

Kulumapartikkelit säätelevät Tollin kaltaisten reseptoreiden määrää peri-implanttikudoksissa

Jukka Pajarinen¹, Zygmunt Mackiewicz^{2,3}, Raimo Pöllänen^{1,2}, Michiaki Takagi⁴, Noah J. Epstein⁵, Ting Ma⁵, Stuart B. Goodman⁵, Yrjö T. Konttinen^{1,2,6}

¹ Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY

² Sairaala ORTON

³ Vilnius University Institute of Experimental and Clinical Medicine, Lithuania

⁴ Department of Orthopaedic Surgery, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan

⁵ Department of Orthopaedic Surgery, Stanford University, Stanford, CA, USA

^{1,2,6} Tekonivelsairaala COXA

Bacterial remnants and subclinical biofilms residing on prosthesis surfaces have been speculated to play a role in hip implant loosening by opsonizing otherwise relatively inert wear particles. It has been suggested that these opsonized wear particles are in the peri-implant tissues recognized by Toll-like receptors of the innate immunity. Thus, the effect of titanium (Ti) wear particles on TLR protein levels was evaluated. To create a model of wear particle induced inflammation, an intramedullary stainless steel rod with and without Ti particles was bilaterally placed in the femora of 14 mice. The animals were euthanized at 2 or 10 weeks postoperatively and paraffin-embedded femur sections were evaluated for TLR1, 2, 4, 5, 8 and 9 proteins using immunohistochemistry. Decrease in the number of TLR immunoreactive cells was observed between weeks 2 and 10 in both settings. Furthermore in the presence of Ti particles, the numbers of TLR immunoreactive cells were lower than in the presence of rod only at both time points, suggesting down regulation of TLR expression by Ti-particles per se. Accordingly, in a short-term 24 hour stimulation, down regulation of TLR4 mRNA ($P < 0.02$) was observed in vitro in RAW 264.7 cells challenged with Ti particles. Results suggest that after an initial inflammatory stage, TLRs are down regulated in response to Ti particles, possibly to inhibit excessive inflammation, although TLR down regulation might at the same time render tissues more susceptible to pathogens.

Lonkan keidonivelen aseptiseksi irtoamiseksi kutsutaan tapahtumasarjaa, jossa proteesia aiemmin tiiviisti ympäröinyt luu yllättäen sulaa pois 10–15 vuotta keidonivelen asennuksesta ilman ilmeistä bakteeri-infektiota. Invalidisoivan lonkan seudun kivun vuoksi ajaututaan teknisesti haastaviin ja kalliisiin revisioleikkauksiin.

Laajalti on hyväksytty, että aseptinen irtoaminen on yhteydessä proteesista kulumien vuoksi vuosien kuluessa irtoaviin, noin yhden mikrometrin kokoi- siin ja tyypillisesti polyetyleenistä tai titaaniyhdisteistä koostuviin partikkeleihin (1). Implantin ympärille muodostuvassa ja luun korvaavassa valenivelkapselissa nähdään makrofagivaltainen tulehdusreaktio ja perinteisesti kulumapartikkeleiden aikaansaama makrofagikiaktivaatiota onkin pidetty keskeisenä aseptisen irtoamisen patogeenisissä: aktivoituneet makrofagit tuottavat erilaisia tulehdusvälittäjiä, jotka lopulta johtavat lisääntyneeseen osteoklastogeneesiin sekä viime- kädessä proteesin irtoamiseen (2,3).

Tarkat molekyyllitason mekanismit, joilla makro- fagit kulumapartikkeleita tunnistavat ja näiden kans- sa vuorovaikuttavat ovat kuitenkin huonosti tunnetut. Jonkin verran näyttöä on kerääntynyt siitä, että ku- lumapartikkelit sinänsä ovat vain vähän makrofageja aktivoivia ja että partikkelit itse asiassa toimivat laajan pinta-alan omaavina alustoina, joihin hematogeenises- ti paikalle pääsevät bakteerien hydrofobiset rakenne- osat (esimerkiksi lipopolysakkaridi, LPS) tai baktee- ribiofilmit kiinnittyvät (4–6).

Hiljattain olemme esittäneet, että makrofagien Tollin kaltaiset –reseptorit (TLR), tunnistavat näitä bakteerituotteiden verhoamia kulumapartikkeleita ja välittävät partikkeleiden aikaansaamaa makrofagiak- tivaatiota (7,8). TLR:t ovat perhe muodontunnistus- reseptoreita, joiden avulla luonnollinen immunitaetti tunnistaa erilaisia keskeisiä bakteeri-, virus- ja sienipe- räisiä rakennemolekyylejä (9). TLR aktivaatio aikaan- saa laaja-alaisen tulehdusvasteen, jonka seurauksena sekä luonnollinen että adaptiivinen immunitaetti ak- tivoituvat (10). Tulostemme mukaan TLR:iä ilmenne- tään laajalti valenivelkapselissa, etenkin sen makrofa- geissa, ja että valenivelkapseli on potentiaalisesti hyvin reaktiivista mille tahansa läsnä olevalle TLR ligandil- le.

Tämän vuoksi olimme kiinnostuneita selvittä- mään, miten kulumapartikkelit vaikuttavat peri-imp- lanttikudoksen TLR-tasoihin. Tutkimuksessa käytim- me partikkelitulehduksen eläinmallia. Partikkeleiden aikaansaamia suoria solutason TLR muutoksia selvi-

timme edelleen stimuloimalla hiiren makrofageja ku- lumapartikkeleilla in vitro.

Menetelmät

Koeasetelma

Neljälletoista hiirelle asetettiin kummankin femurin ydinonteloon ruostumattomasta teräksestä valmis- tettu K-piikki. Toisen puolen femurin ydinkanavaan ruiskutettiin lisäksi titaani- partikkeleita partikkelitu- lehduksen aikaansaamiseksi kun taas kontrollipuolel- le ruiskutettiin vain partikkeleiden kantajaliuosta. 2 ja 10 viikkoa toimenpiteestä, seitsemän hiirtä kumpana- kin aikapisteinä, uhrattiin ja K-piikkiä, partikkeleiden kanssa tai ilman, ympäröivä TLR profiili tutkittiin im- munohistokemiallisen menetelmän. Välittömien solu- tason muutosten selvittämiseksi, hiiren viljeltyä mak- rofagisolulinjaa stimuloitiin titaani- partikkeleilla ja stimulaation vaikutukset TLR lähetti-RNA tasoihin analysoitiin eri aikapisteiden kuluttua kvantitatiivisel- la PCR:llä.

Titaani- partikkelit

Kulumapartikkelimallina in vivo ja in vitro kokeis- sa käytettiin Alfa Aesarin titaani- partikkeleita, joi- den keskimääräinen koko ($3.7 \pm 1.8 \mu\text{m}$) määritet- tiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla. Ennen kokeita partikkelit pestiin toistetulla 25% typpihappo, 95% etanoli- 0,1M NaOH käsittelyllä endotoksiinien pois- tamiseksi ja käsittelyiden jälkeen partikkeleiden endo- toksiinipitoisuudeksi mitattiin vähemmän kuin 0.125 EU/ml Limulus -menetelmällä.

Eläinmalli

Partikkelitulehduksen eläinmallina käytettiin villi-tyy- pin 12-14 viikkoa vanhoja uros C57BL/6 hiiriä, joi- ta käsiteltiin tavanomaisen eettisen ohjeiston mukaan. Hiiret nukutettiin intraperitonealisella ketamiini- xylazine injeksiolla, jonka jälkeen suoritettiin kum- mankin polven mediaalinen parapatellaarinen artro- tomia. Femurin distaalipään paljastettiin siirtämällä quadriceps-patella kompleksia lateraalisesti, intercon- dylaari fossa läpäistiin 27g neulalla ja edelleen ydin- ontelo riimattiin edelleen 25g neulalla. Tämän jälkeen $1,39 \times 10^8$ titaani- partikkeliä 0,1ml kantajaliuokses- sa (Hyoluronaatti-PBS) ruiskutettiin oikean femurin ydinkanavaan kun taas vasempaan ruikutettiin vain kantajaliuosta. Lopuksi 10mm mittainen 25g puhdis- tettu ja autoklavoitu K-piikki asennettiin kummankin femurin ydinonteloon. Seitsemän hiirtä uhrattiin kah-

den ja seitsemän kymmenen viikon kuluttua toimenpiteestä immunohistokemiallisia analyysejä varten.

Immunohistopatologia

Hiiren puhdistetut femurit fiksoitiin 10 % formaliinilla, dekalsoifioitiin 23% muurahaishapolla ja pedattiin parafiinilla. Näyteblokeista valmistettiin 5 µm leikkeitä, jotka deparafinisoitiin ja rehydroitiin. Antigeenit paljastettiin käyttäen 10 mM sitraattipuskuria, pH 6.0, Milostone Mega T/T mikroaaltouunissa, 98 °C:ssa, 24 minuutin ajan. Tollin kaltaiset reseptorit värjättiin käsin; Ensin endogeeninen peroksidaasi salvattiin käyttäen 0,3% H₂O₂-Metanolia ja epäspesifistä värjäytymistä vähennettiin inkubaatiolla 10% vuohen normaaliseerumissa. Primaari vasta-ainenkubaatio tehtiin yli yön 4 °C ja sekundaarivasta-ainenkubaatio 1h huoneenlämmössä. Antigeeni-vastaainereaktio visualisoitiin käyttäen avidiini-biotiini-peroksidaasi-kompleksimetodia. Vastavärjäys tehtiin hematoksyliinillä. Jokaisen askelen välissä leikkeet pestiin fysiologisella puskuroidulla keittosuolalla. Käytämme primaarivasta-aineet olivat jäniksen anti-humaaneja polyklonaalisia IgG vasta-aineita TLR1 (0.5 µg/mL), TLR2 (1.3 µg/mL), TLR4 (1.3 µg/mL), TLR5 (1.3 µg/mL), TLR8 (1.3 µg/mL) tai TLR9 (0.5 µg/mL) vastaan. Värjäytyneiden solujen määrä arvioitiin asteikoilla: ei positiivisia soluja (-); satunnaisia positiivisia soluja (±); joitain positiivisia soluja (+); runsaasti positiivisia soluja (++) ja suuri määrä positiivisia soluja (+++).

Soluviljely ja partikkelistimulaatio

Hiiren RAW 264.7 monosyytti/makrofagi-linjan soluja viljeltiin +37 °C:ssa, korkean glukoosin DMEM soluviljelymediassa, 10% FCS:n sekä 1% antibiootien kanssa. Partikkelistimulaatioita varten solut irrotettiin rappaamalla ja siirrettiin kuusikuoppalevyihin, 2x10⁵ solua/kuoppa 2ml:n mediassa. 1-2h kiinnitymisajan jälkeen solut huuhdeltiin ja niihin lisättiin ~1x10⁷ titaanipartikkeliä, vastaten noin 100 partikkelia/solu. Kontrollisolut viljeltiin samaan aikaan ilman partikkeleita.

qRT-PCR

RAW 264.7 monosyytti/makrofagi-linjan solujen annettiin fagosytoida partikkeleita 0, 2, 6, 10 ja 24 tuntia, jonka jälkeen kunkin kuopan solut pestiin useita kertoja fysiologisella puskuroidulla keittosuolalla ja käsiteltiin totaali RNA:n eristämiseksi Trizoll-reagentilla. Saadut RNA pitoisuudet mitattiin spektrofotometrial-

la (260/280nm) ja käsiteltiin DNAasilla mahdollisen DNA kontaminaation poistamiseksi. Komplementaarinen DNA (cDNA) tuotettiin käyttäen kaupallista VILO Superscript cDNA synthesis pakettia ja 1µg soluista eristettyä totaali RNA:ta. Hiiren eri TLR ja β-aktiini koettimet suunniteltiin käyttäen Primer3, NCBI blast ja OligoCalc hakukoneita ja ne tilattiin Proligolta. Kvantitatiivinen PCR suoritettiin käyttäen Bio-Radin IQ5-järjestelmää ja -ohjelmistoa. Kunkin aikapisteen cDNA monistettiin PCR tekniikalla käyttäen sense ja antisense koettimia sekä iQ SYBR Green I Supermixiä. Kvantitointi tehtiin vertaamalla PCR tuotteen fluoresenssia kunkin TLR:n standardin laimennossarjaan. Hiiren β-aktiinia käytettiin taloudenpitogeeninä PCR analyyseissä.

Tilastoanalyysi

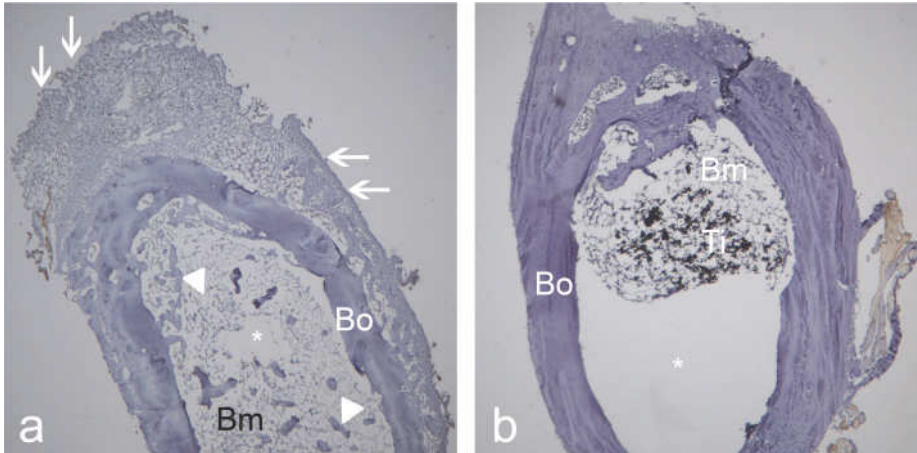
Kvantitatiivisen PCR:n tulokset on esitetty aritmeettisena keskiarvoina sekä standardi deviaatioina. Tulosten normalisuus testattiin Shapiro-Wilk kokeella ja niiden analysointiin käytettiin Studentin t-testiä sekä Mann-Whitney U testiä. Todennäköisyyksiä p < 0,05 pidettiin merkitsevinä.

Tulokset

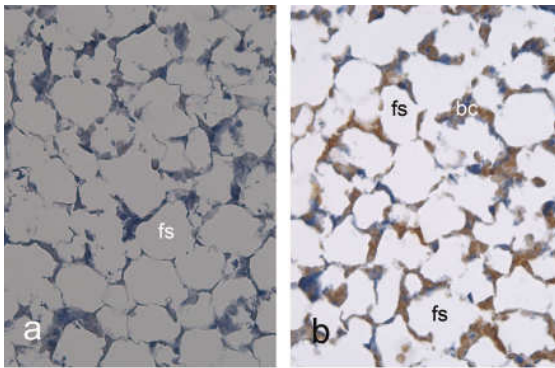
Femurnäytteiden histologia ja immunohistopatologia

Postoperatiivista luun uudelleenmuokkausta ja kallusmuodostusta oli nähtävissä kahden viikon kohdalla kerätyissä näytteissä (kuva 1, paneli A) kun taas kymmenen viikon kohdalla implantaatiosta kallus oli tiivistynyt kortikaaliluuksi (kuva 1, paneli B). K-piikin jälkensä jättämää ydinkanavaa ympäröi fibroottinen kerros, jossa oli nähtävissä tulehdussoluja, ja edelleen hohkaluu, joka usein oli järjestäytynyt säteittäisiksi palkeiksi. Luuytimen makrofageissa oli nähtävissä runsaasti fagosytoituja partikkeleita partikkeliryhmässä (kuva 3, panelit C ja D).

Tiivistelmä TLR värjäystuloksista esitetään taulukossa 1. TLR1 ja TLR5 positiivisten solujen lukumäärä peri-implanttikudoksissa oli suurin (kuva 2, panelit B-D, kuva 3 panelit, A-C) ja TLR9 positiivisten pienin (kuva 2, paneli E, kuva 4 panelit D ja E) Merkillepantavasti TLR positiivisten solujen lukumäärä oli kokonaisuutena suurempi a) kahden viikon kuin kymmenen viikon kohdalla (Vertaa kuva 2, panelit B-F sekä kuva 3 panelit A-F) ja b) suurempi ilman partikkeleita olleessa femurissa kuin partikkeleiden kanssa (kuva 2,



< Kuva 1.



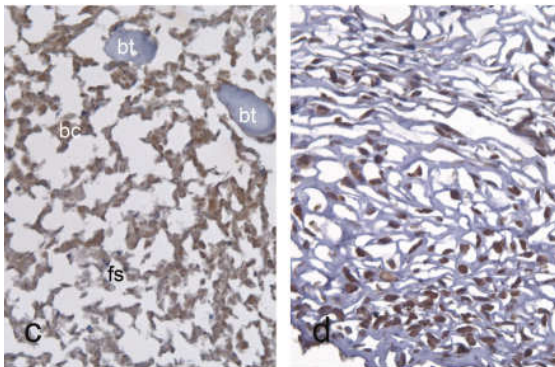
Kuva 1. Luun muokkaus K-piikin ja partikkeleiden implantaation jälkeen.

A- Vain K-piikki, 2 viikkoa toimenpiteestä. Nähtävissä laajaa kallusmuodustusta femurin ulkopinnalla (pitkän nuolet). Hohkaluu ja ohut fibroottinen sidekudoskerros ympäröi riimattua ydinkanavaa, josta K-piikki on poistettu.

B- K-piikki ja partikkelit, 10 viikkoa toimenpiteestä. Kallus on kypsynyt osaksi femurin kortikaalista luuta. Runsaasti titaani-partikkeleita on nähtävissä ydinkanavassa.

Hematoxyleeni värjäys. Alkuperäinen suurennos 40x.

Lyhenteet: Bo – tiivistä luuta, Bm – luuydintä, - Ti- titaani-partikkeleja. Asteriski osoittaa poistetun K-piikin paikan.



Kuva 2. Tollin kaltaisten reseptoreiden ilmeneminen hiiren femurissa 2 viikon kohdalla

A- Negatiivinen värjäyskontrolli, luuydintä

B- TLR1, luuydintä, vain K-piikki

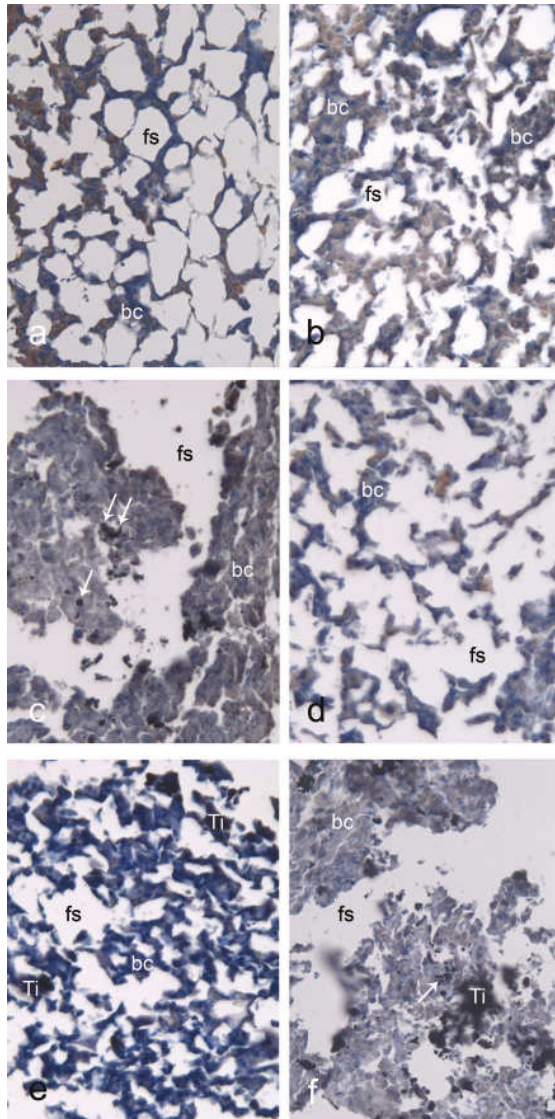
C- TLR5, luuydintä, K-piikki + partikkelit

D- TLR5, periosteali kallusta, K-piikki + partikkelit

E- TLR9, luuydintä, vain K-piikki

F- TLR2, luuydintä, K-piikki + partikkelit

Immunohistokemiallinen värjäys, vastavärjäys hematoxyliinillä. Alkuperäinen suurennos 400x. Lyhenteet: bc – luuytimen hematopoieettista solukkoa, bt – luutrabekkeleita, fs- rasvatilaa, fi – fibriniä, Ti- titaani-partikkeleita.



Kuva 3. Tollin kaltaisten reseptoreiden ilmeneminen hiiren femurissa 10 viikon kohdalla.

- A- TLR1, luuydintä, vain K-piikki
 B- TLR5, luuydintä, vain K-piikki
 C- TLR5, luuydintä, K-piikki + partikkelit
 D- TLR9, luuydintä, vain K-piikki
 E- TLR9, luuydintä, K-piikki + partikkelit
 F- TLR2, luuydintä, K-piikki + partikkelit

Immunohistokemiallinen värjäys, vastavärjäys hematoxyliinillä. Alkuperäinen suurennos 400x. Lyhenteet: bc – luuytimen hematopoeetista solukkoa, fs- rasvatilaa, Ti- titaaniartikkeleita, nuolet – fagosytoituja titaaniartikkeleita.

paneli F; kuva 3, panelit B-E).

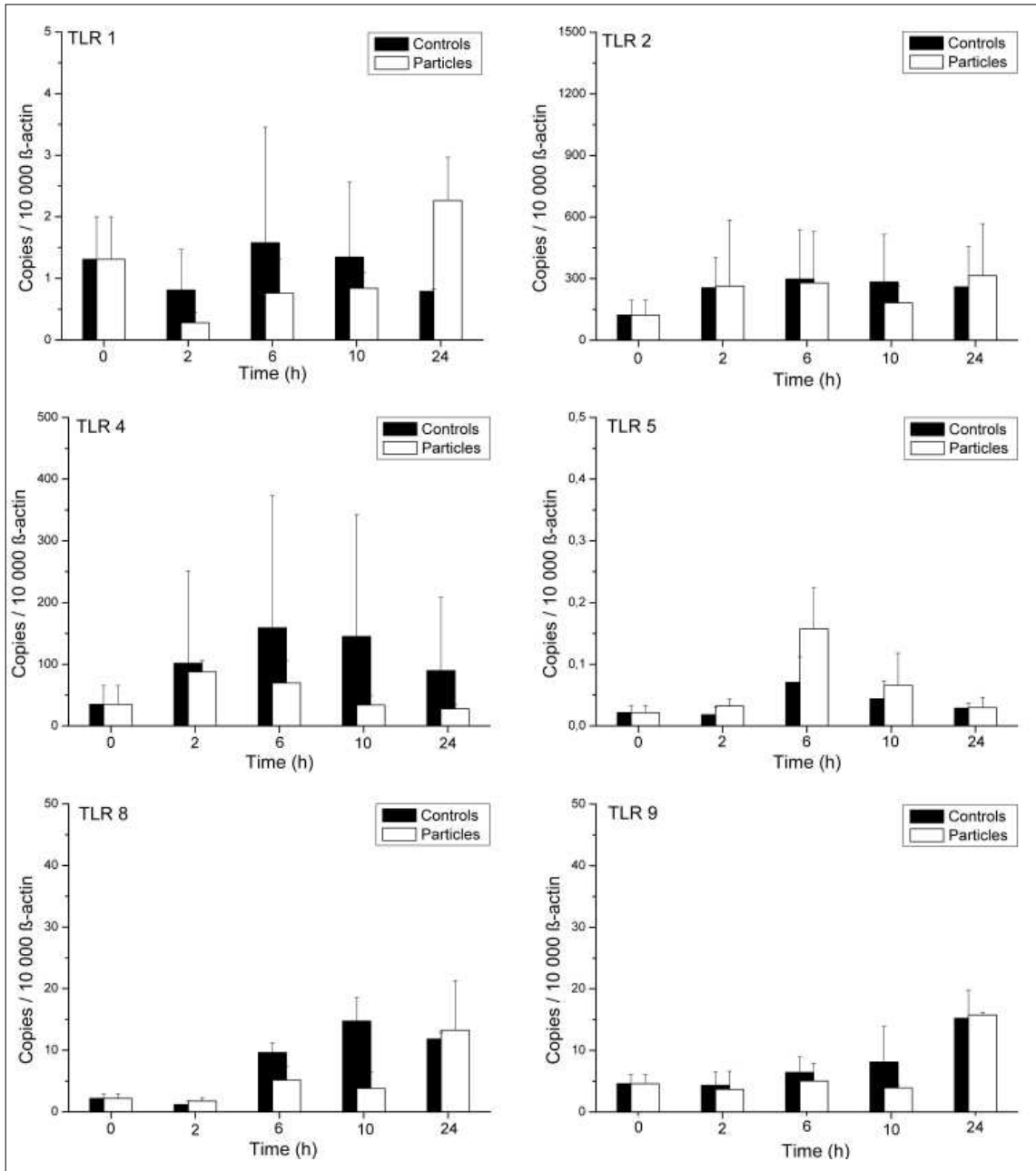
Hiiren makrofagien partikkelistimulaatio

Hiiren monosyytti/makrofagi-linja RAW 264.7 ilmensi kaikkia tutkituista TLR:stä mRNA tasolla kvantitatiivisella PCR:llä tutkittuna. TLR2 lähetti RNA tasot olivat perustasolla suurimmat olleen 122.4 ± 71.4 kopiota ja TLR5:n pienimmät olleen vain 0.022 ± 0.01 kopiota. Muiden TLR:n perus kopiolut sijoittuivat näiden väliin olleen TLR1 (1.3 ± 0.69), TLR4 (35 ± 30.2), TLR8 (2.2 ± 0.8) ja TLR9 (4.6 ± 1.5). Partikkelistimulaatio vaikutti vain vähän näihin lähetti-RNA:n perustasoihin (kuva 4), kuitenkin siten että TLR4 lähetti-RNA tasot laskivat kokonaisuutena tilastollisesti merkitsevästi 24h seuranta-aikana ($p < 0.02$).

Pohdinta

Luonnollisen immunitetin Tollin kaltaisten reseptoreiden (TLR) on esitetty osallistuvan implanttien aseptiseen irtoamiseen tunnistamalla bakteeriperäisten rakenteiden verhoamia kulumapartikkeleita peri-implantti kudoksissa. Tämän vuoksi tutkimme titaanisten kulumapartikkeleiden mahdollista vaikutusta interfaasikudoksen TLR positiivisten solujen lukumäärään partikkelitulehduksen eläinmallissa, jossa hiiren kummankin reisiluun sisään asennettiin ensin K-piikki bilateraalisesti, ja sitten toiselle puolelle lisäksi kulumapartikkeleita. Kaksi ja kymmenen viikkoa toimenpiteestä peri-implanttikudosten TLR positiivisten solujen lukumäärä arvioitiin. Nämä aikapisteet valittiin, koska niiden ajateltiin edustavan varhaista ja myöhäistä vastetta vierasesineeseen. Oletimme, että partikkeleiden läsnäolo johtaisi rajumpaan tulehdusreaktioon ja että siten myös TLR positiivisten solujen lukumäärä peri-implantti kudoksessa olisi partikkeli-puolella suurempi kuin kontrollipuolella. Kuitenkin, vastoin odotuksia, TLR positiivisten solujen lukumäärä oli sekä kahden että kymmenen viikon kohdalla pienempi partikkeli- kuin kontrollipuolella. Koska on loogista olettaa, että TLR tasot olivat lähtökohtaisesti samat kummassakin femurissa, näytti kulumapartikkeleiden läsnäolo näin vastoin odotuksia johtavan TLR:n alasajoon peri-implantti kudoksessa.

Edelleen selvittääksemme kulumapartikkeleiden suoria solutason vaikutuksia TLR tasoihin, stimuloimme hiiren makrofagi solulinjaa titaaniartikkeleilla 24 tuntiin asti ja analysoimme usean eri TLR:n lähetti RNA tasot kvantitatiivisella PCR menetelmällä. Hienoisia muutoksia TLR tasoissa nähtiin, ja TLR4:n lä-



Kuva 4. Diagrammi partikkelistimuloitujen hiiren makrofagien ja kontrollisolujen TLR lähetti-RNA tasoista kvantitatiivisella PCR:llä määritettynä.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR8 ja TLR9 lähetti-RNA tasot ovat esitettyinä. Totaali RNA kerättiin 0, 2, 6, 10 ja 24 tunnin partikkelistimulaation jälkeen. Valkoiset pylväät ovat partikkelistimuloitujen solujen TLR lähetti tasoja ja mustat kontrollisolujen vastaavia. TLR lähetti-RNA tasot on esitetty aritmeettisina keskiarvoina, per 10 000 beetta-aktiini kopiota. Standardideviaatiot ovat myös nähtävissä. Tutkittu hiiren makrofagilinja ilmensi kaikkia tutkituista TLR:stä ja kuluma-partikkeleilla näytti olevan vaikutus TLR lähetti tasoihin verrattain aikaisessa vaiheessa ainakin TLR4:n kohdalla, jonka ilmeneminen ryhmänä laski tilastollisesti merkitsevästi partikkelistimulaation seurauksena.

hetti RNA tasojen laskun suhteen nämä olivat tilastollisesti merkitseviä (Kuva 4). Kiintoisesti Takagi et al. ovat aikaisemmin raportoineet samantyyppisen TLR4 ja TLR9 lähetti-RNA tasojen alasajon titaani-partikkelistimuloiduissa rotan luuytimen makrofageissa in vitro (11). Samoin TLR9 ekspression alasajo on kuvattu PMA-erilaistetuissa U-937 soluissa vasteena nanokoiisiin titaani-partikkeleihin (12).

Näiden tutkimusten valossa näyttää siis siltä, että kulumapartikkeleiden vaikutus TLR tasoihin on ensisijaisesti reseptoritasoja vähentävä eikä niinkään niitä nostava. Toisaalta tiedetään myös että koska TLR aktivaatio saa aikaan rajun tulehdusvasteen, on se tarkasti säädelty prosessi, ja että voimakasta aktivaatiota seuraa aina liiallisen kudostuhon välttämiseksi signaaloinnin nopea vaimentuminen sen useilla eri tasoilla: parhaiten tunnettu esimerkki rajoittamattomasta TLR vasteesta ja sen seurauksista on septinen shokki (13-15). Näin on mahdollista, että havaittu vähentynyt TLR positiivisten solujen lukumäärä peri-implantti kudoksissa partikkeleiden yhteydessä itse asiassa heijastaa alun perin hyvin voimakasta vastetta partikkeleihin, jota on sitten seurannut nopea TLR toiminnan vaimentuminen joka on ollut nähtävissä jo kahden viikon kohdalla. Havaittu TLR positiivisten solujen väheneminen saattaa siis suojata peri-implanttikudosta liioitellulta tulehdusvasteelta, mutta toisaalta taas liiallinen TLR:n alasajo vasteena kulumapartikkeleiden saattaa altistaa kudoksen patogeeneille ja edelleen kliinisesti merkittävälle infektiolle.

Mahdollisia solutason mekanismeja, joilla kulumapartikkelit TLR tasoihin vaikuttavat, ovat ainakin auto- ja parakriininen signaali: partikkeleiden aktiiviset makrofagit erittävät tulehdusvälittäjiä, jotka edelleen johtavat vastavuoroisesti TLR tasojen laskuun kudoksia vaurioittavan, liiallisen, tulehduksen rajoittamiseksi. Kulumapartikkelit saattavat olla bakteeriperäisten molekyylien tai jopa bakteeribiofilmien verhoamia, jolloin niiden makrofageja aktivoivat sekä tulehdusreaktiota indusoivat ominaisuudet edelleen voimistuvat TLR signaaloinnin kautta (16,17). Huomattavaa myös on, että aivan hiljattain on tunnistettu myös useita endogeenisiä, elimistöstä itsestään lähtöisin olevia, TLR ligandeja. Näitä alarmiineiksi kutsuttuja molekyyliä vapautuu nekroottisista soluista sekä vaurioituneesta solunulkoisesta matriksista ja ne johtavat TLR signaaloinnin kautta tulehdukseen esimerkiksi kudoksen rikkoutuessa vamman seurauksena (18,19). Mielenkiintoista, ja tulevissa tutkimuksissa selvitettävää, on missä määrin alarmiinit osallistuvat aseptisen

irtoamisen patogeneesiin, sillä myös nämä molekyylit saattaisivat sitoutua kulumapartikkeleiden pinnoille, opsonisoida niitä makrofageille ja johtaa aseptiseen irtoamiseen myös ulkopuolisen patogeenin puuttuessa.

TLR positiivisten solujen määrän lasku kahden ja kymmenen viikon välillä nähtiin myös partikkelitossa femurissa, jonka ydinonteloon oli asetettu vain K-piikki. On siis luultavaa, että kirurginen trauma tulehdusreaktioineen sekä kudosekrooseineen aiheuttaa myös ensin voimakkaan nousun TLR tasoihin, jotka sitten trauman parantuessa palautuvat normaaleiksi, todennäköisesti sitä nopeammin mitä voimakkaampi tulehdusreaktio on alun perin ollut kyseessä.

Näyttää siis siltä, että kulumapartikkelit johtavat vastoin odotuksia ensisijaisesti TLR tasojen laskuun sekä in vivo, että in vitro. Tämä on mahdollisesti seurausta alkuvaiheen rajusta tulehdusvasteesta, jota seuraa tulehdusvälittäjien auto- tai parakriinisen signaaloinnin kautta TLR:n vastavuoroinen signaaloinnin vaimeneminen ja ilmenemisen vähentyminen. Havaittu TLR:n väheneminen peri-implanttikudoksissa partikkelitulehduksen yhteydessä saattaa siis rajoittaa potentiaalisesti haitallista tulehdusta mutta toisaalta myös altistaa kudoksen infektiolle.

Kirjallisuus

1. Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 2007;28:5044-5048.
2. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2007;460:240-252.
3. Goodman SB, Gómez Barrena E, Takagi M, Kontinen YT. Biocompatibility of total joint replacements: A review. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:603-18
4. Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Nalepka JL, Seabold JM. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;72:179-85
5. Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:25-30.
6. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, ym. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007;357:654-663.
7. Lähdeoja T, Pajarinen J, Kouri VP, Sillat T, Salo J, Kontinen YT. Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis - a potential to respond against danger signals? *J Orthop Res* 2009 DOI 10.1002/jor.20979
8. Pajarinen J, Cenni E, Savarino L, Gomez-Barrena E, Tamaki Y, Takagi M, ym. Toll-like receptors in the septic loosening of total hip arthroplasties. *J Biomed Mater Res A* (in press)
9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.

10. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19:3-10
11. Takagi M, Tamaki Y, Hasegawa H, Takakubo Y, Konttinen L, Tiainen VM, ym. Toll-like receptors in the interface membrane around loosening total hip replacement implants. *J Biomed Mater Res A* 2007;81:1017-1026.
12. Lucarelli M, Gatti AM, Savarino G, Quattroni P, Martinelli L, Monari E, ym. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:339-346.
13. Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 2005;6:1198-1205.
14. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5:446-458.
15. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* 2008;29:315-321.
16. Bi Y, Seabold JM, Kaar SG, Ragab AA, Goldberg VM, Anderson JM, ym. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2001;16:2082-2091.
17. Schwab LP, Xing Z, Hasty KA, Smith RA. Titanium particles and surface-bound LPS activate different pathways in IC-21 macrophages. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;79:66-73.
18. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005;17:359-365.
19. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005;204:27-42