

# IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA POLIETILENSKIH IN KOVINSKIH DELCEV IZ TKIVA OB KOLNIH ENDOPROTEZAH

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF UHMWPE AND METAL WEAR PARTICLES FROM PERIPROSTHETIC TISSUES

ALEKSANDRA MINOVI<sup>1</sup>, I. MILOJEVIĆ<sup>1</sup>, V. ANTOLIĆ<sup>2</sup>, S. HERMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Ortopedska klinika, Klinični center Ljubljana, Zaloška 9, 1000 Ljubljana

*Prejem rokopisa - received: 1997-10-01; sprejem za objavo - accepted for publication: 1997-12-19*

Uporabili smo metodo razkroja tkiva z natrijevim hidroksidom za izolacijo polietilenskih in kovinskih delcev iz periprostetičnega tkiva. S FTIR in EDS smo potrdili, da so bili izolirani delci res polietilenski in delci zlitine Ti-6Al-4V. S SEM smo ugotovili morfologijo in velikost delcev. Histološka analiza periprostetičnega tkiva je potrdila prisotnost obrabnih delcev.

Ključne besede: endoproteze, obrabni delci, tkivo, kemijska analiza

A method of tissue digestion using sodium hydroxide was applied to the isolation of ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) and metal particles from periprosthetic tissues. FTIR and EDS verified that the recovered particles were UHMWPE and Ti-6Al-4V. When viewed by SEM morphology and size of particles was determined. Histologic analysis of the tissues confirmed the presence of UHMWPE and metal particles.

Key words: endoprostheses, wear particles, tissue, chemical analysis

### 1 UVOD

V klinični uporabi je več modelov kolnih endoprotez, najpogosteje vsebujejo acetabulo, izdelano iz visokomolekularnega polietilena, kovinsko steblo in kovinsko ali keramično glavo. Kovinski del implanta je najpogosteje iz nerjavnega jekla, zlitine Co-Cr-Mo ali Ti-Al-V. Kljub veliki korozijski odpornosti in vrstnosti teh materialov se po dolgem času na površini implantov pojavijo poškodbe, ki povzročijo vnetne reakcije in razmakanost<sup>1</sup>. Najpogosteje privede do poškodb nezadostna odpornost materiala proti obrabi v kombinaciji z močnim korozijskim napadom biološkega okolja in mehanskimi napetostmi, ki se pojavijo ob fizičnih aktivnostih. Ko polietilenski in kovinski delci zaradi navedenih procesov obrabe pridejo v tkivo ob implantu, niso inertni, temveč vključeni v biološke reakcije, ki v končni fazi pripeljejo do osteolize oziroma omajanja implanta. Histološke analize so pokazale, da so sproščeni delci izpostavljeni procesu fagocitoze, pri čemer aktivirani makrofagi sproščajo v tkivo različne mediatorje - citokine in derivate prostaglandina E<sub>2</sub>, ki povzročajo patološke spremembe v okolju tkiva<sup>2</sup>.

### 2 EKSPERIMENTALNI DEL

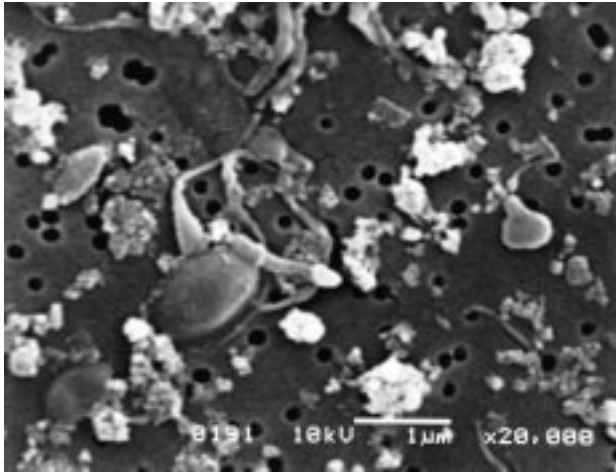
Preuvali smo vzorce loveškega tkiva, ki so bili odvzeti na Ortopedski kliniki v Ljubljani, ob odstranitvi implanta s femoralnim stebлом iz zlitine Ti-6Al-4V in polietilensko acetabulo, po dveh letih zaradi omajnosti in izpaha.

Vzorci za histološko analizo smo fiksirali v formalinu, vstavili v parafinski blok in razrezali na lističe debeline 4 µm ter obarvali s hematoksilinom in eosinom.

Vzorci za kemijsko analizo smo razkrojili in izolirali polietilenske in kovinske delce. Približno 200 mg tkiva smo dodali 2 ml 4 M NaOH in hidrolizirali 48 ur pri 56°C. Nato smo centrifugirali 40 minut pri 10 000 obratih s 6 ml 95% etanola in s tem pospešili sedimentacijo. Sedimentiranemu delu smo zopet dodali 2 ml NaOH in postopek ponovili. Vzorec smo sprali z destilirano vodo in delce separirali v ultrazvočni kopeli. Ločili smo zgornjo plast v epruveti, kjer so se nahajali polietilenski delci, od spodnje, kjer so bili kovinski. 200 µl vzorca izoliranih polietilenskih delcev smo filtrirali skozi 0,2 µm polikarbonatni filter papir, prekrili z zlatom in analizirali s SEM (JEOL JSM 5800). Ostali del izoliranih polietilenskih delcev smo analizirali z FTIR spektroskopijo (FTIR 1725X, Perkin Elmer) v območju 400 - 4000 cm<sup>-1</sup>. Vzorec izoliranih delcev zlitine Ti-6Al-4V smo prekrili z zlatom in analizirali s SEM in EDS (JEOL JSM 5800, EDS LINK ISIS).

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Postopek razkroja tkiva in izolacije delcev smo preizkusili na vzorcu govejega mesa, ki smo mu dodali referenčne polietilenske delce (Shamrock, 7 µm) in referenčne delce čeleza (Ventron, 100 µm). Ugotovili smo, da postopek ne vpliva na velikost in obliko delcev, potrebno jih je le dobro separirati v ultrazvočni kopeli in s tem preprečiti združevanje v večje grupe, kar bi onemogočilo karakterizacijo delcev<sup>3</sup>.



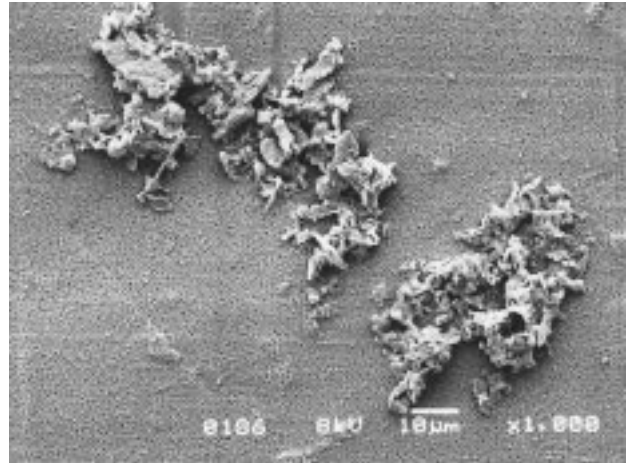
**Slika 1:** SEM- posnetek morfologije polietilenskih delcev, izoliranih iz tkiva ob kol-nih endoprotezah

**Figure 1:** Scanning electron micrograph of polyethylene particles recovered from periprosthetic tissue

SEM-posnetek polietilenskih delcev kaže na tri karakteristične morfologije delcev (**slika 1**). Okrogli so veliki 0,05 - 1,5 µm, podolgovati pa 1 - 5 µm in so v obliki vlaken, lahko imajo glavo in rep ali pa so brez glave, v obliki večjih krp. Poleg teh dveh morfologij delcev se pojavljajo (e individualni, submikrometrski delci v obliki zrn. Polietilenske delce smo identificirali z FTIR spektroskopijo s primerjavo s spektrom za referenčni material polietilena (**slika 2**). Karakteristični vrhovi se pojavljajo pri 2917, 2850, 1470 in 721 cm<sup>-1</sup>.

SEM-posnetek kovinskih delcev kaže na grobo strukturo, delci se pojavljajo v obliki kosmičev in so veliki 1 - 10 µm (**slika 3**). Delce zlitine Ti-6Al-4V smo identificirali z EDS spektroskopijo. Pojavljajo se značilni vrhovi za titan in aluminij, vrh vanadija pa je skrit za zlato, s katerim je bil prekrit vzorec.

Histološke analize tkiva ob kolni endoprotezi so potrdile prisotnost polietilenskih in kovinskih



**Slika 3:** SEM posnetek morfologije kovinskih delcev, izoliranih iz tkiva ob kol-nih endoprotezah

**Figure 3:** Scanning electron micrograph of metal particles recovered from periprosthetic tissues

delcev. Pojavljajo se značilne celice velikanke, ki nastanejo ob napadu makrofagov na obrabne delce. Celice se zaradi ujetih delcev ne delijo pravilno, delijo se le jedra, celice pa ostanejo nedeljene in pri tem nastanejo velikanke. Da celice velikanke vsebujejo polietilenske delce, lahko posredno sklepamo na podlagi analize pod mikroskopom s polarizirano svetlobo, kjer se polietilen zaradi dvolomnih lastnosti svetli<sup>4</sup>. @al tudi nekatere druge snovi v tkivu kažejo dvolomnost in smo zato morali poiskati dodatno metodo - FTIR, ki je nedvomno potrdila prisotnost polietilena<sup>5</sup>.

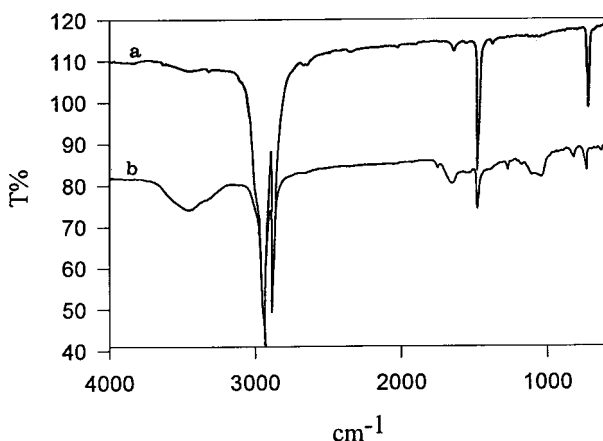
[tudija, ki je novost v raziskavah na področju ortopedije v Sloveniji, je prvi korak k na-inu reševanja zahtevnega problema biodegradacije endoprotez, biološke aktivnosti sproženih delcev in v končni fazi sistemskih učinkov, ki jih lahko povzročijo produkti korozijskih in obrabnih procesov na površini implantov.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo se dr. Ireni An'ur (Kemijski inštitut), doc.dr. Andreju Čoru (Medicinska fakulteta) in Zoranu Samard'iji, dipl. ing. (IJS) za pomoč pri delu.

## 4 LITERATURA

- 1 J. Frokjaer et al., Polyethylene particles stimulate monocyte chemotactic and activating factor production in synovial mononuclear cells in vivo. *Acta Orthop. Scand.*, 66 (1995) 303-307
- 2 D. G. Hicks et al., Granular Histiocytosis of Pelvic Lymph Nodes following Total Hip Arthroplasty. *J. Bone Joint Surg.*, 78-A (1996) 482-496
- 3 A. Minovi-, Razvoj polarografske metode za določanje kroma in železa v tkivu. *Diplomsko delo, FKKT, Ljubljana 1997*
- 4 D. Howie, Tissue Response in Relation to Type of Wear Particles Around Failed Hip Arthroplasties. *J. Arthrop.*, 5 (1990) 337-348
- 5 K. G. Shea et al., Analysis of Lymph Nodes for Polyethylene Particles in Patients Who Have Had a Primary Joint Replacement. *J. Bone Joint Surg.*, 78-A (1996) 497-504



**Slika 2:** FTIR - spektra: a) referenčni polietilen b) polietilen, izoliran iz tkiva

**Figure 2:** FTIR spectra of: a) reference polyethylene b) polyethylene particles recovered from periprosthetic tissue