

# ZÁRÓJELENTÉS

OTKA67551

## A nagyízületi endoprotézisek biokompatibilitásának és biológiai rögzítettségének in-vivo vizsgálata

### BEVEZETÉS

A nagyízületi endoprotetizálás az elmúlt évtizedek legfontosabb ortopéd sebészeti vívmányainak egyike. Világszerte évente megközelítőleg 1 millió protézist ültetnek be, jelentős javulást biztosítva ezzel mind az ízületi funkciók, mind a betegek életminősége tekintetében. Ezzel párhuzamosan azonban a pácienseinket új biológiai problémának tesszük ki, amit az implantátum anyag jelenléte okoz az emberi szervezetben, és ez speciális idegen test - humán szövet interakcióban nyilvánul meg [1], mely meghatározza az implantátumok biokompatibilitását és biológiai integrációját is.

#### *Fémérzékenység és nagyízületi implantátum beültetés*

Jelenleg a nagyízületi endoprotézisek domináns anyagtípusa fém természetű. Az elmúlt évtizedek tapasztalatai alapján ma már olyan fémötvözetek kerülnek beültetésre, amiknek a kiváló biomechanikai tulajdonságai mellett igen jó biokompatibilitási mutatói vannak. Ennek ellenére a különböző fémekkel szemben immunológiai reakció alakulhat ki, ami eltérő fokú fémallergia formájában nyilvánul meg. A reakció kialakulásában a fém, mint antigén (haptén) játszik fontos szerepet és ú.n. IV-es típusú, sejt-mediálta késői túlérzékenységi reakciót okoz. A beültetett fém anyaggal a keringés során kontaktusba kerül a T lymphocyták egy altípusa ( $T_{H-1}$ ), ami aktiválódva különféle cytokineket (tumor necrosis factor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ], interleukin [IL]-1, IL-2) termel, melynek hatására

lokálisan macrophag aktiváció alakul ki, mely folyamat beindítja a proinflammatorikus láncreakciót [2]. Emellett az aktiválódott lymphocyták blasztos átalakuláson esnek át allergén jelenlétében és fokozott szaporodással válaszolnak, emellett migrációjuk is megváltozik [3]. Ez az aktív környezet befolyásolja az implantátum integrációját és a periprotetikus csont felszívódásához vezethet [4-6].

A protézis beültetéssel kapcsolatos fémérzékenység speciális több szempontból is. Egyrészt a folyamatban résztvevő antigén prezentáló sejt (APS) típusa nem ismert bizonyossággal, ezért a rutin kután bőrteszt (patch test) alapján, ahol az APS a bőr Langerhans sejtje, nem mindig lehet kimutatni fémérzékenységet. Ennek kiküszöbölésére speciális, sejtes reakciókat vizsgáló fémérzékenységi tesztek kerültek kidolgozásra. További érdekes megfigyelés az, hogy egyes betegeknél protézis beültetést megelőzően fémérzékenységi reakció nem megfigyelhető, majd a beültetést követően fokozatosan, évek alatt alakul ez ki, ami az implantátum rögzítettségének elégtelenségéhez vezethet [3, 7-9]. A helyi reakciókon túl szisztémás hatásokkal is számolnunk kell, mivel ismert probléma az implantátum anyagból származó degradációs termékek megjelenése a parenchymás szervekben, valamint a szérumban is jelentősen emelkedett fém ion szinteket lehet mérni, mely kérdések az immunológiai reakción túl a direkt toxicitás és esetleg karcinogenitás dilemmáját is felvetik [10-12].

#### *A nagyízületi implantátum beültetés és az aszeptikus lazulás*

Az implantátum anyag és a befogadó szervezet közötti interakciók egy másik klinikai következménye a periprotetikus csont felszívódása, ami az esetek nagy többségében együtt jelentkezik az implantátum aszeptikus lazulásával. Ennek súlyossága az egyéntől, az implantátum anyagától és számos egyéb tényezőtől is függ [1]. Az elváltozás hátterében az implantátum anyagból felszabaduló degradációs, korróziós és kopási termékek kiváltotta

periprotetikus steril gyulladáshoz vezető folyamat áll, mely elősegíti a csont felszívódását a protézis körül. A folyamat a protézis rögzítettségének elégtelenségével, funkciójának elvesztésével, majd végső soron annak cseréjével jár. Összességében ez képezi a nagyízületi implantációk hosszú távú komplikációinak legjelentősebb részét, egyidejűleg a revíziós műtétek leggyakoribb okát is [13].

Jelenleg az aszeptikus lazulás diagnózisát a klinikai tünetek és röntgenlelet alapján lehet biztosan felállítani. Ennek hátránya, hogy ekkor már a probléma a végstádiumban van, tehát a megelőzés nem lehetséges, csak az implantátum revíziója. Ennek megfelelően igény van az implantátum rögzítettségének és biokompatibilitásának folyamatos monitorozására olyan technika segítségével, mely 1) rutinszerűen elvégezhető, 2) minimál invazív eljárás és 3) minden beteg rendelkezésére áll. A célja egy ilyen szűrőrendszernek az, hogy még a klinikai tünetek megjelenése előtt lehetőség legyen prognosztizálni az esetleges aszeptikus lazulást. Az aszeptikus lazulás patomechanizmusának ismeretében lehetőség van két nagy folyamat laboratóriumi monitorozására [1, 14, 15]. Az elsőben a periprotetikus sejtek aktivációját lehet kimutatni az általuk kibocsátott faktorok mérésén keresztül szérumból, mely a steril gyulladást reprezentálja. A második folyamatban, ami ugyan nem különül el az elsőtől, de időben később jelentkezik, a csont metabolizmus megváltozása követhető elsősorban vizelet mintából.

## **CÉLKITŰZÉS, HIPOTÉZIS**

Jelen prospektív tanulmányban egyik célunk volt speciális fémérzékenységi vizsgálatok segítségével betekintést nyerni a nagyízületi endoprotetika háttérében lévő késői típusú túlérzékenységi reakcióba, valamint ez alapján detektálni az implantátum beültetését

követően esetlegesen kialakuló fémallergiát olyan betegekben, ahol korábban fémérzékenység nem volt bizonyítható.

A projekt másik hipotézise az, hogy meghatározhatók olyan változók betegek szérumából és vizeletéből, amelyek prognosztizálják, illetve kimutatják az implantátum integritásának elégtelenségét még a klinikai tünetek beállta előtt, esélyt biztosítva ezzel a megelőzésre.

## **MÓDSZEREK**

### *Beteganyag a fémérzékenységi vizsgálatokhoz*

A PTE ÁOK Orthopaediai Klinikáján évente átlagban 450 nagyízületi endoprotézis beültetés történik. Ezen betegek közül három csoportot alakítottunk ki, amikben prospektív vizsgálatokat végeztünk: 1) korban, nemből megfelelő egyének implantátum nélkül, akiknél fémérzékenység nem volt ismert bőrpróbával (5 eset), 2) cement nélküli csípőprotézis beültetésen átesett betegek, akiknél korábban fémérzékenység nem volt kimutatható (40 eset), 3) nem implantált betegek, ahol ismert volt allergia különböző fémek iránt kután tesztet használva (5 eset). A vizsgálatokhoz etikai engedéllyel rendelkezünk és önkéntes, tájékoztatott beleegyezést követően került a tanulmányba beteg.

### *Beteganyag a biomarker vizsgálatokhoz*

A PTE ÁOK Orthopaediai klinikáján évente kb. 450 nagyízületi endoprotézis beültetés történik. Ezen betegek közül megfelelő szempontok szerint 3 csoportot alakítottunk ki, amikben prospektív vizsgálatokat végeztünk: 1) korban, nemből megfelelő betegek ízületi panaszok nélkül (5 eset; 2 nő, 3 ffi, átlag életkor 66 év), 2) csípőprotézis beültetésen átesett betegek klinikai és radiológiai lazulás jelei nélkül (30 eset; 17 nő, 13 ffi, átlag életkor az

utolsó mintavételnél 71 év), 3) csípőprotézis beültetésen átesett betegek klinikai lazulás biztos jeleivel (30 eset; 14 nő, 16 ffi, átlag életkor 68 év), akiknél a revíziós műtét indikációra került. A beültetett protézisek cementezett típusúak voltak. A betegeket a laborvizsgálatok mellett prospektív módon követtük standard radiológiai és klinikai (Harris Hip Score) vizsgálatokkal betegbehívásos rendszer alapján [16, 17]. A vizsgálatokhoz etikai engedéllyel rendelkezünk és önkéntes, tájékoztatott beleegyezést követően került a tanulmányba beteg. A csoportokban nem volt ismert a betegek között olyan krónikus betegség, mely befolyásolja érdemben a csontanyagcserét és a gyulladáshoz vezető jeleket, valamint oszteotrop gyógyszerek szedése is kizárható volt. A betegek mobilizálása is megfelelő volt, nem fekvő, illetve járásképtelen egyének kerültek a tanulmányba.

#### *Mintavétel*

A betegektől műtét előtt, valamint azt követően megfelelő időpontokban (3, 6, 12, 24, 36 és 48 hónap) vér és vizelet mintát vettünk standard protokollnak megfelelően. A vér mintából mononucleáris sejtek kerültek elválasztásra gradiens (Ficoll-isopaque, Pharmacia, Piscataway, NJ) centrifugálást alkalmazva. A szérumból külön mintából került kinyerésre centrifugálást követően. A szérumból és vizelet minták tárolása -80 °C-on történt későbbi felhasználás esetén. Standard röntgenfelvétel SF-36 és Harris Hip Score vizsgálatok is történtek a fenti időpontokban.

#### *A fémérzékenység vizsgálata*

Korábbi vizsgálatok alapján kiderült, hogy a nagyízületi implantáció kapcsán felmerülő fémérzékenységi vizsgálatokhoz nem elegendők a standard kután bőrpróbák. Ezért speciális tesztek kerültek kidolgozásra, melyek a betegek perifériás leukocita sejtjein végezhetőek in-vitro: 1) lymphocita proliferációs vizsgálat (lymphocita blasztos

transzformáció [LBT], 2) cytokin analízis (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) és 3) leukocita migráció gátlási teszt. A mononucleáris sejt kultúrákat (lymphocyta/monocyta) standard körülmények között (DMEM+ 10% saját szérum) tartva kezeletlenül hagytuk (negatív kontroll), illetve különböző fém ion oldatokkal (0,1 mM CrCl<sub>3</sub>, 0,1 mM NiCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,01 mM Ti), valamint pozitív kontrol anyaggal (phytohaemaglutinin, 0,01 mg/ml) stimuláltuk nem citotoxikus koncentrációban. A fenti vizsgálatokat korábban publikált protokollhoz igazodva végeztük el [3, 7, 8, 18]. Röviden, a proliferációt tríciummal jelölt timidin DNS-be épülésévé 96-well lemezen 5 nap kezelés után, a szekretált citokineket ELISA technikával (0,5 to 32 pg/ml érzékenység, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 2 nap kezelést követően, a gátlási tesztet Boyden kamra (FluoroBok; BD Biosciences) alapú módszerrel vizsgáltuk szintén 2 napos inkubáció után. Paralel epikután bőrtesztet végeztünk a fenti fémekkel standard protokollnak megfelelően [19].

#### *Biomarker vizsgálatok a szérum és vizelet mintákból*

Az alábbi változókat vizsgáltuk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, 0,5 - 32 pg/ml érzékenység, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével: receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , cathepsin-K változók a szérumból, valamint deoxypyridinolinek (Dpd) és az I-es típusú kollagén cross-linkek C- és N-telopeptide (CTX és NTx) paraméterek a vizeletből [20, 21].

A fentiek közül a RANKL – OPG paraméterek alapvetően fontosak a csont normális és patológiás állapotaiban a RANK receptoron keresztüli oszteoklaszt aktiváció és gátlás befolyásolása miatt. A cathepsin K enzim jelenléte az aktív oszteoklasztok jellemzője. Az IL és a TNF citokinek a periprotetikus proinflammatorikus milieu meghatározó szereplői, azzal a kiegészítéssel, hogy az IL-4 Th2 típusú citokin, mely részben antiinflammatorikus és antireszorptív hatással bír és jellemzője a periprotetikus térnek. A csont lebontásának is ismert

változói vannak, köztük a totál Dpd, CTx és NTx is, melyek a csontmátrix jellemző szerves alkotójának, az I-es típusú kollagének a katabolit származékai.

### *Statisztikai analízis*

Leíró statisztikát alkalmaztunk normál eloszlás esetén a csoport átlagok, standard deviációk megállapítására. A kétmintás, független Student t tesztet használtuk a csoportok összehasonlítására Bonferroni korrekcióval. Nem normál eloszlás esetén, illetve csoporton belüli értékmegoszlások vizsgálatára és együttlátására non-parametrikus tesztek és diszkriminancia analízist használtunk. A szignifikanciát a  $p < 0,05$  szinten állapítottuk meg. A statisztikai számításokat az SPSS 10.0 statisztikai programmal végeztük (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **EREDMÉNYEK**

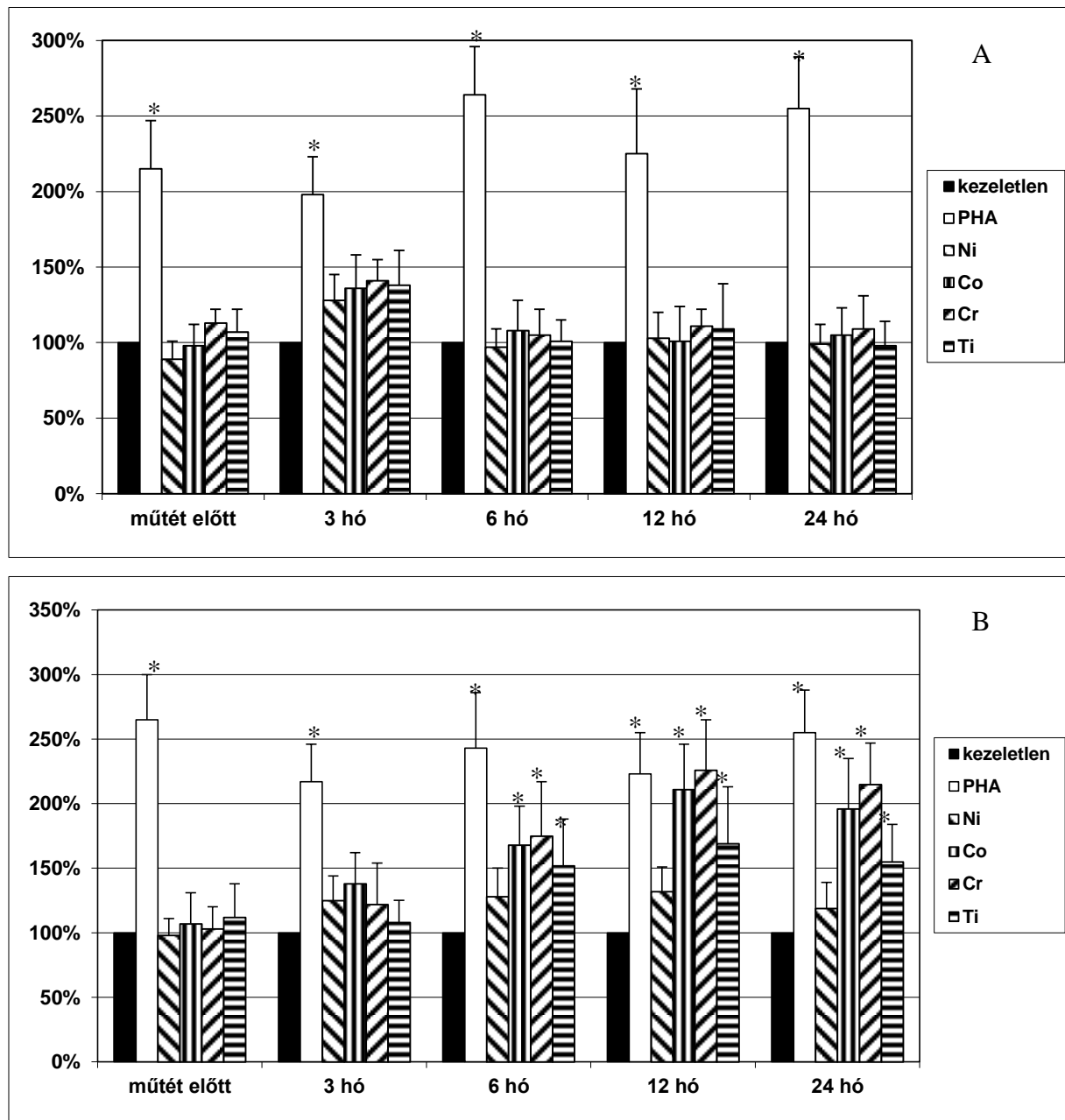
### **Fémérzékenységi vizsgálatok**

#### *Proliferációs teszt (lymphocyta transformációs teszt)*

A pozitív kontrollként használt PHA szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) fokozta a mononuclearis sejtek in vitro proliferációját minden beteg esetében a tanulmány során. Az 1-es beteg csoportban a Ni kezelés emelte a sejtek szaporodását, de ez nem volt szignifikáns. A 2-es betegcsoportban, ahol a betegek a tesztelt fémekkel szembeni pozitív bőrpróba alapján kerültek kiválasztásra, mind a négy vizsgált fém szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) fokozta a sejtek osztódását, ahogy várható is volt. A 3-as csoportban a műtétet megelőzően a sejt kultúrák nem válaszoltak a fémion kezelésre. A műtétet követő 6. hónapban azonban a betegek 25% ( $n=10$ ) mutatott szignifikáns ( $p < 0,05$ ) stimulációt a kezelések (fémek) hatására a nikkelt kivéve. Még az alacsonyabb koncentrációban használt titán is stimuláló hatással bírt. A tanulmány 36.

hónapos felülvizsgálatánál a 3-as csoporton belüli betegek 35%-a (n=14) mutatott emelkedett sejtproliferációt a tesztelt fémek jelenlétében (1. Ábra). Érdekes módon a paralel végzett kután bőrtesztek nem mutattak reakciót ezen betegeknben sem.

1. Ábra



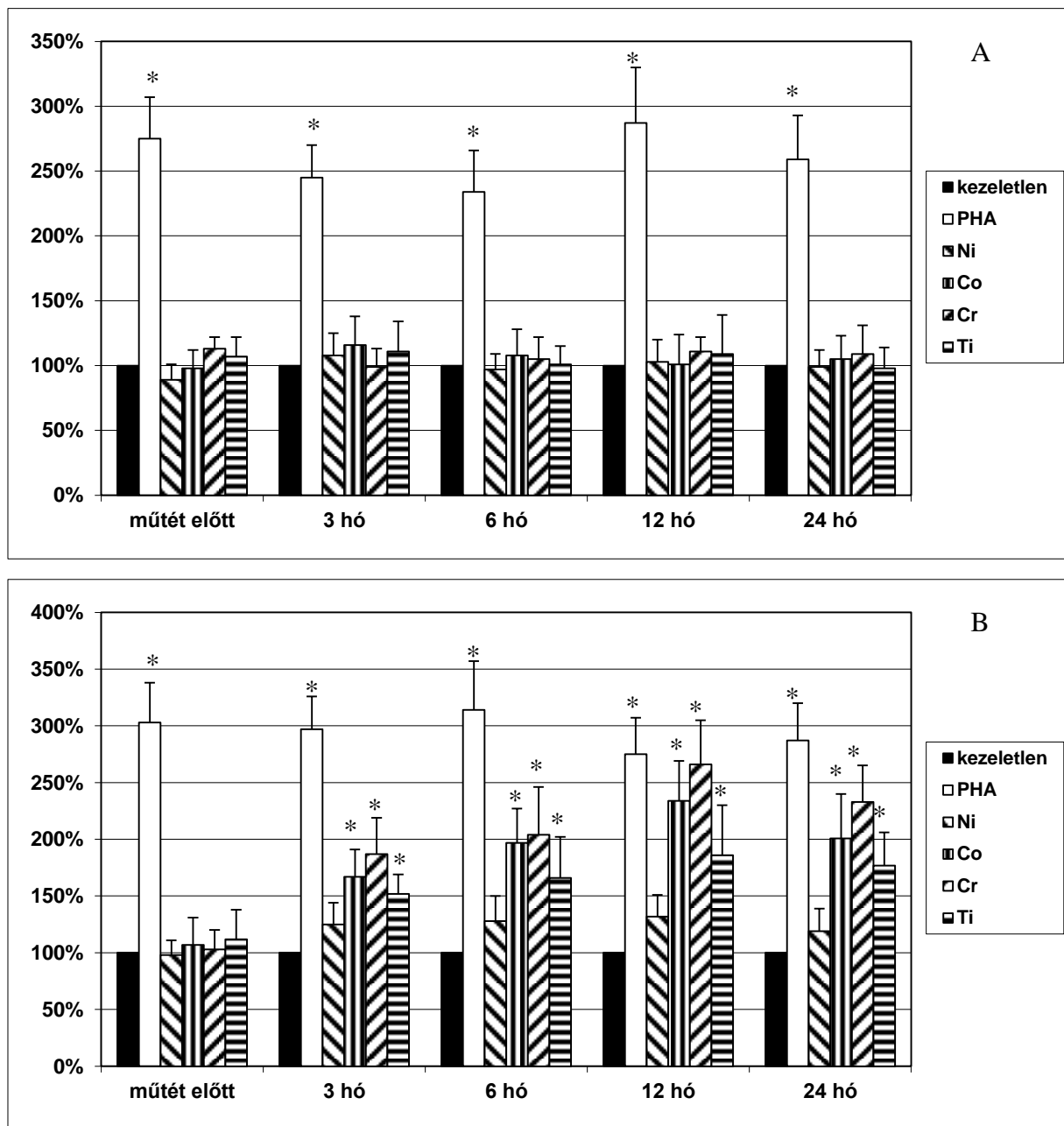
1. Ábra: Proliferációs vizsgálatok eredményei nem reaktív (Panel A) és reaktív (Panel B) esetekben. Látható, hogy a reaktív esetekben a posztoperatív időszakban szignifikáns ( $p < 0.05$ ) emelkedés volt megfigyelhető a betegek perifériás mononucleáris sejtjein, hasonlóan a pozitív kontrollhoz (PHA). A nem reaktív esetek értékei nem mutattak eltérést a nem implantált és bőr teszttel negatív esetek értékeitől. Az ismertén fémérzékeny, nem implantált esetek hasonló értékmegoszlást mutattak, mint a reaktív betegek.



### *Citokin termelés*

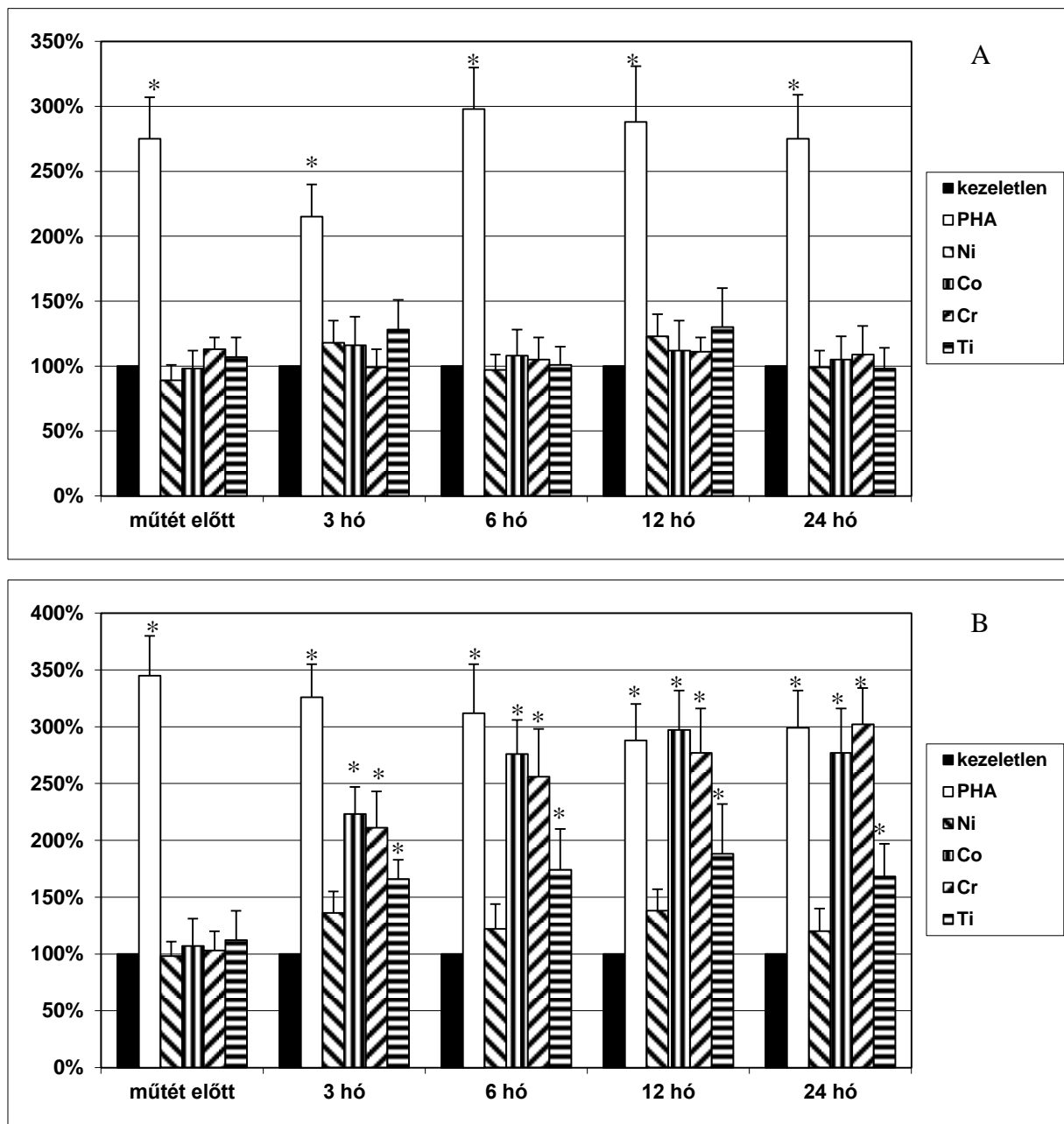
A pozitív kontrol PHA szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) fokozta a sejtek in vitro IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelését a vizsgálat során. Az 1-es beteg csoportban nem emelkedett a fenti citokinek termelése fémkezelés hatására. A 2-es betegcsoportban, ahol a betegek a Ti, Ni, Cr és Co fémekkel szembeni pozitív bőrpróba alapján kerültek kiválasztásra, mind a négy vizsgált fém szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) fokozta a sejtek IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelését. A 3-as csoportban a műtétet megelőzően a sejt kultúrák nem válaszoltak a fémion kezelésre. A műtétet követő 3. hónapban azonban a betegek 21% ( $n=8$ ) mutatott szignifikáns ( $p < 0,05$ ) stimulációt IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelés tekintetében a kezelések (fémek) hatására, a nikkelt volt a legkevésbé induktív (2. és 3. Ábrák). Még az alacsonyabb koncentrációban használt titán is stimuláló hatással bírt. A tanulmány 36. hónapos felülvizsgálatánál a 3-as csoporton belüli betegek 30%-a ( $n=12$ ) mutatott emelkedett IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelést a tesztelt fémek jelenlétében. Ismét, a paralel végzett kután bőrtesztek nem mutattak reakciót ezen betegekben sem.

2. Ábra



2. Ábra: Perifériás mononucleáris sejtek interferon-gamma termelésének eredményei nem reaktív (Panel A) és reaktív (Panel B) esetekben. Látható, hogy a reaktív esetekben a posztoperatív időszakban szignifikáns ( $p < 0.05$ ) emelkedés volt megfigyelhető a betegek perifériás mononucleáris sejtjein, hasonlóan a pozitív kontrollhoz (PHA). A nem reaktív esetek értékei nem mutattak eltérést a nem implantált és bőr tesztel negatív esetek értékeitől. Az ismertén fémérzékeny, nem implantált esetek hasonló értékmegoszlást mutattak, mint a reaktív betegek.

### 3. Ábra



3. Ábra: Perifériás mononucleáris sejtek tumor necrosis factor-alpha termelésének eredményei nem reaktív (Panel A) és reaktív (Panel B) esetekben. Látható, hogy a reaktív esetekben a posztoperatív időszakban szignifikáns ( $p < 0.05$ ) emelkedés volt megfigyelhető a betegek perifériás mononucleáris sejtein, hasonlóan a pozitív kontrollhoz (PHA). A nem reaktív esetek értékei nem mutattak eltérést a nem implantált és bőr teszttel negatív esetek értékeitől. Az ismertén fémérzékeny, nem implantált esetek hasonló értékmezősztést mutattak, mint a reaktív betegek.

### *Leukocita migráció gátlás*

Az egyes csoportban a fémek nem befolyásolták a leukocita migrációt. A 2-es csoportban szignifikáns ( $p < 0,05$ ) migráció gátlás lépett fel a használt fémek jelenlétében. A 3-as csoportban a műtétet megelőzően a betegek leukocytái nem reagáltak fém kezelésre, majd a műtétet követő 6. hónapban a betegek 16%-a ( $n=6$ ) mutatott migráció gátlást a fémek jelenlétében, mely a 36. hónapra 23%-a ( $n=9$ ) emelkedett. Ismét, a paralel végzett kután bőrtesztek nem mutattak reakciót ezen betegekből sem.

### *Az in vitro leukocita vizsgálatok összefoglalása*

A betegek leukocitáin végzett funkcionális vizsgálatok sejt szintű reaktivitást igazoltak protézis beültetést követően. A három különböző teszt azonban eltérő arányokban bizonyult pozitívnak a 3-as csoporton belül, mely időfüggést is mutatott. Összegezve, egy beteget akkor tekintettünk reaktívnak egy fémmel szemben, ha mind a három vizsgálat során szignifikáns ( $p < 0,05$ ) stimulációt találtunk. Ennek alapján, a 3-as csoportban 12% ( $n=5$ ) és 18% ( $n=7$ ) volt a tesztelt fémekkel szemben reaktív 6, illetve 36 hónappal a műtéti beavatkozás után. A betegek kezdeti 12%-a beletartozott a későbbi 18%-os csoportba és mindegyik beteg érzékenységet mutatott a Ti, Co és Cr irányába.

### *A beültetett protézisek klinikai funkciója*

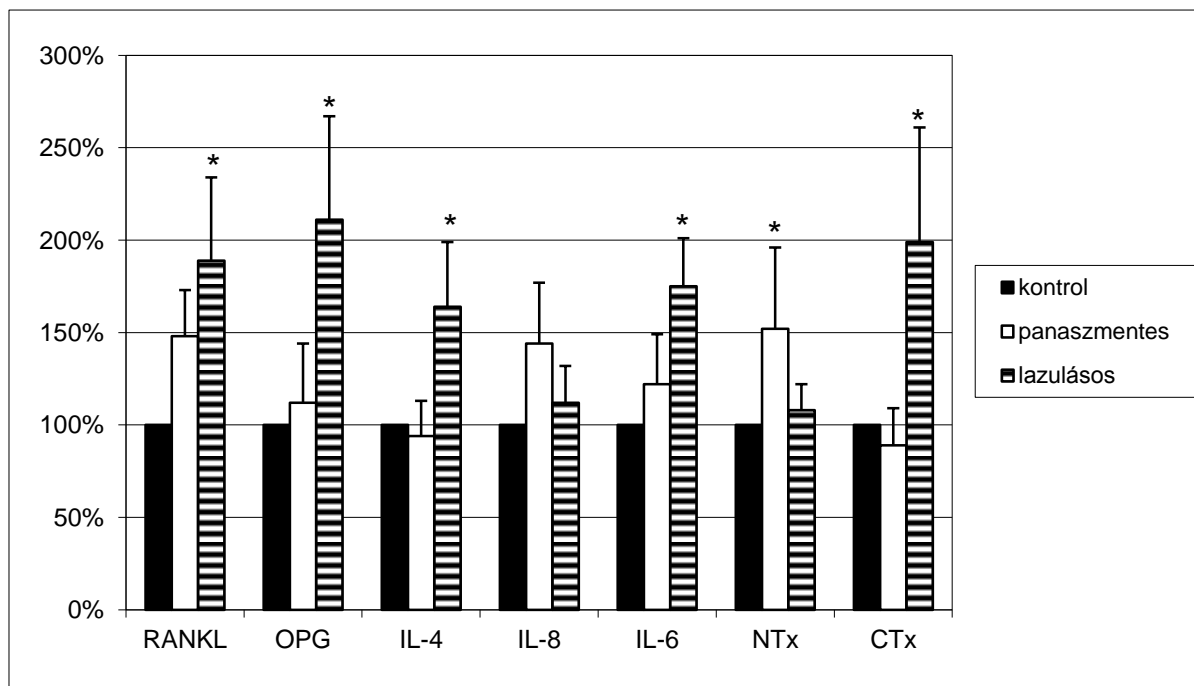
A tanulmány ideje alatt a beültetett protézisek funkciója minden betegnél kiváló volt (SF-36 és HHS) és érdemi radiológiai eltérést sem tapasztaltunk.

## Biomarker vizsgálatok

### A szérum és vizelet minták mérési eredményei

A mérési eredmények kimutatták, hogy a panaszos lazult csoportban szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) emelkedett volt a kontrol és a panaszmentes implantált csoporthoz képest a RANKL, OPG, IL-6, TNF- $\alpha$ , cathepsin-K, IL-4, CTx és Dpd szintje, utalva a steril gyulladás és csontvesztés meglétére, illetve detektálhatóságára (4. Ábra). Ezek azonban inkább a krónikus folyamatokra utalnak.

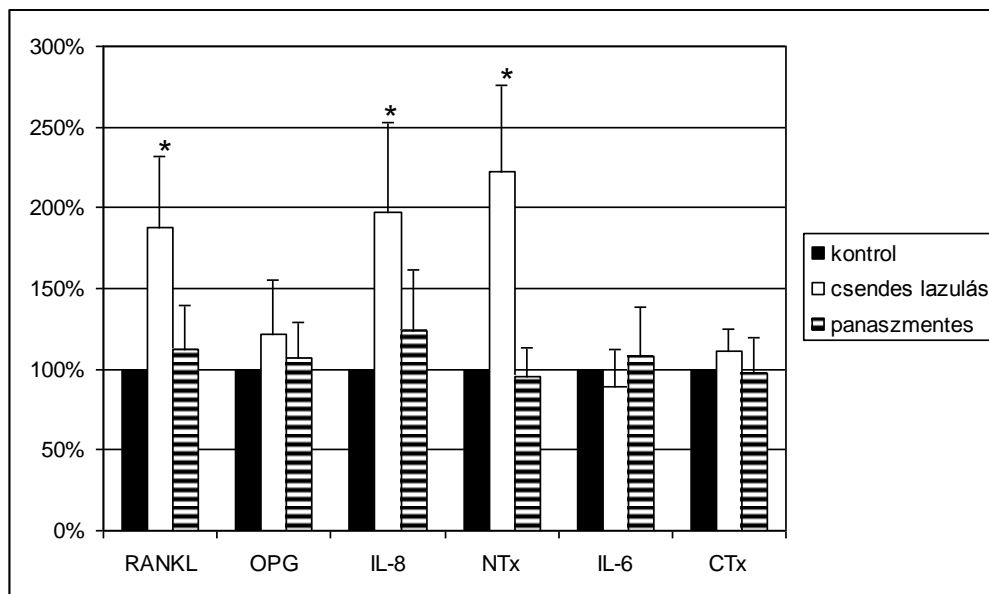
4. Ábra



4. Ábra: Szérum és vizelet markerek eltérései a kontrol, lazulásos és panaszmentes csoportban 48 hónap után. A jelen ábrán a receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), interleukin (IL)-4, IL-6, IL-8 és az I-es típusú kollagén cross-linkek C- és N-telopeptide (CTx és NTx) változásait mutatjuk. Jól látható, hogy a lazulásos csoportban a bemutatott változók közül az IL-8 és az NTx nem mutatott szignifikáns emelkedést. A panaszmentes csoportban több változó is emelkedett volt, de nem ért el szignifikáns értéket. A  $p < 0,05$  értéket vettük szignifikánsnak, az oszlopok csoport átlagokat mutatnak+SD.

A panaszmentes csoportban is észlelhető a betegek egy részénél szignifikáns ( $p < 0,05$ ) emelkedés az IL-8, RANKL és NTx szintekben a kontrollhoz képest. A többi vizsgált paraméter ebben a csoportban igen változó képet mutatott: a teljesen normál megjelenés volt a legjellemzőbb, de random jelleggel egy-egy komponens (többnyire IL-6, TNF- $\alpha$  és OPG) szignifikáns ( $p < 0,05$ ) emelkedését lehetett mérni, de ez alapján csoportosítást nem lehetett végezni. Ezek nem mutattak korrelációt az IL-8, RANKL és NTx emelkedéssel, ami viszont konzekvens volt az érintett betegekben, mely segítségével a 2-es csoportban egy alcsoport alakult ki ( $n=8$ , 27%), melyet „reaktív” névvel jellemeztünk. A csontmetabolizmus megváltozásának korai detektálhatósága miatt a RANKL/OPG hányadost is vizsgáltuk, mely további karakterisztikus trendet mutatott. Fontos, hogy a panaszmentes csoporton belül a „reaktív” eseteknél a RANKL/OPG hányados és az NTx növekszik, melyek korai fokozott oszteoklaszt aktivitásra utalnak, valamint az IL-8 jelzi a steril gyulladás lehetőségét is (5. Ábra).

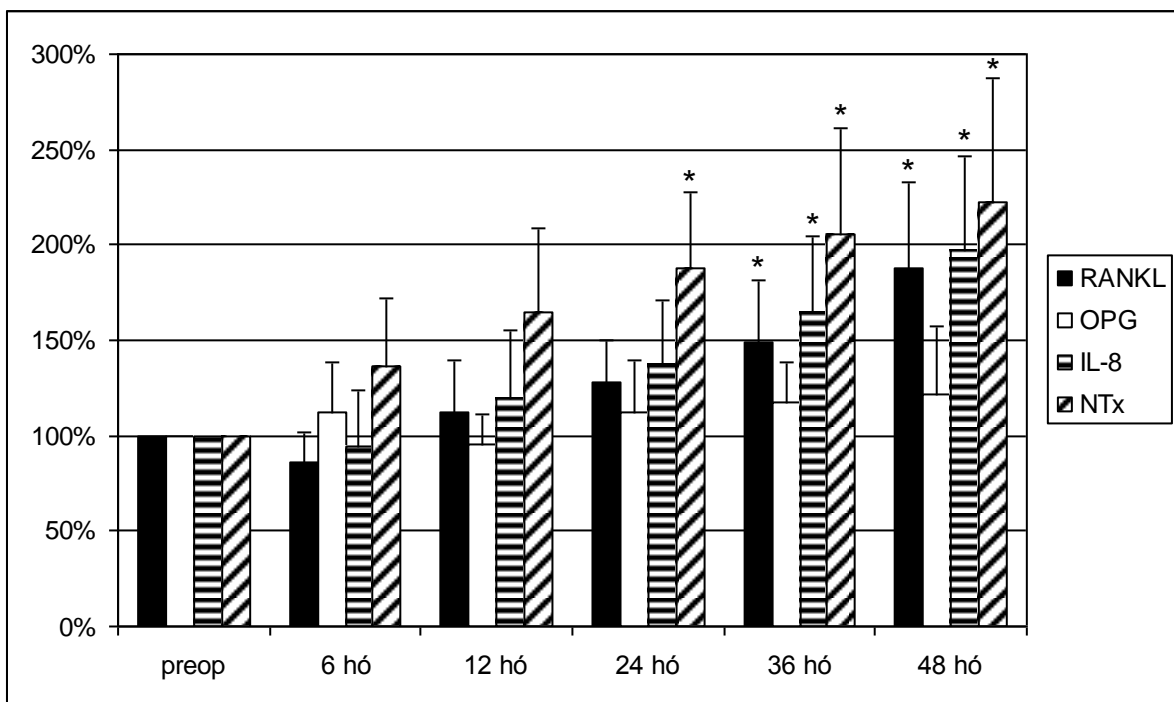
5. Ábra



5. Ábra: Az implantált, panaszmentes csoporton belüli értékmegoszlások 48 hónap után. A jelen ábrán a receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), interleukin (IL)-6, IL-8 és az I-es típusú kollagén C és N-telopeptide (CTx, NTx) változásait mutatjuk. A panaszmentes csoporton belül szignifikánsan emelkedett volt bizonyos egyéneknél konzekvensen a RANKL, IL-8 és NTx szintje („csendes lazulás”). Az OPG, IL-6 és CTx nem mutattak szignifikáns eltérést a csoport tagjaiban. A  $p < 0,05$  értéket vettük szignifikánsnak, az oszlopok csoport átlagokat mutatnak+SD.

Ezek az eltérések azonban a beültetést követő 36. hónaptól voltak szignifikánsan észlelhetőek és további emelkedést mutattak a 48 hónapos periódusnál, mind a növekedés mértékében, mind az esetek számában (6. Ábra). Érdekes, hogy a krónikusan lazult csoportban a RANKL/OPG hányados jelentősen csökken a nagyobb mértékben emelkedett OPG miatt, valamint megjelenik szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) emelkedett szinten az IL-4. Ezen változók antireszorptív hatással bírnak, ami kompenzáló mechanizmusnak lehet az eredménye. Eredményeink alapján jól látható az eltérő szérumszint és vizeletprofil a lazult panaszos csoport és a panaszmentes, de laboreltérést mutató „reaktív” esetek között.

6. Ábra



6. Ábra: A panaszmentes csoporton belüli reaktív betegek szérumszintje és vizeletmarkereinek változása a tanulmány során. Ezeknél a betegeknél a activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), interleukin (IL)-8 és az I-es típusú kollagén N-telopeptide (NTx) paraméterekben lehetett konzekvensen szignifikáns emelkedést mérni a 36 és 48 hónapos utánkövetéseknél. A  $p < 0,05$  értéket vettük szignifikánsnak, az oszlopok csoport átlagokat mutatnak+SD.

## MEGBESZÉLÉS

### *Fémérzékenységi vizsgálatok*

Korábbi nagy mintán végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a populáció 10-12%-a érzékeny különböző fémekkel szemben [22]. Az esetek egy részében már a műtéti beavatkozás előtt ismert a fémérzékenység, ilyenkor a megfelelő implantátum választása a megoldás [23]. A protézis komponenseket alkotó fémek iránti túlérzékenység azonban jelentősen befolyásolhatja az implantátum integrációját a csontban. Általánosságban elmondható, hogy protetikai műtéteket követően a keringő mononucleáris sejtek kapcsolatba kerülnek az implantátum anyagát képező fémekkel és bizonyos esetekben IV-es típusú túlérzékenységi reakció alakulhat ki. A sejt mediálta, késői típusú fémallergia lokálisan steril gyulladást indukálhat, mely ismert mechanizmusokon keresztül a periprotetikus csont felszívódásához és az implantátum lazulásához vezethet, illetve jelentősen hozzájárul a kopási törmelék hatásához [9, 24-26].

Jelenleg az epikután bőrpróba az elfogadott diagnosztikus teszt fémérzékenység vizsgálatára protetikai műtéti beavatkozásoknál. Azokban az esetekben, ahol a beteg még nem esett át fém beültetésével járó beavatkozáson, ott minden bizonnyal megfelelő információt szolgáltat a fémérzékenység meglétéről, illetve annak hiányáról. Más kérdés, hogy vajon adekvát vizsgálati módszer-e olyan esetekben, ahol a válaszreakció elemei a keringő mononucleáris sejtek, szemben a bőrpróbával. További kevésbé ismert probléma, hogy implantációt követően változhat-e az érzékenység bizonyos fémek tekintetében [9].

Jelen tanulmányunk eredményei megmutatták, hogy a korábban meghatározott és itt is használt vizsgálati módszereink alkalmasak az általános fémérzékenység vizsgálatára hasonlóan az epikután teszthez. Az általunk alkalmazott technika viszont specifikusabb és érzékenyebb a bőrtesztnél az implantátum indukálta fémek iránti reakció vizsgálatára, mivel



több évvel a beültetést követően ez a módszer alkalmas volt detektálni fémek iránti érzékenységet az esetek 18%-ában, míg a bőrpróba negatívnak bizonyult. Ehhez hasonló megfigyelést a nemzetközi irodalomban is ritkán találunk, mivel vagy a hagyományos bőrtesztet alkalmazták ennek vizsgálatára, illetve nem prospektív tanulmányok voltak [9, 26, 27].

Epikután próbával 20% körülnek találták korábban a nemzetközi tanulmányok csípőprotézis beültetést követően jelentkező fémérzékenységet jól funkcionáló implantátumok mellett [2, 28-30]. Hazai vizsgálatok is alátámasztották ezt [31], ahol műtétet megelőzően 10% körüli volt a betegek fémérzékenysége, ami a beültetést követő átlag 35 hónappal 20% körüli emelkedett. A leukocita funkcionális tesztek kidolgozásával lehetőség nyílt egy új irányból vizsgálni az implantátum anyag kiváltotta fémek iránti esetleges érzékenységet. Több tanulmány vizsgálta a fenti problémát és 30-35% közöttinek találták a tesztelt fémek iránti reaktivitást [26, 32]. Megjegyzendő, hogy ezen közlemények során többnyire egy típusú leukocita funkcionális tesztet alkalmaztak a szerzők, illetve az utánkövetési idő is jelentősen hosszabb volt. Jelen tanulmány során csak azon betegek minősültek reaktívnek fémekkel szemben 36 hónapot követően (18%), ahol mind a három leukocita teszt (négy vizsgált paraméter) pozitív volt. Ez nyilván szűkíti az érintettek körét, de mivel szigorúbb feltételeket teremt, így a megbízhatósága is magasabb. Fontos hangsúlyozni, hogy a paralel végzett epikután próba negatív volt az implantált csoportban az összes fém tekintetében mindegyik utánkövetésnél.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a betegek perifériás mononukleáris sejtjein végzett funkcionális tesztek alkalmasak lehetnek az implantátum beültetése előtti, illetve az azt követő, fém indukálta reaktivitás, illetve fémérzékenység vizsgálatára. Eredményeink kimutatták továbbá, hogy az implantátum beültetésen átesett betegek nagy százaléka érzékennyé válik bizonyos fémek iránt, ami valószínű, hogy az expozíciós idő növekedésével

emelkedni fog. Ez jelenleg előre nem látható módon történik, de további vizsgálatok alapján lehetőség nyílik még a beültetés előtt megállapítani fogékonyságot a fenti jelenségre. Jelen módszerünk alkalmasnak tűnik protetizált betegek szűrésére fémérzékenység tekintetében, ami lehetőséget biztosít a korai prevencióra, ha szükséges. Igazán jelentősége akkor lesz ennek a lehetséges szűrőrendszernek, ha hosszabb távú vizsgálatoknál bebizonyosodik, hogy az érintett, jelenleg 18% arányú betegcsoportban szignifikánsan hamarabb találunk problémát a beültetett implantátum funkciójában.

### *Biomarker vizsgálatok*

A beültetett ortopédiai implantátumok okozta biológiai válaszreakciók folyamatos követése nem megoldott kérdés. A protézis komponensek okozta reaktivitás befolyásolja annak biokompatibilitását, végső soron meghatározza az integritását a befogadó szövetben. A jelenleg használt implantátumoknál minden esetben számítani lehet erre. Az integritás elvesztése implantátum lazuláshoz vezet, amit az esetek jelentős részében akkor ismerünk fel, mikor annak már fizikális és RTG jelei vannak. Ebben a stádiumban azonban a folyamat nem visszafordítható, az implantátum cseréje szükséges [33].

A fenti probléma miatt igen nagy jelentőségű az aszeptikus lazulás korai diagnosztikája. Ebben a témakörben két nagy trendet lehet elkülöníteni. Az egyik esetében képalkotókkal próbálják felfedni a periprotetikus csont állapotát [34]. A másikonál különböző laboratóriumi módszerekkel igyekeznek markereket találni, melyek tükrözik a periprotetikus térben lejátszódó folyamatokat [35]. A korrekt képalkotás esetében számos probléma merül fel. Az utóbbi időben röntgen (DEXA, CT) és MRI alapú vizsgálatokat teszteltek, ahol jelentős a sugárterhelés, a protézis komponensekből származó műtermék nehezíti a korrekt térbeli volumetrikus analízist, mely a periprotetikus tér csont vagy képi denzitásán alapul. Könnyen belátható az objektívitas meghatározásának nehézsége (pl. oszteolízisről, vagy csak

csökkent denzitásról beszélünk) [36]. A laborvizsgálatoknál is több kérdés merül fel. Mik azok a paraméterek, melyek adhatnak megbízható eltérést, mennyire nagy az individuális szórás, egyéb folyamatok is befolyásolják a vizsgált változókat, illetve a lokális folyamatról, vagy egyéb generalizált problémáról kapunk e képet [37]. Egy további probléma a korai diagnosztikával, hogy igen hosszú távú prospektív tanulmányok tudnak csak választ adni arra, hogy az időben mért labor elváltozások, majd az évekkel későbbi implantátum lazulással még mindig összefüggésben lesznek e. Jelen vizsgálatnak is abban várható a jelentősége, ha bebizonyosodik, hogy a reaktív csoportban az implantátumok funkciójában hamarabb áll be jelentős funkcióvesztés, mint a többi esetben.

Az eredmények alapján panaszmentes betegeknél az aszeptikus lazulás korai jellemzője lehet a RANKL/OPG arány, az NTx és az IL-8 szintek szignifikáns emelkedése. Ezek a változók a klinikailag lazult eseteknél megszűnnek, illetve kiegészülnek számos másikkal melyek változása szintén jól detektálható és a reaktív csoportra nem jellemzőek. Az implantált populációban kiemelkedő fontossággal bír a reaktivitás detektálása olyan módszerrel, mely rutinszerűen végezhető, minden beteg rendelkezésére áll és minimálisan invazív. A kiszűrt betegeken tervezhető az antireszorptív prevenció és/vagy terápia, mellyel az implantátum csere is megelőzhető. Természetesen a jelenleg kísérleti stádiumban lévő tanulmányhoz számos vizsgálat szükséges, hogy a fenti előnyök a klinikai gyakorlatban is felhasználhatóak legyenek.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

1. Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, Hallab NJ, Glant TT (2001) Osteolysis: Basic Science. Clin Orthop 393:71-77
2. Hallab NJ, Merritt K, Jacobs JJ (2001) Metal sensitivity in patients with orthopedic implants. J Bone Joint Surg Am 83-A:428-436
3. Hallab NJ, Mikecz K, Jacobs JJ (2000) A triple assay technique for the evaluation of metal-induced, delayed-type hypersensitivity responses in patients with or receiving total joint arthroplasty. J Biomed Mater Res 53:480-489

4. Park YS, Moon YW, Lim SJ, Yang JM, Ahn G, Choi YL (2005) Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery Am* 87:1515-1521
5. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, Lohmann CH (2005) Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *Journal of Bone and Joint Surgery Am* 87:28-36
6. Thyssen JP, Jakobsen SS, Engkilde K, Johansen JD, Soballe K, Menne T (2009) The association between metal allergy, total hip arthroplasty, and revision. *Acta Orthop* 80:646-652
7. Hallab N, Jacobs JJ, Black J (2000) Hypersensitivity to metallic biomaterials: a review of leukocyte migration inhibition assays. *Biomaterials* 21:1301-1314
8. Hallab NJ, Mikecz K, Vermes C, Skipor A, Jacobs JJ (2001) Differential lymphocyte reactivity to serum-derived metal-protein complexes produced from cobalt-based and titanium-based implant alloy degradation. *J Biomed Mater Res* 56:427-436
9. Thomas P, Braathen LR, Dorig M, Aubock J, Nestle F, Werfel T, Willert HG (2009) Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy* 64:1157-1165
10. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ (1998) A prospective, controlled, longitudinal study of metal release in patients undergoing primary total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 80-A:1444-1458
11. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, Galante JO (1998) Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 80-A:1447-1458
12. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M (2000) Dissemination of wear particles to the liver, spleen and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg Am* 82-A:457-477
13. Jacobs JJ, Urban RM, Glant TT, Galante JO (1995) Clinical implications of osteolysis. in: *Total Hip Revision Surgery*: 81-90
14. Archibeck MJ, Jacobs JJ, Roebuck KA, Glant TT (2000) The basic science of periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 82-A:1478-1489
15. Vermes C, Glant TT, Hallab NJ, Fritz EA, Roebuck KA, Jacobs JJ (2001) The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: Review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors. *J Arthroplasty* 16:95-100
16. Gruen TA, McNeice GM, Amstutz HC (1979) "Modes of Failure" of cemented stem-type femoral components. *Clin Orthop* 17-27

17. Johnston RC, Fitzgerald RH, Harris WH, Müller ME, Sledge CB (1990) Clinical and radiographic evaluation of total hip replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery Am* 72:161-168
18. Hallab NJ, Anderson S, Stafford T, Glant TT, Jacobs JJ (2005) Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 23:384-391
19. Bohm I, Brody M, Bauer R (1997) Comparison of personal history with patch test results in metal allergy. *J Dermatol* 24:510-513
20. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT (2001) The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *Journal of Bone and Joint Surgery Am* 83:201-211
21. Qureshi AA, Viridi AS, DiDonna ML, Jacobs JJ, Masuda K, Paprosky WG, Thonar EJMA, Sumner DR (2002) Implant design affects markers of bone resorption and formation in total hip replacement. *J Bone Miner Res* 17:800-807
22. Thyssen JP, Menne T (2010) Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 23:309-318
23. Szebeny M, Sárváry A (2001) Térdprotézis beültetés súlyos krómérzékenység mellett. *Magyar Traumatológia, Ortopédia Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* 44:62-65
24. Caicedo MS, Pennekamp PH, McAllister K, Jacobs JJ, Hallab NJ (2010) Soluble ions more than particulate cobalt-alloy implant debris induce monocyte costimulatory molecule expression and release of proinflammatory cytokines critical to metal-induced lymphocyte reactivity. *J Biomed Mater Res A* 93:1312-1321
25. Hallab NJ, Caicedo M, Finnegan A, Jacobs JJ (2008) Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Surg Res* 3:6-17
26. Hallab NJ, Caicedo M, Epstein R, McAllister K, Jacobs JJ (2010) In vitro reactivity to implant metals demonstrates a person-dependent association with both T-cell and B-cell activation. *J Biomed Mater Res A* 92:667-682
27. Thyssen JP, Johansen JD, Menne T, Liden C, Bruze M, White IR (2010) Hypersensitivity reactions from metallic implants: a future challenge that needs to be addressed. *Br J Dermatol* 162:235-236
28. Deutman R, Mulder TJ, Brian R, Nater JP (1977) Metal sensitivity before and after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 59:862-865
29. Elves MW, Wilson JN, Scales JT, Kemp HB (1975) Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements. *Br Med J* 4:376-378
30. Rooker GD, Wilkinson JD (1980) Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement. A prospective study. *J Bone Joint Surg Br* 62-B:502-505
31. Gréczy I, Czakó J, Ócsai H, Török L (1995) Fémallergia vizsgálata csípőprotézis műtétén átesett betegeken. *Magyar Traumatológia, Ortopédia Kézsebészet és Plasztikai Sebészet* 38:215-218

32. Merritt K, Rodrigo JJ (1996) Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin Orthop Relat Res* 71-79
33. Hirakawa K, Jacobs JJ, Urban R, Saito T (2004) Mechanisms of failure of total hip replacements: lessons learned from retrieval studies. *Clin Orthop Relat Res* 10-17
34. Schwarz EM, Campbell D, Totterman S, Boyd A, O'Keefe RJ, Looney RJ (2003) Use of volumetric computerized tomography as a primary outcome measure to evaluate drug efficacy in the prevention of peri-prosthetic osteolysis: a 1-year clinical pilot of etanercept vs. placebo. *J Orthop Res* 21:1049-1055
35. Streich NA, Gotterbarm T, Jung M, Schneider U, Heisel C (2009) Biochemical markers of bone turnover in aseptic loosening in hip arthroplasty. *Int Orthop* 33:77-82
36. Walde TA, Weiland DE, Leung SB, Kitamura N, Sychterz CJ, Engh CA, Jr., Claus AM, Potter HG, Engh CA, Sr. (2005) Comparison of CT, MRI, and radiographs in assessing pelvic osteolysis: a cadaveric study. *Clin Orthop Relat Res* 138-144
37. Wilkinson JM, Hamer AJ, Rogers A, Stockley I, Eastell R (2003) Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in aseptic loosening after total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 21:691-696