chondrocytů, která má za následek sníženou produkci matrix a její anomálie. Chrupavka měkne, snižuje se její výška a tvoří se v ní trhliny.

Sekundární koxartróza se většinou objevuje u pacientů s kloubní nepravidelností, která vznikla na základě tzv. vrozené displazie kyčelního kloubu nebo na základě traumatických změn. Při vzniku koxartrózy na základě vrozené kyčelní displazie jsou dalšími příznaky výrazný rozdíl délek končetin, eventuálně atypické postavení postižené končetiny a pánve. U primární koxartrózy se totální endoprotéza indikuje až v případě, že selhaly všechny možnosti konzervativní léčby. Ta spočívá v kombinaci nefarmakologických prostředků (zejména rehabilitace, redukce váhy, fyzikální léčby, chůze s oporou) s prostředky farmakologickými.

Pro léčbu osteoartrózy se nejčastěji používají analgetika, nesteroidní antirevmatika, chondroprotektiva a steroidní antirevmatika. Účinek nesteroidních antirevmatik je protizánětlivý a protiboletivý. Chondroprotektiva patří mezi tzv. pomalu působící léky, jejichž účinek nastupuje pomalu, ale přetrvává dlouhodobě. Příkladem je chondroitinsulfát a glukosaminsulfát, dále pak přípravky na podkladě diacerinu, které blokují tvorbu interleukinů. Ty se významně podílejí na odbourávání chrupavky i kosti. Ve formě mastí se používají preparáty s účinnými látkami odvozenými od kyseliny hyaluronové. Steroidní antirevmatika jsou preparáty ve formě intraartikulárních injekcí. V případě kyčelního kloubu se vzhledem k obtížné aplikaci používají méně než například u kolenního kloubu. [1, 2, 4]

## **4.2. Ostatní indikace**

Mezi zánětlivé a pozánětlivé stavy kyčelního kloubu řadíme nemoc Bechtěrevovu a artritidy. Bechtěrovovo onemocnění postihuje většinou oba klouby a proces ankylosy (vrůst hlavice stehenní kosti do acetabula) probíhá velmi rychle. V těchto případech je méně vhodné použití celokovových endoprotéz, u kterých je výrazně větší tendence k tvorbě osifikací. Mezi pouřazové stavy, u kterých je indikována endoprotéza, patří zejména následky po zlomeninách acetabula, krčku stehenní kosti, paklouby a nekrózy hlavice. Aloplastikou kyčelního kloubu řešíme nejenom stavy, při nichž je postižena nádorem hlavice a krček, ale i stavy časté lokalizace tumorů v oblasti proximální části stehenní kosti. Cervikokapitální protéza je vhodná jen u patologických zlomenin krčku. Pro nahrazení proximální části stehenní kosti se používá speciální totální endoprotéza, která umožňuje náhradu až poloviny délky stehenní kosti. [1, 2, 4]

## **5. Materiály endoprotéz**

### **5.1. Kovy**

Kovové materiály, které se pro výrobu implantátů používají, musí splňovat velké požadavky (vysoká odolnost proti korozi, dostatečná pevnost, netoxicity). V současné době se používají jednak ušlechtilé kovy, které jsou z elektrochemického hlediska stálé, jednak kovy, popřípadě jejich slitiny, které za určitých podmínek získávají elektrochemické vlastnosti ušlechtilých kovů, i když to není za všech podmínek natrvalo. V současné době jsou používány tyto základní materiálové typy:

- a) korozi-vzdorná ocel typu Cr-Ni-Mo
- b) slitina na bázi Co-Cr-Mo
- c) slitina na bázi Ti

[1, 2]

#### **5.1.1. Reakce organismu na kov**

Všechny změny ve tkáni způsobené zavedením kovového implantátu zahrnuje pojem metalóza. Zkoumány jsou jak reakce tkáně na kompaktní implantáty, tak i na jejich mikročástice, které přešly do tkáně následkem korozivního procesu nebo jako produkty tření. Jak uvedl již v roce 1908 Bayer, organismus se snaží každé cizí těleso izolovat od okolní tkáně a vytváří tak kolem něho vazivové pouzdro. Při vyšší hodnotě pH a současném překročení určité koncentrace iontů ve tkáni dochází k vylučování hydroxidu kovu. Vlivem organického prostředí však může dojít, a to i při nižším pH, k vyloučení těžko rozpustných organických solí. Ty se pak ukládají ve tkáni a mohou vést až k aseptické nekróze tkáně v okolí implantátu.

Reakce tkáně na produkty koroze přechází do určité míry z lokální na všeobecnou reakci. Retikulární buňky, jež jsou ve tkáni, mízních uzlinách, ve slezině a kostní dřeni, se aktivují. V tom okamžiku můžeme pozorovat všeobecné změny od místních bolestí až ke změně krevního obrazu a zvýšenému stupni sedimentace. [1, 2]

### **5.2. Keramika**

Pro aloplastiky se používá tzv. korundová keramika. Jde o čistý (99,7%), slinitý  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Zbytek tvoří MgO. Oxid hlinitý je jedním z nejstabilnějších oxidů. Otěr korundové

keramiky patří k nejnižším a na rozdíl od otěru plastů, který vyvolává menší či větší reakci, částice keramiky se chovají v těle inertně. Negativní vlastností keramiky je ale její nízká pevnost na ohyb. Zdá se, že nejvýhodnější použití tohoto materiálu je pro hlavici totální endoprotézy v kombinaci s polyethylenovou jamkou. [1, 2]

### **5.3. Plasty**

Molekuly makromolekulárních látek obsahují nejméně 1000 atomů, což odpovídá relativní molekulové hmotnosti asi 5000. Jsou známy makromolekuly s počtem atomů 1 000 000, což odpovídá molekulové hmotnosti asi 5 000 000. Rozdíl mezi nízkomolekulárními a vysokomolekulárními látkami je především v jejich rozdílných fyzikálně-chemických a mechanických vlastnostech. Vyšší molekulová hmotnost způsobuje zejména větší tažnost a houževnatost, odolnost proti korozi a snižuje náchylnost k tečení za studena. Dosud byly ve větším rozsahu použity pro výrobu endoprotéz tři druhy plastů: polytetrafluorethylen (teflon, PTFE), polyethyltereftalát (polyester, PET), polyethylen (PE). [1, 2]

#### **5.3.1. Polytetrafluorethylen**

Tento plast je šedobílý, termoplastický, voskovitého omaku. Je vysoce chemicky odolný (díky symetrické lineární struktuře a přítomnosti pevné vazby C-F). Má velmi dobrý koeficient tření. Při vyšších tlacích však snadno podléhá deformaci a opotřebení, neboť má velmi nízkou pevnost v tlaku. V roce 1958 ho Charnley použil pro výrobu jamky kyčelního kloubu, ale později bylo od jeho používání upuštěno pro krátkou životnost a nepříznivou reakci tkáně na částice otěru. [1, 2]

#### **5.3.2. Polyethyltereftalát**

Polyethyltereftalát má velmi dobré mechanické vlastnosti a je odolný vůči olejům a tukům. Je dlouhodobě stálý a má malý koeficient tření. Na přelomu šedesátých a sedmdesátých let se hojně používal pro výrobu umělých jamek, zvláště díky možnosti sterilizace varem bez nebezpečí deformace. Po třech letech se však od jeho používání upustilo. Důvodem bylo nadměrné opotřebení a velké množství produktů tření nalezených v okolí implantátů, které napomáhaly k uvolňování náhrad. [1, 2]

### 5.3.3. Polyethylen

Výchozí surovinou pro jeho výrobu je ethylen, který se získává z ropy. Polymerace však vyžaduje dokonalou čistotu ethylenu. Podle způsobu výroby, která určuje jeho vlastnosti, rozeznáváme polyethylen vysokotlaký, středotlaký a nízkotlaký. Nízkotlaký polyethylen vykazuje nejlepší mechanické vlastnosti. V současné době je nejpoužívanějším typem pro výrobu komponent kloubních náhrad ultravysokomolekulární polyethylen (UHMWPE).

Polyethylen byl jako materiál pro výrobu kloubní jamky zaveden do konstrukce endoprotézy v roce 1962 Charnleyem. Polyethylen měl nahradit již v té době nevyhovující polytetrafluorethylen a zpočátku byl považován za ideální materiál. V roce 1977 však Willert a Semlitsch publikovali práci, ve které poukázali na reakci organismu na částice polyethylenu vzniklé otěrem vedoucí k aseptickému uvolnění jednotlivých komponent. Cílem dalších studií bylo sledovat různé faktory výroby a sterilizace, které mají vliv na velikost otěru. Možností snížení otěru je vedle zlepšení jeho vlastností také párování s jinými než ocelovými hlavicemi (vitalium, keramika). [1, 2]

#### 5.3.3.1. Vysokomolekulární polyethylen (UHMWPE)

Tento v současné době nejpoužívanější typ polyethylenu je polymerem 71000 až 214000 skupin ethylenu s celkovou hmotností v rozmezí 2 až 6 milionů. Při výrobě prochází krystalickým procesem a má podobu prášku s částicemi menšími než 500 nanometrů. Prášek se dále lisuje do tří forem: tyče, plošné desky, jednotlivé výlisky. Dříve byl při výrobě přidávána příměs kalciumstearátu pro usnadnění opracování polyethylenu. Od tohoto postupu však bylo upuštěno, protože tato příměs zhoršovala mechanické vlastnosti a odolnost proti oxidaci polyethylenu.

Každá komponenta kloubní náhrady musí před samotnou aplikací projít procesem sterilizace. Ta ovlivňuje vlastnosti daného materiálu. Koncem 60.let byla zavedena sterilizace hotové polyethylenové jamky gama-zářením. V 90.letech bylo dokázáno, že produkty vznikající při procesu ozáření zvyšují otěr. Ozářením se totiž mohou některé C-C vazby rozštěpit a vznikají tak volné karbonové radikály (viz Obr.2. a, b), které jsou příčinou zvýšení otěru. Jinou variantou je, že se naopak vytvoří nové C-C vazby spojující vzdálenější části molekuly (viz Obr.2. c). Vzniká tak tzv. „low cross-linked“ polyethylen. Ten má pak lepší mechanické vlastnosti a je proti otěru odolnější. Jakmile však sterilizace probíhá za přítomnosti vzduchu, resp. kyslíku, dochází ke tvorbě volných

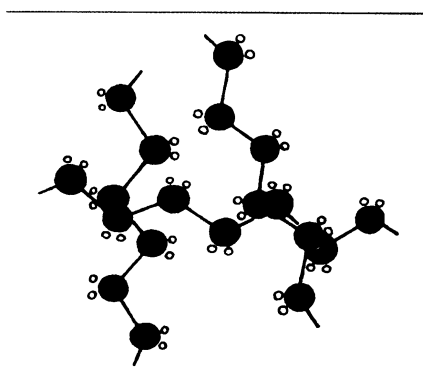
oxidovaných karbonových radikálů. Tento nežádoucí efekt výrazně zhoršuje odolnost polyethylenu proti otěru a tím zkracuje životnost jamek. Proto se v současné době výrobci polyethylenových komponent snaží sterilizovat hotové výrobky gama-zářením v inertním prostředí (dusík, argon).

Jiným způsobem sterilizace polyethylenových částí endoprotéz je sterilizace ethylenoxidem. Ten nezpůsobuje vznik příčných vazeb, které zvyšují odolnost polyethylenu, ale zároveň ani neovlivňuje původní mechanické vlastnosti polyethylenu. Dalším způsobem sterilizace je použití formaldehydu.

Od roku 1999 se v klinické praxi používají jamky z polyethylenu, který je sterilizován ozářením elektronovými paprsky v kombinaci s ohřívacím procesem. Takto připravený polyethylen je nazýván „highly cross-linked“ (viz Obr.2. d). Jeho otěr je v laboratorních podmínkách neměřitelný. [1, 2, 3]

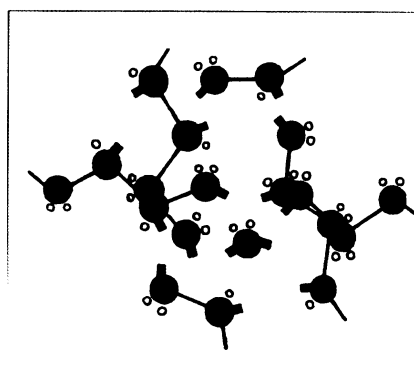
Obr.2.

a



a

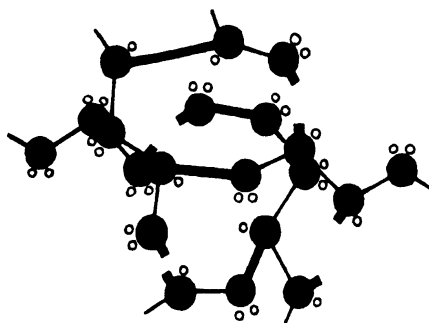
Vazby v neozářeném UHMWPE polyethylenu





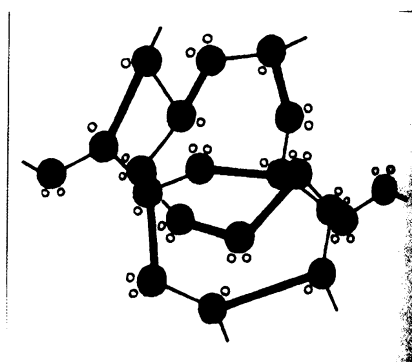
b Vznik volných karbonových radikálů z původních C-C vazeb v průběhu ozařování

c



c V průběhu ozařování náhodně vznikají nové tzv. příčné C-C vazby. Ostatní volné karbonové radikály mohou za přítomnosti kyslíku oxidovat, a tím se zhorší mechanické vlastnosti polyethylenu.

d



d Zahřátí v průběhu sterilizace způsobí eliminaci reziduálních volných karbonových radikálů vznikem dalších nových příčných C-C vazeb. To zlepšuje mechanické vlastnosti tzv. „vysoce zkříženého“ polyethylenu. [3]

## 6. Kostní cement

Kostní cementy jsou samotuhnoucí methylmetakryláty. Polymethylmetakrylát používaný k chirurgickým účelům vzniká polymerací, při které se slučují molekuly

nízkomolekulárních látek monomeru v makromolekulární útvary. Monomer je tekutý (roztok monomeru obsahuje: metakrylát stabilizovaný hydrochinonem, N,N-dimethyl-p-tolnidin, chlorofyl) a polymer se používá v podobě prášku (složení prášku: methylmetakrylátový polymer, oxid zirkoničitý jako rentgenokonstrastní látka, benzoylperoxid, chlorofyl). Kostní cement se připravuje polymerací pomocí iniciátorů - nejčastěji peroxidů. Polymerace smícháním tekutého monomeru a prášku polymeru se provádí vždy až během operace po ukončení opracování dutiny acetabula či proximálního femuru. [1, 2, 4]

## **7. Biologické aktivity polyethylenu**

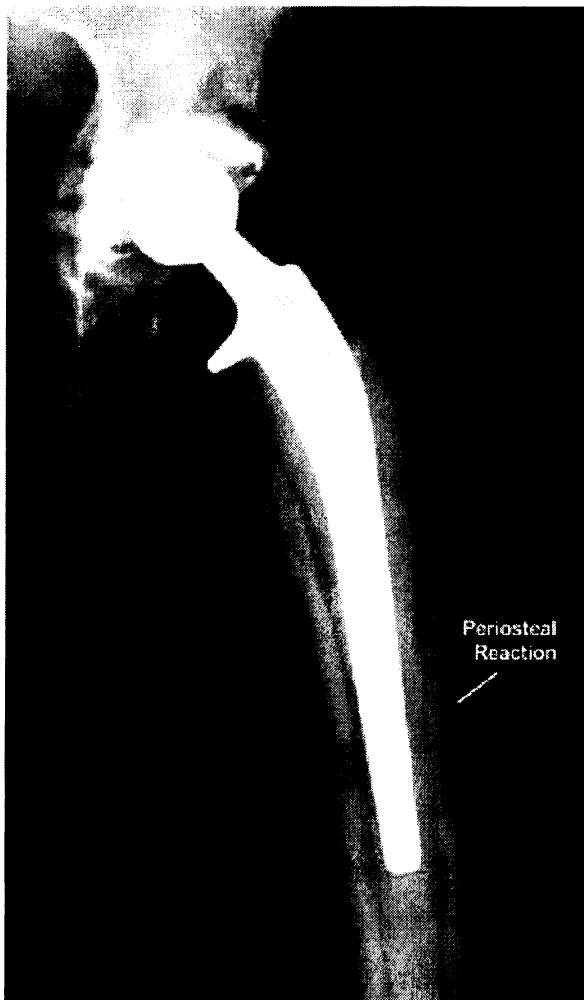
Organismus přijímá plastické hmoty jako cizorodý materiál. Po jejich implantaci se organismus snaží plasty ohraničit nebo eliminovat. Jestliže není plastická hmota z hlediska fyziologického a chemického dráždivá, pak ji organismus přijímá, opouzdřuje ji a dlouhodobě toleruje. Podmínkou vhojení je nepřítomnost nízkomolekulárních látek, které se používají buď pro přípravu plastických hmot, nebo k ovlivnění fyzikálně-mechanických vlastností vybrané základní hmoty. Následkem změny struktury a chemické stability plastu se mohou změnit jeho mechanické vlastnosti, a tím i zvýšit otěr, který bývá příčinou těžkých zánětlivých reakcí organismu.

Otěr je progresivní úbytek materiálu spojený s uvolňováním otěrových částic v důsledku relativního pohybu mezi dvěma protilehlými plochami za působení tlaku. Většinou se otěr týká měkčího ze dvou materiálů, které jsou v kontaktu. Otěr probíhá třemi různými mechanismy. Adhesivní otěr vzniká vazbou mikropovrchů protilehlých ploch, které jsou vystaveny tlaku. Při jejich pohybu dochází k odstraňování materiálu z povrchu plochy. Nerovnosti na tvrdším materiálu zapříčiňují abrasivní otěr. Tyto nerovnosti poškozují měkčí plochu a vyrývají z ní materiál. Únavový otěr vzniká při takových stavech, kdy lokální napětí překročí únavovou pevnost materiálu a dojde k jeho uvolňování z povrchu. Nejčastěji se pro měření otěru používá tzv. lineární otěr, který hodnotí postupné zanořování hlavice do nosné části jamky. V poslední době se uvádí, že by neměl být větší než 0,08 mm za rok. Lineární otěr je cca třikrát až desetkrát menší při párování keramika-polyethylen než při párování kov-polyethylen.

Výsledkem otěru jsou otěrové částice, které se hromadí v kloubu a lymfatickou cestou jsou transportovány do jeho blízkého okolí. Biologicky aktivní částice jsou fagocytovány makrofágy. Ty poté uvolňují sady cytokinů a jiných zánětlivých

mediátorů, které vedou k rozvoji zanícené tkáně bohaté na polyethylenové granulomy v okolí kosti. Jejich vystupňovaná tvorba vede k rozsáhlé kostní resorpci a následnému uvolnění implantátu. [3]

Obr.3.



Obr.3.: Rentgenový snímek uvolněné endoprotézy kvůli probíhající periosteální infekční reakci. [5]

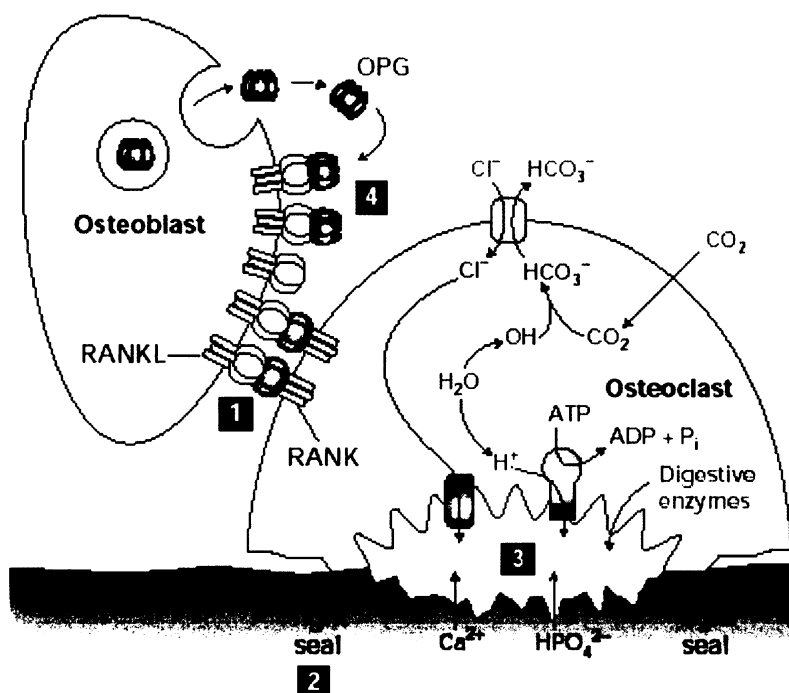
### 7.1. Osteoklasty a osteoblasty

Výsledky studie posledních dvaceti let dokazují, že osteolýza kosti a následné uvolnění implantátu je podmíněna přítomností osteoklastů. Osteoklasty jsou mnohоядерné, finálně difenciované buňky odvozené od hematopoetické progenitorové (pluripotentní) buňky linie monocytů/makrofágů, které degradují matrix kosti. Normální metabolismus kosti zahrnuje propojení dvou dějů: tvorbu nových kostních buněk ( tu zajišťují osteoblasty) a jejich odbourávání. Rovnováhu těchto dvou dějů reguluje signální komplex zprostředkovaný povrchovými receptory a cytokiny. Osteoblasty regulují

diferenciaci a funkci osteoklastů během normální obnovy kosti. Zvýšená aktivita osteoklastů byla zaznamenána i při onemocněních typu reumatoidní artritidy, aseptického ubývání kostní tkáně a onemocnění s postižením ozubice. Je pravděpodobné, že aktivita osteoklastů je při těchto onemocněních řízena podobnými mechanismy.

Osteoklasty jsou tedy typy makrofágů, které v plazmatické membráně (resp. v útvech zvaných podosomy) obsahují vysoce dynamické integriny (adherentní struktury). Zejména integrin  $\alpha\beta3$  (lokalizován také v podosomech) je nezbytný pro iniciaci vazby osteoklastu na povrch kosti. Osteoklast vytváří s povrchem kosti těsné spojení. Díky tomu se pak vytvoří otevřený extracelulární prostor, do něhož osteoklast produkuje velmi korozivní směs HCl a proteas, která ničí anorganickou složku kosti a proteiny kostní hmoty. Osteoklast pro transport  $H^+$  iontů do kosti využívá membránovou pumpu třídy V (protonová pumpa). Resorpce kosti osteoklasty je regulována mezibuněčnou interakcí s osteoblasty, které sekretují kolagen I. (hlavní organickou složku kosti). Osteoblasty exprimují trimerní povrchový signální protein RANKL (ligand pro RANK). Povrchový receptor pro RANKL označovaný jako RANK je povrchovým receptorem exprimovaným na povrchu osteoklastů. Interakci RANK-RANKL iniciuje signální kaskáda v osteoklastech (signalizační kaskáda NF- $\kappa$ B a TNF- $\alpha$ ). Tyto signály indukují aktivaci osteoklastů a jejich tvarovou změnu nutnou pro vytvoření těsného spojení s povrchem kosti. Osteoblasty také produkují rozpustný protein osteoprotegerin OPG, který chrání kost před resorpcí. OPG se váže na RANKL na povrchu osteoblastů, tím zabraňuje interakci RANK-RANKL, a tudíž i aktivaci osteoklastů ke kostní resorpci. [6] Tento proces shrnuje Obr.4.

Obr.4.



Obr.4.: Kostní resorpce a její regulace.

1-interakce RANK-RANKL indukovaná reorganizací cytoskeletu

2-těsné spojení mezi osteoklastem a povrchem kosti

3-osteoklast produkuje směs HCl a proteas

4-osteoblasty produkují OPG blokující interakci mezi RANK a RANKL

[6]

## 7.2. Úloha makrofágů

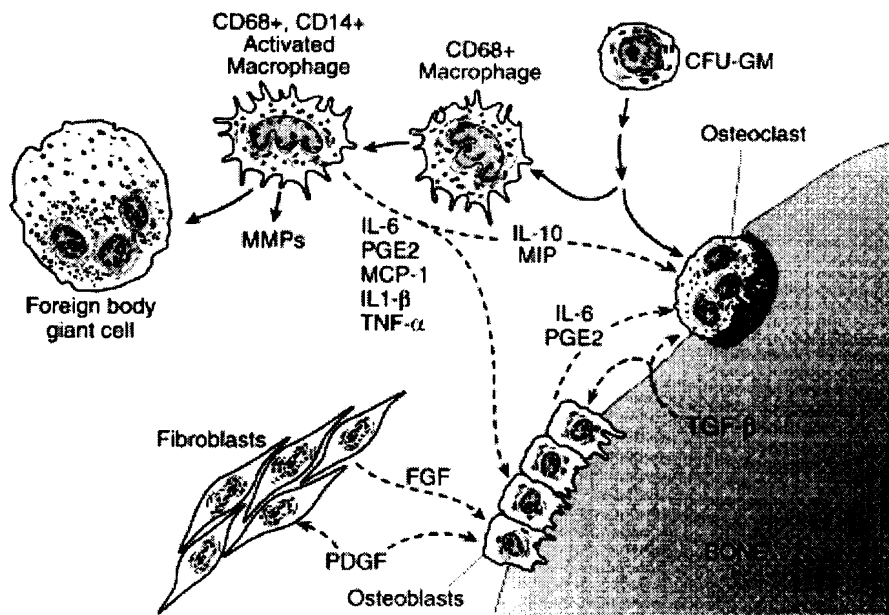
Částice otěru mohou být tvořeny vlivem otěru nebo koroze totální kloubní náhrady. Otěr, který vzniká pohybem tvrdé kovové nebo keramické hlavice proti kloubní jamce, produkuje UHMWPE částice. Po implantaci totální kyčelní endoprotézy se tvoří nové kloubní pouzdro nebo pseudosynoviální membrána. Fibrózní membrána podobná synoviální tkáni se také tvoří na rozhraní kost/cement v cementovaných endoprotézách 2-3 měsíce po operaci. Ačkoli by se tato membrána neměla tvořit u necementovaných implantátů, často byla při revizních operacích zjištěna přítomnost zesílené membrány s velkým počtem cév, které infiltrují do okolí implantátu velké množství makrofágů.

Koncentrace polyethylenových otěrových částic z periprotetické tkáně má přímý vztah k době, která uběhla od implantace. Je uváděno, že osteolýza se objevuje při překročení prahu počtu částic ve tkáni přes  $1 \times 10^{10}/g$ . [7]

### **7.2.1. Odpověď makrofágů na otěrové částice „in vivo“**

Jak již bylo zmíněno, osteolýza spojená s totální kyčelní náhradou je spjata s tvorbou granulomatózní periprotetické membrány bohaté na makrofágy a částice otěru implantátu. Přítomnost a aktivace makrofágů je stimulována přítomností částic UHMWPE. Klíčovým rysem při studiu těchto membrán jsou vysoce vaskularizované fibrózní tkáně bohaté na makrofágy, mnohjaderné velké buňky a otěrové částice. Makrofágy se spojují s částicemi o velikosti menší než mikrometr a s velkými buňkami tvořícími se kolem větších (nad  $10 \mu m$ ) částic. Analýza těchto membrán ukázala přítomnost velkého množství faktorů způsobujících zánět, buněčné dělení a resorpci kosti. V periprotetických tkáních byla dokázána přítomnost těchto cytokinů: TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ), IL-6 (interleukin-6), IL-8, IL-11, TGF- $\beta$ , PGE $_2$  (prostaglandin E $_2$ ), metalloproteinasy, kolagenáz, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), MIP-1 (macrophage inflammatory protein). Všechny tyto faktory mohou buď nepřímo vést ke ztrátám kostní tkáně stimulací aktivity osteoklastů (cytokiny), nebo přímo způsobovat odbourávání kosti (kolagenázy). IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  jsou považovány za důležité zánětlivé zprostředkovatele. Mají také důležitou roli v regulaci tvorby osteoklastů. IL-1 $\beta$  působí přímo na preosteoklasty a ukazuje se, že je důležitý v koordinaci signalizace mezi preosteoklasty a osteoblasty během tvorby osteoklastů. IL-6 má regulační funkci v udržování zánětlivé odpovědi v okolí implantátu, dále má nepříznivý vliv na proces remodelace kosti a může zprostředkovávat signalizaci mezi TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Receptor pro IL-6 je přítomen na povrchu makrofágů. Prostaglandiny (PGEs) jsou odvozeny od kyseliny arachidonové a stimulují či inhibují vývoj osteoklastů. To, zda budou osteoklasty stimulovány či inhibovány, závisí na množství a stupni jejich diferenciaci. [5] Některé z buněk a cytokinů jsou během této reakce zobrazeny na Obr.5.

Obr.5



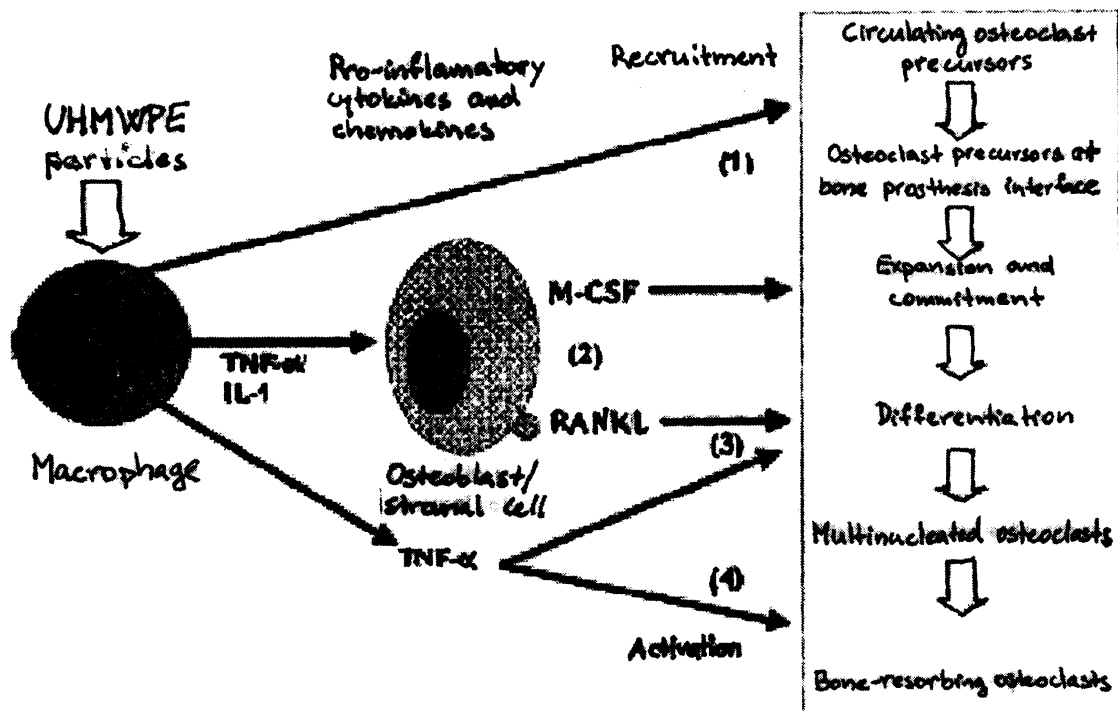
Obr.5.: Obrázek shrnuje některé z buněk a preinfekčních cytokinů způsobující kostní resopci [5]

Studie na zvířecích modelech umožnily stanovit přímý vztah mezi polyethylenovými částicemi, makrofágy a osteolýzou. Kim [8] ve své studii použil kontinuální infúzi polyethylenových částic (průměrné velikosti 2  $\mu\text{m}$ ) do kolenního kloubu krysy ke stimulaci produkce částic in vivo. Trvalo jen 6 týdnů, než se fibrózní tkáň dostala k dřeni kosti a nastala resopce kosti pod chrupavkou. Analýza granulomatózní tkáň ukázala výrazné zvýšení TNF- $\alpha$  mRNA již po 4 týdnech. Hodnoty mRNA pro IL-1 a IL-6 se výrazně nezvýšily. Studie na zvířatech tak vyhodnotily TNF- $\alpha$  jako klíčový cytokin osteolýzy. Merkel [9] pro svou studii použil myši s vyřazeným genem pro receptor p55TNF (TNFR1) a gen pro receptor p55TNF a p75 (TNFR2). Po 7 dnech začala probíhat resorpce kosti. Tkáň byla pozitivní (imunochemické značení) na TNF- $\alpha$ . Experiment byl zopakován s vyřazenými geny pro TNFR1 a TNFR2. Ačkoli se opět tvořila zánětlivá tkáň, k osteolýze nedocházelo. V jiné studii bylo použito rekombinantního receptoru TNF (antagonista, používaný při léčbě rheumatoidní arthritidy) k demonstrování schopnosti léků předcházet vzniku částicemi indukované osteolýzy [9]. Childs [10] dokázal na myších, že adenovirální genová terapie pomocí sTNFR:Fc (rozpuštěný inhibitor TNF- $\alpha$ ) zabránil otěrovými částicemi indukované osteolýze. Tyto studie vedly Schwarze [11] ke spuštění pilotní klinické studie. Někteří z dvaceti pacientů s vzniklou osteolýzou necementované totální endoprotézy kyčelního

kloubu (po více než 1 roce od operace) podstoupili anti-TNF terapii, jiní dostávali placebo. Nebyl zjištěn výrazný rozdíl mezi léčenými pacienty a pacienty, kteří užívali placebo.

Osteoklasty jsou odpovědné za resorpci kosti a jsou odvozeny od stejných progenitorů jako makrofágy. Některé z makrofágů mohou v periprotetické tkáni být diferenciovány v osteoklasty schopné způsobovat resorpci kosti. TNF- $\alpha$ /IL-1 produkované aktivovanými makrofágy hrají roli v diferenciaci prekursorů v zralých osteoklastech stimulací exprese RANKL (receptor activator of nuclear faktor kappa B ligand) a produkci M-CSF (macrophage colony stimulating factor) osteoblasty. TNF- $\alpha$  může zvyšovat diferenciaci prekursorů vzniklých pomocí RANKL, aktivovat zralé osteoklasty k resorpci kosti a zvýšit tak délku života osteoklastů. [7] Potenciální mechanismus shrnuje Obr.6.

Obr.6.



Obr.6.: Potenciální mechanismus makrofágy stimulované osteolýsy. 1-cytokiny a chemotaktické faktory mohou způsobit zvýšenou tvorbu haematopoetických prekursorů osteoklastů. 2-Makrofágová produkce TNF- $\alpha$  a IL-1 může vést k zvýšené expresi M-CSF a RANKL osteoblasty vedoucí k diferenciaci osteoklastů v zralé osteoklasty. 3-



TNF- $\alpha$  může způsobit diferenciaci prekursorů osteoklastů v přítomnosti RANKL-signalizace. 4-TNF- $\alpha$  může aktivovat zralé osteoklasty k resorpci kosti. [7]

Buněčný kontakt a nezbytná signalizace mezi prekurzory osteoklastů a osteoblasty jsou zajištěny pomocí ligandů nebo receptorů stromálních nebo osteoblastických buněk. Tyto faktory byly pojmenovány jako diferenciacní faktory osteoklastů a OPG-ligandy. Tyto byly označeny jako identické k TRANCE (TNF-related activation induced cytokine) a RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand). RANKL je nezbytný diferenciacní faktor osteoklastů, který stimuluje osteoklastogenezi a kostní resorpci vazbou na RANK na prekursoru osteoklastů a zralých osteoklastech. RANK a receptor pro RANKL na preosteoklastech jsou zástupci TNF receptor skupiny. Vysoké hladiny RANK byly nalezeny u pacientů s rheumatoidní artritidou. V těchto případech se předpokládalo, že T-lymfocyty jsou hlavním zdrojem RANKL. Avšak v okolních tkáních postižených osteolýzou po implantaci endoprotéz se T-lymfocyty téměř nevyskytovaly. Studie D.R.Haynese, T.N.Crottiho a H.Zreiqata [12] ukázala, že lidské monocyty mohou exprimovat RANKL mRNA. RANKL sám není dostačující k tvorbě osteoklastů z prekursorových buněk. RANKL je aktivován v přítomnosti M-CSF, který je nezbytný pro další život zralých osteoklastů i jejich prekursorů. Pokud jsou v okolí implantátu přítomny TNF- $\alpha$  a IL- $\beta$  ve velkém množství, mohou indukovat tvorbu osteoklastů bez přítomnosti RANKL. Interakce RANK a RANKL je tedy nezbytná ke tvorbě osteoklastů. Přírodním inhibítozem RANKL je regulován osteoprotegerinem, OPG. OPG je zástupce TNF receptor skupiny, který postrádá transmembránovou doménu a patří mezi sekretované proteiny. OPG je exprimován různými liniemi osteoblastů zahrnující např.: buňky kostní dřene, normální trabekulární osteoblasty. OPG inhibuje tvorbu osteoklastů v kulturách buněk izolovaných z tkání v okolí implantátů pacientů při reoperacích. Poměr množství RANKL a OPG se zdá být důležitý v regulaci tvorby osteoklastů při resorpci kosti. Nedávné studie ukázaly, že poměr mezi RANKL a OPG proteinové expresi ve tkáních koreluje s aktivní osteolýzou nejen v okolí implantátů, ale i při onemocněních kostí jako je např. rheumatoidní artritida.

Kapacita OPG pro blokování RANK signalizaci byla demonstrována na zvířecích modelech. To vede k návrhu genové terapie, která nabízí možnost dlouhodobé produkce terapeutických látek podobných OPG.

V nedávné době byl navržen předpoklad, že osteolýzu kosti mohou přímo způsobovat i jiné buňky než osteoklasty. Například fibroblasty rostou v kosti během osteolýzy a mohou tak způsobovat rozklad kosti podobným mechanismem jako osteoklasty. Fibroblasty sekretují  $H^+$  ionty a způsobují tak degradaci povrchu kosti. Takto vzniklé nízké pH vede k rozpadu minerální části kosti a umožní degradaci spojení tkání enzymy, které mohou být produkovány fibroblasty. [5, 7, 12, 13]

### 7.2.2. Odpověď makrofágů na otěrové částice „in vitro“

In vitro studie klinicky získaných polyethylenových částic jsou limitovány. Obtížně se s částicemi pracuje zejména kvůli jejich hustotě, která je menší než hustota kultivačních roztoků.

T.R. Greenem, J.Fisherem, M.Stonem, B.M. Wroblewskim a E. Inghamem byla provedena studie [14], která měla za úkol definovat kritickou velikost polyethylenových částic pro indukci cytokinů makrofágy in vitro. V této studii byly použity myší peritoneální makrofágy a polyethylenové částice prášku Ceridust 3615 o velikostech 0,21, 0,49, 4,3 a 7,2  $\mu\text{m}$ . Částice (objem v  $\mu\text{m}^3$ ) byly smíchány s makrofágy (počet buněk) v poměrech 100:1, 10:1, 1:1, 0,1:1. Sekrece IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  byly určeny pomocí imunochemického stanovení ELISA. Problémem při tomto stanovení byla spontánní aktivace makrofágů během izolace a kultivace. Tomu odpovídaly hodnoty cytokinů produkované v kontrolních vzorcích bez částic polyethylenu. Bylo však dokázáno, že polyethylenové částice stimulují makrofágy k zvýšené produkci osteolytických cytokinů: IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  in vitro. Výsledky ukazují, že objem a velikost částic jsou kritické faktory v makrofágové aktivaci. Nejvíce biologicky aktivní jsou částice o velikosti 0,3-10  $\mu\text{m}$ . Částice o velikosti větší než 88 $\mu\text{m}$  a menší než 0,21  $\mu\text{m}$  nestimulují makrofágy k produkci cytokinů. Vysvětlením pro částice větší než 88 $\mu\text{m}$  může být neschopnost makrofágů fagocytovat částice větší, než jsou oni sami. Malé částice jsou zřejmě unášeny extracelulárními tekutinami během pinocytózy v protikladu k aktivní fagocytóze u částic větších než 0,3  $\mu\text{m}$ . Tato studie ukázala, že TNF- $\alpha$  je produkován desetinásobně víckrát než IL-6 a IL-1 $\beta$ . Produkce TNF- $\alpha$  byla maximální při poměru objemu částic polyethylenu k počtu makrofágů 10:1, zatímco maximální

sekrece IL-6 a IL-1 $\beta$  byla v poměrech 100:1. Studie také ukázala, že IL-6 a IL-1 $\beta$  mohou být produkovány makrofágy nezávisle na přítomnosti osteoblastů.

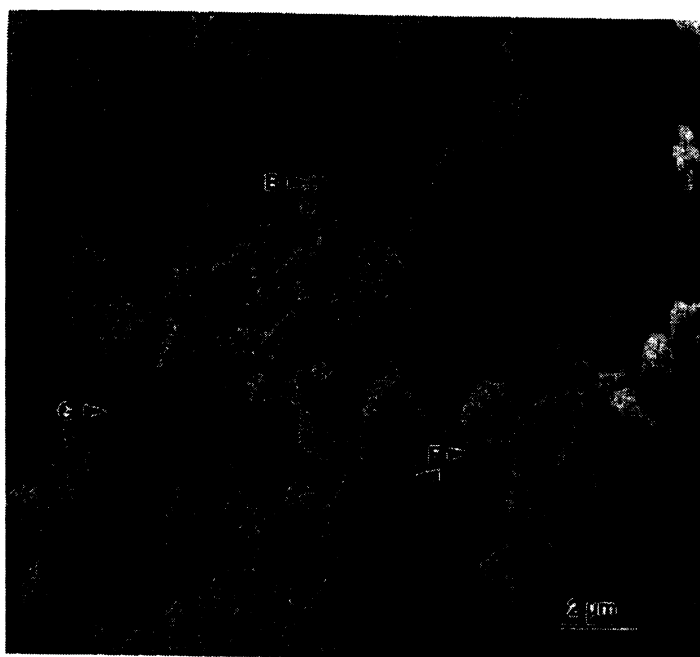
IL-6 stimuluje tvorbu osteoklastů a kostní resorpci. To je podloženo skutečností, že pacienti s Pagetovou chorobou (kostní onemocnění s častou malignitou) mají receptory pro IL-6 na povrchu buněčných membrán. IL-1 $\beta$  stimuluje proliferaci a zrání progenitorových buněk v osteoklasty a osteoklasty v mnohoaderné kost-rozrušující buňky. TNF- $\alpha$  patří mezi zásadní cytokiny způsobující osteolýzu indukovanou částicemi polyethylenu. [5, 7, 12, 13]

### 7.3. Velikost a tvar polyethylenových částic

Izolací a následným pozorováním elektronovým mikroskopem bylo identifikováno několik různých typů polyethylenových částic. Tzv. granula jsou kulaté mírně zploštělé částice menší než 1  $\mu\text{m}$ . Větší (1-2  $\mu\text{m}$ ) přibližně kulaté částice s nepravidelným povrchem byly označeny jako tzv. korálky. „Fibrily“ jsou tenké, výrazně prodloužené kuželovité částice, jejichž délka se pohybuje od 1  $\mu\text{m}$  do 5  $\mu\text{m}$ . Tzv. úlomky jsou delší a tenčí částice o délce 10-20  $\mu\text{m}$  a šířce několik mikronů. Částice připomínající vločky jsou největší a mohou mít jak hladký, tak i nepravidelný povrch. [15] Jednotlivé typy částic můžeme rozlišit na Obr.7. a, b.

Obr.7.

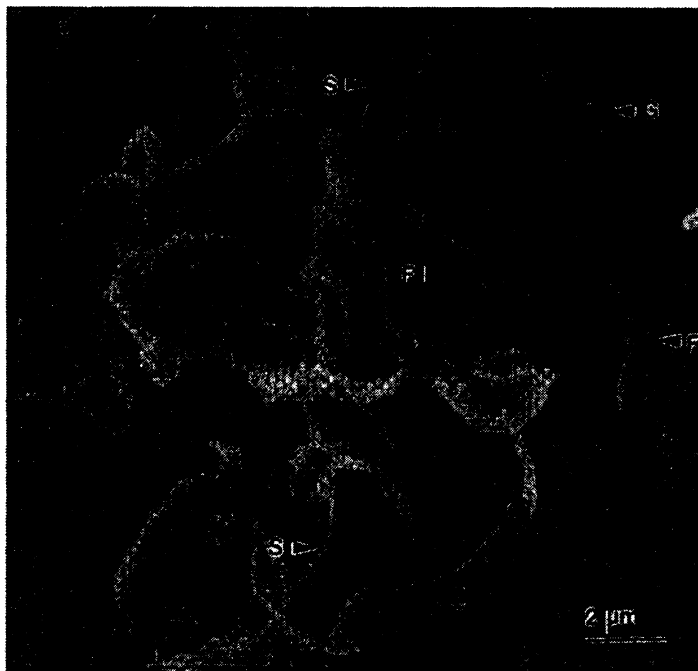
a



a Fotografie polyetylenových částic z elektronového mikroskopu. Částice byly získány z kyčelního kloubu.

B-1  $\mu\text{m}$  korálky, G-granula menší než 1  $\mu\text{m}$ , F-tenké prodloužené fibrily

b



b Fotografie polyetylenových částic z elektronového mikroskopu. Částice byly získány z kolenního kloubu.

FI-velké vločky, S-velké úlomky, F-malé fibrily, G-granula [15]

Zánětlivá reakce v kolenním kloubu způsobená cizorodými částicemi je charakterizována početnými velkými buňkami s menším počtem makrofágů. Ve vzorcích získaných z kolenního kloubu se nejčastěji objevovaly velké úlomkovité částice a částice typu vločky. Ve vzorcích získaných z kyčelního kloubu se vyskytovaly kulaté částice menší než 1 mikron, zploštělá granula, přibližně kulaté „korálky“ s nepravidelným povrchem o velikosti 1-2  $\mu\text{m}$  nebo tenké dlouhé „fibrily“ v délce od 1 do 5  $\mu\text{m}$ . Průměr těchto fibril je podobný jako průměr granul. Částice připomínající vločky se v těchto vzorcích vyskytovaly jen výjimečně. Částice ze vzorků z kolenního kloubu byly také „korálky, granula, fibrily, a úlomky“, ale jejich tvar, povrch i velikost byly různorodější. Nejméně se v těchto vzorcích vyskytovala granula. „Fibrily a úlomky“ se zdály být roztržené, mající dva a více „ocasů“. Často se také objevovaly

velké částice připomínající vločky. Průměrná plocha částic izolovaných z kolenního kloubu byla dvakrát větší ( $1,2 \mu\text{m}^2$ ) než plocha částic z kyčelního kloubu ( $0,61 \mu\text{m}^2$ ). Průměrný obvod i délka částic byla také větší u částic kolenního kloubu. Zatímco 85 % částic izolovaných z kyčle bylo kratších než  $1 \mu\text{m}$ , jen 71 % částic izolovaných z kolenního kloubu bylo kratších než  $1 \mu\text{m}$ . Jen 4 % částic z kyčle bylo delších než  $2 \mu\text{m}$ , zatímco u kolene bylo 13,5 % takových částic. Ačkoli většina otěrových částic z kolenního kloubu byla menší než 1 mikron, ve vzorcích z kyčelního kloubu bylo výrazně větší množství nejmenších polyethylenových částic (s plochou  $0,2 \mu\text{m}^2$ ). Částice menších rozměrů jsou tedy menší a častější u vzorků izolovaných z kyčelních kloubů, zatímco velké částice jsou větší a častější u kolenního kloubu. Tyto rozdíly jsou nejspíše dány různým mechanismem vzniku otěru. Tibiální a českové komponenty totální náhrady kolenního kloubu mají relativně tenkou vrstvu polyethylenu a jsou vystaveny klouzavému, krouživému a rotačnímu pohybu umělé komponenty femuru. Výsledný vysoký dotykový tlak může být spojen s únavovou nedostatečností polyethylenu produkující relativně velké otěrové částice. Únavový otěr je u náhrad kyčelního kloubu méně častý, převládá abrazivní a adhezivní mechanismus otěru, který vede k tvorbě velmi malých částic. [15]

## **8. Analýza polyethylenových částic**

Do dnešních dnů bylo uveřejněno několik různých způsobů izolace a analýzy polyethylenových částic z periprotetických tkání získaných při reoperacích z okolí kloubních náhrad. Granulomatózní tkáně jsou většinou získány od pacientů různého věku, od mužů i žen, od pacientů s různými typy endoprotéz, s různou dobou uběhlou od implantace, s různou indikací aplikace endoprotézy. Všechny vzorky jsou většinou získány z okolí dříku, s rentgenovým nálezem osteolýzy v této oblasti.

### **8.1. Rentgenová analýza**

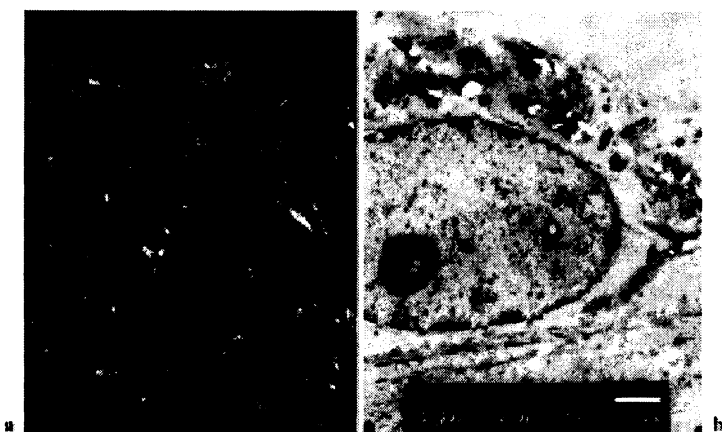
Standartně jsou analyzovány rentgenové snímky pánevní kosti, stydké kosti a femuru. Rentgenografické kritérium pro osteolýzu femorální komponenty je světlá (až průsvitná) linie kolem dříku min. 2 mm široká (tj. pokles o 2mm tloušťky kosti). Podle těchto snímků byly definovány dva typy osteolýzy. Jako lineární typ byl označen stav, kdy světlá oblast obklopující endoprotézu měřila méně než 5 mm v největším rozměru.

Rozsáhlé, narušující, vyduté poškození kosti osteolýzou měřící více než 5 mm v největší tloušťce bylo označeno jako fokální typ osteolýzy. [16]

## 8.2. Světelná mikroskopie

Pro světelnou mikroskopii jsou vzorky většinou fixovány 10% formaldehydem a vloženy do parafínu. Poté jsou krájeny na tenké plátky (cca 5  $\mu\text{m}$ ). Po obarvení hematoxylinem a eosinem, jsou vzorky zkoumány pod mikroskopem. V polarizovaném světelném mikroskopu se polyethylenové částice objevují jako jasné dvojlomy. Tímto způsobem jsou vizualizována různá množství polyethylenových částic a některé částice jsou viditelné v makrofázích (viz Obr.8.). Tento způsob analýzy však neumožňuje přesnou klasifikaci velikosti každé částice. [10]

Obr.8.



Obr.8.: Detekce polyethylenových částic světelnou mikroskopií (a) zvětšení 100x, elektronovou mikroskopií (b) zvětšení 6500x [16]

## 8.3. Transmisní elektronová mikroskopie

Podle studie Hironobu Koseki, Tomoko Matsumoto, Shigeru Ito, Hirofumi Doukawa, Hiroshi Enomoto, Hiroyuki Shindo [16] byly vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii připraveny tímto způsobem: vzorky tkání byly nařezány na 1 mm kousky a fixovány 2,5 % glutaraldehydem v 0,1 % kakodylátovém pufru 4 hod při 4°C a poté fixovány v 2 %  $\text{OsO}_4$  2 hod při 4°C. Dále byly vzorky postupně dehydratovány ethanolem (70 %, 90 %, 100 %) a polymerizovány v epoxydové pryskyřici. Vzorky byly nařezány Reihher Ultra cut S ultramicrotome s diamantovým nožem na plátky tenké 70-

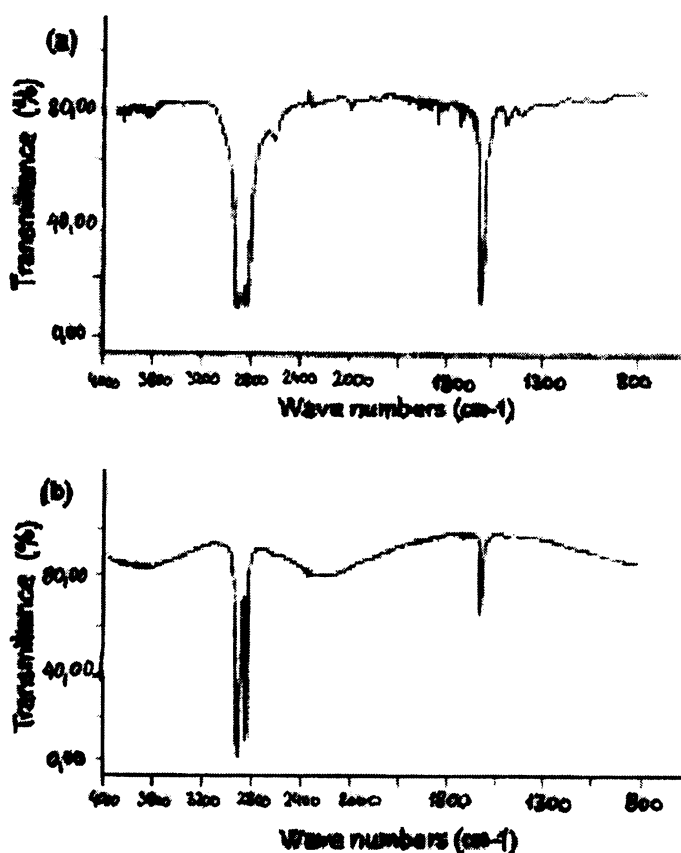
80 nm. Ty byly umístěny na mřížky pokryté vrstvou mědi a obarveny 1 % uranylacetátem a citrátem olovnatým. Vzorky byly pozorovány pomocí JEOL elektronového mikroskopu (JEM-1200 EX; JEOL, Tokyo, Japan) při 80 kV.

Protože některé polyethylenové částice byly vytlačeny během řezání na velmi tenké plátky, původní velikost polyethylenových částic byla viditelná jako světlá vakuola. Některé částice se vyskytovaly v cytoplazmě, ale ne v jádře makrofágů. Většina částic byla menší než 1 mikron. (viz Obr.8.b) [16]

#### 8.4. Infračervená spektroskopie

Izolované částice jsou také analyzovány „Fourier transform infrared spectroscopy“ (FTIR). Tato spektra izolovaných částic vykazují typický peak kolem 2800 a 1400  $\text{cm}^{-1}$  vlnové délky. Tyto peaky jsou identické s hlavními peaky spektra UHMWPE (GUR 1020) získaného od výrobce (viz Obr.9.). Analýza infračervenou spektroskopii ukazuje, zda získané polyethylenové částice jsou kontaminovány jinými látkami, jako je např. cement nebo kovové částice. [16]

Obr.9.



Obr.9.: Infračervené spektrum polyethylenových částic z tkáně (a) a částic standartního UHMWPE (b) [16]

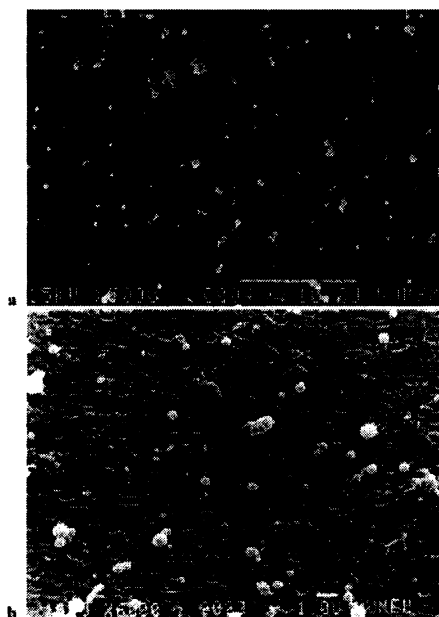
## 8.5. Přehled izolací polyethylenových částic

Izolace polyethylenových částic je prováděna různými způsoby. Používá se KOH, kyselina dusičná, NaOH, nebo papain, kolegenáza či proteáza. Následně pro samotnou izolaci se využívá ultracentrifugace v gradientu sacharózy nebo vodném roztoku isopropanolu nebo separace od lipidů a proteinů pomocí směsi chloroformu a methanolu a následné precipitaci ethanolem.

Podle Hironobu Koseki, Tomoko Matsumoto, Shigeru Ito, Hirofumi Doukawa, Hiroshi Enomoto, Hiroyuki Shindo [16] byla izolace prováděna pomocí enzymu. Tkáň byla hned při reoperaci umístěna do 10 % formalinu. Kousky tkáně o hmotnosti 2 g byly rozsekány na malé části a čtyřikrát promyty v destilované vodě. Poté byly vráceny zpět do formalinu. Vzorky tkáně byly podrobeny působení 3 mg papainu (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) v 10 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 6,5) obsahující 2 mM N-acetylcystein. 5 ml tohoto roztoku s enzymem bylo přidáno k 1 g vzorku tkáně. Tato směs byla umístěna do vodní lázně o teplotě 65°C na dobu tří dnů, přičemž každý den byl roztok papainu vyměňován. Poté byla směs centrifugována při 100 000 g po dobu 60 min. Supernatant obsahující polyethylenové částice byl odebrán a 10 min sonikován. Polyethylenové částice byly získány filtrací roztoku přes polykarbonátové filtry nejprve s póry o velikosti 45 a 10  $\mu\text{m}$  a poté o velikosti 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA, USA). Částice na filtrech byly dvakrát promyty, nejprve vodou poté 70 % ethanolem. Charakterizace polyethylenových částic byla provedena pomocí elektronového mikroskopu. Částice polyethylenu byly pokryty zlatem a pozorovány elektronovým mikroskopem (SEM, JSM-35C; JEOL) při zvětšení 3000 x a 5000 x (viz Obr.10.).



Obr.10.



Obr.10.: Fotografie polyethylenových částic z elektronového mikroskopu izolované z periprostetického osteolytického okolí femuru.

a-zvětšení 3000x

b-zvětšení 6000x [16]

Jiný způsob izolace byl použit podle Arun S. Shanbhag, Hallum O. Bailey, Deuk-Soo Hwang, Charles W. Cha, Nicholas G. Eror, Harry E. Rubash [17]. 18 vzorků bylo získáno od 17 pacientů, kteří podstoupili revizní operaci totální náhrady kolenního kloubu. U deseti pacientů byla diagnostikována osteolýza. Tkáň získaná z revizních operací byla promyta solným roztokem a část byla umístěna do formalinu pro histologické zkoušky. Zbýlá tkáň byla před rozřezáním na menší kousky zmrazena při  $-15^{\circ}\text{C}$ . Poté byly přibližně 3 g tkáně inkubovány s 3 ml papainu (roztok papainu ve fosfátovém pufru (PBS) s přidaným 0,02 M EDTA a 0,02 M N-acetyl-N-cystein) po dobu 48 hod ve vodní lázni o teplotě  $37^{\circ}\text{C}$ . Kousky tkání byly poté třikrát promíchány s 95% ethanolem a centrifugovány při  $1500 \times g$  60 min. Čistý supernatant byl odstraněn. Poté byl přidán 4 M KOH a roztok byl ultrasonikován po dobu 5 min. Hydrolyza probíhala 16 hod. Částice polyethylenu byly od ostatních částic (minerálních kostních částic, částic kovu) odděleny pomocí směsi hexanu a ethanolu. Polyethylenové částice vytvořily světlou až bílou vrstvu na rozhraní mezi vrstvami těchto dvou kapalin. Odtud byly odebrány pomocí pipety (Fisher Scientific). Takto získané částice byly promyty 4

M KOH (pro odstranění zbývajících denaturovaných proteinů). Dále byly třikrát promyty destilovanou vodou a resuspendovány v 3 ml ethanolu. Poté byly částice opět promývány vodou po dobu 16 hod a centrifugovány 30 min při 1500 x g. Všechny vzorky byly takto promyty třikrát. Částice v ethanolu byly promíchány pomocí vortexu a ultrasonikovány po dobu 5 min. Pro filtraci byly použity polykarbonátové filtry o velikosti póru 1 a 0,1  $\mu\text{m}$ . Před pozorováním v elektronovém mikroskopu byly částice pokryty zlatem. Morfologická a elementární analýza byla provedena pomocí elektronového mikroskopu (SEM, JOEL-35CF) ve spojení s rentgenovou spektroskopií (EDX, Tracor Northern 2000). [17]

Podle Mauley Visentin, Susanny Stea, Stefana Aquazoni, Barbary Anonietti, Mattea Reggiani, Alda Toni [18] centrifugace při izolaci může vést ke změně morfologie částic a ztrátě podstatné části polyethylenových částic. Navrhli proto jiný postup izolace polyethylenových částic z tkáně a synoviální tekutiny bez centrifugace. Vzorky získané z reoperací byly umístěny do 10% formalinu. Vzorky určené pro mikroskopii byly obarveny haematoxylinem a eosinem. Synoviální tekutina byla zmrazena při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tkáňové vzorky byly nakrájeny na plátky 20  $\mu\text{m}$  tenké a umístěny na lesklou stranu polykarbonátového filtru (25 mm průměr, 0,2  $\mu\text{m}$  velikost pórů, Millipore, Isopore TM, membrane filters, Ireland). Na každý filtr byly umístěny 2 až 3 vzorky tak, aby se nepřekrývaly. Filtr byl poté umístěn do nálevky (Swinnex, 25 mm, Millipore). Na filtr bylo poté nakapáno 800  $\mu\text{l}$  xylolu. Xylol byl ponechán na filtru 5 min a poté opatrně absorbován filtračním papírem. Tento postup byl zopakován třikrát. Vzorky byly dále rehydratovány. Konečná fáze izolace představovala přidání 500  $\mu\text{l}$  chlornanu sodného (Sigma, St. Luis, USA) a ponechání vzorků v tomto roztoku 2 hod při pokojové teplotě. Zásobník byl následně uzavřen a vzorky byly promyty 50 ml dvakrát destilované vody. Se synoviální tekutinou bylo postupováno podobně. 200  $\mu\text{l}$  tekutiny bylo rozmrazeno a nakapáno na filtr. Přidalo se 200  $\mu\text{l}$  chlornanu sodného a následné kroky byly již stejné jako u vzorků tkáně. Charakterizace částic byla prováděna pomocí elektronového mikroskopu, mikro-Ramanovy spektroskopie a počítačové analýzy. [18]

Dalším způsobem izolace je použití KOH [19]. 5 g náhodně vybrané periprostetické tkáně od každého pacienta byla ponechána v 12 M KOH při  $60^{\circ}\text{C}$  po 2-5 dnů. Lipidy byly poté extrahovány směsí chloroform:methanol (2:1). Následně byly vzorky centrifugovány při 2000 x g po dobu 10 min. Zbylé proteiny byly precipitovány

pomocí přidaného ledově studeného ethanolu a za míchání inkubovány při 4°C 24 hod. Precipitované proteiny byly odstraněny centrifugací při 2000 x g, 4°C, 2 hod. Získaný supernatant byl filtrován přes předem zvážené polykarbonátové filtry s póry o velikosti 10, 1 a 0,1 μm (Whatman Int. Ltd, UK). Filtry byly poté sušeny pod infračervenou lampou minimálně 4 hod. Částice zachycené na filtrech byly přeneseny na hliníkové sloupce a pokryty zlatem pro pozorování elektronovým mikroskopem (Hitachi S700, Japan).

Podobným způsobem izolace je použití NaOH [9]. 5 g periprostetické tkáně bylo ponecháno v 5 M NaOH při 65°C po dobu 5 hod. Vzorky byly dále ultracentrifugovány v gradientu sacharózy (při 40 000 otáčkách za minutu při 5°C po dobu 3 hod). Vrchní vrstva gradientu zahrnující polyethylenové částice byla odebrána a promyta 30 ml horké přefiltrované vody. Tento roztok byl poté ultracentrifugován s přidáním 2 ml 0,96 g/ml a 2 ml 0,90 g/ml isopropanolu. Částice z rozhraní mezi dvěma isopropanolovými roztoky byly odebrány a uchovány v ampulích pro charakterizaci.

Dalším typem izolace je použití kyseliny dusičné [20]. Tkáň byla ponechána v 70% kyselině dusičné (filtrováno přes 0,2 μm membrány, Millipore filters, Millipore, Bedford, MA) po dobu 24 hod při laboratorní teplotě. Směs byla promíchána, sonikována a ponechána dalších 48 hod při laboratorní teplotě. Poté byl roztok centrifugován při 11 600 x g (Beckman Microfuge, Palo Alto, CA) po dobu 15 min. V roztoku byly viditelné bílé a černé částice. Roztok mezi nimi byl opatrně odsán a k částicím byl přidán aceton. Nízká hustota acetonu dovolila sedimentaci polyethylenových i kovových částic. 400 μl vzorku bylo filtrováno přes 10 μm a 0,4 μm polykarbonátové filtry ( Nucleopore, Cambridge, MA) a filtrát byl uschován. 200 μl roztoku s částicemi bylo sonikováno a přidáno k němu 20 ml filtrovaného elektrolytického roztoku (Isoton II, Coulter Electronics, Hialeah, FL). Částice byly poté měřeny pomocí analyzátoru elektrického odporu částic (Coulter Multisizer II). Desetimikrometrové filtry obsahující relativně velké částice byly rozříznuty na dvě poloviny. Jedna z nich byla sušena při 50°C a poté pozorovány světelnou mikroskopií. Druhá polovina filtru byla pokryta zlatem a pozorována elektronovým mikroskopem (SEM, Philips, EM400T, Netherlands). 0,4 μm filtry byly podobně připraveny pro elektronovou mikroskopii.

V naší laboratoři na katedře biochemie PřF UK se provádí izolace polyethylenových částic pomocí HNO<sub>3</sub>. Tato metoda, která je oproti publikovaným

postupům značně modifikována, byla vybrána po mnohém testování a je neustále vylepšována. [21]

## 9. Izolace polyethylenových částic

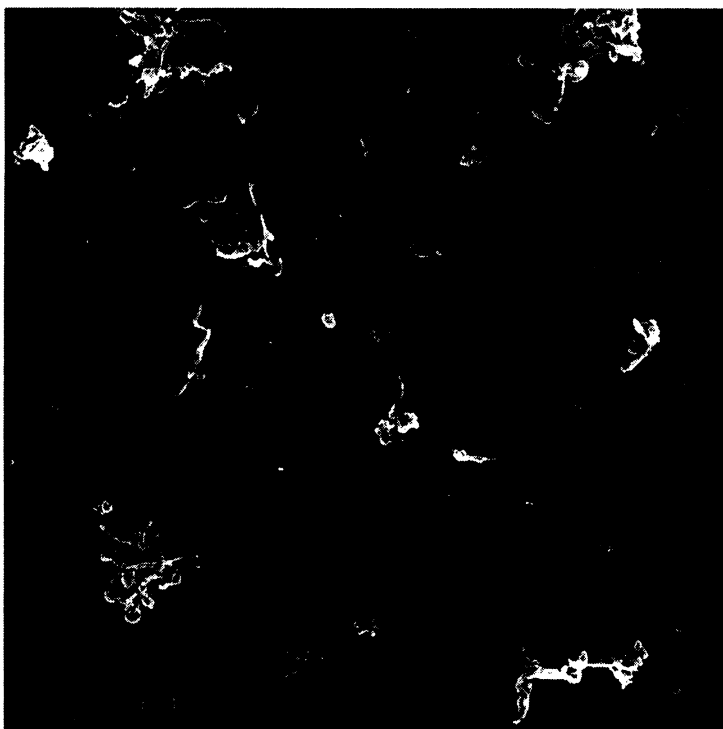
Vzorky získané z reoperací prováděných ve Fakultní nemocnici v Motole a ve Fakultní nemocnici Olomouc jsou získávány zmražené. Vzorky jsem nejprve zvážila a zlyofilizovala. Použitou 65%  $\text{HNO}_3$  a 12 M KOH jsem filtrovala před použitím postupně přes 10  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$  polykarbonátovou membránu (Cyclopore, Whatman, UK). Pro delipidizaci jsem vzorky rozkrájela na malé kousky a odvážila vždy 0,3 g. Delipidizaci jsem prováděla směsí chloroform-methanol (2:1). Ke každému vzorku ve zkumavce (resp. 0,3 g vzorku) jsem přidala 10 ml tohoto roztoku. Po 12 hod jsem roztok chloroform-methanol vyměnila. Vzorky byly dále důkladně vysušeny proudem filtrovaného vzduchu a pak zahřívány při 60°C po 2 hod. Po vysušení jsem vzorky hydrolyzovala 5 ml 65%  $\text{HNO}_3$  po 24 hod za laboratorní teploty. Druhý den jsem z každé zkumavky odsála spodní vrstvu roztoku a ponechala ve zkumavce 2 ml. Do každé zkumavky jsem opět přidala kyselinu dusičnou do celkového objemu 7 ml. Roztoky ve všech zkumavkách jsem promíchala na vortexu, zcentrifugovala (1 min, při 500 x g) a nechala stát do dalšího dne. Dále jsem z každé zkumavky (ode dna) odsála roztok na zbylý objem 2 ml a doplnila destilovanou vodou (filtrovanou přes membránu o velikosti pórů 10  $\mu\text{m}$ , Cyclopore, Whatman, UK) do 7 ml. Roztoky jsem promíchala na vortexu a zcentrifugovala. Po cca 2 hod jsem promytí vodou zopakovala. Do každé zkumavky jsem pro upravení pH přidala 0,2 ml 12 M KOH. Dále jsem všechny vzorky dvakrát promyla vodou, stejným způsobem, jak již bylo řečeno. 2 ml hydrolyzátu zředila 2 ml isopropanolu. Takto zředěné roztoky jsem filtrovala před membrány (velikost pórů 10  $\mu\text{m}$ , Cyclopore, Whatman, UK) do skleněné zkumavky. Původní zkumavku jsem promyla dvakrát 0,5 ml isopropanolu a membránu jsem promyla 1 ml isopropanolu. Poté jsem filtrovala 4,5 ml roztoku (již zfiltrovaného přes membránu s póry 10  $\mu\text{m}$ ) přes membránu s velikostí pórů 0,1  $\mu\text{m}$  (Cyclopore, Whatman, UK). Membránu jsem vždy promyla 1 ml isopropanolu. 0,2 ml roztoku (již zfiltrovaného přes membránu s póry 10  $\mu\text{m}$ ) jsem filtrovala přes membránu s velikostí pórů 0,1  $\mu\text{m}$ . Membránu jsem promyla 0,5 ml isopropanolu. Tyto membrány se zachycenými částicemi jsem předala na Ústav makromolekulární chemie, kde byly vyhodnoceny metodami: elektronová mikroskopie (rastrovací elektronový mikroskop Vega, urychlovací napětí 30 kV), infračervená

spektroskopie (spektrometr Bruker IFS-55 FTIR vybavený MCT detektorem - 256 scan/spectrum, rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$ . Měření byla provedena ATR technikou s použitím Golden Gate™ Heated Diamond ATR Top-Plate -Specac Ltd.- při laboratorní teplotě) a pro ověření čistoty látek - energeticky disperzní analýza paprsků X (EDAX). Mikroprvková analýza se provádí pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu XL30 ESEM vybaveného EDAX detektorem. [21]

## 10. Výsledky

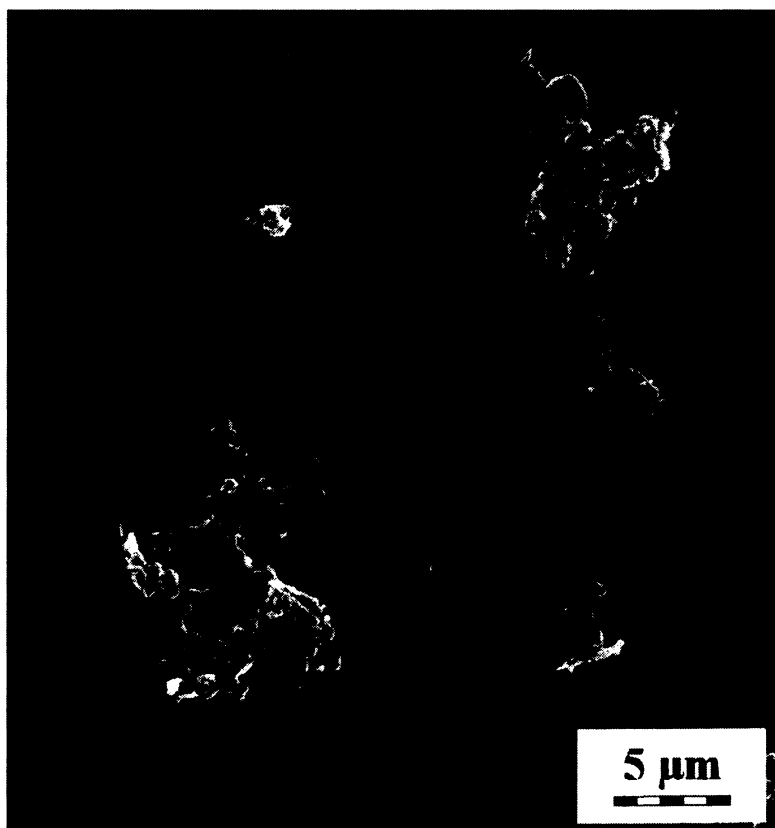
Izolaci dle odstavce 9. jsem zpracovala 18 vzorků granulomů. Obr.11. ukazuje částice získané z okolí endoprotézy kyčelního kloubu. Obr.12. ukazuje částice získané z okolí endoprotézy kolenního kloubu.

Obr.11.



Obr.11.: Polyethylenové otěrové částice získané z okolí endoprotézy kyčelního kloubu

Obr.12.



Obr.12.: Polyethylenové otěrové částice získané z okolí endoprotézy kolenního kloubu

Výsledky získané vyhodnocením částic zachycených na membránách Ústavem makromolekulární chemie Akademie věd metodami SEM a IČ byly spolu s našimi údaji a údaji získanými z chorobopisů pacientů zpracovány do tabulky (viz Tab.1.). Tímto způsobem budou statisticky vyhodnocovány všechny další vzorky.

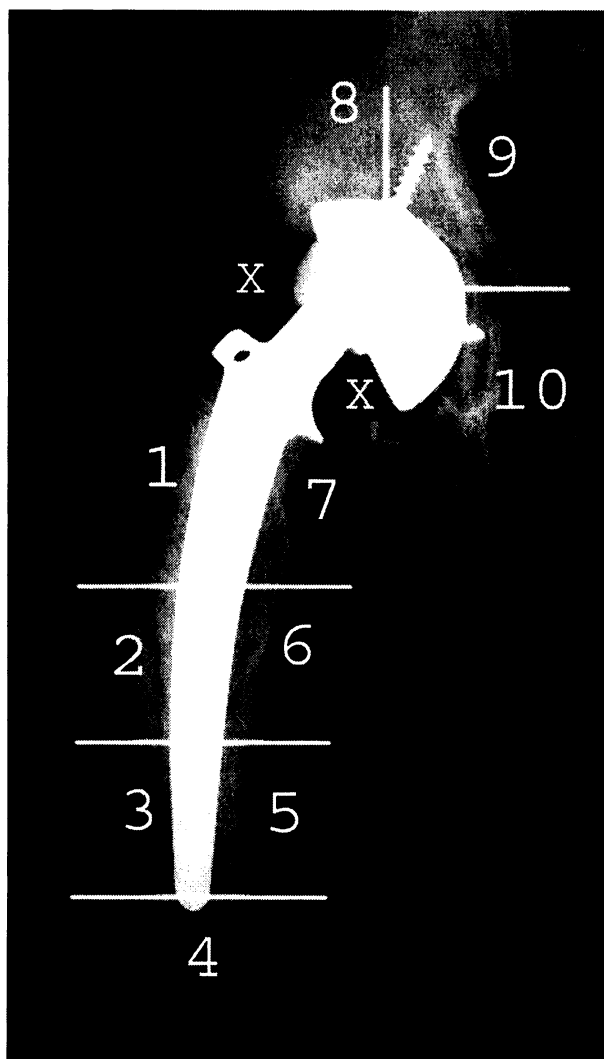
Tab.1.

Č.	pohlaví	rok narození	doba	typ	typ zóny	zóna	výrobce náhrady	způsob fixace	způsob sterilizace	jméno	pův. membrány	výrobce membrány	m[g]	V1 [ml]	V2[ml]	V3[ml]	SEMQ	lrc
1	M	1933	7 K	T		2	PFC J+J	cem		Oberlegner V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,36	0,35
2	M	1933	7 K	T		3	PFC J+J	cem		Oberlegner V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,11	0,07
3	M	1933	7 K	F		1	PFC J+J	cem		Oberlegner V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,2	0,16
4	F	1946	4 K	T		3	LCS DePuy	necem		Havsová M.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,27	0,27
5	F	1946	4 K	F		1	LCS DePuy	necem		Havsová M.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,08	0,04
6	F	1946	4 K	F		7	LCS DePuy	necem		Havsová M.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,13	0,11
7	M	1928	8 K	F		1	PCF J+J	cem		Zlesák V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,41	0,36
8	M	1928	8 K	F		5	PCF J+J	cem		Zlesák V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,46	0,48
9	M	1928	8 K	F		3	PCF J+J	cem		Zlesák V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,56	0,61
10	M	1928	8 K	T		3	PCF J+J	cem		Zlesák V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,09	0,05
11	F	1969	9 H		II		WM/Necroblock J+J	necem		Svorová L.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,35	0,32
12	F	1969	9 H		III		WM/Necroblock J+J	necem		Svorová L.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,41	0,47
13	F	1969	9 H			0	WM/Necroblock J+J	necem		Svorová L.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,24	0,2
14	F	1969	9 H			7	WM/Necroblock J+J	necem		Svorová L.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,39	0,43
15	F	1935	0,4 H		II		LOR Sulzer/Foldi	hybrid		Kublková J.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,09	0,02
16	F	1935	0,4 H		III		LOR Sulzer/Foldi	hybrid		Kublková J.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,27	0,24
17	M	1937	9 H			0	B/CF30 Sulzer	hybrid		Horák V.	0,1	Whatman	0,3	6	4,5	0,2	0,39	0,35

poznámky:  
V1=celkový objem finální suspenze PE-částic v IProH  
V2=větší objem roztoku přefiltrovaného přes membránu na SEMq a lrc  
V3=menší objem roztoku přefiltrovaného přes membránu na morfologii  
doba=doba od implantace do reoperace/roky  
m=hmotnost vysušeného granulomu  
typ=hlc(=kyšal)/knee(=koleno)  
typ zóny=tenoral/ibial (jen u kolene)  
zóna=šíšlo zóny (viz obr. 13)  
lrc=naměřené a vypočtené hodnoty integrální intenzity pásu polyethylenu  
SEMQ=vysvětluje stupeň pokrytí membrány (totálně pokrytá=1, prázdná=0)

Tab.1.

Obr.13.



Obr.13.: Totální kyčelní endoprotéza s vyznačenými lokacemi tj. oblastmi možného vzniku granulomu, RTG snímek [22]

## 11. Diskuse

Na základě poznatků z publikovaných metod izolace polyethylenových otěrových částic byl vybraný postup izolace částic pomocí KOH modifikován. Před samotnou filtrací jsou vzorky sonikovány. To umožňuje neškodné oddělení jednotlivých částic. Do filtrátu se tudíž dostávají i částice, které dříve kvůli shlukování zůstávaly zachyceny již membránou s velikostí pórů 10  $\mu\text{m}$ , ač svojí velikostí nepřevyšovaly rozměr póru membrány. Dále se



osvědčilo používání teflonových membrán namísto dosavadních polyethylenových. Tento materiál není na překážku při následném vyhodnocování a navíc se tak filtrace výrazně urychluje.

Otevřeným problémem v tuto chvíli zůstává nehomogenita vzorků. Testováním v naší laboratoři bylo potvrzeno, že vzorek získaný od jednoho pacienta z jedné konkrétní zóny nevykazuje stejnoměrné rozmístění polyethylenových částic v celém objemu. Další výzkum se proto bude také soustředit na možnosti úpravy a zpracování celých tkáňových vzorků bez toho, aby polyethylenové částice byly rozbity a následné vyhodnocení tak zkresleno. Otázkou nehomogenity vzorků se zatím nezabývala žádná publikovaná metoda izolace polyethylenových částic.

## **12. Závěr**

V této práci je podán přehled publikovaných způsobů izolace polyethylenových otěrových částic, navrženy další drobná vylepšení metody izolace pomocí KOH prováděné na PřF UK. V práci je také podán přehled o biologických aktivitách polyethylenových částic v organismu. Prakticky jsem provedla izolaci polyethylenových částic z 18 vzorků získaných z okolí endoprotéz kyčelního a kolenního kloubu. Po zpracování většího množství vzorků (cca 500) a statistickém vyhodnocení výsledků (příklad uveden v Tab.1.) bude navržen nejvíce vyhovující materiál pro endoprotézy kolenního a kyčelního kloubu, vybrán nejvhodnější způsob jejich ukotvení a také způsob sterilizace vedoucí ke vzniku nejmenšího počtu polyethylenových otěrových částic.

## **Použitá literatura:**

1. Čech, O., Pavlanský, R.: Alopastika kyčelního kloubu. Avicenum-Zdravotnické nakladatelství, Praha (1979)
2. Beznoska, S., Čech, O., Lobl, K.: Umělé náhrady lidských kloubů (Biomechanické, materiálové a technologické aspekty). SNTL-Nakladatelství technické literatury, Praha (1987)
3. Čech, O., Džupa, V.: Revizní operace náhrad kyčelního kloubu. Galén (2004)
4. Sosna, A., Pokorný, D., Jahoda, D.: Náhrada kyčelního kloubu. Nakladatelství TRITON s.r.o. Praha (2003)
5. Bauer, T.W., Schills, J.: The pathology of total joint arthroplasty (II. Mechanism of implant failure). *Skeletal Radiol* (1999) 28: 483-497
6. Lodish, H. et al.: *The Molecular Cell Biology*. WH Freeman and Company, New York (2003)
7. Ingham, E., Fisher, J.: The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* (2005) 26: 1271-1286
8. Kim, J.L.L., Kobayashi, Y., Itoh, T.: Osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1998) 352:46-52
9. Merkel, K.D., Erdmann, J.L., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L.: Tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates orthopaedic implant osteolysis. *Am J Pathol* (1999) 154: 203-10
10. Childs, L.M., Goater, J.J., O'Keefe, R.J., Schwarz, E.M.: Effect of antitumour necrosis factor gene therapy on wear debris induced osteolysis. *J Bone J Surg.* (2001) 83A: 1789-97
11. Schwarz, E.M., Looney, R.J., O'Keefe, R.J.: Anti-TNF $\alpha$  therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis. *Arthritis Res.* (2000) 2: 165-8
12. Haynese, D.R., Crotti, T.N., Zrekat, H.: Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. *Biomaterials* (2004) 25: 4877-4885
13. Masui, T., Sakano, S., Hasegawa, Y., Warashina, H., Ishiguro, N.: Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. *Biomaterials* (2005) 26: 1695-1702

14. 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. *Biomaterials* (1998) 19: 2297-2302
15. Schmalzried, T.P., Campbell, P., Schmitt, A.K., Brown, I.C., Amstutz, H.C.: Shapes and dimensional characteristics of polyethylene wear particles generated in vivo by total knee replacement compared by total hip replacement. *Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)* (1997) 38: 203-210
16. Koseki, H., Matsumoto, t., Ito, s., Doukawa, H., Enomoto, H., Shindo, H.: Analysis of polyethylene particles isolated from periprosthetic tissue of loosened hip arthroplasty and comparison with radiographic appearance. *J Orthop Sci* (2005) 10: 284-290
17. Shanbhag, A.S., Bailey, H.O., Hwang, D-S., Cha, Ch.W., Eror, N.G., Rubash, H.E.: Quantitative analysis of ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear debris associated with total knee replacement. *Journal of Biomedical Materials Research* (2000) 53: 100-110
18. Visentin, M., Stea, S., Squarzone, S., Antonietti, B., Reggiani, M., Toni, A.: A new method for isolation of polyethylene wear debris from tissue and synovial fluid. *Biomaterials* (2004) 25: 5531-5537
19. Howling, G.I., Barnett, P.I., Tipper, J.L., Stone, M.H., Fisher, J., Ingham, E.: Quantitative characterization of polyethylene debris isolated from periprosthetic tissue in early failure knee implants and early and late failure Charnley hip implants. *Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)* (2001) 58: 415-420
20. Hirakawa, K., Bauer, T.W., Stulberg, B.N., Wilde, A.H.: Comparison and quantitation of wear debris of failed total hip and total knee arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research* (1996) 31: 257-263
21. Šlouf, M., Eklová, S., Kumstátová, J., Berger, S., Synková, H., Sosna, A., Pokorný, D., Špundová, M., Entlicher, G.: Isolation, characterization and quantification of polyethylene wear debris from periprosthetic tissues around total joint replacements. *Wear*, submitted
22. Sosna, A., Vavrik, P., Pokorný, D.: Arthropatie. In: *Základy ortopedie*. Sosna, A., Vavrik, P., Krbec, M., Pokorný, D. a kol.(ed.). Triton, Praha (2001): 44-46

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka