

Nízká exprese TLR-1, -2, -4 a IL-2, -2R, -10, -10R, TGFb1 v pseudosynoviální tkáni odebrané při reoperaci asepticky uvolněné totální endoprotézy kyčle a kolena

Low Expression of TLR-1, -2, -4 a IL-2, -2R, -10, -10R and TGFb1 in Pseudosynovial Tissue Collected at Revision Total Knee Arthroplasty for Aseptic Loosening

T. TOMÁNKOVÁ¹, E. KRIEHOVÁ¹, R. FILLEROVÁ¹, P. LUŽNÁ², J. EHRMANN², J. GALLO³

¹ Ústav imunologie, Lékařská fakulta UP v Olomouci

² Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta UP v Olomouci

³ Ortopedická klinika LF UP v Olomouci a FN Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Aseptic loosening (AL) and periprosthetic osteolysis (PPOL) in total hip (THA) and knee (TKA) arthroplasty are linked to an inflammatory process initiated by wear debris released from artificial joints. There is still limited information about the contribution of Toll-like receptors (TLRs) and distinct regulatory cytokines to AL/PPOL in both joints.

METHODS

In this study, we investigated mRNA expression of TLR-1,-2,-4 and cytokines/receptors (IL-2,-2R,-10,-10R, TGFb1) in pseudosynovial tissue obtained from 55 patients with aseptically failed THAs/TKAs and 37 control patients with hip/knee primary osteoarthritis (OA) using quantitative RT-PCR. Immunohistochemical staining was used to detect the corresponding proteins. Non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to determine differences between the patient groups.

RESULTS

When comparing expression profiles between patients with aseptically failed THA and TKA, higher amounts of TLR-1,-2,-4 and IL-2R mRNA transcripts were detected in THA patients. The mRNA expression of studied molecules (TLR-1,-2,-4, IL-2, IL-10, IL-2R, IL-10R, TGFb1) did not differ between THA and OA hip tissues. Lower mRNA expression of TLR-1,-2,-4, IL-10, and IL-10R was detected in TKA when compared to control knee OA. Similar mRNA profiles of IL-2, IL-2R, and TGFb1 were observed in TKA and knee OA. Using immunohistochemistry, we detected low expression of TLR-1 protein in failed THA/TKA, whereas TLR-2 protein levels were higher in TKA/THA patients than in OA controls. High individual variability in TLR-4 protein levels was detected among patients with aseptically loosened THA and TKA. IL-10 protein levels were similar in THA and TKA patient subgroups and control subjects, whereas IL-10R protein level was higher in failed TKAs and OA controls than in THAs. No difference in IL-2 protein levels was detected between patients with THA/TKA and those with OA.

DISCUSSION

Our data indicate close similarity between the expression patterns in aseptically failed THA and TKA. However, certain differences were observed which also suggest unique pathways associated with the end-stage of aseptic loosening in THA and TKA. For instance, differences in the size, shape and load of polyethylene particles between THA and TKA could play some role. The composition of THA and TKA and differences in terms of mechanical forces might also be involved.

CONCLUSIONS

This is the first study comparing the gene expression profile of a particular set of innate immunity regulatory molecules between tissues from aseptically failed THA and TKA. Low expression of TLR-1,-2,-4 and cytokines/receptors (IL-2, IL-2R, IL-10, IL-10R, and TGFb1) was observed in pseudosynovial tissues obtained from aseptically failed THAs and TKAs. Higher amount of TLR transcripts was detected in THA as compared to TKA. These findings indicate certain differences in the mechanism of aseptic loosening occurring at the site of THA and TKA. Further research is warranted.

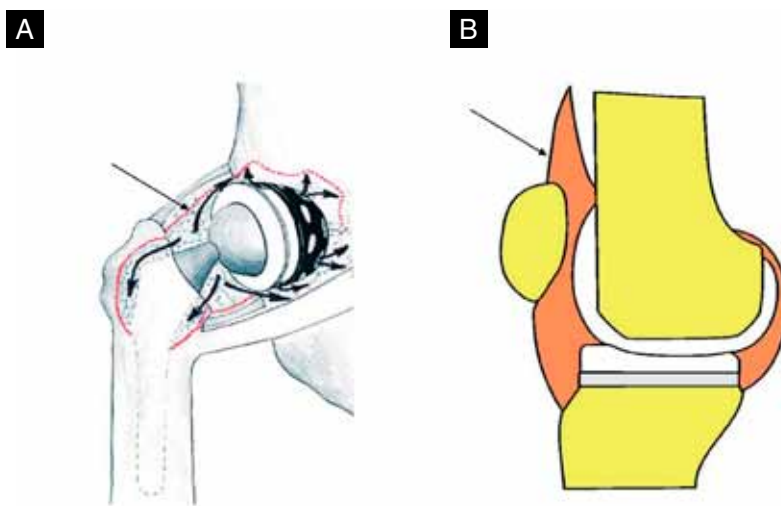
Key words: aseptic loosening, periprosthetic osteolysis, total hip arthroplasty, total knee arthroplasty, gene expression, immunohistochemistry, TLRs, cytokines, IL-2, IL-10, TGFb1.

ÚVOD

Nejčastější pozdní komplikací totální endoprotézy (TEP) kyčle a kolena je aseptické uvolnění v kombinaci s periprotetickou osteolýzou. Frekvence těchto komplikací narůstá po 10. roce od operace, objevují se však i dříve (6). Reoperace je nepochybně problémem pro pacienta, ale také pro nemocnici a společnost, protože je mnohem nákladnější než primární operace (2). Chceme-li přemýšlet o prodloužení životnosti TEP, musíme detailně porozumět procesům, které k uvedenému typu selhání vedou. Obě komplikace si vysvětlujeme patologickým souběhem mechanických a biologických událostí (4). Předpokládáme přitom, že u většiny pacientů dojde nejdříve k resorpci kostního lůžka, čímž se oslabí spoj mezi protézou a kostí, a teprve následně se uvolní implantát.

K periprotetické resorpci kosti (osteolýze) dochází v rámci odpovědi hostitele na přítomnost velkého množství částic uvolňovaných do kloubu při každém kroku z povrchu endoprotézy. Biologicky jsou nejúčinnější částice o velikosti kolem jednoho mikrometru a menší (9). Rychlost a progresse osteolýzy jsou ovlivněny také původem materiálu (21). Nejagresivnější jsou podle *in vitro* studií polyetylenové částice, následované částicemi kostního cementu a kovovými částicemi. Experimentálně bylo prokázáno, že částice uvolňované z povrchu endoprotézy vyvolávají zánětlivou odpověď, konkrétně stimulují expresi pro-zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů u makrofágů, fibroblastů a osteoblastů (20). Chronický zánět je doprovázen proliferací fibro-granulomatózní tkáně. Na rozhraní s kostí dochází ke zvýšené akumulaci pre-osteoklastů, které zde vyžívají v osteoklasty, buňky specializované na resorpci kosti (31).

Současné znalosti naznačují, že prvním krokem v patogenezi aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy je aktivace receptorů nespecifické imunity na povrchu tkáňových rezidentních buněk (makrofágů, dendritických buněk, fibroblastů aj.), nacházejících se v okolí endoprotézy (4). Tím se spouští dráhy vedoucí k expresi chemokinů, cytokinů a proteolytických enzymů, vytvářejících odpověď hostitele na přítomnost částic protetic-



Obr. 1. Schematické znázornění místa odběru pseudosynoviální tkáně v okolí TEP kyčle (A) a kolena (B). Vzorčky byly odebírány z vnitřního listu pseudosynoviální kloubní výstelky; šipky označují místo, ze kterého byla pseudosynoviální tkáň odebrána v průběhu reoperace TEP.

Tab. 1. Klinické charakteristiky pacientů s reoperovanými TEP kyčle a kolena a kontrolních jedinců s primární osteoartrózou (OA); KSS – Knee Society Score; všechna data jsou prezentována jako střední hodnoty; min–max hodnoty jsou uvedeny v závorce

| | TEP kyčle (n=36) | OA kyčle (n=17) |
|--|---------------------|--------------------|
| Pohlaví (muži/ženy) | 8/28 | 10/7 |
| BMI (kg/m ²) | 29,2 (19,8–41,4) | 29,2 (21,3–35,3) |
| Primární diagnóza: | | |
| Primární OA | 17 | 17 |
| Postdysplastická OA | 19 | 0 |
| Předoperační Harrisovo skóre | 60,7 (20–90) | 48,8 (16–68) |
| Věk v době reoperace | 60,9 (31–75) | 56,9 (28–68) |
| Doba od operace k revizní operaci (roky) | 12,0 (4–18) | --- |
| Typ fixace implantátu: | | |
| Cementovaná/hybridní/bezcementová | 3/5/28 | --- |

| | TEP kolena (n=19) | OA kolena (n=20) |
|--|----------------------|---------------------|
| Pohlaví (muži/ženy) | 5/14 | 7/13 |
| BMI (kg/m ²) | 29,5 (22,9–38,9) | 29,7 (20,6–35,4) |
| Primární diagnóza: | | |
| Primární OA | 19 | 20 |
| Sekundární OA | 0 | 0 |
| Předoperační skóre: | | |
| KSS bolest | 40,6 (32–48) | 59,2 (20–69) |
| KSS funkce | 46,1 (30–60) | 52,2 (30–72) |
| Věk v době reoperace | 74,8 (56–88) | 65,6 (52–79) |
| Doba od operace k revizní operaci (roky) | 9,7 (3–15) | --- |
| Typ fixace protézy: cementovaná | 19x | --- |

kých biomateriálů. Jednou z nejvýznamnějších receptorových skupin jsou tzv. Toll-like receptory (TLR), jejichž prostřednictvím rozpoznávají rezidentní buňky ve svém okolí bakteriální motivy, ale i endogenní signály (28, 35). Stimulace TLR spouští kaskádu pro-zánětlivých drah, které nakonec vedou k osteolýze a uvolnění implantátu. Ve skutečnosti však dojde k aseptickému uvolnění až za velmi dlouhou dobu od prvního kontaktu

Tab. 2. Popis vyšetřovaných genů a použitých primerů a sond pro reverzní transkripci – polymerázovou řetězovou reakci

| Zkratka genu | Název genu | Identifikační číslo v GenBank* | Forward, reverse primery/ Assay ID | Dodavatel | LNA sonda** |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------|-------------|
| TLR-1 | Toll-Like Receptor 1 | NM_003263.3 | Hs00413978_m1 | Life Technologies | |
| TLR-2 | Toll-Like Receptor 2 | NM_003264.3 | Hs00152932_m1 | Life Technologies | |
| TLR-4 | Toll-Like Receptor 4 | NM_003266.3 | Hs01060206_m1 | Life Technologies | |
| IL-2 | Interleukin 2 | NM_000586.3 | Hs00174114_m1 | Life Technologies | |
| IL-2R | Interleukin 2 Receptor | NM_000417.2 | Hs00907779_m1 | Life Technologies | |
| IL-10 | Interleukin 10 | NM_000572.2 | Hs00961622_m1 | Life Technologies | |
| IL-10R | Interleukin 10 Receptor | NM_001558.3 | 5' gtcttggtcagacgctcat 3' 5' tgctcaaacacacagacg 3' | Roche | #23 |
| TGFb1 | Transformační růstový faktor, Beta 1 | NM_000660.3 | 5' gcagcagctggagctgta 3' 5' cagccggttgctgagga 3' | Roche | #72 |

* Sekvence genů jsou dostupné online na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>** Číslo LNA (Locked Nucleic Acid) sond v souladu s komerčně dostupnou knihovnou (www.universalprobelibrary.com).

Primery byly navrženy s pomocí ProbeFinder assay design tool (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)

Sady primerů/sond byly dodány z Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

tkání s částicemi uvolňujícími se z endoprotézy a pouze u části pacientů. Z toho lze usuzovat na silný potenciál regulačních proti-zánětlivých a homeostatických drah, nacházejících se ve stejné tkáni jako TLR a další receptory. Mezi nejsilnější proti-zánětlivé a homeostatické cytokiny patří interleukin 10 (IL-10) a transformační růstový faktor beta (TGFb1), (10).

V článku referujeme expresní profily vybraných TLR a několika regulačních cytokinů v pseudosynoviální tkáni získané během reoperací asepticky uvolněných kloubních náhrad. Aseptickému uvolnění a osteolýze by měla odpovídat vyšší mRNA/proteinová exprese TLR a naopak nižší exprese proti-zánětlivých cytokinů. Očekávali jsme, že expresní profily sledovaných molekul v periprotetické tkáni u aseptického uvolnění kyčlí a kolenní podobné, neboť pozdní stadium AL/POL je v obou lokalitách z pohledu operátora velmi podobné.

MATERIÁL A METODIKA

Pacienti

Vzorky pseudosynoviální tkáně jsme získali od 55 pacientů reoperovaných pro aseptické uvolnění a periprotetickou osteolýzu u TEP kyčle (n = 36) a TEP kolena (n = 19). Kontrolní skupinu tvořilo 37 pacientů, u nichž byl odběr synoviální tkáně proveden při implantaci primární kloubní náhrady kyčle (n = 17) a kolena (n = 20). Aseptické selhání bylo odlišeno od septického podle dříve publikovaných kritérií (5). Všichni pacienti byli české národnosti a patřili k tzv. kavkazské rase. Odběry tkání u pacientů, kteří podepsali informovaný souhlas, provedl v letech 2008 až 2012 jeden operátor. Studie byla schválena etickou komisí pro projekt IGA MZ ČR NT11049.

Kostní defekty v oblasti kyčle byly popisovány v intencích klasifikace podle Saleha a spol. (32), defekty v oblasti kolena byly tříděny podle klasifikace AORI (3). Otěr polyetyleny jsme měřili z rentgenových snímků u pacientů se selhávající TEP kyčle metodou podle Dorra (29). U kolenních náhrad jsme pro měření otěru

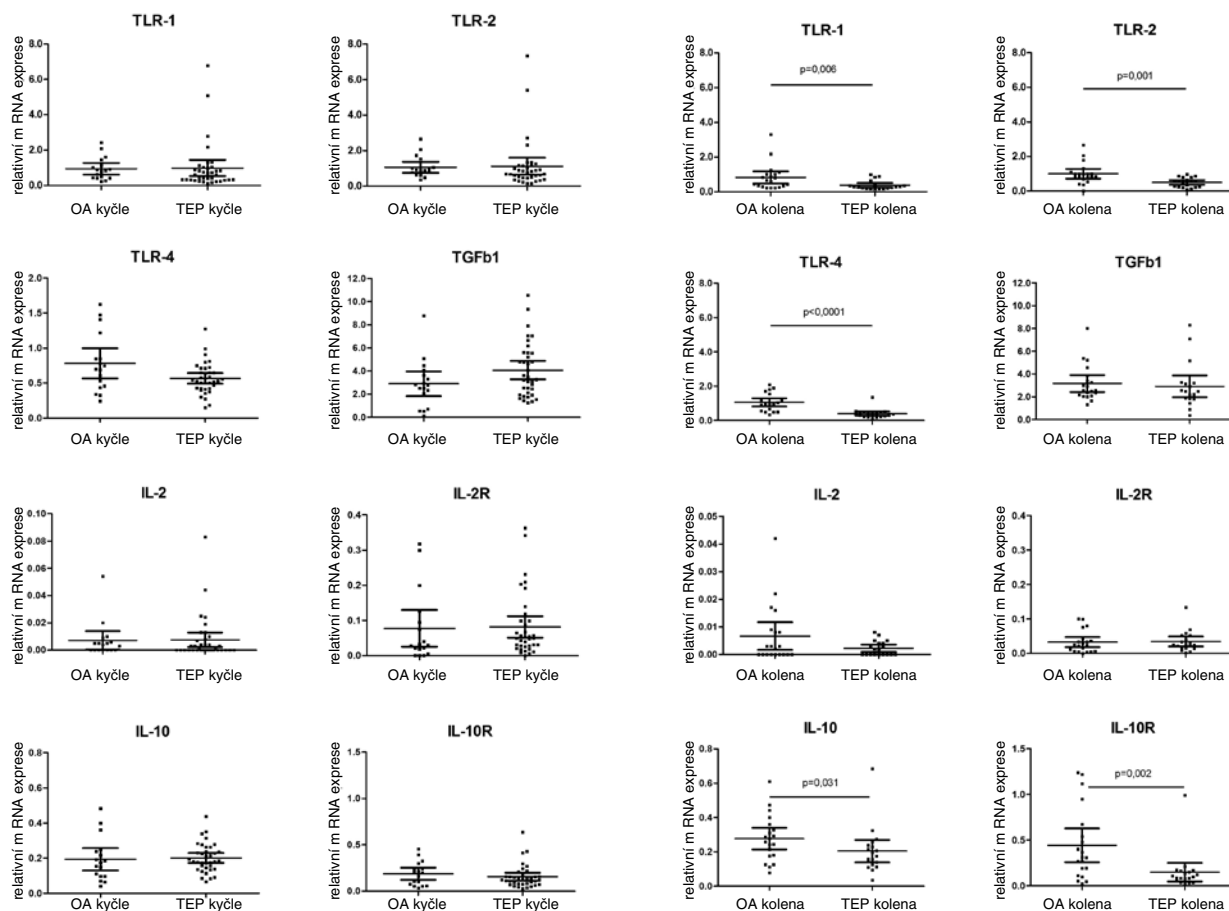
neměli k dispozici validovanou metodologii. Detailní informace o souborech pacientů jsou uvedeny v tabulce 1.

Odběry tkání a kvantitativní RT-PCR

Vzorky byly odebírány z vnitřního listu pseudosynoviální kloubní výstelky krátce po incizi kloubu (obr. 1). Tenký list tkáně byl okamžitě po odběru vložen do RNA lateru (Ambion, Austin, USA). Po homogenizaci (0,1 g odebrané tkáně) byla izolována celková RNA mirVana izolačním kitem (Ambion, Austin, USA) a přepsána do cDNA pomocí anchored oligo dT (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) podle protokolu výrobce. Množství a kvalita izolované RNA byly stanoveny na 2100 Bioanalyzery pomocí RNA 6000 Nanoassay (oboje Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Kvantitativní PCR byla provedena na přístroji RotorGene3000 (16) a metoda druhé derivace byla použita pro výpočet relativní exprese (RotorGene Software 6.1.81, QIAGEN Inc., Valencia, CA). HPRT1 byl použit jako referenční gen. Sekvence primerů a sond jsou uvedeny v tabulce 2.

Imunohistochemie

Vzorky pseudosynoviálních membrán asepticky selhávajících TEP kyčelních (n = 7) a kolenních kloubů (n = 7) a kontrolních tkání od pacientů s osteoartrózou (primární náhrada kyčle n = 5; kolena n = 5) byly odebrány identicky jako pro mRNA profilování, avšak ihned po odběru byly vloženy do 10% formalínu. Další zpracování probíhalo podle standardního protokolu, stejně jako imunohistochemické barvení (34). Byly použity následující primární protilátky: králíčí polyklonální anti-TLR-1 (1:50, Santa Cruz, CA, USA); králíčí polyklonální anti-TLR-2 (1:500, Abcam, Cambridge, Velká Británie); myší monoklonální anti-TLR-4 (klon 76B357.1, 1:200, Abcam); králíčí monoklonální anti-IL-2 (klon EPR2780, 1:500; Novus Biologicals, CO, USA); králíčí polyklonální anti-IL-10 (1:1500, Abcam); králíčí polyklonální anti-IL-10R (1:30, Millipore, SRN). Revitalizace všech studovaných antigenů byla provedena 10mM



Obr. 2. Rozložení hodnot relativní mRNA exprese TLR-1, TLR-2, TLR-4, TGFb1, IL-2, IL-2R, IL-10, a IL-10R v pseudosynoviální tkáni získané od pacientů s asepticky uvolněnou TEP kyčle, resp. od kontrolních jedinců s primární osteoartrózou kyčle. Střední hodnoty jsou vyznačeny horizontální přímkou, chybové úsečky vyznačují interval spolehlivosti (95% CI).

Obr. 3. Rozložení hodnot relativní mRNA exprese TLR-1, TLR-2, TLR-4, TGFb1, IL-2, IL-2R, IL-10, a IL-10R v pseudosynoviální tkáni získané od pacientů s asepticky uvolněnou TEP kolena a od kontrolních jedinců s primární osteoartrózou kolena. Střední hodnoty jsou vyznačeny horizontální přímkou, chybové úsečky vyznačují interval spolehlivosti (95% CI).

Tab. 3. Srovnání expresních profilů genů v pseudosynoviální tkáni odebrané u pacientů s TEP kyčle/kolena a u kontrolních jedinců s primární osteoartrózou (OA) kyčle/kolena

| | TEP kyčle | OA kyčle | p TEP kyčle vs. OA kyčle | TEP kolena | OA kolena | p TEP kolena vs. OA kolena | p TEP kyčle vs. TEP kolena |
|--------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | (N=36) | (N=17) | | (N=19) | (N=20) | | |
| TLR-1 | 0,989 (0,531–1,447) | 0,950 (0,626–1,275) | 0,156 | 0,382 (0,255–0,510) | 0,829 (0,475–1,182) | 0,006 | 0,006 |
| TLR-2 | 1,124 (0,643–1,604) | 1,068 (0,758–1,378) | 0,219 | 0,502 (0,370–0,635) | 1,002 (0,722–1,283) | 0,001 | 0,012 |
| TLR-4 | 0,565 (0,490–0,641) | 0,781 (0,565–0,996) | 0,085 | 0,400 (0,275–0,525) | 1,050 (0,811–1,290) | < 0,001 | 0,001 |
| IL-2 | 0,008 (0,002–0,013) | 0,007 (0,0004–0,014) | 0,546 | 0,002 (0,001–0,004) | 0,007 (0,002–0,012) | 0,407 | 0,644 |
| IL-2R | 0,082 (0,051–0,112) | 0,077 (0,025–0,130) | 0,326 | 0,034 (0,020–0,049) | 0,033 (0,018–0,048) | 0,747 | 0,025 |
| IL-10 | 0,202 (0,174–0,229) | 0,193 (0,130–0,257) | 0,469 | 0,204 (0,139–0,269) | 0,277 (0,214–0,340) | 0,031 | 0,571 |
| IL-10R | 0,157 (0,114–0,199) | 0,189 (0,124–0,254) | 0,365 | 0,149 (0,047–0,251) | 0,443 (0,258–0,627) | 0,002 | 0,280 |
| TGFb1 | 4,078 (3,281–4,875) | 2,897 (1,831–3,964) | 0,103 | 2,914 (1,963–3,865) | 3,159 (2,415–3,903) | 0,354 | 0,081 |

Všechna data jsou prezentována jako střední hodnoty relativní mRNA exprese (v závorce je uveden 95% interval spolehlivosti). Relativní mRNA exprese jednotlivých genů je vztažena k mRNA expresi referenčního genu HPRT1. N = počet pacientů.

citrátovým pufrém, pH 6 (120 °C) ve vysokotlakém histoprocessoru HistosPro (Milestone, MI, USA); En-Vision™ systém (Dako, Glostrup, Dánsko) byl použit k vizualizaci reakce. Imunohistochemické značení bylo vyhodnoceno pomocí tzv. histoskóre, které je násobkem pozitivitu (kategorie 1, 2, 3) a intenzity barvení (stupeň 1, 2, 3). Kategorie 1 odpovídá pozitivitě 0–25 % buněk, kategorie 2 znamená 25–60 % pozitivních buněk a kategorie 3 je pro více než 60 % pozitivních buněk ve vzorku. Intenzita barvení je stupně 1 (slabé), 2 (střední) nebo 3 (silné). Histoskóre tudíž dosahovalo hodnot 1, 2, 3, 4, 6 nebo 9. Všechny primární protilátky byly testovány na doporučených kontrolních tkáních, jako negativní kontrola byla použita polyklonální protilátka (Isotype Control, 1:100, Abcam).

Statistická analýza

Ke statistické analýze byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitney U test. Relativní exprese (poměr exprese genu zájmu a referenčního genu, což umožňuje korigovat rozdíly mezi množstvím vstupního materiálu u jednotlivých vzorků tkání při vlastní analýze) byly vypočteny pomocí GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Hodnota $p < 0,05$ byla považována jako statisticky významná.

VÝSLEDKY

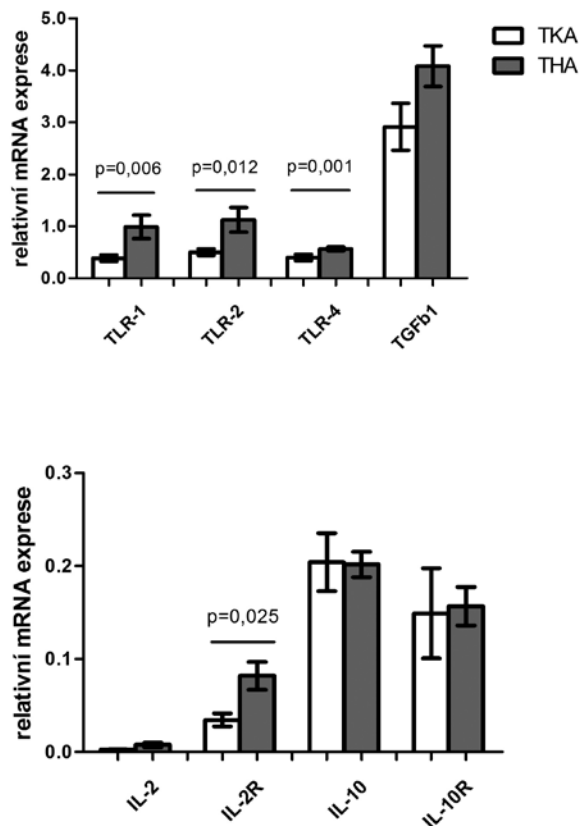
Porovnání mRNA expresních profilů v pseudosynoviální tkáni pacientů s asepticky uvolněnou TEP kyčle nebo kolena s příslušnými kontrolními tkáněmi

Abychom mohli stanovit transkripční aktivitu důležitých receptorů nespecifické imunity a vybraných regulačních cytokinů, porovnali jsme mRNA exprese TLR-1, -2, -4 a TGFb1, IL-2, IL-10 a jejich receptorů IL-2R, IL-10R v pseudosynoviální tkáni získané od pacientů s asepticky selhávající TEP kyčle a kolena a synoviální tkáni odebrané od pacientů s idiopatickou osteoartrózou kyčlí a kolena.

Zjistili jsme podobné expresní profily studovaných molekul mezi pseudosynoviální tkání u TEP kyčle a její kontrolní tkáni (osteoartróza kyčle), (obr. 2; tab. 3). Naopak v případě tkání z oblasti kolenního kloubu byla zjištěna nižší exprese TLR-1, -2, -4, IL-10, IL-10R ve srovnání s osteoartrózou kolena (obr. 3; tab. 3). V expresi mRNA u IL-2, IL-2R a TGFb1 nebyl v porovnání s kontrolami shledán rozdíl.

Porovnání mRNA expresí v pseudosynoviální tkáni mezi pacienty s asepticky uvolněnou TEP kyčle a kolena

Abychom mohli potvrdit nebo vyvrátit teorii o klinicko-patologické blízkosti zánětu probíhajícího kolem asepticky uvolněné TEP kyčle a kolena, porovnali jsme expresní profily TLR-1, -2, -4, a TGFb1, IL-2, IL-10 a jejich receptorů IL-2R, IL-10R mezi pacienty s asepticky selhávající TEP kyčle a kolena.



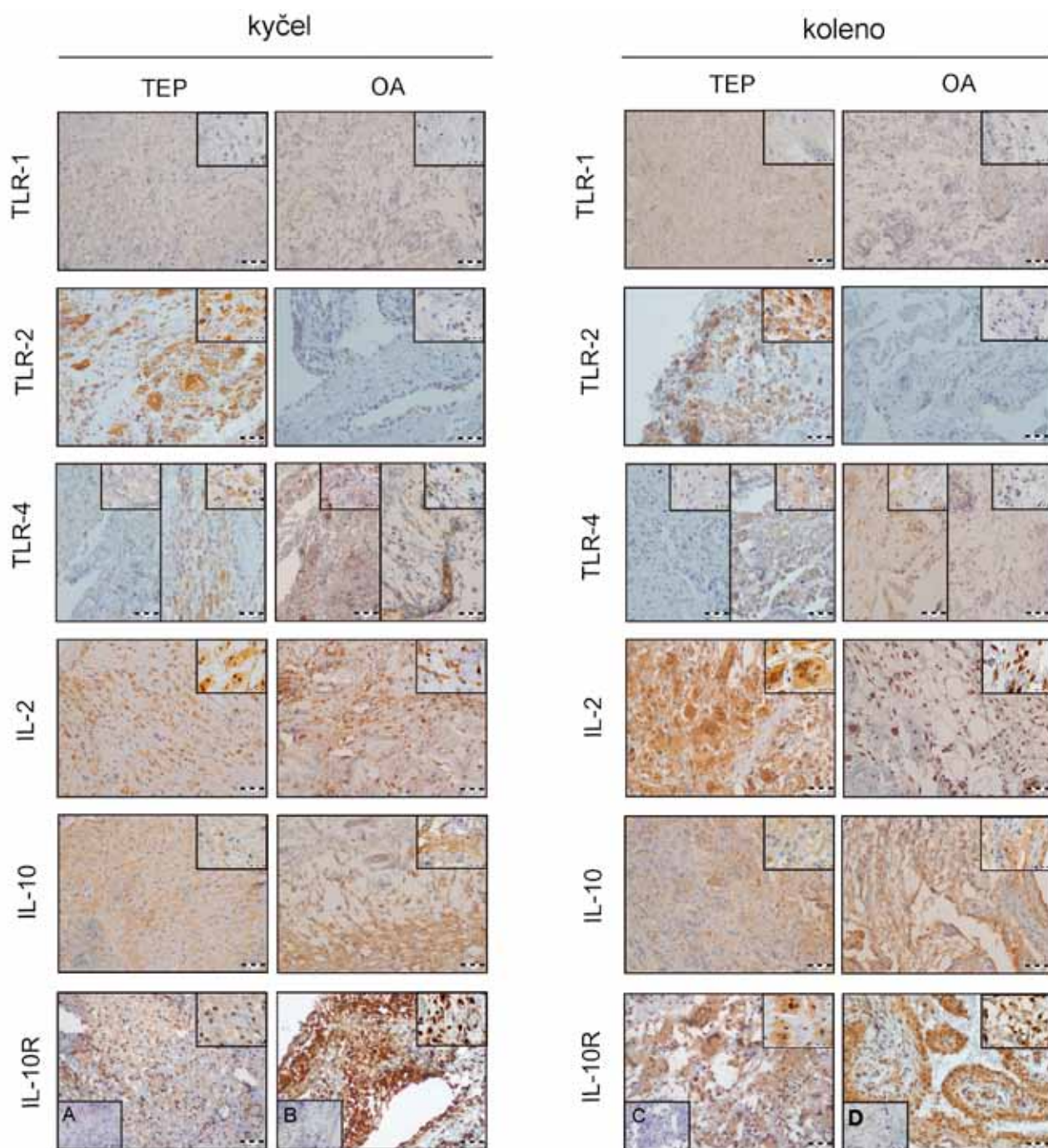
Obr. 4. Srovnání relativní mRNA exprese TLR-1, TLR-2, TLR-4, TGFb1, IL-2, IL-2R, IL-10, and IL-10R mezi pacienty s asepticky uvolněnou TEP kyčle (THA) a kolena (TKA). Chybové úsečky vyznačují standardní odchylku od střední hodnoty.

Zjistili jsme vyšší množství mRNA transkriptů TLR-1, -2, -4 a IL-2R u pacientů s TEP kyčle oproti stejné tkáni získané od pacientů s TEP kolena (obr. 4; tab. 3). Expres IL-2, IL-10, IL-10R, a TGFb1 se nelišily (obr. 4, tab. 3). Roli nehrálo ani to, zda byla tkáň odebraná z oblasti cementované nebo bezcementové kyčle.

Imunohistochemie

K určení lokalizace a semikvantitativnímu zhodnocení tkáňové exprese studovaných proteinů bylo provedeno imunohistochemické vyšetření. Stejně jako u genového profilování jsme porovnávali pseudosynoviální tkáň z okolí asepticky selhávající TEP kyčle a kolena, resp. příslušné kontrolní synoviální tkáň od pacientů s osteoartrózou.

Ve srovnání s kontrolními tkáněmi jsme zjistili nízké histoskóre u proteinu TLR-1 v pseudosynoviální tkáni z okolí TEP kyčle/kolena i u kontrolních tkání od pacientů s osteoartrózou (obr. 5). Naopak tkáňová exprese TLR-2 byla u aseptického uvolnění v obou lokalitách vyšší než u kontrol, přičemž hlavním producentem TLR-2 proteinu byly makrofágy (obr. 5). Expres TLR-4 vykazovala velkou interindividuální variabilitu mezi tkáněmi od pacientů s asepticky selhávajícími TEP kyčle



Obr. 5. Imunohistochemická detekce proteinů v pseudosynoviální tkáni odebrané od pacientů s asepticky uvolněnou TEP kyčle/kolena a od kontrolních jedinců s primární osteoartrózou (OA) kyčle/kolena – reprezentativní příklady (měřítko = 50 µm; výřez v pravém horním rohu: měřítko = 20 µm). Výřezy A,B,C,D představují reprezentativní příklady negativních kontrol (měřítko = 20 µm).

a kolena, resp. příslušnými kontrolami. Hlavními producenty TLR-4 byly opět makrofágy. Množství buněk pozitivních na IL-10R bylo vyšší u pacientů s aseptickým uvolněním TEP kolena ve srovnání s TEP kyčlí a u osteoartrózy ve srovnání s TEP kyčlí (obr. 5). IL-10R-pozitivita byla detekována zejména u makrofágů a fibroblastů. Naopak množství IL-10 pozitivních buněk se nelišilo ani mezi případy, ani při porovnání případů a kontrol. Detekovali jsme vyšší množství IL-2 pozitivních makrofágů ve tkáních případů s aseptickým uvolněním ve

srovnáním s kontrolami. Rozdíl však nebyl statisticky významný (obr. 5).

DISKUSE

Patogeneze aseptického uvolnění není stále zcela objasněná, ani přes 40 let trvající výzkum. V předložené studii jsme zjistili nízkou genovou expresi induktorů zánětlivé odpovědi (TLR) a vybraných regulátorů tkáňové homeostázy (IL-2/IL-2R, IL-10/IL-10R,

TGFb1) v pseudosynoviální tkáni pacientů reoperovaných pro aseptické selhání TEP kyčle a kolena. Nízká exprese TLR-1 u TEP kyčle a kolena byla potvrzena na proteinové úrovni, zatímco v případě TLR-2 jsme zjistili zvýšenou ve tkáních pacientů s aseptickým selháním TEP kolena a kyčle oproti příslušným kontrolám s osteoartrózou. Pro proteinovou distribuci TLR-4 byla charakteristická velká individuální variabilita. Přestože byla mRNA exprese IL-10 a IL-10R nižší u pacientů s asepticky uvolněnou TEP kolena než u kontrol, na tkáňové úrovni byl naopak detekován vyšší počet IL-10R pozitivních buněk u TEP kolena ve srovnání s kontrolami. V případě IL-2 a IL-2R nebyl rozdíl mezi genovou/proteinovou expresí u případů a kontrol zaznamenán.

Dosavadní výzkum naznačuje, že iniciálním krokem v patogenezi aseptického uvolnění a periprotetické osteolýzy by mohla být aktivace receptorů signalizujících nebezpečí, cizorodé látky a poškození tkání (danger- and pathogen-associated molecular patterns, endogenous alarmins), jako reakce na částice (ionty) uvolňující se z endoprotéz (24). Nejvíce studovanými senzory nespecifické imunity jsou TLR. V nedávné experimentální studii bylo zjištěno, že makrofágy stimulované částicemi polyethylenu a kostního cementu zvýšeně exprimují TLR-2 a TLR-4 (37). Prokázalo se také, že TLR-2 dokáže rozpoznat alkanovou strukturu, která vzniká při degradaci polyethylenu *in vivo* (23). Naopak TLR-4 se podílí na spuštění reakce vůči kovům (14). Po stimulaci TLR dojde k aktivaci zánětlivých drah, tkáňové rezidentní i nově distribuované makrofágy se polarizují do fenotypu M1 a vznikají mnohobuněčné obrovskobuněčné útvary (27). Některé práce naznačují, že TLR signalizace je také spojena s rozvojem tkáňové fibrózy a procesem hojení (30). Na roli TLR v souvislosti s aseptickým uvolněním a periprotetickou osteolýzou poprvé upozornili Takagi a spol. (35). Od té doby následovaly další studie, které však referovaly expresi TLR pouze ve tkáních z okolí TEP kyčle (17) anebo v experimentální situaci (28, 37). Podle jedné z nich byla mRNA exprese TLR-2, -4, -5 a -9 vyšší u pacientů s aseptickým uvolněním TEP kyčle než u pacientů s primární osteoartrózou (36). V naší studii s vyšším počtem případů jsme zvýšenou genovou expresi studovaných TLR u pseudosynoviální tkáně kolem TEP kyčle ve srovnání s primární osteoartrózou neprokázali. Na proteinové úrovni jsme potvrdili dřívější pozorování vyšší exprese u selhávající TEP kyčle oproti kontrole pouze pro TLR-2. U TLR-4 jsme prokázali velkou interindividuální variabilitu u pacientů s asepticky uvolněnou TEP.

Prioritním pozorováním v předložené studii je přehled expresních profilů TLR-1, -2 a -4 u asepticky selhávajících TEP kolen, které jsou velmi nízké. Při vzájemném porovnání expresních profilů v obou lokalitách jsme prokázali vyšší počet mRNA transkriptů u TLR-1, -2 a -4 a IL-2R u TEP kyčlí než u TEP kolen. Zmíněné rozdíly mohou odrážet specifické podmínky, za nichž selhává TEP kyčle ve srovnání s TEP kolena. Uplatnit se může například odlišný profil částic uvolňovaných kloubní náhradou. Je doloženo, že z povr-

chu TEP kyčle se uvolňuje výrazně vyšší počet částic o velikosti do 1 mikrometru ve srovnání s TEP kolena (22), které jsou biologicky mnohem agresivnější. Nelze vyloučit ani typ polyethylenu použitého k výrobě vložky u TEP kyčle a kolena (11). Určitou úlohu může sehrávat také odlišná hydromechanika kapalin v koleně a kyčli, resp. specifický zátěžový profil obou kloubů.

Současné znalosti podporují hypotézu, že krátce po implantaci kloubní náhrady a poté, co se uvolnila první kvanta částic polyethylenu (kovu, keramiky), dojde k aktivaci nespecifické imunity, která spustí zánět (1). U většiny pacientů se ovšem rozvine tzv. imunologická tolerance. Iniciální zánět se utlumí, obnoví se tkáňová kresba, sníží se exprese pro-zánětlivých cytokinů. V tomto případě pacient s kloubní náhradou žije řadu let, než dojde k postupné degradaci fixačního rozhraní v důsledku osteolýzy či únavového selhání. Pozdní stadium aseptického uvolnění by měla provázet zvýšená exprese senzorů tkáňového poškození a současně narůstající přítomnost regulátorů tkáňové homeostázy, jejichž exprese se spouští automaticky s aktivací pro-zánětlivých drah. Jedním z klíčových cytokinů v navození tolerance je TGFb1, multifunkční růstový faktor s proti-zánětlivým a imunomodulačním vlivem na makrofágy, osteoblasty a osteoklasty (13). Podílí se rovněž na vytváření rovnováhy mezi tvorbou a resorpcí extracelulární hmoty, a tím na hojení a remodelaci tkání. V jedné studii byla pozorována zvýšená exprese TGFb1 a TGFb2 v pseudopouzdrů TEP kyčle ve srovnání s kontrolou (15), což autoři dávali do souvislosti s „pro-fibrotickým a imunosupresivním efektem“ studovaných molekul, který se patrně uplatňuje také při růstu membrány rozhraní mezi TEP a kostním lůžkem. Také další autoři zjistili zvýšenou expresi TGFb1 u pacientů s aseptickým uvolněním a periprotetickou osteolýzou u TEP kyčle ve srovnání s kontrolou (33). My jsme pozorovali zvýšenou expresi TGFb1 mRNA u pacientů s TEP kyčle oproti kontrole, rozdíl však nedosáhl statistické významnosti.

Dalším studovaným cytokinem byl IL-2, který vykazuje široké spektrum kooperačních a antagonistických efektů při rozvoji zánětu a je zcela nepostradatelný pro vývoj a vyzrání regulačních T lymfocytů (19). K zájmu o tento pleiotropní cytokin nás motivovaly také výsledky naší předchozí studie, v níž jsme navrhli zařadit funkční polymorfismus genu pro IL-2 mezi potenciální genetické znaky podmiňující individuální vnímavost k rozvoji periprotetické osteolýzy a aseptického uvolnění u TEP kyčle (7). Ve srovnání s příslušnou kontrolou jsme zjistili u pacientů s TEP kyčle a kolena nižší množství IL-2 a IL-2R mRNA oproti kontrolním tkáním, zatímco na proteinové úrovni byl počet buněk exprimujících IL-2 srovnatelný. Zajímavé je, že předchozí studie nezachytila IL-2 pozitivní buňky kolem asepticky uvolněné TEP kyčle, z čehož její autoři usuzovali na minimální roli T lymfocytů ve fázi aseptického uvolnění (18). Jiní autoři naměřili zvýšené hladiny IL-2 pouze v případě, kdy vzorky periprotetické tkáně vložili před extrakcí/

kvantifikací proteinu do speciálního média (33). Přestože jsme na proteinové úrovni pozorovali vyšší počet IL-2 pozitivních buněk, jsou nutné další studie, které by podrobněji určily roli IL-2 v patogenezi aseptického uvolnění.

IL-10 je jedním z nejvýznamnějších proti-zánětlivých a homeostatických cytokinů, který ovlivňuje zejména monocyto-makrofágovou buněčnou linii (10). Předpokládá se jeho účast v útlumu pooperační zánětlivé odpovědi, v navození tolerance na TEP, i v pozdních fázích selhávání, kdy by měl odrážet aktivitu lokálních homeostatických mechanismů navozených chronickým zánětem, destrukcí tkání a poruchami metabolismu (12). Ve všech zmíněných rolích vystupuje M2 subpopulace makrofágů, která vyžívá mimo jiné pod silným vlivem IL-10 signalizace (27). Tyto buňky mají silné proti-zánětlivé a homeostatické vlastnosti. V naší studii jsme zjistili nízkou expresi genů pro IL-10 a IL-10R u TEP kolena ve srovnání s kontrolou, avšak na proteinové úrovni bylo množství IL-10R-pozitivních buněk vyšší oproti tkáním z okolí TEP kyčle i kontrolám. U IL-10 jsme rozdíl v počtu IL-10 pozitivních buněk mezi tkáněmi z oblasti TEP kyčle, kolena, resp. kontrolami nezjistili. Ve shodě s naší studií referují dvě práce nízké exprese IL-10 v periprotetické membráně z okolí selhávající TEP kyčle (25, 26). Naopak jiné studie uvádějí zvýšenou koncentraci IL-10 v synoviální tekutině (8) a v periprotetických tkáních z okolí uvolněné TEP kyčle (38). Studium role IL-10 a IL-10R v udržení lokální tkáňové rovnováhy bude určitě předmětem dalšího zkoumání.

Naše studie má několik koncepčních a metodologických omezení. Patří mezi ně retrospektivní sběr údajů o předoperačním stavu pacientů a o předchozí operaci. Je také zřejmé, že studie pokrývá jen malé spektrum molekul, které se podílejí na regulaci tkáňové odpovědi v okolí TEP. Bude proto nutné ověřit aktivitu dalších molekul a drah. Námitky je možné vznést vůči osteoartróze jako kontrolní tkáni, nicméně ve světové literatuře se jiná kontrolní tkáň neuvádí. Jsme si samozřejmě

vědomi toho, že tato tkáň nepřišla nikdy do styku s protézou či jejími vedlejšími produkty. V neposlední řadě je zřejmé, že existuje celá řada dalších faktorů, které podmiňují stabilitu TEP kyčle a kolena, ať již na straně pacienta, operátora nebo implantátu, což výrazně znesnadňuje interpretaci selhání TEP u každého jednotlivého případu.

ZÁVĚR

V předložené studii referujeme expresní profily u vybrané skupiny molekul podílejících se na indukci a regulaci zánětu, tkáňové homeostáze v okolí asepticky selhávající TEP kyčle a kolena. Úroveň genové exprese v periprotetických tkáních z okolí uvolněné TEP byla nízká ve srovnání s kontrolními tkáněmi od pacientů s osteoartrózou. Uvedené nálezy by mohly odrážet určitou míru vyčerpání (vyhoření) regulačních a homeostatických mechanismů v pozdějších fázích aseptického uvolnění. Dále jsme téměř u všech studovaných molekul zjistili nižší expresi v pseudosynoviální tkáni z okolí TEP kolena oproti stejné tkáni z oblasti TEP kyčle. To by mohlo poukazovat na odlišnosti v lokální tkáňové odpovědi na TEP, resp. její odpadové produkty v obou anatomických lokalizacích. Další výzkum by se měl soustředit na kompletizaci poznatků o roli nejdůležitějších pro-zánětlivých/regulačních drah v procesech aseptického uvolnění (například metodou cytokinových sítí). Detailní porozumění mechanismům aseptického uvolnění nám umožní navrhnout preventivní, případně i léčebné strategie, které by mohly prodloužit životnost kloubních náhrad.

Poděkování

Část imunogenetických prací (RT-PCR) byla provedena v Laboratoři imunogenomiky LF UP v Olomouci (vedoucí: prof. MUDr. Martin Petřek, CSc.).

Děkujeme také MUDr. Jiřímu Lošťákovi za jeho pomoc při sběru klinických a radiografických údajů u pacientů, kteří byli zařazeni do studie.

Literatura

1. ANDERSON, J. M., RODRIGUES, A., CHANG D. T.: Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.*, 20: 86–100, 2008.
2. ASSMANN, G., KASCH, R., HOFER, A., SCHULZ, A. P., KAYSER, R., LAHM, A., MERK, H., FLESSA, S.: An economic analysis of aseptic revision hip arthroplasty: calculation of partial hospital costs in relation to reimbursement. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 134: 413–420, 2014.
3. ENGH, G. A., AMMEEN, D. J.: Bone loss with revision total knee arthroplasty: defect classification and alternatives for reconstruction. *Instr. Course Lect.*, 48: 167–175, 1999.
4. GALLO, J., GOODMAN, S. B., KONTTINEN, Y. T., RASKA, M.: Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun.*, 19: 213–224, 2013.
5. GALLO, J., KOLAR, M., DENDIS, M., LOVECKOVA, Y., SAUER, P., ZAPLETALOVA, J., KOUKALOVA, D.: Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol.*, 31: 97–104, 2008.
6. GALLO, J., LOSTAK, J., LANGOVA, K.: Long-term survival of the uncemented Balgrist total hip replacement cup. *Int. Orthop.*, 37: 1449–1456, 2013.
7. GALLO, J., MRAZEK, F., PETREK, M.: Variation in cytokine genes can contribute to severity of acetabular osteolysis and risk for revision in patients with ABG 1 total hip arthroplasty: a genetic association study. *BMC Med. Genet.*, 10: 109, 2009.
8. GENTZSCH, C., KAISER, E., PLUTAT, J., SELLCKAU, R., WODTKE, J., DELLING, G.: cDNA array approach to cytokine expression profile of aseptic loosened hip arthroplasty. *Pathologie*, 23: 373–378, 2002.
9. GREEN, T. R., FISCHER, J., STONE, M., WROBLEWSKI, B. M., INGHAM, E.: Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials*, 19: 2297–2302, 1998.
10. HOFMANN, S. R., ROSEN-WOLFF, A., TSOKOS, G. C., HEDRICH, C. M.: Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin. Immunol.*, 143: 116–127, 2012.

11. ILLGEN, R. L., 2ND, FORSYTHE, T. M., PIKE, J. W., LAURENT, M. P., BLANCHARD, C. R.: Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles – an in vitro comparison of biologic activities. *J. Arthroplasty*, 23: 721–731, 2008.
12. IYER, S. S., CHENG, G.: Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.*, 32: 23–63, 2012.
13. KASAGI, S., CHEN, W.: TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell Biosci.*, 3: 4, 2013.
14. KONTTINEN, Y. T., PAJARINEN, J.: Adverse reactions to metal-on-metal implants. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 9: 5–6, 2013.
15. KONTTINEN, Y. T., WARIS, V., XU, J. W., JIRANEK, W. A., SORSA, T., VIRTANEN, I., SANTAVIRTA, S.: Transforming growth factor-beta 1 and 2 in the synovial-like interface membrane between implant and bone in loosening of total hip arthroplasty. *J. Rheumatol.*, 24: 694–701, 1997.
16. KRIEGEROVA, E., ARAKELYAN, A., FILLEROVA, R., ZATLOUKAL, J., MRAZEK, F., NAVRATILOVA, Z., KOLEK, V., DU BOIS, R. M., PETREK, M.: PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Mol. Biol.*, 9: 69, 2008.
17. LAHDEOJA, T., PAJARINEN, J., KOURI, V. P., SILLAT, T., SALO, J., KONTTINEN, Y. T.: Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *J. Orthop. Res.*, 28: 184–190, 2010.
18. LI, T. F., SANTAVIRTA, S., WARIS, V., LASSUS, J., LINDROOS, L., XU, J. W., VIRTANEN, I., KONTTINEN, Y. T.: No lymphokines in T-cells around loosened hip prostheses. *Acta Orthop. Scand.*, 72: 241–247, 2001.
19. LIAO, W., LIN, J. X., LEONARD, W. J.: Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38: 13–25, 2013.
20. LIN, T. H., TAMAKI, Y., PAJARINEN, J., WATERS, H. A., WOO, D. K., YAO, Z., GOODMAN, S. B.: Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF-kappaB as a therapeutic target. *Acta Biomater.*, 10: 1–10, 2014.
21. LOHMANN, C. H., DEAN, D. D., KOSTER, G., CASASOLA, D., BUCHHORN, G. H., FINK, U., SCHWARTZ, Z., BOYAN, B. D.: Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. *Biomaterials*, 23: 1855–1863, 2002.
22. MABREY, J. D., AFSAR-KESHMIRI, A., ENGH, G. A., SYCHTERZ, C. J., WIRTH, M. A., ROCKWOOD, C. A., AGRAWAL, C. M.: Standardized analysis of UHMWPE wear particles from failed total joint arthroplasties. *J. Biomed. Mater. Res.*, 63: 475–483, 2002.
23. MAITRA, R., CLEMENT, C. C., SCHARF, B., CRISI, G. M., CHITTA, S., PAGET, D., PURDUE, P. E., COBELLI, N., SANTAMBROGIO, L.: Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis. *Mol. Immunol.*, 47: 175–184, 2009.
24. MATZINGER, P.: An innate sense of danger. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 961: 341–342, 2002.
25. MORAWIETZ, L., GEHRKE, T., FROMMELT, L., GRATZE, P., BOSIO, A., MOLLER, J., GERSTMAYER, B., KRENN, V.: Differential gene expression in the periprosthetic membrane: lubricin as a new possible pathogenetic factor in prosthesis loosening. *Virchows Arch.*, 443: 57–66, 2003.
26. NABAE, M., INOUE, K., USHIYAMA, T., HUKUDA, S.: Gene expressions of antiinflammatory mediators in THR retrieved interfacial membranes. *Acta Orthop. Scand.*, 70: 149–154, 1999.
27. NICH, C., TAKAKUBO, Y., PAJARINEN, J., AINOLA, M., SALEM, A., SILLAT, T., RAO, A. J., RASKA, M., TAMAKI, Y., TAKAGI, M., KONTTINEN, Y. T., GOODMAN, S. B., GALLO, J.: Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 101: 3033–3045, 2013.
28. PEARL, J. I., MA, T., IRANI, A. R., HUANG, Z., ROBINSON, W. H., SMITH, R. L., GOODMAN, S. B.: Role of the Toll-like receptor pathway in the recognition of orthopedic implant wear-debris particles. *Biomaterials*, 32: 5535–5542, 2011.
29. POLLOCK, D., SYCHTERZ, C. J., ENGH, C. A.: A clinically practical method of manually assessing polyethylene liner thickness. *J. Bone Jt Surg.*, 83-A: 1803–1809, 2001.
30. REUVEN, E. M., FINK, A., SHAI, Y.: Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838: 1586–1593, 2014.
31. SABOKBAR, A., ITONAGA, I., SUN, S. G., KUDO, O., ATHANASOU, N. A.: Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J. Orthop. Res.*, 23: 511–519, 2005.
32. SALEH, K. J., HOLTZMAN, J., GAFNI, A., SALEH, L., DAVIS, A., RESIG, S., GROSS, A. E.: Reliability and intraoperative validity of preoperative assessment of standardized plain radiographs in predicting bone loss at revision hip surgery. *J. Bone Jt Surg.*, 83-A: 1040–1046, 2001.
33. SHANBHAG, A. S., KAUFMAN, A. M., HAYATA, K., RUBASH, H. E.: Assessing osteolysis with use of high-throughput protein chips. *J. Bone Jt Surg.*, 89-A: 1081–1089, 2007.
34. TAKACOVA, S., SLANY, R., BARTKOVA, J., STRANECKY, V., DOLEZEL, P., LUZNA, P., BARTEK, J., DIVOKY, V.: DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo. *Cancer Cell.*, 21: 517–531, 2012.
35. TAKAGI, M., TAMAKI, Y., HASEGAWA, H., TAKAKUBO, Y., KONTTINEN, L., TIAINEN, V. M., LAPPALAINEN, R., KONTTINEN, Y. T., SALO, J.: Toll-like receptors in the interface membrane around loosening total hip replacement implants. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 81: 1017–1026, 2007.
36. TAMAKI, Y., TAKAKUBO, Y., GOTO, K., HIRAYAMA, T., SASAKI, K., KONTTINEN, Y. T., GOODMAN, S. B., TAKAGI, M.: Increased expression of toll-like receptors in aseptic loose periprosthetic tissues and septic synovial membranes around total hip implants. *J. Rheumatol.*, 36: 598–608, 2009.
37. VALLADARES, R. D., NICH, C., ZWINGENBERGER, S., LI, C., SWANK, K. R., GIBON, E., RAO, A. J., YAO, Z., GOODMAN, S. B.: Toll-like receptors-2 and 4 are overexpressed in an experimental model of particle-induced osteolysis. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 102: 3004–3011, 2014.
38. WANG, C. T., LIN, Y. T., CHIANG, B. L., LEE, S. S., HOU, S. M.: Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials*, 31: 77–82, 2010.

Korespondující autor:

Prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP
a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz