

TRENDY STUDIA UVOLŇOVÁNÍ KOVŮ Z KLOUBNÍCH NÁHRAD

MARTIN KUBA^{a,b}, JIŘÍ GALLO^c a DAVID MILDE^a

^a Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Státní veterinární ústav Olomouc, Detašované pracoviště Kroměříž, Oddělení cizorodých látek, Národní referenční laboratoř pro kovy a dusíkaté sloučeniny, Hulínská 2286, 767 60 Kroměříž, ^c Ortopedická klinika Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc david.milde@upol.cz

Došlo 9.9.19, přijato 16.1.20.

Klíčová slova: kloubní náhrady, klinické vzorky, stopová prvková analýza, speciální analýza

Obsah

1. Úvod
2. Kloubní náhrady
3. Odběr a příprava vzorků
4. Metody prvkové analýzy
5. Speciální analýza
6. Koncentrační úrovně
7. Prokazování kvality výsledků
8. Závěr

1. Úvod

Kloubní náhrady mohou prodloužit aktivní život mnoha pacientů, jejichž klouby již nejsou schopny plnit svou původní funkci. S určitým zjednodušením lze indikace k implantaci kloubní náhrady popsat jako všechny situace, kdy není možné poškozené kloubní povrchy léčit jiným způsobem. To znamená, že pacientovi nepomohly ani konzervativní, ani operační „kloub zachovávající“ (obnovení poškozené kloubní plochy, osteotomie apod.) léčebné postupy a má potíže, které zhoršují jeho kvalitu života (bolesti, poruchy funkce, závislost na pomoci okolí apod.). Indikací jsou tedy pokročilá stadia osteoartrózy a úrazové, zánětlivé a tumorózní destrukce kloubu.

Jako první se o přístup ve smyslu kloubní náhrady systematicky pokoušel Themistocles Glück, který o svých výsledcích referoval poprvé už v roce 1890. K prvním ručně vyrobeným kloubním implantátům použil slonovinu, k jejich fixaci pak sádru, pemzu a kalafunu. Přesto není možné tento pionýrský počín považovat za první etapu

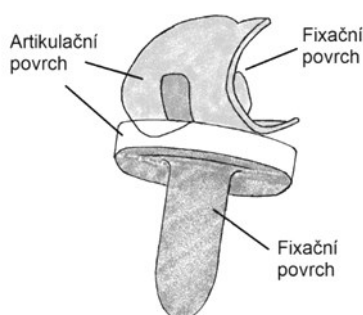
rozvoje endoprotetiky. Ta je spojená až s výzkumnou a klinickou činností Johna Charnleye, který se zasloužil nejen o vývoj, klinické testování a uvedení do praxe první široce používané kloubní náhrady kyčle, ale i o pozici celé endoprotetiky¹. Totální náhrady kyčle se od začátku 60. let 20. století začaly postupně šířit do celého světa. První klinicky úspěšné a používané náhrady kolena se objevily v 70. letech minulého století². Náhrady kyčlí, kolena a některých dalších kloubů dnes patří k běžným operačním výkonům. Jiné jsou indikovány méně často a implantovány jsou pouze na specializovaných pracovištích (např. náhrada lokte).

První kloubní náhrada „klasické“ konstrukce byla v Československu implantována již v roce 1969 (cit.³). V České republice se ročně implantuje přibližně 25 tisíc náhrad, z čehož necelých 11 tisíc tvoří náhrady kolena a 14 tisíc kyčlí, zbytek jsou náhrady jiných kloubů⁴. V současnosti implantované kloubní náhrady jsou zpravidla vyrobeny z kovových bioinertních slitin na bázi kobaltu, chromu, molybdenu či titanu, popř. i čistých kovů (titan). Méně často z korozivzdorné speciální oceli. Kovové částice a ionty se z povrchu kloubních náhrad uvolňují několika způsoby, včetně přirozené koroze v důsledku oxidačního působení vnitřního prostředí lidského organismu na tyto komponenty. Kovy uvolněné do okolí kloubní náhrady se podílejí na indukcii zánětlivých či alergických reakcí, v jejichž důsledku může dojít k odloučení protézy od kostního lůžka^{5,6}. Dosud není zcela vyřešená otázka systémové zátěže kovy uvolněnými z implantátu, i když se zatím nezdá, že by přispívaly například ke karcinogenezi či poškození DNA. Ze všech zmíněných důvodů je důležité uvolňování kovů do okolí implantátu dlouhodobě sledovat. K objasnění množství a osudu uvolněných kovů v organismu významnou měrou přispívají právě metody stopové prvkové analýzy. Díky nízkým mezím stanovitelnosti umožňují kvantifikovat nejen stopové koncentrace prvků, ale navíc ve spojení s vhodnou separační technikou poskytují i informaci o jednotlivých chemických formách⁵.

Tento přehledový článek shrnuje stav problematiky v oblasti prvkové analýzy a uvolňování kovů z kloubních implantátů, se zaměřením na používané metody a postupy, od odběru a přípravy vzorků až po zabezpečení kvality výsledků měření.

2. Kloubní náhrady

Kloubní náhrady se obvykle skládají z části fixační, kterou je protéza upevněna do kosti, a části artikulační, na které se odehrává pohyb v kloubu (obr. 1). Fixační povrch je nejčastěji vyroben z kovu. Tvar, mikrostruktura a povrchová úprava implantátů se přizpůsobují typu fixace (s či bez použití kostního cementu) a anatomické lokalizaci.



Obr. 1. Schematické znázornění náhrady kolenního kloubu

Artikulační povrchy jsou vyrobeny z polyethylenu, kovu, keramiky či nových materiálů, např. polyetheretherketonu (PEEK).

Kloubní náhrady jsou určeny k pohybu v kloubu a přenosu sil. Předchozí výzkum ukázal, že právě nevhodné otěrové vlastnosti zkracují výrazně délku přežití implantátů⁷. Na kloub se můžeme dívat jako na klasický tribosystém tvořený kloubním párem (například hlavička a jamka), mazací kapalinou a okolním prostředím⁸. V uvedeném kontextu rozlišujeme kloubní páry typu kov-polyetylen, keramika-polyetylen, keramika-keramika, kov-kov či kov-keramika (testovány byly i jamky z PEEK a dalších materiálů). V současnosti jsou velmi populární polyethyleny s vysokým stupněm síťování a dalšími tepelnými úpravami, resp. s přidáním antioxidantních aditiv, které zvyšují odolnost vůči nejčastějším mechanismům otěru⁹.

Kovy používané k výrobě kloubních náhrad jsou testovány na celou řadu vlastností, které se dají zhruba shrnout jako odolnost proti korozi, dostatečná mechanická odolnost, nízká toxicita a dobrá biokompatibilita⁵. Tyto podmínky splňují Ti, Co a Cr, resp. jejich slitiny, jež jsou základem pro většinu dnes používaných náhrad¹⁰. Pro vylepšení mechanických vlastností se do slitin přidávají např. Al, V, Nb, Mo a Ni, které jsou však zastoupeny v řádově nižším obsahu (do 5 %). Základem slitin na bázi kobaltu a chromu je tedy kobalt (66–67 %) s příměsí chromu (26–30 %), niklu (3–5 %) a molybdenu (4–5 %). Odolnost proti korozi je u těchto slitin založena na principu tvorby tenké pasivační vrstvy Cr_2O_3 na povrchu implantátu. Druhou významnou skupinou jsou implantáty na bázi titanu (slitiny s obchodními názvy Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb). Třetí skupinou jsou implantáty vyrobené pouze z titanu, které na povrchu implantátu tvoří stabilní vrstvu TiO_2 zvyšující mimo jiné odolnost materiálu vůči korozi^{5,11}. A čtvrtou skupinou materiálů používaných k výrobě implantátů jsou ušlechtilé oceli (obchodní názvy 316L, Rex 734 či Biodur 138).

Elektrochemická koroze postihuje do určité míry všechny kovové implantáty. Prostředí lidského těla je pro elektrochemické děje velmi příhodné, proto jsou bariérové funkce povrchové vrstvy implantátu intenzivně studovány, testovány a kontrolovány. Nejčastěji se ke kontrole koro-

zivních dějů využívá tenká ochranná pasivační vrstva oxidu (tloušťka od desítek nm po stovky μm), která brání transportu kovových iontů k povrchu implantátu (u slitin obsahujících Cr je to Cr_2O_3 , u slitin Ti pak TiO_2). Koroze mohou akceleroovat mechanické síly, zejména v místech spojů kovových komponent. Dojde-li kdekoliv k poškození ochranné vrstvy, rychlost uvolňování kovových iontů se prudce zvyšuje a je zvýšená do té doby, dokud se ochranná vrstva neobnoví. Korozivní problematika kloubních náhrad je podrobně popsána jinde^{12,13}.

Jednou z nejčastějších a nejdůležitějších otázek před operací je, jak dlouho „umělý“ kloub vydrží. Odpověď na tuto otázku však může být pouze pravděpodobnostní a je souhrnem řady parametrů. Nejdůležitějším je nepochybně správná operační technika a použití kvalitního implantátu. Ukazuje se však, že životnost totální endoprotézy (TEP) kyčle i kolena bývá horší například u mladších pacientů a zejména mužů, u nichž se předpokládá vysoká zátěž. Podobné důsledky mají také vysoké hodnoty BMI (body mass index) anebo vysoká pohybová aktivita. Přežití ovlivňuje také primární diagnóza, neboli indikace k implantaci TEP, a některé další znaky¹⁴. S určitým zjednodušením můžeme jako spolehlivou označit takovou TEP, která má v registrech kloubních náhrad doloženo 95% přežití k 10. roku od operace. Mezi 10. a 20. rokem sledování by se křivka přežití měla držet u nejlepších implantátů stále kolem 90 %.

3. Odběr a příprava vzorků

Kritickým problémem při stopové prvkové analýze může být kontaminace vzorku během odběru a přípravy vzorků. Tento problém je při odběru ortopedických vzorků umocněn faktem, že jej většinou nikdy nemůže provádět sám analytik a že nástroje standardně používané v chirurgii (injekční jehly, skalpely a operační pomůcky) jsou vyrobeny z chirurgické oceli, a mohou tedy obsahovat stanovené analyty (např. Fe, Cr a Ni). Proto je třeba při získávání klinických vzorků věnovat pozornost přípravě vhodné strategie a způsobu odběru a jejich skladování^{5,15,16}. Pokud je to možné, je doporučeno používat plastové, teflonové nebo alespoň vnitřně posilikonované jehly nebo kanyly^{5,17}. Některé kovové jehly však mohou být posilikonované jen z vnější strany¹⁴. Při odběru vzorků pomocí kanyl se pak k analýze odebrá až část vzorku procházející mimo kovovou jehlu^{18,19}, vyřazení první části prošlého vzorku se doporučuje i při použití kovových jehel²⁰. Pro porovnání výsledků ze vzorků moči je potřeba stanovit i kreatinin, popř. určit hustotu moči, a výsledky na tyto hodnoty korigovat¹⁶. Při odběru moči je doporučováno využití plastových odběrových nádobek a její okyselení, nejlépe pomocí HNO_3 . Ačkoliv jsou v literatuře popsány případy, kdy byla k analýze odebrána i tkáň²¹, nástroje k tomu použité jsou v literatuře jen obtížně dohledatelné. Zeiner a spol. uvádějí, že při odběru vzorků tkání *post mortem* byly využity nekovové nástroje²², ale u odběru vzorků *in vivo* není používání nástrojů z chirurgické oceli v tomto případě z pochopitelných důvodů jednoduše na-

hraditelné nekovovými alternativami.

Mezi dnes již standardní procedury pro odběr klinických vzorků patří použití odběrových nádobek (obvykle z polypropylenu nebo polyethylenu), uzpůsobených pro stopovou analýzu (loužení ve zředěné kyselině dusičné), nebo použití komerčně dodávaných odběrových zkumavek pro stopovou prvkovou analýzu^{5,17}. Pokud jsou odebrané vzorky analyzovány krátce po jejich odběru, je možné k jejich skladování využít ledničku (pod 5 °C), v opačném případě mrazničku nebo hlubokomrazicí box (–20 °C a nižší)⁵.

Příprava vzorku je závislá zejména na použité instrumentální metodě, dostupném množství analyzovaného vzorku a v neposlední řadě je kladen důraz na zamezení ztrát těkavých analytů či naopak zamezení kontaminaci vzorků⁵. V literatuře se pro stanovení kovů uvolněných z kloubních náhrad nejčastěji využívají metody AAS a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS), po přípravě vzorků mineralizací na mokré cestě nebo vhodným zředěním různými rozpouštědly^{5,10}. Některé matrice je sice možné analyzovat přímo (krevní sérum, moč), ale díky jejich vysoké viskozitě a obsahu solí je většinou nezbytné vhodné naředění⁵. Při analýze tkání, krve a krevního séra se nejčastěji uplatňuje rozklad na mokré cestě v uzavřeném systému s přísadkou HNO₃, popř. její směsí s HClO₄ nebo H₂O₂. V následujících odstavcích jsou popsány použité postupy pro rozklad klinických matric pro potřeby analýz pomocí AAS a ICP-MS v souvislosti se stanovením kovů.

Příprava vzorků krevního séra a krve

Z důvodu vysoké viskozity krevního séra se pro jeho transport úzkými hadičkami automatických podavačů používá minimálně jednoduchého naředění vodou, zředěnou kyselinou dusičnou nebo Tritonem X-100, popř. směsí Tritonu X-100 s dalšími látkami^{23,24}. Krev lze považovat za komplikovanou matici, při její přípravě pro stopovou prvkovou analýzu se často využívá mikrovlnného rozkladu. Obdobně jako u krevního séra lze pro některé instrumentální metody využít ředění vzorku Tritonem X-100 v různých poměrech nebo taktéž směsí Tritonu X-100 s dalšími látkami^{25,26}. Pro úplný rozklad tekuté či lyofilizované krve v otevřeném i uzavřeném systému se obvykle využívá směs HNO₃ a H₂O₂ (cit.^{19,27,28}).

Příprava vzorků moči

Díky nižší viskozitě moči se obecně častěji uplatňují jednodušší způsoby přípravy než u krve a séra, stále je však potřeba mít na paměti vysoký obsah solí. Při přípravě vzorků moči lze využít jednoduchého ředění vodou, zředěnou HNO₃ či směsí s obsahem Tritonu X-100 (cit.^{23,28}).

Příprava vzorků kloubních tekutin

Kloubní tekutina (výpotek) je viskózní kapalina vznikající činností povrchových buněk synoviální nebo pseudosynoviální výstelky kloubu, jejímž úkolem je zejména

mazání kloubních ploch a podpora metabolismu buněk kloubní chrupavky (v případě nativního kloubu). Protože výpotek omývá povrchy kloubu a současně je možné jej relativně snadno získat punkcí kloubu, je cenným klinickým materiálem, který se využívá při klinické diagnostice. Kovy se stanovují v kloubní tekutině při podezření na patologickou reakci periprotetických tkání vůči kovovým iontům/částicím a jako součást studií monitorujících korozivní chování kloubních náhrad²⁹. Lugowski a spol. studovali vliv rozkladných a ředících způsobů přípravy vzorku s následným stanovením Co, Cr a Mo. Pro přípravu vzorku kloubní tekutiny bylo využito ředění Tritonem X-100, mikrovlnný rozklad a klasický rozklad pomocí kyseliny dusičné a chloristé. Výsledky prokázaly, že uvedené metody přípravy vzorku poskytují srovnatelné výsledky³⁰. Obdobně jako u vzorků krve lze i pro rozklad kloubní tekutiny využít mikrovlnný rozklad se směsí HNO₃ a H₂O₂ (cit.³¹).

Příprava vzorků tkání

Informaci o akumulaci kovů uvolňovaných z oblasti kloubní náhrady lze nejlépe získat ze tkání odebraných z okolí kloubní náhrady při reoperacích nebo *post mortem*. Vyšetřovat lze takto: 1) pseudosynoviální tkáň, což je povrchová vrstva na vnitřní straně kloubního pouzdra připomínající vzhledem synoviální tkáň; 2) kloubní pouzdro; 3) membránu či granulační tkáň nacházející se kolem uvolněné kloubní náhrady anebo 4) kost z okolí implantátu. *Post mortem* lze uvedenou sestavu tkání doplnit o další odběrová místa, a stanovit tak systémovou expozici organismu kovům uvolňovaným z kloubních náhrad³². K přípravě vzorků pro stanovení řady kovů pomocí ICP-MS v různých lidských tkáních včetně pseudosynoviální tkáně je v literatuře popsán postup zahrnující lyofilizaci vzorků a využití mikrovlnného rozkladu se směsí HNO₃ a H₂O₂ (cit.^{22,31}).

4. Metody prvkové analýzy

Při volbě instrumentální metody pro stanovení kovů uvolněných z kloubních náhrad je potřeba zvážit hned několik faktorů. Typ a velikost vzorku, stanovené prvky a jejich počet, předpokládaný koncentrační rozsah, požadavky na preciznost a pravdivost, rychlost, cenu analýzy a dostupnou instrumentaci⁵. Hlavním problémem při stanovení kovů v ortopedických vzorcích je, že jsou obsaženy ve velmi nízkých koncentracích v komplikované matici a často v blízkosti instrumentálních mezí stanovitelnosti použitých metod. Na druhou stranu jsou publikovány i řádově vyšší výsledky, kde se např. v kloubních tekutinách vyskytovaly kovy v koncentracích převyšujících jednotky mg l⁻¹ (cit.³³).

Požadavky na tyto druhy analýz částečně splňuje AAS, při které se využívá zejména elektrotermické atomizace⁵. Meze detekce v některých případech mohou postačovat pro rozlišení pacientů se stabilní nebo selhávající kloubní náhradou a kontrolní skupiny, značnou nevýhodou

však je možnost analyzovat jen jeden prvek v rámci jedné analýzy a nezbytné použití modifikátorů matrice, což může vést ke kontaminaci vzorku⁵. Velké využití v této oblasti nachází zejména metoda ICP-MS, která poskytuje nejen dostatečně nízké meze detekce, ale i možnost simultánní analýzy více prvků a široký lineární dynamický rozsah. Pro studium kovů uvolněných z kloubních náhrad lze využít i optickou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem²², u které v praxi narážíme na nedostatečné instrumentální meze detekce. Oudadesse a spol. použili neutronovou aktivační analýzu (NAA) a částicemi indukovanou rentgenovou emisi ke sledování obsahu kovů v měkkých tkáních³⁴. U těchto metod je třeba zmínit značnou časovou náročnost analýzy (NAA) a vysoké pořizovací náklady ve srovnání s metodami atomové spektrometrie (AAS a ICP-MS). Kromě spektrálních metod lze pro stanovení kovů např. v krevním séru využít i adsorpční rozpouštěcí voltametrii³⁵. V této studii byly stanovovány koncentrace Co (od 0,03 $\mu\text{g l}^{-1}$) v mineralizovaných vzorcích ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) od pacientů s kloubní náhradou typu kov-kov. V literatuře je uvedena řada méně běžných metod používaných v problematice, které se věnuje tento článek. Studium změn ve složení povrchů kloubních náhrad se lze zabývat s využitím rentgenové fotoelektronové spektrometrie (XPS)³⁶, která v kombinaci s transmisí nebo skenovací elektronovou mikroskopií umožňuje studovat otěrové částičky uvolňující se z povrchu třecích ploch implantátů do kloubního výpotku a složení vrchní vrstvy kloubní náhrady^{37,38}. Sutherland a spol. studovali *in vitro* vliv různých proteinů na kontaminaci povrchu selhávajících náhrad obsahujících titan pomocí metod XPS, skenovací elektronové mikroskopie a pomocí hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů³⁹. Ke studiu kovových částic ve tkáních byla využita metoda synchrotronové rentgenové fluorescenční spektrometrie, rentgenová absorpční spektrometrie pak k analýze chemických forem chromu⁴⁰. Širšímu využití rentgenové fluorescenční spektrometrie v této oblasti brání nedostačující meze detekce⁴¹.

5. Speciální analýza

Toxicita jednotlivých kovů však závisí nejenom na jejich celkové koncentraci, ale také na jejich chemické formě a době expozice⁵. Podle doporučení IUPAC je analytická aktivita vedoucí ke zjištění chemické formy prvků a jejich rozlišení nazývána speciací⁴². Rozdílná toxicita jednotlivých chemických forem je u kovů využívaných pro výrobu kloubních náhrad nejvíce znatelná u chromu. Na rozdíl od jeho trojmocné formy Cr^{III} patří chrom v šestém mocenství Cr^{VI} mezi karcinogeny a je silné oxidační činidlo, které prostupuje buněčnými membránami. Recentní přehledový článek věnovaný speciaci Cr v biologických materiálech⁴¹ potvrzuje, že Cr^{VI} se po vstupu do organismu redukuje na Cr^{III} , a přítomnost chromu v šestém mocenství je tak v lidském těle značně nepravděpodobná. Možným důvodem rozporuplných výsledků ohledně přítomnosti Cr^{VI} v klinických vzorcích v literatuře je interkonverze mezi Cr^{III} a Cr^{VI} během přípravy vzorku⁴³. To lze

s využitím ICP-MS studovat pomocí izotopicky obohacených referenčních materiálů (např. $^{50}\text{Cr}^{\text{III}}$ nebo $^{53}\text{Cr}^{\text{VI}}$), které se používají pro přípravu kalibračních roztoků a jsou také komerčně dostupné. Speciací titanu se zabývali Nuevo-Ordóñez a spol., jež vyvinuli metodu pro jeho speciaci z ortopedických a dentálních implantátů v lidském séru, která využila iontově výměnnou kapalinovou chromatografii a ICP-MS se sektorovým hmotnostním analyzátozem s dvojitou fokusací. Bylo prokázáno, že titan se z 99,8 % váže na protein transferin. Pro kvantifikaci titanu byla využita metoda izotopového ředění. Stejný kolektiv autorů se zabýval studiem uvolňování kovů (Co, Cr, Ti, Mo a Mn) z kloubních náhrad a dentálních implantátů. Pro analýzy bylo využito obdobné instrumentální uspořádání jako výše (HPLC-ICP-MS). Výsledky ukázaly, že Mn se váže na transferin, Co na albumin, Cr se nepodařilo detekovat⁴⁴.

Speciální analýza a studium chemických forem kovů se zdá být přirozeným pokračováním v oblasti prvkové analýzy kovů uvolněných z kloubních náhrad, je však třeba vzít v úvahu vyšší nároky na instrumentaci, jelikož speciace většinou vyžaduje kombinaci několika analytických metod.

6. Koncentrační úrovně

Pro účely sledování expozice uvolňovaných kovů bývají nejčastěji stanovovány koncentrace kovů v krvi, krevním séru, plasmě a moči⁵, dále pak v kloubním výpotku^{30,31,33}, tkáních v blízkosti kloubu^{21,31–33,45}, eventuálně lidských orgánech *post mortem*²⁹. Analýzy kovů ve vlasech, kostech či nehtech jsou méně běžné. Stanovené koncentrační hladiny mohou sloužit nejen jako obraz celkového zatížení organismu, ale i jako biomarkery pro predikci selhání kloubních náhrad v klinické matrici⁵.

Tabulka I prezentuje doposud publikované koncentrační rozsahy kovů v nejčastěji analyzovaných klinických matricích (krevní sérum, krev a moč) pro kontrolní skupinu a skupinu pacientů se stabilní nebo selhávající kloubní náhradou. Přibližuje tak čtenáři možné očekávané nejnižší a nejvyšší koncentrační hladiny a může sloužit jako orientační přehled pro budoucí výzkumy. Z tabulky je znatelný značný rozptyl dat pro obě skupiny. Koncentrační úrovně kovů pro kloubní tekutinu a tkáň jsou komentovány níže.

Ačkoliv některé studie deklarují, že se jim povedlo odlišit kontrolní skupinu od pacientů s kloubní náhradou, event. pacienty se stabilní a selhávající náhradou⁵, srovnáme-li doposud zveřejněné koncentrační úrovně v konkrétních matricích v rámci jednotlivých prvků z pohledu celkového rozsahu (tab. I), je zřejmé, že koncentrační úrovně kovů v těchto skupinách se v rámci různých studií řádově liší a dochází i k překryvu koncentračních rozsahů u skupin pacientů se stabilní nebo selhávající kloubní náhradou a kontrolní skupiny. Proto určení jednoznačné koncentrační hladiny, ze které by se dalo s jistotou usuzovat, že určitá kloubní náhrada selhává, je značně obtížné.

Koncentrační hladiny kovů v kloubním výpotku u kontrolních skupin jsou zřídka kdy udávány. Hallab

Tabulka I

Koncentrační hladiny nejčastěji stanovovaných kovů (Ti, V, Co, Cr, Mo, Ni) v klinických materiálech (krev, krevní sérum, moč) u kontrolních skupin a pacientů se stabilní nebo selhávající kloubní náhradou v $\mu\text{g l}^{-1}$ (modifikováno z cit.⁵)

Prvek	Kontrolní skupina			Pacienti s kloubní náhradou		
	krev	krevní sérum	moč	krev	krevní sérum	moč
Ti	0,3–9,3	0,20–5,13	0,09–1	0,590–319,6	0,06–536,8	0,004–650
V	0,026–1	–	0,008–1	0,042–0,181	–	0,002–0,004
Co	0,04–1,75	0,1–3,46	0,04–1,04	0,16–116,1	0,08–25,81	0,004–205,62
Cr	0,05–5,8	0,06–1,47	0,04–0,9	0,130–108,1	0,6–23,08	0,004–42,83
Mo	0,3–1,3	0,27–2,11	4,25–110	0,4–58,6	0,4–2,11	0,26–100
Ni	0,3–1,4	0,1–1,7	0,24–2,7	0,5–3,7	≈0,7	0,015–3,38

a spol. uvádějí přibližné průměrné hladiny koncentrací kovů v kloubním výpotku u pacientů bez kovových implantátů (Ti: $13 \mu\text{g l}^{-1}$; Co: $5 \mu\text{g l}^{-1}$; Cr: $3 \mu\text{g l}^{-1}$; Mo: $21 \mu\text{g l}^{-1}$; Ni: $5 \mu\text{g l}^{-1}$) i u pacientů s kloubní náhradou buď ze slitiny Ti-6Al-4V, nebo Co-Cr-Mo (Ti: $556 \mu\text{g l}^{-1}$; Co: $588 \mu\text{g l}^{-1}$; Cr: $385 \mu\text{g l}^{-1}$; Mo: $58 \mu\text{g l}^{-1}$; Ni: $32 \mu\text{g l}^{-1}$)⁴⁶. Lass a spol. uvádějí koncentrace kobaltu a chromu v kloubní tekutině u pacientů s kloubními náhradami typu kov-kov na bázi Co-Cr (Co: $1,0\text{--}872 \mu\text{g l}^{-1}$; Cr: $1,5\text{--}1928 \mu\text{g l}^{-1}$)⁴⁷. Statisticky významné rozdíly mezi hladinami Ti, Co a Cr mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů se selhávající kloubní náhradou potvrdila studie³¹.

Z doposud publikovaných výzkumů plyne, že tkáně přiléhající ke kloubní náhradě jsou zatíženy kovy řádově více než tělní tekutiny, stejně tak vyšší koncentrace kovů byly prokázány v lidských orgánech analyzovaných *post mortem*. Zeiner a spol. udávají i koncentrační úrovně (Al, Co, Cr, Mo, Nb, Ni, Ti) pro kontrolní skupinu v různých lidských orgánech, které se pro většinu prvků pohybují pod $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (suché váhy), signifikantní rozdíly oproti skupině pacientů však byly nalezeny jen pro některé prvky v některých tkáních²². Přehledový článek autorů A. Sargeanta a T. Goswami uvádí koncentrace kovů uvolněných z kloubních náhrad do tkání v řádech stovek až tisíců $\mu\text{g g}^{-1}$ (cit.³³). Obdobně vysoké hodnoty kovů uvolňovaných z kloubních náhrad do přiléhajících tkání publikovali i další autoři^{31,32}.

7. Prokazování kvality výsledků

Výsledky získané na základě analýz klinických vzorků přispívají nejenom k rozvoji vědeckého poznání v této oblasti, ale může k nim být přihlédnuto i při hodnocení zdravotního stavu pacientů. Je tedy zcela nezbytné věnovat velkou pozornost prokázání kvality výsledků, využívat předem validované postupy měření a vhodné referenční materiály jak pro zajištění metrologické návaznosti výsledků, tak i pro ověření pravdivosti. Využití referenčních materiálů je nezbytné nejen při samotné validaci postupů měření, ale i pro řízení kvality při rutinních analýzách.

Na trhu se vyskytuje pestrá škála referenčních materiálů různých úrovní, včetně biologických matric jako je

krev, sérum, moč, tkáně atd. Z pohledu stanovení kovů uvolněných z kloubních náhrad (Co, Cr, Mo, Ti, Al, V, Ni) však není snadné najít vyhovující matricové referenční materiály, které by obsahovaly všechny potřebné prvky současně a s certifikovanými hodnotami na vhodných koncentračních úrovních. Často se používají referenční materiály krve a krevního séra s komerčním názvem SeronormTM (Sero, Norsko), které mají certifikovány hodnoty pro řadu kovů na několika koncentračních úrovních. Z matricových certifikovaných referenčních materiálů tkání živočišného původu, které obsahují dostatek certifikovaných hodnot pro stanovení více prvků zároveň, jsou použitelné např.: SRM 1577c – Bovine Liver (NIST, USA) či TORT-2 (NRC-CNRC, Kanada). Neuspokojivá je situace na poli speciální analýzy, která nejvíce trpí nedostatkem matricových referenčních materiálů. Obecně však lze konstatovat, že použití méně vhodného referenčního materiálu (např. tkáně živočišného původu) je lepší než provádět analýzy zcela bez metrologické návaznosti na jakýkoliv referenční materiál⁵.

8. Závěr

Doposud publikované výsledky dokazují, že kloubní náhrady mohou být významným zdrojem kovů uvolňovaných do lidského těla. Ty mohou vést k lokálním komplikacím spojených s TEP, stejně jako mohou být akumulovány v okolních tkáních, resp. mohou se dostávat až do krevního řečiště, prostřednictvím kterého mohou být rozváděny do dalších orgánů v lidském těle. Problematikou celkové zátěže kovy uvolněnými z kloubních náhrad se zabývá řada studií, stejně tak je zde patrná značná snaha využít uvolněné kovy jakožto biomarkery pro odhalení selhávající kloubní náhrady, i když určení konkrétních koncentračních hladin, které by mohly být použity v klinické praxi, se prozatím jeví jako problematické. Ke stanovení těchto kovů, stejně jako ke studiu chemických změn na povrchu kloubních náhrad, přispívají významnou měrou metody prvkové analýzy, jako jsou AAS, ICP-MS a XPS. Málo pozornosti je doposud věnováno speciální analýze uvolněných kovů, ačkoliv jejich toxicita může značně záviset právě na jejich chemické formě.

Autoři děkují Univerzitě Palackého za finanční podporu v rámci projektu (IGA_PrF_2019_028 a IGA_LF_2020_016).

LITERATURA

- Jackson J.: *J. Med. Biogr.* 19, 151 (2011).
- Ranawat C. S.: *J. South Orthop. Assoc.* 11, 218 (2002).
- Moravec H., Fojt J., Filip V., Joska L.: *Chem. Listy* 108, 40 (2014).
- Šlouf M., Vacková T., Nevoralová M., Mikešová J., Dybal J., Pilař J., Zhigunov A., Kotek J., Kredatusová J., Fulín P.: *Chem. Listy* 107, 783 (2013).
- Matusiewicz H.: *Acta Biomater.* 10, 2379 (2014).
- Gallo J., Goodman S. B., Konttinen Y. T., Raska M.: *Innate Immun.* 19, 213 (2013).
- Fulín P., Pokorný D., Šlouf M., Nevoralová M., Vacková T., Dybal J., Kaspáříková N., Landor I.: *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* 83, 155 (2016).
- Gallo J., Hartl M., Vrbka M., Návrat T., Krupka I.: *Acta Chir. Orthop. Tr.* 80, 377 (2013).
- Fulín P., Pokorný D., Šlouf M., Vacková T., Dybal J., Sosna A.: *Acta Chir. Orthop. Tr.* 81, 33 (2014).
- Brunski J. B., v knize: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* (Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., ed.), 2. vydání, kapitola 2.9, str. 137. Elsevier, Londýn 2004.
- Marti A.: *Injury* 31, 18 (2000).
- Cooper H. J.: *Orthop. Clin. North Am.* 45, 9 (2014).
- Jacobs J. J., Cooper H. J., Urban R. M., Wixson R. L., Della Valle C. J.: *J. Arthroplasty* 29, 668 (2014).
- MacInnes S. J., Del Vescovo E., Kiss-Toth E., Ollier W. E. R., Kay P. R., Gordon A., Greenfield E. M., Wilkinson M. J.: *J. Orthop. Res.* 33, 193 (2015).
- Rodushkin I., Odman F.: *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15, 40 (2001).
- Rodushkin I., Engstrom E., Baxter D. C.: *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 365 (2010).
- Spěváčková V., Knotková J.: *Chem. Listy* 92, 287 (1998).
- Hart A. J., Hester T., Sinclair K., Powell J. J., Goodship A. E., Pele L., Fersht N. L., Skinner J.: *J. Bone Joint Surg. Br. Vol.* 88B, 449 (2006).
- Lhotka C., Szekeres T., Steffan I., Zhuber K., Zweymuller K.: *J. Orthop. Res.* 21, 189 (2003).
- Afolaranmi G. A., Tettey J. N. A., Murray H. M., Meek R. M. D., Grant M. H.: *J. Arthroplasty* 25, 118 (2010).
- Schnabel C., Herpers U., Michel R., Loer F., Buchhorn G., Willert H. G.: *Biol. Trace Elem. Res.* 43–45, 389 (1994).
- Zeiner M., Zenz P., Lintner F., Schuster E., Schwagerl W., Steffan I.: *Microchem. J.* 85, 145 (2007).
- Iavicoli I., Gianluca F., Alessandrelli M., Rafaella C., De Santis V., Salvatori S., Alimonti A., Carelli G.: *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 25 (2006).
- Balcaen L., Bolea-Fernandez E., Resano M., Vanhaecke F.: *Anal. Chim. Acta* 809, 1 (2014).
- Masse A., Bosetti M., Buratti C., Visentin O., Bergadano D., Cannas M.: *Biomed. Mater. Res., Part B* 37B, 750 (2003).
- Liu T. K., Liu S. H., Chang C. H., Yang R. S.: *Tohoku J. Exp. Med.* 185, 253 (1998).
- Schaffner A. W., Pilger A., Engelhardt C., Zweymuller K., Ruediger H. W.: *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 839 (1999).
- Sarmiento-Gonzalez A., Marchante-Gayon J. M., Tejerina-Lobo J. M., Paz-Jimenez J., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1001 (2005).
- Waterson H. B., Whitehouse M. R., Greidanus N. V., Garbuz D. S., Masri B. A., Duncan C. P.: *Bone Joint J.* 100B, 720 (2018).
- Lugowski S. J., Smith D. C., McHugh A. D., Vanloon J. C.: *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5, 23 (1991).
- Kuba M., Gallo J., Pluháček T., Hobza M., Milde D.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 107, 454 (2019).
- Betts F., Wright T., Salvati E. A., Boskey A., Bansal M.: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 276, 75 (1992).
- Sargeant A., Goswami T.: *Mater. Des.* 28, 155 (2007).
- Oudadesse H., Irigaray J. L., Chassot E.: *J. Trace Microprobe Tech.* 18, 505 (2000).
- Milosev I., Pisot V., Campbell P.: *J. Orthop. Res.* 23, 526 (2005).
- Decking R., Reuter P., Huttner M., Puhl W., Claes L. E., Scharf H. P.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 64B, 99 (2003).
- Milosev I., Remskar M.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 91A, 1100 (2009).
- Kovacik M. W., Gradisarl A., Tokash J. C., Stojilovic N., Ehrman J. D., Bender E. T., Ramsier R. D.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 84A, 1068 (2008).
- Sutherland D. S., Forshaw P. D., Allen G. C., Brown I. T., Williams K. R.: *Biomaterials* 14, 893 (1993).
- Hart A. J., Quinn P. D., Sampson B., Sandison, Atkinson K. D., Skinner J. A., Powell J. J., Mosselmans J. F. W.: *Acta Biomater.* 6, 4439 (2010).
- Lukačovičová O., Mikuš P.: *Chem. Listy* 112, 242 (2018).
- Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* 72, 1453 (2000).
- Pechancová R., Pluháček T., Milde D.: *Spectrochim. Acta, Part B* 152, 109 (2019).
- Nuevo-Ordóñez Y., Montes-Bayon M., Blanco-Gonzalez E., Paz-Jimenez J., Tejerina-Lobo J. M., Pena-Lopez J. M., Sanz-Medel A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 1037 (2009).
- Wang J. C., Yu W. D., Sandhu H. S., Betts F., Bhuta S., Delamarter R. B.: *Spine* 24, 899 (1999).
- Hallab N. J., Mikecz K., Vermes C., Skipor A., Jacobs J. J.: *Mol. Cell. Biochem.* 222, 127 (2001).
- Lass R., Grubl A., Kolb A., Stelzeneder D., Pilger A., Kubista B., Giurea A., Windhager R.: *J. Orthop. Res.* 32, 1234 (2014).

M. Kuba^{a,b}, J. Gallo^c, and D. Milde^a (^a *Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*; ^b *State Veterinary Institute in Olomouc, Kroměříž*, ^c *Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital, Palacký University, Olomouc*): **Trends in Study of Metals Being Released from Joint Replacements**

Releasing of metals from joint replacements represents one of the current topics of modern orthopedics. Determination of metals can contribute to understanding of patient's exposure to the metals and could be used as potential biomarker to detect the failure of joint replacements. This review focuses on materials used in production of joint replacements and their release into the human

body. It provides an overview of the most frequently used sample preparation procedures, instrumental techniques including elemental speciation analysis, and the previously reported concentration levels of released metals in various clinical matrices, such as blood, serum, joint fluid or tissues. Quality of results, as a non-negligible part of analytical procedure, is also discussed.

Keywords: joint replacements, clinical samples, trace element analysis, speciation analysis

Acknowledgements

This work was supported by Palacký University in Olomouc (Grant numbers: IGA_PrF_2019_028 and IGA_LF_2020_016).