

Bakteerien tunnistajia peri-implanttikudoksissa

Tuomas Lähdeoja^{*1}, Jukka Pajarinen^{*1,2,3}, Vesa-Petteri Kouri¹, Tarvo Sillat¹,
Jari Salo², Yrjö T. Konttinen^{1,4,5}

1. Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY
2. Ortopedian ja traumatologian klinikka, Kliininen laitos, HY
3. Anatomian osasto, Biolääketieteenlaitos, HY
4. Sairaala ORTON
5. Tekonivelsairaala COXA

Wear particle induced macrophage activation is traditionally considered as the principle mechanism of aseptic loosening, the major long term complication of large joint replacement surgery. Recently also the role of bacterial remnants and subclinical biofilms residing on prosthesis surfaces as activators of innate immunity has been speculated. Toll-like receptors (TLRs) are the main means by which innate immune system recognize these pathogen associated molecular patterns (PAMPs). To characterize the TLR palette of synovial membrane like interface-tissue, bacterial culture-negative, aseptic periprosthetic tissue (n=4) was compared to osteoarthritis synovial membrane (n=5) for the presence of cells positive for all known human functional TLRs, which were stained using specific antibodies by immunohistochemistry followed by morphometry. In comparison to osteoarthritic synovium, number of TLR positive cells was found to be increased in the aseptic setting, reflecting the macrophage infiltration to the investigated tissues. In osteoarthritic synovium TLR expression was limited to the few stromal and synovial lining cells. It is concluded that aseptic periprosthetic tissue is thus very reactive, not only to traditional PAMPs, but likely also to the newly identified endogenous alarmins which are also recognized by TLRs, thus suggesting a novel mechanism of aseptic loosening of endoprosthesis.

Johdanto

Lonkan totaaliproteesia pidetään yhtenä kustannustehokkaimmista kirurgisista interventioista. Huolimatta materiaaliteknologian ja kirurgisen tekniikan kehityksestä, on aseptinen irtoaminen yhä totaaliproteesien merkittävimpiä pitkän aikavälin komplikaatioita (1). Proteesin liukupinnoilta irtoavien kulumapartikkelien aikaansaama makrofagien aktivaatiota proteesia ympäröivässä interfaasikudoksessa on perinteisesti pidetty keskeisenä tapahtumana aseptisen irtoamisen patogeneesissä (2, 3). Partikkelit ärsyttävät makrofagit tuottamaan tulehdusvälittäjiä, jotka aktivoivat kudok-

sen tukisoluja, lähinnä osteoblasteja ja fibroblasteja, ilmentämään RANK ligandia, vahvaa osteoklastogeenistä kasvutekijää, joka edelleen stimuloi interfaasikudokseen tunkeutuneet makrofagit fuusioitumaan osteoklasteiksi.

Tämän ”partikkelitauti” paradigman lisäksi proteesin tai kulumapartikkeleiden pinnalle muodostuvien subkliinisten mikrobibiofilmien ja mikrobiperäisten molekyyli-rakenteiden osallisuutta aseptisen irtoamisen patogeneesiin on viimeaikoina laajalti tutkittu (4-6). Oletimme että näitä patogeneeseihin liittyviä molekyyli-muotoja (esim. lipopolysakkaridi ja lipoteikkohappo)

tunnistavat periproteettisessa kudoksessa luonnollisen immunitetin muodontunnistusreseptorit, joista tärkeimpiä ovat Tollin kaltaiset reseptorit (TLR). Näitä kalvoproteiineita ilmennetään useiden eri solutyypin solukalvoilla tai endosomeissa ja niiden aktivaatio sopivalla ligandilla aikaansaa immuunijärjestelmän aktivaation (7)

Useiden mikrobiperäisten molekyylihuotojen kerääntyminen periproteettiseen kudokseen on osoitettu mutta näitä rakenteita tunnistavien reseptoreiden läsnäoloa periproteettisessa kudoksessa on vähemmän tutkittu (8). Tutkimuksen tarkoituksena oli siten osoittaa mahdollinen TLR:ien läsnäolo aseptisesti irtoavaa proteesia ympäröivässä interfaasikudoksessa, kartoittaa kudoksen TLR profiili ja verrata sitä ”tervetä” kudosta edustavaan nivelrikkoiseen nivelkalvoon.

Menetelmät

Potilaat ja näytteet

Neljä nivelkalvon kaltaista kudoksenäytettä kerättiin periproteettisesta kudoksesta lonkan totaaliproteesin aseptisen irtoamisen vuoksi suoritetussa revisioleikkauksesta. Bakteri- ja sieniviljelyt olivat negatiivisia. Kontrollieiksi kerättiin viisi nivelkalvon kudoksenäytettä primaarisen nivelrikon vuoksi suoritetuista lonkan totaaliproteesi leikkauksesta.

Immunohistopatologia

Kudosnäytteet fiksoitiin 30 % formaliiniin, jonka jälkeen suoritettiin dehydraatio etanolissa, kirkastus ksyleenissä ja petaus parafiinissä. Näyteblokeista valmistettiin 8 µm leikkeitä, jotka deparafinoitiin 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 normaalseerumissa. Primaari vasta-aineinkubaatio tehtiin yli yön 4 °C ja sekundaarivasta-aine inkubaatio 1h huoneenlämmössä. Antigeeni-vasta-ainereaktio visualisoitiin käyttäen avidiini-biotiini-peroksidaasi-kompleksimetodia. Vastavärjäys tehtiin hematoksyliinillä. Jokaisen askelen välissä leikkeet pestiin fysiologisella puskuroidulla keittosuolalla. Käyttämämme primaarivasta-aineet olivat jäniksen anti-humaaneja polyklonaalisia IgG

vasta-aineita TLR-1 (0.80 µg/mL), TLR-2 (2.7 µg/mL), TLR-3 (2 µg/mL), TLR-4 (1.3 µg/mL), TLR-5 (0,8 µg/mL), TLR-6 (1 µg/mL), TLR-7 (0.8 µg/mL), TLR-8 (2.7 µg/mL) tai TLR-9 (0.5 µg/mL) vastaan. Värjäytyneiden solujen määrä näkökentässä laskettiin. Polyetyleenipartikkelit visualisoitiin käyttäen polarisaatiomikroskopiaa.

Tulokset

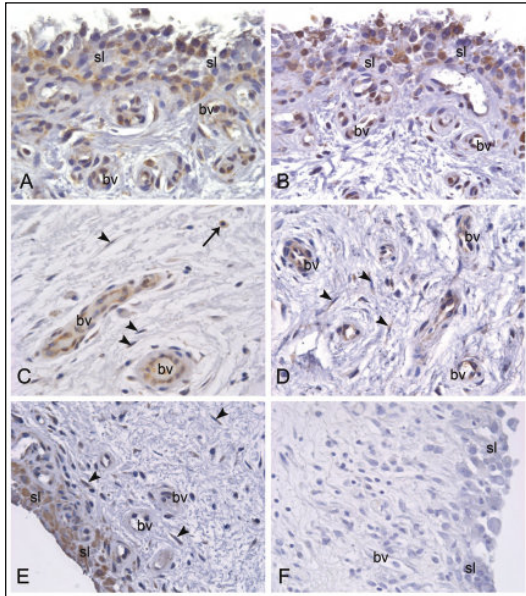
Histologia

Nivelrikkoisissa näytteissä löyhää, hyvin verisuonitettua ja lievästi ödemistä, sidekudosta nähtiin nivelkalvon pintasolukon alla. Lukuun ottamatta fibroblasteja sekä satunnaisten tulehdussolujen tunkeutumista kudokseen, oli nivelkalvon strooma hyvin vähänsoluista. Sen sijaan aseptisessä periproteettisessa kudoksessa tämä pintasolukon alainen, löyhä sidekudos strooma oli voimakkaasti monosyytti/makrofagien infiltroitu. Runsasta vierasesinejättisolujen ja satunnaista vierasesinegranuloomien muodostusta nähtiin. Polarisaatiomikroskopiassa todettiin monosyytti/makrofagien usein sisältävän fagosytoituja polyetyleenin partikkeleita.

TLR histopatologia

TLR värjäytyvyys oli pääasiassa sytoplasmista, mutta myös solukalvon värjäytymistä nähtiin. Nivelrikkoisissa näytteissä TLR värjäytyvyys oli kautta linjan keskittynyt osaan nivelkalvon pintasolukosta, verisuonten endoteeliin sekä satunnaisiin perivaskulaarisin tulehdussolu infiltraatteihin (Kuva 1, paneelit A-E). Myös joitain TLR positiivisia fibroblastin ja monosyytti/makrofagin kaltaisia soluja nähtiin kudoksen stroomassa (Kuva 1, paneelit C-E). Näiden solujen lisäksi aseptisessä periproteettisessa kudoksessa runsaat monosyytti/makrofagi infiltraatit ja vierasesinejättisolu olivat positiivisia kaikille tutkituista TLR:stä (Kuva 2, paneelit A-F). Värjäyskontrollit olivat negatiivisia tai sisälsivät korkeintaan hentoa taustavärjäytymistä (Kuva 1, paneeli F).

TLR positiivisten solujen keskiarvo nivelrikkoisessa nivelkalvossa oli 26.9 ± 8.3 verrattuna 56.6 ± 14.7 arvoon interfaasikudoksessa (näytettä liian pieni tilastollisen merkitsevyyden osoittamiseen). Eri TLR-kohtaiset arvot on esitetty erillisessä pylväsdigrammissa (kuva 3).

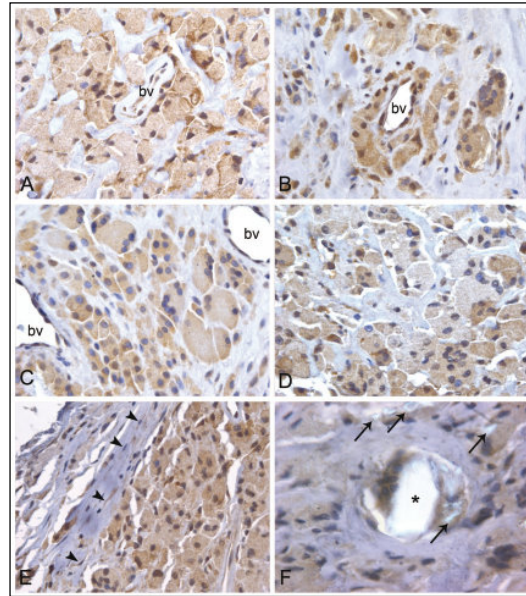


Kuva 1: Tollin kaltaiset reseptorit (TLR) nivelrikkoisessa nivelkalvossa. A-F TLR immunoperiksidaasivärjäys nivelrikkoisesta nivelkalvosta, joka koostui nivelkalvon pintasolukosta, sekä sen alaisesta hyvin verisuonitetusta ja lievästi tulehtuneesta löyhästä sidekudoksesta. Osa nivelkalvon pintasolukosta sekä verisuonten endoteeli vastasivat suurimmasta osasta nähdystä TLR immunoreaktiivisuudesta. A- TLR1 värjäys. B- TLR2 värjäys. C-TLR4 värjäys. Muutamia TLR4 positiivisia fibroblasteja ja monosyytti/makrofageja (nuoli) nähdään tässä näkökentässä. D- TLR6 värjäys. Verisuonen endoteelin lisäksi nähdään muutamia TLR6 positiivisia fibroblasteja (nuolenpäät). E- TLR9 värjäys. Nivelkalvon pintasolukon lisäksi nähdään joitain TLR9 positiivisia fibroblasteja (nuolenpäät). F- Negatiivinen värjäyskontrolli. Vastavärjäys hematoksyliinillä. Suurenno 400x. Lyhenteet: bv-verisuoni, sl- nivelkalvon pintasolukko.

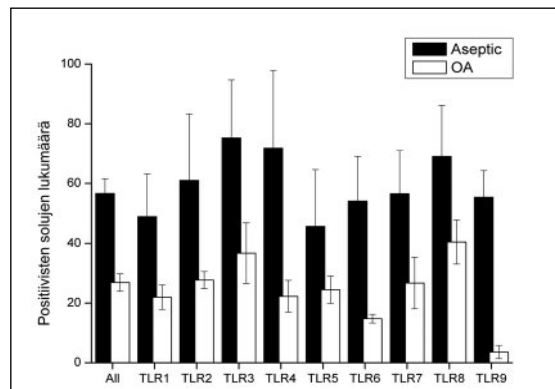
Pohdinta

Tollin kaltaisten reseptoreiden ilmeneminen nivelrikkoisessa nivelkalvossa sekä aseptisessä interfaasikudoksessa tutkittiin käyttäen TLR spesifisiä vasta-aineita. Ensimmäisessä lähinnä verisuonten endoteeli sekä osa nivelkalvon pintasolukosta, mahdollisesti tyypin A makrofagin kaltaiset solut, olivat positiivisia kaikille tutkituista TLR:stä kun taas jälkimmäisessä suurin osa TLR positiivisista soluista oli kudokseen tunkeutuneita monosyytti/makrofageja.

Potentiaalisia TLR-ligandeja saattaa hyvinkin esiintyä periproteettisessa kudoksessa. Merkittävää lipopolysakkaridi (LPS) kontaminaatiota jää kaupallisten proteesin pinnoille tavanomaisten sterilointimenettelyiden jälkeen (9). LPS:ää vapautuu terveidenkin ihmisten verenkiertoon hampaiden harjauksen yhte-



Kuva 2: Tollin kaltaiset reseptorit (TLR) aseptisessä interfaasikudoksessa. A-F TLR immunoperiksidaasivärjäys aseptisesta interfaasikudoksesta, jota karakterisoi TLR positiivisten monosyytti/makrofagien infiltraatio muuten vähänsoluisen sidekudokseen sekä vierasesinejättisolujen muodostus. A- TLR1 värjäys. Monosyytti/makrofagien sekä jättisolujen lisäksi verisuonten endoteeli on TLR positiivista. B- TLR2 värjäys. C- TLR4 värjäys. D- TLR6 värjäys. E- TLR9 värjäys. Joitain TLR9 positiivisia fibroblasteja (nuolenpäät) nähdään tässä näkökentässä. F- Komposiittikuva, jossa suuri määrä polyeteenipartikkeleita nähdään fagosytoituina TLR9 positiivisen monitumaisen jättisolun sisällä (asteriski). Pienempiä partikkelikertymiä on myös merkitty (nuolet). Polyeteenipartikkelit tunnistettiin polarisaatiomikroskopiolla. Vastavärjäys hematoksyliinillä. Suurenno 400x. Paneelin F kirkkautta ja kontrastia on korostettu. Lyhenteet: bv- verisuoni



Kuva 3: Pylväsdiagrammi, jossa on esitettyä TLR positiivisten solujen lukumäärän keskiarvo, satunnaisessa edustavassa näkökentässä, nivelrikkoisessa nivelkalvossa (OA) sekä aseptisessä interfaasikudoksessa (aseptic). Johtuen monosyytti/makrofagi infiltraateista sekä vierasesinejättisolujen muodostuksesta, sisältää jalkimmäinen selvästi enemmän TLR positiivisia soluja.

ydessä ja tämän kiertävän LPS:n suuri affiniteetti ja kerääntyminen kulumapartikkeleiden pinnoille on osoitettu hiirimallissa (10, 11). LPS:ää on osoitettu periproteettisessa kudoksessa myös aseptisen irtoamisen yhteydessä (12, 13). LPS on Gram-negatiivisten bakteerien soluseinän rakenneosana, joka on myös vahva immunijärjestelmää aktivoiva vaarasignaali, jonka rooli esimerkiksi septisen shokin synnyssä on tunnettu. LPS:n tunnistaa solukalvon TLR4 reseptori.

Proteesin pinnalle muodostuvia subkliinisiä bakteeribiofilmejä yhtenä aseptisen irtoamisen patogeenisiä edistävänä tekijänä on niin ikään epäilty (14, 15). Kliinisesti suurin osa havaituista proteesi-infektioista on Staphylococcus epidermidiksen, Staphylococcus aureuksen tai jonkin muun, usein biofilmiä muodostavan Gram-positiivisen bakteerin aiheuttama (16). Vaikka Gram-positiiviset bakteerit eivät tuota LPS:ää, tuottavat ne soluseinäänsä muita potentisti immuunijärjestelmää aktivoivia molekyyliumuotoja, kuten lipoteikkohappoa, di- ja triasyyli lipopeptideitä sekä peptidoklygaania. Näitä rakenteita tunnistavat solukalvon TLR2 reseptori tai TLR1/TLR2 ja TLR2/TLR6 reseptoridimeerit (17). Endosomaalinen TLR9, joka tunnistaa bakteeriperäistä metyloimatonta CpG DNA:ta, saattaisi niin ikään osallistua immuunivasteeseen fagosytoituja kulumapartikkeleita vastaan. Bakteeriperäistä flagelliinia tunnistavan TLR5 sekä virusperäisiä yksi- ja kaksijuosteisia RNA:ta tunnistavien TLR3, TLR7 ja TLR8:n rooli aseptisen irtoamisen patogeenisissä tämän hetkisen tiedon valossa lienee vähäisempi.

Hiljattain myös endogeenisiä TLR ligandeja on tunnistettu (18). Näitä alarmiineina tunnettuja, vaaraa signaloivia molekyyliumuotoja vapautuu nekroottisista soluista ja niihin kuuluvat mm. useat stressiproteiinit, tuman HMGB1 sekä virtsahappo. Myös jotkin pilkkoutuneen ekstrasellulaarimatriksin proteiineista voivat toimia alarmiineina ja tällä voi olla merkitystä niin nivelrikon aseptisen irtoamisen kuin nivelreuman patogeneesin kannalta, kun ajatellaan nyt osoitettua TLR:n läsnäoloa nivelrikkoisessa nivelkalvossa sekä periproteettisessa kudoksessa. Ligandi-TLR interaktio johtaa MyD88 riippuvaista toisilähettiläskaskadia myöten transkriptiotekijän NF- κ B aktivaatioon ja edelleen useiden tulehdusvälittäjien synteesiin ja eritykseen, esimerkkeinä TNF- α , IL-1 β ja IL-6, joita nykyisin esimerkiksi nivelreuman hoidossa salvataan (19). Kiintoisasti nämä tulehdusvälittäjät on aiemmin liitetty aseptisen irtoamisen patogeenisiin ja ne voivat myös aktivoida strooman soluja tuottamaan osteoklas-

togeenistä RANK ligandia (20).

Johtopäätöksenä todetaan, että johtuen suurista, kaikkien funktionaalisten TLR:n suhteen positiivisista, monosyytti/makrofagi kertymistä, on aseptinen periproteettinen kudos hyvin reaktiivista sekä endo- että eksogeenisille TLR ligandeille. Useiden TLR ligandien läsnäolo periproteettisessa kudoksessa on osoitettu ja vielä kun TLR:ien voimakkaat tulehdusta välittävät ominaisuudet ovat hyvin tunnetut, näyttää näiden reseptoreiden sekä niiden tunnistamien vaarasignaalien rooli totaaliproteesien aseptisen irtoamisen patogeenisissä todennäköiseltä. Mielenkiintoista siten onkin, voivatko TLR:ssä ja niiden signaalintireiteissä tavatut polymorfismit ja mutaatiot altistaa tai toisaalta suojata joitain potilaista aseptiselta irtoamiselta.

Kiitos

Kiitämme Bioanalyttikko Erkki Hännistä teknisestä avusta. Ortopedian ja Traumatologian tutkimussäätiö, evo, Sigrid Juseliuksen säätiö, Finska Läkaresällskapet, Wilhelm och Else Stockmannin säätiö, Invalidi säätiö ja TEKES ovat rahoittaneet tutkimusta.

Kirjallisuus:

1. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C: The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007;370:1508-1519.
2. Goodman SB: Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials*. 2007;28:5044-5048.
3. Goodman SB, Gómez Barrera E, Takagi M, Konttinen YT: Biocompatibility of total joint replacements: A review. *J Biomed Mater Res A*. Published Online First: 28 May 2008. doi:10.1002/jbm.a.32063
4. Ince A, Rupp J, Frommelt L, Katzer A, Gille J, Löhr JF: Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin Infect Dis*. 2004;39:1599-1603.
5. 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;72:179-185.
6. Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS: Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005;437:25-30.
7. Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1-5.
8. 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.

9. 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.
10. Page RC: The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998; 3(1):108-120.
11. Tatro JM, Taki N, Islam AS, Goldberg VM, Rinnac CM, Doerschuk CM, ym: The balance between endotoxin accumulation and clearance during particle-induced osteolysis in murine calvaria. *J Orthop Res.* 2007;25:361-369.
12. Clarke MT, Roberts CP, Lee PT, Gray J, Keene GS, Rushton N: Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427:132-137.
13. Nalepka JL, Lee MJ, Kraay MJ, Marcus RE, Goldberg VM, Chen X, ym: Lipopolysaccharide found in aseptic loosening of patients with inflammatory arthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;451:229-235.
14. 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.
15. Esteban J, Gomez-Barrera E, Cordero J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R: Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol.* 2008;46:488-492.
16. Darouiche RO: Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004; 350:1422-1429.
17. Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:499-511.
18. Miyake K: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol.* 2007;19:3-10.
19. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
20. Mandelin J, Li TF, Hukkanen M, Liljeström J, Salo J, Santavirta S, ym: Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. *J Rheumatol.* 2005;32:713-720.