

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



**IZOLACE, MORFOLOGIE A DISTRIBUCE
POLYETHYLENOVÝCH OTĚROVÝCH ČÁSTIC
Z OKOLÍ ENDOPROTÉZ BÝČELNÍCH A
KOLENNÍCH KLOUBŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Eva Zolotarevová

Školitel: Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

PRAHA 2008

Obs. titulní strany:

**Polyethylenová otěrová částice izolovaná z granulomové tkáně z okolí endoprotézy kyčelního kloubu;
snímek z elektronového mikroskopu; velikost částice cca 90 x 80 μm; dobarveno**

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233146277

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 52d/08 sled
(biokemie)*

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Gustava Entlichera, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 25.dubna 2008


podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit své poděkování školiteli Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi, CSc. z katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za pomoc a vedení při zpracování mé diplomové práce.

Můj velký dík patří i paní Marcele Špundové z katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za podporu, ochotu a pomoc při izolaci částic.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. Davidu Pokornému, Ph.D. a MUDr. Filipu Veselému z 1.Ortopedické kliniky 1.LF UK a FN Motol za poskytnutí tkáňových vzorků a zároveň i RNDr. Miroslavu Šloufovi, Ph.D. a RNDr. Monice Lapčíkové, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR za spolupráci a poskytnutí výsledků mikroprvkové analýzy, infračervené spektroskopie a pořízení snímků z elektronového mikroskopu.

V neposlední řadě děkuji i RNDr. Zlatě Fejfárkové za poskytnutí řady cenných informací a zkušeností.

Tato práce byla vypracována v rámci Grantového projektu Národního programu výzkumu II. č.: 2B06096 s názvem „Sledování a minimalizace otěru polymeru UHMWPE v kloubních náhradách“ poskytnutého Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Obsah

Poděkování.....	2
Obsah	3
1. Seznam zkratek	5
2. Úvod.....	6
3. Teoretický úvod	8
3.1. Historie náhrad lidských kloubů	8
3.2. Typy používaných endoprotéz.....	9
3.3. Indikace aloplastiky kyčelního a kolenního kloubu	14
3.3.1. Koxartrosa.....	14
3.4. Materiály endoprotéz	15
3.4.1. Kovy.....	15
3.4.2. Keramika.....	15
3.4.3. Kostní cement	16
3.4.4. Povrchové úpravy	16
3.4.5. Polyethylen	17
3.4.5.1. Vysokomolekulární polyethylen.....	17
3.4.6. Polyethylenový otěr	20
3.4.7. Polyethylenové otěrové částice a vznik granulomu.....	21
3.4.8. Velikost a tvar polyethylenových částic	24
4. Cíl Práce.....	27
5. Materiály	28
6. Metody	30
6.1. Tkáňové vzorky	30
6.2. Izolace polyethylenových částic z tkáně.....	30
6.2.1. Čištění používaných chemikálií.....	30
6.2.2. Membrány	30
6.2.3. Lyofilizace a delipidace vzorků	31
6.2.4. Sonikace.....	31
6.2.5. Kyselá hydrolýza	31
6.2.6. Enzymová hydrolýza	32
6.2.7. Filtrace polyethylenových částic	32

6.3. Vliv centrifugace na morfologii PE částic	33
6.4. Distribuce PE částic v tkáni	36
6.5. Příprava modelových částic PE	39
6.6. Kalibrační řada PE částic z tkáně	39
6.7. Příprava PE částic z tkáně pro testování na buněčných modelech	42
6.8. Heterogenita vzorku – vliv homogenizace	44
6.9. Kvantifikace a charakterizace PE částic	44
6.9.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	45
6.9.2. Infračervená spektroskopie (IR)	45
6.9.3. Energeticky disperzní analýza paprsků X (EDAX)	47
7. Výsledky	48
7.1. Vliv centrifugace na morfologii PE částic	48
7.2. Distribuce PE částic v tkáni	55
7.3. Příprava modelových částic PE	66
7.4. Kalibrační řada PE částic z tkáně	66
7.5. Příprava PE částic z tkáně pro testování na buněčných modelech	68
7.6. Heterogenita vzorku – vliv homogenizace	70
8. Diskuse	72
9. Závěr	75
10. Použitá literatura	76

1. Seznam zkratek

EDAX	energeticky disperzní analýza paprsků X
IRc	metoda kvantifikace polyethylenových částic pomocí FTIR spektroskopie
IR (FTIR)	infračervená spektroskopie (Fourierova transformace infračervených spekter)
PE	polyethylen
PC	polykarbonátová membrána
PrOH	propan-2-ol
RTG	rentgenografie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SEMq	metoda kvantifikace polyethylenových částic pomocí SEM
TF	teflonová membrána
UHMWPE	„ultra high molecular weight polyethylene“ Polyethylen s ultravysokou molekulovou hmotností

2. Úvod

Možnost náhrady nevratně poškozeného kloubu implantátem znamená pro mnoho lidí na celém světě často jedinou cestu zpět do normálního života bez bolesti a bez významného pohybového omezení. Protože jsou nejčastěji poškozeny nejvíce zatěžované klouby – kloub kyčelní a kolenní - soustředí se vývoj a výroba umělých náhrad právě na tyto typy implantátů. V posledních letech vznikají nové typy endoprotéz vyráběné špičkovými technologiemi. Zároveň se neustále zdokonalují operační techniky, které jsou ale také předmětem vědecké diskuse. Stále častěji je náhrada kloubu indikována i mladším pohybově aktivnějším pacientům, což klade větší nároky na kvalitu všech komponent náhrad. Rozšiřuje se také škála kloubních poškození, která lze vyřešit náhradou kloubu. Se zvyšujícím se počtem pacientů s kloubní náhradou však logicky stoupá i počet pacientů, kterým je třeba endoprotézu vyměnit. Tyto výkony je třeba provést v případě selhání endoprotézy, jejího uvolnění z kostního lůžka či infekčních komplikací. Životnost endoprotézy, která se pohybuje mezi 5-20 lety, je nejvíce ovlivněna tzv. aseptickým uvolněním, tj. procesem interakce organismu a implantátu, při němž dojde k rozvolnění vazby mezi implantátem a kostí pacienta.

Polyethylen byl zaveden do konstrukce endoprotéz kyčelních kloubů v roce 1962 jako materiál pro výrobu acetabulární jamky. V této době byl považován za ideální materiál. Až koncem 70. let byla popsána reakce organismu na polyethylenové částice. V procesu aseptického uvolnění hrají právě polyethylenové částice vzniklé otěrem při pohybu hlavice v jamce majoritní roli. V menší míře se na tomto procesu podílejí také částice kovu nebo kostního cementu. Otěrové částice se hromadí v kloubu a lymfatickou cestou jsou transportovány do jeho okolí. Tyto biologicky aktivní částice jsou v závislosti na své velikosti pohlceny makrofágy. To má za následek spuštění aseptických zánětlivých reakcí, jejichž důsledkem je vznik granulomu (tkáň bohatá na makrofágy, částice polyethylenu, kostního cementu, kovu, popř. keramiky), resorpce kosti a uvolnění implantátu. Ačkoliv je tedy polyethylen klíčovou komponentou a v kombinaci s kovovou nebo keramickou částí endoprotézy vykazuje nejlepší vlastnosti, je zároveň i nejslabším článkem ovlivňující životnost celého implantátu. Polyethylenový otěr je v posledních

desetiletích jednou z nejvíce diskutovaných otázek souvisejících se životností náhrad kloubů. Právě této otázce je tato práce věnována.

Tkáňové vzorky bohaté na granulomy získané při reoperacích kyčelních a kolenních kloubů spolu s informacemi o jejich lokaci a použitém typu endoprotézy pomáhají vysvětlit vznik a proces vzniku polyethylenových i jiných otěrových částic. Publikováno již bylo několik metod pro izolaci a následnou charakterizaci (kvantitativní i morfologickou) polyethylenových částic. Částice se izolují v podstatě třemi různými způsoby, které se liší použitím látky degradující tkáňový materiál. Provádí se hydrolýza pomocí kyseliny dusičné, hydroxidu draselného nebo hydrolytických enzymů (papain, kolagenasa, proteasa). K charakterizaci, kvantifikaci a kontrole čistoty izolovaných částic se používají nejčastěji metody mikroskopické (světelná a elektronová mikroskopie), spektroskopické (infračervená spektroskopie) a mikroprvková analýza.

3. Teoretický úvod

3.1. Historie náhrad lidských kloubů

S největší pravděpodobností první zaznamenaný pokus o umělou náhradu velkého lidského kloubu byl proveden v roce 1890 Gluckem [1]. Tato totální náhrada kolenního kloubu byla vyrobena ze slonoviny a k její fixaci do stehenní a bércevé kosti byla použita kalafuna smíšená s pemzou a sádrou. Podobnou náhradu navrhl i pro kyčelní kloub. Další vývoj náhrad nefunkčních kloubů se již soustředil na kloub, který je jedním z nejvíce postižených opotřebením a destrukcí chrupavčitého povrchu kluzných ploch – tedy kloub kyčelní. [2, 4]

Při hledání vhodných materiálů byly postupně s různými úspěchy vyzkoušeny zlaté fólie (R. Jonesem v roce 1920), „čepičky“ ze stříbra, magnesia, zinku a slonové kosti (E. Lexerem v roce 1906, A. Hoffem v roce 1906), „čepičky“ ze skla, pyrexového skla, viskaloidu a bakelitu (M. N. Smith-Petersenem v roce 1917) a „čepička“ z vitalia (chrom-kobaltová slitina i v dnešní době využívána k výrobě hlaviček endoprotézy kyčelního kloubu). Vitaliová Smith-Personova čepička se uplatnila nejvíce a byla léta používána v zámoří. Další snahou však bylo nahradit celou hlavici i s krčkem jiným materiálem. Objevily se proto pokusy se slonovinou, ocelí, osakrylem, vitaliem a titanem. V souvislosti s tím se však objevil problém vhodného ukotvení náhrady do stehenní kosti. Byly vyzkoušeny dva způsoby: náhrada hlavice femuru byla ukotvena pouze v krčku (bratry R. a J. Judety v roce 1946) nebo krčkový dřík byl ukotven navíc pomocnou dlahou k laterální části femuru (P. Wilesem v roce 1938, G. K. McKeem v roce 1940) či do intramedulárně umístěného hřebu (R. K. Lippmannem v roce 1951). V této době byla nejvíce používaným typem osakrylová endoprotéza bratří Judetů. V souvislosti s touto endoprotézou bylo poprvé referováno o fenoménu otěru plastu. Vývoj komponent, které se závádějí do dutiny femuru, zahájili v roce 1940 A. T. Moore a H. R. Bohlman. A. T. Moore pak v roce 1951 zavedl úspěšnou necementovanou cervikokapitální endoprotézu (nahrazena je jen hlavice stehenní kosti), která měla otvory v dříku, do které vrůstala kostní tkáň a tím zabezpečovala přiměřenou stabilitu. V 50. letech se začala vyvíjet endoprotéza, jež měla na kovovou femorální komponentu nasazenu plastovou hlavici (J. Gossetem, M. Langem, H. Rettigem v roce 1950). Použitý polyetylen byl však nevhodný. G. K. McKee v roce 1940 navrhl první typ necementované náhrady s párováním kov-kov. [2, 4]

Nový trend nastartoval počátkem 60. let anglický profesor J. Charnley [5] zavedením „low friction arthroplasty“ (tj. princip nízkého tření) párováním kov-plast. Použil jamku z teflonu (polytetrafluorethylen) a femorální komponentu z nerezavějící oceli. Obě komponenty fixoval pomocí polymethylmethakrylátového kostního cementu. V roce 1962 nahradil nevyhovující teflon nízkotlakým vysokomolekulárním polyethylenem, který se používá dodnes. [2 - 4]

V Čechách byly v 50. letech zpočátku používány osakrylové endoprotézy bratří Judetů, poté Smith-Petersonovy „čepičky“ a necementované endoprotézy Moorovy. V 70. letech se začala rozvíjet technika endoprotéz především zásluhou prof. O. Čecha. V roce 1972 byla podle jeho návrhu vyrobena v Poldi SONP Kladno první série totální náhrady kyčelního kloubu. Tato konstrukce vycházela z Charnleyova typu a byla řešena jako kombinace kov-vysokomolekulární polyethylen a určena k fixaci kostním cementem. V roce 1974 byla poprvé vyrobena v sérii cervikokapitální náhrada v celokovovém provedení z kobaltové slitiny a souběžně tentýž typ z korozivzdorné oceli. V současnosti výrobu endoprotéz převzala firma Beznoska spol. s. r. o., která vyrábí endoprotézy, kde jamka je z polyethylenu a hlavice je kovová. Tyto endoprotézy již není třeba cementovat. [2 - 4]

V současnosti používanými typy endoprotéz jsou systémy, kde hlavice i jamky jsou kovové nebo keramické, a systémy, kdy jamka je z vysokomolekulárního polyethylenu a hlavice buď kovová nebo keramická. Objevují se rovněž nové materiály jako zirkoniová keramika, karbonové a kompozitní materiály a nově zpracovaný polyethylen. Tzv. vysoce síťovaný vysokomolekulární polyethylen vykazuje zvýšenou odolnost vůči otěru. Zároveň je snahou přecházet k miniinvazivním operačním technikám [2 – 4, 6].

3.2. Typy používaných endoprotéz

Endoprotéza kyčelního kloubu se skládá z tzv. dříku, který je zaveden do stehenní kosti a je vyroben z různých kovových slitin. Na krček tohoto dříku je nasazována hlavička, která je buď ze stejného materiálu jako dřík, nebo z keramiky. Důležitá je hladkost hlavice. Ta musí být maximální, aby nezpůsobovala opotřebení polyethylenové vložky v jamce. Kloubní povrch postiženého kyčelního kloubu nahrazuje polyethylenová jamka. [2 - 4]

Z hlediska rozsahu náhrady kyčelního kloubu můžeme implantáty rozdělit na:

1. *povrchové* – nahrazující jen povrchovou kontaktní plochu hlavičky stehenní kosti
2. *cervikokapitální* – nahrazující jen hlavičku stehenní kosti
3. *totální* – nahrazující obě části kyčelního kloubu, tj. hlavičku stehenní kosti i pánevní jamku
4. *anatomické* – nahrazující kromě hlavičky ještě určitou část stehenní kosti

Výběr typu náhrady kyčelního kloubu závisí na stupni poškození kloubu a zároveň na celkovém zdravotním stavu pacienta a jeho schopnosti snést větší či menší operační zákrok.

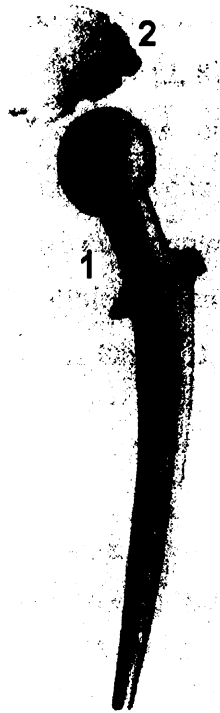
Podle způsobu fixace ke kostnímu lůžku rozlišujeme endoprotézy na:

1. *cementované*, u kterých se k ukotvení používá tzv. kostní cement (polymethylmetakrylát) viz Obr. 1 A str.11
2. *necementované*, jejichž povrchová úprava v místech kontaktu s kostí umožní fixaci bez cementu (viz Obr. 1 B str. 11)

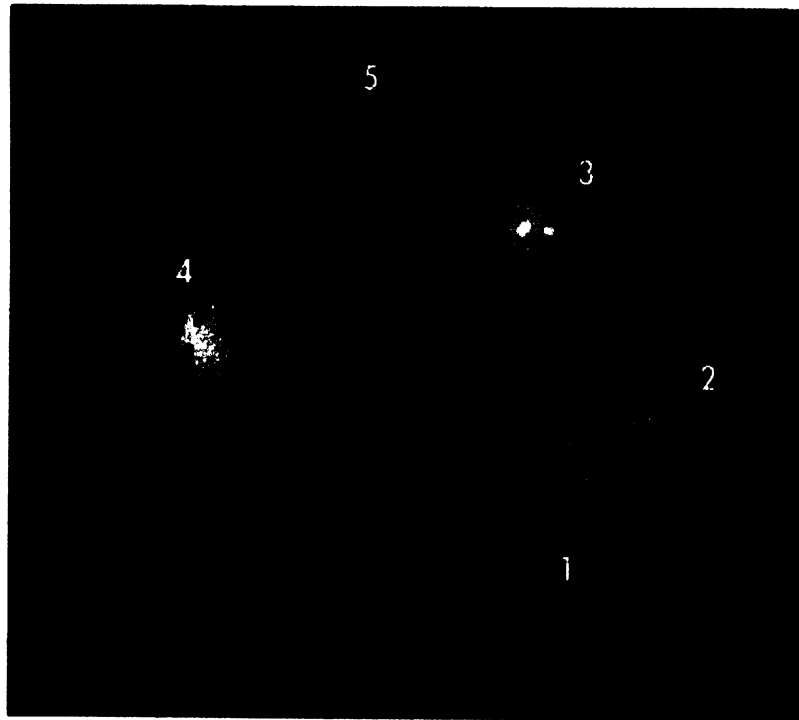
Se způsobem ukotvení endoprotézy do kostního lůžka souvisí také typ použité jamky. Jamky kotvené pomocí cementu se skládají jen z jedné polyethylenové části, zatímco necementované se skládají z kovové kotvící části, do níž je vložena vložka z vysokomolekulárního polyethylenu. U těchto necementovaných jamek je fixace zajištěna lamelami, které na obvodu kotvící části tvoří závit a do pánevní kosti jsou zašroubovány nebo upevněny jinak. U necementovaných jamek polokulovitěho (sférického) tvaru je kotvící část pevně zaražena do kotvícího lůžka, které je přesně vyfrézováno. Povrch těchto jamek je navíc opatřen některým typem speciálního nástřiku, který povrch zdrsní a zajistí postupný vrůst kostní tkáně. [2, 4]

Obr. 1.

A



B



Obr. 1.: Endoprotéza kyčelního kloubu

A: Klasická necementovaná endoprotéza, výrobce: firma Beznoska – Meditech

1. celokovová komponenta – dřík s hlavici
2. polyethylenová jamka

B: Necementovaná endoprotéza, výrobce: firma Walter

1. dřík (kovový) zaváděný do stehenní kosti s upraveným povrchem
2. krček dříku (na něj je nasazována hlavice)
3. hlavice (keramická)
4. jamka – kovová kotvící část
5. polyethylenová vložka

upraveno podle [7]

Společným rysem náhrad kolenního kloubu je užití velmi tenkých a kompaktních komponent, které imitují tvary přirozených tibiálních a femorálních kondylů. Femorální komponenta je zhotovena z nerezavějící oceli, vitalia nebo titanu. Tibiální komponenta je vyrobena z polyethylenu. Rozdělit náhrady kolenního kloubu můžeme v zásadě na dva konstrukční typy [2, 8]:

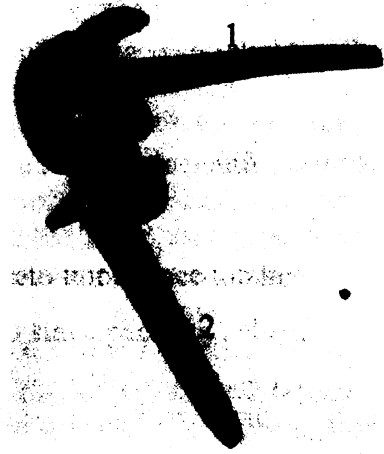
1. *povrchové* endoprotézy ve tvaru dvoukondylárního nebo jednokondylárního kluznicového systému (viz Obr.2 A str. 13) [2, 8]
2. *závěsné pantové* endoprotézy, které jsou schopny korigovat velké osové úchytky a přibírají i funkci poškozeného vazivového aparátu. Vyžadují však velkou resekci. (viz Obr. 2 B str. 13) [2, 8]

Obr. 2.

A



B



Obr. 2.: Endoprotéza kolenního kloubu

A: povrchová endoprotéza, výrobce: firma Beznoska spol. s. r. o.

1. femorální komponenta (kobaltová slitina)
2. tibiální komponenta (slitina titanu nebo korozivzdorná ocel)
3. polyethylenová vložka
4. spojovací šroub

upraveno podle [11]

B: závěsná pantová endoprotéza, typ Guepar

1. femorální část
2. tibiální část

upraveno podle [2]

3.3. Indikace aloplastiky kyčelního a kolenního kloubu

Počet onemocnění, která mohou být řešena náhradou poškozeného kloubu (tj. aloplastikou), neustále narůstá. Tento chirurgický výkon se tak pro pacienty často stává poslední možnou variantou. Aloplastika je indikována po vyčerpání konzervativní léčby u bolestivých nedostatečností s destrukcí kloubu. Mezi současné indikace cervikokapitálních endoprotéz patří [2, 4, 7]:

1. zlomeniny a pouřazové stavy v oblasti krčku femuru u starších pacientů
2. tumory postihující hlavici femuru
3. dočasné náhrady při komplikacích, které vznikly během implantace totální endoprotézy (zejména při náhlém zhoršení celkového stavu pacienta během operace)

Totální endoprotézy jsou indikovány z těchto důvodů:

1. koxartrosy – artrosa kyčelního kloubu (viz další odstavec)
2. stavy zánětlivé a pozánětlivé (artritida, Bechtěrevovo onemocnění)
3. pouřazové stavy
4. kostní nádory a jim podobné útvary

3.3.1. Koxartrosa

Příčinami vzniku koxartrosy tedy artrosy kyčelního kloubu jsou nejčastěji chronické přetížení a dědičné predispozice. Projevuje se zpočátku námahovou bolestí, později bolestí při chůzi, zejména jako bolest na začátku pohybu. Postupně je omezena rotace kyčelního kloubu a přidává se i bolest klidová. Primární příčinou artrosy 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.

Pro léčbu artrosy se nejčastěji používají analgetika, nesteroidní antirevmatika, chondroprotektiva (chondroitinsulfát a glukosaminsulfát) a steroidní antirevmatika.[2, 3, 7]

3.4. Materiály endoprotéz

3.4.1. Kovy

Kovové materiály, které se používají pro výrobu komponent kloubních náhrad, musí splňovat náročné požadavky (vysoká odolnost proti korozi, dostatečná pevnost, biokompatibilita). V současné době se volba výchozího materiálu soustřeďuje jednak na ušlechtilé kovy, které jsou z elektrochemického hlediska stálé, a jednak na kovy nebo jejich slitiny, které za určitých podmínek získávají vlastnosti ušlechtilých kovů. Kovové materiály můžeme rozdělit na základní typy:

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

V současné době se nejvíce používají slitiny na bázi kobaltu a titanu, protože vykazují mnohem větší odolnost vůči únavovým zlomeninám. Slitiny titanu se z důvodu blízkého modulu elasticity v porovnání s elasticitou kostní tkáň používají pro výrobu femorálních dřívků. Zároveň jsou tyto slitiny organismem velmi dobře přijímány, mají vysokou biokompatibilitu. Jejich použití pro výrobu hlavic endoprotéz je však nevhodné z důvodu nízké odolnosti vůči otěru. Naproti tomu slitiny kobaltu s molybdenem se využívají pro výrobu hlavic zejména z důvodu nižšího otěru. [2]

Protože každý implantát je v živé tkáni cizím tělesem, tkáň na něj reaguje. Zatím neexistuje žádný kov ani slitina kovů, které by ve tkáni reakce nevyvolávaly. Otázkou je tedy pouze intenzita průběhu reakcí. Nebezpečná situace může nastat při vyšší hodnotě pH a současném překročení určité koncentrace iontů ve tkáni, kdy 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 tkáň v okolí implantátu. [2]

3.4.2. Keramika

V aloplastice se využívá korundová keramika. Jedná se o slinutou směs oxidu hlinitého a oxidu hořečnatého. Otěr keramiky patří k nejnižším na rozdíl od otěru plastů,

který vyvolává větší či menší reakci. Částice keramiky se chovají v těle inertně. Také tvrdost je pětikrát až desetkrát vyšší než u známých kovů či jejich slitin. Negativní vlastností keramiky je ale její nízká pevnost v ohybu. [2]

Nejvýhodnější použití tohoto materiálu je pro výrobu hlavice totální endoprotézy kyčelního kloubu v kombinaci s polyethylenovou vložkou acetabulární komponenty. Takový typ endoprotézy je zobrazen na Obr. 1 B str. 11. [2]

3.4.3. Kostní cement

Kostní cementy jsou samotuhnoucí methylmetakryláty a používají se u cementovaných typů endoprotéz k upevnění v kostním lůžku. Polymethylmetakrylát používaný k chirurgickým účelům vzniká polymerací. Monomer je tekutý a obsahuje metakrylát stabilizovaný hydrochinonem, N,N-dimethyl-p-toluidin a chlorofyl. Polymer se používá v podobě prášku a obsahuje methylmetakrylátový polymer, oxid zirkoničitý (rentgenokontrační látka), benzoylperoxid a chlorofyl. Kostní cement se připravuje polymerací pomocí iniciátorů (peroxydy) smícháním tekutého monomeru s práškem polymeru vždy až během operace [2, 3]. Významnou komplikací při použití tohoto materiálu je vysoká teplota jeho polymerizace (v rozsahu 70 – 90 °C). V důsledku vysokých teplot tak může docházet k nekrózám kostních tkání. Některé studie však prokázaly, že vzestup teploty během polymerace je kompenzován vlhkým prostředím a kovovou komponentou. [9, 10]

Zejména při revizní endoprotetice se však v současné době používají spíše necementované implantáty.

3.4.4. Povrchové úpravy

O povrchových úpravách hovoříme v souvislosti s kovovými necementovanými komponentami endoprotéz kyčelních kloubů. Tyto úpravy se provádí nastříknutím osteoaktivní látky (jednou z nich je hydroxyapatit). Tato povrchová úprava zvětší povrch endoprotézy a umožní lepší uchycení v místě implantace. Krystaly hydroxyapatitu jsou

rovněž součástí kostní tkáně a ve spojení s kolagenními fibrilami zajišťují pevnost kosti. Povrchová úprava komponent je cíleně vytvořena tak, že podporuje proces vrůstání kostní tkáně.

3.4.5. Polyethylen

Výchozí surovinou pro výrobu polyethylenu je ethylen získávaný z ropy. Podle způsobu výroby, jež je určující pro jeho vlastnosti, rozlišujeme polyethylen vysokotlaký, středotlaký a nízkotlaký. Nízkotlaký polyethylen má pravidelnější strukturu a proto i lepší mechanické vlastnosti. Navíc se velmi dobře zpracovává do požadovaných tvarů a má velmi dobrou biokompatibilitu. V současné době je nejpoužívanějším polymerem pro výrobu komponent kloubních náhrad nízkotlaký ultravysokomolekulární polyethylen (UHMWPE). [2, 3]

Když v roce 1953 Ziegler a Natta publikovali svůj objev vysokomolekulárního polyethylenu, použil sir Charnley jako první tento materiál pro výrobu jamek pro náhrady kyčelního kloubu [14]. Polyethylen tak nahradil již v té době nevyhovující teflon. Tímto okamžikem došlo k základnímu zvratu v osudu pacientů s těžkým artrotickým postižením kyčelního kloubu. Až v roce 1977 byla publikována první práce upozorňující na reakci organismu na částice polyethylenu vzniklé otěrem vedoucí k aseptickému uvolnění implantátu [12]. Od té doby byla věnována velká pozornost různým faktorům při technologii výroby, způsobu sterilizace a jejich vlivům na velikost otěru. Možností snížení otěru je vedle zlepšení jeho mechanických vlastností zejména jeho párování s jinými než ocelovými komponentami – zejména vitalium a keramika. [2, 3]

3.4.5.1. Vysokomolekulární polyethylen

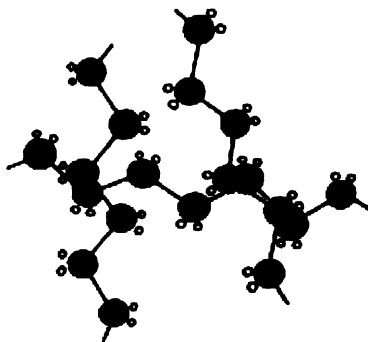
Pro vysokomolekulární polyethylen se používá zkratka UHMWPE vzniklá z anglického názvu „Ultra High Molecular Weight Polyethylene“. Tento typ polyethylenu je polymerem 71000 – 214000 skupin ethylenu s celkovou molekulovou hmotností v rozmezí 2 až 6 milionů. Při výrobě prochází krystalickým procesem a má podobu prášku. V dnešní době se k výrobě polyethylenových jamek používají tři metody. První metodou je

přímé tvarování, při němž je prášek umístěn do formy, ve které je vytlačen do požadovaného tvaru. Druhá metoda spočívá ve výrobě polyethylenových tyčí, ze kterých je pak finální výrobek vysoustružen. Třetí metodou je výroba velkých (až 20 cm silných) desek, ze kterých je obráběním vyprodukován konečný tvar. Dříve byla při výrobě přidávána příměs kalciumstearátu pro snadnější zpracování. Dnes se již od tohoto postupu upouští, jelikož tato směs zhoršovala mechanické vlastnosti a zejména odolnost proti oxidaci.

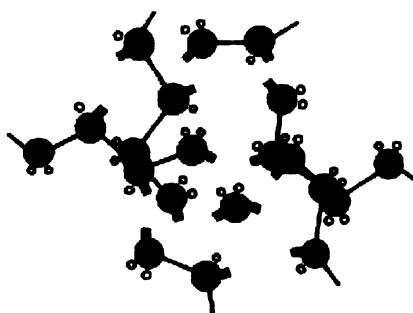
Každá komponenta implantátu musí před samotnou aplikací projít procesem sterilizace. Odolnost UHMWPE vůči otěru však závisí také právě na způsobu sterilizace. První polyethylenové jamky byly sterilizovány formaldehydovými parami. Koncem 60. let byla zavedena sterilizace gama-zářením. V 90. letech však bylo prokázáno, že produkty vznikající při ozáření mají vliv na zvýšení otěru. Ozáření se totiž mohou štěpit některé C-C vazby a mohou tak dát vznik volným uhlíkovým radikálům, jež jsou příčinou zvýšení otěru (viz Obr. 3. A, B str. 19). Naproti tomu u tzv. zesítěného „low cross-linked“ polyethylenu vznikají nové C-C vazby, které spojí vzdálenější části molekuly (viz Obr. 3. C str.19). Tento zesítěný polyethylen ~~má lepší mechanické vlastnosti a je tak i~~ proti otěru odolnější. Pokud však dochází k ozáření za přítomnosti kyslíku, dochází k nežádoucímu efektu – volné uhlíkové radikály oxidují. Tento efekt se projevuje „rozlomením“ jamky za několik málo let po implantaci. Proto se nyní výrobci polyethylenových jamek snaží sterilizovat hotové výrobky gama-zářením v inertních atmosférách dusíku nebo argonu. Někteří výrobci také přistoupili k jinému způsobu sterilizace bez použití záření, např. pomocí ethylenoxidu. Tento způsob neindukuje vznik nových příčných vazeb, ale zároveň pouze minimálně ovlivní původní mechanické vlastnosti polyethylenu. [3]

Od roku 1999 se v klinické praxi používají jamky z polyethylenu, který je sterilizován elektronovými paprsky v kombinaci s ohřívacím procesem. Otěr tohoto „vysoce zesítěného“ resp. „Highly cross-linked“ polyethylenu je v laboratorních podmínkách neměřitelný (viz Obr. 3. D str.20). Zahřátí (nad teplotu tání PE, cca 145 °C) v průběhu sterilizace způsobí eliminaci reziduálních volných uhlíkových radikálů vznikem dalších nových příčných C-C vazeb. Pro ozáření se používá vysokoenergetické záření 2,5 – 25 Mrad.

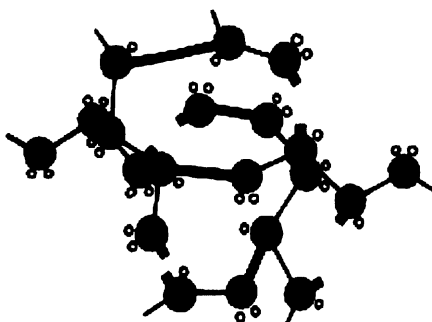
Obr. 3.



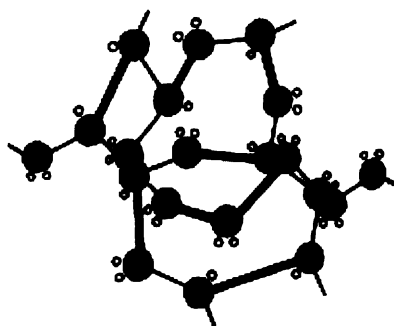
Obr. 3. A: Vazby v neozářeném vysokomolekulárním polyethylenu



Obr. 3. B: Vznik volných uhlíkových radikálů z původních C-C vazeb v průběhu ozáření



Obr. 3. C: Vznik nových tzv. příčných C-C vazeb v průběhu ozáření



Obr. 3. D: Eliminace volných uhlíkových radikálů vznikem nových příčných vazeb – „vysoce zesítný“ polyethylen

Upraveno podle [3]

3.4.6. Polyethylenový otěr

Otěr je progresivní úbytek materiálu spojený s uvolňováním otěrových částic v důsledku vzájemného pohybu dvou protilehlých ploch za působení tlaku. Většinou se otěr týká měkčího ze dvou materiálů – u endoprotéz tedy polyethylen. Proces otěru může probíhat různými mechanismy. Adhezivní otěr vzniká vazbou mikropovrchů protilehlých ploch, které jsou vystaveny tlaku a při jejich pohybu dochází k odstraňování materiálu z povrchu plochy. Jiným typem otěru je abrasivní otěr, který je způsoben nerovnostmi tvrdšího materiálu. Hlavice vyrobená z takového tvrdého a nedokonale opracovaného materiálu vytváří mikroskopické rýhy v profilu měkčí polyethylenové komponenty. K únavovému otěru dochází v důsledku tak velkého opakovaného zatěžování, kdy je překročena únavová pevnost materiálu a dojde k jeho uvolňování z povrchu. Typické pro tento typ otěru jsou podpovrchové praskliny, které dávají vznik otěrovým částicím větších rozměrů (oproti abrazivnímu a adhezivnímu otěru). V souvislosti s otěrem je nutno zmínit také pojem tok za studena. Jedná se o proces plastické deformace, při které se netvoří polyethylenové částice a nedochází k úbytku materiálu, pouze k jeho „odtékání“ z místa největšího tlaku. [3, 13, 14]

K otěru dochází za určitých podmínek, které nazýváme mody (režimy) otěru. Při modu 1 vzniká otěr vzájemným pohybem dvou primárních povrchů kloubní náhrady a

jedná se tak například o pohyb femorální komponenty proti polyethylenové acetabulární vložce kloubní jamky. Situace, kdy se primární povrch pohybuje proti sekundárnímu povrchu označujeme jako mod 2. Příkladem může být stav, kdy hlavice endoprotézy penetruje polyethylenovou jamku a tře se tak proti kovové kotvící acetabulární misce. Mod 3 nastává v okamžiku, kdy je mezi dvěma vzájemně se pohybujícími primárními povrchy vmezeřeno třetí těleso, kterým mohou být například uvolněné fragmenty kostního cementu, drobné částice kostí nebo kovové částice z povrchu implantátu. Díky těmto částicím dochází buď k přechodnému nebo permanentnímu zdrsnění primárních nosných ploch. Mod 4 přichází v úvahu při vzájemném kontaktu dvou sekundárních povrchů. Příkladem může být ořez na rozhraní kostního cementu nebo vzájemný pohyb kovového dřívku resp. jeho povrchu proti kosti. Částice vzniklé v rámci ořezového modu 4 se mohou skládat z kostní tkáně, polymethylmetakrylátu, hydroxyapatitu nebo kovových slitin. Zároveň mohou být transportovány k primárním plochám a tam způsobovat ořezový režim 3. [3, 13, 14]

Pro klinické účely se využívá pro měření ořezu tzv. lineární ořez. Ten hodnotí postupné zanořování hlavice do nosné části jamky na rentgenovém snímku po určitých časových intervalech. Hodnoty lineárního ořezu vztahující se k endoprotéze, kde je hlavice o průměru 22 mm vyrobena z chrom-kobaltové slitiny a jamka z UHMWPE, se pohybují mezi 0,1 – 0,2 mm za rok. Volumetrický ořez, který měří počet částic uvolněných z artikulující plochy za jednotku času nebo při jednom pohybovém cyklu, činí (pro tento typ endoprotézy) 17-41 mm³ za rok, tj. 0,3-10,2 mg za rok. [15]

3.4.7. Polyethylenové ořezové částice a vznik granulomu

Organismus přijímá polyethylen jako cizorodý materiál, proto se ho po jeho implantaci snaží ohraničit nebo eliminovat. Pokud není plastická hmota z fyziologického hlediska dráždivá opouzdřuje ji a dlouhodobě toleruje.

Jak již bylo popsáno výše, výsledkem ořezu jsou ořezové částice, které se hromadí v kloubu a lymfatickou cestou jsou transportovány do jeho blízkého okolí. Setkáváme se s nimi však i v oblastech vzdálených (tříselné a kyčelní uzliny, játra a slezina), kam jsou zanášeny nejen cestou lymfatickou, ale i cestou krevní. Tyto biologicky aktivní částice stojí na počátku aseptického zánětlivého procesu v organismu. V závislosti na velikosti (nejčastěji jsou fagocytovány částice o velikosti 0,3 – 0,5 μm) [15] jsou pohlcovány

makrofágy a iniciují tak produkci zánětlivých mediátorů. Dochází tak ke spuštění kaskády reakcí, jejichž důsledkem je vznik zanícené tkáně bohaté na polyethylenové granulomy (viz Obr. 4.) v okolí kosti. Vystupňovaná tvorba takového granulomu vede k rozsáhlé kostní resorpci a následnému uvolnění implantátu.

Obr. 4.



Obr. 4.: Tkáň bohatá na granulom

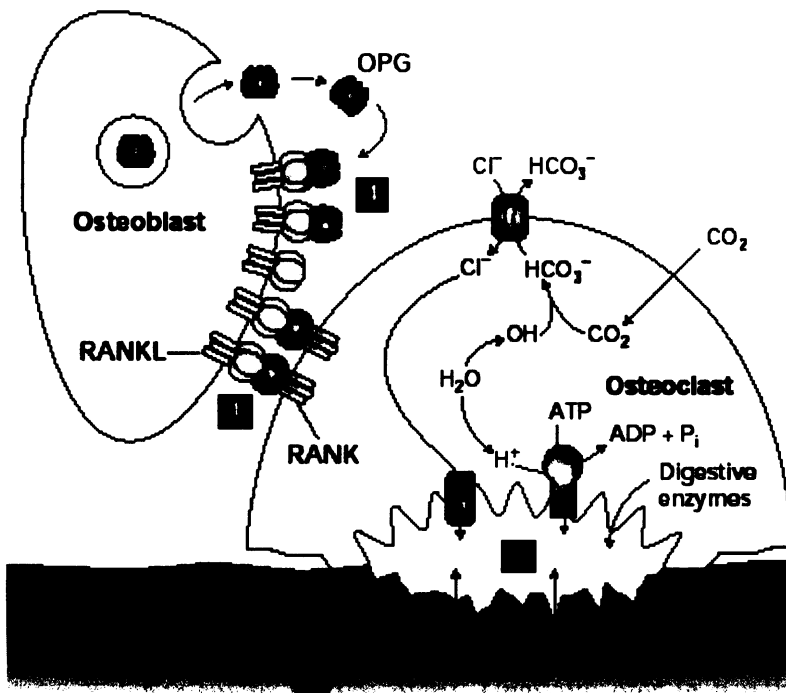
Upraveno podle [16]

Osteolýza kosti a následné uvolnění implantátu je podmíněna přítomností osteoklastů – mnohjaderných finálně diferencovaných buněk odvozených od hematopoetické buňky linie monocytů/makrofágů, které degradují matrix kosti. Normální metabolismus kosti zahrnuje jak její novotvorbu (zajišťují osteoblasty), tak i její odbourávání. Rovnováhu těchto dějů reguluje signální komplex zprostředkovaný povrchovými receptory a cytokiny. Osteoklasty jsou tedy typy makrofágů, které v plazmatické membráně obsahují integriny. Osteoklast pomocí nich tvoří s povrchem kosti pevné spojení. Díky tomu se pak vytvoří otevřený extracelulární prostor, do něhož osteoklast produkuje velmi korozivní směs chloridových iontů a proteas, která ničí anorganickou složku kosti a proteiny kostní hmoty. Resorpce kosti osteoklasty je regulována mezibuněčnou interakcí s osteoblasty, které sekretují kolagen I. Osteoblasty exprimují povrchový signální protein RANKL (ligand pro receptor RANK = receptor activator of nuclear factor κ B). Povrchový receptor pro RANKL označovaný jako RANK je povrchovým receptorem exprimovaným na povrchu osteoklastů. Interakci RANKL-RANK iniciuje signální kaskáda v osteoklastech (signalizační kaskáda NF- κ B = nuclear

factor κB a $TNF-\alpha$ = tumor necrosis factor α). Tyto signály indukují aktivaci osteoklastů a jejich tvarovou změnu nutnou pro vytvoření těsného spojení s povrchem kosti. Osteoblasty navíc produkují protein osteoprotegerin (OPG), který chrání kost před resorpcí. OPG se dokáže vázat na RANKL a tím zabránit interakci RANK-RANKL a tudíž i aktivaci osteoklastů ke kostní resorpci. Výše popsany proces shrnuje Obr. 5.

[17]

Obr. 5.



Obr. 5.: Kostní resorpce a její regulace

- 1- Interakce RANK-RANKL
- 2- Těsné spojení mezi osteoklastem a povrchem kosti
- 3- Osteoklast produkuje směs chloridových iontů a proteas
- 4- Osteoblasty produkují OPG blokuující interakci mezi RANK-RANKL

Upraveno podle [17]

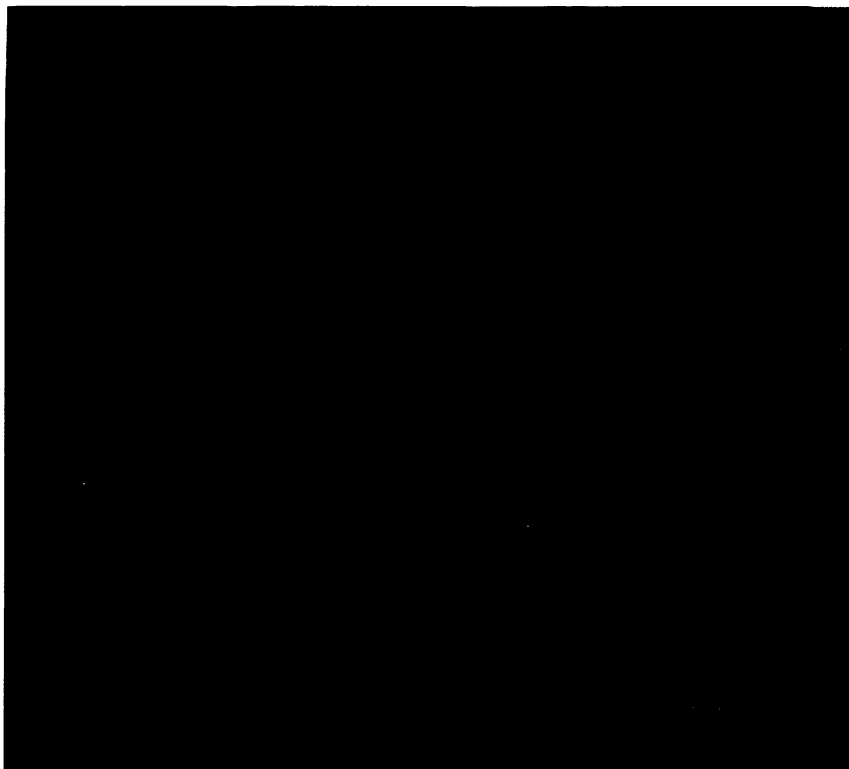
V tkáni obklopující uvolněnou kloubní náhradu byla prokázána přítomnost celé řady cytokinů: M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), TNF- α (tumor necrosis factor α), řada interleukinů IL-1 β (interleukin 1 β), IL-6 (interleukin 6), IL-8, IL-11, transformující růstové faktory (TGF- β), dále pak metaloproteinasy, kolagenasy, prostaglandin E₂ (PGE₂). Všechny tyto faktory mohou buď nepřímo vést ke ztrátám kostní tkáně stimulací aktivity osteoklastů (cytokiny), nebo přímo způsobovat odbourávání kosti (kolagenasy). [18]

3.4.8. Velikost a tvar polyethylenových částic

Izolací a následnou morfologickou charakterizací pomocí elektronového mikroskopu bylo identifikováno několik různých typů polyethylenových částic. Tzv. zrna jsou kulaté mírně zploštělé částice menší než 1 μm . Větší (1-2 μm) přibližně kulaté částice s nepravidelným povrchem byly označeny jako tzv. korálky. „Fibrily“ jsou tenké, výrazně prodloužené kuželovité částice, jejichž délka se pohybuje od 1 μm do 5 μm . Tzv. úlomky jsou delší a tenčí částice o délce 10-20 μm a šířce několik mikronů. Částice připomínající vločky jsou největší a mohou mít jak hladký, tak i nepravidelný povrch. [19]

Průměrná plocha částic izolovaných z kolenního kloubu byla dvakrát větší (1,2 μm^2) než plocha částic z kyčelního kloubu (0,61 μm^2). Ačkoli většina otěrových částic z kolenního kloubu byla menší než 1 mikron, ve vzorcích z kyčelního kloubu bylo výrazně větší množství nejmenších polyethylenových částic. Tyto rozdíly jsou nejspíše dány různým mechanismem vzniku otěru. Únavový otěr je u náhrad kyčelního kloubu méně častý, převládá abrazivní a adhezivní mechanismus otěru, který vede k tvorbě velmi malých částic. Srovnání izolovaných PE částic z kolenního a kyčelního kloubu poskytují Obr. 6.1. str. 25 a Obr. 6.2. str.26. [19]

Obr. 6.1.



Obr. 6.1: Jednotlivé morfologické typy PE částic z kyčelního kloubu (snímek z elektronového mikroskopu)

B- korálky 1 μm

G- zrna menší než 1 μm

F- tenké prodloužené fibrily

Upraveno podle [19]

Obr. 6.2.



Obr. 6.2.: Jednotlivé morfologické typy PE částic z kolenního kloubu (snímek z elektronového mikroskopu)

Fl-velké vločky

S-velké úlomky

F-malé fibrily

G-zrna

Upraveno podle [19]

4. Cíl Práce

- ❖ Potvrdit/vyvrátit publikované tvrzení: „Centrifugace použitá při izolaci má vliv na morfologii polyethylenových částic [24]
- ❖ Popsat distribuci polyethylenových částic v různých částech tkáňového vzorku z okolí endoprotéz kyčelních kloubů
- ❖ Připravit modelové polyethylenové částice
- ❖ Izolovat važitelné množství polyethylenových částic, vytvořit kalibrační řadu, definovat vztah mezi hodnotami IRC a absolutní hmotností resp. počtem částic
- ❖ Připravit membrány s definovaným počtem částic pro testy na tkáňových modelech
- ❖ Ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR charakterizovat izolované polyethylenové částice

5. Materiály

Chemikálie:

Dusík kapalný

Hydroxid draselný (Lachema)

Hydroxid sodný (Lachema)

Chlorid vápenatý bezvodý (Lachema)

Chloroform (Lachema)

Oxid uhličitý pevný

Propan-2-ol (Lachema)

Kyselina chlorovodíková (Lachema)

Kyselina dusičná (Lachema)

Kyselina trihydrogenfosforečná (Lachema)

Methanol (Lachema)

Toluen (Lachema)

Enzymy:

Proteasa ze *Streptomyces griseus* - Lot:121H04595 (Sigma)

Kolagenasa z *Clostridium histolyticum* – Lot:10K1142 (Sigma)

Kolagenasa CRUDE – Lot: 75H69955 (Sigma)

Materiály:

Tkáňové vzorky granulomů (FN Motol, FN Olomouc)

Přístroje:

Centrifuga MPW-310 (Mechanika Precyzysna)

Centrifuga Universal 32R (Hettich)

Centrifuga Optima LE.80K ultracentrifuge (Beckman Coulter)

Filtrační zařízení skleněné FG25S (Whatman)

Filtrační zařízení skleněné GV 050/0 (Schleicher & Schuell)

Frita S4

FTIR spektrometr IFS-55 vybavený MCT detektorem (256 scan/spectrum, rozlišení 4 cm^{-1}) (Bruker)

Homogenizátor X620 CAT (600 W, 50/60 Hz) M.Zipperer GmbH
Laboratorní minitřepačka Minishaker MS2 (IKA) - vortex
Lyofilizátor Lyovac GT 2E (Finn-Aqua)
Membránová vývěva VM-20D (MEZ)
Polykarbonátové membrány 0,1 μm – Isopore disc PC philic (Millipore)
Polykarbonátové membrány 10 μm – Isopore disc PC philic (Millipore)
Polykarbonátové membrány 5 μm (Whatman)
Rastrovací elektronový mikroskop Vega TS 5130 (Tescan)
Rastrovací elektronový mikroskop Quanta 200 FEG (FEI) vybavený EDS detektorem (EDAX, USA)
Rastrovací elektronový mikroskop XL20 ESEM vybavený EDAX detektorem (FEI)
Sonotroda MS3 (průměr hrotu 3 mm) (Hielscher)
Teflonové membrány 0,1 μm – Omnipore disc PTFE philic (Millipore)
Teflonové membrány 10 μm – Omnipore disc PTFE philic (Millipore)
Ultrasonic Procesor UP100 (Hielscher)
Vakuové naprašovací zařízení Sputter coater BAL-TEC SCD 050 (Balzers)
Vakuové naprašovací zařízení JEE-4C (JEOL)

6. Metody

6.1. Tkáňové vzorky

Vzorky granulomové tkáně byly odebrány při reoperacích kyčelních a kolenních kloubů prováděných na 1. Orthopedické klinice 1. LF UK ve Fakultní nemocnici Motol a ve Fakultní nemocnici v Olomouci. Indikací pro tyto reoperace bylo vždy aseptické uvolnění implantátu. Granulomy byly získány od pacientů různého věku, od žen i mužů s rozdílnými typy endoprotéz. Odebrané vzorky tkáně byly předány ve zmraženém stavu k analýze.

6.2. Izolace polyethylenových částic z tkáně

6.2.1. Čištění používaných chemikálií

Všechny roztoky používané během izolace byly předem čištěny. Destilovaná voda, 0,015 mol/l CaCl_2 , propan-2-ol (dále jen PrOH) byly před použitím filtrovány přes polykarbonátovou (dále jen PC) membránu s velikostí pórů 0,1 μm . Agresivnější chemikálie – 65% kyselina dusičná, 12 mol/l hydroxid draselný byly filtrovány přes teflonovou membránu (dále jen TF membrána) s velikostí pórů 0,1 μm .

6.2.2. Membrány

Při všech následujících postupech byly používány polykarbonátové a teflonové membrány s různou velikostí pórů. Od výrobce Millipore byly používány polykarbonátové membrány (označeny výrobcem Isopore) s velikostí pórů 0,05; 0,1 a 10 μm (dále jen 0,05; 0,1 a 10 μm PC membrány). Rovněž od výrobce Millipore byly používány teflonové membrány (výrobcem označeny Omnipore) s velikostí pórů 0,1 a 10 μm (dále jen 0,1 a 10 μm TF membrány). Od výrobce Whatman byly používány polykarbonátové membrány s velikostí pórů 5 μm (dále jen 5 μm PC membrány).

6.2.3. Lyofilizace a delipidace vzorků

Zmražené vzorky granulomové tkáně byly před samotnou izolací lyofilizovány a delipidovány. Po lyofilizaci byly ze vzorku odebrány 0,3 g suché tkáně a nakrájeny na malé kousky. Následně byla suchá tkáň delipidována 10 ml směsí chloroform/methanol (2:1, v/v). Po 12 hodinách byla delipidační směs vyměněna. Po odstranění druhé delipidační směsi byly vzorky důkladně vysušeny při 60°C po 2 hod.

6.2.4. Sonikace

Během izolace UHMWPE částic (dále jen PE částice) z tkáně byla použita v různých krocích sonikace za účelem snížení agregace PE částic a zvýšení výtěžnosti izolace. Pro sonikaci byla použita sonotroda MS 3 sonikátoru Ultrasonic Processor UP100H (Hielscher) za těchto podmínek: 30kHz, amplituda 180 μm , hustota akustického výkonu 460 W/cm^2 . Tyto podmínky byly dodrženy při všech izolacích s tím, že pro jednotlivé postupy byla specifická jen doba působení ultrazvuku.

6.2.5. Kyselá hydrolýza

Delipidovaný a vysušený vzorek byl hydrolyzován 5 ml 65% HNO_3 po 24 hod za laboratorní teploty. Dále byla zpracovávána jen vrchní 2 ml vrstva suspenze (zbylá spodní vrstva nebyla použita). Vrchní 2 ml vrstva byla následně promyta dalšími 5 ml HNO_3 a poté celkem 5krát 8 ml vody. Před každým oddělením horní vrstvy byl roztok vždy promíchán (na vortexu), sonikován 2 min (sonikace byla prováděna jen při promývání vodou za podmínek popsaných v odstavci 6.2.4), centrifugován při 2000 x g 5 min a ponechán stát při laboratorní teplotě. Při čtvrtém promytí vodou byla suspenze neutralizována přidáním 0,2 ml 12 mol/l KOH.

Získaná horní 2 ml vrstva suspenze obsahující PE otěrové částice byla použita pro další zpracování – filtraci.

6.2.6. Enzymová hydrolýza

K delipidovanému a vysušenému vzorku byl přidán roztok 0,015 mol/l CaCl_2 (8,35 ml na 1 g suché tkáně). Tyto roztoky se vzorky byly povařeny na vodní lázni 15 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo upraveno pH na hodnotu 8,5 pomocí 2 mol/l roztoku NaOH a 2,5% H_3PO_4 . Dále byla ke vzorkům přidána proteasa ze *Streptomyces griseus* (8,5 mg enzymu na 1 g suché tkáně). Takto připravené směsi byly překryty tenkou vrstvou toluenu a umístěny do inkubátoru na dobu 4 hod. Proteasa byla inaktivována povařením na vodní lázni 10 min. Vzorky byly rozděleny na lyzát a nedegradovanou část. Obě části byly zvláště lyofilizovány a zváženy. Lyzáty byly dále podrobeny kyselé hydrolýze (viz postup popsáný v odst. 6.2.5). Dalšímu enzymatickému působení byly vystaveny jen nedegradované části. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl ke vzorkům opět přidán roztok 0,015 mol/l CaCl_2 a pH stejným způsobem upraveno na 7,5. Následně byla ke vzorkům přidána kolagenasa z *Clostridium histolyticum* (8,5 mg enzymu na 1 g suché tkáně). Směsi byly opět překryty vrstvou toluenu a umístěny do inkubátoru. V průběhu degradace kolagenasou bylo průběžně kontrolováno a upravováno pH roztoku na 7,5. Po degradaci vzorků byl z roztoku odstraněn toluen. Vzorky byly opět rozděleny na lyzát a nedegradované částičky. Nedegradované částičky byly omyty destilovanou vodou, vysušeny a zváženy. Kolagenasové lyzáty byly lyofilizovány, zváženy a dále zpracovány kyselou hydrolýzou (dle odst. 6.2.5.).

6.2.7. Filtrace polyethylenových částic

Výsledná 2 ml horní vrstva suspenze PE částic ve vodě byla vždy smíchána s 2 ml PrOH. Tato 4 ml suspenze (PrOH + PE částice + voda) byla ihned po sonikaci 2 min zfiltrována (do skleněné zkumavky kalibrované na 6ml) přes 10 μm PC membránu. Původní zkumavka byla promyta 2 x 0,5 ml PrOH a takto získané suspenze byly rovněž filtrovány přes stejnou membránu. Membrána byla promyta 1 ml PrOH. Po promíchání na vortexu bylo z filtrátu odebráno 4,5 ml suspenze a přefiltrováno přes 0,1 μm PC membránu. Membrána byla promyta 1 ml PrOH. Dále byly odebrány 0,2 ml filtrátu a filtrovány přes další 0,1 μm PC membránu. Membrána byla promyta 0,5 ml PrOH.

Membrány se zachycenými UHMWPE otěrovými částicemi 0,1 – 10 μm byly následně charakterizovány a kvantifikovány různými metodami (IR, SEM, EDAX viz odst. 6.9.) na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

6.3. Vliv centrifugace na morfologii PE částic

Otěrové částice polyethylenu byly izolovány pomocí hydrolyzy HNO_3 , jak je uveden v odstavci 6.2.5. s tím rozdílem, že nebyla v žádném kroku použita centrifugace. PE částice byly jen ponechány samovolné flotaci po dobu 24 hod. Po posledním promytí suspenze 8 ml vody bylo 8 ml spodní vrstvy odsáto a uschováno. Zbylé 2 ml suspenze byly dále zpracovávány. Z těchto 2 ml bylo odebráno 0,5 ml a smícháno s 0,5 ml PrOH. Tato směs byla po promíchání na vortexu a sonikaci 2 min filtrována přes 10 μm teflonovou membránu (TF membrána byla 2x promyta 0,5 ml PrOH). Po sonikaci 2 min byly 2 ml filtrátu filtrovány přes 0,1 μm PC membránu (PC membrána promyta 0,5 ml PrOH). Ke zbylé původní horní vrstvě (1,5 ml) byla přidána původně odsátá spodní vrstva (8 ml). Po promíchání, sonikaci 2 min a centrifugaci při 500 x g (2 min) bylo opět odsáto 8 ml spodní vrstvy. Z 1,5 ml horní vrstvy bylo opět odebráno 0,5 ml a smícháno s 0,5 ml PrOH. Vzorek byl filtrován stejným způsobem, jak bylo popsáno u vzorku, který byl ponechán samovolné flotaci. K 1 ml zbylé horní vrstvy bylo přidáno 8 ml spodní vrstvy. Po rozmíchání, sonikaci 2 min a centrifugaci při 16 000 x g (5 min) bylo opět odsáto 8 ml spodní vrstvy. Ze zbylé 1 ml horní vrstvy bylo odebráno 0,5 ml a smícháno s 0,5 ml PrOH. Vzorek byl filtrován stejným způsobem jako vzorek centrifugovaný při 500 x g. K 0,5 ml horní vrstvy bylo přidáno 8 ml spodní vrstvy. Po promíchání, sonikaci 2 min a centrifugaci při 105 000 x g (30 min) bylo opět odsáto 8 ml spodní vrstvy. Zbylá 0,5 ml horní vrstva, ke které se přidalo 0,5 ml PrOH, byla filtrována jako předešlé vzorky. Výše popsáný postup shrnuje Schéma 1, str.34.

Schéma 1:

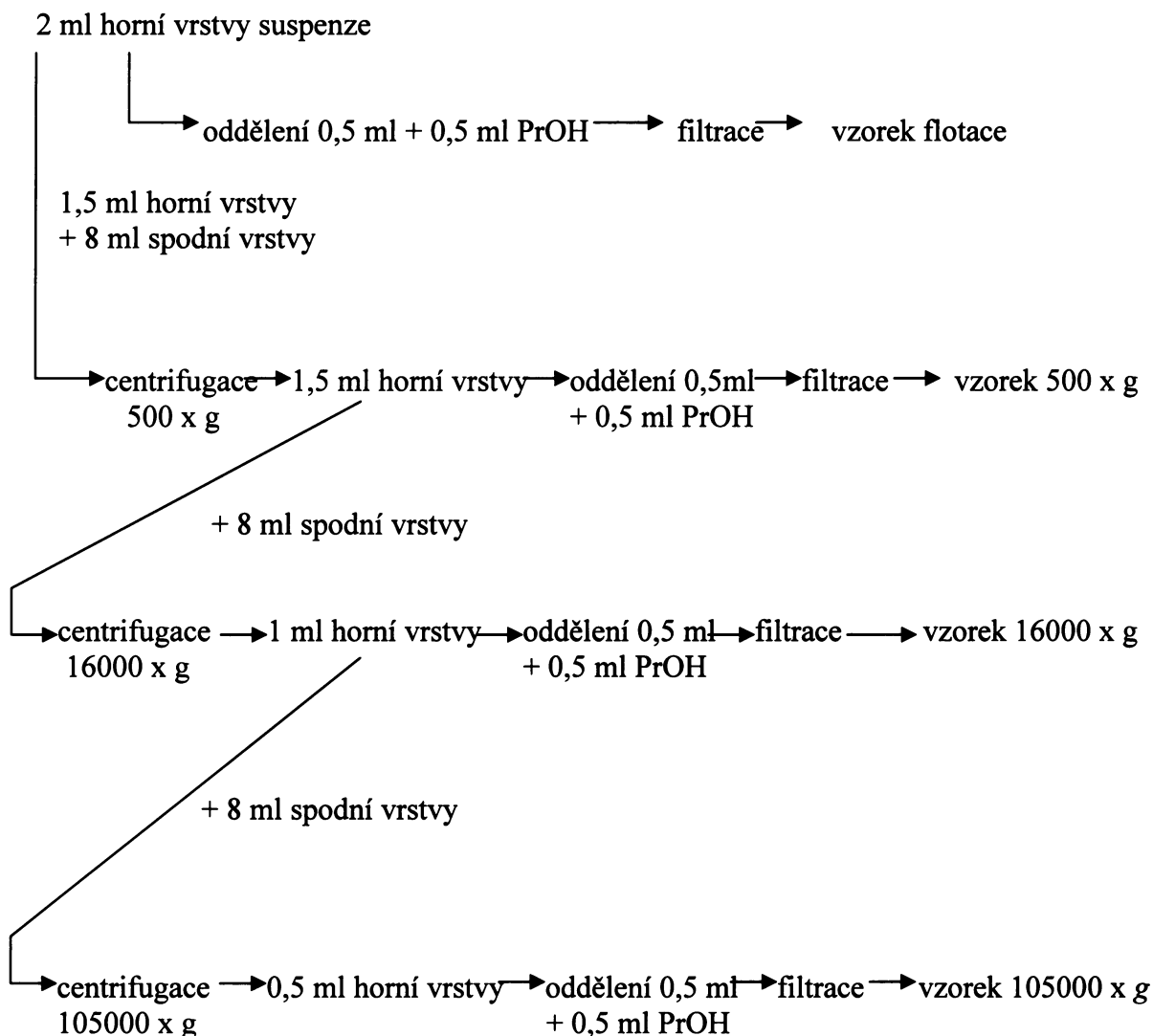


Schéma 1: Postup izolace PE částic pro posouzení vlivu centrifugace na jejich morfologii

Membrány se zachycenými otěrovými PE částicemi 0,1 – 10 μm byly charakterizovány obrazovou analýzou pomocí metody SEM (viz odst. 6.9.). Testovanými parametry obrazové analýzy byly: ekvivalentní průměr, cirkularita, elongace. Tyto parametry byly určeny pomocí programu obrazové analýzy – Lucia. Ekvivalentní průměr (D) byl definován jako:

$$D = (4 \times \text{plocha částice na snímku} / \pi)^{1/2}$$

Cirkularita (C) byla definována jako:


$$C = 4 \pi \times \text{plocha částice na snímku} / (\text{obvod částice})^2$$

Elongace (E) je parametr odvozený od ekvivalentního průměru a byla definována jako:

$$E = \text{Max průměr} / \text{Min průměr}$$

Pokud by při vzrůstajícím zrychlení při centrifugaci docházelo k morfologickým změnám PE částic, výše uvedené parametry obrazové analýzy by se měnily tak, jak shrnuje Tab.1.

Tab.1.

Modelové PE částice			
	Parametry obrazové analýzy		
Ekvivalentní průměr	1,13	1,13	0,63
Cirkularita	0,09	0,12	0,26
Elongace	16,74	1,49	6,39

Změny parametrů obrazové analýzy

→ D

↑ C

↓ E

Tab.1.: Tabulka popisující změny parametrů obrazové analýzy, ke kterým by mohlo docházet při centrifugaci [23]

6.4. Distribuce PE částic v tkáni

Pro zjištění distribuce PE částic v tkáni, resp. pro posouzení množství a zastoupení jednotlivých velikostních a morfologických skupin v granech a okolní tkáni, byla použita enzymová hydrolyza. Postup byl již stručně popsán v odstavci 6.2.6. s tím rozdílem, že byly zpracovávány čerstvé nativní vzorky. V dalším textu popsany postup shrnuje Schéma 2 na str. 38.

Čerstvé nativní vzorky (nelyofilizované) byly po rozmražení rozkrájeny a rozděleny na **granulomovou tkáň** (znatelné kuličky – grana) a **okolní tkáň** (svaly, kosti, chrupavka, vazy). Tyto dvě skupiny byly zvlášť lyofilizovány a zváženy (granulomová tkáň 2,6 g, okolní tkáň 1,6 g). Po lyofilizaci bylo z každého vzorku odebráno 0,3 g suché tkáně. 0,3 g odebrané z **granulomové tkáně** byly označeny „G“, delipidovány a dále zpracovány kyselou hydrolyzou (viz odst. 6.2.5.). 0,3 g odebrané z **okolní tkáně** byly označeny „T“, delipidovány a dále zpracovány kyselou hydrolyzou (viz odst. 6.2.5.). Finální 4 ml suspenze PE částic (2 ml vodná suspenze PE částic + 2 ml PrOH) byla celá filtrována přes předem zváženou 10 µm PC membránu. Filtrát byl dále filtrován přes předem zváženou 0,1 µm PC membránu (před filtrací byl každý vzorek sonikován 4 min).

Veškerý zbytek lyofilizované **granulomové tkáně** (2,3 g) a **okolní tkáně** (1,3 g) byl dvakrát delipidován směsí chloroform/methanol (2:1, v/v). Po důkladném odpaření zbytků delipidační směsi při 60°C byl k oběma vzorkům přidán 0,015 mol/l CaCl₂ (ke granulomové tkáni 19,2 ml, k okolní tkáni 10,8 ml). Tyto roztoky byly poté povařeny na vodní lázni 15 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo upraveno pH na 8,5 (pomocí 2 mol/l NaOH a 2,5% H₃PO₄). Dále byla k oběma vzorkům přidána **proteasa** ze *Streptomyces griseus* (ke gran.tkáni 19,2 mg, k okolní tkáni 11 mg). Takto připravené vzorky byly umístěny do inkubátoru (s teplotou 37°C) na 4 hod. Po 4 hod. byla proteasa degradována povařením na vodní lázni 15 min. Každý vzorek byl poté rozdělen na 2 části: lyzát a nedegradovanou část (resp. z granulomové tkáně byl získán vzorek označený G (grana) a lyzát označený GL, z okolní tkáně byl získán vzorek nedegradované tkáně=NDT a lyzát označený TL, viz Schéma 2, str.38). Protože na hladině byly viditelné kousky PE, byly tyto šupinky opatrně odebrány z hladiny a přidány k příslušnému lyzátu. Všechny 4 takto získané vzorky byly zvlášť lyofilizovány a poté zváženy (TL=0,805 g, GL=1,19 g, G=0,83 g, NDT=0,46 g). Vzorky TL a GL byly následně rozděleny po 0,3 g a podrobeny

standardní izolaci pomocí kyseliny dusičné (stejný postup jako pro vzorky „G“ a „T“). Stejným způsobem byly jejich finální suspenze i filtrovány. Získali jsme tedy 2 membrány (10 µm PC) se vzorkem TL (**TL1, TL2**) a 2 membrány (0,1 µm PC) se vzorkem TL (**TL1, TL2**) a 3 membrány (10 µm) se vzorkem GL (**GL1, GL2, GL3**) a 3 membrány (0,1 µm) se vzorkem GL (**GL1, GL2, GL3**).

K nedegradovaným kouskům (po působení proteasy), tj. ke vzorkům označeným G a NDT, byl přidán 0,015 M CaCl₂ (ke G 7 ml, ke NDT 4 ml). Poté bylo upraveno pH na 7,5 (pomocí 2mol/l NaOH a 2,5% kys.fosforečné). Dále byla ke vzorkům přidána **kolagenasa z *Clostridium histolyticum* typ I** (ke G 7 mg, ke NDT 4 mg). Oba vzorky byly překryty vrstvou toluenu a umístěny do inkubátoru (37°C) na 72 hod. Protože i po této době byly v roztocích znatelné kousky nedegradované tkáně, bylo ke vzorkům po opětovné úpravě pH na 7,5 přidáno ještě další množství kolagenasy (ke G 7 mg, k NDT 4 mg). Vzorky byly opět překryty vrstvičkou toluenu a umístěny do inkubátoru na 24 hod. Po 24 hod. byl celý postup opakován, tj. opět přidáno stejné množství kolagenasy, a navíc bylo ještě přidáno stejné množství **kolagenasy „CRUDE“** (ke G 8 mg, k NDT 4 mg). Po 24 hod. byl z každého vzorku slit lyzát a ze sraženin vybrány „tvrdé kousky“ = **kostní fragmenty**. Kousky kostí byly poté omyty, vysušeny a zváženy. Oba získané lyzáty (označené **GKL a TKL**) byly zvláště lyofilizovány a poté zváženy a rozděleny po 0,3 g. Tyto lyofilizované lyzáty byly poté podrobeny izolaci pomocí kyseliny dusičné (viz odst. 6.2.5.). Stejným způsobem byly jejich finální suspenze i filtrovány. Získali jsme tedy 2 membrány (10 µm PC) se vzorkem TKL (**TKL1, TKL2**) a 2 membrány (0,1 µm PC) se vzorkem TKL (**TKL1, TKL2**) a 3 membrány (10 µm PC) se vzorkem GKL (**GKL1, GKL2, GKL3**) a 3 membrány (0,1 µm PC) se vzorkem GKL (**GKL1, GKL2, GKL3**).

Protože se všechny filtraci prováděly přes předem zvážené membrány, byla určena hmotnost zachycených PE částic v jednotlivých vzorcích.

Pro morfologickou analýzu (tj. fotografie z elektronového mikroskopu a obrazovou analýzu) byly vybrány tyto 0,1 µm PC membrány: **TKL1, TL2, GKL2, GL3**. Tyto byly umístěny do příslušného objemu roztoku PrOH/voda 1:1 v/v (TKL1 do 21 ml, TL2 do 13,7 ml, GKL2 do 26,5 ml, GL3 do 17,2 ml) a sonikovány 20 min pro uvolnění PE částic z membrány do roztoku. Po důkladné sonikaci bylo vždy z vzorku odebráno 0,2 ml a ihned filtrováno přes 0,1 µm PC membránu. Morfologická analýza byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Izolací získané nedegradované (ani po působení

kolagenasy) kousky – kostní fragmenty – byly analyzovány pomocí mikroprvkové analýzy (EDAX viz odst. 6.9.3.) na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

Schéma 2:

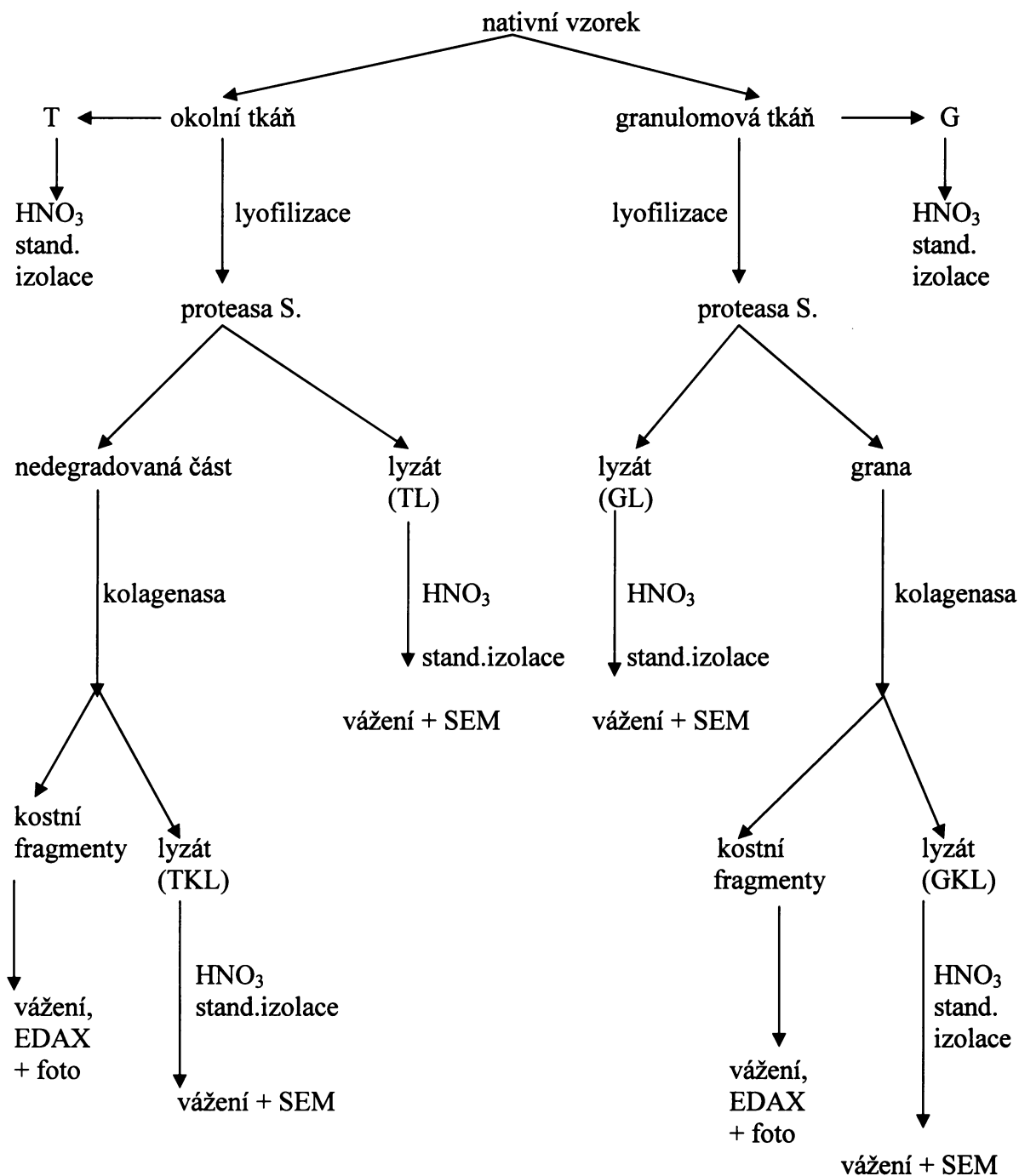


Schéma 2: Postup pro posouzení distribuce PE částic ve tkáni

6.5. Příprava modelových částic PE

Pro přípravu modelových částic polyethylenu byl použit prášek GUR 4150. Tento prášek byl drcen v předem vychlazené porcelánové třecí misce, která byla umístěna do misky se směsí pevného CO₂ a ethanolu. GUR byl po menších dávkách (cca 1g) drcen porcelánovým tloučkem v kapalném dusíku. Na GUR byl vždy nalit kapalný dusík (cca 20 ml) a prášek byl třen o stěny misky, dokud veškerý dusík nevyprchal. Pro jednu navážku byl tento postup opakován minimálně třikrát.

Navážka (4,583 g) takto drceného prášku byla rozmíchána v 250 ml směsi PrOH a vody (v poměru 1:1, v/v, obě složky směsi byly předem filtrovány přes 0,1 µm PC membránu). Vzniklá suspenze byla sonikována (20 min).

Poté byla suspenze filtrována přes fritu S4 (zachycené částice byly promyty 50 ml směsi PrOH/voda 1:1, v/v). Celý objem získaného filtrátu byl opět sonikován 20min.

Dále byla suspenze filtrována přes 10 µm TF membránu (membrána byla opět promyta 50 ml).

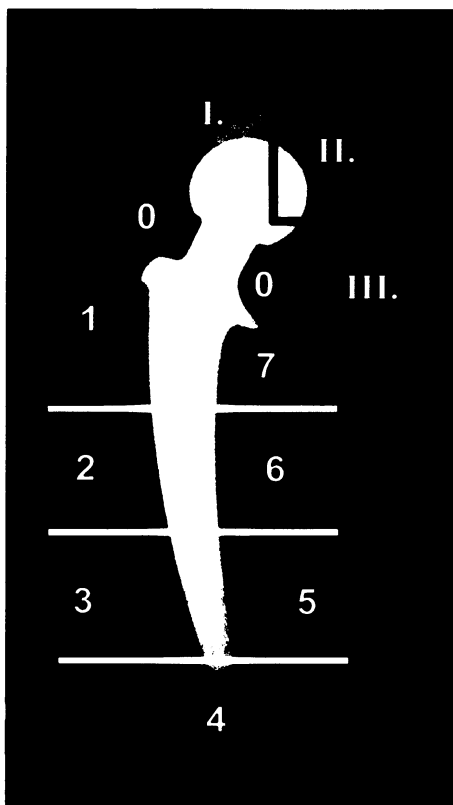
Získaný filtrát byl po 20 min. sonikaci filtrován přes předem zváženou 0,1 µm TF membránu (filtrace byla prováděna za soustavné sonikace ultrazvukovou sondou). Takto byla získána 0,1 µm TF membrána se zachycenými modelovými částicemi o velikosti 0,1-10 µm. Po vysušení membrány v exsikátoru byla membrána s částicemi zvážena a bylo určeno množství zachycených modelových částic.

Takto připravené modelové částice PE byly použity pro prvotní testování toxicity PE částic na buněčných liniích osteoblastů a fibroblastů, které bylo prováděno v Laboratoři buněčných kultur Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

6.6. Kalibrační řada PE částic z tkáně

Pro přípravu kalibrační řady byly přednostně vybrány takové vzorky granulomů dodaných Fakultní nemocnicí v Motole, u kterých se na základě označení lokace odběru (viz Obr. 7, str. 40) v rámci totální kyčelních endoprotéz, předpokládal vyšší výskyt PE otěrových částic v porovnání s jinými. Jednalo se zejména o lokace označené III. a 7. Dalším kritériem pro vybírání vzorků byla pokud možno minimální přítomnost krve ve vzorku, která komplikuje proces izolace.

Obr.7.



Obr.7.: Totální kyčelní endoprotéza s vyznačenými lokacemi možného vzniku granulomu podle Gruena a DeLeeho, RTG snímek.

Upraveno podle [20]

Dle výše zmíněných kritérií bylo vybráno 20 vzorků suché lyofilizované tkáně po 0,3 g. Každý tento vzorek byl umístěn do zkumavky a zvlášť zpracováván. Všechny vzorky byly podrobeny kyselé hydrolyze jak bylo popsáno v odstavci 6.2.5. Nakonec byla ve všech 20 zkumavkách získána horní 2 ml vrstva PE částic ve vodě. Ke každé této 2 ml vrstvě byly přidány 2 ml PrOH. Po důkladném promíchání na minitřepačce a seškrabání usazenin ze stěn zkumavek byly roztoky sonikovány 3 min. Ihned po sonikaci byl každý vzorek zvlášť filtrován přes 10 μm PC membránu (bylo tedy získáno celkem 20 membrán se zachycenými PE částicemi většími než 10 μm). Filtráty prošlé 10 μm membránou byly spojeny a bylo tak získáno 80 ml mléčného filtrátu obsahujícího částice menší než 10 μm . Tento filtrát byl opět důkladně sonikován 5 min a poté filtrován přes předem zváženou 0,1 μm polykarbonátovou membránu (průměr 47 mm). Takto byla získána membrána se

zachycenými částicemi o velikosti 0,1 – 10 μm . Po vysušení membrány v exsikátoru byla určena hmotnost zachycených částic vážením.

Pro určení hmotnosti PE částic o velikosti větší než 10 μm byly všechny (20) získané 10 μm PC membrány se zachycenými částicemi umístěny do 120 ml roztoku PrOH/voda (1:1, v/v). Tato suspenze byla sonikována 30 min. Poté byly membrány jedna po druhé vytahovány ze suspenze a oplachovány tak, aby byly veškeré částice přeneseny do suspenze. Takto byla získána suspenze s částicemi většími než 10 μm . Po krátké sonikaci byla jedna polovina suspenze filtrována přes první předem zváženou 10 μm PC membránu a poté druhá polovina přes druhou předem zváženou 10 μm PC membránu. Po vysušení v exsikátoru byly obě membrány zváženy a z rozdílu hmotností bylo určeno množství PE částic větších než 10 μm .

Membrána (PC 47 mm 0,1 μm) se zachycenými PE částicemi o velikosti 0,1-10 μm byla zvážena a umístěna do zábrusové baňky. K membráně bylo přidáno 80 ml roztoku PrOH/voda (1:1, v/v). Suspenze byla sonikována 20 min. Membrána byla po sonikaci ze suspenze vyjmuta, opláchnuta 2 ml roztoku 50% PrOH a umístěna do exsikátoru. Po důkladném vysušení byla zvážena a z rozdílu hmotností (s částicemi a bez nich) byla určena hmotnost PE částic, která byla převedena do suspenze.

80 ml zásobní suspenze obsahující polyetylenové otěrové částice o velikosti 0,1-10 μm bylo sonikováno 20 min. Hned poté bylo z suspenze odebráno 0,2 ml a okamžitě filtrováno přes 0,1 μm PC membránu. Tentýž objem byl stejným způsobem filtrován ještě dvakrát. Získali jsme tedy 3 PC membrány se zachycenými PE částicemi z objemu 0,2 ml. Vždy po sonikaci byly stejným způsobem filtrovány 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml a 1 ml. Od každého nanášeného objemu byly tedy získány tři 0,1 μm PC membrány.

Tyto membrány byly předány ke kvantifikaci pomocí IR na Ústav makromolekulární chemie AV ČR. Z naměřených tří hodnot IR_c pro daný objem byly určeny průměrné hodnoty. Nanášené objemy roztoku PE částic byly výpočtem převedeny na hmotnosti PE částic v daném objemu. Ze závislosti hodnot IR_c na hmotnosti PE částic v jednotlivých objemech nanášených roztoků byla vytvořena kalibrační řada. Po určení ekvivalentního průměru 0,1 – 10 μm PE částic (ekvivalentní průměr určen pro 0,1 – 10 μm PE částice při Zjišťování vlivu centrifugace viz odst. 6.3.) byla vytvořena závislost IR_c na počtu PE částic.

6.7. Příprava PE částic z tkáně pro testování na buněčných modelech

Pro testování toxických a osteolytických vlivů PE částic na buňky (resp. osteoblasty a fibroblasty) bylo třeba izolovat a připravit definované množství otěrových částic granulomové tkáně. Samotné testování těchto částic probíhalo v Laboratoři buněčných kultur Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Pro určení absolutního počtu izolovaných částic zachycených membráně bylo třeba nejprve určit ekvivalentní průměr částic pomocí metody SEM. Zásobní roztok obsahující dříve izolované polyetylenové otěrové částice (pro přípravu kalibrační řady viz odst.6.6.) o velikosti 0,1-10 μm (17,47 mg v 80 ml roztoku PrOH/voda 1:1, v/v) byl sonikován 20 min. Z tohoto roztoku bylo odebráno 28 ml a hned po sonikaci 5 min filtrováno přes předem zváženou a vysušenou PC membránu (Whatman) o velikosti pórů 5 μm . Tato membrána se zachycenými částicemi o velikosti 5 μm – 10 μm byla vysušena a zvážena. Membrána byla vložena do 161 ml roztoku PrOH/voda (1:1) a sonikována 30 min (**tzv. získali jsme suspenzi s částicemi 5-10 μm**). Ihned po sonikaci bylo z této suspenze odebráno 0,2 ml a filtrováno rovněž přes PC membránu (Whatman) o velikosti pórů 5 μm . Tato membrána byla předána pro určení ekvivalentního průměru částic o velikosti 5-10 μm . K filtrátu získaném při původní filtraci 28 ml přes 5 μm membránu (**tj. obsahující částice 0,1-5 μm**) bylo přidáno 20 ml roztoku PrOH/voda (1:1, v/v) do celkového objemu 48 ml. Tato suspenze byla sonikován 20 min. Po sonikaci bylo z této suspenze odebráno 0,2 ml a filtrováno přes 0,1 μm PC membránu. Tato membrána byla předána pro určení ekvivalentního průměru částic o velikosti 0,1-5 μm . Z filtrátu prošlého 0,1 μm membránou při filtraci velkého množství částic při přípravě kalibrační řady (**tj. obsahující částice menší než 0,1 μm**) bylo po sonikaci 15 min odebráno 25 ml. K této suspenzi bylo přidáno 95 ml roztoku PrOH/voda (1:1, v/v) do celkového objemu 120 ml. Tato suspenze byla sonikován 5 min a poté ponechána stát, aby částice částečně agregovaly. Poté bylo z této suspenze odebráno 0,2 ml a filtrováno přes 0,05 μm PC membránu. Tato membrána byla předána pro určení ekvivalentního průměru částic o velikosti 0,05-0,1 μm .

Pomocí metody SEM byly v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR určeny ekvivalentní průměry pro částice o velikosti 0,05-0,1 μm a 0,1-5 μm . Ekvivalentní průměr částic o velikosti 5-10 μm se nepodařilo určit metodou SEM, a proto byl odhadnut podle ekvivalentních průměrů skupin částic o velikosti 0,05-0,1 μm a 0,1-5 μm (závislost ekvivalentního průměru na velikosti částic podle toho, na jaké membráně byly zachyceny).

Z hodnot ekvivalentních průměrů bylo možno určit navážku (resp. potřebný objem suspenze částic o známé koncentraci) částic potřebnou pro získání konkrétního počtu PE částic o dané velikosti zachycených na membráně. Pro první sérii membrán bylo třeba nanést na membrány 10^{10} PE částic. K získání membrány s 10^{10} částic o velikosti 0,05-0,1 μm bylo na polykarbonátovou membránu s velikostí pórů 0,05 μm nanášeno (po předchozí sonikaci roztoku) 81 μl roztoku obsahující částice o potřebné velikosti (koncentrace roztoku byla 0,14 mg/ml). K získání membrány s 10^{10} částic o velikosti 0,1-5 μm bylo na polykarbonátovou membránu s velikostí pórů 0,1 μm nanášeno (po předchozí sonikaci) 5 ml roztoku obsahující částice o velikosti 0,1-5 μm (koncentrace roztoku byla 0,03 mg/ml). K získání membrány s 10^{10} částic o velikosti 5-10 μm bylo na PC membránu s velikostí pórů 5 μm nanášeno (po předchozí sonikaci) 50 ml roztoku obsahující částice o velikosti 5-10 μm (koncentrace roztoku byla 0,03 mg/ml). Takto byly tedy získány 3 membrány se stejným množstvím zachycených PE částic (10^{10}) pro tři různé velikostní skupiny.

Pro druhou sérii membrán bylo třeba nanést na membrány 10^8 PE částic. K získání membrány s 10^8 částic o velikosti 0,05-0,1 μm bylo na PC membránu s velikostí pórů 0,05 μm nanášeno (po předchozí sonikaci suspenze) 40 μl suspenze obsahující částice o potřebné velikosti (koncentrace suspenze byla 0,14 mg/ml). K získání membrány s 10^8 částic o velikosti 0,1-5 μm bylo na PC membránu s velikostí pórů 0,1 μm nanášeno (po předchozí sonikaci) 50 μl suspenze obsahující částice o velikosti 0,1-5 μm (koncentrace suspenze byla 0,03 mg/ml). K získání membrány s 10^8 částic o velikosti 5-10 μm bylo na PC membránu s velikostí pórů 5 μm nanášeno (po předchozí sonikaci) 0,5 ml suspenze obsahující částice o velikosti 5-10 μm (koncentrace suspenze byla 0,03 mg/ml). Tímto způsobem byly tedy získány 3 membrány se stejným množstvím zachycených PE částic (10^8) pro tři různé velikostní skupiny.

Tyto dvě série membrán se zachycenými PE částicemi o definovaných počtech a velikostech byly předány pro testování na buněčných kulturách do Laboratoře buněčných kultur Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

6.8. Heterogenita vzorku – vliv homogenizace

Pro tento pokus byly vybrány vzorky od tří pacientů. Z každého z těchto lyofilizovaných vzorků bylo odebráno 1,8 g. Dále bylo těchto 1,8 g každého vzorku rozděleno na polovinu (tj. 2 x 0,9 g). První polovina byla rozdělena na tři díly (3 x 0,3 g – standardně zpracovávané množství) a druhá polovina byla ponechána v jedné zkumavce. Takto rozdělené vzorky byly dvakrát delipidovány směsí chloroform/methanol (2:1, v/v). Vzorky první poloviny (tj. 3 x 0,3 g) byly zpracovávány standardně kyselou hydrolyzou (viz odst. 6.2.5.). Jejich finální horní 2 ml vrstvy suspenze PE částic byly následně standardně filtrovány (viz odst. 6.2.7.).

Vzorky druhé poloviny (tj. 0,9 g) byly po delipidaci a vysušení při 60°C umístěny do skleněné zkumavky s destilovanou vodou. Následně byly tyto vzorky 10 min homogenizovány (homogenizátor X620 CAT; plynule zvyšovány otáčky z 8000 ot/min na 20500 ot/min). Homogenizované vzorky byly poté opět lyofilizovány a rozděleny na 3 stejně velké díly (první vzorek na 3 x 0,22 g, druhý vzorek na 3 x 0,19 g, třetí vzorek na 3 x 0,24 g). Tyto vzorky byly hydrolyzovány standardní kyselou hydrolyzou (viz odst. 6.2.5.). Získaná finální horní 2 ml vrstva suspenze obsahující PE otěrové částice byla standardně filtrována (viz odst. 6.2.7.).

Z tkáňového vzorku každého pacienta bylo tedy získáno celkem 6 membrán se zachycenými částicemi (3 vzorky homogenizované, 3 nehomogenizované). PE částice na těchto 18 membránách byly kvantifikovány pomocí metody IRc na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. U jednoho pacienta bylo připraveno navíc ještě dalších 6 membrán (filtrovaný objem 0,2 ml suspenze) pro obrazovou analýzu metody SEM.

6.9. Kvantifikace a charakterizace PE částic

PE částic z granulomů zachycené na membránách byly kvantifikovány, charakterizovány, kontrolovány z hlediska čistoty v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR pomocí mikroskopických a spektroskopických metod.

6.9.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Tato metoda je používána ke kvantifikaci, určení morfologických parametrů, ověření čistoty izolovaných částic. Na snímcích membrán bylo možné rozlišit nečistoty pocházející z rozpouštědel použitých při izolaci, krystalické struktury anorganických příměsí, popřípadě i nerozložené organické látky z původního vzorku tkáně.

Před samotným snímkováním byla membrána s PE částicemi povrchově upravena. Membrána byla připevněna na mosazný terčík a byla na ni nanesena 12 nm vrstva platiny (pomocí vakuového naprašovacího zařízení Sputter Coater SCD 050) nebo uhlíku (pomocí vakuového naprašovacího zařízení JEE-4C), aby byl z povrchu odveden povrchový náboj vznikající v průběhu rastrovací mikroskopie při interakci povrchu se svazkem elektronů. Platina byla používána jen v případě, kdy se neuvvažovalo o možné energeticky disperzní analýze. Takto upravené membrány byly připraveny k vlastnímu mikroskopování. SEM mikrofotografie byly snímány na skenovacím elektronovém mikroskopu Vega TS 5130 v režimu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 30 kV a na rastrovacím elektronovém mikroskopu Quanta 200 FEG v režimu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí kolem 3 kV.

Metoda kvantitativní analýzy SEM mikrofotografií (SEMq) je založena na automatizované obrazové analýze mikrofotografií získaných ze skenovacího elektronového mikroskopu. Pro získání reprodukovatelných výsledků je třeba do obrazové analýzy zahrnout minimálně 4 snímky pořízené z různých míst membrány. [21]

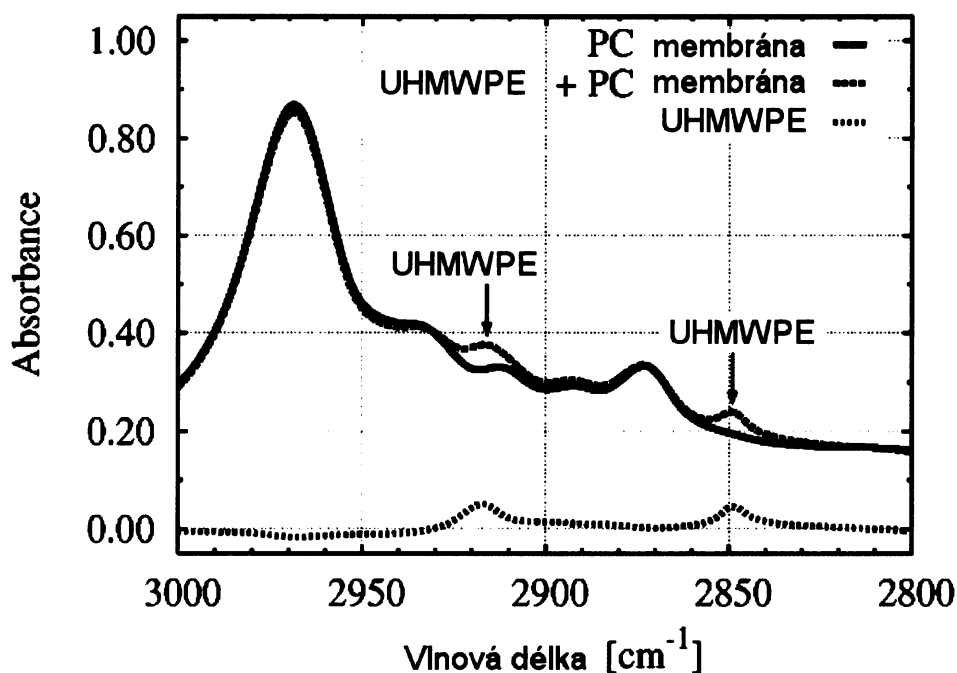
6.9.2. Infračervená spektroskopie (IR)

Infračervená spektroskopie byla použita pro kvantifikaci a ověření čistoty izolovaných částic. Membrána, na které jsou částice zachyceny, slouží jako vnitřní kalibrační standart. Tato metoda využívá měření infračervených spekter s Fourierovou transformací (FTIR). Výsledkem FTIR pro PE jsou typické „peaky“ při 2919 cm^{-1} a 2849 cm^{-1} , které odpovídají antisymetrické a symetrické $-\text{CH}_2-$ vibraci. Konečné spektrum otěrových částic bylo získáno rozdílem spektra PC membrány obsahující PE částice a spektra prázdné membrány (viz. Obr. 8 str. 46.). Po odečtení pozadí polykarbonátové membrány je pro kvantifikaci částic výhodnější „peak“ při 2849 cm^{-1} . Integrací plochy pod

tímto vrcholem byla získána hodnota odpovídající relativnímu objemu zachycených otěrových PE částic. Metoda IRc poskytovala informaci o objemu PE částic v relativní stupnici.

FTIR spektra z nepokovených membrán (ty, jež nebyly ještě zpracovány metodou SEM) byla získána na spektrometru Bruker IFS-55 FTIR vybaveného MCT detektorem (256 scan/spectrum, rozlišení 4 cm^{-1}). Měření byla provedena ATR technikou (zeslabené totální reflexe) s použitím Golden GateTM Heated Diamond ATR Top-Plate (Specac Ltd.) při laboratorní teplotě, nebo byla měřena transmisní technikou na spektrometru vybaveném detektorem DTGS (128 scan/spectrum, rozlišení 2 cm^{-1}). Pro ověření čistoty izolovaných částic bylo využíváno techniky ATR, pro kvantifikaci transmisní technika. [22]

Obr. 8.



Obr. 8.: FTIR spektrum PE částic

Upraveno podle [22]

6.9.3. Energeticky disperzní analýza paprsků X (EDAX)

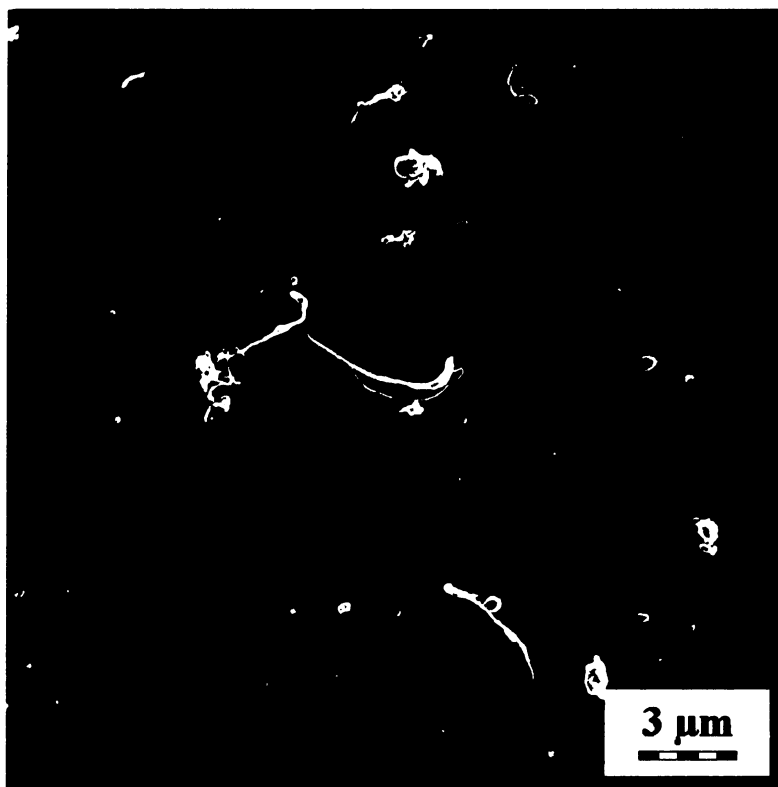
Pomocí této metody byla ověřována čistota izolovaných částic. Vzorky pro mikroprvkovou analýzu byly před samotnou analýzou upraveny podobným způsobem jako vzorky pro SEM. PC membrány byly připevněny pomocí epoxidového lepidla na mosazný terčik a naprášeny vrstvou uhlíku pomocí vakuového naprašovacího zařízení JEE-4C. Analýza pak byla provedena na rastrovacím elektronovém mikroskopu Quanta 200 FEG vybaveném EDS detektorem. Podmínky pro zaznamenávání EDS spekter byly: vakuum 120 Pa, použité napětí 30kV, velikost stopy svazku elektronů 3, pracovní vzdálenost 10 mm.

7. Výsledky

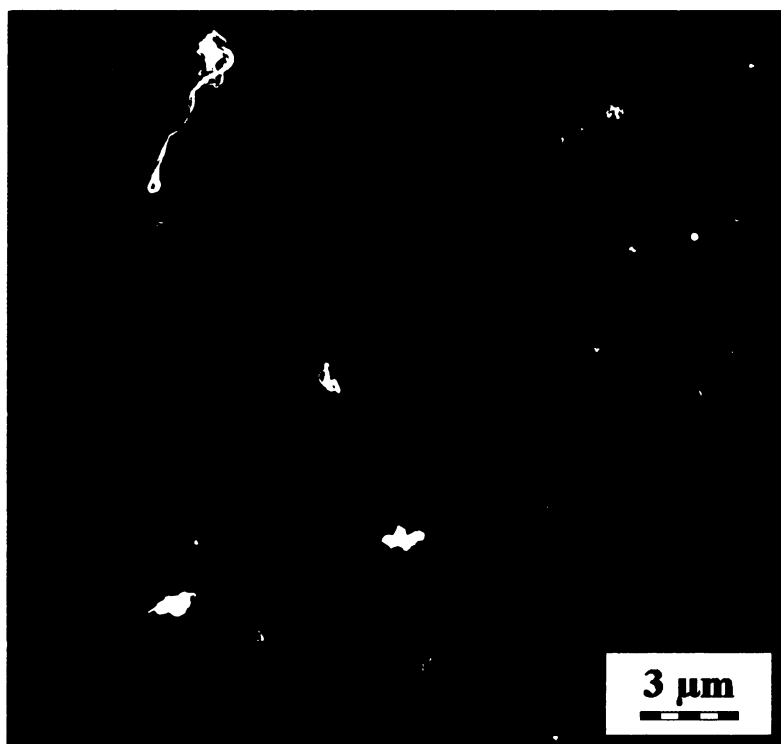
7.1. Vliv centrifugace na morfologii PE částic

0,1 μm PC membrány se zachycenými PE částicemi o velikosti 0,1 – 10 μm byly podrobeny obrazové analýze. Ta potvrdila náš předpoklad, že centrifugace neovlivňuje tvar částic.

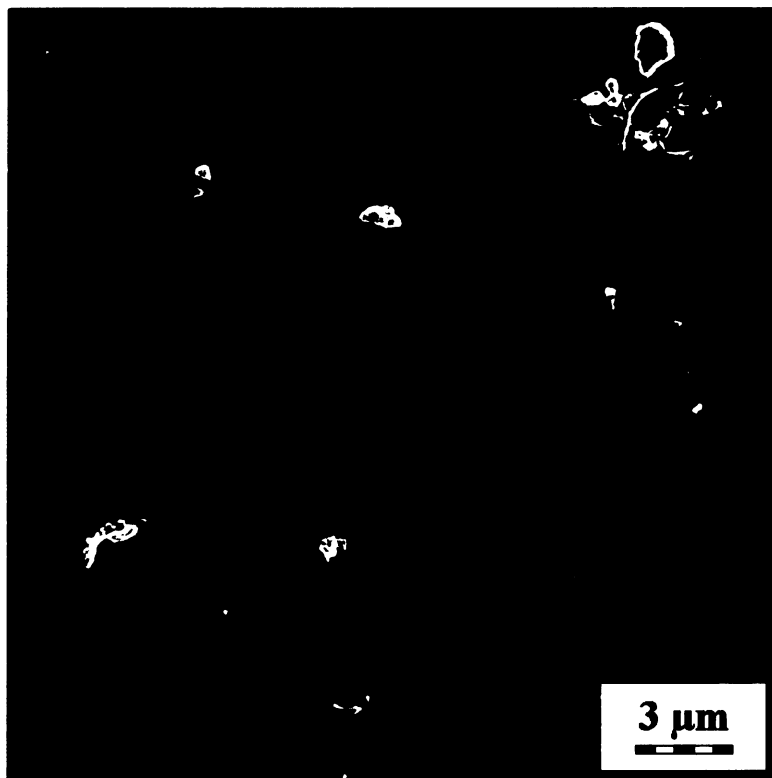
U každého vzorku (samovolná flotace, flotace při 500 x g, flotace při 16000 x g a flotace při 105000 x g) bylo nasnímáno 20 SEM mikrofotografií. Vzorky u nichž byly částice získány samovolnou flotací (Obr. 8. Str. 49), flotací při 500 x g (Obr. 9. Str. 49), flotací při 16000 x g (Obr. 10. Str. 50) a flotací při 105000 x g (Obr. 11. Str. 50) měly stejný charakter, jak ukazují SEM mikrofotografie.



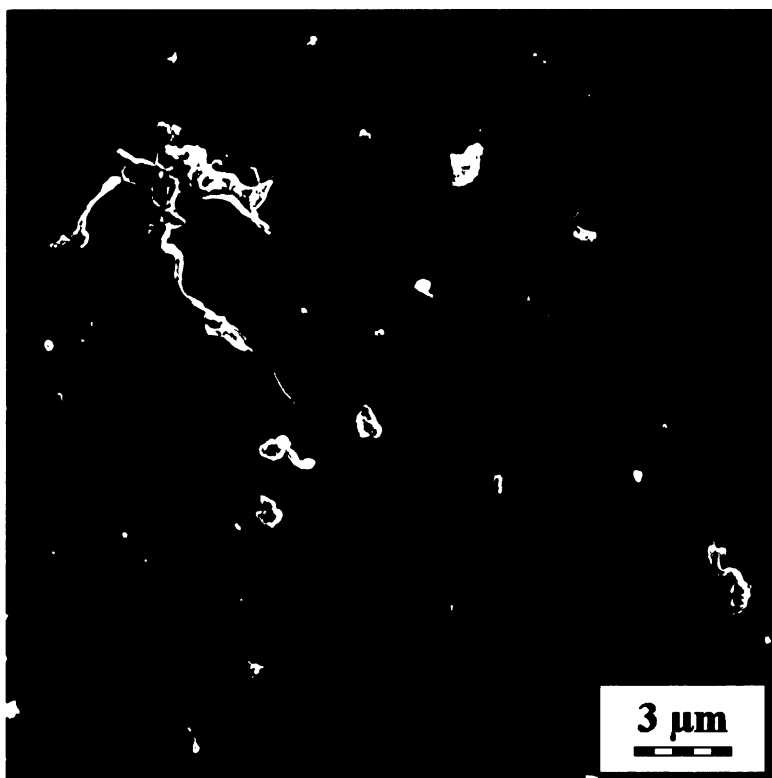
Obr.8.: PE částice oddělené samovolnou flotací
[23]



Obr. 9.:PE částice oddělené flotací při 500 x g
[23]



Obr.10.: PE částice oddělené flotací při 16000 x g
[23]



Obr.11.: PE částice oddělené flotací při 105000 x g. [23]

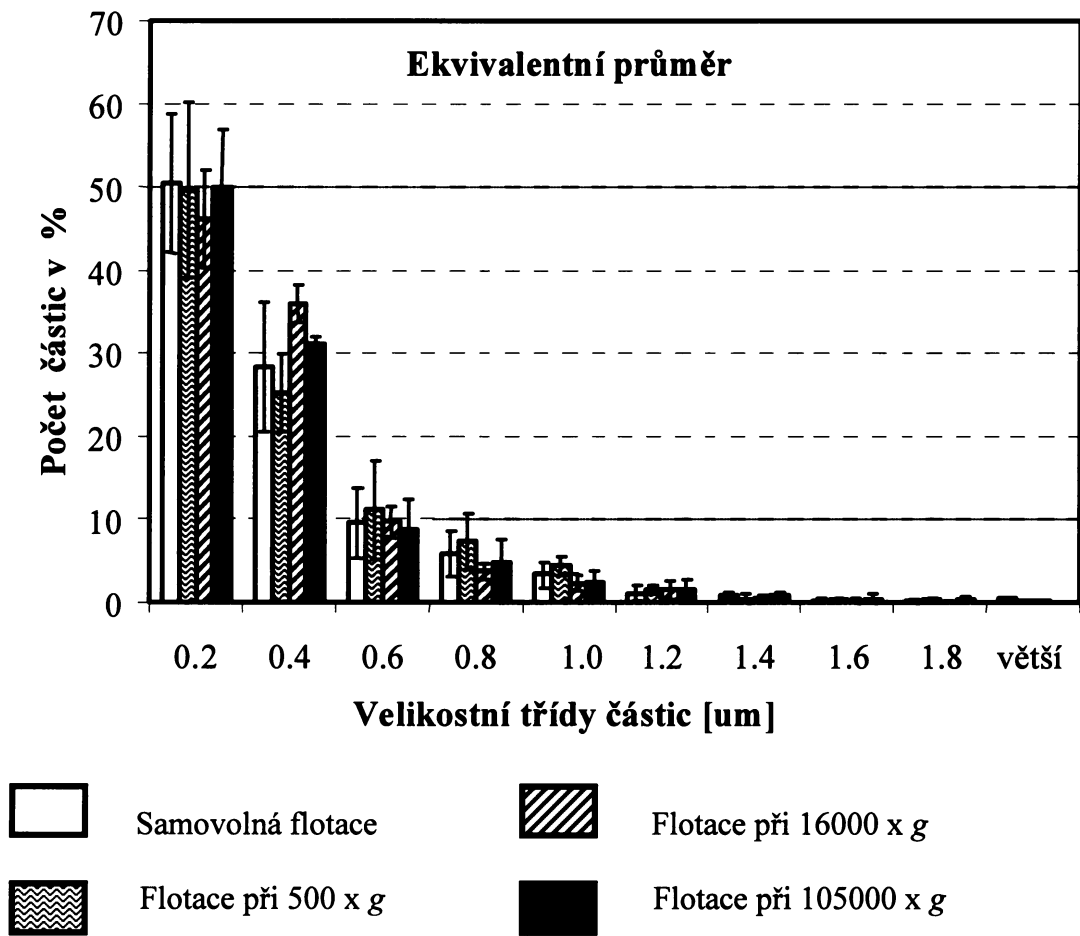
Pomocí programu Lucia (program obrazové analýzy) byly určeny parametry PE částic (Tab.2.).

Částice UHMWPE	Ekvivalentní průměr$[\mu\text{m}]$	Cirkularita	Elongace	Počet částic
samovolná flotace	0,345	0,704	1,763	556
flotace při 500 x g	0,358	0,620	1,818	333
flotace při 16000 x g	0,314	0,636	1,738	824
flotace při 105000 x g	0,299	0,671	1,745	499

Tab.2.: Parametry obrazové analýzy PE částic

Následující grafy (Graf 1. Str.52, Graf 2.Str.53, Graf 3.Str.54) shrnují změny parametrů obrazové analýzy PE částic flotovaných při různých podmínkách (samovolná flotace, flotace při 500 x g, flotace při 16000 x g a flotace při 105000 x g). Z grafů lze jednoznačně určit, že výše uvedené parametry obrazové analýzy se při různých podmínkách flotace neměnily, a proto centrifugace neovlivňuje morfologii PE částic.

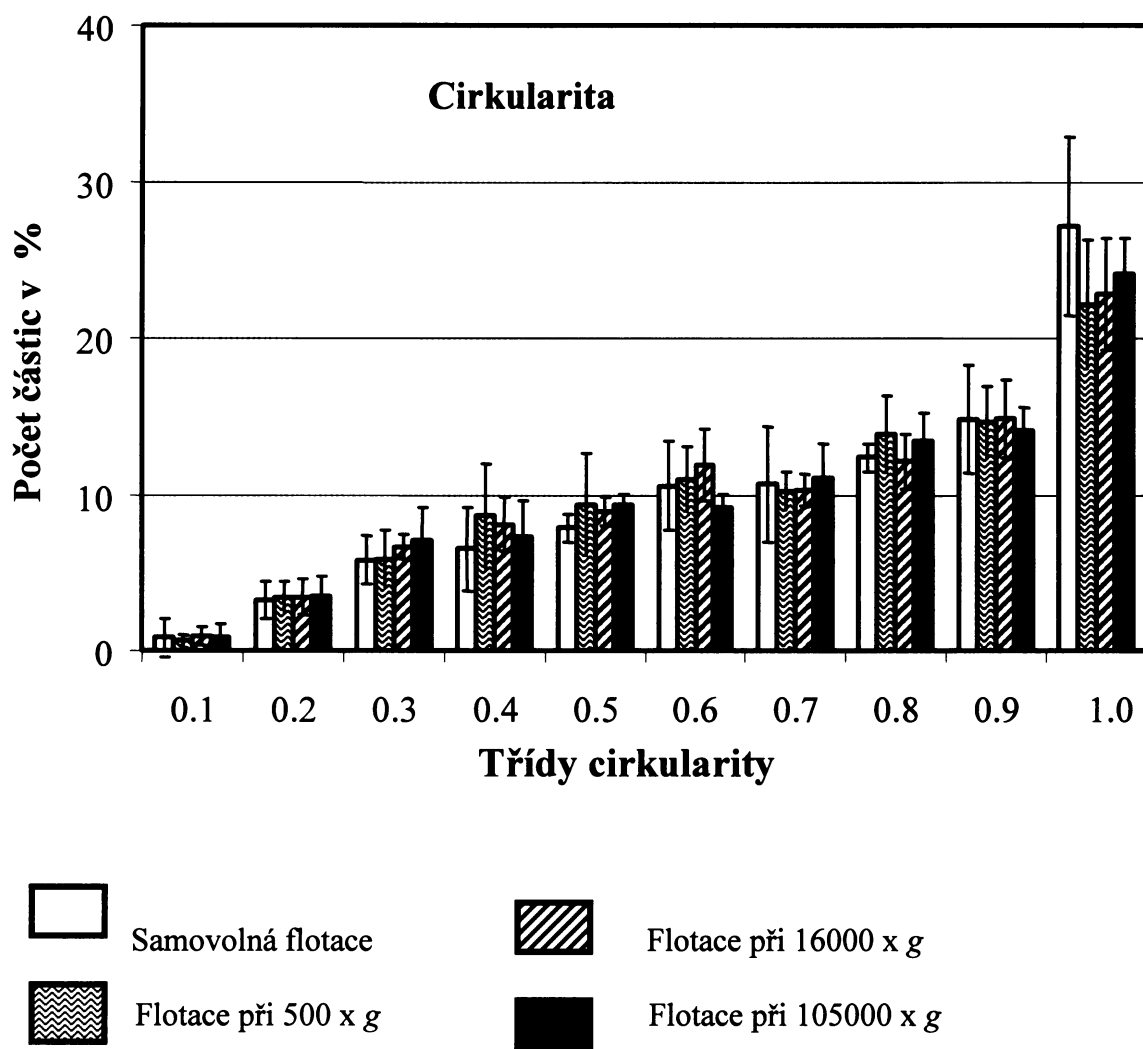
Graf 1.



Graf 1.: Graf popisující změny ekvivalentního průměru PE částic flotovaných při různých podmínkách.

[23]

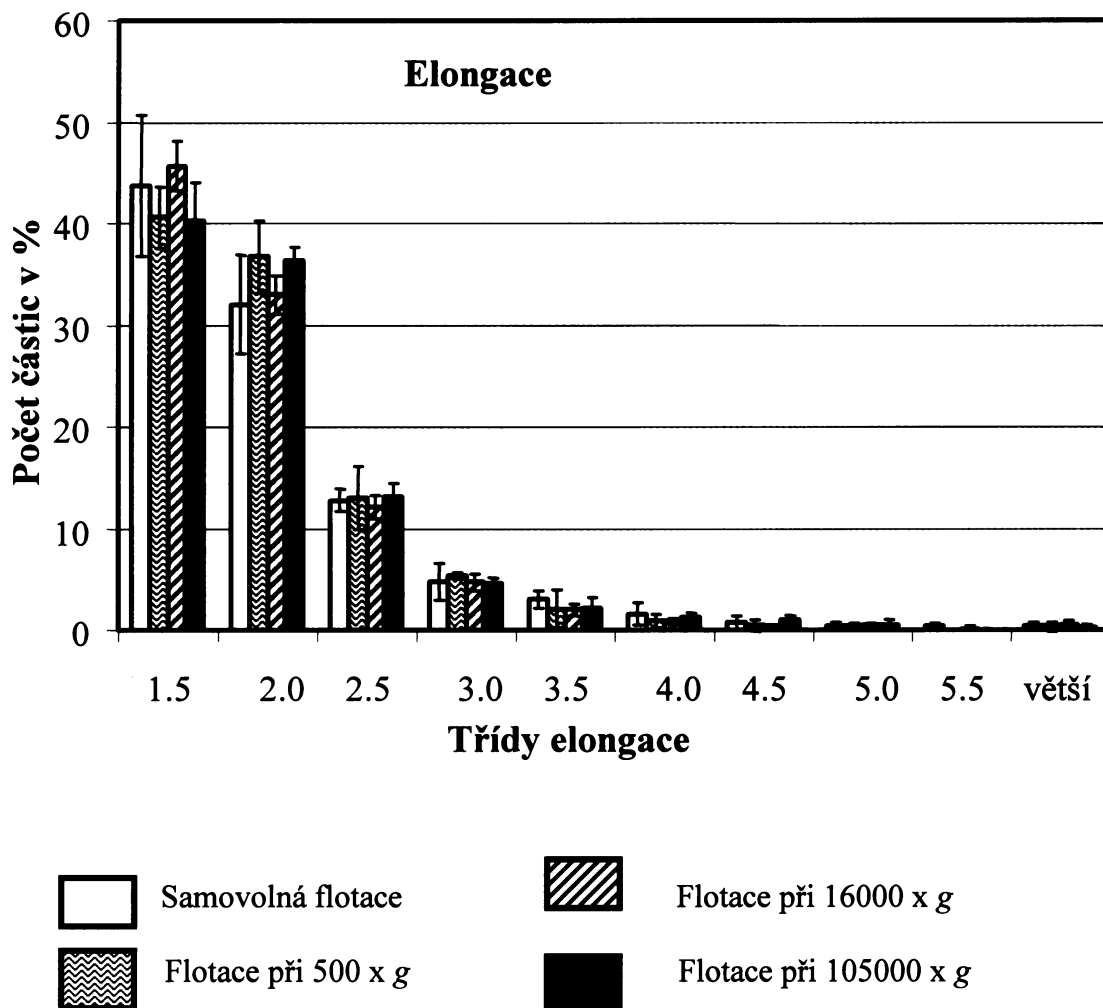
Graf 2.



Graf 2.: Graf popisující změny cirkularity PE částic flotovaných při různých podmínkách.

[23]

Graf.3.



Graf.3.: Graf popisující změny elongace PE částic flotovaných při různých podmínkách.

[23]

7.2. Distribuce PE částic v tkáni

Postupem popsaným v odst. 6.4. byly izolovány PE částice a také kostní fragmenty. Filtrací přes předem zvážené membrány byla vážením zjištěna hmotnost PE částic o určité velikosti v dané části tkáňového vzorku. Zjištěné hmotnosti PE částic jsou zaznamenány v Tab.3. Vzorky byly před finální izolací pomocí kyseliny dusičné (viz odst. 6.2.5.) rozděleny na standardně zpracovávané množství, tj. po 0,3 g. Proto je v Tab.3. u většiny vzorků několik hodnot. Schéma 3. na Str. 56 pak shrnuje celkovou hmotnost PE částic izolovaných z tkáňového vzorku také hmotnosti izolovaných kostních fragmentů.

Tab.3.

Označení vzorku (viz Schéma 3. Str.56)	Hmotnost zachycených PE částic na membráně (mg)	
	10 μm PC	0,1 μm PC
G	3,3	0,7
T	3,0	0,4
GL1	1,2	0
GL2	8,5	0,1
GL3	10,2	0,5
TL1	2,7	0,2
TL2	0,5	0,4
GKL1	9,0	1,6
GKL2	14,6	0,8
GKL3	16,6	0,8
TKL1	1,4	0,6
TKL2	7,5	0,3

Schéma 3.:

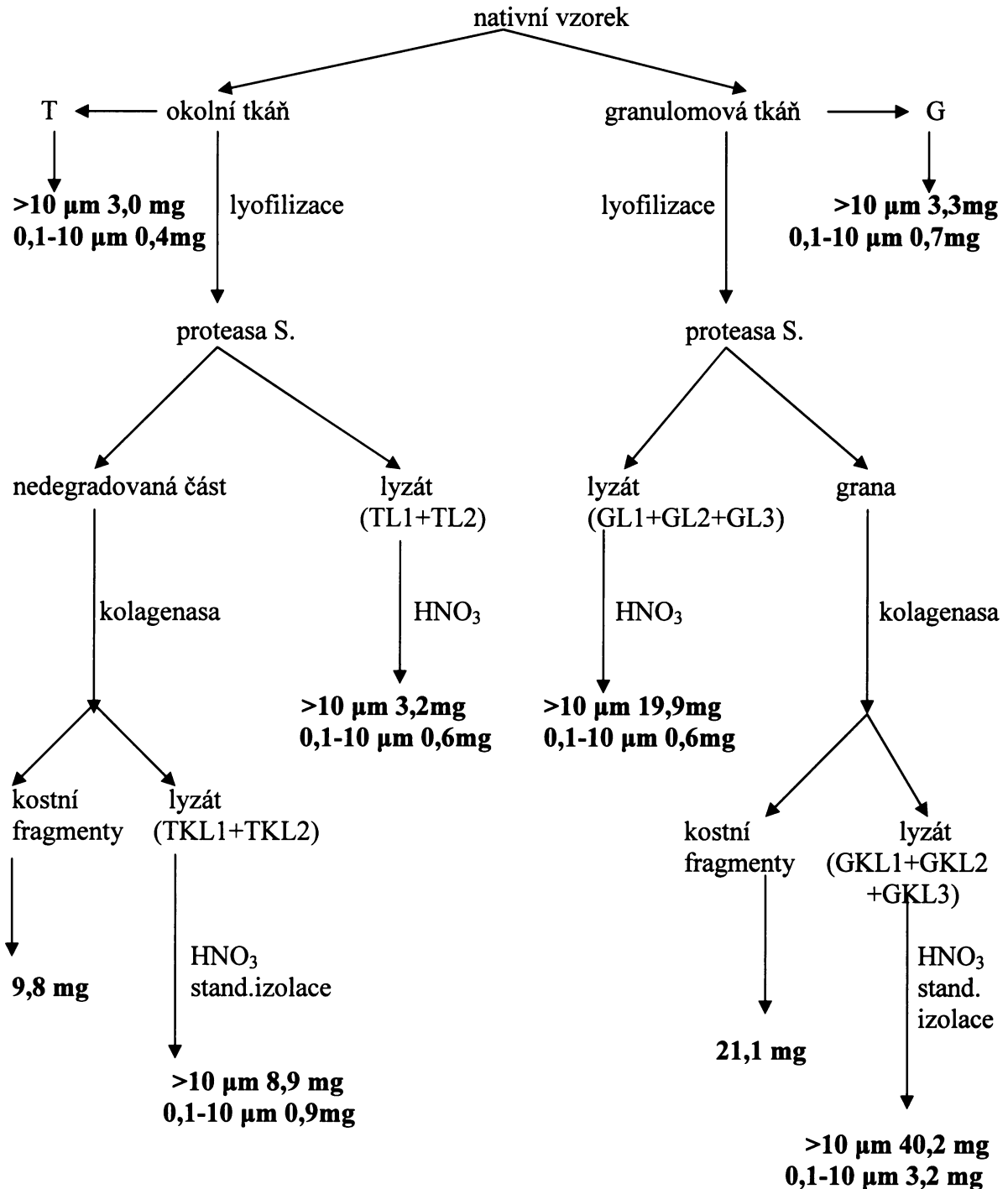


Schéma 3.: Celkové hmotnosti izolovaných PE částic z různých částí tkáňového vzorku a hmotnosti izolovaných kostních fragmentů.

Jednotlivé hmotnosti izolovaných PE částic lze porovnávat po přepočtení hmotností částic na stejnou hmotnost suché tkáně. Ve vzorku T byly 3 mg PE částic o velikosti větších než 10 μm . Tyto hodnoty jsou však vztaženy na 0,3 g suché tkáně, která byla v tomto případě zpracovávána. 1,3 g vzorku z okolní tkáně bylo zpracováno dalším enzymovým postupem. Tím bylo získáno 8,9 mg PE částic větších než 10 μm (z vzorku TKL) a 3,2 mg PE částic větších než 10 μm (z vzorku TL) – tedy celkem **12,1 mg** PE částic větších než 10 μm (v 1,3 g suché tkáně). Výpočtem převedené hmotnosti PE částic větších než 10 μm ve vzorku T na 1,3 g suché tkáně činí **13,0 mg**. Ve vzorku T byly 0,4 mg PE částic o velikosti 0,1-10 μm . Tyto hodnoty jsou však vztaženy na 0,3 g suché tkáně, která byla v tomto případě zpracovávána. 1,3 g vzorku z okolní tkáně bylo zpracováno dalším enzymovým postupem. Tím bylo získáno 0,9 mg PE částic větších než 10 μm (z vzorku TKL) a 0,6 mg PE částic větších než 10 μm (z vzorku TL) – tedy celkem **1,5 mg** PE částic o velikosti 0,1-10 μm (v 1,3 g suché tkáně). Výpočtem převedené hmotnosti PE částic o velikosti 0,1-10 μm ve vzorku T na 1,3 g suché tkáně činí **1,7 mg**.

Stejným způsobem byly přepočítány i hodnoty pro vzorek G a následné vzorky GKL a GL. Porovnatelné jsou tedy hodnoty **25,3 mg** (vypočtená hodnota pro vzorek G) a **60,1 mg** (součet hodnot vzorků GKL a GL) pro částice větší než 10 μm . Pro částice o velikosti 0,1-10 μm jsou porovnatelné hodnoty **5,1 mg** (vypočtená hodnota pro vzorek G) a **3,8 mg** (součet hodnot vzorků GKL a GL). Všechny tyto vypočtené a porovnatelné hmotnosti shrnuje Schéma 4. Str.58.

Metodou disperzní analýzy paprsků X bylo ověřeno, že izolované velké „tvrdé kousky“ jsou kostní fragmenty. Graf 4. Str.59 a Graf 5.Str.59 zobrazuje příslušná EDAX spektra. Vrchol síry pochází z lepidla, jinak jsou jasné vrcholy fosforu a vápníku. Zároveň byly pořízeny fotografie izolovaných kostních částic (viz Obr.12. Str.60 a Obr.13.Str.60).

Schéma 4.:

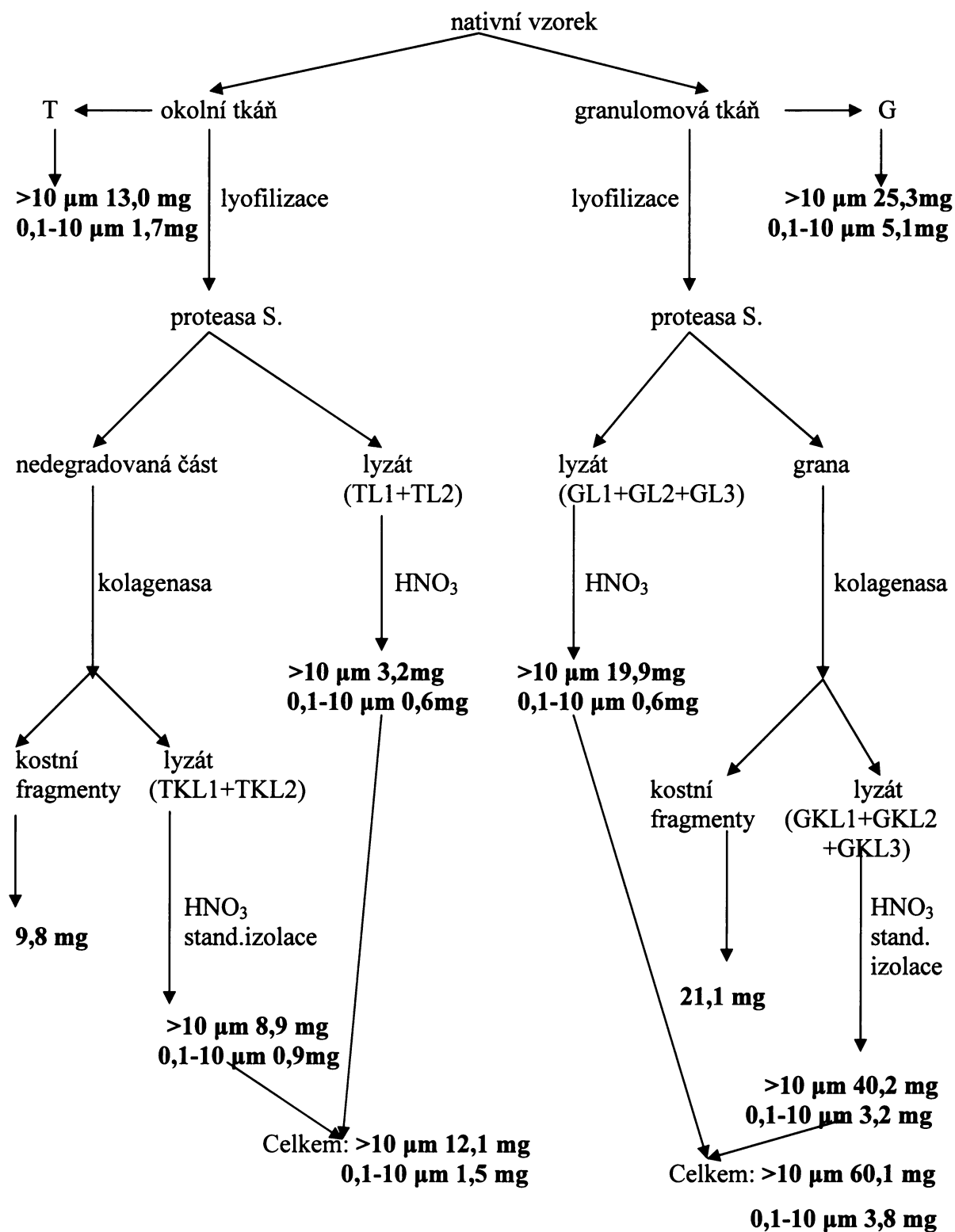
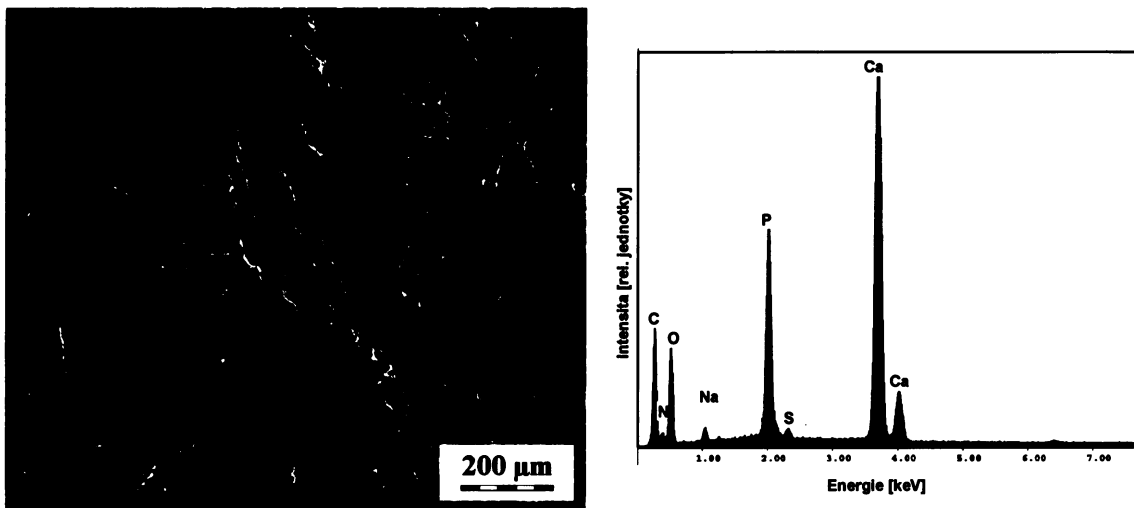


Schéma 4.: Přepočtené a porovnatelné hmotnosti izolovaných PE částic

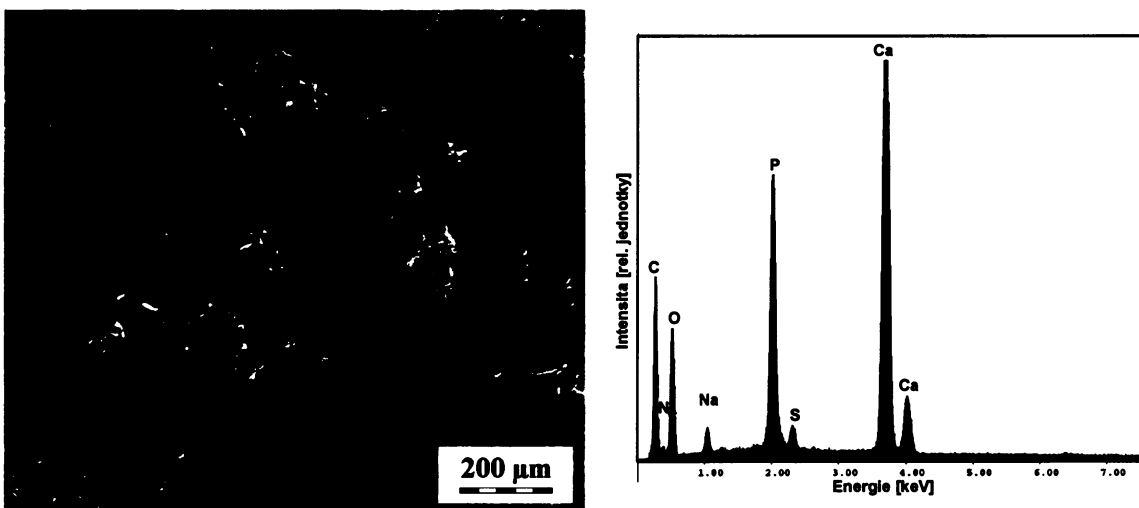
Graf 4.



Prvek	C	N	O	Na	P	S	Ca
Hmot. %	40,6	8,6	26,95	1,1	6,9	0,3	15,5
Atom. %	53,3	9,7	26,5	0,8	3,5	0,2	6,1

Graf 4.: Spektrum EDAX a mikrofotografie kostních fragmentů z granulomové tkáně

Graf 5.



Prvek	C	N	O	Na	P	S	Ca
Hmot. %	45,1	6,0	26,8	1,05	6,68	0,6	13,4
Atom. %	57,8	6,6	25,8	1,0	3,3	0,3	5,1

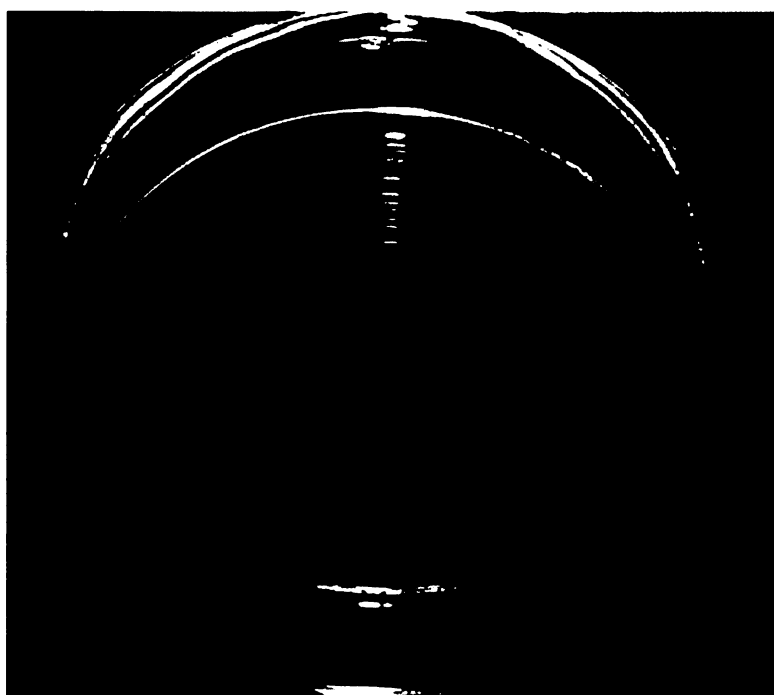
Graf 5.: Spektrum EDAX a mikrofotografie kostních fragmentů z okolní tkáně

Obr.12.



Obr.12.: Fotografie kostních fragmentů (z granulomové tkáně)

Obr.13.

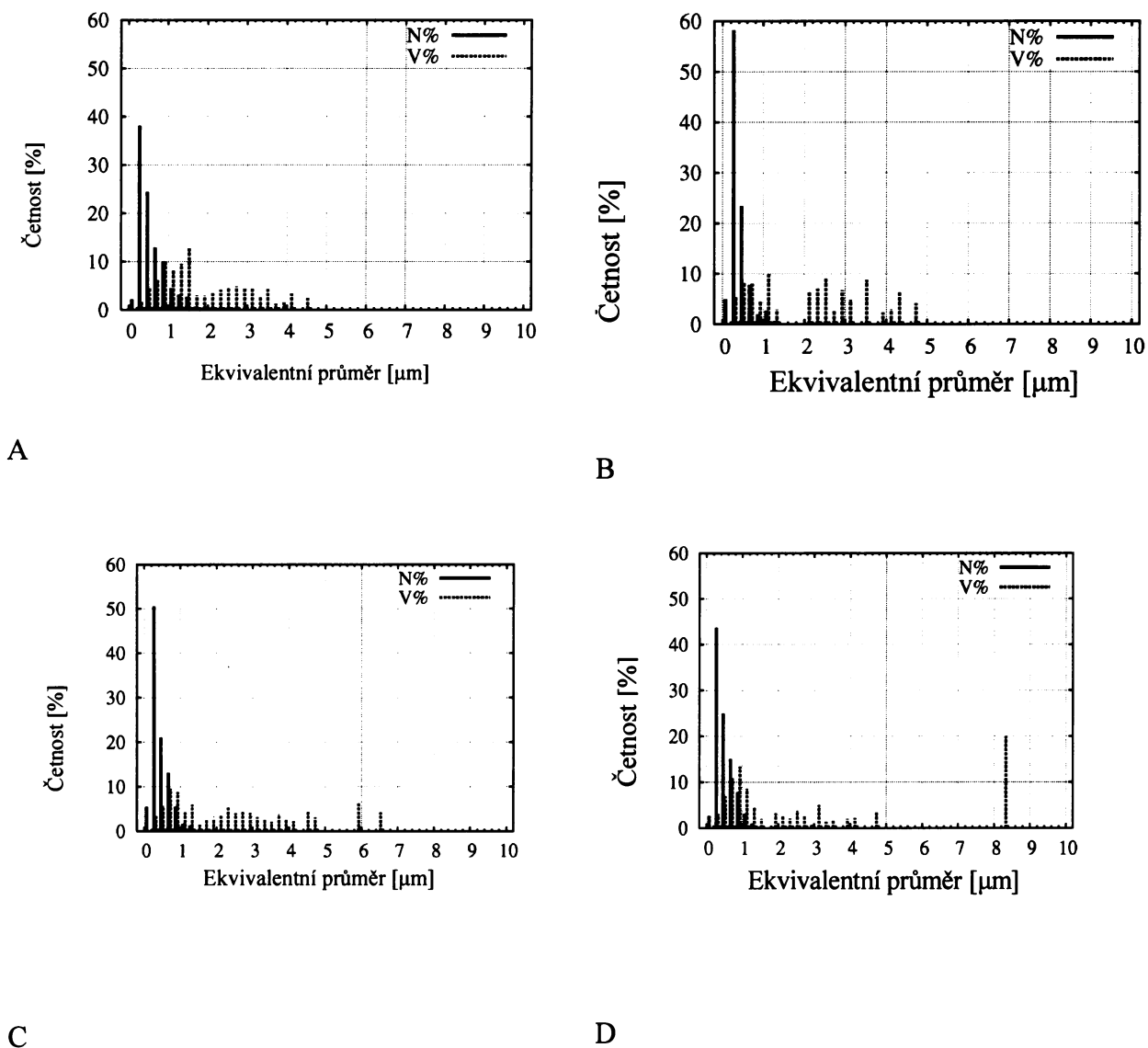


Obr.13.:Fotografie kostních fragmentů (z okolní tkáně)

Pro morfologickou analýzu (tj. fotografie z elektronového mikroskopu a obrazovou analýzu) byly vybrány tyto 0,1 μm PC membrány: **TKL1**, **TL2**, **GKL2**, **GL3**. Grafy 6.Str.62, 7.Str.63, 8.Str.64 shrnují výsledky obrazové analýzy. Porovnáním diagramů pro vzorky GKL a TKL lze říci, že ve vzorku z granulomové tkáně po působení kolagenasy (tj. GKL) byly větší částice, kulatější a delší než ve vzorku z okolní tkáně po působení kolagenasy (TKL). Také lze říci, že ve vzorku z granulomové tkáně je nejvíce částic ve velikostní třídě 0,2 μm stejně jako ve vzorku z okolní tkáně, ale ve vzorku granulomové tkáně je těchto částic celkově více (cca 50%) – v porovnání s ostatními velikostními skupinami. Porovnáním diagramů pro vzorky GL a TL lze říci, že ve vzorku z granulomové tkáně po působení proteasy *Streptomyces griseus* (tj. GL) byly menší částice, méně kulaté a kratší než ve vzorku z okolní tkáně po působení proteasy *Streptomyces griseus* (TL). Také lze říci, že ve vzorku z granulomové tkáně je nejvíce částic ve velikostní třídě 0,2 μm stejně jako ve vzorku z okolní tkáně, ale ve vzorku okolní tkáně je těchto částic celkově více (cca 60%).

Na Obr.14 str.65 jsou zobrazeny snímky z elektronového mikroskopu jednotlivých vzorků vyhodnocovaných metodou SEM.

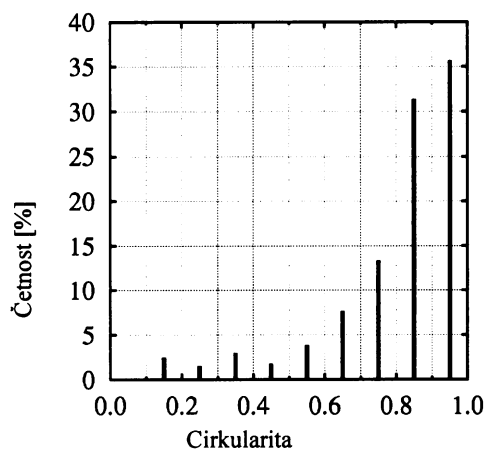
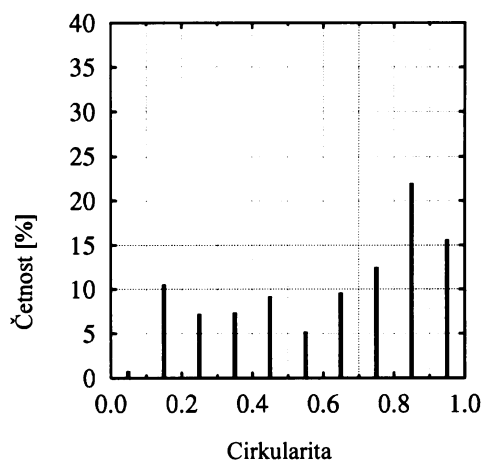
Graf 6.



Graf 6.: Obrazová analýza vzorků: porovnání tříd ekvivalentních průměrů částic z hlediska četnosti (červené plné sloupce) a z hlediska objemové distribuce (zelené čárkované sloupce).

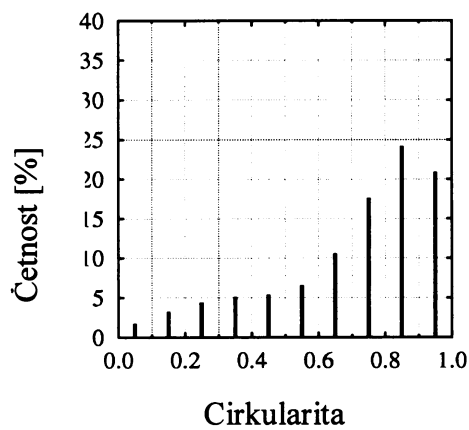
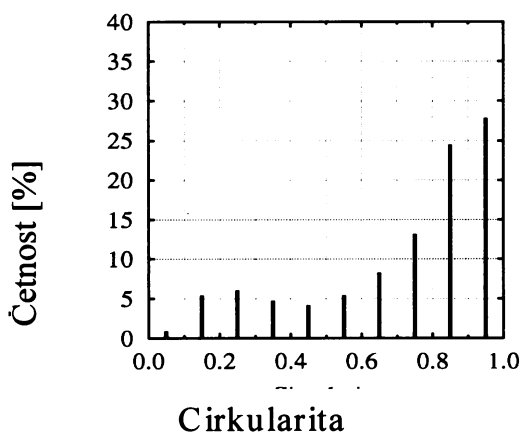
- A: vzorek GL3
- B: vzorek TL2
- C: vzorek GKL2
- D: vzorek TKL1

Graf 7.



A

B



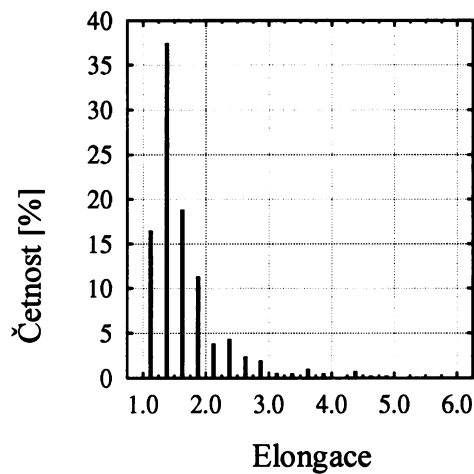
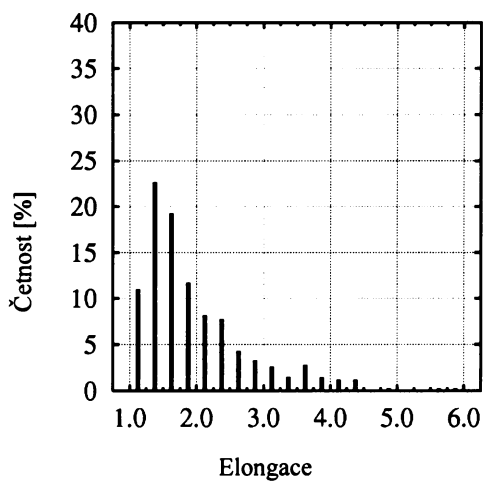
C

D

Graf 7.: Obrazová analýza vzorků: porovnání cirkularit částic z hlediska četnosti.

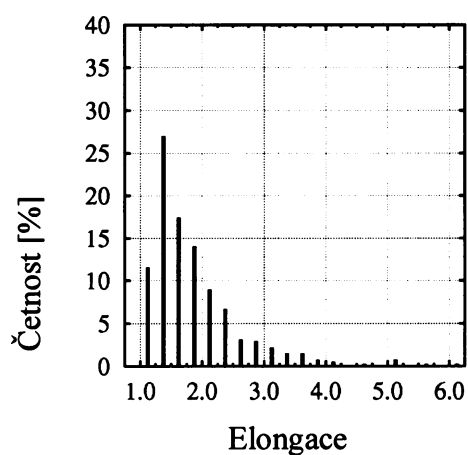
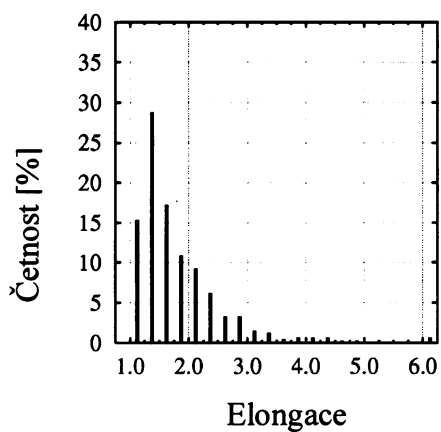
- A: vzorek GL3
- B: vzorek TL2
- C: vzorek GKL2
- D: vzorek TKL1

Graf 8.



A

B



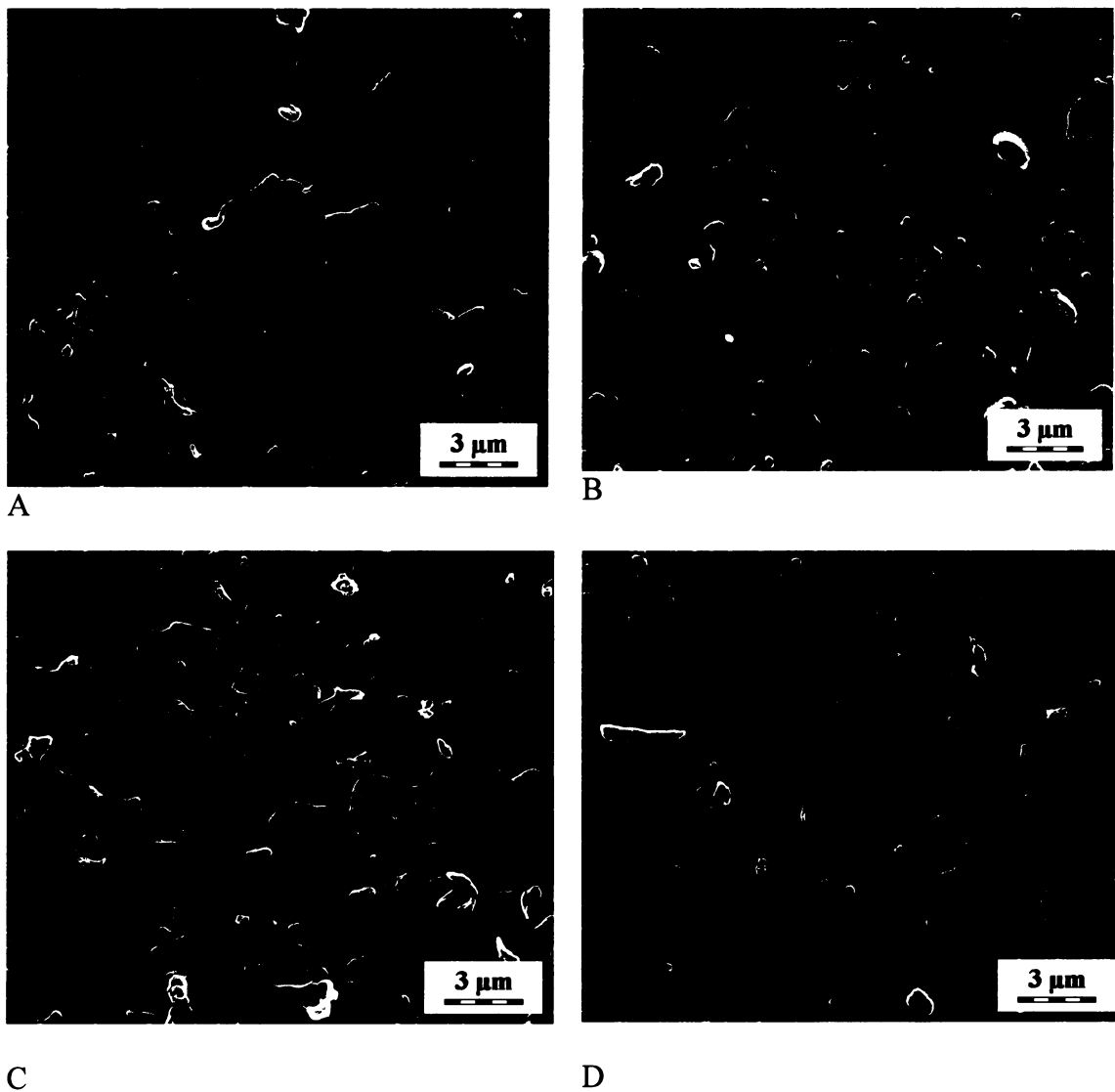
C

D

Graf 8.: Obrazová analýza vzorků: porovnání elongací částic z hlediska četnosti.

- A: vzorek GL3
- B: vzorek TL2
- C: vzorek GKL2
- D: vzorek TKL1

Obr.14.



Obr.14.: Snímky z elektronového mikroskopu:

- A: GL3
- B: TL2
- C: GKL2
- D: TKL1

7.3. Příprava modelových částic PE

Postupem popsaným v odst. 6.5. byly získány modelové částice PE z prášku GUR 4150 o velikosti 0,1-10 μm . Z rozdílu hmotnosti prázdné 0,1 μm PC membrány a membrány s částicemi byla určena hmotnost zachycených částic. Ta činila 0,6 mg.

Tyto modelové částice byly použity pro pilotní testování biologické aktivity PE částic na buněčných liniích osteoblastů a fibroblastů (v Laboratoři buněčných kultur Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci).

7.4. Kalibrační řada PE částic z tkáně

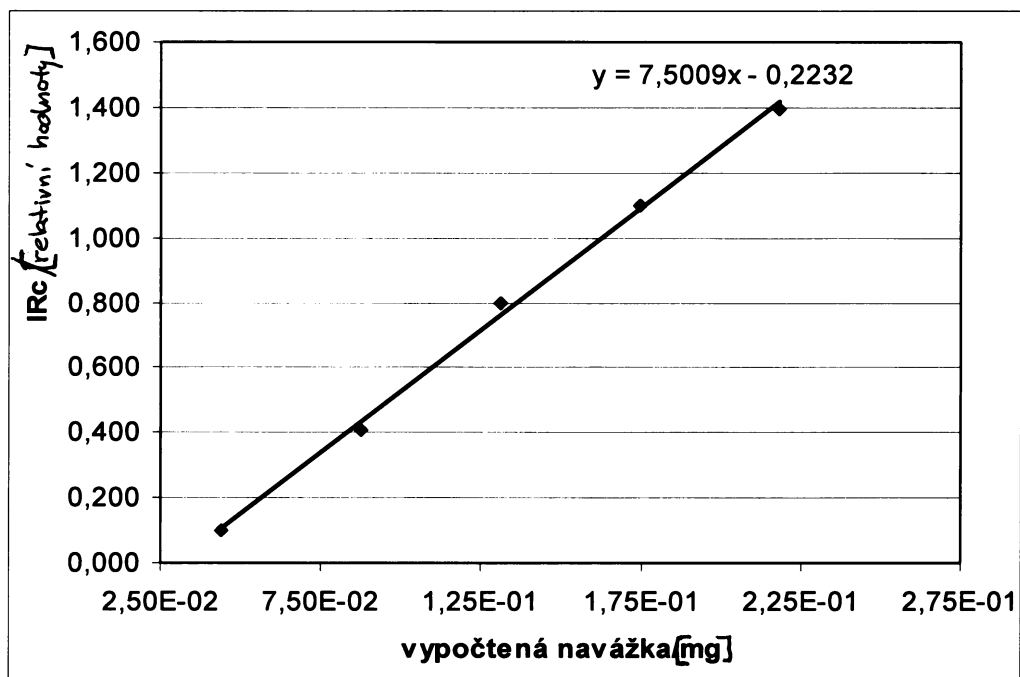
Postupem popsaným v odst. 6.6. bylo získáno 19,0 mg PE částic o velikosti 0,1-10 μm , přičemž z membrány do suspenze se podařilo převést 17,5 mg. Dále bylo získáno 25,1 mg PE částic o velikosti větší než 10 μm .

Ze zásobní suspenze obsahující PE částice o velikosti 0,1-10 μm byly postupem popsaným v odst. 6.6 odebrány jednotlivé objemy (0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1 ml) a filtrovány přes 0,1 μm PC membrány. Tyto membrány byly předány ke kvantifikaci na Ústav makromolekulární chemie AV ČR. Tab. 4 Str.66. shrnuje výsledky změřených hodnot IRc. Z hodnot IRc pro tři stejné objemy byla vypočítána průměrná hodnota. Jednotlivé pipetované objemy suspenze PE částic byly přepočítány na hmotnosti PE částic nanesených při filtraci na membránu. Z průměrné hodnoty IRc a z vypočtené navážky PE částic byla vytvořena kalibrační přímka (Graf 9. Str.67). Z dříve určených ekvivalentních průměrů pro částice (hodnota 0,23 μm) o velikosti 0,1-10 μm (určeno při vlivu centrifugace viz odst. 7.1.) byly vypočtené navážky PE částic převedeny na počet PE částic. Závislost IRc na počtu částic je vyjádřena v Grafu 10.Str.68.

Tab.4.

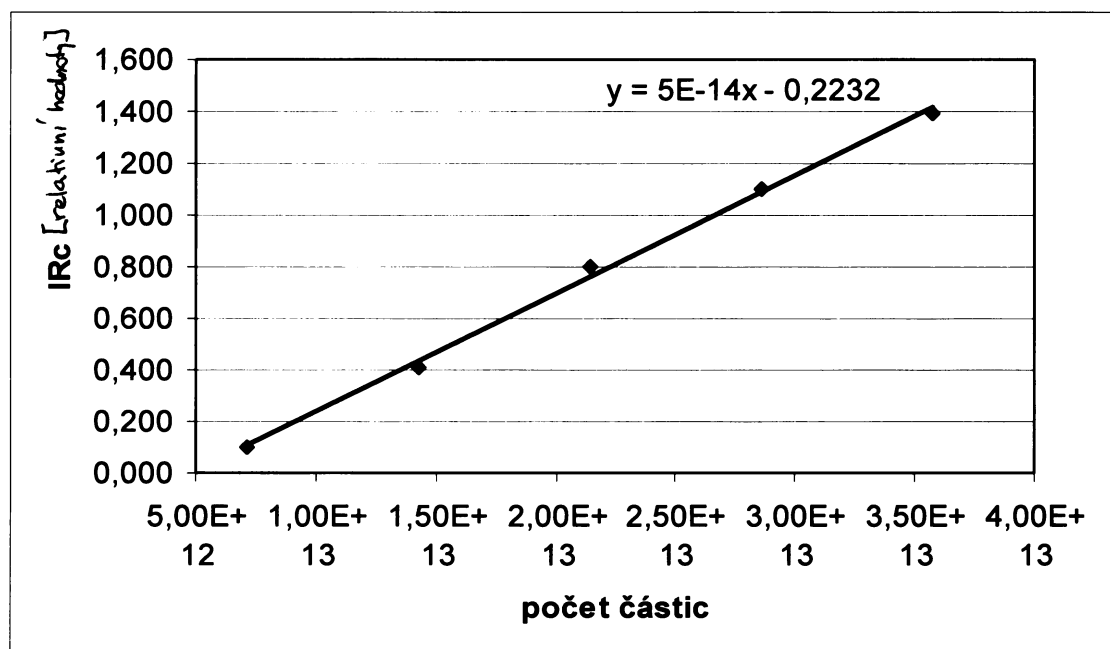
Objem suspenze (ml)	IRc [relativní hodnoty]
0,2	0,112
0,2	0,092
0,2	0,090
0,4	0,433
0,4	0,402
0,4	0,395
0,6	0,771
0,6	0,852
0,6	0,774
0,8	1,107
0,8	1,111
0,8	1,082
1,0	1,431
1,0	1,345
1,0	1,395

Graf 9.



Graf.9.: Kalibrační přímka: závislost IRc na vypočtené navážce PE částic

Graf 10.



Graf 10: Kalibrační přímka: závislost IRc na počtu částic

7.5. Příprava PE částic z tkáně pro testování na buněčných modelech

Postupem popsaným v odst. 6.7. byly nejprve určeny pomocí obrazové analýzy metody SEM ekvivalentní průměry pro částice o velikosti 0,1-5 μm a o velikosti 0,05-0,1 μm . Ekvivalentní průměr částic o velikosti 5-10 μm byl určen výpočtem ze závislosti ekvivalentního průměru na velikosti částic podle toho, na jaké membráně byly zachyceny.

V Tab.5.Str. 69 jsou zaznamenány hodnoty ekvivalentních průměrů a hmotností částic (jedné i všech zachycených na membráně) použité pro výpočet objemu suspenze částic potřebné pro nanesení určitého počtu PE částic na membránu. Vypočtené objemy suspenze částic byly filtrovány přes dané membrány (viz postup popsaný v odst. 6.7.). Takto připravené membrány se zachycenými částicemi o definovaných počtech a

velikostech byly předány pro testování na buněčných kulturách do Laboratoře buněčných kultur Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Tab.5.

	0,05-0,1 μm	0,1-5 μm	5-10 μm
velikost částic podle membrány (μm)	0,075	2,550	7,500
ekviv.průměr (μm)	0,131	0,308	0,662
poloměr částice (cm)	0,66E-05	1,54E-05	3,31E-05
m jedné částice (g)	1,129E-15	1,468E-14	1,457E-13
potřebná m všech částic na membráně pro počet 10E+10 (g)	1,13E-05	1,47E-04	1,46E-03
objem filtrované suspenze pro počet 10E+10 (ml)	0,08	4,99	50,00
potřebná m všech částic na membráně pro počet 10E+8 (g)	1,129E-07	1,468E-06	1,457E-05
objem filtrované suspenze pro počet 10E+8 (ml)	0,04	0,05	0,50
koncentrace zásobního roztoku (mg/ml)	0,1400	0,0295	0,0292

7.6. Heterogenita vzorku – vliv homogenizace

Postupem popsaným v odst. 6.8. byly zpracovány tkáňové vzorky tří pacientů. Z lyofilizovaného vzorku každého pacienta byly odebrány 3 x 0,3 g a zpracovány standardní kyselou hydrolyzou a standardně filtrovány. Dále bylo z lyofilizovaného vzorku odebráno 0,9 g. Tato část vzorku byla homogenizována, znovu lyofilizována a poté rozdělena na tři díly o stejné hmotnosti. Následně byly i tyto homogenizované vzorky zpracovány standardní kyselou hydrolyzou a standardně filtrovány.

Membrány (celkem 18) se zachycenými PE částicemi byly kvantifikovány pomocí metody IRc. Získané hodnoty shrnuje Tab.6.

Tab.6.

Číslo pacienta	Použití homogenizace Ano/Ne	IRc [relat. hodnoty]	Průměr IRc [relat.hodnoty]	Směrodatná odchylka
1.	Ano	0,676	0,948	0,267
1.	Ano	0,957		
1.	Ano	1,210		
1.	Ne	0,225	0,522	0,719
1.	Ne	0		
1.	Ne	1,342		
2.	Ano	1,612	1,623	0,077
2.	Ano	1,705		
2.	Ano	1,553		
2.	Ne	2,653	3,014	0,585
2.	Ne	3,689		
2.	Ne	2,700		
3.	Ano	1,108	1,363	0,244
3.	Ano	1,594		
3.	Ano	1,388		
3.	Ne	1,175	1,229	0,518
3.	Ne	1,772		
3.	Ne	0,741		

Pro tkáňové vzorky pacienta č.1 byla provedena i obrazová analýza. Hodnoty jednotlivých posuzovaných parametrů obrazové analýzy (ekvivalentního průměru, elongace, cirkularity) u vzorků homogenizovaných i nehomogenizovaných vykazovaly minimální rozdíly. Použitá homogenizace při izolaci PE částic tedy nemá vliv na jejich morfologii. Z Tab. 6 Str. 70 vyplývá, že po homogenizaci se významně snížily směrodatné odchylky.

8. Diskuse

Vysokomolekulární polyetylen se používá pro výrobu kloubní jamky totální kyčelní endoprotézy a pro výrobu artikulační vložky kolenní endoprotézy. Vznikající otěrové částice patří mezi hlavní příčiny způsobující vznik osteoagresivního granulomu a selhání endoprotézy.

Polyetylenové otěrové částice lze izolovat z tkání okolo endoprotéz kyčelních a kolenních kloubů různými metodami. Hydrolýza pomocí kyseliny dusičné byla vyhodnocena jako nejrychlejší a nejefektivnější metoda. Množství tkáně bohaté na granulom zpracovávané v naší laboratoři je oproti jiným publikovaným metodám (např. metoda mikrotonových řezů tkáně – Visentin a kol. [24]) největší. Protože tkáňové vzorky jsou značně heterogenní, je třeba zpracovávat co možná největší množství, jinak výsledky nejsou vypovídající. Hydrolýza proteolytickými enzymy je metodou časově i finančně náročnou, avšak poskytuje možnosti postupné degradace tkáně a tudíž i možnost kvantifikovat a charakterizovat PE částice v různých částech tkáňového vzorku. Tyto informace mohou přispět k prokázání mechanismu vzniku polyetylenového granulomu.

Izolací PE částic ze směsného vzorku bylo získáno vůbec poprvé (ve srovnání s publikovanými postupy) važitelné množství částic o velikosti 0,1-10 μm , a to 19,0 mg. Izolací získané částice zachycené na 0,1 μm PC membráně vykazovaly výrazné elektrostatické vlastnosti, a proto bylo pro vytvoření kalibrační řady nutné jejich převedení do roztoku PrOH/H₂O (1:1, v/v). Dále se tedy pracovalo se suspenzí PE částic a kalibrační řada byla připravena filtrací různých objemů suspenze PE částic přes 0,1 μm PC membrány. Získáním važitelného množství PE otěrových částic ze směsného vzorku a vytvořením kalibrační přímky se poprvé podařilo (v rámci řešení problematiky otěrových částic spojených se vznikem granulomu) definovat vztah mezi hodnotami IRc (hodnoty relativního objemu částic) a absolutní hmotností resp. počtem částic. Dosud se vždy mohlo hovořit jen o relativních hodnotách.

Díky úspěšné izolaci važitelného množství PE částic o velikosti 0,1-10 μm ze směsného vzorku a pomocí vytvořené kalibrační přímky spolu se zjištěnými hodnotami ekvivalentních průměrů bylo možné připravit membrány s definovaným počtem částic. Pro testy na buněčných kulturách byly připraveny membrány s počtem částic 10^{10} a 10^8 .

Drcením práškového polyethylenu GUR4150 se podařilo získat jen velmi malé množství PE částic o velikosti 0,1 – 10 μm považovaných dle literatury za příčinu vzniku granulomu a aseptického zánětu v oblasti komponent endoprotézy [26]. Drcení částic v tekutém dusíku bylo neúčinné a navíc mohly být takto připravené částice znečištěny částicemi porcelánu třecí misky.

Podle Visentin a kol. [24] centrifugace použitá v průběhu izolace PE otěrových částic ovlivňuje jejich morfologii. Toto tvrzení nebylo ve výše uvedeném článku podloženo žádnými výsledky, bylo použito jen jako podklad pro publikování nové metody izolace. Námi vypracovaným postupem a získanými výsledky bylo toto tvrzení vyvráceno. Obrazová analýza potvrdila, že sledované parametry (ekvivalentní průměr, cirkularita, elongace) se zvyšováním gravitačního zrychlení při centrifugaci nemění. Tedy ani centrifugace při 105000 x g neovlivňuje morfologii částic [25].

Pro zjištění distribuce PE částic v tkáňovém vzorku byla použita postupná degradace proteolytickými enzymy. Působením proteasy (*Streptomyces griseus*) se podařilo izolovat jednotlivá grana z tkáně. Působením kolagenasy byla degradována grana. Z jednotlivých částí byly izolovány polyethylenové částice a jejich zastoupení bylo porovnáváno. Ze vzorku odebraného z „okolní tkáně“ (1,3 g suché tkáně), který byl zpracován postupnou enzymatickou hydrolýzou (viz postup popsáný v odst. 6.4, Schéma 2 Str. 38), bylo celkem získáno 12,1 mg částic větších než 10 μm a 1,5 mg částic o velikosti 0,1-10 μm . Kyselou hydrolýzou izolované PE částice z jiné části „okolní tkáně“ směšného nativního vzorku byly rovněž zváženy a po přepočtení na stejnou hmotnost suché tkáně (tj. 1,3 g) byly získány tyto jejich hmotnosti: 13 mg částic větších než 10 μm a 1,7 mg částic o velikosti 0,1-10 μm . Různými způsoby izolace z různých částí „okolní tkáně“ směšného nativního vzorku bylo tedy získáno téměř stejné množství PE částic. Ze vzorku odebraného z granulomové tkáně (2,3 g suché tkáně), který byl zpracován postupnou enzymatickou hydrolýzou, bylo celkem získáno 60,1 mg částic větších než 10 μm a 3,8 mg částic o velikosti 0,1-10 μm . Kyselou hydrolýzou izolované PE částice z jiné části granulomové tkáně směšného nativního vzorku byly rovněž zváženy a po přepočtení na stejnou hmotnost suché tkáně (tj. 2,3 g) byly získány tyto jejich hmotnosti: 25,3 mg částic větších než 10 μm a 5,1 mg částic o velikosti 0,1-10 μm . V tomto případě jsou ve shodě jen hmotnosti částic o velikosti 0,1-10 μm . Diskrepanci v hmotnostech částic větších než 10 μm v granulomové tkáni lze vysvětlit značnou heterogenitou části vzorku bohatého na grana. V granulomové tkáni bylo obecně PE částic (jak částic větších než 10 μm tak i o

velikosti 0,1-10 μm) více než v okolní tkáni. Nejvíce částic bylo v granech 40,2 mg o velikosti větších než 10 μm a 3,2 mg o velikosti 0,1-10 μm . Lze tedy říci, že vznik granulomu snižuje množství otěrových částic přístupných pro možnou interakci s makrofágy (a potenciálně pro možný vznik aseptické zánětlivé reakce a osteolýzy), a že funguje jako přirozený mechanismus, jakým organismus eliminuje nemetabolizovatelné částice. Díky obrazové analýze lze navíc říci, že PE částice z „okolní tkáně“ jsou obecně větší. Zároveň bylo prokázáno, že grana obsahují kostní fragmenty, a to v dvojnásobném množství než obsahovala „okolní tkáň“. To potvrzuje hypotézu, že granulom může vznikat nejen jako reakce na vznikající PE otěrové částice, ale i jako reakce na přítomnost fragmentů kostí vzniklých degradací kosti nebo např. frézováním při operaci.

Před interpretací výsledků zjišťování heterogenity vzorku – vlivu homogenizace je třeba zmínit to, že nehomogenizované vzorky byly odebírány z různých částí granulomu. Naproti tomu homogenizované vzorky vznikly až dělením jedné části granulomu (o hmotnosti 0,9 g) až po homogenizaci a následné lyofilizaci. I díky tomuto faktu jsou směrodatné odchylky homogenizovaných vzorků výrazně menší než směrodatné odchylky vzorků nehomogenizovaných. Zejména u vzorků nehomogenizovaných (tj. těch, které byly odebírány z různých částí granulomu) jsou patrné velké rozdíly mezi naměřenými hodnotami IRC. Tyto rozdíly ukazují na výraznou heterogenitu vzorků granulomové tkáně. Avšak zajistit snížení heterogenity vzorků je úkol jen velmi těžko dosažitelný. Organismus žádných dvou pacientů není stejný, nereaguje na přítomnost PE otěrových částic stejně, a proto ani granulomy dvou pacientů nemohou být totožné. Navíc ani z anatomického hlediska není často možné přesně stejným způsobem odebírat při reoperacích stejné vzorky granulomové tkáně. Minimální rozdíly v parametrech obrazové analýzy (provedené u vzorku jednoho pacienta) prokázaly, že homogenizace nemá vliv na morfologii PE částic. Vzhledem k časové náročnosti homogenizace neuvažujeme o zařazení tohoto kroku do standardní izolace PE částic.

9. Závěr

- ❖ Centrifugace použitá při izolaci nemá vliv na morfologii polyethylenových částic.
- ❖ Byla popsána distribuce polyethylenových částic v různých částech tkáňového vzorku z okolí endoprotéz kyčelních kloubů. Nejvíce částic je přítomno v granech, kde byly nalezeny i fragmenty kostí. Díky tomu lze říci, že vznik granulomu funguje jako mechanismus, jakým organismus eliminuje nemetabolizovatelné částice.
- ❖ Příprava modelových PE částic drcením v tekutém dusíku nebyla účinná.
- ❖ Podařilo se izolovat važitelné množství polyethylenových částic, vytvořit kalibrační řadu, definovat vztah mezi hodnotami IRc a absolutní hmotností resp. počtem částic.
- ❖ Byly připraveny membrány s počtem PE částic 10^{10} a 10^8 pro testy na buněčných modelech.
- ❖ Bylo prokázáno, že granulomové tkáňové vzorky jsou heterogenní. Snížení jejich heterogenity lze jen těžko dosáhnout. Použití homogenizace při izolaci částic nemá vliv na jejich morfologii. O zařazení homogenizace pro standardní izolaci částic se neuvažuje, kvůli její časové náročnosti.

10. Použitá literatura

1. Müller, K.: Interdisziplinäre Entwicklung eines künstlichen Kniegelenks in Kunststoff-Metall-Kombinationsbauweise. Zeitschrift für Werkstofftechnik, 9/75, s. 290-305. Weinheim, Verlag Chemie 1975 citováno dle [2]
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. Čech, O., Pavlanský, R.: Aloplastika kyčelního kloubu. Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, Praha (1979)
5. Schmalzried, T.P., Callaghan, J.J.: Wear in total hip and knee replacement. J. Bone Jt. Surg. 81-A, 115-136 (1999)
6. Michel, M.C., Witschger, P.: Microhip: A minimally invasive procedure for total hip replacement surgery. A modified Smith-Petersen approach. Hip International 16, 40-47 (2006)
7. Sosna, A., Pokorný, D., Jahoda, D.: Náhrada kyčelního kloubu. Nakladatelství TRITON s.r.o., Praha (2003)
8. Rybka, V., Vavřík, P.: Aloplastika kolenního kloubu. Arcadia, Praha (1993)
9. Hansen, D., Jensen, J. S.: Prechilling and vakuum mixing is not suitable for all bone cements. Handling characteristics and exotherms of bone cements. J. Arthroplasty 5, 287-290 (1990)
10. Mulroy, R. D., Harris, W. H.: The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. J. Bone Jt. Surg. 72-B, 757-760 (1990)
11. Totální náhrada kolenního kloubu typ SVL – obr. Dostupné na URL: <http://beznoska.cz/indexm.php?a=text&id=49&lan=cz> [10.04.2008]
12. Willert, H.-G., Semlitsch, M.: Reactions of the Articular Capsule to Wear Products of Artificial Joint Prostheses. J. Biomed. Mater. Res. 11, 157-164 (1997) citováno dle [3]

13. Wright, T. M., Goodman, S. B.: Implant Wear in Total Joint Replacement. Rosemont, Illinois. American academy of orthopaedic surgeons. 176-178 (2001)
14. Pokorný, D., Sosna, A.: Problematika životnosti kloubních náhrad. *Sanquis* 50, 20-21 (2007)
Dostupné na URL: http://www.sanquis.cz/clanek.php?id_clanek=801 [10.04.2008]
15. Janíček, P.: Ortopedie. MU, Brno (2001)
16. Ohnsorge, J. A. K., Davis, J., Maus, U., Saklak, M., Weisskopf, M., Wirtz, D. Ch.: Early Polyethylene Wear and Excessive Acetabular Granuloma in an Uncemented HA-Coated Total Hip Arthroplasty – Midterm Results of a Prospective Study. *HSS Journal* 2, 114-120 (2006)
17. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J.: *The Molecular Cell Biology* 5e. WH Freeman and Company. New York (2003)
18. Bauer, T. W., Schills, J.: The pathology of total point arthroplasty (II. Mechanism of implant failure). *Skeletal Radiol.* 28, 483-497 (1999)
19. Schmalzried, T. P., Campbell, P., Schmidt, 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. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 38, 203-210 (1997)
20. Pokorný, D., Šlouf, M., Horák, Z., Jahoda, D., Entlicher, G., Eklová, A., Sosna, A.: Metodika sledování distribuce otěrových částic UHMWPE v okolních tkáních u TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir. Orthop. Traum. Čechosl.* 73, 243-250 (2006)
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 point replacements. *Wear* 262, 1171-1181 (2007)
22. Šlouf, M., Pokorný, D., Entlicher, G., Dybal, J., Synková, H., Lapčíková, M., Fejfárková, Z., Špundová, M., Veselý, F., Sosna, A.: Quantification of UHMWPE wear^{debris} in periprosthetic tissues of hip arthroplasty: description of a new method based on IR and comparison with radiographic appearance. *Wear* (2007) in press
23. Lapčíková, M., Šlouf, M., Fejfárková, Z., Zolotarevová, E., Entlicher, G., Pokorný, D., Sosna, A.: Influence of centrifugation on morphology of UHMWPE wear particles. UHMWPE 2007, Madrid, Spain, 14.-15.09.2007 (presentation)

24. Visentin, M., Stea, S., Aquarzoni, S., Antonietti, B., Reggiani, M., Toni, A.: A new method for isolation of polyethylene wear debris from tissue and synovial fluid. *Biomaterials* 25, 5531-5537 (2004)
25. Zolotarevová, E., Fejfárková, Z., ^{Entlicher, G.,} Lapčíková, M., Šlouf, ^{Pokorný, D.)} M., Sosna, A.: Can centrifugation affect the morphology of polyethylene wear debris? *Wear*. In press
26. Green, T. R., Fischer, 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* 19, 2297-2302 (1998)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Datum vrácení	Poznámka