

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. Κ. ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΥΜΕΝΙΤΙΔΩΝ ΣΕ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ
ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΑΚΟΥ Π. ΜΑΡΙΑ
ΙΑΤΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΑΡΑΧΑΛΙΟΣ ΘΕΟΦΙΛΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΙΩΑΝΝΟΥ ΜΑΡΙΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΕΛΕΚΟΣ ΜΙΧΑΗΛ

Καθηγητής Ουρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΑΡΑΧΑΛΙΟΣ ΘΕΟΦΙΛΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΣΙΛΙΜΙΓΚΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής ΚαρδιοΘωρακοΧειρουργικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΑΨΩΡΙΤΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοπαθολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΙΩΑΝΝΟΥ ΜΑΡΙΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*στην μητέρα μου
& στην Λίλια*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Αρθρικός υμένας	
1.2. Ιστολογία του αρθρικού υμένα.....	9
1.2.1. Προέλευση-Ταυτοποίηση των κυττάρων του αρθρικού υμένα.....	10
1.2.1.α. Ανοσοϊστοχημική μελέτη των κυττάρων του αρθρικού υμένα	11
1.2.1.β. Μελέτη των κυττάρων του αρθρικού υμένα με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	12
1.2.1.γ. Λειτουργίες των κυττάρων του αρθρικού υμένα.....	13
2. Αρθροπλαστική.....	15
2.1. Ιστορική αναδρομή των επεμβάσεων της αρθροπλαστικής.....	15
2.2. Είδη αρθροπλαστικής.....	17
2.3. Σύνδεση των προθεμάτων.....	18
2.4. Βιούλικά για την κατασκευή των προθεμάτων.....	19
2.5. Επιπλοκές της αρθροπλαστικής.....	21
3. Χαλάρωση της αρθροπλαστικής.....	22
3.1. Ομοιοστασία του οστού και οστεόλυση.....	23
3.2. Ιστοπαθολογική εικόνα των περιπροθετικών ιστών.....	23
3.2.α. Χαλαρά προθέματα με οστεόλυση.....	24
3.2.β. Χαλαρά προθέματα χωρίς οστεόλυση.....	24
3.2.γ. Καλά σταθεροποιημένα προθέματα, χωρίς οστεόλυση.....	24
3.2.δ. Πολυαιθυλένιο.....	24
3.2.ε. Μέταλλο.....	25
3.2.στ. Κεραμικά υλικά	25
3.2.η. Σωματίδια ενδογενούς προέλευσης.....	25
Εικόνες	
3.3. Αίτια της άσηπτης χαλάρωσης.....	28
3.3.1. Νόσος των σωματιδίων (particle disease)	
3.3.1.α. Τσιμέντο.....	28
3.3.1.β. Πολυαιθυλένιο.....	29
3.3.1.γ. Μέταλλο.....	30
3.3.1.δ. Κεραμικά υλικά.....	32
3.3.2. Εναλλακτικές θεωρίες της άσηπτης χαλάρωσης	
3.3.2.1. Δραστικό μεσάρθριο διάστημα.....	33
3.3.2.1.α. Μικροκινήσεις των ενδοπροθεμάτων.....	33
3.3.2.1.β. Μη φόρτιση του οστού.....	34
3.3.2.1.γ. Υψηλή πίεση του ενδοαρθρικού υγρού.....	34
3.3.2.2. Ενδοτοξίνη.....	35
3.3.2.3. Ατομικές ή γενετικές αποκλίσεις.....	36
3.3.2.4. Συμπέρασμα.....	37

4. Μακροφάγα	
4.1. Βασικά στοιχεία της βιολογίας των μακροφάγων.....	38
Πίνακας	
4.2. Ενεργοποίηση των μακροφάγων	40
4.2.1. Ρύθμιση της ενεργοποίησης των μακροφάγων.....	40
4.2.1.α. Μη-ειδική ανοσία.....	40
4.2.1.β. Εδική ανοσία.....	41
4.2.1.γ. Ενεργοποίηση των μακροφάγων με τον κλασσικό τύπο 1 ενεργοποίησης.....	42
4.2.1.δ. Ενεργοποίηση των μακροφάγων με τον εναλλακτικό τύπο 2 ενεργοποίησης.....	43
4.2.2. Ρυθμιστές της ρύθμισης των μακροφάγων.....	43
4.2.2.1. Μικρόβια.....	44
4.2.2.2. Μακροφάγα (αυτοκρινής ρύθμιση των μακροφάγων).....	44
4.2.2.3. Τ λεμφοκύτταρα.....	45
4.2.2.4. Ορμόνες.....	45
4.2.2.5. Ξένα σώματα.....	46
4.2.3. Απενεργοποίηση των μακροφάγων.....	48
5. Βιολογία της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης	
5.1. Κυτταρική βιολογία της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης	
5.1.1. Μακροφάγα.....	50
5.1.2. Οστεοκλάστες.....	52
5.1.3. Οστεοβλάστες.....	53
5.1.4. Ινοβλάστες.....	53
5.1.5. Λεμφοκύτταρα.....	54
5.2. Μοριακή βιολογία της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης	
5.2.α. RANK.....	55
5.2.β. RANKL.....	55
5.2.γ. OPG.....	55
5.2.1. Ενεργοποιημένα σηματοδοτικά «μονοπάτια» μέσω RANK- RANKL.....	56
5.2.2.1. NFκB «σηματοδότηση».....	57
5.2.2.2. MAPK «σηματοδότηση».....	58
5.2.2.3. Υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων.....	59
5.2.2.4. Αλληλεπίδραση του RANKL-RANK με άλλα σηματοδοτικά «μονοπάτια».....	60
5.3. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης.....	61
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	
1. Υλικό και μέθοδος.....	64
2. Αποπαραφίνωση των τομών.....	65
3. Ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα	
3.1. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για CD68.....	65
3.2. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για galectin-3.....	66
3.3. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Ινδολεαμίνη.....	66
3.4. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για MyD88.....	67
3.5. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για MUM-1.....	67
3.6. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Factor XIIIa.....	68
3.7. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για CD1a.....	68
3.8. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για EGFR.....	69

3.9. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για HIF-1alpha.....	69
3.10. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για NF-kappaB.....	70
4. Ευρήματα	
4.1. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με CD68.....	72
4.2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με galectin-3.....	72
4.3. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με Ινδολεαμίνη.....	72
4.4. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με MyD88.....	72
4.5. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με MUM-1.....	72
4.6. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με Factor XIIIa.....	73
4.7. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με CD1α.....	73
4.8. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με EGFR.....	73
4.9. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με HIF-1alpha.....	73
4.10. Ανοσοϊστοχημική μελέτη με NF-kappaB.....	74
5. Συζήτηση	
5.1. CD68.....	75
5.2. galectin-3.....	75
5.3. Ινδολεαμίνη.....	77
5.4. MyD88.....	77
5.5. MUM-1.....	78
5.6. Factor XIIIa.....	79
5.7. CD1α.....	80
5.8. EGFR.....	80
5.9. HIF-alpha.....	82
5.10. NFkB.....	83
Πίνακες	
Εικόνες	
Περίληψη.....	90
Summary.....	91
Βιβλιογραφία.....	92

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου, για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής Κον Γ. Κ. Κουκούλη, για την εμπιστοσύνη, που έδειξε στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια και για την ηθική υποστήριξή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκ. Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομικής Κα Μ. Γ. Ιωάννου, για την σημαντική βοήθειά της και την αμέριστη υποστήριξή της, από το ξεκίνημα της ειδικότητάς μου, στο Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέχρι σήμερα.

Θα επιθυμούσα να εκφράσω ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή της Ορθοπαιδικής, Κον Κ. Μαλίζο, όπως και στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ορθοπαιδικής, Κον Θ.Καραχάλιο, για την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υλικό της μελέτης και για την πολύτιμη βοήθεια την οποία προσέφεραν κατά την διάρκεια της παρούσης μελέτης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΥΜΕΝΑΣ (synovial membrane ή synovium)

Στις φυσιολογικές διαρθρώσεις, η αρθρική κοιλότητα περιβάλλεται από μια ινώδη κάψα (αρθρικός θύλακος), η οποία προσφύεται στην περιφέρεια των αρθρικών επιφανειών, τις οποίες και συνδέει. Η λεία εσωτερική επιφάνεια του αρθρικού θυλάκου, γνωστή ως αρθρικός υμένας, επαλείφει την αρθρική κοιλότητα, χωρίς να εκτείνεται πέρα από τα όρια των αρθρικών χόνδρων. Επιπλέον, περιβάλλει ενδοαρθρικούς συνδέσμους και τένοντες.

Εμβρυολογικά, ο αρθρικός υμένας δημιουργείται μετά την 6^η εβδομάδα της κύησης, από μεσεγχοματικά κύτταρα της μεσοχόνδριας στιβάδας, του αρχέγονου σκελετικού προπλάσματος.

1.2. Ιστολογία του αρθρικού υμένα

Ο αρθρικός υμένας δεν αφορά σε ορογόνο, αλλά καθαρά σε συνδετικό ιστό.

Παρουσιάζει δύο στιβάδες. Μια εσωτερική, κυτταροβριθή στιβάδα (synovial intima) και μια εξωτερική αγγειοβριθή στιβάδα (synovial subintima), η οποία συνδέεται με τον αρθρικό θύλακο.

Στους ανθρώπινους αρθρικούς ιστούς δεν υπάρχει βασική μεμβράνη μεταξύ του έσω και έξω χιτώνα του αρθρικού υμένα, καθώς και δομές δίκην δεσμοσωματίων μεταξύ των κυττάρων (Barland και συν.1962, Ghadially και συν.1983, Henderson & Pettipher 1985). Δομές δίκην δεσμοσωματίων εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες σχετίζονται με υπερπλασία των συνοβιοκυττάρων (Ghadially και συν. 1978).

Ο έσω χιτώνας αποτελείται από έναν έως τέσσερις στρώσεις κυττάρων, εμβαπτισμένων μέσα σ'ένα κοκκώδες χαλαρό μεσοκυττάριο στρώμα. Τα κύτταρα παρουσιάζουν ποικιλία ως προς το σχήμα τους, μπορεί να έχουν εμφάνιση αποπλατυσμένη, επιμήκη ή πολυεδρική, ως προς το μέγεθος τους και τον προσανατολισμό τους.

Αναγνωρίζονται δύο μορφολογικά διαφορετικοί τύποι κυττάρων: κύτταρα τύπου-A ή συνοβιακά μακροφάγα (synovial macrophages) και κύτταρα τύπου-B ή κύτταρα ομοιάζοντα με ινοβλάστες (fibroblast-like cells) (Barland και συν.1962, Graabaek και συν.1982,1984, Edwards 1994).

Τα κύτταρα τύπου A είναι συνήθως στρογγυλά, με ωοειδείς ή στρογγυλούς πυρήνες και φυσιολογικά ένα πυρήνιο. Εντοπίζονται στο ανώτερο τμήμα του έσω χιτώνα, περίπου το μισό των κυτταρικών σωμάτων επεκτείνεται πάνω από την επιφανειακή γραμμή του αρθρικού υμένα.

Τα B-κύτταρα βρίσκονται αρκετά μακριά από τον αρθρική κοιλότητα, όπου η εξωτερική επιφάνεια του αρθρικού υμένα έχει πάχος πάνω από ένα κύτταρο.

Τα κύτταρα τύπου A και B, είναι δυνατό να διατάσσονται σε στενή σχέση το ένα με το άλλο (closely packed) σε ορισμένες θέσεις και σε άλλες να είναι αραιά τοποθετημένα μεταξύ τους, επιτρέποντας την είσοδο και διασπορά ιστού του έξω χιτώνα ανάμεσα στα επιφανειακά κύτταρα και την άμεση επαφή αυτού με την αρθρική κοιλότητα.

Ο έξω χιτώνας συνήθως αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, ενίοτε είναι δυνατό να περιέχει περισσότερο ινώδη συνδετικό ιστό. Τα κυτταρικά του συστατικά περιλαμβάνουν, λιπώδη κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα, και σιτευτικά κύτταρα.

Το πάχος και η μορφολογία της συνοβιακής μεμβράνης, διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τους τύπους της, οι οποίοι αρχικά ταξινομήθηκαν από τον Key (1928) ως χαλαρός συνδετικός, λιπώδης και ινώδης. Η ταξινόμηση αυτή έγινε με βάση την σύνθεση του συνδετικού ιστού του έξω χιτώνα και ισχύει μέχρι σήμερα.

Στον χαλαρό συνδετικό τύπο (areolar) , ο αρθρικός υμένας αποτελείται από έναν σημαντικά κυτταροβριθή έσω χιτώνα και υποκείμενο (subintimal) χαλαρό συνδετικό ιστό, πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία. Στον λιπώδη τύπο (adipose), υπάρχει μια μόνο στιβάδα επιπεδωμένων κυττάρων και υπό αυτών μια στιβάδα λιποκυττάρων.

Τέλος, στον ινώδη τύπο (fibrous), μια λεπτή κυτταρική στιβάδα άμεσα έρχεται σε επαφή με πυκνό κολλαγονώδη ιστό. Μικτοί τύποι είναι παρόντες στις θέσεις συμβολής των διαφόρων τύπων.

Στον χαλαρό συνδετικό τύπο ο αρθρικός υμένας παρουσιάζει πτυχώσεις στην επιφάνειά του, δίκην δακτύλων χειρός (finger-like), οι οποίες είναι δυνατό να προεκβάλλουν στην αρθρική κοιλότητα και ερμηνεύονται ως συνοβιακές λάχνες (synovial villi) (Shively & van Sickle 1977, Leach και συν. 1988). Οι λάχνες, οι οποίες είναι ορατές μακροσκοπικά, είναι αγγειοβριθείς, ποικίλουν ως προς το σχήμα και το μέγεθός τους και αποτελούνται από κολλαγόνα ινίδια. Βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές της άρθρωσης -για παράδειγμα , σε θέσεις όπου η συνοβιακή μεμβράνη καλύπτει χαλαρό συνδετικό ιστό. Οι συνοβιακές λάχνες μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανάπτυξης εκφύσεων του αρθρικού υμένα ή διάσπασης και απόσπασης του επιφανειακού ιστού ή και των δύο διεργασιών. Φλεγμονή ή ερεθισμός του αρθρικού υμένα, προκαλεί υπερβολική δημιουργία λαχνών και σε παθολογικές καταστάσεις οι προεκτάσεις των λαχνών είναι δυνατόν να καλύπτουν εξ'ολοκλήρου την εσωτερική επιφάνεια του αρθρικού υμένα.

Επιπρόσθετα, στις λάχνες, ο αρθρικός υμένας μπορεί επίσης να περιέχει πεπαχυσμένες πτυχές, οι οποίες εκτείνονται μέσα στην αρθρική κοιλότητα (π.χ. ενάρθριος πτυχή της επιγονατίδας). Επιπλέον, λιπώδης ιστός μπορεί να συγκεντρωθεί μέσα στον αρθρικό υμένα δημιουργώντας δέσμες λίπους (fat pads). Οι τελευταίες δρουν ως ένα ελαστικό και ευλύγιστο στρώμα , που μειώνει τις πιέσεις κατά την κίνηση, και εκτείνεται μέσα σε ακανόνιστες περιοχές στην αρθρική κοιλότητα. Αυτή η περιοχή έντονα κυτταροβριθή και αγγειοβριθή, θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την ομοιοστασία της αρθρικής κοιλότητας , λόγω της παραγωγής συνοβιακού υγρού, απομάκρυνση των ενδοαρθρικών συγκριμμάτων και ρύθμιση των ανοσολογικών συμβάντων.

Επομένως, ο χαλαρός συνδετικό τύπος προτιμάται για την μορφολογική και παθολογική μελέτη των κυττάρων του αρθρικού υμένα.

1.2.1. Προέλευση- Ταυτοποίηση των κυττάρων του αρθρικού υμένα

Η προέλευση και η φύση των δύο κύριων κυτταρικών τύπων του αρθρικού υμένα είναι αμφιλεγόμενη. Δεν είναι ακόμη σαφές εάν τα κύτταρα τύπου Α και Β, αντιπροσωπεύουν δύο ξεχωριστούς κυτταρικούς πληθυσμούς με διαφορετική προέλευση, ή εάν αποτελούν δύο διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις, που εκδηλώνονται από έναν μόνο κυτταρικό τύπο.

Όσον αφορά την προέλευσή τους, έχει αποδειχθεί ανοσοϊστοχημικά, ότι τα κύτταρα τύπου A προέρχονται από τον μυελό των οστών, σχετικά με τα κύτταρα τύπου B, η προέλευσή τους είναι άγνωστη λόγω απουσίας ειδικών κυτταρικών δεικτών.

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των των κυττάρων του αρθρικού υμένα, πραγματοποιήθηκε κυρίως με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Αν και υπήρχαν αμφιλεγόμενες απόψεις, όσον αφορά την ταξινόμησή τους, είναι γενικά αποδεκτό ότι, ο έσω χιτώνας περιέχει δύο μορφολογικά διαφορετικούς τύπους κυττάρων: μακροφάγα (τύπος A) και κύτταρα δίκην ινοβλαστών (fibroblast-like, type B)(Barland και συν.1962, Graabaek και συν.1982,1984, Edwards 1994).

Ο ενδιάμεσος τύπος (transitional cell) έχει ταυτοποιηθεί ως ο τρίτος τύπος κυττάρων (Barland και συν.1962,Shannon & Graham 1971, Fell και συν. 1976, Nishijma 1981) οδηγώντας μας στην ιδέα ότι αυτοί οι τρεις τύποι είναι απλώς μορφολειτουργικές παραλλαγές της ίδιας κυτταρικής σειράς. Όμως, η ύπαρξη του τρίτου τύπου αμφισβητήθηκε μετά από λεπτομερέστερες παρατηρήσεις, σε αρθρώσεις ποντικών, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο(Graabaek και συν.1982,84).

Προηγούμενες μελέτες, τεκμηριώνουν την υπεροχή των τύπου A κυττάρων, σε ανθρώπινο ιστό (Barland και συν.1962), ιστό ποντικών (Roy & Ghadially 1967), ιστό γατών (Groth 1975) και ιστό βοοειδών (Leach και συν. 1988), ερχόμενες σε ασυμφωνία με ιστολογικές και άλλες μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Krey & Cohen 1973, Johansson & Rejno 1976, Okada και συν. 1981, Graabaek 1982,1984, Horky 1984, Edwards 1994, Kittamura και συν.1999). Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να εξηγηθεί από την ανομοιογενή κατανομή των κυττάρων τύπου A, καθώς και από την παρερμηνεία πολλών κυττάρων τύπου B, ως ενδιάμεσων κυττάρων (Graabaek 1982). Από την άλλη πλευρά, οι Jilani & Ghadially (1986), υποστηρίζουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της ηλικίας και των μεταβολών στον κυτταρικό πλυθισμό. Ο αριθμός των B-κυττάρων μειώνεται σημαντικά με την ηλικία, ενώ αυξάνει ,σχετικά, ο αριθμός των κυττάρων-A.

Η ονομασία των κυττάρων του αρθρικού υμένα, παρουσιάζει ποικιλίες, που αντιστοιχούν στις ανωτέρω εκτιθέμενες ποικιλίες απόψεις. Για τα μακροφάγα ονομασίες όπως, τύπου A κύτταρα, συνοβιακά μακροφάγα, M κύτταρα, A κύτταρα (A: absorptive), V-κύτταρα (vacuole), έχουν δοθεί, ενώ για τα κύτταρα ομοιάζοντα με ινοβλάστες, τύπου B κύτταρα, συνοβιοβλάστες, F κύτταρα, S κύτταρα (secretory), ER κύτταρα (endoplasmic reticulum).

1.2.1.α. Ανοσοϊστοχημική μελέτη των κυττάρων του αρθρικού υμένα

Οι κυτταρικοί πληθυσμοί του φυσιολογικού αρθρικού υμένα , παρουσιάζουν τον εξής ανοσοφαινότυπο:

- σημαντικός αριθμός CD3+ T-λεμφοκυττάρων (CD4+/βοηθητικά και CD8+/κυτταροτοξικά), τα οποία παρουσιάζουν κυρίως περιαγγειακή κατανομή
- απουσία L26+ B-λεμφοκυττάρων

- Kp1+ μακροφάγα (κύτταρα τύπου A), ως επί το πλείστον στην επιφάνεια της συνοβιακής μεμβράνης

- HLA-DR+ κύτταρα τύπου A και B, στον έσω χιτώνα και διάχυτα

- CD32+, CD34+,CD39+,CD54+ ενδοθηλιακά κύτταρα. (Singh et al 2003)

Τα κύτταρα τύπου A εκφράζουν μια πληθώρα κυτταρικών δεικτών, όπως το λευκοκυτταρικό κοινό αντιγόνο(Leucocyte Common Antigen, LCA ή CD45, καθώς και μια σειρά αντιγόνων που σχετίζονται με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα (μυελοειδή αντιγόνα). Σ'αυτά περιλαμβάνονται: CD11a,b,c και CD18, CD13, CD14,CD16

(FcRIII receptor), CD31, CD32, (FcRII receptor), CD33,CD37, CD39, CD54 ή ICAM-1, CD64 (FcRI receptor),CD68, CD71 (transferrin receptor). (Athanasou &Quinn 1991, Athanasou 1995). Το κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (CD45) εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη όλων των κυττάρων που προέρχονται από το αιμοποιητικό σύστημα καθώς και σε κύτταρα του συστήματος μονοκυττάρων/μακροφάγων.

Τα συνοβιακά μακροφάγα εκφράζουν αντιγόνα που σχετίζονται με την λειτουργία των λεμφοκυττάρων (Lymphocyte Function Associated (LFA)-antigen). Πρόκειται για μόρια της κυτταρικής μεμβράνης, που εμπλέκονται σε αντιδράσεις προσκόλλησης (adhesion molecules). Τα εν λόγω μόρια αποτελούνται από τρία ετεροδιμερή με διαφορετικές α-άλυσους μοριακού βάρους 180 kD (LFA-1), 155 kD (CR3), 150 kD (p150/95) και μια κοινή β-άλυσο, 95 kD. Αυτές οι διαφορετικές υπομονάδες αναφέρονται ως CD11a, CD11b, CD11c ανάλογα και η κοινή β-άλυσο ως CD18. Τα συνοβιακά μακροφάγα παρουσιάζουν έντονη έκφραση στην α-άλυσο του αντιγόνου CR3 και την κοινή β-άλυσο. Το αντιγόνο CR3 θεωρείται σημαντικός υποδοχέας στην πρόσληψη και φαγοκυττάρωση κυττάρων και σωματιδίων από τα κύτταρα τύπου A. Επίσης εκφράζουν και το μόριο προσκόλλησης των κυττάρων CD54 (ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule-1).

Επιπλέον, τα εν λόγω κύτταρα εκφράζουν και άλλους υποδοχείς σημαντικούς στην φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρωση, στους οποίους περιλαμβάνονται τρεις υποδοχείς του Fc τμήματος της ανοσοσφαιρίνης- FcRI(CD64), FcRII(CD32) και FcRII(CD16). Η έκφραση υποδοχέων για την μεταφορά του σιδήρου (CD71), εξηγεί την ικανότητα των μακροφάγων του αρθρικού υμένα να αθροίζουν αιμοσιδηρίνη, ένα από τα χαρακτηριστικά των ειδικών μονοκύτταρων φαγοκυττάρων.

Η έκφραση των μακροφαγικών δεικτών CD14 και CD68 σε συνδυασμό με τους υπόλοιπους μονοκυτταρικούς/μακροφαγικούς δείκτες οδηγεί στη άποψη ότι τα μακροφάγα του αρθρικού υμένα, αποτελούν μέρος του συστήματος μονοκυττάρων/μακροφάγων.

1.2.1.β. Μελέτη των κυττάρων του αρθρικού υμένα με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Κύτταρα τύπου-A: Τα επιφανειακά A-κύτταρα καλύπτονται από μικρολάχνες και μικροπτυχώσεις (ψευδοπόδια), οι οποίες είναι δομές χαρακτηριστικές για τα τυπικά μακροφάγα. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (transmission electron microscopy) διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα A διαθέτουν άφθονα λυσοσώματα , μεγάλα κενοτόπια, των οποίων το περιεχόμενο και η λειτουργία παραμένει άγνωστη, καθώς και φαγοκυτταρικά κυστίδια, συχνά εγγύς της αρθρικής κοιλότητας. Επίσης, διαθέτουν εκτεταμένο σύστημα Golgi αλλά όχι καλά αναπτυγμένο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Κύτταρα τύπου B: Αυτά τα κύτταρα διαθέτουν σχετικά μεγάλο πυρήνα, σε σχέση με το μικρό ποσό του γύρω κυτταροπλάσματος. Ένα από τα πιο εμφανή χαρακτηριστικά τους είναι το καλά διαμορφωμένο ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο διαθέτουν και είναι κατανεμημένο εξ' ολοκλήρου μέσα στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας ενεργό σύνθεση πρωτεϊνών. Γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα αυτά, ονομάστηκαν από τους Soutwick & Bench (1971) ER κύτταρα. Ριβοσώματα εύκολα αναγνωρίζονται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και ελεύθερα σε ομάδες (clusters) μέσα στο κυτταρόπλασμα. Όπως και τα κύτταρα A, διαθέτουν κάποια κυστίδια και κενοτόπια και ένα λιγότερο αναπτυγμένο σύστημα Golgi στο κυτταρόπλασμα. Τα

κύτταρα τύπου Β, περιέχουν ένα μικρό αριθμό μεγάλων κενοτοπίων στην κορυφή των κυτταροπλασματικών τους αποφύσεων. Εφόσον τα κενοτόπια και τα λυσοσώματα αποτελούν ένα χαρακτηριστικό δείκτη των Α κυττάρων, η παρουσία τους στα Β- κύτταρα, οδηγεί σε λάθος ερμηνεία των κυττάρων αυτών ώστε να επονομάζονται ενδιάμεσα κύτταρα. Η πλασματική μεμβράνη των Β-κυττάρων αποκαλύπτει πολυάριθμους, μικρούς εγκολεασμούς, με λεία τοιχώματα, 60-90nm διαμέτρου. Επίσης, τα Β-κύτταρα είναι γνωστό ότι διαθέτουν καλά διαμορφωμένες επιμήκεις δεσμίδες αποτελούμενες από μικροϊνίδια και ενδιάμεσα ινίδια (10nm ινίδια) στο κυτταρόπλασμά τους. Η ανάπτυξη των ινιδίων ακτίνης σ' αυτά τα κύτταρα υπενθυμίζει την σχέση τους με τα λεία μυικά κύτταρα ή μυοινοβλάστες. Επιπλέον, τα Β-κύτταρα συχνά περιέχουν έναν μονήρη κροσσό, το οποίο συνήθως επεκτείνεται από τον πυθμένα ενός βαθύτερου εγκολεασμού της κυτταρικής μεμβράνης. Ένα από τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά των Β-κυττάρων είναι η ανάπτυξη κυτταροπλασματικών αποφύσεων, οι οποίες παρουσιάζουν ποικιλία στο σχήμα και την έκτασή τους. Με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατέδειξαν το ακανόνιστο, συχνά δενδριτικό σχήμα των Β-συνοβιοκυττάρων (Barland και συν. 1962, Southwick & Bensch 1971, Graabaek 1985, Wilkinson και συν. 1992). Τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν μια ή περισσότερες κυτταροπλασματικές αποφύσεις οι οποίες εκτείνονται προς την επιφάνεια της συνοβιακής μεμβράνης. Τα Β-συνοβιοκύτταρα, που βρίσκονται πλησίον της αρθρικής κοιλότητας προεκβάλλουν αρκετές επιμήκεις, ραβδοειδείς κυτταροπλασματικές αποφύσεις, ακτινωτά κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται σε βαθύτερες στιβάδες του έσω συνοβιακού χιτώνα εκτείνουν μια κορυφαία απόφυση προς την αρθρική κοιλότητα, οι αποφύσεις τους απλώνονται στην επιφάνεια και διακλαδίζονται με ένα δενδριτικό τρόπο. Αυτές οι κυτταροπλασματικές αποφύσεις δημιουργούν αρκετά ομοιόμορφα δίκτυα στην επιπολής στιβάδα του έσω χιτώνα, αν και η πυκνότητά τους διαφέρει κατά περιοχές. Συνήθως έχουν να επιδείξουν ένα πυκνά κατανεμημένο δίκτυο στην επιφάνεια, ως έναν αφοριστικό υμένα (lamina limitans). Δυστυχώς, η λειτουργική σημασία των δικτύων αυτών είναι ασαφής, αν και εμπλέκονται αδρά στην ρύθμιση της μεταφοράς του αρθρικού υγρού. Τα Β- κύτταρα, στα τρωκτικά, περιέχουν εκκριτικά κοκκία, που υποδηλώνουν ενδοκρινική λειτουργία. (Linck & Porte 1978, Okada και συν. 1981, Graabaek 1984). Βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, κυρίως συγκεντρωμένα στην περιφέρεια, χωρίς σαφή πολικότητα προς την αρθρική κοιλότητα.

1.2.1.γ. Λειτουργίες των κυττάρων του αρθρικού υμένα

Κύτταρα τύπου Α: Τα κύτταρα τύπου Α έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν ξένες ουσίες, οι οποίες βρίσκονται εντός της αρθρικής κοιλότητας, Φυσιολογικά, αυτά τα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να απορροφούν και να διασπών εξωκυττάρια συστατικά, κυτταρικά συγκρίμματα, μικροοργανισμούς και αντιγόνα στο αρθρικό υγρό και το στρώμα, με την βοήθεια ενός καλά οργανωμένου κυστικού και λυσοσωμικού συστήματος. Εφόσον τα κύτταρα του αρθρικού υμένα διαχειρίζονται σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών μπορούν να προσδιορίσουν την πρωτεϊνική σύνθεση του συνοβιακού υγρού.

Αν και στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά με την πυκνότητα της κατανομής των τύπου Α κυττάρων, αυτά τα κύτταρα ίσως είναι κατανεμημένα ανομοιογενώς στον αρθρικό υμένα.

Η υψηλή περιεκτικότητα κυττάρων τύπου A, στις λάχνες αντιστοιχεί στην ικανότητά τους να προσλαμβάνουν τις ξένες ουσίες. Μπορούν να μεταφέρουν τις προσλαμβανόμενες ουσίες στα λεμφικά κανάλια του έξω χιτώνα και ενδεχομένως να τα απομακρύνουν από την άρθρωση.

Τα συνοβιοκύτταρα τύπου A είναι ανοσοαντιδραστικά, σε αρκετά μονοκλωνικά αντισώματα κατά των μακροφάγων ή των προϊόντων τους. Επίσης, εκφράζουν το major histocompatibility class (MHC) II μόριο και Ia αντιγόνο, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγονική παρουσίαση κατά τα αρχικά στάδια της ανοσοαπάντησης. Λυσοσωμικά ένζυμα, όπως μη-ειδικές εστεράσες, όξινη φωσφατάση και καθεψίνες B και D και L, είναι επίσης χρήσιμα για την κυτταροχημική επισήμανση των κυττάρων τύπου A. Υπάρχει πιθανότητα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες φλεγμονής, η παραγωγή αυτών των ενζύμων και κυρίως των καθεψινών, να αυξηθεί σημαντικά και με την απελευθέρωσή τους στο εξωκυττάριο στρώμα να προκαλέσουν ιστική βλάβη.

Κύτταρα τύπου B: Τα B-κύτταρα εκκρίνουν κολλαγόνο, ιωδονεκτίνη, υαλουρονικό οξύ και άλλες γλυκοσαμινογλυκάνες στον διάμεσο ιστό του έσω συνοβιακού χιτώνα και στην αρθρική κοιλότητα. Το υαλουρονικό οξύ είναι μια πρωτεογλυκάνη, η οποία περιέχεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο συνοβιακό υγρό της αρθρικής κοιλότητας (3-4 mg/ml). Τα B-κύτταρα θεωρείται, επίσης ότι εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα στον έλεγχο της πρωτεϊνικής σύνθεσης του συνοβιακού υγρού. Ο Kitamura και συν. (1999) κατέδειξαν την ύπαρξη ενός νευρωνικού δείκτη, του PGP 9.5 (protein gene product 9.5) σε συνοβιοκύτταρα αλόγου. Ο συγκεκριμένος δείκτης έχει παρατηρηθεί και σε αρκετά αισθητήρια κύτταρα, όπως γευστικά κύτταρα, οσφρητικά κύτταρα, κύτταρα Merkel. Αυτή η εκλεκτική τοποθέτηση του PGP 9.5 στα B-κύτταρα υποστηρίζει την άποψη της αισθητήριας λειτουργίας τους. Πιθανά «αισθητικά» μηνύματα των κυττάρων του αρθρικού υμένα δεν μεταφέρονται στους νευρικούς ιστούς, λόγω της απουσίας συναπτικών επαφών με αισθητήριους νευρώνες. Προς απάντηση σε μεταβολές του ερθρικού υγρού (πίεση, γλοιότητα, χημική σύνθεση) τα κύτταρα είναι δυνατόν να αυτορυθμίζουν την έκκριση συστατικών μέσα στον έσω χιτώνα και την αρθρική κοιλότητα.

2. ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗ

Η αρthroπλαστική γενικά, είναι μια ορθοπαιδική χειρουργική επέμβαση, η οποία ενδείκνυται στα τελικά στάδια αρθρίτιδας και συνίσταται στην αντικατάσταση των κατεστραμμένων συνδέσμων καθώς και των αρθρικών επιφανειών, με την τοποθέτηση τεχνητών προθεμάτων από βιοϋλικά συμβατά με τον ανθρώπινο οργανισμό, με απώτερο σκοπό την απαλλαγή από τον πόνο και την επαναφορά της κίνησης ή της σταθερότητας της άρθρωσης.

Η τεχνική αυτή προσφέρει βελτίωση της ποιότητας ζωής σε ασθενείς, οι οποίοι διαφορετικά θα ήταν καταδικασμένοι σε μια μόνιμη, μη αναστρέψιμη επώδυνη αναπηρία.

Μια κατεστραμμένη άρθρωση, λόγω τραύματος (π.χ. κάταγμα), χρόνιας νόσου (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα), εκφυλιστικών αλλοιώσεων (π.χ. οστεοαρθρίτιδα) μπορεί να μειώσει σημαντικά το επίπεδο της ποιότητας ζωής, εξαιτίας του έντονου πόνου ο οποίος δεν ανακουφίζεται ικανοποιητικά με παυσίνονα και της δυσκινησίας, επηρεάζοντας άμεσα τομείς, όπως τη λειτουργικότητα του ατόμου και την συναισθηματική του κατάσταση.

2.1. Ιστορική αναδρομή των επεμβάσεων αρthroπλαστικής

Το 1890, ένας Γερμανός χειρουργός, ο T. Gluck, δημοσίευσε μια μελέτη σχετικά με την αντικατάσταση πασχόντων αρθρώσεων με ξένα αντικείμενα. Σχεδίασε πολυάριθμα αρθρικά προθέματα από ελεφαντόδοντο, ειδικά για το ισχίο και το γόνατο και τα δοκίμασε σε τραυματίες πολέμου.

Περίπου την ίδια περίοδο, στην Γαλλία, ο J. Pean πραγματοποίησε την πρώτη αντικατάσταση της γληνοβραχιόνιας άρθρωσης με πρόθεση, σε έναν νεαρό ασθενή, που έπασχε από φυματιώδη αρθρίτιδα. Η πρόθεση έμεινε στον ασθενή για δύο χρόνια και κατόπιν αφαιρέθηκε, εξαιτίας φλεγμονής, που δεν ελεγχόταν.

Η κατασκευή προθεμάτων συνεχίστηκε και κατά τις πρώτες δεκαετίες του 1900.

Το 1937, ο S. Peterson στο Γενικό Νοσοκομείο της Μασσαχουσέτης, μετά από πειραματικές μελέτες, δημιούργησε με επιτυχία το Vitalium, ένα κράμα χρωμίου και κοβαλτίου. Το κράμα αυτό χρησιμοποιείται ακόμη στην αρthroπλαστική.

Ένας Άγγλος χειρουργός, ο P. Wiles το 1938, πραγματοποίησε οκτώ ολικές αρthroπλαστικές ισχίου, χρησιμοποιώντας ένα μεταλλικό κοτυλιαίο κυπέλλιο και μια μεταλλική μηριαία κεφαλή. Και τα δύο συστατικά συγκρατήθηκαν με μεταλλικές βίδες. Βέβαια τα αποτελέσματα αυτής της πρώτης ολικής αρthroπλαστικής ισχίου ήταν πολύ «φτωχά», λόγω επιπλοκών όπως κάταγμα του μετάλλου, οστική απορρόφηση ή έκτοπη οστεοποίηση.

Το 1951 ο Άγγλος χειρουργός, J. McKee, ξεκίνησε την πραγματοποίηση των ολικών αρthroπλαστικών ισχίου πάνω σε κανονική βάση, με την χρήση μεταλλικής κεφαλής από χρωμοκοβάλτιο και κυπέλλιο από το ίδιο υλικό, όπου το μεταλλικό συστατικό ήταν υπό πίεση προσαρμοσμένο εντός του αυλού του οστού. Αν και τα

αποτελέσματα της μεθόδου αυτής ήταν μερικώς μόνο ικανοποιητικά, ο σχεδιασμός της υιοθετήθηκε εις τις Η.Π.Α. και εφαρμόστηκε ευρύτερα το 1966.

Το ποσοστό επιτυχίας του Mc Kee, ξεπεράστηκε το 1960 από τον επίσης Άγγλο χειρουργό J.Charnley. Ως αποτέλεσμα συστηματικής έρευνας πάνω στον σχεδιασμό, τα υλικά και τις χειρουργικές μεθόδους, ο Charnley έκανε τρεις σημαντικές προόδους. Πρώτον, για να μειώσει το πρόβλημα των ρινισμάτων του υλικού λόγω φθοράς όταν το μέταλλο τρίβεται πάνω στο μέταλλο, ελάττωσε το μέγεθος της μηριαίας μεταλλικής κεφαλής και αντικατέστησε την μεταλλική κοτύλη με κυπέλλιο από πολυαιθυλένιο. Δεύτερον, χρησιμοποίησε ως οστικό «τσιμέντο», το πολυμεθυλμεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA), ώστε τα προθέματα να συγκρατούνται σταθερά πάνω στο οστό.

Η χρήση «τσιμέντου» ήδη προϋπήρχε στον ιατρικό χώρο. Το ακρυλικό αυτό υλικό χρησιμοποιούνταν για μακρό χρονικό διάστημα για την κατασκευή οδοντικών προθεμάτων και την πλήρωση ελλειμμάτων του θόλου του κρανίου, από τους νευροχειρουργούς. Στις αρχές του 1950, ο Wilse και συνεργάτες του άρχισαν τις πειραματικές μελέτες για την πιθανή χρήση τσιμέντου στην ορθοπαιδική χειρουργική. Μετά από μελέτες σε πειραματόζωα, συνέστησαν ότι αυτό το υλικό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πλήρωση οστικών ελλειμμάτων, την συγκόλληση καταγμάτων ή την σταθεροποίηση προθεμάτων.

Αν και ο Charnley ήταν ο πρώτος χειρουργός που το χρησιμοποίησε στην καθημερινή πράξη στις ολικές αρθροπλαστικές ισχίου, ο Haboush στην Νέα Υόρκη, είχε πειραματιστεί με την χρήση του τσιμέντου στην ολική αρθροπλαστική ισχίου ήδη από το 1953.

Τα προθέματα για την άρθρωση του γόνατος παρουσίασαν ανάλογη εξέλιξη.

Περίπου το 1940, κατασκευάστηκαν προθέματα για ημιαρθροπλαστική γόνατος.

Το 1951, ο Waldius επιχείρησε την πρώτη ολική αρθροπλαστική γόνατος με την χρησιμοποίηση ακρυλικού υλικού. Περίπου το 1958, χρησιμοποιήθηκε πρόθεμα χρωμίου-κοβαλτίου και τέλος το 1969, ένα πολυκεντρικό πρόθεμα μετάλλου-πολυαιθυλενίου και τσιμέντου κατασκευάστηκε από το Charnley Hip Center στην Αγγλία.

Η σύντομη αυτή αναδρομή επικεντρώθηκε στις ολικές αρθροπλαστικές ισχίου και γόνατος, δεδομένου του γεγονότος ότι το μεγαλύτερο μέρος της διεθνούς βιβλιογραφίας επικεντρώνεται στην μελέτη αυτών. Η αρθροπλαστική του ώμου καθυστέρησε πολύ να αναπτυχθεί σε σύγκριση με την αρθροπλαστική γόνατος και ισχίου. Διάφοροι λόγοι είναι υπεύθυνοι γι' αυτό. Οι ώμοι που χρειάζονται αρθροπλαστική είναι πολύ λιγότεροι από τα ισχία ή τα γόνατα που χρειάζονται πρόθεση. Επιπλέον ο ώμος επιτρέπει αντισταθμιστική κίνηση. Όταν υπάρχει πρόβλημα στην γληνοβραχιόνια άρθρωση, προσπαθεί να αντισταθμίσει η ωμοπλατταίο-θωρακική. Ο ασθενής «αποδέχεται» πολλές φορές μια πάθηση του ώμου, χρησιμοποιώντας το μέλος λιγότερο, σε αντίθεση με μια πάθηση του ισχίου ή του γόνατος, όπου δυσχεραίνεται η μετακίνησή του.

Σήμερα έχουν κατασκευαστεί προθέματα, σχεδόν για κάθε άρθρωση. Κάθε πρόθεμα υπόκειται σε διάφορες αλλαγές όσον αφορά τον σχεδιασμό του, με βάση τις νεώτερες μελέτες και την ανακάλυψη νέων υλικών.

Επιπρόσθετα, με την βαθμιαία εξέλιξη του σχεδιασμού των προθεμάτων, κάθε κατασκευαστής έχει να επιδείξει το δικό του μοντέλο.

(Mc Carthy & Frassica. Pathology of Bone and Joint Disorders with Clinical and Radiological Correlation. 1st edition, 1998)

2.2. Είδη αρθροπλαστικής

-Ημιαρθροπλαστική ή μερική αρθροπλαστική. Αντικαθίσταται μόνο η μία αρθρική επιφάνεια με ένα πρόθεμα.

-Ολική αρθροπλαστική. Αντικαθιστώνται και οι δύο αρθρικές επιφάνειες, που υπέστησαν βλάβη.

Η τελευταία είναι εγχείρηση ριζική και είχε ένδειξη μόνο στις περιπτώσεις εκείνες, που κάθε άλλη χειρουργική μέθοδος είναι καταδικασμένη εκ των προτέρων να αποτύχει και ιδιαίτερα σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας, που η αναπηρία τους καθιστά ανίκανους ακόμη και για την προσωπική τους εξυπηρέτηση.

Γενικά, η ολική αρθροπλαστική δεν ήταν θεραπεία πρώτης επιλογής για νέους ασθενείς και γι' αυτούς που έχουν αυξημένες χειρωνακτικές δραστηριότητες. Σήμερα με την βελτίωση των υλικών και την εξέλιξη των χειρουργικών τεχνικών, η επέμβαση αυτή μπορεί να γίνει και σε νέους ασθενείς καθώς κύρια ένδειξη για την επέμβαση είναι ο πόνος και η συνεπακόλουθη κακή ποιότητα ζωής.

Τα αποτελέσματα μιας μελέτης των Hartofilakidis G, Karachalios T, Karachalios G (2005), υποστηρίζουν την άποψη ότι, η αρθροπλαστική Charnley αποτελεί μια αξιόπιστη διαδικασία για την αντικατάσταση ισχίου, ακόμη και σε νεότερους ασθενείς.

Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος σε τρεις τομείς:

-Αρθροπλαστικές μικρής επεμβατικότητας (MIS). Το θεωρητικό τους πλεονέκτημα είναι οι μικρές τομές του δέρματος και η μικρή καταστροφή των ιστών γύρω από αυτό. Η χρήση τους όμως είναι πολλές φορές αμφιλεγόμενη. Τα πλεονεκτήματά τους είναι η ταχύτερη μετεγχειρητική κινητοποίηση του ασθενούς, η ελάττωση του μετεγχειρητικού πόνου, η μείωση της απώλειας αίματος, η μείωση του χρόνου νοσηλείας και το καλύτερο αισθητικό αποτέλεσμα. Υπάρχουν όμως και μειονεκτήματα όπως, η αυξημένη δυσκολία και η μειωμένη ορατότητα κατά την επέμβαση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε παράταση του χειρουργικού χρόνου και σε κακή τοποθέτηση των εμφυτευμάτων. Οι αρθροπλαστικές μικρής επεμβατικότητας δεν πρέπει να γίνονται σε βάρος της σωστής τοποθέτησης των προθέσεων, που είναι σημαντικός παράγοντας, γιατί επηρεάζει άμεσα την μακροβιότητα της ολικής αρθροπλαστικής. Εάν ο χειρουργός είναι κατάλληλα εκπαιδευμένος και μπορεί με την μέθοδο αυτή να τοποθετήσει σωστά τα υλικά, τότε έχει σαφώς πλεονεκτήματα. Στην αντίθετη περίπτωση είναι προτιμότερη μια συμβατική προσπέλαση.

-Αρθροπλαστικές επιφανείας. Είναι το είδος της αρθροπλαστικής που αντικαθιστά μόνο τις αρθρικές επιφάνειες, αφαιρώντας έτσι πολύ λιγότερο οστού. Ξεκίνησε για πρώτη φορά την δεκαετία του '70, αλλά όχι με καλά αποτελέσματα. Είναι μέθοδος εκλογής σε νεότερους ασθενείς και σε ασθενείς με αυξημένες δραστηριότητες, στους οποίους μπορεί να χρειαστεί και δεύτερη επέμβαση στο μέλλον. Είναι όμως τεχνικά δύσκολη και απαιτεί εμπειρία, ενώ τα πλεονεκτήματά της έναντι των ολικών αρθροπλαστικών δεν είναι ακόμη αποδεδειγμένα σε μακροχρόνιες μελέτες.

-Χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών στην τοποθέτηση των προθέσεων με ρομποτική διεγχειρητικά (καθοδήγηση μέσω computer navigation technology). Έχει σαν

μειονέκτημα το αυξημένο κόστος και αυξημένο χειρουργικό χρόνο και ενώ στην συμβατική ολική αρθροπλαστική είναι μάλλον υπερβολή, στις αρθροπλαστικές μικρής επεμβατικότητας λόγω μειωμένης ορατότητας μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη. Πρόκειται όμως για μια μέθοδο, που είναι ακόμη στην γένεσή της.

2.2. Σύνδεση των προθεμάτων

Ανάλογα με την περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ειδικό «τσιμέντο» οστών, πολυμεθυλ-μεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA), με το οποίο επιτυγχάνεται σταθερή στήριξη της τεχνητής άρθρωσης στα οστά. Το χειρουργικό τσιμέντο είναι ένα συνθετικό υλικό, το οποίο εγχύεται στο καλά προετοιμασμένο οστό πριν την εφαρμογή της πρόθεσης.

Το τσιμέντο δεν έχει ουσιαστικά συνδετική ικανότητα, αλλά χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό του προθέματος. Στην ουσία είναι ένα εκμαγείο που αγκαλιάζει την εμφυτευόμενη πρόθεση και έτσι δεν αφήνει κενό ανάμεσα σε αυτή και το οστό του ασθενούς. Εισχωρεί στο οστό υπό πίεση, μέσα σε χώρους ανάμεσα στις οστικές δοκίδες, 10 min πριν γίνει σκληρό και προσκολλάται σ' αυτό. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η τεχνητή άρθρωση συμπεριφέρεται ως ένα ενιαίο σύνολο και έτσι η φόρτιση του οστού γίνεται ομοιόμορφα σε όλη την έκταση της αρθροπλαστικής, προστατεύοντας το από δυσχρηστία και κατά συνέπεια από οστεοπόρωση. Τα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι το ακρυλικό υλικό είναι περισσότερο εύθραυστο από το οστό.

Συνεπώς, η πίεση που ασκείται στην διεπιφάνεια οστού-τσιμέντου οδηγεί σε απόξεση και δημιουργία ρινισμάτων φθοράς των τμημάτων που έχουν προσχωρήσει στους διάμεσους χώρους των οστικών δοκίδων, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε οστεόλυση και χαλάρωση του προθέματος.

Στα τέλη της δεκαετίας του '70 αναπτύχθηκε ένας εναλλακτικός τύπος αρθροπλαστικής, όπου δεν είναι απαραίτητη η χρήση τσιμέντου για την σταθεροποίηση των προθεμάτων (cementless arthroplasty). Θεωρητικά οι αρθροπλαστικές αυτές ελαττώνουν τα προβλήματα που προκαλεί η γήρανση και η θραύση του τσιμέντου. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι για την ακρίβεια της εμφύτευσης των υλικών απαιτείται εμπειρία και καλός προεγχειρητικός σχεδιασμός, καθώς και το γεγονός ότι παρουσιάζουν προβλήματα σε ασθενείς με οστεοπόρωση. Ορισμένα προθέματα, στις χωρίς τσιμέντο αρθροπλαστικές, επικαλύπτονται με στρώμα υδροξυαπατίτη, ένα κεραμικό υλικό με οστεοεπαγωγικές ιδιότητες, που ενισχύει τον άμεσο σχηματισμό οστίτη ιστού στο διάκενο μεταξύ πρόθεσης και οστού, χωρίς ενδιάμεσο στρώμα ινώδους ιστού. Ο υδροξυαπατίτης είναι μια ουσία που απαντάται στην φύση και ειδικότερα τα δύο βασικά συστατικά του, ο φώσφορος και το ασβέστιο, κυριαρχούν στα οστά. Η εξαιρετική βιοσυμβατότητά του το καθιστά αξιοποιήσιμο και στα προθέματα, βελτιώνοντας την οστική αύξηση και την μακροπρόθεσμη σταθερότητα του προθέματος. Οι επιστρώσεις υδροξυαπατίτη εφαρμόζονται σε όλα τα βιοϋλικά των προθεμάτων.

Υπάρχει κι ένας τρίτος τύπος, όπου μόνο το ένα εκ των δύο προθεμάτων εφαρμόζει με τσιμέντο, ενώ το άλλο όχι. Ο τύπος αυτός ονομάζεται μικτός ή υβρίδιο.

2.4. Βιοϋλικά για την κατασκευή των προθεμάτων

Βασικές ιδιότητες που πρέπει να διαθέτουν τα υλικά, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των προθεμάτων, είναι αφενός η μηχανική αντοχή και αφετέρου η βιοσυμβατότητα. Τα υλικά πρέπει να έχουν μεγάλη αντοχή ώστε να ανθίστανται στις δυνάμεις και τις τάσεις που επιβάλλονται στο σώμα του ασθενούς, καθώς με μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί, οι τάσεις που επιβάλλονται στις προθέσεις συχνά υπερβαίνουν σημαντικά το βάρος του σώματος. Από την άλλη, τα υλικά πρέπει να είναι βιοσυμβατά, δηλαδή να είναι καλώς ανεκτά από τους ιστούς του οργανισμού. Αυτό σημαίνει να μην είναι τοξικά, να μην επάγουν ανοσολογική ανταπόκριση και να μην προκαλούν καρκινογένεση. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι τα συνήθως χρησιμοποιούμενα υλικά δεν προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες όταν εφαρμόζονται σε μορφή μάζας. Η συμπεριφορά τους ωστόσο μεταβάλλεται όταν βρίσκονται υπό την μορφή μικρών κόκκων, σαν σκόνη. Σε αυτή την λεπτοκκοκιδώδη μορφή, τα υλικά μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονή, που δυνητικά βλάπτει και τον περιβάλλοντα ιστό, προκαλώντας οστεόλυση. Συνεπώς, καθίσταται σαφές ότι μία επιπλέον απαίτηση που τίθεται σ' ένα υλικό προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε πρόθεση, είναι η ιδιότητά του να μην φθείρεται σε μεγάλο βαθμό, ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα σε μορφή κόκκων.

Τα προθέματα κατασκευάζονται από μεταλλικά, κεραμικά και πολυμερή βιοϋλικά. Τα διάφορα μέταλλα (κράματα χρωμίου-κοβαλτίου, τιτανίου, ανοξειδώτου χάλυβα), χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μεταλλικών πιάτων και καρφίτσων, για αντικαταστάσεις συνδέσμων ισχίου, γονάτου, ώμου κ.τ.λ. καθώς και υποστηρικτών ισχίου. Κεραμικά, όπως αλουμίνα και ζirkονία (Al_2O_3 , ZrO_2) χρησιμοποιούνται για αντικαταστάσεις αρθρώσεων που έχουν υποστεί φθορά. Η πορώδης αλουμίνα βρίσκει εφαρμογή στην αντικατάσταση μεγάλων τμημάτων οστών, που έχουν αφαιρεθεί από τον οργανισμό λόγω κάποιας ασθένειας. Τα πολυμερή, όπως το υψηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλένιο (UHMWPE), χρησιμοποιούνται για την κατασκευή επιφανειών στήριξης των προθεμάτων στις αντικαταστάσεις συνδέσμων.

Μέταλλο-πολυαιθυλένιο: Είναι ο συνδυασμός, όπου υπάρχει η μεγαλύτερη εμπειρία, τόσο από κλινικές μελέτες όσο και από τα εργαστήρια (simulators).

Το πολυαιθυλένιο όμως είναι πολύ ευαίσθητο στην τραχύτητα της αντίθετης επιφάνειας, στο σημείο επαφής. Περιοχές με κενά ή ογκώματα από κακή κατασκευή είναι δυνατόν να αποτελέσουν την αρχή ρωγμών και τελικά καταγμάτων του υλικού. Παρόμοια καταστρεπτική επίδραση μπορεί να έχουν μικροτεμάχια οστού, τσιμέντου ή υδροξυαπατίτη, που μένουν στην περιοχή επαφής. Επίσης, παρόμοια αρνητική επίδραση στην μακροβιότητα του πολυαιθυλενίου έχει και η οξειδωση.

Η συμπεριφορά του πολυαιθυλενίου εξαρτάται ακόμη και από το είδος του υλικού που έρχεται σε επαφή με την άρθρωση. Το κεραμικό οξείδιο του αλουμινίου (αλουμίνα) παρέχει πολύ καλύτερη ολίσθηση και έτσι η φθορά από την τραχύτητα του υλικού ελαττώνεται. Αντίθετα το κράμα τιτανίου ($TiAl_6V_4$), προκαλεί ταχύτατη και δραματική φθορά των δύο υλικών.

Μέταλλο-μέταλλο: Οι αρθρούμενες επιφάνειες είναι κατασκευασμένες από κράμα χρωμίου-κοβαλτίου. Τα υλικά αυτά πρωτοχρησιμοποιήθηκαν από τους Mc Kee, Farrar και εν συνεχεία εγκαταλείφθηκαν, λόγω της μεγάλης φθοράς και της τοξικότητας των προϊόντων αποδόμησης. Πρόσφατα με την αλματώδη βελτίωση της τεχνολογίας κατασκευής αναφέρονται καλά αποτελέσματα τόσο κλινικά όσο και στο εργαστήριο. Χρειάζεται όμως να λυθούν τα προβλήματα της αποδόμησης των

μετάλλων, που στους νέους και δραστήριους ασθενείς μπορεί να είναι ακόμη επικίνδυνα.

Κεραμική ζirkονία-πολυαιθυλένιο: Η κεραμική ζirkονία έχει μεγαλύτερη αντοχή από την κεραμική αλουμίνα και αρθρούται με το πολυαιθυλένιο με πολύ μικρούς βαθμούς τριβής.

Κεραμική αλουμίνα-αλουμίνα: Η ιατρική μορφή του κεραμικού οξειδίου του αλουμινίου (αλουμίνα), εισήχθη στην ορθοπαιδική χειρουργική από τους Boutin & Blanquet το 1981. Το υλικό αυτό διαθέτει άριστες ιδιότητες τριβής με το πολυαιθυλένιο ή τον εαυτό του, υπό την προϋπόθεση ότι η κατασκευή του είναι απόλυτα ομοιόμορφη, χωρίς ανωμαλίες και με σχήμα σφαιρικό. Έτσι η άρθρωση αλουμίνας με αλουμίνα παράγει λιγότερα ρινίσματα φθοράς, απ'ότι τα συμβατικά συστήματα πλαστικό-μέταλλο ή μέταλλο-μέταλλο, τα οποία όμως – ανεξήγητο για ποιους λόγους- δεν εμφανίζονται σε κάθε δείγμα. Αν και η αλουμίνα είναι το τρίτο σκληρότερο υλικό (η σκληρότητά της είναι δεύτερη στην κατάταξη μετά τα διαμάντια) και η λεία επιφάνειά της την καθιστούν ιδανική για χρήση σε επιφάνειες τεχνητών αρθρώσεων, καθώς δεν χαράσσεται εύκολα, εν τούτοις όμως είναι εύθραστη. Γενικά τα κεραμικά υλικά δεν διαθέτουν πλαστικότητα, με αποτέλεσμα όταν υπόκεινται σε πιέσεις ή επίδραση φορτίων, αντί να υποστούν πλαστική παραμόρφωση, όπως τα μέταλλα ή το πολυεθυλένιο, λόγω της αδυναμίας τους να απορροφήσουν τις δυνάμεις που τους επιβάλλονται θα θραύσουν ελαστικά από την διέγερση μιας ρωγμής. Για το λόγο αυτό η θέση του προθέματος την ώρα του χειρουργείου είναι σημαντική για την μακροβιότητά του. (Barrack RL και συν. 2004). Επιστήμονες διαφόρων ειδικοτήτων, συνεχώς μελετούν νέα υλικά, με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη οστεοενσωμάτωση του προθέματος. Μια σύγχρονη προσέγγιση αφορά στη χρήση νανο-βιοϋλικών, υλικών των οποίων οι δομικές μονάδες είναι της τάξεως του 1 έως 100nm. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα οστά αποτελούνται από βιολογικές οντότητες με διαστάσεις νανομέτρου (π.χ. κολλαγόνο τύπου I και κρυστάλλους υδροξυαπατίτη), οπότε τα οστεοκύτταρα είναι εξοικειωμένα να αλληλεπιδρούν με υλικά της τάξεως του νανομέτρου. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες, που αναφέρουν καλύτερη οστεοενσωμάτωση πάνω στις νανοεπιφάνειες, οι οποίες μπορεί να δημιουργηθούν με κεραμικά, μέταλλα, πολυμερή ή σύνθεση αυτών, σε σύγκριση με κλασσικά υλικά. (Sato M και Webster TJ 2004, Balasundaram G και Webster TJ, 2007)

2.5. Επιπλοκές της αρθροπλαστικής

Σήμερα, η ολική αρθροπλαστική είναι μια απολύτως ασφαλής χειρουργική επέμβαση με σημαντική κλινική επιτυχία και το ποσοστό επιπλοκών είναι λιγότερο από 2%.

Οι συχνότερες επιπλοκές, που παρουσιάζονται σε μια ολική αρθροπλαστική είναι:

- η χαλάρωση των προθεμάτων
- η φθορά και η θραύση των εξαρτημάτων
- τα κατάγματα
- η αστάθεια
- οι λοιμώξεις
- η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση

Η πιο συχνή επιπλοκή είναι η άσηπτη χαλάρωση του προθέματος, η οποία μπορεί να προσβάλλει τους ασθενείς σε 10 έως 20 χρόνια μετά την ολική αρθροπλαστική, οδηγώντας σε αποτυχία του προθέματος.

Βέβαια στην περίπτωση αυτή, είναι δυνατό να αντικατασταθούν τα προθέματα, επέμβαση γνωστή ως αναθεώρηση της αρθροπλαστικής. Η αναθεώρηση, όμως, είναι επικίνδυνη για τον ασθενή και επιπλέον πολυδάπανη επέμβαση και χρονοβόρα.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ικανοποιητικά, συγκριτικά με αυτά της πρώτης αρθροπλαστικής.

Για τον λόγο αυτό η χαλάρωση του προθέματος έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τόσο στην ιατρική όσο και στην βιομηχανική των βιοϋλικών των προθεμάτων.

3. ΧΑΛΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ

Η χαλάρωση της αρθροπλαστικής, είναι η συχνότερη αιτία των εγχειρήσεων αναθεώρησης και συγχρόνως αποτελεί ένα πολύπλοκο πρόβλημα, που δημιουργείται κυρίως από την αδυναμία καθολικής αντιστοιχίας της ακτινολογικής εικόνας με την κλινική πραγματικότητα. Με την έννοια της χαλάρωσης, περιγράφουμε την απώλεια της σταθερής συγκράτησης της τεχνητής άρθρωσης στα οστά.

Ορισμός: Είναι η ακτινολογικά εμφανής αλλαγή της μηχανικής ακεραιότητας του φορτιζόμενου τμήματος της ενδοπρόθεσης, που εκδηλώνεται είτε με κάταγμα του τσιμέντου, ή με την δημιουργία διαχωριστικού κενού μεταξύ τσιμέντου-πρόθεσης ή τσιμέντου οστού (Gruen et al, 1979). Φυσικά, σήμερα που οι αρθροπλαστικές χωρίς τσιμέντο είναι αρκετά δημοφιλείς, έχουν προστεθεί και άλλα ακτινολογικά χαρακτηριστικά. Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ο όρος, «νόσος του τσιμέντου» (Jones & Hungerford, 1987), για να αιτιολογήσει την εμφάνιση χαλάρωσης των αρθροπλαστικών με τσιμέντο. Υπήρχε η άποψη, ότι οι διαυγαστικές γραμμές που χαρακτήριζαν την χαλάρωση οφειλόταν στον ουλώδη ιστό, που δημιουργείται από την νέκρωση του οστού λόγω υψηλής θερμοκρασίας, που αναπτύσσεται κατά τον πολυμερισμό του τσιμέντου, ενώ πάντα τα παθολογοανατομικά ευρήματα αφορούσαν την ανίχνευση μικροτεμαχίων πολυμερούς. Αποδείχθηκε όμως σύντομα, ότι ο όρος αυτός ήταν ατυχής, καθ' όσον οι διαυγαστικές γραμμές και οστεόλυση εμφανιζόταν με εξ ίσου αυξανόμενο ρυθμό και στις χωρίς τσιμέντο αρθροπλαστικές.

Επιπλέον, πρόσφατες δημοσιεύσεις με αποτελέσματα ολικών αρθροπλαστικών, στις οποίες η χρήση του τσιμέντου έγινε με μοντέρνες μεθόδους, ελαχιστοποιούν τα ποσοστά χαλάρωσης, επιβεβαιώνοντας την θέση ότι οι λόγοι της άσηπτης χαλάρωσης είναι πολυπαραγοντικοί.

Συχνότητα: Φαίνεται να είναι πιο συχνή σε νέους ασθενείς, μεγάλου σωματικού βάρους και έντονης δραστηριότητας και σε ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα και γενικά από οστεοπόρωση.

Πολύ πιο ανησυχητικό φαινόμενο όμως, τα τελευταία χρόνια αποτελεί η αναγνώριση της συχνότητας της εμφάνισης οστεόλυσης. Πρόκειται για καταστροφή οστικής μάζας, που οφείλεται στην αντίδραση του οργανισμού στην παρουσία ρινισμάτων, που προέρχεται από την φθορά των κινούμενων επιφανειών της τεχνητής άρθρωσης και όχι μόνο. Η οστεόλυση είναι δυνατόν να είναι το αποτέλεσμα της χαλάρωσης του δεσμού μεταξύ υλικού και οστού ή να είναι αυτή η αρχική εντόπιση της χαλάρωσης. Η εκτεταμένη απορρόφηση του οστού, που οδηγεί στην άσηπτη χαλάρωση του προθέματος, περιγράφηκε από τον Harris και συν. (1976), σε τέσσερις αρθροπλαστικές ισχίου. Η οστεόλυση, μπορεί να είναι γραμμική, δηλαδή ισότιμα κατανεμειμένη γύρω από το πρόθεμα ή εστιακή, δηλαδή τμηματική απώλεια οστού σε στενή σχέση με το πρόθεμα. Η εστιακή οστεόλυση μπορεί να εμφανιστεί δίχως κανένα σύμπτωμα και το πρόθεμα μπορεί να παραμείνει σταθερό.

3.1. Ομοιοστασία του οστού και οστεόλυση

Για την πλήρη κατανόηση της οστεόλυσης, που προκαλείται από τα σωματίδια των βιοϋλικών, θα πρέπει κατ'αρχάς να λάβουμε υπ'όψιν την λεπτή ισοροπημένη διαδικασία της σκελετικής ομοιοστασίας. Τα οστά του σκελετού υπόκεινται συνεχώς σε ανακατασκευή, μέσω μιας διαδικασίας η οποία περιλαμβάνει την μερική απορρόφηση του οστού μέσω οστεοκλαστών και ταυτόχρονα την σύνθεση και αποθήκευση νέας οστικής μητρικής ουσίας από τους οστεοβλάστες. (Felix και συν. 1996, Roodman 1996). Οι οστεοβλάστες και οστεοκλάστες προέρχονται από διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Οι οστεοβλάστες προέρχονται από αρχέγονα μεσεγχευματικά κύτταρα, ενώ οι οστεοκλάστες διαφοροποιούνται από αιμοποιητικούς μονοκυτταρικούς/μακροφαγικούς προδρόμους. (Manolagas και συν. 1995, Poroff και Schneider 1996, Teitelbaum 1996). Η οστεοκλάστη είναι ένα πολυπύρηνο κύτταρο, που σχηματίζεται μέσω συγχώνευσης των μονοπύρηνων κυττάρων, που προέρχονται από αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Η διαφοροποίηση των μυελοειδών πρόδρομων κυττάρων σε οστεοκλάστες χαρακτηρίζεται από την παρουσία mRNA και πρωτεΐνης για τον υποδοχέα ανβ3 (vibronectin receptor), cathepsin K, TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) και τον υποδοχέα καλσιτονίνης (calcitonin receptor) (Mostov και Werb 1997, Roodman 1996). Μέσω αυτών των υποδοχέων οι οστεοκλάστες καθίστανται ικανοί για οστική απορρόφηση. Πολλοί παράγοντες επιδρούν στη οστική ομοιοστασία στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης, όπως: CSF-1 (colony-stimulating factor) γνωστός επίσης και ως M-CSF, IL-1, TGF-B, TNF-α, IL-6, βιταμίνη D₃, IL-11, καλσιτονίνη, προσταγλανδίνη E₂(PGE₂) και η παραθυρεοειδής ορμόνη (Greenfield και συν. 2002, Mostov και Werb 1997, Roodman 1996). Το ανισοζύγιο της δράσης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της διαταραχής των ελεγχόμενων κυτταροκινών, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε εντοπισμένη ή συστηματική μείωση της οστικής μάζας. (Mostov 1997, Reddi 1997).

3.2. Ιστοπαθολογική εικόνα των περιπροθετικών ιστών

Σε μια τεχνητή άρθρωση, σχηματίζεται μια λεπτή μεμβράνη από ινώδη ιστό (περιπροθετικός ιστός) στην διεπιφάνεια οστού- προθέματος.

Ο Goodman και οι συνεργάτες του (1998), διαπίστωσαν με ανοσοϊστοχημικές και in situ υβριδισμού μελέτες, ότι οι περιπροθετικοί ιστοί παρουσιάζουν διαφορές στους κυτταρικούς τύπους, ανάλογα με τον βαθμό σταθερότητας της τεχνητής άρθρωσης και την παρουσία ή όχι οστεόλυσης, με τα υλικά των προθεμάτων και την χρήση ή όχι τσιμέντου.

Βάσει των ανωτέρω, μπορούμε να ταξινομήσουμε τα προθέματα σε έξι ξεχωριστές ομάδες:

Ομάδα 1^η- χαλαρά προθέματα με τσιμέντο, και παρουσία οστεόλυσης.

Ομάδα 2^η- χαλαρά προθέματα , με τσιμέντο, χωρίς παρουσία οστεόλυσης.

Ομάδα 3^η- καλά-σταθεροποιημένα προθέματα , με τσιμέντο, χωρίς ακτινολογικά σημεία χαλάρωσης.

Ομάδα 4^η- χαλαρά προθέματα , χωρίς τσιμέντο και παρουσία οστεόλυσης.

Ομάδα 5^η- χαλαρά προθέματα, χωρίς τσιμέντο και χωρίς παρουσία οστεόλυσης.

Ομάδα 6^η- καλά-σταθεροποιημένα προθέματα, χωρίς τσιμέντο και χωρίς ακτινολογικά σημεία χαλάρωσης.

3.2.α. Χαλαρά προθέματα με οστεόλυση (ομάδες 1 και 4)

Κατά την ιστολογική εξέταση διαπιστώνεται ότι οι περιπροσθετικοί ιστοί αποτελούνται από έντονα αγγειοβριθή συνδετικό ιστό, λόγω της παρουσίας πολλών νεόπλαστων αγγείων.

Η επιφάνεια που επαλείφει το πρόθεμα συνήθως καλύπτεται από μια στιβάδα που προσομοιάζει με τον αρθρικό υμένα (synovial-like membrane).

Το υποκείμενο στρώμα περιέχει ινοβλάστες, οι οποίοι συχνά παρουσιάζουν θετική ανοσοχρώση για TGFβ. Τα μακροφάγα και τα πολυπύρηννα μακροφάγα είναι μεγαλύτερα CD-68 θετικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν mRNA για IL-1α, IL-6, TNFα και PDGFα. Τα CD-14 θετικά ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι ένας υπότυπος των CD-68 θετικών μακροφάγων και συνήθως βρίσκονται σε ομάδες γύρω από τα αγγεία. Τα CD3-θετικά, T-λεμφοκύτταρα είναι μικρά, στρογγυλά, σκουρόχρωμα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται διασκορπισμένα μέσα στον ιστό και ενίοτε παρουσιάζουν περιαγγειακή κατανομή.

Σε ορισμένες περιπτώσεις τμήματα του ψευδομεμβρανώδους ιστού είναι νεκρωτικά και άμορφα, με λίγα αναγνωρίσιμα κυτταρικά στοιχεία

Οι περιπροσθετικοί ιστοί των τεχνητών αρθρώσεων χωρίς τσιμέντο είναι περισσότερο ινώδεις και λιγότερο αγγειοβριθείς και κυτταρικοί.

3.2.β. Χαλαρά προθέματα χωρίς οστεόλυση (ομάδες 2 και 5)

Στην περίπτωση αυτή, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι τσιμέντου, τα χαλαρά προθέματα περιβάλλονται από μια καλύτερα οργανωμένη στιβάδα ινώδους ιστού, η οποία περιέχει ποικίλου αριθμού κύτταρα και ρινίσματα υλικών.

Σε ορισμένες θέσεις, κοκκιοματώδους τύπου αντιδράσεις έχουν σημειωθεί ενώ σε άλλες θέσεις τα μακροφάγα είναι διασκορπισμένα. Συνοβιακή μεμβράνη (synovial-like membrane), μπορεί να φανεί ορισμένες φορές. Γενικά ο όγκος του ιστού είναι πολύ λιγότερος απ' αυτόν που εκτέμενεται από τα χαλαρά προθέματα με οστεόλυση.

3.2.γ. Καλά σταθεροποιημένα προθέματα χωρίς οστεόλυση(ομάδες 3 και 6)

Οι περιπροσθετικοί ιστοί στην προκειμένη περίπτωση είναι δύσκολο να αφαιρεθούν. Γύρω από τα προθέματα δημιουργείται λίγος ιστός ο οποίος συχνά είναι στενά προσκολλημένος στο πρόθεμα ή το υποκείμενο οστό και είναι κατεξοχήν ινώδης.

Διασκορπισμένα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ρινίσματα παρατηρούνται.

Δεν υπάρχει ψευδοσυνοβιακή μεμβράνη (synovial-like membrane)

3.2.δ. Πολυαιθυλένιο: Τα περισσότερα σωματίδια πολυαιθυλενίου απορρίπτονται μέσα στην αρθρική κοιλότητα. Όμως, ορισμένα σωματίδια μεταναστεύουν μακριά από την αρθρική κοιλότητα μέσα σε χώρους μεταξύ του προθέματος και του οστού.

Τα σωματίδια των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 1 έως 200μm προκαλούν ιστική αντίδραση. Μικρότερα σωματίδια φαγοκυτταρώνονται από ιστιοκύτταρα. Ομάδες αυτών των κυττάρων, με το υαλοειδές κυτταρόπλασμα συγκεντρώνονται στα μαλακά μόρια της άρθρωσης και στην μεμβράνη που περιβάλλει το πρόθεμα. Ιστιοκύτταρα είναι δυνατό να συγκεντρώνονται και στους μυελοχώρους. Μεγαλύτερα τμήματα πολυαιθυλενίου, περιβάλλονται από γιγαντοκύτταρα ξένου σώματος. Τα τμήματα αυτά, τα οποία μοιάζουν με θραύσματα γυαλιού, είναι έντονα διπλοθλαστικά (γαλαζοπράσινα) στο πολωμένο φώς. Θραύσματα των προθεμάτων τόσο του ισχίου όσο και του γόνατος, είναι δυνατό να εισέλθουν στην λεμφική παροχέτευση του ποδιού. Το υλικό αυτό, συγκεντρώνεται στους επιχώριους λεμφαδένες και προκαλεί έντονη ιστιοκυτταρική διήθηση. Αυτή η ιστιοκυτταρική αντίδραση συχνά

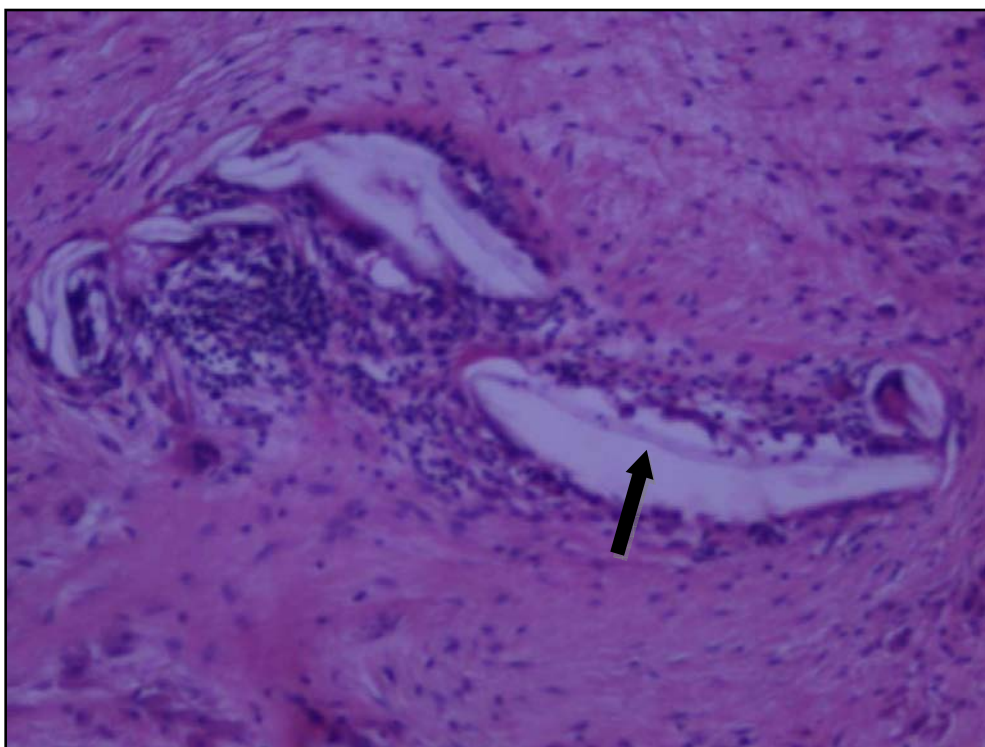
ανακαλύπτεται στους λεμφαδένες ασθενών με ασυμπτωματικά προθέματα οι οποίοι υπόκεινται σε βουβωνική λεμφαδεκτομή, για καρκίνωμα προστάτου.

3.2.ε. Μέταλλο: Τα μεταλλικά συστατικά όταν τοποθετούνται στους ανθρώπινους ιστούς, αποτελούν στην ουσία ένα διάλυμα ηλεκτρολυτών. Συνεπώς, στιβάδες οξειδίων (oxide layers) σχηματίζονται στην επιφάνεια του χρωμίου-κοβαλτίου ή τιτανίου και οι πιέσεις στην επιφάνεια του μετάλλου οδηγούν στην διάχυση των οξειδίων εντός των γύρω ιστών. Τα οξείδια τιτανίου είναι περισσότερο ευπαθή στις πιέσεις απ' ό,τι τα οξείδια χρωμίου. Τα οξείδια αυτά προκαλούν μαύρη χρώση των ιστών γύρω από το πρόθεμα (συχνά χρησιμοποιείται ο όρος μετάλλωση). Ιστολογικά, τα μαυρόχρωα αποθέματα των οξειδωμένων μετάλλων είναι ορατά τόσο στον εξωκυττάριο χώρο όσο και στο κυτταρόπλασμα των ιστοκυττάρων. Σε μικρές συγκεντρώσεις, προσδίδουν στο κυτταρόπλασμα των ιστοκυττάρων κοκκιώδη όψη, ενώ όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις «σκιάζουν» τον πυρήνα και άλλες κυτταρικές λεπτομέρειες.

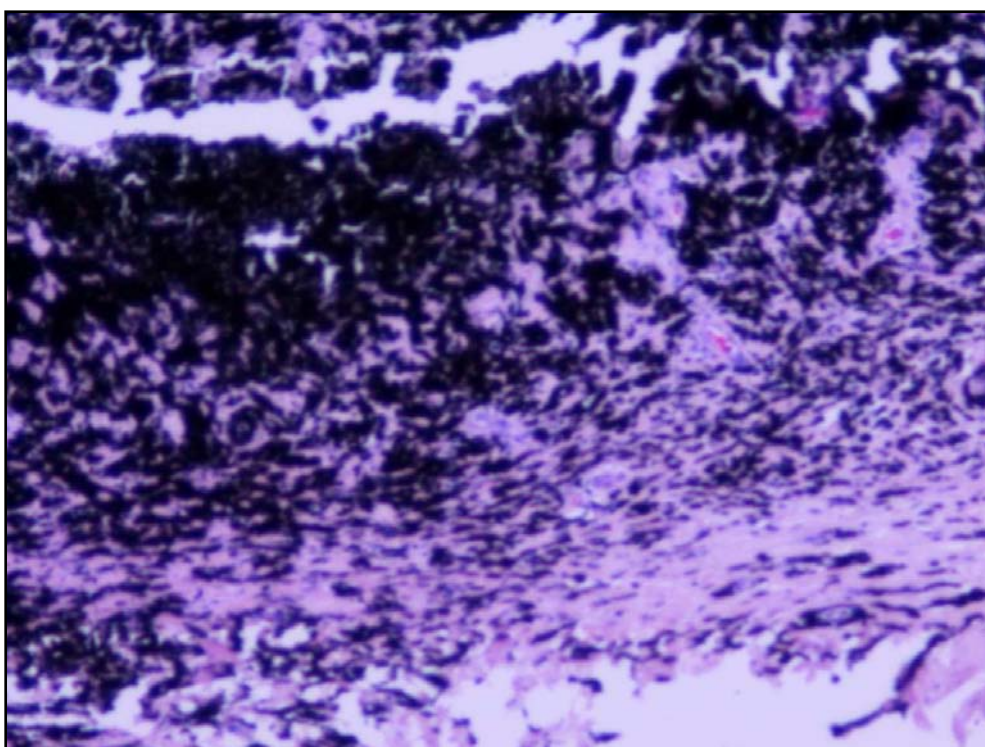
3.2.στ. Κεραμικά υλικά: τα ρινίσματα των προθεμάτων από κεραμικά υλικά, στο οπτικό μικροσκόπιο αναγνωρίζονται ως καστανοπράσινα, μαύρα ή καστανόχρωα σωματίδια, μεγίστης διαμέτρου από 1 έως 10μm, εντός μακροφάγων ιστοκυττάρων, στα οποία προσδίδουν μία «τραχειά» κοκκιώδη εμφάνιση. Γιγαντοκύτταρα δεν παρατηρούνται. Δεν προεξέχουν T- λεμφοκύτταρα. (Mochida Y και συν. 2001).

3.2.ζ. «Τσιμέντο»: Παρόμοια με τα σωματίδια πολυαιθυλενίου, τα θραύσματα του ακρυλικού εισχωρούν στον περιπροσθετικό μαλακό ιστό. Αυτά τα σωματίδια, μεγέθους 30 έως 100 μm, συνήθως διαλύονται στην ξυλόλη, κατά την επεξεργασία του ιστού για την ιστολογική μελέτη ρουτίνας. Η παρουσία τους συνάγεται από τους άδειους χώρους στον μαλακό ιστό, χώροι οι οποίοι συνήθως οριοθετούνται από γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος.

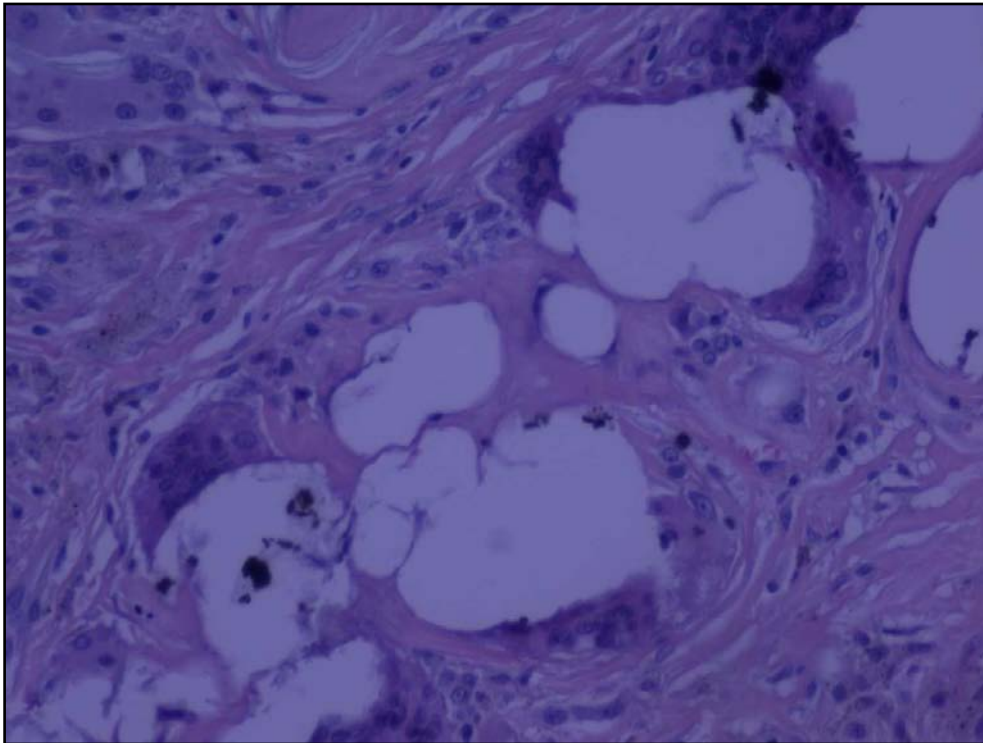
3.2.η. Σωματίδια ενδογενούς προέλευσης: Οι μεμβράνες γύρω από τα προθέματα μιας ολικής αρθροπλαστικής, μπορεί επίσης να περιέχουν και σωματίδια ενδογενούς προέλευσης, όπως αιμοσιδηρίνη και φωσφορικό ασβέστιο. Τα σωματίδια αιμοσιδηρίνης δεν θα πρέπει να παρερμηνεύονται ως κεραμικά σωματίδια (αλουμίνας ή ζirkονίας), επειδή και τα δύο είναι ελαφρώς καστανόχρωα, με «τραχειά» κοκκιώδη εμφάνιση. Το ασβέστιο μπορεί να ερμηνευτεί από την δημιουργία κρυστάλλων. Οι μεμβράνες των ασθενών με προϋπάρχουσα φλεγμονώδη αρθροπάθεια έχουν μια πιο πολύπλοκη ιστολογική εμφάνιση, πολυάριθμα λεμφοκύτταρα, σχηματισμό λεμφοζιδίων, και πλασματοκύτταρα.



Παρατηρείται αντίδραση τύπου ξένου σώματος. Αναγνωρίζονται θραύσματα πολυαιθυλενίου (βέλος).



Παρατηρείται μακροφαγική αντίδραση και μαζική άθροιση μεταλλικών οξειδωμένων σωματίων.



Παρατηρείται αντίδραση τύπου ξένου σώματος με γιγαντοκύτταρα. Οι κενοί χώροι αντιστοιχούν σε φαγοκυτταρωμένα σωματίδια «τσιμέντου», τα οποία διαλύονται με την ξυλόλη.

3.3. Αίτια της άσηπτης χαλάρωσης

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες σχετικά με τα αίτια της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης των ενδοπροθεμάτων. Η πρώτη και –για χρόνια-επικρατέστερη θεωρία αφορά στην νόσο των σωματιδίων (particle disease). Όλα τα μηχανικά αρθρικά προθέματα υπόκεινται σε φθορά στις διεπιφάνειες επαφής. Τα ρινίσματα φθοράς των υλικών των προθεμάτων (τσιμέντο, μέταλλο, πολυαιθυλένιο, κεραμικά υλικά) αναγνωρίστηκαν ως το κύριο εναρκτήριο γεγονός, που τελικά οδηγεί στην οστεόλυση και χαλάρωση των προθεμάτων. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα μελετών σε πειραματικά μοντέλα, που θέτουν το ερώτημα εάν τα σωματίδια φθοράς των βιοϋλικών είναι καθεαυτά υπεύθυνα για την απορρόφηση του οστού γύρω από το πρόθεμα. Θεωρείται ότι το μέγεθος των σωματιδίων και το υλικό από το οποίο προέρχονται οδηγούν σε μια βιολογική αντίδραση του οργανισμού, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτταροκινών και διαφόρων πρωτεϊνικών μεταβιβαστών οι οποίοι κινητοποιούν μηχανισμούς οστικής απορρόφησης και χαλάρωσης του προθέματος. Στην προσπάθεια των διαφόρων ερευνητών να γίνει όσο το δυνατό πιο σαφής η όλη διαδικασία που τελικά οδηγεί στην χαλάρωση του προθέματος, στην αρχική θεωρία έχουν προστεθεί και δευτερεύουσες εναλλακτικές θεωρίες-υποθέσεις, όπως η μικροκινήσεις των προθεμάτων, η αυξημένη πίεση του αρθρικού υγρού, η παρουσία ενδοτοξίνης και άλλες οι οποίες και θα αναφερθούν διεξοδικότερα στην συνέχεια.

3.3.1. Νόσος των σωματιδίων (particle disease)

3.3.1.α. «Τσιμέντο» (cement) (polymethylmethacrylate, PMMA)

Με την πάροδο του χρόνου το «τσιμέντο» γίνεται πιο εύθραυστο και μπορεί εύκολα να αποτελέσει «πηγή» ρινισμάτων. Ο Harris και οι συνεργάτες του αναφέρθηκαν (1976) σε τέσσερις περιπτώσεις με εκτεταμένη οστεόλυση αρθροπλαστικών ισχίου με «τσιμέντο», χωρίς σημεία φλεγμονής. Υποστήριζαν δε την άποψη ότι ο ινώδης ιστός μεταξύ οστού και τσιμέντου έχει τον κύριο ρόλο στην εισαγωγή της οστεόλυσης.

Σε άλλη μελέτη, από τους Jasty και συνεργάτες του (1986), παρουσιάστηκαν τέσσερα περιστατικά με απορρόφηση οστού χωρίς εμφανή φλεγμονή, σε αντικατάσταση ισχίου με τσιμέντο. Η ιστομορφομετρική ανάλυση, κατέδειξε ρινίσματα πολυαιθυλενίου στους ιστούς, και οι συγγραφείς πρότειναν ότι η μικροκινήσεις των προθεμάτων εισάγουν την αποτυχία του «τσιμέντου» με επακόλουθη απελευθέρωση ρινισμάτων τσιμέντου. Εν συνεχεία προκαλεί μια αντίδραση ξένου σώματος, που οδηγεί σε οστεόλυση και άσηπτη χαλάρωση. Οι Jones και Hundgerford (1987) υποστήριζαν ότι τα ρινίσματα τσιμέντου ήταν υπεύθυνα για την χαλάρωση των προθεμάτων και πρότειναν την χρήση προθεμάτων χωρίς τσιμέντο για νέους και δραστήριους ασθενείς. Ο Willert και οι συνεργάτες του (1990) εξέτασαν τον ιστό από αναθεωρημένες αρθροπλαστικές ισχίου και παρατήρησαν ρινίσματα τσιμέντου και πολυαιθυλενίου στα ιστιοκύτταρα και στα γιγαντοκύτταρα ξένου σώματος. Πρότειναν μια χρονολογική σειρά, αφότου παρατήρησαν διαφορετικές στιβάδες στον κοκκιωματώδη ιστό, που περιείχαν σωματίδια «τσιμέντου» ή πολυαιθυλενίου. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο ιστός εισάγεται πρώτα στο «τσιμέντο» και εν συνεχεία ως αποτέλεσμα της φθοράς του «τρίτου-σώματος» πάνω στην επιφάνεια του πολυαιθυλενίου παράγονται ρινίσματα του τελευταίου. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς υποστήριζαν ότι, το ποσό των ρινισμάτων φθοράς είναι τόσο σημαντικό όσο και το

υλικό από το οποίο προέρχονται και πρότειναν ότι τα ρινίσματα τσιμέντου και πολυαιθυλενίου από κοινού είναι υπεύθυνα για την άσηπτη οστεόλυση. Στο συγκεκριμένο μοντέλο τα σωματίδια πολυαιθυλενίου, προάγουν τον σχηματισμό κοκκιώματος και την οστική απορρόφηση και οδηγούν στην άσηπτη χαλάρωση του προθέματος. Σε μελέτες *in vitro*, με καλλιέργειες μακροφάγων, καταδείχθηκε ότι σωματίδια τσιμέντου (PMMA) και πολυαιθυλενίου μεγέθους <20μm, προκαλούν σημαντικά μεγαλύτερη απελευθέρωση TNF-α, IL-1, IL-6, προσταγλανδινών (PGE₂), μεταλλοπρωτεϊνών και άλλων παραγόντων, απ'ότι μεγαλύτερα σωματίδια. (Gonzalez et al. 1996, Shanbhag et al 1994, Abbas et al 2003, O'Keefe et al 1998).

3.3.1.β. Πολυαιθυλένιο (ultra-high molecular-weight polyethylene, UHMWPE):

Το πολυαιθυλένιο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, στην αντικατάσταση της μιας αρθρικής επιφάνειας, στις ολικές αρθροπλαστικές ισχίου και γόνατος. Με το χρόνο το πολυαιθυλένιο υφίσταται οξειδωτική διάσπαση, που οδηγεί σε μείωση του μοριακού του βάρους και αύξηση της πυκνότητάς του και την δημιουργία κρυστάλλων. Η επιφάνειά του θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο λεία ώστε να μειώνεται η τριβή και η φθορά. Για το λόγο αυτό η αναγωγή της οξειδωτικής εκφύλισης είναι σημαντική για να διατηρηθούν οι ευνοϊκές ιδιότητες του πολυαιθυλενίου.

Ο Howie και οι συνεργάτες του (1988) παρουσίασαν μια μελέτη σε ποντικούς, όπου εισήγαγαν ένα βύσμα τσιμέντου (polymethylmethacrylate) σε κάθε μηριαίο και εν συνεχεία το εξέθεσαν σε σωματίδια πολυαιθυλενίου σε χρονικό διάστημα 2,4,6 και 8 εβδομάδων, μετά την τοποθέτηση του τσιμέντου. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να μιμηθούν την διεπιφάνεια οστού-τσιμέντου. Γύρω από το πρόθεμα παρατηρήθηκε απορρόφηση οστού και η διεπιφάνεια του οστού αντικαταστήθηκε από συνδετικό ιστό. Με βάσει τα ανωτέρω ευρήματα, οι συγκεκριμένοι συγγραφείς έθεσαν την άποψη ότι τα σωματίδια μπορούν να προκαλέσουν οστική απορρόφηση απουσία κίνησης ή φλεγμονής. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν έχουν αναπαραχθεί (Howie et al 1993, Van Der Vis et al 1997). Απ'ότι έχουν δείξει αρκετές μελέτες στην βιβλιογραφία είναι δύσκολο να αποδειχθεί κάποια σαφής σχέση μεταξύ των σωματιδίων πολυαιθυλενίου και της απορρόφησης του οστού με μελέτες που βασίζονται σε πειραματόζωα (Howie et al. 1998, Soballe et al. 1992, Bobyn et al. 1995, Dowd et al. 1995, Allen et al 1996, Van Der Vis et al 1997, Aspenger and Van Der Vis 1998b, Kim et al 1998, Frokjaer et al. 1999, Lalor et al 1999, Brooks et al 2000, Rahbek et al 2000, Sundfeldt et al 2002).

Η ομάδα του Sundfeldt 2002 και των συνεργατών του, μελέτησαν τα αποτελέσματα επαναλαμβανομένων εγχύσεων σωματιδίων πολυαιθυλενίου σε αρθρώσεις γόνατος κουνελιών. Τα σωματίδια ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης και είχαν μέγιστη διάμετρο 0,2mm. 250 mg εγχύθηκαν σε κάθε άρθρωση αριστερού γόνατος κάθε δεύτερη εβδομάδα. Η άρθρωση του δεξιού γόνατος χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο (control). Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν σε 26 και 42 εβδομάδες. Παρά το υψηλό φορτίο των σωματιδίων, δεν παρατηρήθηκαν ακτινολογικές, ιστοπαθολογικές ή βιομηχανικές διαφορές μεταξύ των δύο αρθρώσεων, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι επιπρόσθετοι παράγοντες εμπλέκονται στην έναρξη της χαλάρωσης. Ο Down και οι συνεργάτες του (2000) πρότειναν ότι η φθορά του πολυαιθυλενίου είναι γραμμική στις αρθροπλαστικές ισχίου και επίσης διαπίστωσαν σημαντική σχέση μεταξύ της οστεόλυσης και της φθοράς του πολυαιθυλενίου σε ανθρώπινη μελέτη. Ο Sochart (1999) κατέδειξε ότι όταν ο βαθμός φθοράς είναι κάτω από 1mm ανά χρόνο το πρόθεμα διατηρείται σε ποσοστό 90%, ενώ ετήσιες τιμές φθοράς πάνω από 2mm

οδηγούν σε χαλάρωση του προθέματος μέσα σε 25 έτη. Βάσει των ανωτέρω συνεπάγεται ότι η αποτυχία του προθέματος επηρεάζεται από τον βαθμό φθοράς και επομένως είναι προφανές ότι τα σωματίδια εμπλέκονται στη χαλάρωση των προθεμάτων. Τα σωματίδια πολυαιθυλενίου, που έχουν απομονωθεί από αποτυχημένα προθέματα, ποικίλλουν στο σχήμα, από σφαιρικά έως επιμήκη και σε μέγεθος από 0,1μm έως αρκετά mm. (Campbell et al 1995, Maloney et al 1996, 1994, Margevicius et al 1994). Τα μακροφάγα φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στα σωματίδια μεγέθους υπό του 1μm, ενώ γύρω από μεγαλύτερα σωματίδια (άνω των 10 μm) σχηματίζονται γιγαντοκύτταρα. Τα σωματίδια πολυαιθυλενίου φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα, τα οποία δρουν με δύο τρόπους. Πρώτον, απελευθερώνουν διάφορες κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην ανακατασκευή του οστού (bone remodeling), όπως προσταγλανδίνη E2 (PGE2), ιντερλευκίνη 1α (IL1α), ιντερλευκίνη 1β (IL1β), παράγων νέκρωσης των όγκων α (TNFα). Οι κυτταροκίνες αυτές ρυθμίζουν την δράση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών η οποία εν συνεχεία αυξάνει την οστεόλυση (Murray and Rushton 1990, Howie et al 1993, Kim et al 1998). Δεύτερον, τα μακροφάγα διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες, ως αποτέλεσμα της διέγερσής τους από τα σωματίδια πολυαιθυλενίου (Quinn et al. 1998, Sabokbar et al. 1998) και προσβάλλουν άμεσα τον οστικό ιστό.

Τα ρινίσματα πολυαιθυλενίου, που παράγονται σε τεχνητές αρθρώσεις γόνατος και ισχίου ποικίλλουν προς το μέγεθος και το σχήμα (Landy and Walker 1888), αλλά έχει επικρατήσει η άποψη ότι η δράση των μακροφάγων προκαλείται από σωματίδια μεγέθους της τάξεως υπό του 1μm (Green et al 1998). Εφόσον η άρθρωση του γόνατος είναι μεγαλύτερη, ο χρόνος που απαιτείται για την «κριτική» δόση είναι μεγαλύτερος απ'ότι στην άρθρωση του ισχίου. Η άσηπτη χαλάρωση στις αρθροπλαστικές γόνατος δεν έχει μελετηθεί τόσο καλά όσο στις αρθρώσεις του ισχίου. Ο τρόπος φθοράς των προθεμάτων είναι διαφορετικός στις δύο αρθρώσεις. Επίσης, η άσηπτη χαλάρωση συνδέεται και με υψηλές πιέσεις στο συνοβιακό υγρό (Aspenberg and Van der Vis 1998 a,b, Van der Vis et al 1998 a,b) και εφόσον η άρθρωση του γόνατος είναι αρκετά μεγαλύτερη από του ισχίου, υψηλές πιέσεις είναι λιγότερο πιθανό να εμφανιστούν. Αποτρίμματα πολυαιθυλενίου σε μια τεχνητή άρθρωση γόνατος εμφανίζονται μέσω τριβής, λόγω της άμεσης επαφής των προθεμάτων. Η φθορά του πολυαιθυλενίου λόγω χαμηλής αντίστασης, κατασκευαστικές ιδιότητες και υψηλό φορτίο στην επιφάνειά του προκαλούν διάσπασή του (διαχωρισμό σε στιβάδες ή πέταλα). Επίσης, η φθορά του εξαρτάται και από τον χρόνο ημιζωής: οξειδωτική διάσπαση εμφανίζεται όταν αποθηκεύονται τα προθέματα και ο χρόνος ημιζωής είναι επομένως ένας παράγων που θα πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν όταν συζητείται η αντίσταση στην φθορά και η «μακροζωία» του προθέματος καθώς και ο τύπος της αποστείρωσης που επιλέγεται για το πρόθεμα. Τα σωματίδια πολυαιθυλενίου μπορούν να είναι μια από τις αιτίες της άσηπτης χαλάρωσης. Όμως επιπρόσθετοι παράγοντες, πιθανώς απαιτούνται για να την προκαλέσουν.

3.3.1.γ. Μέταλλο

Λόγω των ενδείξεων, ότι τα ρινίσματα πολυαιθυλενίου είναι υπεύθυνα για την άσηπτη χαλάρωση, το ενδιαφέρον στράφηκε στις μέταλλο με μέταλλο αρθροπλαστικές. Τα προθέματα μετάλλου έχουν λιγότερη φθορά απ'ότι τα προθέματα μέταλλο με πολυαιθυλένιο. Το πρόβλημα όμως της άσηπτης χαλάρωσης παραμένει (August et al 1986, Visuri 1987, Jantsch et al 1991, Jacobsson et al 1996,

Schmalzried et al 1996). Τα κράματα κοβαλτίου-χρωμίου έχουν υψηλή ανθεκτικότητα έναντι της φθοράς, ενώ η ανθεκτικότητά τους στην διάβρωση είναι χαμηλή. Τα προθέματα τιτανίου θεωρούνταν υπεύθυνα για την άσηπτη χαλάρωση (Agins et al 1988, Lombardi et al 1989, Buly et al 1992, Huo et al 1992). Όμως σήμερα τα κράματα τιτανίου χρησιμοποιούνται με αυξημένη αντίσταση στην παραγωγή ρινισμάτων. Σε μια μελέτη *in vitro* από τον Rader και τους συνεργάτες του (1999), η απελευθέρωση κυτταροκινών που σχετίζεται με σωματίδια πολυαιθυλενίου ήταν πολύ πιο έντονη από την σχετιζόμενη με σωματίδια τιτανίου. Ο Blaine και οι συνεργάτες του (1996) αναφέρουν ότι κυτταροκίνες απελευθερώνονται από τα μακροφάγα μετά από έκθεσή τους σε σωματίδια τιτανίου ελεύθερα ενδοτοξίνης. Ο Doorn και οι συνεργάτες του μελέτησαν σωματίδια κοβαλτίου-χρωμίου από ολικές αρθροπλαστικές ισχίου και αναφέρουν ότι τα σωματίδια μετάλλου προκαλούν λιγότερη τοπική δράση απ'ότι τα σωματίδια πολυαιθυλενίου. Η συγκεκριμένη ομάδα συγγραφέων συζήτησε διαφορετικές εξηγήσεις για αυτά τα ευρήματα. Εφόσον τα σωματίδια μετάλλου που παράγονται είναι της τάξεως του nm (10-400 nm), κάθε μακροφάγο μπορεί να αποθηκεύσει περισσότερα σωματίδια, το οποίο σημαίνει ότι λιγότερα μακροφάγα απαιτούνται για να αποθηκεύσουν το συνολικό ποσό των σωματιδίων και επομένως λιγότερα κύτταρα ενεργοποιούνται. Εναλλακτικά, τα σωματίδια μετάλλου υφίστανται οξειδωση και εξαφανίζονται και εφόσον είναι τόσο μικρά πιο εύκολα αποβάλλονται από το σώμα. Επιπλέον, τα μεταλλικά ιόντα, που απελευθερώνονται από τα προθέματα έχουν το δυναμικό να προκαλούν ανοσολογική απάντηση τύπου IV, η οποία διαμεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα, οδηγώντας σε φλεγμονή του συνοβίου, περιπροθετική οστεόλυση και αποτυχία του προθέματος ή εξω-αρθρικές εκδηλώσεις όπως δερματίτιδα. Υπάρχουν αρκετές πρόσφατες μελέτες που εγείρουν την υπόνοια ότι η υπερευαισθησία στα μεταλλικά υλικά σχετίζεται με την αποτυχία μιας αρθροπλαστικής (Willert et al 2005, Davies et al 2005, Park et al 2005, Hallab et al 2001). Η αντιδράσεις υπερευαισθησίας στα ιόντα μετάλλου, έχουν αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες στην δεκαετία του 1970 και 1980, όπου με δερματολογικές δοκιμασίες καταδείχθηκε ότι ασθενείς με καλά λειτουργικά μεταλλικά προθέματα παρουσιάζουν αλλεργία στο μέταλλο σε ποσοστό 25%, διπλάσιο απ'ότι στον γενικό πληθυσμό, ενώ σε ασθενείς με αποτυχημένα προθέματα το ποσοστό ήταν της τάξεως του 60%. Σε μια μελέτη οι Hart και συνεργάτες (2006) κατέδειξαν ότι οι μέταλλο-μέταλλο αρθρώσεις σχετίζονται με αύξηση του ποσού των CD8+ T λεμφοκυττάρων. Τα σωματίδια φθοράς του μετάλλου (αλουμίνιο, τιτάνιο, κοβάλτιο και χρώμιο) μπορεί να έχουν καρκινογενές δυναμικό και επίσης είναι δυνατό να προσβάλλουν την αιμοποίηση και την διανοητική ικανότητα (Jacobs et al. 1998). Το 1997 σε μια μελέτη από τους Langkamer και τους συνεργάτες του αναφέρθηκε μια σχέση μεταξύ μεταλλικών προθεμάτων και κακοήθων νόσων, αλλά δεν υπάρχει κάποια απόδειξη ότι η φθορά των μεταλλικών προθεμάτων σε μια αρθροπλαστική μπορεί να προκαλέσει τέτοια νόσο (Mc Gregor et al. 2000, Signorello et al. 2001, Fryzek et al. 2002, Visuri et al. 2003). Περιληπτικά, κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι, παρά την ήπια αντίδραση ξένου σώματος που προκαλείται από τα σωματίδια τιτανίου, και κοβαλτίου-χρωμίου, ακόμη και αυτά τα σωματίδια προκαλούν απελευθέρωση κυτταροκινών είτε με φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα είτε μέσω αντιγονικής παρουσίασης των μακροφάγων στα T-λεμφοκύτταρα (αντίδραση υπερευαισθησίας, τύπου IV) και επακόλουθη ενεργοποίησή τους, γεγονός που σημαίνει ότι τα σωματίδια μετάλλου εμπλέκονται στη διαδικασία της άσηπτης χαλάρωσης.

3.3.1.δ. Κεραμικά υλικά (αλουμίνα (Al_2O_3) ζirkονία (ZrO_2))

Πρόκειται για υλικά που παρουσιάζουν πολύ μικρούς ρυθμούς τριβής, είτε αρθρώνονται με το πολυαιθυλένιο είτε μεταξύ τους. Τα σωματίδια από τα κεραμικά προθέματα είναι αδιάλυτα και η βιολογική απάντηση είναι πιθανώς περισσότερο αποτέλεσμα των σωματιδίων παρά του ιδίου κεραμικού υλικού.

Σε μια μελέτη του Ito και των συνεργατών του (1993), καταδεικνύεται ότι, τα σωματίδια που προέρχονται όταν η κεραμική ζirkονία αρθρώνεται με το πολυαιθυλένιο, παρουσιάζουν μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, απ'ότι στις αρθροπλαστικές μετάλλου-πολυαιθυλενίου.

Από την άλλη πλευρά, ο Warashima και οι συνεργάτες του (2003), σε μια μελέτη σε πειραματόζωα, διεπίστωσαν λιγότερη απορρόφηση οστού και χαμηλότερη φλεγμονώδη απάντηση στα κεραμικά σωματίδια σε σύγκριση με τα σωματίδια πολυαιθυλενίου και τιτανίου. Οστεόλυση έχει περιγραφεί από τους Hatton και συνεργάτες του (2002), σε αρθροπλαστική ισχίου, όπου και τα δύο προθέματα ήταν από κεραμικό υλικό. Είναι πιο πιθανό τα κεραμικά σωματίδια να προκαλέσουν μια βιολογική απάντηση ανεξαρτήτως ως προς την σύσταση του υλικού, σύμφωνα με τους Green και συνεργάτες (1998). Σε μια μελέτη *in vitro*, ο Hatton και συν (2003), απέδειξαν ότι τα σωματίδια φθοράς της κεραμικής αλουμίνας είναι ικανά να προκαλέσουν παραγωγή κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα μακροφάγα και εν συνεχεία οστεόλυση. Ο τρόπος παραγωγής σωματιδίων φθοράς από τα κεραμικά υλικά δεν είναι και σήμερα σαφής. Όμως, οι δόσεις που απαιτούνται είναι πολύ υψηλές και τέτοια δόση ενδεχομένως να μην εμφανίζεται στη κλινική πράξη. Ακόμη και εάν τα ποσά των κεραμικών σωματιδίων φθοράς που παράγονται σε μια αρθροπλαστική είναι πολύ μικρά, θα μπορούσαν όμως να εμπλέκονται στην διαδικασία της άσηπτης χαλάρωσης. Πάντως, στην περίπτωση των υλικών αυτών η βιολογική απάντηση του οργανισμού στα ρινίσματα φθοράς τους δεν έχει πλήρως μελετηθεί. Το βασικό τους μειονέκτημα είναι τα κατάγματα, τα οποία αν και σπάνια αποτελούν ένα σοβαρό πρόβλημα, γιατί όταν συμβούν είναι εκτεταμένα και η επακόλουθη αναθεώρηση της αρθροπλαστικής εγκυμονεί τον κίνδυνο της αποτυχίας λόγω των σωματιδίων που πιθανώς παρέμειναν στην περιοχή. Τέλος, το κόστος των κεραμικών προθεμάτων είναι κατά 20% υψηλότερο απ'ότι οι προθέσεις μετάλλου-πολυαιθυλενίου.

3.3.2.Εναλλακτικές θεωρίες της άσηπτης χαλάρωσης

3.3.2.1. Δραστικό μεσάρθριο διάστημα ολικής αρθροπλαστικής (effective joint space)

Ο Schmalzried (1992) περιέγραψε την έννοια του δραστικού μεσάρθριου διαστήματος μιας ολικής αρθροπλαστικής (effective joint space), που δεν περιλαμβάνει μόνο τον χώρο των αρθρούμενων τμημάτων, αλλά ουσιαστικά όλη την έκταση της επιφάνειας επαφής πρόθεσης-οστού, που μπορεί να είναι προσιτή στο αρθρικό υγρό και κατ'επέκταση στα ρινίσματα φθοράς των αρθρούμενων υλικών. Η ευκολία με την οποία τα ρινίσματα είναι δυνατό να φθάσουν στην διεπιφάνεια οστού- προθέματος/τσιμέντου και να προκαλέσουν οστεόλυση, εξαρτάται από την σταθερότητα του δεσμού μεταξύ τους καθώς και από την ποιότητα του οστού στην συγκεκριμένη περιοχή. Συνεπώς εάν υπάρχουν μικροκινήσεις και ο δεσμός είναι χαλαρός, τότε τα ρινίσματα θα προκαλέσουν οστεόλυση. Το ίδιο συμβαίνει και εάν υπάρχει οστική ατροφία συνέπεια μη φόρτισης του οστού (stress shielding).

3.3.2.1.α. Μικροκινήσεις των ενδοπροθεμάτων

Σύμφωνα με τον Goodman (1994), πρόκειται για κινήσεις μεταξύ του προθέματος και του γύρω οστού, οι οποίες δεν είναι διακριτές με τις κλασσικές ακτινολογικές μεθόδους. Η μόνη μέθοδος για την επιβεβαίωση των μικροκινήσεων in vivo, στα προθέματα των ανθρώπινων αρθρώσεων είναι η ραδιοστερομετρική ανάλυση (radiostereometric analysis, RSA). Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα σημαντικό διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο για τα αρθρικά προθέματα. Εφ'όσον διαγνωσθούν μικροκινήσεις στην διεπιφάνεια οστού-προθέματος, είναι πολύ πιθανό αυτό να σημαίνει ότι, δεν έχει επιτευχθεί οστεοενσωμάτωση σ'ένα πρόθεμα με τσιμέντο ή ήδη άρχισε η διάσπαση ενός προθέματος με τσιμέντο. Σε μια μελέτη αρθροπλαστικής γόνατος με τσιμέντο, οι Ryd και Linder διαπίστωσαν με ραδιοστερομετρική ανάλυση, ότι αρχικά όλα τα προθέματα «μετανάστευαν» πάνω από τρία χρόνια μετεγχειρητικά και στο τέλος αυτής της «μετανάστευσης» όλα τα κνημιαία προθέματα ήταν σταθερά προσκολλημένα στο οστό μέσω μαλακών μορίων. Η μικροκίνηση ενός προθέματος μεταγχειρητικά διακινδυνεύει τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα. Επομένως η αρχική σταθερότητα που επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια του χειρουργείου είναι σημαντική. Αυτή η κατάσταση είναι ανάλογη με την επούλωση ενός κατάγματος, όπου η σταθερότητα είναι ζωτική για την θεραπεία και την μακροχρόνια σταθερότητα. Χωρίς την σταθεροποίηση ενός κατάγματος ή ενός προθέματος η επουλωτική διαδικασία δεν θα διεκπεραιωθεί καθώς πρέπει, με αποτέλεσμα την δημιουργία ινώδους ιστού/κάλου, με καθόλου μηχανική ισχύ. Από την άλλη πλευρά, μικροκινήσεις μπορούν ακόμη να εμφανισθούν και σε σταθερά οστεοενσωματώμενα προθέματα. Σε ένα πειραματικό μοντέλο σκύλου, οι Jasty και συν. (1997a), κατέδειξαν ότι 20μm ταλαντώμενης κίνησης επιτρέπουν την οστεοενσωμάτωση, ενώ στα 40 μm τα προθέματα περιβάλλονται από ινοχόνδρινο ή ινώδη ιστό σε μερικές περιοχές. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα όρια της οστεοενσωμάτωσης (σε σκύλους) είναι μεταξύ 20 και 40 μm ταλαντώμενης κίνησης. Φαίνεται λοιπόν πιθανό, ότι η μικροκινήσεις επηρεάζουν την σταθερότητα του προθέματος και είναι δυνατό να διευρύνουν την διεπιφάνεια οστού-προθέματος,

εκθέτοντας το οστό στο αρθρικό υγρό και στα ρινίσματα φθοράς, οδηγώντας σε οστεόλυση και επακόλουθη χαλάρωση.

3.3.2.1.β. Μη φόρτιση του οστού

Η τοποθέτηση προθέματος στο γόνατο ή το ισχίο, οδηγεί σε ανακατασκευή του οστού ως αποτέλεσμα των νέων φορτίων που επιβάλλονται μέσω του προθέματος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε οστεόλυση γύρω από το πρόθεμα σε περιοχές μη φόρτισης, και αυτό αναφέρεται ως οστική ατροφία συνέπεια μη φόρτισης του οστού. «Κάθε μεταβολή στην μορφολογία και την λειτουργία ενός οστού ή μόνο της λειτουργίας του ακολουθείται από συγκεκριμένες μεταβολές στην εσωτερική του αρχιτεκτονική και εξ ίσου οριστική δευτερεύουσα μεταβολή στη εξωτερική του δόμηση, σύμφωνα με μαθηματικούς κανόνες»(Wolff's law, 1870). Με την αναδόμηση του οστού γίνεται ουσιαστικά μια προσπάθεια προσαρμογής του στους νέους όρων φόρτισης. Επομένως, η μη φόρτιση του οστού (stress shielding) οδηγεί σε ατροφία, η οποία δεν είναι αποτέλεσμα οστεόλυσης αλλά αναδόμησης του οστού. Η απώλεια οστού εγγύς του προθέματος διευρύνει και εκθέτει την διεπιφάνεια οστού-προθέματος στο αρθρικό υγρό και τα ρινίσματα φθοράς.

3.3.2.1γ. Υψηλή πίεση του ενδοαρθρικού υγρού

Ο Linder (1994) συζήτησε την επίδραση της υψηλής πίεσης, στην διαδικασία της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης. Σε μια πειραματική μελέτη κουνελιών, οι Aspenberg και Van der Vis (1998a,b) κατέδειξαν ότι διακυμάνσεις στην πίεση του υγρού προκαλούν οστεόλυση και καταστροφή οστεοκυττάρων. Προτάθηκε ότι αυτή η αύξηση της πίεσης ίσως επιδρά στο διάμεσο υγρό και στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες οδηγώντας σε απώλεια οστού. Ο Robertson et al. (1997) μελέτησαν την πίεση σε 18 ισχία, πριν την αναθεώρηση αρθροπλαστικής, λόγω άσηπτης χαλάρωσης και βρήκαν υψηλότερη ενδοκαμική πίεση απ'ότι σε 34 μη-αναθεωρημένα, κλινικά και ακτινολογικά σταθερά ισχία. Ο Schmalzried et al (1992a) επίσης συζήτησε το ρόλο της υψηλής πίεσης ως αιτία της οστεόλυσης. Η ενδοκαμική πίεση είναι υψηλότερη στις οστεοαρθρικές αρθρώσεις απ'ότι σε φυσιολογικές. Στις φυσιολογικές αρθρώσεις το οστό δεν εκτίθεται στο αρθρικό υγρό, αλλά όταν ο χόνδρος προσβάλλεται λόγω κάποιας νόσου ή τραύματος το οστό εκτίθεται. Εμφανίζεται φλεγμονή της αρθρώσεως, που οδηγεί στην παραγωγή περισσότερου υγρού με αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης στην άρθρωση. Αυτό μπορεί να διαταράξει την κυκλοφορία του οστού, με αποτέλεσμα κύστεις ή διατεταμένους λεμφικούς χώρους, ως αποτέλεσμα της απώλειας οστού. Αυτή η απώλεια θεωρείται ότι εμφανίζεται χωρίς την ενεργοποίηση των μακροφάγων (αντίδραση ξένου σώματος) σε αντίθεση με τις κύστεις που αναπτύσσονται στις προθετικές αρθρώσεις. Εάν η πίεση είναι πάνω από 700mmHg (Hendrix et al 1983) στο δραστικό μεσάρθριο διάστημα το αποτέλεσμα μπορεί να είναι πολύ επιζήμιο για τα οστεοκύτταρα γύρω από το πρόθεμα- έχοντας ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη απορρόφηση και οστεόλυση. Είναι προφανές ότι η πίεση του αρθρικού υγρού εμπλέκεται στην διαδικασία της χαλάρωσης.

3.3.2.2. Ενδοτοξίνη

Ο ρόλος των βακτηριακών ενδοτοξινών συμπεριλαμβάνεται στις θεωρίες της άσηπτης χαλάρωσης. Αν και φαινομενικά υπάρχει αντίφαση, δηλαδή το γεγονός ότι η άσηπτη χαλάρωση προϋποθέτει απουσία λοίμωξης, δεν έχει αποκλεισθεί ο ρόλος των βακτηριδίων. Πρώτος ο Charnley (1979) ανέφερε ότι «σε μερικές (ολικές αναθεωρήσεις ισχίου) παρατηρήθηκαν θετικές καλλιέργειες οργανισμών χαμηλής παθογένειας, ενώ στην προηγούμενη επέμβαση δεν υπήρχαν κλινικές ή ακτινολογικές ενδείξεις λοίμωξης». Οι Mariani και συν. (1996) μελέτησαν το αρθρικό υγρό 50 ασθενών με κλινικά σημεία λοίμωξης χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και κλασσικές καλλιέργειες. Αυτοί βρήκαν θετικές καλλιέργειες σε 15 ασθενείς αλλά η PCR ήταν θετική σε 32 δείγματα (συμπεριλαμβανομένων και των 15 θετικών καλλιέργειών). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την θεωρία της ενδοτοξίνης πάνω στα σωματίδια που είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι οι κλασσικές ενδοτοξίνες, που παράγονται από Gram-αρνητικά βακτήρια. Όμως, τόσο τα Gram-αρνητικά όσο και τα Gram-θετικά βακτήρια παράγουν και άλλα μόρια (π.χ. πεπτιδογλυκάνες), τα οποία ασκούν την ίδια βιολογική δράση με τις ενδοτοξίνες. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ενδεχόμενες «πηγές» ενδοτοξίνης στους ασθενείς με άσηπτη χαλάρωση. Πρώτον, πριν το χειρουργείο, τα ίδια τα προθέματα μπορεί να περιέχουν σημαντικά ποσά ενδοτοξίνης. Ο Ragab και συνεργάτες (1999) κατέδειξαν ότι τα σωματίδια του εμπορικός διαθέσιμου τιτανίου, που χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματόζωα είχαν ενδοτοξίνη στην επιφάνειά τους. Επομένως συμπέραναν ότι και σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες η ενδοτοξίνη θα μπορούσε να ήταν υπεύθυνη για τα αποτελέσματα στον ιστό της διεπιφάνειας οστού-προθέματος. Αυτοί οι συγγραφείς επίσης υπέθεσαν ότι εξαιτίας της αδυναμίας των κατασκευαστών να απομακρύνουν την ενδοτοξίνη από τα σωματίδια, υπήρχε πιθανώς ενδοτοξίνη στα προθέματα που εμφυτεύονταν.

Δεύτερον, είναι δυνατό ενδοτοξίνες από την χλωρίδα του εντέρου, από ελάσσονες, υποκλινικές λοιμώξεις ή οδοντοϊατρικές επεμβάσεις, μέσω της αιματικής κυκλοφορίας να έρχονται και να προσκολούνται στα σωματίδια φθοράς των υλικών. Υπάρχουν μελέτες σε πειραματικά μοντέλα που υποστηρίζουν την άποψη ότι κυκλοφορούσες ενδοτοξίνες συγκεντρώνονται πάνω σε σωματίδια ελεύθερα ενδοτοξινών ή/και στους γύρω ιστούς μετά την εμφύτευση των προθεμάτων (Seabold και συνεργάτες 2003, 2004). Τρίτον, πιθανολογείται ότι η πιο σημαντική, από ποσοτική άποψη, «πηγή» ενδοτοξίνης είναι η βακτηριακή βιομεμβράνη που βρέθηκε σε πολλά προθέματα ασθενών με άσηπτη χαλάρωση. Πρόκειται για μια βιομεμβράνη η οποία σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια του προθέματος. Στην ουσία είναι μια αποικία μικροβίων, όπου τα κύτταρα προσκολλώνται σε ένα υπόστρωμα ή μια διεπιφάνεια ή το ένα στο άλλο και είναι εμβαπτισμένα μέσα σ'ένα στρώμα πολυμερών ουσιών που τα ίδια παράγουν.

Οι βιομεμβράνες αναπτύσσονται αργά και έχουν την ικανότητα να προκαλούν φλεγμονή. Η βιομεμβράνη επιτρέπει στα βακτήρια να επιβιώνουν σε ένα εχθρικό περιβάλλον, είναι ανθεκτική στα αντιβιοτικά και είναι δύσκολο να καταδειχθεί με καλλιέργειες ο αιτιολογικός παράγοντας (Dunne WM και συν. 2002, Costerton JW και συν. 2005, 1999). Θεωρείται ότι οι βακτηριακές ενδοτοξίνες δρουν ως οψωνίνες, με αποτέλεσμα την αύξηση της φαγοκυττάρωσης και επομένως και της βιολογικής δράσης των σωματιδίων φθοράς. Υπάρχουν διάφορες μελέτες σχετικές με την μεταβολική δραστηριότητα των ενδοτοξινών (Charlebois S και συν. 2002) και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Akisue T και συν 2002, Charlebois S

και συν. 2002, Cho DR και συν. 2002, Daniels AU και συν. 2000, Brooks RA και συν.2002, Carmody E και συν.2002) που αφορούν σχεδόν όλους τους τύπους σωματιδίων, όπως τιτανίου (Lee DH και συν. 2001, Cho DR και συν. 2002, Carmody E και συν.2002), κοβαλτίου-χρωμίου(Charlebois S και συν. 2002, Cho DR και συν. 2002, Daniels AU και συν. 2000), PMMA (Hitchins VM και συν. 1999, Lee DH και συν. 2001, Brooks RA και συν. 2002), πολυαιθυλενίου (Charlebois S και συν. 2002, Cho DR και συν. 2002), υδροξυαπατίτη (Lee DH και συν. 2001). Περιληπτικά οι ανωτέρω μελετητές συγκρίναν τις επιδράσεις των σωματιδίων με ή χωρίς ενδοτοξίνη πάνω σε μακροφάγα και διαπίστωσαν ότι τα σωματίδια με παρουσία ενδοτοξίνης προκαλούν σημαντικά υψηλότερη παραγωγή κυτταροκινών, διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και συνεπώς οστεόλυση. Επειδή οι βιομεμβράνες είναι δύσκολο να διαπιστωθούν με διαγνωστικές μεθόδους ρουτίνας, όπως είναι οι καλλιέργειες (Neut D και συν. 2003), η παρουσία τους και ενδεχομένως ο ρόλος τους στην διαδικασία της «άσηπτης» χαλάρωσης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ίσως και έχει υποτιμηθεί. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια μπορεί να είναι παρόντα στους περιπροθετικούς ιστούς, επομένως να διεγείρουν μία φλεγμονή έστω και χωρίς την επίδραση βιομεμβράνης (Boelens JJ και συν. 2000).

3.3.2.3. Ατομικές ή γενετικές αποκλίσεις

Οι ατομικές αποκλίσεις μεταξύ των ασθενών όσον αφορά την φθορά των ενδοπροθεμάτων από πολυαιθυλένιο έχουν παρατηρηθεί κλινικά: ενώ μερικοί ασθενείς έχουν αρκετή φθορά των προθεμάτων και καθόλου σημεία αποτυχίας του προθέματος άλλοι μπορεί να παρουσιάζουν μια εικόνα μόλις αισθητής φθοράς αλλά ταχεία οστεόλυση και αποτυχία του προθέματος. Σε μερικούς ασθενείς αυτό εξηγείται λόγω της ηλικίας τους, το επίπεδο δραστηριοτήτων ή το βάρος του σώματος, αλλά σε πολλούς ασθενείς η εξήγηση είναι άγνωστη. Σε μια *in vitro* μελέτη, ο Matthews et al (2000) αναφέρουν ότι μακροφάγα από 3 διαφορετικούς δότες απελευθέρωσαν διαφορετικά ποσά κυτταροκινών όταν εκτέθηκαν σε σωματίδια πολυαιθυλενίου ελεύθερα ενδοτοξίνης. Μερικά άτομα ίσως είναι πιο ευαίσθητα στα προϊόντα φθοράς απ'ότι άλλα («implant looseners» and “eventually implant loosers”). Κατά πόσο υπάρχει σχέση μεταξύ αυξημένης ευαισθησίας και αυξημένου κινδύνου για χαλάρωση των προθεμάτων είναι κάτι που μένει να αποδειχθεί. Βάσει αυτού μπορεί να εξηγηθεί γιατί είναι τόσο δύσκολο να χρησιμοποιηθούν πειραματόζωα σ' αυτές τις μελέτες. Οι μελέτες *in vitro*, που εστιάζουν στην δράση των μακροφάγων χρησιμοποιούν ανθρώπινα πρωτογενή κύτταρα, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και κύτταρα ζωϊκής προέλευσης. Στο πλαίσιο της ετερογένειας των ασθενών, η επιλογή ζωϊκών κυττάρων και πιθανώς πειραματικών μοντέλων για μελέτες της αλληλεπίδρασης υλικού-κυττάρου δεν είναι ευνόητη. Για παράδειγμα, τα ζωϊκά μακροφάγα ίσως αντιδρούν τελείως διαφορετικά στα προϊόντα φθοράς απ'ότι τα ανθρώπινα μακροφάγα. Επιπλέον, *in vitro* μελέτες με χρήση ανθρωπίνων κυττάρων μπορεί να είναι πιο κατάλληλες από διάφορες με πειραματικά μοντέλα *in vivo*. Σύμφωνα με τον Matthews και συνεργάτες (2000), η μελέτη του ρόλου των ατομικών και/ή γενετικών αποκλίσεων στην άσηπτη χαλάρωση έχει καθυστερήσει υπερβολικά. Ένα άλλο έμμεσο συμπέρασμα είναι ότι κατά την μελέτη της άσηπτης χαλάρωσης σε πειραματόζωα, τα αποτελέσματα της απάντησης στα σωματίδια δεν είναι ευχερώς συγκρίσιμα με ιστικές αντιδράσεις ασθενών. Επίσης, μια σημαντική διαφορά μεταξύ πειραματικών μοντέλων και κλινικής αποτυχίας των προθεμάτων είναι ότι τα ζώα

λαμβάνουν μια μόνο δόση σωματιδίων με υψηλή συγκέντρωση, ενώ στους ασθενείς τα σωματίδια συνεχώς παράγονται

3.3.2.4. Συμπέρασμα

Βάσει των ανωτέρω, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η άσηπτη χαλάρωση είναι αποτέλεσμα πολύπλοκης και πολυπαραγοντικής διαδικασίας.

Η χαλάρωση των προθεμάτων είναι ένας συνδυασμός μακρο-, μικρο- και νανογεγονότων, τα οποία μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: μηχανικά και βιολογικά.

Επομένως η επιτυχία μιας ολικής αρθροπλαστικής εξαρτάται από την συχνότητα με την οποία αυτά εμφανίζονται. Ο χρόνος ημιζωής κάθε προθέματος είναι περιορισμένος και τα προθέματα στους νεότερους, υγιείς και δραστήριους ασθενείς είναι πιθανό να χαλαρώνουν πιο γρήγορα. Ο Sir John Charnley, ένας πρωτοπόρος στην ολική αρθροπλαστική, έθεσε την εξής άποψη: «Neither surgeons nor engineers will ever make an artificial hip joint which will last thirty years and at some time in that period enable the patient to play football».

Τελικά, το ερώτημα που παραμένει είναι ποιό είναι το αρχικό γεγονός και με ποιό τρόπο προκαλεί την έναρξη της άσηπτης χαλάρωσης. Ανεξάρτητα, όμως από το εναρκτήριο γεγονός, είναι γενικά αποδεκτό ότι στην διαδικασία της άσηπτης χαλάρωσης/οστεόλυσης των προθεμάτων μιας αρθροπλαστικής, ο κύριος ρόλος αφορά στην βιολογική απάντηση του οργανισμού στα προϊόντα φθοράς των βιοϋλικών των προθεμάτων, σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, η οποία διαμεσολαβείται από τα κυτταρικά στοιχεία της ψευδοσυνοβιακής μεμβράνης, στην διεπιφάνεια οστού-προθέματος και κυρίως αφορά στον ρόλο των μακροφάγων. Τα μακροφάγα που φαγοκυτταρώνουν ρινίσματα φθοράς, στην ψευδομεμβράνη γύρω από το πρόθεμα, δεν παράγουν μόνο κυτταροκίνες αλλά έχουν επίσης την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε λειτουργικούς οστεοκλάστες και να επιδρούν στη οστική απορρόφηση και την χαλάρωση ενός προθέματος. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της έρευνας γύρω από την χαλάρωση των προθεμάτων έχει στραφεί και στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού και συγκεκριμένα στην απάντηση των T κυττάρων παρουσία των ρινισμάτων φθοράς (Revell και συν. 2008). Ο ρόλος τους στις μεταλλο-μέταλλο αρθροπλαστικές έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες. Όλα τα μέταλλα που βρίσκονται σε επαφή με βιολογικά συστήματα υφίστανται διάβρωση και τα ιόντα που απελευθερώνονται είναι δυνατό να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της δημιουργίας συμπλεγμάτων μετάλλου-πρωτεΐνης. Όμως δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί, κατά πόσο υπάρχει αιτιολογική σχέση μεταξύ υπερευαισθησίας στα μεταλλικά υλικά και την αποτυχία του προθέματος. Ο Santavirta και συνεργάτες (1991), σε καλλιέργειες μονοκυττάρων, του περιφερικού αίματος, με τσιμέντο (PMMA), διεπίστωσαν την παρουσία μη ειδικής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης και συμπέραναν ότι τα σωματίδια τσιμέντου είναι κατά βάση ανοσολογικά αδρανή. Με την χρήση καλλιεργιών λεμφοκυττάρων ανθρώπινων ιστών με σκοπό να εκτιμήσουν την βιοσυμβατότητα του πολυαιθυλενίου, οι ίδιοι συγγραφείς συμπέραναν ότι, ενώ τα σωματίδια προκαλούσαν μια αντίδραση ξένου σώματος, ήταν επίσης ανοσολογικά αδρανής. Το ερώτημα όμως, εάν η άσηπτη χαλάρωση/οστεόλυση έχει ανοσολογική βάση, παραμένει ανοικτό προς απάντηση.

4. ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

4.1. Στοιχεία της βιολογίας των μακροφάγων

Τα μακροφάγα, είναι ευρέως κατανεμημένα στους ιστούς, ως μόνιμα, ιστικά μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, και συμμετέχουν σε ποικίλλες φλεγμονώδεις-ανολσολογικές διεργασίες. Σ' αυτές περιλαμβάνονται η αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση, η χημειοταξία, η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή κυτταροκινών, η καταστροφή καρκινικών κυττάρων και μικροβίων, η ίνωση και η επανόρθωση των ιστών, η ρύθμιση της αιμοποίησης, ο μεταβολισμός λιπιδίων και σιδήρου.

(Σχηματική απεικόνιση του 'profile' των μακροφάγων στον πίνακα 1)

Τα μακροφάγα προέρχονται από τον μυελό των οστών, από πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα, τα οποία κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης, IL-1, CSF-1, GM-CSF-1 καθώς και αυτοκρινών παραγόντων, TNF-α και IL-6, διαφοροποιούνται σε μονοβλάστες (Adams & Hamilton 1984, Rutherford και συν. 1993). Από τους μονοβλάστες, εν συνεχεία, δημιουργούνται τα προμνοκύτταρα και μονοκύτταρα. Τα τελευταία εισέρχονται, τελικά, στην αιματική κυκλοφορία, απ' όπου μεταναστεύουν στους ιστούς στους οποίους υφίστανται περαιτέρω διαφοροποίηση σε μόνιμα, ιστικά μακροφάγα (resident macrophages) (Adams & Hamilton 1984, Beller & Ho 1982).

Τα ιστικά μακροφάγα είναι «πολυμήχανα» ανοσοκύτταρα, ικανά για περαιτέρω διαφοροποίηση και ωρίμανση σε τοπικούς ετερογενείς πληθυσμούς. Όμως, τα μακροφάγα είναι δύσκολο να ταξινομηθούν σε κατηγορίες, επειδή δεν διαθέτουν διαφορετικά επιφανειακά λειτουργιο-εξαρτώμενα αντιγόνα, όπως είναι για παράδειγμα οι δείκτες CD4 και CD8, που εκφράζονται αντίστοιχα από βοηθητικά η κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Η ετερογένειά τους είναι αποτέλεσμα, της «μετανάστευσής» τους από την αιματική κυκλοφορία στους ιστούς και της επακόλουθης έκθεσης τους σε ποικίλα μικροπεριβαλλοντικά «σήματα», που προέρχονται από τα κύτταρα ή μικροβιακούς παράγοντες. Αυτά τα ειδικά ιστικά «σήματα», ωθούν τα μακροφάγα ώστε να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικούς μορφολογικούς, αντιγονικούς και λειτουργικούς φαινοτύπους. Έτσι προκύπτουν τα ιστιοκύτταρα στο δέρμα και τους συνδετικούς ιστούς, μικρογλοιακά κύτταρα στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα, κύτταρα Kupffer στο ήπαρ, κυψελιδικά μακροφάγα στους πνεύμονες, περιτοναϊκά μακροφάγα στις ορώδεις κοιλότητες, κύτταρα Hofbauer στον πλακούντα, οστεοκλάστες στο οστό, κύτταρα τύπου A (synovial macrophages) στον αρθρικό υμένα.

Πίνακας 1.

<u>Selected macrophage pattern recognition receptors and ligands</u>	
<u>Pattern recognition receptors</u>	Ligand
Toll-like receptors (TLR)	
TLR-2	Lipoproteins & glycolipids
TLR-3	Virus, polyI:C
TLR-4	Lipopolysaccharide (LPS)
TLR-5	Flagellin
TLR-7	single-stranded RNA
TLR-8	single-stranded RNA
TLR-9	Bacterial (CpG) DNA
Type 3 complement receptor (CR3)	Zymosan (β -glucan), fibrinogen, heparin sulphate, JAM-3
Scavenger receptors (SR)	Lipid A, apoptotic cells
Dectin-1 (β glucan receptor, β -GR)	Yeasts (β -glucan), T cells
Mannose receptor (MR)	Lipoarabinomannan, L-selectin
<u>Substances secreted by macrophages</u>	
Microbicidal and cytotoxic	
Reactive oxygen intermediates	Superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, hypohalite chloramines
Reactive nitrogen intermediates	Nitric oxid, nitrites, nitrates
Oxygen-independent	Neutral proteases, acid hydrolases, lysozyme, defensins
Tumouricidal	H ₂ O ₂ , NO, TNF- α , C3 α , proteases, arginase, thymidine
Tissue damaging	H ₂ O ₂ , NO, TNF- α , C3 α , neutral proteases
Fever inducing	
Pyrogenic cytokines	IL-1, TNF- α , IL-6
Inflammatory regulators	
Bioactive lipids	Prostaglandins (PGE ₂ , PGE _{2α}), prostacyclin (PGI ₂), tromboxans, leukotriens (LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄)
Bioactive oligopeptides	Glutathione
Complement components	C1, C4, C2, C3, C5, Factors D, D, P, I, H
Clotting factors	V, VII, IX, X, prothrombin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor
Cytokines	IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , macrophage inflammatory proteins (MIP1, MIP2, MIP3), regulatory growth factors (M-CSF, GM-CSF, G-CSF, PDGF)
Neutral proteinase	Elastase, collagenase, angiotensin convertase, stromelysin
Proteinase inhibitors	α -Macroglobulin, α -1proteinase inhibitor, plasmin & collagenase inhibitors, plasminogen activator inhibitor
Acid hydrolases	Acid proteases (cathepsin D & L), peptidases, lipases, lysozyme & other glycosidases, ribonucleases, phosphatases, sulphatases
Stress proteins	Heat shock proteins (HSP)
Immune response regulators	
Innate immune responses	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)
Adaptive immune responses	MHC class I, II, IL-12, IL-18
Tissue regeneration	
Tissue reorganization	Elastase, collagenase, hyaluronidase
Angiogenesis	bFGF, TGF- α , GM-CSF, M-CSF, VEGF/VPF, IL-8, human angiogenic factor (HAF), angiotropin, substance P
Mitogens for fibroblasts, keratinocytes and osteoblasts	TGF- α , TGF- β 1-3, FGF1,2& 4, HB-EGF, BMP-2
Other	Apolipoprotein E, IL-1 inhibitors, purine & pyrimidine derivates (thymidine, uracil, neopterin)

Προσαρμοσμένο από: Xia Z & Triffit JT. *Biomed. Mater.*2006;1: R1-R9

4.2. Ενεργοποίηση των μακροφάγων

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων, είναι στην ουσία η απόκτηση αυξημένης ικανότητας, ώστε να πληρούν διάφορες λειτουργίες με απώτερο σκοπό την καταστροφή των μικροβίων, των καρκινικών κυττάρων και την απομάκρυνση ξένων σωμάτων. Η πολύπλοκη διαδικασία της ενεργοποίησής τους περιλαμβάνει μια σειρά πολλαπλών και διαδοχικών «βημάτων». Αλληλεπιδράσεις με παράγοντες ενεργοποίησης όπως η IFN- γ , αρχικά και εν συνεχεία με επιπρόσθετους επαγωγικούς παράγοντες, όπως IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, οδηγούν σε «ανταπόκριση» των μακροφάγων. Αυτά τα ήδη διεγερμένα μακροφάγα, δέχονται δευτερεύοντα «σήματα» από διάφορες μικροβιακές ενδοτοξίνες (π.χ. λιποπολυσακχαρίτες), με αποτέλεσμα να οδηγηθούν σε ένα ανώτατο στάδιο ενεργοποίησης (Rutherford και συν. 1993, Hogan & Vogel 1987). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, έχουν την δυνατότητα να καταστέφουν και να απομακρύνουν οποιοδήποτε «ξένο» σώμα, μέσω της αυξημένης ικανότητάς τους για χημειοταξία, κυτταρική σύνδεση, φαγοκυττάρωση, αυξημένη έκφραση επιφανειακών Ia μορίων, υποδοχείς τρανσφερίνης, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), και έκκριση κυτταροκινών, TNF- α , NO, υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και κυτταρολυτικές πρωτεάσες. Διαφορετικοί συνδυασμοί αυτών των λειτουργιών εκφράζονται από διαφορετικούς πληθυσμούς μακροφάγων, σε συνάρτηση με το μικροπεριβάλλον όπου βρίσκονται και τον συνδυασμό και συγκέντρωση των «σημάτων» ενεργοποίησης (Gessani et al. 1993, Zhang & Morrison 1993).

4.2.1. Ρύθμιση της ενεργοποίησης των μακροφάγων

Τα μακροφάγα έχουν διττό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή έναντι των εξωγενών εισβολέων. Αποτελούν κύτταρα πρώτης γραμμής στην μη-ειδική ανοσοποιητική απάντηση, ενώ δρουν και ως σημαντικά επικουρικά κύτταρα στην ειδική ανοσοποιητική απάντηση. Η έννοια της μη-ειδικής ανοσίας αναφέρεται στην στερεότυπη κινητοποίηση των ίδιων πάντοτε αμυντικών μηχανισμών για την εξουδετέρωση του ξένου βιολογικού παράγοντα, ανεξάρτητα από την ιδιαίτερη αυτού φύση. Η έννοια της ειδικής ανοσίας αναφέρεται στην κινητοποίηση, ειδικών για κάθε ξένο βιολογικό παράγοντα, αμυντικών μηχανισμών που δεν υπήρχαν εξ' αρχής, αλλά αναπτύχθηκαν επ' ευκαιρία προηγούμενης εισόδου του ίδιου βλαπτικού παράγοντα στον οργανισμό.

4.2.1.α. Μη-ειδική ανοσία

Τα μακροφάγα αρχικά αναγνωρίστηκαν ως μη ειδικά εκκαθαριστικά κύτταρα, ικανά για φαγοκυττάρωση, ανεξάρτητα από την ύπαρξη οψωνοποίησης. Τα μακροφάγα, στην μη-ειδική ανοσία μπορούν να διακρίνουν οντογενετικά διατηρημένες μοριακές δομές ή προϊόντα μεταβολισμού των μικροβίων. Οι δομές αυτές δεν παρουσιάζουν αντιγονική μεταβλητότητα στην πάροδο του χρόνου, και είναι γνωστές ως «μοριακοί σχηματισμοί συνδεδεμένοι με την παθογονικότητα» (pathogen-associated molecular patterns, PAMPS). Η αναγνώριση των PAMPS γίνεται μέσω υποδοχέων, που φέρονται ως «υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών

σηματισμών» (pattern-recognition receptors, PRRs), οι οποίοι διακρίνονται σε: - διαλυτούς (MBL, Mannan-binding lectin, CRP, C-reactive protein, serum amyloid protein P, LBP, LPS-binding protein) –μεμβρανικούς (CD14, macrophage mannose receptor, macrophage scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure) -διαμεμβρανικούς (Toll-like receptors) –ενδοκυττάρους (PKR, dsRNA-activated protein kinase) (Gordon S 2002).

Η αναγνώριση των PAMPs από τους αντίστοιχους PRRs επάγει την φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης, που οδηγούν στην παραγωγή κυτταροκινών και την «καταστροφή» των μικροβίων.

Αυτή η σημαντική τους λειτουργία να καταστρέφουν επικίνδυνους «εισβολείς» μπορεί να αποβεί επιζήμια στην περίπτωση των αρθρικών προθεμάτων. Σε μια ολική αρθροπλαστική, στην διεπιφάνεια του, κλασσικά χρησιμοποιούμενου, μετάλλου-πλαστικού (ultra high molecular weight polyethylene, UHMWPE), παράγεται μεγάλος αριθμός ρινισμάτων λόγω φθοράς. «Επιδρομή» των μακροφάγων έναντι αυτών των συνθετικών σωματιδίων οδηγεί σε μια προοδευτική και συνεχή χρόνια φλεγμονή, τύπου ξένου σώματος, με περιπροθετική οστεόλυση και την άσηπτη χαλάρωση της αρθροπλαστικής ως τελικό αποτέλεσμα. Όταν τα σωματίδια είναι αρκετά μεγάλα, ώστε τα μακροφάγα δυσκολεύονται να τα «συλλαβουν» τότε τα τελευταία «συνεργάζονται» και συγχωνεύονται σε γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος (DeFife και συν. 1999).

Τελικά, εάν τα βακτήρια ή/και τα σωματίδια είναι δύσκολο να καταστραφούν, τα μακροφάγα διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή κύτταρα και σχηματίζουν κοκκιώματα, με σκοπό την απομόνωση και τον περιορισμό του εν δυνάμει βλαβερού ερεθίσματος (Ma και συν. 2003)

4.2.1.β. Ειδική ανοσία

Τα μακροφάγα έχουν την δυνατότητα να δράσουν σαν κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (antigen presenting cell, APC), όπως και τα δενδριτικά κύτταρα. Τα μακροφάγα διασπών τον ξένο βιολογικό παράγοντα και παρουσιάζουν τμήματα αυτού στην επιφάνειά τους (αντιγόνα) πάνω σε μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) τάξης II, σχηματίζοντας σύμπλεγμα MHC class II –αντιγόνο, το οποίο παρουσιάζεται στον υποδοχέα των CD4+ T –λεμφοκυττάρων (T cell receptor, TCL), προάγοντας την ενεργοποίησή τους (Pu και συν. 2002).

Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα ή βοηθητικά T-κύτταρα δρουν ως διαμεσολαβητές στην ανοσοποιητική απάντηση. Δεν έχουν κυτταροτοξικές ή φαγοκυτταρικές ιδιότητες, αλλά ρυθμίζουν την ανοσοποιητική απάντηση.

Υπάρχουν δύο τύποι ανοσοποιητικής απάντησης των CD4+ T-βοηθητικών κυττάρων, οι Th1 (T helper 1) και Th2 (T helper 2) «απαντήσεις», οι οποίες προκαλούνται από κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές (APC) και η καθεμία προορίζεται να εξοντώσει διαφορετικούς τύπους παθογόνων. Η ενεργοποίησή της Th1 ή της Th2 «απάντησης» πραγματοποιείται μέσω συγκεκριμένων / διαφορετικών ομάδων κυτταροκινών. Παρουσία των κυτταροκινών, IL-12 και IL-18, (οι οποίες παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα), υπερισχύει η Th1 «απάντηση» (Pollock και συν. 2003), ενώ παρουσία IL-5 (και IL-13) επικρατεί ο

τύπος Th2 «απάντησης» (Bellinghausen και συν. 2003). Τα ενεργοποιημένα Th1 κύτταρα, παράγουν IFN- γ , η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί και άλλα μακροφάγα.

4.2.1.γ. Ενεργοποίηση των μακροφάγων με τον κλασσικό τύπο 1 ενεργοποίησης

Παρουσία των Th1 κυττάρων/κυτταροκινών, τα μακροφάγα ενεργοποιούνται ώστε να καταστούν δραστικά κύτταρα, δηλ. αυξάνουν (προάγουν) την ικανότητά τους να καταστρέφουν ενδοκυττάρια μικρόβια, όπως το *Mycobacterium Tuberculosis*. Εκτός από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και τις πεπτιδογλυκάνες, η IFN- γ φαίνεται να είναι το πιο σημαντικό ερέθισμα ενεργοποίησης. Επιπρόσθετα με την απάντηση στο ερέθισμα που μεσολαβείται μέσω JAK/STAT1- α , στην ενεργοποίηση των μακροφάγων η επίδραση της IFN- γ σηματοδοτείται μέσω μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων, γνωστών ως «ρυθμιστικοί παράγοντες της ιντερφερόνης» (IRF-1 έως IRF-9, στις οποίες περιλαμβάνεται η IFN-8, παλαιότερα γνωστή ως ICSBP (interferon consensus sequence-binding protein), και η IFN-9, παλαιότερα γνωστή ως ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3). Η IRF-1, μέσω δέσμησης στο IRF-binding element (IRF-E), προκαλεί μια αντιϊκή κατάσταση μέσω υπερρύθμισης της IFN- α και IFN- β και μια αντιβακτηριακή κατάσταση μέσω υπερρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης iNOS (inducible nitric oxid synthase), ενώ η IRF-2 εξασθενεί την μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω IRF-E (Battistini και συν. 2002). Τα «κλασσικά» ενεργοποιημένα «άγρια» μακροφάγα έχουν υψηλή μικροβιοκτόνο και προφλεγμονώδη δράση.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η IFN- γ δρα συνεργιστικά με τον παράγοντα TNF στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ο παράγων TNF δρα μέσω των υποδοχέων του, TNF-R2 και ιδιαίτερα μέσω του TNF-R1. Η πρόσθεση του συνδέτη προκαλεί διμερισμό (dimerization) του υποδοχέα TNF-R1 και αποδέσμευση των πρωτεϊνών SODD (silencer of death domain) από το κυτταροπλασματικό μέρος του συμπλέγματος υποδοχέα προσθέτη (ligand-receptor) (Tschopp και συν. 1999). Αυτό οδηγεί σε δέσμευση διαφόρων προσαρμοστικών πρωτεϊνών (adaptor proteins). Σε αυτές περιλαμβάνονται: TRADD (TNR receptor-associated death domain), RIP (receptor interacting protein), TRAF2(TNF-R-associated factor 2), FADD (Fas-associated death domain) (Wajant και συν. 2001, He και συν. 2002, Brown και συν. 2002). Αυτές οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες δεσμεύουν μερικά ένζυμα «κλειδιά» τα οποία μπορούν να εισαγάγουν 3 διαφορετικούς σταθμούς ενεργοποίησης. Οι «σταθμοί» αυτοί είναι: 1) η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (απόπτωση), μέσω FADD (Juo και συν. 1998). 2) ενεργοποίηση της «οδού» JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), μέσω TRAP2 και 3) ενεργοποίηση του NF κ B, μέσω RIP, ο οποίος προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών και προστατεύει έναντι της απόπτωσης (Meylan και συν. 2002).

Άλλες κυτοκίνες, όπως η IL-1 β και ο επάγων τον σχηματισμό κοκιο-και ή μονοκυτταρικών αποικιών παράγοντας GM-CSE(granulocyte-macrophage colony stimulating factor), παίζουν επίσης ρόλο ως ρυθμιστές της ενεργοποίησης των μακροφάγων.

Η δέσμευση της IL1 β στον υποδοχέα IL-1R1 ενεργοποιεί την «οδό» MAPK AP-1 (mitogen activated protein kinase-activator protein1, Fos and Jun heterodimers) καθώς και την «οδό» I- κ B kinase (IKK)-NF κ B, μέσω του παράγοντα MyD88(myeloid differentiation factor 88), της πρωτεΐνης IRAK(interleukin-1 receptor-associated

kinase) και του πρωτεϊνικού συμπλέγματος TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6).

Ο επάγων τον σχηματισμό κοκιο-και ή μονοκυτταρικών αποικιών παράγοντας GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) δεσμεύεται σε έναν ετεροδιμερή υποδοχέα GM-CSFR ο οποίος μοιράζεται μια κοινή β_c άλυσσο «σηματοδότησης» με την IL-3 και την IL-5 (Helman και συν. 2002). Μέσω της δέσμευσης αυτής ενεργοποιούνται οι «οδοί» MAPK-AP-1 και JAK2-STAT5. Ο ρόλος της IL-12 και IL-18, οι οποίες παράγονται από κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές, στην κατεύθυνση της ωρίμανσης των T βοηθητικών κυττάρων στον Th1 τύπο. (ήδη αναφέρθηκε στην ειδική ανοσία)

4.2.1.δ. Ενεργοποίηση των μακροφάγων με τον εναλλακτικό τύπο 2 ενεργοποίησης

Παρουσία ορισμένων Th2 κυττάρων/κυτταροκινών, τα μακροφάγα ενεργοποιούνται με έναν εναλλακτικό τρόπο, για την «καταπολέμηση» παρασιτικών και εξοκυττάρων παθογόνων (σε σύγκριση με την φαγοκυττάρωση και την ενδοκυττάρια καταστροφή του M. Tuberculosis) (Gordon S. 2003). Ο τύπος 2 ενεργοποίησης, αναφέρεται σε μια εναλλακτική ενεργοποίηση παρουσία της IL-4 και της IL-13, που σηματοδοτούν τα μακροφάγα εν μέρει δια μέσου μιας κοινής αλύσου-υποδοχέα, IL-4Ra. Ο αριθμός των κυττάρων αντιγονοπαρουσιαστών αυξάνεται, μέσω εκλεκτικής παραγωγής χημειοκινών, MDC (macrophage-derived chemokine) και TARC (thymus and activation-regulated chemokine). Οι χημειοκίνες, MDC και TARC, παράγονται στα κοκκιώματα τύπου 1 και 2. Μέσω του υποδοχέα mannose 6-phosphate receptor και του MHC class II (major histocompatibility complex class II), ρυθμίζεται η ενδοκυττάρια αντιγονική αντίληψη και παρουσίαση, αντίστοιχα. Η παραγωγή αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου, μέσω μακροφάγων εν μέρει καταστέλλεται, αλλά όχι πλήρως όπως συμβαίνει μέσω της IL-10. Η παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) είναι μειωμένη στα τρωκτικά και δεν παρατηρείται στους ανθρώπινους ιστούς, ίσως ως αποτέλεσμα της επαγωγής της αργινάσης τύπου 1 (arginase type 1). Η δράση της αργινάσης τύπου 1 ρυθμίζεται μέσω IL-4 και IL-13, ενώ καταστέλλεται μέσω IFN- γ . Η αργινάση τύπου 1 υδρολύει την L-αργινίνη σε ουρία και L-ορνιθίνη. Η L-ορνιθίνη χρησιμοποιείται στην παραγωγή πολυαμινών και προλίνης, που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή κολλαγόνου. Η αυξημένη αναλογία arginase type 1/ L-ornithine, μπορεί να συμβάλλει στον σχηματισμό επιθηλιοειδών κυττάρων και κοκκιοματώδους αντιδράσεως.

4.2.2. Ρυθμιστές της ενεργοποίησης των μακροφάγων

Η διαδικασία ενεργοποίησης μακροφάγων, μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους επαγωγικούς ή κατασταλτικούς παράγοντες. Η επίδραση των ρυθμιστικών παραγόντων, ασκείται μέσω επιφανειακών υποδοχέων και οδηγεί σε μια σειρά ενδοκυττάρων μεταβολών της γονιδιακής μεταγραφής και της πρωτεϊνικής έκφρασης και τελικά την λειτουργία των μακροφάγων.

4.2.2.1. Μικρόβια

Τα μακροφάγα μπορούν να αναγνωρίσουν μια πληθώρα βακτηρίων, ιών, παρασίτων και μυκήτων, μέσω μοριακών σχηματισμών που συνδέονται με την παθογονικότητα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) (Bucland J, 2001). Τα μικρόβια διαθέτουν έναν περιορισμένο αριθμό σταθερών δομών αναγνώρισης (PAMPs), που δεν υπάρχουν στα κύτταρα του ξενιστή. Οι δομές αυτές είναι απαραίτητες για την επιβίωση των μικροβίων και μικρές ακόμη μεταβολές αυτών είναι βλαβερές για τα μικρόβια.. Επομένως, μπορούν με σιγουριά να αναγνωρίζονται από περιορισμένο αριθμό υποδοχέων του ξενιστή, οι οποίοι αναφέρονται ως υποδοχείς αναγνώρισης (pattern-recognition receptors, PRRs). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς ανευρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια και σε διαλυτή μορφή σε διάφορα υγρά του σώματος. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός στην οψωνινοποίηση (πχ. διαλυτοί PRR C-reactive protein και serum amyloid P, τα οποία ήδη έχουν αναφερθεί στην μη-ειδική ανοσία), όπως και στην φαγοκυττάρωση και απόπτωση. Τα λιπίδια-A των λιποπολυσακχαριτών στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων θεωρούνται τυπικά PAMPs. Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή ενδοτοξίνες, συνδεόμενες με την πρωτεΐνη LPS-binding protein (διαλυτός PRR), αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα CD14, ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων. Για την σηματοδότηση του εν λόγω υποδοχέα είναι απαραίτητη η συνεργασία του με τον υποδοχέα TLR4. Ο TLR δρά μέσω IL-1 και MyD88. Αυτές οι μοριακές οδοί σηματοδότησης του TLR, προκαλούν ετερογένεια στην τελική «απάντηση» του ξενιστή (Underhill D και Ozinsky A, 2002). Τα διάφορα ερεθίσματα, τα οποία προέρχονται από τους λιποπολυσακχαρίτες, οδηγούν στην κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων, με αποτέλεσμα την παραγωγή IL-12. Επιπρόσθετα, περιλαμβάνεται αντιγονική επεξεργασία και παρουσίαση και ενεργοποίηση μηχανισμών ειδικής ανοσοαπάντησης στην άμυνα του ξενιστή. Μερικοί υποδοχείς αναγνώρισης (TLRs) είναι μονοειδικοί (πχ. TLR3, TLR5, TLR9), ενώ άλλοι όπως ο υποδοχέας TLR5 (δρα μαζί με τους TLR1 ή TLR6), έχουν ευρεία ειδικότητα, συμπεριλαμβανομένων και των πεπτιδογλυκανών (gram-θετικά βακτήρια).

4.2.2.2. Μακροφάγα

(αυτοκρινής ρύθμιση της δράσης των μακροφάγων, μέσω δραστικών τους μορίων)

Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την σημασία της αυτοκρινούς ρύθμισης των μακροφάγων. Για παράδειγμα, οι προτινόμενες επιδράσεις της IL-12 και της IL-18 πάνω στην IFN- γ (Munder M και συν. 1998), έχουν επικριθεί (Golab J και συν. 2000). Υπάρχει ακόμη αρκετή σκέψη για την άμεση αυτοκρινή ρύθμιση της δράσης των μακροφάγων μέσω της IFN- γ (Gessani S και Belardelli F, 1998), ή την ύπαρξη αρνητικής αυτοκρινούς ανατροφοδότησης μέσω του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της παραγωγής κυτταροκινών μέσω των ενεργοποιημένων μακροφάγων (Thomassen M και Kanuru M, 2001). Κάποιες ασάφειες προέρχονται από την απώλεια συμφωνίας για το κατά πόσο τα μακροφάγα είναι ικανά να παράγουν IFN- γ και TGF- β (Gessani S και Belardelli F, 1998), και της ετερογένειας των μακροφάγων. Επιπλέον υπάρχουν παραλλαγές στην ρύθμιση των μακροφάγων και στις «απαντήσεις» στους ίδιους μεσολαβητές (το μονοξείδιο του αζώτου, NO, αποτελεί

ένα καλό παράδειγμα). Παρ' όλα αυτά η αυτοκρινής ρύθμιση των μακροφάγων μέσω IFN- γ , IL-12, IL-10 και MIF, μπορεί να έχει βιολογική και κλινική σημασία.

4.2.2.3. T λεμφοκύτταρα

Τα T κύτταρα ρυθμίζουν την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση κυρίως μέσω δύο τύπων σημάτων. Ο πρώτος πραγματοποιείται μέσω κυτταροκινών, για παράδειγμα IFN- γ . Οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα Th1 λεμφοκύτταρα (IFN- γ , TNF, TNF- β , IL-2, GM-CSF, IFN- α /IFN- β) οδηγούν σε κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων, ενώ τα ενεργοποιημένα Th2 κύτταρα οδηγούν σε εναλλακτική ενεργοποίηση μέσω της IL-4 και IL-13 ή καταστολή της δράσης των μακροφάγων (TGF- β , IL-10). Ο δεύτερος τύπος ενεργοποίησης επιτυγχάνεται μέσω της επαφής CD4 T-κυττάρων με μακροφάγα (CD40-CD145). Η σύνδεση αυτή επάγει την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών/χημειοκινών, όπως IL-1 α / β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF, MIP-1 α . Επιπλέον, διεγείρει την παραγωγή NO, μεταλλοπρωτεϊνών και αποτρέπει την απόπτωση.

4.2.2.4. Ορμόνες

Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα διαθέτουν κλασσικούς κυτταροπλασματικούς οιστρογονικούς (ER α και ER β) καθώς και ανδρογονικούς υποδοχείς (ARs), όπως καταδείχθηκε σε μια μελέτη από τους Cutolo και συνεργάτες (1992). Επιπρόσθετα, τόσο τα οιστρογόνα όσο και τα ανδρογόνα διαθέτουν επιφανειακούς υποδοχείς, οι οποίοι μεσολαβούν άμεσες δράσεις. Υποδοχείς προγεστερόνης δεν έχουν παρατηρηθεί στα ανθρώπινα μακροφάγα. Πολλές αυτοάνοσες νόσοι είναι πιο συχνές στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες. Επομένως, κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη αυξάνουν ενώ η τεστοστερόνη μειώνει την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Όμως, σε μια μελέτη οι Morishita M και συν. (1999), κατέδειξαν ότι η προγεστερόνη, η 17 β -οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη μειώνουν την παραγωγή της IL-1 α και IL-1 β , που επάγεται μέσω λιποπολυσακχαριτών. Σε άλλη μελέτη η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη οδηγούν σε μείωση του IL-1 β mRNA, των μονοκυττάρων που εκτίθενται σε λιποπολυσακχαρίτες (Polan M και συν. 1989). Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα στην συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν από γυναίκες στην ωχρινική φάση του καταμηνίου κύκλου. Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της 17 β -οιστραδιόλης μειώνουν την παραγωγή της IL-1 β , TNF και IL-6 στις καλλιέργειες αίματος (Ralston S και συν. 1990). Αυτή η δράση παρεμποδίζεται με την χρήση αντιοιστρογόνου ICI 182780 και δεν προκαλείται από τον ανενεργό τύπο της 17 β -οιστραδιόλης. Επομένως, αν και έχουν επίσης παρουσιαστεί αντιφατικά στοιχεία (Pfeilschifter J και συν. 2002), είναι φανερό ότι τόσο τα οιστρογόνα όσο και τα ανδρογόνα ελαττώνουν την κλασσική ενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Η έλλειψη οιστρογόνων (εμμηνόπαυση) προδιαθέτει σε οστεοπόρωση, στην οποία προφανώς συντελούν η IL-1 β , TNF και IL-6. Τα οιστρογόνα αυξάνουν την δράση του υποδοχέα IL-1R2 και μειώνουν τον προφλεγμονώδη υποδοχέα IL-1R1 στα οστεοκλαστικά κύτταρα (Sunyer T και συν. 1999). Η συστηματική φλεγμονή ενεργοποιεί τον υποθαλαμικό-

υποφυσικό-επινεφριδικό άξονα και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Τα νευρικά ερεθίσματα που φθάνουν στον υποθάλαμο οδηγούν σε απελευθέρωση γλυκοκορτικοστεροειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων. Επίσης τα νευρικά ερεθίσματα, σε απάντηση στην φλεγμονή οδηγούν σε απελευθέρωση νορεπινεφρίνης από τα συμπαθητικά νεύρα και επινεφρίνης από τον φλοιό των επινεφριδίων. Αυτές οι ορμόνες δρουν στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοστεροειδών και στον β_2 -επινεφριδικό υποδοχέα των μονοκυττάρων/μακροφάγων, και αναστέλλουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF και IL-12 (Panina-Bordignon P και συν. 1997), καθώς και την κυτταροτοξική δράση του NO, μέσω αναστολής του iNOS.

4.2.2.5. Ξένα σώματα

Ένα κλασσικό παράδειγμα ξένου σώματος, αποτελούν τα μη αφομοιούμενα ρινίσματα των βιοσταθερών προθεμάτων, που χρησιμοποιούνται στις αρθροπλαστικές. Τα μακροφάγα είναι τα κύρια κύτταρα, που «απαντούν» δραστικά σχεδόν σε όλα τα βιοϋλικά των προθεμάτων, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων (Takebe και συν. 2003), των κεραμικών υλικών και του τσιμέντου (Lu και συν. 2002), των πολυμερών (Labow και συν. 2005, Solheim και συν. 2000) και πρωτεϊνικών υλικών, όπως το κολλαγόνο (Khouw και συν. 1998, Xia και συν. 1994). Η φαγοκυττάρωση των ρινισμάτων φθοράς, που προέρχονται από τα προθέματα μιας αρθροπλαστικής, είναι το κρίσιμο βήμα στην παθιογένεση της οστεόλυσης και της άσηπτης χαλάρωσης. Τα βιοϋλικά μπορούν να ενεργοποιούν τα μακροφάγα ομοίως με τα gram-αρνητικά βακτήρια ή τους λιποπολυσακχαρίτες, μέσω του υποδοχέα αναγνώρισης TLR4 (Toll-Like Receptor-4). Όμως τα επακόλουθα της μικροβιακής εισβολής και της εμφύτευσης των προθεμάτων είναι διαφορετικά. Τα μικρόβια προκαλούν λοιμώξεις, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ειδικών ανοσοποιητικών μηχανισμών, μέσω των B και T λεμφοκυττάρων, ενώ τα συνδεδετικά βιοϋλικά προκαλούν φλεγμονή και αντίδραση τύπου ξένου σώματος, χωρίς την εμπλοκή των B και T κυττάρων.

Το πρώτο βήμα στην απάντηση των μακροφάγων στην εισβολή του ξένου σώματος είναι η αναγνώριση του ξένου σώματος. Πρόκειται για μια διαδικασία όπου το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού ξεχωρίζει χημικές ουσίες, κύτταρα και ιστούς, που ανήκουν στο δικό του «σώμα», από εκείνα των ξένων οργανισμών ή παραγόντων. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται από τα μακροφάγα, μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης (pattern recognition receptors, PRRs), στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, TLRs (Toll-Like Receptors, TLR-2 έως TLR-9), SR (Scavenger Receptors), MR (Mannose Receptors), Dectin-1 (β glucan receptor, β -GR).

Μετά την αναγνώριση τα μακροφάγα προσδένονται στο ξένο σώμα με αντιδράσεις προσκόλλησης μέσω ιντεγκρινών (Phillips και Kao 2005). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν, αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης, κυτταρική κίνηση, ενεργοποίηση ειδικών κυτταρικών λειτουργιών, γονιδιακή μεταγραφή, πολλαπλασιασμό και επιβίωση των κυττάρων (Berton και Lowell 1999). Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα. Αυτά τα μόρια είναι οι πρώτοι υποδοχείς που ρυθμίζουν την προσκόλληση των κυττάρων στις πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας.

Υπάρχουν τουλάχιστον 17 διαφορετικές α -άλυσες και 8 διαφορετικές β -άλυσες

ιντεγκρινών οι οποίες δημιουργούν ζεύγη με ειδικά μόρια ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο εκφράζονται (Berton και Lowell 1999, Phillips και Kao 2005). Μελέτες του κυτταροσκελετού και των δομών προσκόλλησης έχουν καταδείξει ότι τα ποδοσώματα είναι οι κύριες δομές προσκόλλησης των επιφανειών των μακροφάγων και των ξένων σωμάτων και όχι η εστιακή επαφή (De Fife και συν 1999). Μέσω της φαγοκυττάρωσης τα μακροφάγα εγκλείουν το ξένο υλικό. Τα μακροφάγα έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν ξένα σώματα διαμέτρου τουλάχιστον 0,5μm. Η διαδικασία αυτή εισάγεται μέσω αλληλεπιδράσεων ειδικών υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης με ειδικά μόρια, συνδέτες, που βρίσκονται στην επιφάνεια των ξένων σωματιδίων. Η πρόσδεση συνδέτη-υποδοχέα αποτελεί το έναυσμα για την τοπική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού για την πρόσληψη των σωματιδίων (Kwiatkowska και Sobota 1999). Βέβαια η διαδικασία που οδηγεί τα μακροφάγα στην προσκόλληση και φαγοκυττάρωση των βιοϋλικών είναι πολύπλοκη και όχι πλήρως κατανοητή.

Για σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους (π.χ. 10-100μm), τα οποία ένα μόνο μακροφάγο δεν έχει την δυνατότητα να τα προσλάβει, σχηματίζονται πολυπύρηννα μακροφάγα, πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα ή γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος. Ο σχηματισμός των πολυπύρηννων κυττάρων είναι αποτέλεσμα συγχώνευσης των μονοπύρηννων μακροφάγων. Οι κυτταροκίνες IL-4 και IL-13, έχει αποδειχθεί ότι επάγουν τον σχηματισμό γιγαντοκυττάρων τύπου ξένου σώματος (Christenson και συν. 2005, De Fife και συν. 1997) καθώς και ο υποδοχέας των μακροφάγων MR (McNally και συν. 1996). Επίσης και τα λεμφοκύτταρα αυξάνουν την προσκόλληση και συγχώνευση των μακροφάγων (Brodbeck και συν. 2005, McEwan και συν. 2005).

Έχει αποδειχθεί σε μελέτες, in vivo και in vitro, ότι τα γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος έχουν την ικανότητα να αποδομούν αποτελεσματικά κολλαγόνο/υδροξυαπατίτη, πολυμερή υλικά και τσιμέντο (Xia και συν. 1994,2004). Ο ρόλος των κυττάρων αυτών στην αποδόμηση των βιοϋλικών και τα επακόλουθα αποτελέσματά τους στους ιστούς έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας (Elliot και συν. 2002, Lam και συν. 1993, Xia και συν. 1994).

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α) χημειοκίνες, παράγοντες ανάπτυξης(M-CSF, GM-CSF, G-SF, PDGF), και άλλους βιοενεργούς παράγοντες με σκοπό την ρύθμιση των λειτουργιών άλλων κυτταρικών τύπων στο φλεγμονώδες περιβάλλον (Bosca και συν. 2005), στους οποίους περιλαμβάνονται βιοενεργά λιπίδια (prostaglandins:PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, tromboxans, leukotrienes: LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), βιοενεργά ολιγοπεπτιδία (glutathione), συστατικά του συμπληρώματος (C1, C4, C2, C3, C5, factors B, D, P, I, H), παράγοντες πήξης του αίματος (V, VII, IX, X, prothrombin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitors), πρωτεϊνάσες (elastase, collagenase, angiotensin convertase, stromelysin), όξινες υδρολάσες (cathepsin D, L, peptidases, lipases, lysozyme, ribonucleases, phosphatases, sulphatases), πρωτεΐνες (heat shock proteins), ενεργά παράγωγα οξυγόνου (superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, chloramines) και ενεργά παράγωγα αζώτου (nitric oxid, nitrites, nitrates). Για παράδειγμα, η συστηματική αύξηση των επιπέδων της IL-1 που προέρχεται από τα μακροφάγα, μπορεί να προκαλέσει ουδετεροφιλία, αύξηση της κυτταροβρίθειας του μυελού των οστών, αύξηση της συγκέντρωσης του οξειδίου του αζώτου, και αύξηση της ηπατικής σύνθεσης πρωτεϊνών. Μια τοπική αύξηση στην συγκέντρωση της IL-1 μπορεί να αυξήσει την διήθηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηννων λευκοκυττάρων, να επάγει την αγγειογένεση, να αυξήσει την παραγωγή αντισωμάτων και την σύνθεση λεμφοκυτταροκινών (Kao 1999).

Εκτός από τον ρόλο τους στην ανοσοποιοποιητική απάντηση και φλεγμονή, τα μακροφάγα έχουν σημαντικό ρόλο και στη αναγέννηση του ιστού. Η εμφύτευση των βιοϋλικών *in vivo* προκαλεί την διαρροή του αίματος από τα κατεστραμμένα αγγεία και τον σχηματισμό θρόμβου ινικής. Το πρώτο βήμα, προς την κατεύθυνση της αναγέννησης του ιστού είναι η απομάκρυνση των συγκριμάτων, που αποτελούνται από κατεστραμμένο ιστό, νεκρωτικά και αποπτωτικά κύτταρα και σωματίδια. Τα μακροφάγα «ανοίγουν» ουσιαστικά τον δρόμο για την επανόρθωση του ιστού μέσω της φαγοκυτταρώσεως των συγκριμάτων και παράλληλα παράγουν διάφορα ένζυμα (proteinase, collagenase, elastase, hyaluronidase), για την αναδιοργάνωση του. Εν συνεχεία, εκκρίνουν διάφορους παράγοντες ανάπτυξης, όπως FGF1, FGF2, FGF4 (fibroblast growth factors) και TGF α , β 1-3 (transforming growth factors), οι οποίοι συμβάλουν στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών (Linkhart και συν. 1996), EGF (epithelial growth factor), στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Martin 1997) και ακόμη BMP (bone morphogenetic proteins), που επάγουν τον σχηματισμό οστού (Champagne και συν. 2002, Takebe και συν. 2003). Το τελευταίο βήμα στην αναγέννηση του ιστού είναι η αγγειογένεση, δηλαδή η δημιουργία αιμοφόρων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό σύστημα. Τα μακροφάγα απελευθερώνουν αγγεογενετικά μόρια (Crowther και SYN. 2001), στα οποία περιλαμβάνονται οι bFGF (basic fibroblast growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor- α), VEGF (vascular endothelial growth factor) (Okazaki και συν. 2005), MMP-9 (macrophage matrix metalloproteinase-9) (Bendeck 2004) και MIF (macrophage migration inhibitory factor) (Nishihira και συν. 2003).

Η ανταπόκριση των μακροφάγων στα βιοϋλικά δεν είναι πλήρως κατανοητή. Εκτός από την φλεγμονώδη αντίδραση, επιπλέον μελέτες απαιτούνται σχετικά με την αποδόμηση των βιοϋλικών μέσω των μακροφάγων και της αναγέννησης των ιστών.

4.2.3. Απενεργοποίηση των μακροφάγων

Η απενεργοποίηση των ήδη ενεργοποιημένων μακροφάγων, είναι μια ενεργός και ελεγχόμενη διαδικασία. Μπορεί να επιτευχθεί μέσω αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, π.χ. IL-10. Τα γλυκοκορτικοστεροειδή, μετά από δέσμευσή τους σε έναν κυτταροπλασματικό υποδοχέα στεροειδούς ορμόνης (steroid hormone receptor), απορρυθμίζουν την γονιδιακή μεταγραφή των iNOS, COX-2 και TNF. Σε υψηλές συγκεντρώσεις τα γλυκοκορτικοστεροειδή είναι ανοσοκατασταλτικά και αναστέλουν την έκφραση του MHC class I-II και την αντιγονική επεξεργασία (Berrebi και συν. 2003).

Μερικές δράσεις των γλυκοκορτικοστεροειδών μεσολαβούνται μέσω μεταγραφικής ρύθμισης αντιφλεγμονωδών γονιδίων, π.χ. annexin 1 (lipocortin 1). Τα συγκεκριμένο γονίδιο, δεσμεύει στην κυτταρική του μεμβράνη, υποστρώματα της φωσφολιπάσης A2 και απορρυθμίζει τον σχηματισμό αραχιδονικού οξέος. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί την βάση για τον σχηματισμό των προσταγλανδινών (PGs), μέσω κυκλοξυγενασών (COX-1 έως -3). Η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), υπερρυθμίζεται μέσω φλεγμονωδών ερεθισμάτων και θεωρείται ότι εμπλέκεται στην έκκριση προσταγλανδινών στα τελικά στάδια της φλεγμονής, κατά τη διάρκεια της λύσης αυτής. Η αντιφλεγμονώδης δράση τους διεκπεραιώνεται μέσω μιας υποομάδας των μεταβολιτών των προσταγλανδινών, των cyPGs (cyclopentenone prostaglandins), όπως η 15dPGJ₂ που προέρχεται από τον μεταβολίτη PGD₂ και η PGE_{1/2} που προέρχεται από τον μεταβολίτη PGA_{1/2}.

Οι cγPGs απορρυθμίζουν τα μακροφάγα και τα σηματοδοτικά μονοπάτια NFκB, AP-1, STAT. Επιπλέον, αυξάνουν την απόπτωση των μακροφάγων και μειώνουν την παραγωγή αντιδραστικών προϊόντων τους, οξυγόνου και αζώτου. Η 15dPGJ₂ είναι συνδέτης του υποδοχέα PRARγ, ο οποίος σχετίζεται με την απορρύθμιση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τις «οδούς» NFκb, AP-1 και STAT. Επιπρόσθετα η 15dPGJ₂ είναι άμεσα αναστολέας της IKK και επομένως εμποδίζει την ενεργοποίηση της «οδού» NFκB (Lawrence και συν. 2002).

Διάφορα πεπτίδια, όπως PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), VIP (vasoactive intestinal peptide) και νευροπεπτίδια που παράγονται από Th2 κύτταρα, απορρυθμίζουν την έκκριση των TNF, IL-6, IL-12p40, IFN-γ, TGFβ και υπερρυθμίζουν την έκκριση της IL-10. Το πεπτίδιο VIP, μπορεί να δεσμευτεί σε τρεις διαφορετικούς υποδοχείς, VPAC1, VPAC2 και PAC1. Σε ένα πειραματικό μοντέλο αρθρίτιδας, η κύρια δράση του VIP φαίνεται να είναι στην απενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και αυτό μέσω του υποδοχέα VPAC1 (Delgado και συν. 2001). Με την δέσμευση του στον υποδοχέα VPAC1, ενεργοποιεί το σύστημα cAMP/PKA, το οποίο σύμφωνα με τους Ganea και Delgado (2001) οδηγεί σε απορρύθμιση των IRF-1, AP-1 και NFκB σηματοδοτικών μονοπατιών.

Η άμεση επαφή κύτταρο με κύτταρο μπορεί να παίξει απενεργοποιητικό ρόλο, όταν το κύτταρο στόχος είναι CD47+ και έρθει σε επαφή με το μακροφάγο το οποίο εκφράζει την διαμεμβρανική πρωτεΐνη SIRPα (signal regulatory protein-α). Έχει καταδειχθεί πρόσφατα ότι η δέσμευση αυτή οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση της φαγοκυττάρωσης, η οποία επιτελείται μέσω του υποδοχέα Fcγ, λόγω της αποφωσφορυλίωσης της μυοσίνης-IIA., η οποία αποτελεί μόριο-«κλειδί» για την φαγοκυττάρωση στις φαγοκυτταρικές συνάψεις.

Απορρύθμιση μπορεί να ακολουθήσει και μετά τον διαχωρισμό του συμπλέγματος IFN-γ/IFN-R. Η πρόσληψη αποπτωτικού υλικού, δημιουργεί αντιφλεγμονώδη «σήματα». Υψηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιημένων ερεθισμάτων είναι κυτταροτοξικές για τα μακροφάγα. Αυτά τα ερεθίσματα περιλαμβάνουν τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και σωμάτια πυριτίου (silica particles). Η αυτοκρινής παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων από τους λιποπολυσακχαρίτες διαμεσολαβεί την απόπτωση των μακροφάγων, με αποτέλεσμα την «μη-φλεγμονώδη απομάκρυνσή» τους από την «σκηνή».

5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΣΗΠΤΗΣ ΧΑΛΑΡΩΣΗΣ/ΟΣΤΕΟΛΥΣΗΣ

Η περιπροθετική οστεόλυση/ άσηπτη χαλάρωση παραμένει η κύρια επιπλοκή μιας ολικής αρθροπλαστικής. Τα ρινίσματα φθοράς των υλικών των προθεμάτων, θεωρούνται το κύριο αρχικό γεγονός που οδηγεί τελικά στην άσηπτη χαλάρωση του προθέματος. Ο πιο σημαντικός κυτταρικός στόχος των σωματιδίων φθοράς είναι τα μακροφάγα, τα οποία ανταποκρίνονται με δύο ξεχωριστούς τρόπους, πρώτον ενεργοποιούνται προφλεγμονώδη σήματα, που οδηγούν στην αύξηση των οστεοκλαστών και την ενεργοποίησή τους και δεύτερον τα ρινίσματα φθοράς αναστέλλουν τις προστατευτικές δράσεις των αντιστεοκλαστογενετικών κυτταροκινών (π.χ. IFN- γ), προκαλώντας με τον τρόπο αυτό διαφοροποίηση των μακροφάγων σε λειτουργικούς οστεοκλάστες, όπου και οι δύο οδηγούν σε αυξημένη οστική απορρόφηση. Επίσης, οστεοβλάστες, ινοβλάστες και πιθανώς λεμφοκύτταρα, είναι δυνατό να εμπλέκονται στην διαδικασία της περιπροθετικής οστεόλυσης. Σε μοριακό επίπεδο, τα ρινίσματα φθοράς ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B, των κινασών MAP και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, προκαλώντας έκφραση ή καταστολή ενεργοποίησης των κυτταροκινών. Τέλος, αν και οι θεραπευτικοί παράγοντες έναντι των προφλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. αναστολέας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων, anti-TNF) και των οστεοκλαστών (π.χ. μόρια που καταστέλλουν την σηματοδότηση του RANKL) έχουν δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα, δεν υπάρχουν ακόμη εγκεκριμένες θεραπείες, διαθέσιμες, για τους ασθενείς με οστεόλυση.

5.1. Κυτταρική βιολογία της άσηπτης χαλάρωσης / οστεόλυσης

5.1.1. Μακροφάγα

Υπάρχουν βασικές μαρτυρίες ότι ο πιο σημαντικός κυτταρικός στόχος των ρινισμάτων φθοράς είναι τα μακροφάγα. Η μεμβράνη (synovial-like membrane), που σχηματίζεται στην διεπιφάνεια οστού-προθέματος στους ασθενείς με οστεόλυση, επιδεικνύει εκτεταμένη διήθηση μακροφάγων (Willert 1977) και η παρουσία σωματιδίων στα κύτταρα αυτά υποδηλώνει ενεργό φαγοκυττάρωση (Schmalzried και συν. 1992). Σε μελέτες *in vitro*, με καλλιέργειες μακροφάγων έχει διαπιστωθεί η φαγοκυττάρωση των ρινισμάτων φθοράς (Blaine και συν. 1996, Nakashima και συν. 1999, Xing και συν. 2002, Yagil-Kelmer και συν. 2004), η οποία συνοδεύεται από παραγωγή προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως την προσταγλανδίνη E2 (PGE2), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α (TNF- α), την ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β) και ιντερλευκίνη-6 (IL-6) (Blaine και συν. 1996, Ingham και συν. 2000, Maloney και συν. 1996, Merkel και συν. 1999, Nakashima και συν. 1999, Wilmhurst και συν. 2001). Η φύση της απάντησης εξαρτάται από διάφορους παραμέτρους, όπως η σύνθεση (Haynes και συν. 1998, Sethi και συν. 2003, Shanbhag και συν. 1994), το μέγεθος (Green και συν. 1998, Yagil-Kelmer και συν. 2004), το σχήμα (Yang και συν. 2002), ο όγκος και η επιφάνεια (Shanbhag και συν. 1994) των σωματιδίων. Η έκφραση και η έκκριση των μεταλλοπρωτεϊνών είναι επίσης αυξημένη στα μακροφάγα που εκτίθενται σε ρινίσματα φθοράς *in vitro* (Nakashima και συν. 1998). Αυξημένα επίπεδα και άλλων πρωτεϊνών έχουν διαπιστωθεί στους

περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με οστεόλυση (Kido και συν. 2004, Takei και συν. 2000), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι μπορεί να συμβάλλουν στην καταστροφή του ιστού.

Μελέτες με πειραματικά μοντέλα υποστηρίζουν τον ρόλο των μακροφάγων παρουσία των σωματιδίων φθοράς. Για παράδειγμα, η εμφύτευση πολυαιθυλενίου στο οστόν της κνήμης κουνελιού, επάγει μια αντίδραση τύπου ξένου σώματος (Goodman και συν. 1990) και ο ιστός γύρω από το χαλαρό πρόθεμα παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα PGE₂, σε σύγκριση με τον ιστό γύρω από τα σταθερά προθέματα (Goodman και συν. 1992). Ομοίως σε πειραματικά μοντέλα σκύλων ανευρέθησαν αυξημένες τιμές προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως των PGE₂ και IL-1 (Spector και συν. 1990). Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, η εμφύτευση σωματιδίων μετάλλου, πολυαιθυλενίου και οστικού τσιμέντου υποδερμικά επάγει την αύξηση των μακροφάγων και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Woolley και συν. 2002), αναλόγως με την άμεση εφαρμογή τσιμέντου ή σωματιδίων τιτανίου γύρω από τα κνημιαία προθέματα (Warne και συν. 2004).

Τα αποτελέσματα από τους ιστούς στις *in vitro* και πειραματικές μελέτες, δημιουργούν ένα μοντέλο για την οστεόλυση, όπου τον κύριο εναρκτήριο γεγονός είναι η προφλεγμονώδης ανταπόκριση των μακροφάγων, η οποία οδηγεί σε εκτεταμένη «στρατολόγηση», παραγωγή και ενεργοποίηση οστεοκλαστών. Μια σημαντική υποστηρικτική απόδειξη της εμπλοκής των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην οστεόλυση, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, αφορά στην παρατήρηση, ότι γονιδιακή θεραπεία με αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1Ra ή IL-10, προστατεύει από την φλεγμονώδη ανταπόκριση στα σωματίδια πολυαιθυλενίου (Yang και συν. 2002). Επιπρόσθετα, αναστολή της δράσης του TNF- α , είτε με διαγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τους TNF υποδοχείς (TNFRS) είτε μέσω θεραπείας με etanercept (TNF ανταγωνιστής), μειώνουν την φλεγμονή που επάγεται από τα σωματίδια τσιμέντου (PMMA) και τιτανίου καθώς και την οστεόλυση (Merkel και συν. 1999, Schwarz και συν. 2000, Childs και συν. 2001). Παρ' όλα αυτά δεν υπάρχει άμεση απόδειξη, για παρόμοια εμπλοκή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στους ανθρώπινους ιστούς. Για παράδειγμα, αν και μερικοί ερευνητές έχουν αναφέρει αυξημένες τιμές του TNF- α στους περιπροθετικούς ιστούς και το αρθρικό υγρό των ασθενών με οστεόλυση (Chiba και συν. 1994, Nivbrant και συν. 1999, Stea και συν. 2000), άλλοι υποστηρίζουν ότι οι τιμές του είναι χαμηλότερες συγκρινόμενες με control groups ή μη ανιχνεύσιμες (Sabokbar και συν. 1995, Shanbhag και συν. 1995). Δεν υπάρχει κάποια απόδειξη που να συνηγορεί υπέρ των αυξημένων επιπέδων του TNF- α στο ορό των ασθενών με οστεόλυση (Fiorito και συν. 2003, Granchi και συν. 1998, Hernigou και συν. 1999). Επίσης, οι μετρήσεις των επιπέδων του TNF- α mRNA επίσης δεν οδηγούν σε κάποιο συμπέρασμα (Haynes και συν. 2001, Ishiguro και συν. 1997, Suh και συν. 2002). Ανοσοϊστοχημικές και μελέτες με *in situ* υβριδισμό, υποστηρίζουν την παρουσία αυξημένης έκφρασης του παράγοντα TNF- α στα κύτταρα των περιπροθετικών ιστών (Goodman και συν. 1998, Stea και συν. 2000, Xu και συν. 1996). Αυτές όμως οι τεχνικές είναι ημιποσοτικές και δεν μπορούν πραγματικά να αξιολογηθούν σαν αληθείς ποσοτικές μετρήσεις των επιπέδων της πρωτεΐνης και του mRNA του παράγοντα TNF- α . Τα δεδομένα για την έκφραση του TNF- α στους ασθενείς με οστεόλυση είναι αμφισβητήσιμα. Μια πιθανότητα, σύμφωνη με την σημασία του TNF στα διάφορα πειραματικά μοντέλα είναι ότι στους ανθρώπινους ιστούς, ο παράγοντας TNF, να εμπλέκεται στα πρώιμα και όχι στα τελικά στάδια της παθογένεσης. Η επίλυση του θέματος αυτού είναι σημαντική για την καλύτερη

κατανόηση της οστεόλυσης και της χαλάρωσης καθώς και για τον σχεδιασμό και την επιλογή της θεραπείας.

Έχει επίσης καταδειχθεί ότι ένα ποσοστό των μακροφάγων, στους περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με οστεόλυση, διαθέτει την ικανότητα να διαφοροποιείται σε λειτουργικούς οστεοκλάστες και να εκφράζει δείκτες οστεοκλαστών, όπως TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) και VNR (vibronectin receptor) (Neale και συν. 2000). Η δημιουργία οστεοκλαστών από τα μακροφάγα της αρθροπλαστικής αναστέλλεται μέσω OPG, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο συνδέτης RANKL, μπορεί να επηρεάζει την δημιουργία των οστεοκλαστών στους ιστούς αυτούς (Itonaga και συν. 2000). Οι μαρτυρίες αυτές βρήκαν υποστήριξη σε μια μελέτη του Haynes και συν. (2001), οι οποίοι κατέδειξαν την δημιουργία οστεοκλαστών, ικανών για οστική απορρόφηση, από κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από ιστούς γύρω από χαλαρά προθέματα με οστεόλυση, καθώς επίσης και την έκφραση mRNA για τα μόρια RANK και RANKL στα κύτταρα που απομονώθηκαν από τους περιπροθετικούς ιστούς. Επομένως η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι οι ιστοί γύρω από τα χαλαρά προθέματα μιας αρθροπλαστικής πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την διαφοροποίηση των οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων. Υπάρχει μια πρόσφατη μαρτυρία, ότι τα μακροφάγα των περιπροθετικών ιστών, που λαμβάνονται μετά από αναθεώρηση της αρθροπλαστικής διαφοροποιούνται σε λειτουργικούς οστεοκλάστες ικανούς για οστική απορρόφηση, μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από την δράση του RANKL (Sabokbar και συν. 2003).

5.1.2. Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα κύτταρα, που προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα της αιματικής κυκλοφορίας (osteoclast precursor cells) του μονοκυτταρικού φαγοκυτταρικού συστήματος και αποτελούν τον μόνο κυτταρικό τύπο ικανό για οστική απορρόφηση (Boyle και συν. 2003). Όταν εξετάζουμε τις αιτίες της υπερβολικής οστικής απορρόφησης, στους ασθενείς με οστεόλυση, είναι σημαντικό να λαμβάνουμε υπόψιν την συγκέντρωση των προδρόμων οστεοκλαστικών κυττάρων από την αιματική κυκλοφορία και την παραγωγή λειτουργικών οστεοκλαστών εξ αυτών στους περιπροθετικούς χώρους. Το ενδιαφέρον της έρευνας των έμμεσων επιδράσεων των ρινισμάτων φθοράς στην οστεοκλαστογένεση, έχει εστιαστεί κυρίως στην δράση των κυτταροκινών, του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF- α) και της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί ως κύριοι μεσολαβητές της οστεόλυσης σε πειραματικά μοντέμα (Childs και συν. 2001, Epstein και συν. 2005, Yang και συν. 2004). Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α (TNF- α), είναι μια δραστική οστεοκλαστογόνο κυτταροκίνη, η οποία δρα συνεργιστικά με το μόριο RANKL, στην διέγερση της οστεοκλαστογένεσης μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B. (Merkel και συν. 1999, Purdue και συν. 2006). Η IL-1, είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, η οποία έχει ταυτοποιηθεί σε καλλιέργειες μακροφάγων, που εκτέθηκαν σε σωματίδια τιμάντου και τιτανίου (Glant και συν. 1994, 1993), καθώς και στους περιπροθετικούς ιστούς ασθενών με άσηπτη χαλάρωση (Kim και συν. 1993). Οι δράσεις της αφορούν στην ενίσχυση της έκφρασης του υποδοχέα RANKL, την διαφοροποίηση των οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων σε λειτουργικούς οστεοκλάστες και την αύξηση της ικανότητάς τους για οστική απορρόφηση. Όμως δεν είναι σαφές αν οι συγκεκριμένες

φλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι αυξημένες στα τελικά στάδια της οστεόλυσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί.

5.1.3. Οστεοβλάστες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ μερικής οστικής απορρόφηση και σχηματισμού νέου οστού, επιτρέπουν την οστική ανακατασκευή και ομοιοστασία. Είναι όμως σημαντικό να ληφθεί υπόψιν τότε, επιπρόσθετα με την αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα, τα ρινίσματα φθοράς μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην οστεόλυση μέσω αναστολής της δημιουργίας οστού. Δεν έχει δοθεί αρκετή προσοχή γύρω από τον πιθανό ρόλο, στην διαδικασία της οστεόλυσης, των οστεοβλαστών, τον κυτταρικό τύπο που είναι κατεξοχήν υπεύθυνος για την δημιουργία νέου οστού. Η έρευνα είναι περιορισμένη σε *in vitro* μοντέλα, που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις σωματιδίων-κυττάρων. Υπάρχουν μαρτυρίες ότι τα ρινίσματα πολυαιθυλενίου και μετάλλου μπορούν να φαγοκυτταρωθούν από τους οστεοβλάστες (Lohmann και συν. 2000). Σωματίδια μετάλλου και πολυμερών βιοϋλικών μειώνουν την έκφραση του κολλαγόνου τύπου I και III, μέσω των οστεοβλαστών (Vermes και συν. 2001, 2000, Yao και συν. 1997. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι, το τιτάνιο μειώνει την βιωσιμότητα των οστεοβλαστών, αυξάνοντας την απόπτωσή τους (Pioletti και συν. 2002), ενώ το οστικό τσιμέντο καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους (Zamboni και συν. 1998). Οι διάφοροι τύποι σωματιδίων φθοράς, επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τον πολλαπλασιασμό και την δράση των οστεοβλαστών (Lohmann και συν. 2002). Υπάρχει επίσης απόδειξη ότι η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών από τους προγεννήτορές τους απορυθμίζεται παρουσία σωματιδίων τιτανίου (Wang και συν. 2002) και επιπρόσθετα το τιτάνιο και η ζirkονία επάγουν την απόπτωση των κυττάρων αυτών (Wang και συν. 2003), υποδηλώνοντας ότι τα ρινίσματα φθοράς είναι δυνατό να καταστέλλουν τον σχηματισμό και την λειτουργία των οστεοβλαστών.

5.1.4. Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες, είναι άφθονοι στους περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με οστεόλυση, και εκφράζουν τον συνδέτη RANKL (Horiki και συν. 2004, Quinn και συν. 2000). Η έκφρασή τους αυξάνεται μετά από επώαση ινοβλαστών με σωματίδια τιτανίου ή μέσω της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και τα ενεργοποιημένα κύτταρα είναι ικανά να επάγουν την διαφοροποίηση των οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων σε ώριμους λειτουργικούς οστεοκλάστες, παρουσία MCSG (Wei και συν. 2005). Ομοίως, οι ινοβλάστες που απομονώνονται από τους περιπροθετικούς ιστούς (οι οποίοι πιθανώς έχουν εκτεθεί σε ρινίσματα φθοράς *in vivo*), ενισχύουν την παραγωγή οστεοκλαστών από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα (Sabokbar και συν. 2005). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι οι περιπροθετικοί ινοβλάστες που εκτίθενται στα σωματίδια φθοράς των βιοϋλικών των προθεμάτων και / ή στους διαμεσολαβητές της φλεγμονής είναι ικανά να αποτελέσουν βασικές πηγές του συνδέτη RANKL, ο οποίος είναι απαραίτητος για την προώθηση της οστεοκλαστογένεσης στους ασθενείς με οστεόλυση. Τα σωματίδια σε καλλιέργειες ινοβλαστών, μπορούν επίσης να προκαλέσουν παραγωγή προφλεγμονωδών

διαμεσολαβητών (collagenase, stromelysin), που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της οστεόλυσης (Yao και συν. 1995, Manlapaz και συν. 1996) και χημειοκινών, οι οποίες συντελούν στην στην συγκέντρωση αυξημένου αριθμού οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων στους περιπροθετικούς ιστούς (Yaszay και συν. 2001).

5.1.5. Λεμφοκύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ομοιοστασία του οστού, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν προοστεοκλαστογενετικές (π.χ. RANKL) και αντιοστεοκλαστογενετικές (π.χ. ιντερφερόνη- γ) κυτταροκίνες κατά την διάρκεια της ενεργοποίησής τους και εμπλέκονται στην οστική απώλεια που μεσολαβείται μέσω RANKL, που παρατηρείται σε φλεγμονώδεις νόσους, όπως είναι π.χ. η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Gravallesse και συν. 2000, Kong και συν. 1999, Kotake και συν. 2001).

Όμως η εμπλοκή των Τ κυττάρων στην περιπροθετική οστεόλυση είναι αμφιλεγόμενη. Αν σε μερικές μελέτες των περιπροθετικών ιστών αναφέρεται η παρουσία σημαντικών ποσών ενεργοποιημένων Τ κυττάρων (Agora και συν. 2003, Farber και συν. 2001), σε άλλες μελέτες τα ευρήματα αφορούν σε αδρανή ή χαμηλά ποσά Τ κυττάρων (Baldwin και συν. 2002, Lio και συν. 2001). Η παρουσία Th1 και Th2 κυτταροκινών στους περιπροθετικούς ιστούς έχει αναφερθεί (Agora και συν. 2003), ενώ υπάρχουν και μελέτες όπου δεν διαπιστώνεται η παρουσία τους (Baldwin και συν. 2002, Lio και συν. 2001). Η πιο σημαντική απόδειξη για τα ην εμπλοκή των Τ λεμφοκυττάρων στην άσηπτη χαλάρωση είναι οι σχετικές αναφορές στην ειδική λεμφοκυτταρική απάντηση στα μεταλλικά προθέματα (Hallab και συν. 2005, Davies και συν. 2005). Είναι απαραίτητες περισσότερες μελέτες για τον σαφή καθορισμό του ρόλου των λεμφοκυττάρων στην περιπροθετική οστεόλυση.

Η ιντερλευκίνη-18 (IL-18), είναι μια καινοφανής κυτταροκίνη η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην διαταραχή της οστικής ομοιοστασίας, που παρατηρείται σε διάφορες συστηματικές νόσους (π.χ. φλεγμονώδης αρθρίτις) (Liew και συν. 2003). Όμως ο ρόλος της στην οστεοκλαστογένεση, που επάγεται από τα ρινίσματα φθοράς των προθεμάτων δεν έχει εξετασθεί, in vitro ή / και in vivo. Η IL-18 είναι μέλος της οικογενείας της IL-1 και χαρακτηρίζεται από την ικανότητα της να προάγει τις Th1 απαντήσεις σε συνεργεία με την IL-12 (Munder και συν. 1998). Στην IL-18 έχουν αποδοθεί και άλλες ιδιότητες, στις οποίες περιλαμβάνονται η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των Th1 κυττάρων, της έκφρασης της IL-12R α , και της παραγωγής IFN- γ , TNF- α και GM-CSF από τα Th1 κύτταρα (Okamura και συν. 1998). Επίσης, στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των Τ λεμφοκυττάρων η IL-18, είτε τις Th1 ή Th2 απαντήσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη κυτταροκίνη διαδραματίζει ένα ευρύτερο ρόλο στην λειτουργική διαφοροποίηση των Τ κυττάρων (Xu και συν. 2000). Η σύνθεση της IL-18 έχει περιγραφεί στα μακροφάγα, κύτταρα Kupffer, κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες (Gracie και συν. 1999, Okamura και συν. 1995, Olee και συν. 1999, Stoll και συν. 1998, 1997, Udagawa και συν. 1997).

5.2. Μοριακή βιολογία της άσηπτης χαλάρωσης /οστεόλυσης

Μεγάλη πρόοδος έχει γίνει τις τελευταίες δεκαετίες, σε πολλά εργαστήρια, όσον αφορά την κατανόηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην απώλεια οστού. Ιδιαίτερα οι ανακαλύψεις των τριών βασικών μορίων που ελέγχουν την λειτουργία των οστεοκλαστών, έχει μετατοπίσει την έρευνα των οστών σε μια νέα εποχή. Οι παράγοντες αυτοί, είναι ο υποδοχέας RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB), ο συνδέτης του RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB ligand, ο υποδοχέας, «ανταγωνιστής» του RANKL, OPG (osteoprotegerin). Αν και οι αντίστοιχες ουσίες (PTHrP, vit. D3) και κυτταροκίνες (IL-1β, TNF-α) έχει καταδειχθεί ότι επηρεάζουν την οστεοκλαστογένεση σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης (Theill και συν. 2002), μόνο η αλληλεπίδραση RANK-RANKL-OPG αποδειχθεί ότι είναι απολύτως απαραίτητη για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών in vivo (Dougall και συν. 1999, Kong και συν. 1999, Li και συν. 2000).

5.2.a. RANK (Receptor Activator of NFκB)

Ο υποδοχέας ενεργοποίησης του NFκB, είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας, που ανήκει στην υπεροικογένεια του υποδοχέα TNF (TNFR) και εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των αιμοποιητικών οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων, στους ώριμους οστεοκλάστες, στα δενδριτικά κύτταρα, στα χονδροκύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα του μαζικού αδένα (Anderson και συν. 1997, Hsu και συν. 1999, Li και συν. 2000). Η πρόσθεση του υποδοχέα RANK με τον συνδέτη του RANKL εισάγει μια σειρά σημάτων τα οποία τελικά οδηγούν στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστικών αρχέγονων κυττάρων και την ενεργοποίηση των ώριμων οστεοκλαστών (Burgess και συν. 1999, Hsu και συν. 1999, Nakagawa και συν. 1998).

5.2.β. RANKL (Receptor activator of NFκB ligand)

Ο συνδέτης RANKL διαδραματίζει επίσης σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη και ρύθμιση του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος και εμπλέκεται στην ρύθμιση των επικοινωνιών μεταξύ T κυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, την επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων και την οργανογένεση λεμφοζιδίων (Kong και συν. 1999, Theill και συν. 2002). Η παραγωγή RANKL από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα μπορεί άμεσα να ρυθμίσει την οστεοκλαστογένεση και την ανακατασκευή του οστού και έτσι εξηγείται γιατί αυτοάνοσες νόσοι, καρκίνοι, λευχαιμίες, άσθμα, χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις και περιοδοντικές νόσοι οδηγούν σε συστηματική και τοπική οστική απώλεια (Kong και συν. 1999, Mombaerts και συν. 1993, Theill και συν. 2002). Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να εξηγηθεί μια πιθανή «οδός» για την οστεόλυση που διαμεσολαβείται από τα ρινίσματα μετάλλου. Περιληπτικά, η δράση του συνδέτη αφορά την αύξηση και ενεργοποίηση των ώριμων οστεοκλαστών και επομένως σε ματατόπιση της τοπικής και συστηματικής οστικής ομοιοστασίας προς την κατεύθυνση της οστικής απορρόφησης.

5.2.γ. OPG(osteoprotegerin / osteoclastogenesis inhibitor factor)

Η βιολογική δράση του συνδέτη RANKL ρυθμίζεται από μια διαλυτή πρωτεΐνη, την OPG. Και η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην υπεροικογένεια TNFR και εκκρίνεται από στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και τους οστεοβλάστες (Yasuda και συν. 1998). Η πρωτεΐνη OPG, είναι ένας υποδοχέας που δρα ανταγωνιστικά με τον RANKL, μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα RANK στην κυτταρική επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστικών κυττάρων και των ώριμων οστεοκλαστών, παρεμποδίζει την πρόσδεση RANKL-RANK με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή της οστεοκλαστογενετικής δράσης του συνδέτη (Lacey και συν. 1998, Simonet και συν. 1997, Yasuda και συν. 1998). Η καταστολή της δράσης του συνδέτη RANKL μέσω της πρωτεΐνης OPG, αποτρέπει την απώλεια οστού σε πειραματικά μοντέλα με καρκινικές μεταστάσεις και αρθρίτιδα. Έχει καταδειχθεί ότι τα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης σε ποντικούς προκαλούν οστεοπέτρωση (osteopetrosis), επιμύκνιση των οστών και καταστολή της ανάπτυξης και της δράσης των ενδοοστικών οστεοκλαστών (Simonet και συν. 1997). Αντίθετα, η έλλειψη της πρωτεΐνης στους ποντικούς οδηγεί σε σοβαρή οστεοπόρωση, η οποία σχετίζεται με υψηλό ποσοστό καταγμάτων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η οστική απώλεια είναι ανάλογη με τα επίπεδα της OPG, στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο (Bucay και συν. 1998, Mizuno και συν. 1998).

Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται κι από την επίδραση οιστρογόνων, όπως έχει καταδειχθεί σε κυτταρικές σειρές *in vivo* (Hofbauer και συν. 1999, Saika και συν. 2001), γεγονός που εξηγεί την εμφάνιση οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι ανωτέρω αναφορές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι παράγοντες που αυξάνουν ή καταστέλνουν την οστική απορρόφηση μέσω των οστεοκλαστών ρυθμίζονται από τα μόρια RANKL-RANK και /ή OPG και τις μεταξύ τους αναλογίες.

5.2.1. Ενεργοποιημένα σηματοδοτικά «μονοπάτια», μέσω RANK-RANKL

Η πρόσδεση RANK-RANKL και τα σήματα που επάγει, έχουν αποτελέσει εκτεταμένο αντικείμενο έρευνας με σκοπό τον προσδιορισμό της οστεοκλαστογένεσης / οστεόλυσης που μεσολαβείται από τα ρινίσματα φθοράς των υλικών (Childs και συν. 2002, Clohishy και συν. 2002, 2003, 2004, Goater και συν. 2002, Hsu και συν. 1999, Iotsova και συν. 1997). Ο Clohishy (2003) κατέδειξε ότι μετά από έκθεση καλλιέργειων του μυελού των οστών ποντικών, σε σωματίδια τσιμέντου παρατηρήθηκε αύξηση της έκκρισης RANKL. Σε ακόλουθα πειράματα με πρόδρομα οστεοκλαστικά κύτταρα, απουσία εξωγενούς RANKL, οι καλλιέργειες δεν παρουσίασαν οστεοκλαστογενετικό δυναμικό μετά διέγερση με PMMA, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσία του συνδέτη είναι βασικής σημασίας για την οστεοκλαστογένεση που προκαλείται μέσω των σωματιδίων PMMA. Ο βασικός ρόλος της δέσμευσης RANK-RANKL διαπιστώθηκε σε μια *in vivo* και *in vitro* μελέτη με την χρήση RANK:Fc αντισωμάτων, τα οποία εμποδίζουν την προσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα RANK. Παρεμπόδιση της σηματοδότησης του RANK μέσω αυτών των αντισωμάτων αποτρέπει την οστεόλυση, μέσω σωματιδίων, σε ένα πειραματικό μοντέλο *in vivo* (Childs και συν. 2002, Clohishy και συν. 2003). Με ανοσοϊστοχημική μελέτη περιπροθετικών ιστών, σε ασθενείς με οστεόλυση διαπιστώθηκαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης RANKL και η έκφραση του RANKL mRNA και της πρωτεΐνης σχετιζόταν κυρίως με τα κύτταρα που περιείχαν σωματίδια

φθοράς (Crotti και συν. 2002). Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και σε μελέτες περιπροθευικών ιστών με *in situ* υβριδισμό (Baumann και συν. 2004, Mandelin και συν. 2003).

Η πρόσδεση του συνδέτη RANKL στον υποδοχέα RANK, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς σημάτων που ελέγχουν την παραγωγή και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Επειδή ο υποδοχέας RANK είναι μέλος της «οικογενείας» του υποδοχέα TNF (TNFR) δεν διαθέτει δραστηριότητες κινάσης. Επομένως, είναι απαραίτητη η συνεργασία του με άλλους παράγοντες οι οποίοι θα μεταγάγουν τα σήματα μετά την πρόσθεση του συνδέτη. Ο υποδοχέας RANK συνδέεται με τις προσαρμοστικές πρωτεΐνες TRAFs (TNFR-associated factors) και συγκεκριμένα TRAF2,5, και 6 (Darnay και συν. 1998, Wong και συν. 1998,1999). Μέσω αυτών επάγεται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και της κινάσης JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase). Βάσει διαφόρων μελετών (Lomaga και συν. 1999, Naito και συν. 1999, Kobayashi και συν. 2001,2003, Franzoso και συν. 1997, Iotsova και συν. 1997, Kanazawa και συν. 2003), έχει καταδειχθεί ότι το μόριο TRAF6 είναι ο βασικός προσαρμοστικός παράγοντας στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB που απαιτείται για την οστεοκλαστογένεση και την ενεργοποίηση των ώριμων οστεοκλαστών. Τελευταία, έχει αποδειχθεί και η σημασία του προσαρμοστικού μορίου Gab2 (Grb2 associated binder 2), στην σηματοδότηση του RANK(L). Το μόριο Gab2 συνεργάζεται με τον υποδοχέα RANK και διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση των «οδών» NFκB, Act και JNK.

5.2.1.1. NFκB «σηματοδότηση»

Η αλληλεπίδραση RANK-RANKL οδηγεί σε ενεργοποίηση της «οδού» του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Τα θηλαστικά εκφράζουν πέντε Rel (NFκB) πρωτεΐνες, οι οποίες ταξινομούνται σε δύο ομάδες. Στις πρωτεΐνες της πρώτης ομάδας περιλαμβάνονται οι RelA (p65), c-Rel, και Relb οι οποίες συντίθενται ως ώριμα προϊόντα και δεν απαιτούν περαιτέρω πρωτεολυτική διαδικασία. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες της δεύτερης ομάδας, NF-κB1 και NF-κB2, αρχικά συντίθενται πρόδρομα μόρια, p105 και p100, τα οποία στην συνέχεια μέσω πρωτεολυτικής διαδικασίας μετατρέπονται σε ώριμες p50 και p52 NFκB πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες RelA (p65) και c-Rel παραμένουν στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένες με IκB ανασταλτικές πρωτεΐνες. Με την ενεργοποίηση της «οδού» η αποδόμηση της πρωτεΐνης IκB λαμβάνει χώρα τάχιστα μέσω φωσφορυλίωσης της από την ενεργοποιημένη κινάση IκK (IKK). Το σύμπλεγμα IKK αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες, IKKα και IKKβ και μια ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ (NEMO, NF-κB essential modulator). Η ενεργοποίηση των διμερών p50:RelA και p50:c-Rel, θεωρείται ότι είναι το κλασικό «μονοπάτι» το οποίο εξαρτάται κυρίως από την δραστηριότητα της κινάσης IKKβ. Η κινάση IKKα είναι απαραίτητη σε ένα εναλλακτικό «μονοπάτι», για την ενεργοποίηση του συμπλέγματος NF-κB2/p100-RelB, για την απελευθέρωση p52:RelB διμερών και την μετατόπιση τους στον ουρήνα (Karin και συν. 2002, Hayden και συν. 2008).

Για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών, απαιτούνται και οι δύο πρωτεΐνες, NF-κB p50 και p52 (Franzoso και συν.1997, Iotsova και συν.1997). έχει επίσης καταδειχθεί ότι οι ενεργοποιημένες κινάσες, IKKα και IKKβ, είναι σημαντικές για την σηματοδότηση μετά την δέσμευση RANK-RANKL και την οστεοκλαστογένεση. Μια πειραματική μελέτη, με μοντέλα ποντικών με ανεπάρκεια κινασών IKKα και IKKβ, κατέδειξε ότι

η κινάση IKKβ και όχι η IKKα είναι απαραίτητη για την οστεοκλαστογένεση *in vivo* (Ruocco και συν. 2005). Επομένως, φαίνεται ότι η σηματοδότηση του συμπλέγματος RANK-RANKL ασκεί τις επιδράσεις της στην οστεοκλαστογένεση μέσω του κλασσικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NFκB. Αν και οι δύο οδοί είναι σημαντικοί για την οστεοκλαστογένεση *in vitro*, έχει διαπιστωθεί ότι αποσία της κινάσης IKKα, άλλα σήματα, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF) ή η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), σε συνεργασία με το RANKL ενεργοποιούν το κλασσικό «μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, μέσω της κινάσης IKKβ (Ruocco και συν. 2005).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NFκB έχει ταυτοποιηθεί ως ο κύριος μεσολαβητής της οστεοκλαστογένεσης, η οποία επάγεται μετά από έκθεση των τινισμάτων φθοράς των βιοϋλικών των προθεμάτων στα μακροφάγα (Clohishy και συν. 2003, 2004, 2002, Nakashima και συν. 1999, Schwarz και συν. 2003). Τα σωματίδια του οστικού τσιμέντου επάγουν ταχεία δέσμευση του NFκB DNA σε οστεοκλαστικά πρόδρομα κύτταρα ποντικών (CSF-1-dependent bone marrow macrophages) (Clohishy και συν 2004, 2002). Επιπρόσθετα, τα ανθρώπινα μακροφάγα όταν εκτίθενται σε σωματίδια τιτανίου, οδηγούν σε ταχεία (λιγότερο από 30 min) ενεργοποίηση του NFκB (Nakashima και συν. 1999).

5.2.1.2. MAPK «σηματοδότηση»

Οι πρωτεϊνικές κινάσες MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), ανήκουν στην οικογένεια των Ser/Thr πρωτεϊνικών κινασών και αποτελούνται από τις εξής κινάσες: Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinases), p38-MAPKs (α/β/γ/δ), c-Jun N-terminal kinases (JNK 1,2,3) και Erk 5,7,8. Διάφορες MAP κινάσες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα RANK. Για παράδειγμα, υπάρχει μαρτυρία βάσει της οποίας η φαρμακευτική αναστολή του p38α και p38β μέσω SB203580, καταστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, που επάγεται μέσω του συνδέτη RANKL. Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της κινάσης p38 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μέσω RANKL από τα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών (Matsumoto και συν. 2000). Οι κινάσες JNKs και η κινάση 7 (MAP kinase kinase 7, MKK7) εμπλέκονται επίσης στην οστεοκλαστογένεση *in vitro*. Η κινάση JNK1 και όχι η κινάση JNK2, ενεργοποιείται μέσω του συνδέτη RANKL και είναι απαραίτητη για την οστεοκλαστογένεση *in vitro*. Επιπλέον, η κινάση c-Jun, ένα συστατικό του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, ενεργοποιείται μέσω της κινάσης JNK και είναι βασική για την οστεοκλαστογένεση. Άλλα μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, όπως JunB, c-Fos και Fra έχει καταδειχθεί γενετικά ότι είναι σημαντικά για την οστεοκλαστογένεση (David και συν. 2002). Η φωσφορρυλίωση των κινασών Erk p42/p44 αυξάνεται μετά από διέγερση του συνδέτη RANKL, αλλά έχει διαπιστωθεί ότι είναι πρεριττή στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, *in vitro*, που μεσολαβείται μέσω του συνδέτη RANKL (Matsumoto και συν. 2000). Ο ρόλος των κινασών Erk5, Erk 7, Erk8 στην σηματοδότηση του RANK(L) και την οστεοκλαστογένεση δεν έχει ελεγχθεί. Σε διάφορες μελέτες έχει καταδειχθεί η εμπλοκή των κινασών (p38, Erk και JNK), στην ανταπόκριση των μακροφάγων στα ρινίσματα φθοράς των βιοϋλικών (Abbas και συν. 2003, Nakashima και συν. 1999, Rakshit και συν. 2006). Τα σωματίδια τιτανίου και τσιμέντου μπορούν να προκαλέσουν άμεση ενεργοποίηση των MAP κινασών, ενώ η αναστολή της ενεργοποίησής τους μειώνει την ικανότητα των

σωματιδίων αυτών να επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε καλλιέργειες οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων (Rakshit και συν. 2006). Η δράση της κινάσης p38 είναι σημαντική για την αναστολή της δράσης της IL-6, που μεσολαβείται μέσω σωματιδίων τσιμέντου (Rakshit και συν. 2006). Επιπρόσθετα, οι MAP κινάσες ενισχύουν την ικανότητα των ρινισμάτων φθοράς τσιμέντου και τιτανίου, να προκαλούν έκφραση των πρωτεϊνών SOCS (Suppressors of Cytokine Signaling), οι οποίες επάγουν αντιοστεοκλαστογενετικά σήματα (Rakshit και συν. 2006).

5.2.1.3. Υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ελάχιστα γνωρίζουμε γύρω από την μοριακή βάση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ρινισμάτων φθοράς και τις επιφάνειες των κυττάρων. Ακόμη και για τα μακροφάγα, τον βασικό κυτταρικό στόχο των ρινισμάτων φθοράς, η ταυτοποίηση κυτταρικών επιφανειακών υποδοχέων υπεύθυνων για την αναγνώριση των σωματιδίων και η κατανόηση των «οδών» που εισάγονται ή διαμορφώνονται μέσω της πρόσδεσης των σωματιδίων φθοράς, παραμένει ασαφής.

Υπάρχει απόδειξη ότι τα ρινίσματα πολυαιθυλενίου ενεργοποιούν το συμπλήρωμα (DeHeer και συν. 2001), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υποδοχείς του συμπληρώματος που βρίσκονται στα μακροφάγα (π.χ. CR3) έχουν κάποιο ρόλο στη πρόσληψη σωματιδίων.

Οι υποδοχείς SR (scavenger receptors) εμπλέκονται στην λήψη, ανεξάρτητα οψωνίνης, σωματιδίων τιτανίου από κυψελιδικά μακροφάγα (Palecanda και συν. 1999), γεγονός που υποδηλώνει ότι διαφορετικά σωματίδια χρησιμοποιούν διαφορετικούς επιφανειακούς υποδοχείς. Η οψωνινοποίηση δεν είναι απαραίτητη (αν και μπορεί να εμπλέκεται) στην ανταπόκριση των ανθρωπίνων μονοκυττάρων και μακροφάγων στα σωματίδια τιτανίου (Maloney και συν. 1998, Palmos και συν. 2002).

Η εμπλοκή του υποδοχέα του συμπληρώματος CR3 στην δράση των σωματιδίων φθοράς υποστηρίζεται επίσης από την παρατήρηση ότι αντισώματα έναντι του υποδοχέα CR3 μειώνουν την ικανότητα των μακροφάγων να προσλαμβάνουν σωματίδια τιτανίου (Nakashima και συν. 1999), και οστικού τσιμέντου και ότι η έκφραση του CR3 σε μη-φαγεσωρικά κύτταρα αυξάνει τις αλληλεπιδράσεις με τα σωματίδια τσιμέντου (Rakshit και ΣΥΝ. 2006). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα CR3 μιμείται εν μέρει την σηματοδότηση των MAP κινάσων (Rezzonico και συν. 2000), ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NFκB και AP-1 (Nakashima και συν. 1999, Rezzonico και συν. 2001), και αυξάνει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Nakashima και συν. 1999) και χημειοκινών (Rezzonico και συν. 2001).

5.2.1.4. Αλληλεπίδραση του RANKL-RANK με άλλα σηματοδοτικά «μονοπάτια»

Αν και η σηματοδότηση του συμπλέγματος RANK-RANKL είναι βασική για την οστεοκλαστογένεση, διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις με άλλα σηματοδοτικά μόρια είναι εξίσου σημαντικές.

Για παράδειγμα, το μόριο RANKL εκφράζεται στα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα, αλλά τα ίδια κύτταρα εκφράζουν και έναν παράγοντα, την IFN- γ , ο οποίος επηρεάζει αρνητικά την σηματοδότηση του μορίου. Η ιντερφερόνη- γ προκαλεί ταχεία αποδόμηση του TRAF6, μέσω της οδού ubiquitine-proteasome pathway, με αποτέλεσμα την καταστολή της ενεργοποίησης NF κ B και JNK, που προκαλείται μέσω RANKL (Duran και συν. 2004). Επιπλέον το RANKL προκαλεί την παραγωγή ιντερφερόνης β από τα πρόδρομα οστεοκλαστικά κύτταρα και έχει καταδειχθεί ότι η IFN- β αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μέσω παρέμβασης στην έκφραση του c-Fos, η οποία επάγεται μέσω RANKL (Takayanagi και συν. 2002). Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα όχι μόνο καταστέλλουν την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μέσω RANKL, μέσω απορρύθμισης του μονοπατιού JNK-c-Jun, αλλά επίσης ελέγχουν και την έκφραση του υποδοχέα OPG και ως εκ τούτου ρυθμίζουν την σηματοδότηση του RANK-RANKL. (Syed και συν. 2005).

Διάφορες κυτταροκίνες, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την οστεοκλαστογένεση. Παράδειγμα, η IL-4 ακυρώνει την οστεοκλαστογένεση με αναστολή του NF κ B μέσω STAT6 (Abu-Amer και συν. 2001), ενώ οι παράγοντες ανάπτυξης των όγκων (TGF), TGF β 1 και activin και όχι οι BMP-2 (bone morphogenetic proteins), προκαλούν αύξηση της οστεοκλαστογένεσης μέσω RANKL, in vitro (Koseki και συν. 2002). Η κυτταροκίνη M-CSF, η οποία είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των οστεοκλαστών ασκεί τις επιδράσεις της με την ενεργοποίηση της οδού ERK δια μέσου του μορίου GRB2 και της ενεργοποίησης της οδού Akt/PKB μέσω της κινάσης PI3K, αλλά διεγείρει επίσης την έκφραση του υποδοχέα RANK στα c-FMS⁺RANK⁻ μονοκυτταρικά/μακροφαγικά πρόδρομα κύτταρα, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ικανά για ανταπόκριση στον συνδέτη RANKL.

Ο παράγων νέκρωσης των όγκων (TNF), είναι ένας δυναμικός διεγέρτης της οστεοκλαστογένεσης. Υπό προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις ο συνδέτης RANKL και ο TNF συνεργάζονται, και αυξάνουν της οστεοκλαστογένεση. Ο TNF μπορεί επίσης να υπερρυθμίσει την έκφραση του RANKL, στα πρόδρομα οστεοκλαστικά κύτταρα (Zhang και συν. 2001).

Η πρωτεΐνη Gab2, ίσως να αποτελεί έναν επιπρόσθετο παράγοντα στις διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα, που ισορροπούν την οστεοκλαστογένεση και τον οστικό μεταβολισμό. Διάφοροι υποδοχείς για την οστεοκλαστογένεση (integrins, c-Fms, FcR γ , RANK), ασκούν τις δράσεις τους μέσω αυτής της πρωτεΐνης η οποία μπορεί να προσδεθεί σε ποικίλα σηματοδοτικά μόρια (PLC γ , p85PI3K, Grb2, SHP). Επομένως, η πρωτεΐνη Gab2 (και ίσως και άλλα μέλη, π.χ. Gab1 και Gab3) μπορεί να συμβάλλουν στην διέγερση διαφόρων υποδοχέων για τους οστεοκλάστες. Περιληπτικά, ενώ η διέγερση του συμπλέγματος RANKL-RANK είναι βασικής σημασίας για την επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης, πολλαπλοί επιπρόσθετοι υποδοχείς και σηματοδοτικές οδοί μπορούν θετικά ή αρνητικά να διαμορφώσουν τον μεταβολισμό των οστών που διαμεσολαβείται μέσω του υποδοχέα RANK.

5.3. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΗΠΤΗΣ ΧΑΛΑΡΩΣΗΣ/ΟΣΤΕΟΛΥΣΗΣ

Λόγω της ταυτοποίησης της οστεόλυσης, ως μιας φλεγμονώδους νόσου, με συνοδό οστική διάβρωση, για την φαρμακευτική της ρύθμιση έχουν επιστρατευτεί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και καταστολείς της οστικής απορρόφησης.

Οι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (π.χ. COX-2 αναστολείς και TNF ανταγωνιστές) έχουν αποφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα οστεόλυσης. Για παράδειγμα, οι ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF), Etanercept (Childs και συν. 2001) και pentoxifylline (Schwarz και συν. 2000), καθώς και ο αναστολέας της κυκλοοξυγενάσης COX2, Celecoxib (Zhang και συν. 2001) ελαττώνουν την οστεόλυση που επάγεται από τα ρινίσματα φθοράς, σε πειραματικά μοντέλα. Επιπλέον, η προσθήκη των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-4 και η IL-10, σε πειραματικό μοντέλο *in vitro*, όπου καλλιέργειες μονοκυττάρων ή / και μακροφάγων εκτίθενται σε σωματίδια τιτανίου, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του TNF-α και της IL-6. Όμως παρά τις ενθαρρυντικές πειραματικές μελέτες, δεν είναι ακόμη σαφές κατά πόσο οι συγκεκριμένοι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν θετικά στην πρόληψη ή θεραπεία της ανθρώπινης οστεόλυσης.

Δεδομένου ότι η αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα αντιπροσωπεύει το τελικό κυτταρικό στάδιο της οστεόλυσης το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής έρευνας έχει στραφεί προς την κατεύθυνση των αναστολέων της δράσης των οστεοκλάστων (διφοσφονικά), ως πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες για την συγκεκριμένη νόσο.

Τα διφοσφονικά (alendronate, zoledronic acid) είναι μια ομάδα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της οστεοπόρωσης, της νόσου Paget και την υπερασβεστιαμία. Ο ρόλος τους αφορά στην αναστολή της δημιουργίας των οστεοκλαστών, χωρίς να επηρεάζουν την φλεγμονώδη απάντηση.

Και στην περίπτωση όμως αυτή, ενώ υπάρχουν ευνοϊκά αποτελέσματα για τον ρόλο τους στην οστεόλυση μέσω μέσω των σωματιδίων φθοράς, σε πειραματικές μελέτες *in vivo* και *in vitro* (Horowitz και συν. 1996, Millet και συν. 2002, Shanbhag και συν. 1994, Thadani και συν. 2002), δεν υπάρχουν κλινικές μαρτυρίες, που να υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αυτών στην θεραπεία της οστεόλυσης των ασθενών.

Οι στατίνες, μια άλλη ομάδα φαρμάκων, δρουν με ανάλογο τρόπο με τα διφοσφονικά, συγκεκριμένα αναστέλλουν το ίδιο «μονοπάτι» (mevalonate pathway) μέσω αναστολής του ενζύμου HMG-CoA reductase (Mundy και συν. 1999).

Βάσει αυτού θεωρείται ότι μπορούν να καταστείλουν την οστεόλυση, μέσω της καταστολής της δημιουργίας των οστεοκλάστων. Ο von Knoch και συν.(2005), κατέδειξαν σε πειραματικό μοντέλο, ότι η simvastatin μειώνει σημαντικά την οστεόλυση, που προκαλείται μέσω σωματιδίων πολυαιθυλενίου.

Ο κεντρικός ρόλος που κατέχει το μόριο RANKL, στην οστεοκλαστογένεση, το καθιστά ελκυστικό στόχο για πιθανές θεραπείες. Ο υποδοχέας OPG (φυσικός ανταγωνιστής της δράσης του RANKL) και το αντίσωμα RANKL:Fc, έχουν επιδείξει επιτυχή αποτελέσματα στην πρόληψη της οστεόλυσης σε πειραματικά μοντέλα (Ulrich-Vinther και συν. 2002, Goater και συν. 2002, Childs και συν. 2002).

Παραμένει ανοικτό το ερώτημα για το κατά πόσο αυτές οι προσεγγίσεις θα μπορούσαν να αποβούν αποτελεσματικές στην θεραπεία της οστεόλυσης. Η χρήση του AMG-162, ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του RANKL, έχει επιδείξει ασφάλεια και αναστολή της οστικής απορρόφησης (Bekker και συν. 2004, Takahashi και συν. 2005), χωρίς όμως να έχει αξιολογηθεί σε ασθενείς με οστεόλυση. Αυτού

του είδους οι θεραπείες είναι αναμενόμενο να μειώνουν την οστική απώλεια, δεν ελαττώνουν την φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία αποτελεί μια σημαντική ανησυχία καθώς η αυξημένες τιμές του TNF και της IL, είναι ικανές να προκαλέσουν οστεοκλαστογένεση παρουσία ακόμη και πολύ μικρών τιμών RANKL, γεγονός που υποδηλώνει ότι χωρίς την μείωση της φλεγμονής η αναστολή της δράσης του μορίου RANKL θα πρέπει να είναι πλήρης για να είναι αποτελεσματική. Μια εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η συνδυασμένη θεραπεία με ανταγωνιστές έναντι του RANKL και των προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Αυτός ο συνδυασμός έχει δώσει επιτυχή αποτελέσματα σε πειραματικό μοντέλο αρθρίτιδας (Zwerina και συν. 2004). Επειδή η σηματοδότηση του RANK μεταάγεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, οι ανταγωνιστές του εν λόγω παράγοντα ίσως να αντιπροσωπεύουν αποτελεσματικούς θεραπευτικούς παράγοντες για την οστεόλυση. Σε μια μελέτη ο Dai και συν. (2004) κατέδειξαν ότι, η άμεση καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα NFκB μέσω του πεπτιδίου NBD (NEMO-binding domain) προλαμβάνει την απώλεια οστού σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο των οστών. Όμως εφόσον η συνεχής καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα κ-B, μπορεί να προκαλέσει ανοσοανεπάρκεια και κυτταρικό θάνατο, τέτοιες θεραπείες θα πρέπει να προσεγγίζονται με προσοχή.

Οι αναστολές της δράσης των ώριμων οστεοκλαστών αντιπροσωπεύουν μια άλλη πιθανή κατηγορία θεραπευτικών παραγόντων η οποία θα πρέπει να αξιολογηθεί στους ασθενείς με οστεόλυση. Καθώς αποκτούμε όλο και περισσότερες γνώσεις γύρω από την βιολογία των οστεοκλαστών και της δράσης των σωματιδίων, είναι αναμενόμενο ότι επιπρόσθετοι στόχοι για τον σχεδιασμό φαρμάκων θα είναι διαθέσιμοι. Για παράδειγμα, παράγοντες που απαιτούνται για την οστική απορρόφηση, όπως οι αναστολές της κατεψίνης K (μια ειδική πρωτεάση των οστεοκλαστών (Bossard και συν. 1999, Lark και συν. 2002), η αντλία πρωτονίων (osteoclast ATPase proton pump) (Visentin και συν. 2000), ο vibronectin υποδοχέας (Lark και συν. 2001), η τυροσινική κινάση src (Shakespeare και συν. 2003), έχουν εμφανισθεί ως θεραπευτικοί στόχοι.

Συμπερασματικά, παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά την κατανόηση βασικών κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται στην οστεόλυση, που προκαλείται τα ρινίσματα φθοράς των βιοϋλικών των προθεμάτων και την επακόλουθη άσηπτη χαλάρωση, δεν υπάρχει αποδεδειγμένη φαρμακευτική θεραπεία για την αντιμετώπισή της. Η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών των περιπροθετικών ιστών, των ρινισμάτων φθοράς των βιοϋλικών, των κυτταροκινών, των επιφανειακών υποδοχέων και άλλων μορίων, καθιστά σαφές, ότι για την πλήρη κατανόησή τους και κατ' επέκταση την ανάπτυξη αποδεκτών θεραπευτικών προσεγγίσεων, στους ασθενείς με περιπροθετική οστεόλυση / άσηπτη χαλάρωση, υπάρχει ακόμη μεγάλη καθυστέρηση.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1. ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΣ

Το υλικό προέρχεται από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το υλικό αφορά σε περιπροθετικούς ιστούς 60 ασθενών, οι οποίοι υπέστησαν αναθεώρηση αρθροπλαστικής, λόγω άσηπτης χαλάρωσης του προθέματος, στην Πανεπιστημιακή Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μόνον ασθενείς, οι οποίοι είχαν αδιαμβισβήτητα άσηπτη χαλάρωση, περιελήφθησαν στην μελέτη.

Για την διασφάλιση της σωστής επιλογής των ασθενών, ανασκοπήθηκαν κλινικά και μικροβιολογικά δεδομένα των ασθενών και έγινε προσεκτικός επανέλεγχος των ιστολογικών δειγμάτων.

Βασικά στοιχεία επιδημιολογικής φύσεως για τους ασθενείς παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Ο μεγαλύτερος αριθμός των επεμβάσεων αφορούσε σε αναθεωρήσεις γόνατος.

Η διάρκεια και ο τύπος των προθέματων ήταν γνωστά για τους περισσότερους ασθενείς.

Επίσης τα περισσότερα προθέματα αφορούσαν σε μέταλλο και πολυαιθυλένιο.

Το καθ'εαυτό ιστοπαθολογικό υλικό αντιπροσωπεύει υλικό ρουτίνας, το οποίο εστάλη στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο στα πλαίσια ενδοεγχειρητικής διερεύνησης για παρουσία ή μη πολυμορφοπυρηνικού εξιδρώματος οξείας φλεγμονής.

Στα πλαίσια καθιερωμένης πρακτικής, το μεγαλύτερο τμήμα του υλικού σε κάθε περίπτωση εξετάστηκε ιστοπαθολογικά.

Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης, όλα τα διαθέσιμα πλακίδια H/E ανασκοπήθηκαν από δύο Παθολογοανατόμους και επελέγησαν κύβοι παραφίνης, για περαιτέρω μελέτη με βάση τα κάτωθι κριτήρια:

- 1^ο) Παρουσία μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων μακροφάγων κυττάρων.
- 2^ο) Παρουσία δομικών στοιχείων ψευδομεμβράνης (synovial-like membrane).
- 3^ο) Παρουσία περιαγγειακής φλεγμονής.
- 4^ο) Παρουσία φαγοκυτταρωμένων σωματιδίων ή υλικού μεγαλύτερας διαστάσεως, εντός πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων.

Από τους κύβους παραφίνης, κόπηκαν συνεχόμενες, παράλληλες τομές, πάχους 3μm και τοποθετήθηκαν σε πλακίδια DAKO (Dako REAL™, Capillary Gap Microscope Slides, 75μm), ειδικά για την διενέργεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.

2. ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΤΩΝ ΤΟΜΩΝ

1. Μερική αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο 60° over night.
2. Ολική αποπαραφίνωση των τομών με ξυλόλη, για 15min.
3. Ενυδάτωση των τομών, με κατιούσα σειρά αλκοολών (100°, 100°, 96°, 80°, 70°). 5min σε κάθε αλκοόλη.
4. Ξέπλυμα των τομών με νερό βρύσης και εν συνεχεία με απεσταγμένο νερό.

Ακολούθως παρατίθενται αναλυτικά τα ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα, που εφαρμόστηκαν για κάθε αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

3.1. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για CD68 (Cluster Differentiation 68)

Για την επισήμανση των μακροφάγων στους περιπροθετικούς ιστούς, χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρωπίνου CD68 (DakoCytomation, Denmark). Για την ταυτοποίηση των μακροφάγων χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος PG-M1. Το ανοσογόνο αφορά σε παρασκεύασμα ανθρωπίνων μονοκύτταρων σπληνοκυττάρων, που περιέχει πάνω από 80% κύτταρα του Gaucher. Ο ισότυπος είναι της τάξεως IgG3.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε υδατόλουτρο PT (στους 90°C), για 11/2h.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H²O²) 3%, για 10min.
- 5) Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση 1:50), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min.
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες

3.2 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για γκαλεκτίνη-3 (galectin-3)

Για την μελέτη της έκφρασης της στους περιπροθετικούς ιστούς με οστεόλυση, χρησιμοποιήσαμε λυοφιλοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Novocastra) και συγκεκριμένα τον κλώνο 9C4. Το ανοσογόνο αφορά σε μια προκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης, που αντιστοιχεί στο μόριο της ανθρώπινης γκαλεκτίνης-3 πλήρους μήκους, της τάξης IgG1.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός από θυρεοειδικό καρκίνωμα.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε υδατόλουτρο PT (στους 90°C), για 11/2h.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂) 3%, για 10min.
- 5) Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση1:75), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min.
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες

3.3 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Ινδολεαμίνη

Για την μελέτη των περιπροθετικών ιστών, χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου, έναντι της ινδολεαμίνης 2, 3-διοξυγενάσης (Abcam Inc. Cambridge), τύπου ανοσοσφαιρίνης IgG, μοριακού βάρους 45 kDa.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα με pH6 σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850Watt, για 20min.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂) 3%, για 10min
- 5) Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση1:100), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση Kit LSAB.
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.

- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

3.4 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για MyD88

Οι περιπροθετικοί ιστοί επωάσθηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού, έναντι του MyD88 (IMGENEX, San Diego). Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος N/A. Το ανοσογόνο αφορά σε ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή 233-248 των αμινοξέων της ανθρώπινης πρωτεΐνης MyD88. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός παρίσθμιας αμυγδαλής.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα με pH6 σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850Watt, για 10min.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H^2O^2) 3%, για 10min
- 5) Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση 1:300), overnight, στους 4°C.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση Kit LSAB.
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

3.5 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για MUM-1

Για την μελέτη της έκφρασης της MUM1 στους περιπροθετικούς ιστούς, χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ανθρώπινης-MUM1-πρωτεΐνης (DakoCytomation, Denmark). Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος MUM1p. Το ανοσογόνο αφορά σε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης S-τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST)/MUM1, της τάξεως IgG1.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα με Ph10 σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850Watt, για 20min.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H^2O^2) 3%, για 10min
- 5) Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.

- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση 1:25), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

3.6 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για Factor XIIIa

Για την ανίχνευσή του στους περιπροθετικούς ιστούς, χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Novocastra) και συγκεκριμένα τον κλώνο E980.1. Το ανοσογόνο αφορά σε μια προκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, που αντιστοιχεί στην C-τελική περιοχή του μορίου του παράγοντος πήξης του αίματος XIIIa.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε υδατόλουτρο PT (στους 90°C), για 11/2h.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂) 3%, για 10min.
- 5) Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση σε κάθε τομή παραφίνης το αντίσωμα (αραίωση 1:80), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min.
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες

3.7 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για CD1a

Για την ανίχνευσή του, στους περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με χαλάρωση του προθέματος, χρησιμοποιήσαμε τον κλώνο MTB1, λυοφιλοποιημένου αντισώματος ποντικού (Novocastra). Το ανοσογόνο είναι μια ανασυνδυασμένη προκαρυωτική πρωτεΐνη σύντηξης, που αντιστοιχεί στην πλήρη εξωτερική περιοχή του ανθρωπίνου μορίου CD1a της τάξεως IgG1.

Ο συνιστώμενος ιστός που προτείνεται από τους κατασκευαστές ως θετικός μάρτυρας είναι οι παρίσθιμες αμυγδαλές.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε αυτοματοποιημένο μηχάνημα (BOND), στο οποίο οι τομές υφίστανται την ακόλουθη επεξεργασία:
 - Peroxide 5min
 - Marker (At 1:25) 20min
 - Post primary 10min
 - Polymer 10min
 - DAB 10min
 - Hematoxylin 10min
- 2) Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- 3) Αφυδάτωση των τομών με κατιούσα σειρά αλκοολών (100°, 100°, 96°, 80°, 70°) και τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλόξης (10 εμβαπτίσεις της κάθε τομής, στο κάθε διάλυμα)
- 4) Επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

3.8 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για EGFR

Μελετήσαμε την έκφρασή του στους περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με οστεόλυση, με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Zymed Laboratories INC, San Francisco). Για την ανίχνευσή του, στον πυρήνα και την κυτταρική μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος 31g7. Το ανοσογόνο ήταν ανθρώπινος EGFR προερχόμενος από A-431 κύτταρα, της τάξεως IgG1. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ιστός από το δέρμα,

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε Buffer TBST, για 5min.
- 2) Τοποθέτηση Proteinase K, πάνω στις τομές, για 10min.
- 3) Έκπλυση με Buffer.
- 4) Τοποθέτηση του αντισώματος (primary antibody), για 30 min, με αραιώση 1/50.
- 5) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 6) Βάζουμε στις τομές υπεροξειδίο του υδρογόνου 10%, για 10min.
- 7) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 8) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 25min.
- 9) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 10) Τοποθέτηση DAB για 5-10min.
- 11) Έκπλυση με Buffer TBST ή με απεσταγμένο νερό.
- 12) Τοποθέτηση Αιματοξυλίνης, στις τομές, για 1min.
- 13) Έκπλυση με νερό βρύσης.
- 14) Αφυδάτωση των τομών με κατιούσα σειρά αλκοολών (100°, 100°, 96°, 80°, 70°) και τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλόξης (10 εμβαπτίσεις της κάθε τομής, στο κάθε διάλυμα)
- 15) Επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

3.9 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για HIF-1alpha

Για την ανίχνευση του HIF-1alpha, στους περιπροθετικούς ιστούς, των ασθενών με οστεόλυση, χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, μοριακού βάρους 97kDa και συγκεκριμένα τον κλώνο H1alpha67 (Novus Biologicals, Littleton).

Το ανοσογόνο είναι μια πρωτεΐνη σύντηξης που αντιστοιχεί στην περιοχή των αμινοξέων 432-528 της ανθρώπινης πρωτεΐνης HIF-1alpha., της τάξης IgG2B.

Ο συνιστώμενος ιστός, από τους κατασκευαστές, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός «μάρτυρας» είναι το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα με Ph6 σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850Watt, για 10min.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂) 3%, για 10min
- 5) Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδάτωση των τομών παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση, σε κάθε τομή παραφίνης, του αντισώματος (αραίωση1:200), overnight, στους 4°C.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.
- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες

3.10 Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για NF-kappaB

Για την ανίχνευση του NFκB στους περιπροθετικούς ιστούς, των ασθενών με οστεόλυση, χρησιμοποιήσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, μοριακού βάρους 65kDa και συγκεκριμένα τον κλώνο F-6 έναντι της περιοχής των αμινοξέων 1-286 του NFκBp65 ανθρώπινης προέλευσης (Santa Cruz Biotechnology, INC).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός από παρίσθια αμυγδαλή.

- 1) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα με Ph10 σε φούρνο μικροκυμάτων στα 510Watt, για 15min.
- 2) Διατήρηση των τομών για 20min.
- 3) Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 4) Τοποθέτηση των τομών παραφίνης σε διάλυμα υπεροξειδίου (H₂O₂) 3%, για 10min
- 5) Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ενυδατώνουμε τις τομές παραφίνης σε διάλυμα TBST.
- 7) Τοποθέτηση, σε κάθε τομή παραφίνης, του αντισώματος (αραίωση1:500), για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Έκπλυση με Buffer TBST.

- 9) Τοποθέτηση EnVision Detection System για 30min
- 10) Έκπλυση με Buffer TBST
- 11) Τοποθέτηση DAB για 5min.
- 12) Έκπλυση με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.
- 13) Τοποθέτηση στις τομές χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης 10%, για 3min.
- 14) Έκπλυση με νερό βρύσης
- 15) Αφυδάτωση των τομών.
- 16) Κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες.

4. ΕΥΡΗΜΑΤΑ

(Πίνακας 2)

4.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με CD68

Εφαρμογή χρώσεως με CD68 στους περιπροθετικούς ιστούς των ασθενών με χαλάρωση του προθέματος, ανέδειξε, όπως αναμενόταν, μαζική άθροιση ιστοκυττάρων-μακροφάγων.

(Εικόνα 1)

4.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με γκαλεκτίνη-3 (galectin-3)

Όλα τα ιστοκύτταρα παρουσίασαν έντονη ανοσοχρώση για γκαλεκτίνη-3.

(Εικόνα 2)

Η ανοσοχρώση ήταν έντονη, κυρίως κυτταροπλασματική και ίδιας εντάσεως στα μονοπύρρηνα και πολυπύρρηνα ιστοκύτταρα.

(Εικόνες 3 & 4)

Σε ορισμένες θέσεις, συνοβιακά στοιχεία, αντιστοιχούντα με κύτταρα τύπου A, παρουσίασαν ανοσοϊστοχημική χρώση αντίστοιχη με αυτή των μακροφάγων.

(Εικόνα 5)

Η ανοσοαντίδραση με γκαλεκτίνη-3 ήταν παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις ανεξαρτήτως του τύπου του προθέματος ή της εγχειρήσεως.

Σε ορισμένες εστίες, παρατηρήθηκε ασθενής ανοσοχρώση πυρήνων.

4.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με Ινδολεαμίνη

Στους περιπροθετικούς ιστούς μελετήθηκε επίσης η πιθανότητα ανοσοχρώσεως των μακροφάγων για ινδολεαμίνη

Δεν παρατηρήθηκε πειστική ανοσοχρώση των μακροφάγων στο παρόν υλικό.

(Εικόνες 6 & 7)

4.4 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με MYD88

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η πιθανότητα ανοσοχρώσεως των μονοκύτταρων μακροφάγων για MyD88. Δεν παρατηρήθηκε πειστική ανοσοχρώση των μακροφάγων στο παρόν υλικό.

(Εικόνες 8 & 9)

4.5 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με MUM-1

Στο παρόν υλικό δεν παρατηρήθηκε ανοσοθετικότητα του MUM-1 στα μονοπύρρηνα μακροφάγα. (Εικόνα 10)

Ανοσοθετικότης των πλασματοκυττάρων σε παρακείμενη συνοβιακή μεμβράνη ήταν εμφανέστατη. (Εικόνα 11)

4.6 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με Factor XIIIa

Η ανοσο/ιστοχημική μελέτη των περιπροθετικών ιστών, ανέδειξε έναν σημαντικό αριθμό μακροφάγων, που παρουσίασαν ανοσοχρώση για τον παράγοντα XIIIa.

Τα συγκεκριμένα μακροφάγα είχαν πολυεστιακή κατανομή, δεν σχημάτιζαν εστιακά αθροίσεις και ήταν σχετικά διασκορπισμένα. (Εικόνα 12)

Ορισμένα από τα εν λόγω μακροφάγα ήταν πολυγωνικά και άλλα είχαν αστεροειδή-δενδριτική μορφή. (Εικόνα 13)

4.7 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με CD1a

Η ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με CD1a έδειξε σε ποσοστό 5% των περιστατικών (3/60) εστιακή, έντονη μεμβρανική ανοσοχρώση για CD1a.

(Εικόνα 14)

Τα ανοσοθετικά κύτταρα, παρουσίαζαν μορφολογικούς χαρακτήρες ιστιοκυττάρων.

Ορισμένα είχαν δενδριτικές-κυτταροπλασματικές προσεκβολές.

Η παρουσία των εν λόγω εστιών δεν είχε σχέση με την παρουσία έντονης ή μη, χρόνιας λεμφοπλασματοκυτταρικής φλεγμονώδους αντιδράσεως.

Επίσης, δεν είχε σχέση με την έκταση της ιστιοκυτταρικής αντιδράσεως ή των βαθμό ενεργοποίησης των μακροφάγων, όπως αντικατοπτρίζεται από τους προαναφερθέντες δείκτες (galectin-3, MyD88, MUM-1, Indoleamine).

4.8 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με EGFR

Η ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, με αντι-EGFR αντίσωμα, ανέδειξε ανοσοθετικότητα μόνον σε ένα μικρό υποσύνολο των εξετασθέντων μακροφάγων.

Η ανοσοχρώση ήταν μεμβρανική.

(Εικόνα 15)

Τα περισσότερα μονοπύρρηνα μακροφάγα και το σύνολο των πολυπύρηνων μακροφάγων, δεν παρουσίασαν ανοσοχρώση.

Η παρουσία της ανωτέρω ασθενούς ανοσοχρώσεως δεν σχετιζόταν με κλινικά χαρακτηριστικά ή με τον τύπο του προθέματος.

4.9 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με HIF-1alpha

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έδειξε πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση στα μονοπύρρηνα μακροφάγα.

(Εικόνες 16 & 17)

Η πυρηνική χρώση ήταν εστιακή, σε ολίγα περιστατικά και περισσότερο εμφανής σε μακροφάγα, τα οποία ευρίσκοντο σε υπερπλαστικές συνοβιακές λάχνες.

Συνυπήρχε με εναπόθεση ινδοειδούς ουσίας στην περιοχή των λαχνών και κατά τόπους αυξημένη αγγειοβρίθεια. Σημειώνεται εντούτοις, ότι σε ορισμένες περιοχές, υπήρχε πυρηνική ανοσοχρώση μακροφάγων, χωρίς διαταραχές των αγγείων ή εξιδρωματικές αλλοιώσεις.

Η κυτταροπλασματική χρώση ήταν εκτεταμένη στην πλειοψηφία των περιστατικών και χωρίς ειδικούς χαρακτήρες.

Σημειώνεται, ότι κυτταροπλασματική χρώση αντίστοιχης έκφρασης δεν παρατηρήθηκε σε αρνητικά controls.

Επίσης, σημειώνεται ότι πολυπύρρηνα μακροφάγα, τα οποία εμπειρεύσαν ξένα σώματα, παρουσίαζαν αρνητική χρώση για HIF-1alpha με υψηλότερη συχνότητα απ'ότι άλλα κυτταρικά στοιχεία.

Από την μελέτη των περιστατικών, δεν διακρίνεται συσχέτιση με το είδος των προθεμάτων ή άλλους γνωστούς παράγοντες από τα κλινικά δεδομένα.

4.10 Ανοσοϊστοχημική μελέτη με NF-kappaB

Η ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με NF-kappaB έδειξε την παρουσία χρώσεως στο κυτταρόπλασμα, στο σύνολο σχεδόν των μακροφάγων. Σε ένα σημαντικό υποσύνολο, των εν λόγω μακροφάγων, παρατηρήθηκε έντονη χρώση κατά την πυρηνική μεμβράνη και προς την περιφέρεια του πυρήνα.

(Εικόνα 18)

Σε έναν υποπληθυσμό μακροφάγων, ποσοστιαίου μεγέθους 1-5% παρατηρήθηκε σαφής, εντόνη και καθολική πυρηνική χρώση.

(Εικόνα 19)

Πυρήνες πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων δεν εμφάνισαν γενικώς ανοσοχρώση με περιπυρηνική ή καθολική πυρηνική κατανομή.

Σε ορισμένες θέσεις η πυρηνική χρώση και των δύο προτύπων συνυπήρχε με ορατή έντονη φαγοκυττάρωση σωματιδίων, π.χ. μεταλλικής προέλευσης.

(Εικόνα 20)

Σημειωτέον, ότι δεν παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο χρώσεως, ανάλογα με τον τύπο του προθέματος.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατωτέρω παρατίθενται διάφορες παρατηρήσεις και συμπεράσματα, τα οποία αφορούν τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Η προσπέλαση, η οποία ακολουθείται περιλαμβάνει την κατ' αρχήν συζήτηση εκάστου δείκτη και ακολούθως την συζήτηση των καινούριων και ιδιαιτέρως ενδιαφερόντων ευρημάτων, τα οποία προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

5.1. CD68

Το CD68 είναι μια ιδιαίτερα γλυκοσυλιωμένη λυσοσωμιακή μεμβρανική πρωτεΐνη με Mr (σχετικό μοριακό βάρος) 110.000. Η πρωτεΐνη CD68 ανήκει σε μια οικογένεια λυσοσωμιακών γλυκοπρωτεϊνών LGP/πρωτεϊνών παλινδρόμησης κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες διαδραματίζουν ένα ρόλο στην ενδοκυττάρωση ή/και την λυσοσωμιακή επικοινωνία. Η πρωτεΐνη CD68 εκφράζεται έντονα στα κυτταροπλασματικά κοκκία και ασθενώς στην επιφάνεια κυττάρων της γενεαλογίας των μονοκυττάρων/μακροφάγων.

Αντισώματα έναντι του CD68 αναγνωρίζουν μια 110Kd-γλυκοπρωτεΐνη στα ιστικά μακροφάγα και τα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Micklethorp και συν. 1989).

Τα μακροφάγα είναι ιδιαίτερα κινητικά κύτταρα και πολλοί πληθυσμοί είναι ειδικοί για συγκεκριμένους ιστούς. Η φυσιολογική δράση της πρωτεΐνης CD68 στα μακροφάγα αφορά την δέσμευσή τους με ειδικές λεκτίνες ή σελεκτίνες των ιστών, στους οποίους μεταναστεύουν από το περιφερικό αίμα, επιτρέποντας την «μονιμοποίησή» τους στους ιστούς (Holness & Simmons, 1992)

Το CD68 χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη ως γενικός δείκτης μακροφάγων.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα PGM-1, το οποίο αναγνωρίζει μόνον μακροφάγα. Με αυτό τον τρόπο επιχειρήθηκε να καθοριστεί το γενικό σύνολο των αντιδραστικών μακροφάγων στους εξεταζόμενους ιστούς, δεδομένου ότι αρκετοί από τους λοιπούς δείκτες μακροφάγων αναμένεται να «χαρακτηρίσουν» εξειδικευμένα υποσύνολα μακροφάγων.

5.2. Γκαλεκτίνη-3 (Galectin 3)

Η γκαλεκτίνη 3, είναι μια λεκτίνη δέσμευσης της β-γαλακτοζιδάσης (β-galactoside-binding lectin), η οποία αρχικά ταυτοποιήθηκε στην κυτταρική επιφάνεια των περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικών και ονομάστηκε Mac-2 (macrophage marker 2 protein) (Ho & Springer 1982). Επιπλέον, ανιχνεύτηκε και σε άλλα κύτταρα, όπως ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, T- λεμφοκύτταρα, οστεοβλάστες. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο η γκαλεκτίνη-3, μπορεί να εντοπίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου, στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα (Barondes και συν. 1994). Η γκαλεκτίνη-3 εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως, σε αλλεργικές αντιδράσεις, μέσω αλληλεπίδρασής της με την ανοσοσφαιρίνη IgE (Robertson και συν. 1990), στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών (Moutsatsos και συν. 1987), στην προσκόλληση των κυττάρων (Hughes 2001), στην χημειοταξία των μονοκυττάρων/μακροφάγων (Sano και συν. 2000), στην δημιουργία καρκινικών μεταστάσεων (Inufusa και συν. 2001), στην μείωση των απόπτωσης (Yang και συν.

1996). Επιπλέον, η γκαλεκτίνη-3 συμμετέχει στις διαδικασίες της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και της «ωρίμανσης» των χονδροκυττάρων (Stock και συν. 2003). Στο αρθρικό υγρό, των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει διαπιστωθεί η παρουσία γκαλεκτίνης-3 (Neidhart και συν. 2003).

Η γκαλεκτίνη-3 αποτελεί έναν σπανίως χρησιμοποιούμενο ανοσοϊστοχημικό δείκτη μακροφάγων. Σε διάφορες ιστοπαθολογικές εφαρμογές (π.χ. μελέτη θυρεοειδικών νεοπλασμάτων), παρατηρήθηκε ότι η γκαλεκτίνη-3 εκφράζεται από μακροφάγα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ότι, πρακτικά το σύνολο των μακροφάγων στις ιστικές αντιδράσεις γύρω από τα προθέματα μπορούν να θεωρηθούν ως ενεργοποιημένα.

Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει την γκαλεκτίνη-3 ως αξιόπιστο δείκτη ενεργοποιημένων μακροφάγων και συγκεκριμένα δια της οδού της εναλλακτικής ενεργοποίησης (M2) (MacKinnon και συν. 2008).

Η ενεργοποίηση τύπου 2 αναφέρεται σε ενεργοποίηση των μακροφάγων παρουσία της IL-4 και της IL-13 (Ma και συν. 2003). Στο σημείο αυτό θα μπορούσε να εξαχθεί ένα ενδεχομένως βιαστικό συμπέρασμα, ότι η γκαλεκτίνη-3 αντιπροσωπεύει ενεργοποίηση μακροφάγων δια της εναλλακτικής οδού (M2) και στην αντίδραση του ιστού προς το ορθοπαιδικό πρόθεμα.

Όμως, μια σχετικά πρόσφατη και ενδιαφέρουσα δημοσίευση από τους Beatty και συν. (2002) Έδειξε ότι παρά το γεγονός ότι η αντίδραση στο M.Tuberculosis είναι κλασσική ενεργοποίηση τύπου 1, η γκαλεκτίνη-3 εμπλέκεται στην απάντηση των μακροφάγων στην φυματίωση. Συγκεκριμένα η γκαλεκτίνη-3 αθροίζεται στα φαγοσώματα τα οποία περιέχουν μυκοβακτηρίδια και δει ζωντανά μυκοβακτηρίδια.

Στη ίδια εργασία ανεδείχθη η σιβαρή πιθανότητα να αποτελεί η γκαλεκτίνη-3 μια σημαντική οψωνίνη για το M.Tuberculosis.

Επομένως, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η γκαλεκτίνη υπό ειδικές συνθήκες εμπλέκεται και σε άλλες αντιδράσεις, πλην της εναλλακτικής τύπου 2 (M2) ενεργοποίησης των μακροφάγων.

Η παρουσία της γκαλεκτίνης-3 στις μακροφαγικές αντιδράσεις της παρούσας μελέτης, θα μπορούσε να ερμηνευτεί επί τη βάση πρόσφατων δεδομένων, όπως αυτά που ανακοινώθησαν από τους Garin και συν. (2001).

Συγκεκριμένα και απροσδόκητα παρατηρήθηκε σημαντική συγκέντρωση γκαλεκτίνης-3 σε φαγοσώματα μακροφάγων. Οι ανωτέρω συγγραφείς αναφέρουν ότι τα φαγοσώματα είχαν υψηλές συγκεντρώσεις γκαλεκτίνης-3, παράλληλα με άλλες αποπτωτικές πρωτεΐνες. Η σημασία του φαινομένου είναι υπό διερεύνηση, διότι ενδέχεται τα φαγοσώματα να ρυθμίζουν αποπτωτικές διαδικασίες μακροφάγων (Garin και συν. 2001). Εάν αυτό αποδειχθεί ακριβές, τότε πιθανή ρύθμιση και συγκεκριμένα αύξηση της αποπτώσεως των μακροφάγων πέριξ των ορθοπαιδικών προθεμάτων θα είχε εύλογες εντυπωσιακές θεραπευτικές εφαρμογές.

Επίσης, θα εσήμανε ότι είναι μεν δείκτης ενεργοποίησης, υπό την έννοια αυξήσεως και ωριμάνσεως των φαγοσωμάτων αλλά παράλληλα και προάγγελος ενδεχομένου θανάτου τους.

5.3. Indoleamine

Η ινδολεαμίνη 2,3-διοξυγενάση (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) είναι το πρώτο και κύριο ένζυμο στην μεταβολική οδό L-tryptophane-kynurenine, η δράση του οποίου αφορά στην μετατροπή του βασικού αμινοξέος L-tryptophane (L-TRP) σε N-formylkynurenine.

Αρχικά το ένζυμο αυτό βρέθηκε στο ήπαρ, ενώ σήμερα είναι γνωστό ότι η ινδολεαμίνη είναι ευρέως καταναμεμημένησε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου, των πνευμόνων, της καρδιάς, των νεφρών, του εντέρου και του πλακούντα (Saito και συν. 1993, Takikawa και συν. 1986, Kudo και συν. 2004). Αν και ο μηχανισμός της δράσης της in vivo δεν είναι σαφής, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ιντερφερόνες, ιδιαίτερα η ιντερφερόνη-γ (interferon-γ, IFN-γ) σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των μονοκυττάρων είναι οι βασικοί παράγοντες που επάγουν την δράση της. Η αποδόμηση της τρυπτοφάνης, μέσω της ιντερφερόνης-γ επάγει ανοσοαπάντηση Th1 τύπου (ειδική ανοσία) (Carlin και συν. 1998).

Υπάρχουν όμως και μελέτες βάσει των οποίων η επαγωγή της ινδολεαμίνης διαμεσολαβείται και από μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από την IFN-γ, υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Saito και συν. 1993, 1996). Όσον αφορά τους αρθρικούς ιστούς, οι Malone και συν. (1994), κατέδειξαν ότι η IFN-γ, διεγείρει την παραγωγή ινδολεαμίνης και κατά συνέπεια τον μεταβολισμό της τρυπτοφάνης σε καλλιέργειες ανθρωπίνων συνοβιακών κυττάρων. Σε άλλη μελέτη οι Bertazzo και συν. (1999) κατέδειξαν υψηλά επίπεδα ινδολεαμίνης και χαμηλή συγκέντρωση τρυπτοφάνης στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Πρόσφατα, οι Schroecksnadel και συν. (2006) κατέδειξαν ότι σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα η αυξημένη αποδόμηση της τρυπτοφάνης σχετίζεται με την δράση της ινδολεαμίνης στα μακροφάγα του αρθρικού υμένα (κύτταρα τύπου-A).

Η ινδολεαμίνη έχει χρησιμοποιηθεί σαν ανοσοϊστοχημικός δείκτης μακροφάγων, ενεργοποιημένων υπό την επίδραση της IFN-γ.

Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε πειστική ανοσοχρώση για ινδολεαμίνη στα υπό μελέτη μακροφάγα. Αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως σημαντική ένδειξη, ότι τα εν λόγω μακροφάγα δεν είναι υπό την επίδραση λειτουργικών ερεθισμάτων ενεργοποιησέως από την IFN-γ.

5.4. MyD88 (myeloid differentiation factor 88)

Ο παράγοντας MyD88, είναι μια πρωτεΐνη, η οποία κλασσικά θεωρείται ως το κύριο γονίδιο, που είναι υπεύθυνο για την διαφοροποίηση των μυελοειδών κυττάρων.

Επίσης, συμμετέχει στη ενεργοποίηση των μακροφάγων και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση τύπου 1 (κλασσικός τύπος ενεργοποίησης).

Η πρωτεΐνη διαθέτει ένα N-αμινοτελικό τμήμα ανάλογο, με κυτταροπλασματικές σηματοδοτικές θέσεις μελών της υπεροικογενείας των υποδοχέων TNF (TNF-R) και ένα C-αμινοτελικό τμήμα όμοιο με εκείνο που βρίσκεται στους υποδοχείς Toll/interleukin-1-like (Burns και συν. 1998). Υπερέκφραση του μορίου MyD88, προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης c-Jun N-terminal kinase και του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Το C-αμινοτελικό τμήμα του MyD88 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα IL-1 και αναστέλει την ενεργοποίηση του παράγοντα NFκB.

Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων ο παράγοντας MyD88 λειτουργεί σαν προσαρμοστική πρωτεΐνη. Υπάρχουν σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εξαρτώνται

από τον MyD88, άλλα τα οποία είναι ανεξάρτητα και άλλα τα οποία εν μέρει «ρυθμίζονται» από τον παράγοντα MyD88(Adachi και συν. 1998, Dunne και συν. 2003, Hoebe και συν. 2003, Janssens & Beyaert 2002, Kaisho και συν. 2001, Kawai και συν. 1999, O'Neil και συν. 2003, Oshiumi και συν. 2003).

Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, είχε χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως δείκτης μακροφάγων ενεργοποιημένων υπό την επίδραση της IFN- γ (κλασσικός τύπος 1 ενεργοποίησης) (μη δημοσιεύμένες ακόμη μελέτες).

Επί τη βάση της σχετικής βιβλιογραφίας και της απουσίας χρώσεως στα μακροφάγα της παρούσας μελέτης, συμπεραίνεται ότι δεν είχαν «κινητοποιηθεί» μηχανισμοί ενεργοποίησης των μακροφάγων εξαρτώμενοι από την υπερέκφραση ή και την απλή έκφραση του παράγοντα MyD88.

5.5. MUM-1

Η πρωτεΐνη MUM-1 (ογκογονίδιο πολλαπλού μυελώματος-1,μοριακού βάρους 50kDa, είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50kDa, που κωδικοποιείται από το γονίδιο MUM-1. Το γονίδιο είχε αρχικά αναγνωριστεί λόγω της συμμετοχής του στην σπάνια διαμετάθεση t(6;14) (p25;q32), που παρατηρείται στο πολλαπλό μυέλωμα (MM), η οποία προκαλεί γειτνίαση του γονιδίου MUM-1 με τον τόπο βαρείας αλυσίδας της Ig (Iida και συν. 1997, Tsuboi και συν. 2000).

Η πρωτεΐνη MUM-1 ή IRF-4 ή είναι ένας ειδικός μεταγραφικός παράγοντας των λεμφοκυττάρων, μέλος της οικογενείας των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της IFN

(Interferon Regulatory Factors, IRFs) και θεωρείται ότι συμβάλλει στην ρύθμιση της ανοσοαπάντησης, που επάγεται από την IFN και άλλες κυτταροκίνες (Natkunam και συν. 2001, Carbone και συν. 2002, Gupta και συν. 1999)

Σε μια μελέτη με πειραματικά μοντέλα ποντικών, οι Falini και συν. (2000), κατέδειξαν ότι, ποντικοί με ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη MUM-1 δεν είναι σε θέση να σχηματίσουν βλαστικά κέντρα, παρουσιάζουν έλλειμμα πλασματοκυττάρων στο σπλήνα και στο χόριο του βλεννογόνου, ενώ παρουσιάζουν έντονη μείωση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στον ορό και μια αδυναμία να διατηρήσουν ανιχνεύσιμες αντισωματικές αποκρίσεις ή να παραγάγουν αποκρίσεις κυτταροτοξικών ή αντιογκικών T λεμφοκυττάρων.

Η έκφραση της πρωτεΐνης MUM-1 είναι ανεξάρτητη από την διαμετάθεση t(6;14) (p25;q32) και έχει εντοπιστεί σε πολλαπλά μυελώματα, λεμφοκυτταροπλασματικά λεμφώματα (LPL), διάχυτα μεγαλο-B-κυτταρικά λεμφώματα (DLBCL) και ενεργοποιημένα T κύτταρα. Η πρωτεΐνη MUM-1 δεν είναι ειδική για πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση, αλλά είναι δυνατό να προστεθεί στην ομάδα των φαινοτυπικών δεικτών, που διατίθενται για τον χαρακτηρισμό της ιστογένεσης των B κυτταρικών λεμφωμάτων, εκτός από το γεγονός ότι αποτελεί χρήσιμο δείκτη για την υποταξινόμηση των λεμφοειδών κακοηθειών, π.χ. στις B-κυτταρικές χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες (B-CLL).

Η έκφραση της πρωτεΐνης MUM-1,έχει μέχρις τώρα αναδειχθεί σε κύτταρα των λεμφοκυτταρικών και μελανοκυτταρικών γενεαλογιών (Tsuboi και συν. 2000).

Στην κλασσική τύπου 1 ενεργοποίηση των μακροφάγων, η διαδικασία περιλαμβάνει επαγωγή ενός set μεταγραφικών παραγόντων, γνωστών ως IRFs (Interferon Regulatory Factors).

Τα εν λόγω set περιλαμβάνει 9 μεταγραφικούς παράγοντες, IRF1 έως IRF9 (Ma J και συν.) Η πρωτεΐνη MUM-1 είναι στην παραγωγικότητα ο παράγοντας IRF4.

Εν εξελίξει, παράλληλες μελέτες του Εργαστηρίου σε ανοσοφαινότυπους μακροφάγων, έχουν αποδείξει για πρώτη φορά, ότι η πρωτεΐνη MUM-1 εκφράζεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και ειδικότερα σε κλασικές αντιδράσεις τύπου 1, όπως τα κοκκιώματα της φυματίωσης.

Με βάσει αυτά τα δεδομένα, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική χρώση στα μακροφάγα των περιπρωθετικών ιστών για να ελεγχθεί ακόμη ένα «ίχνος» πιθανής ενεργοποίησης από την IFN- γ .

Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης δεν συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης και συνεπικουρούν την μη έκφραση ινδολεαμίνης και MyD88 στα μακροφάγα.

5.6. Factor XIIIa

Ο παράγοντας XIIIa (fibrin stabilizing factor, trans-glutaminase), συνεκφράζεται με MS-1 και HLA-DR, σε δερματικά δένδροκυττάρων και η έκφρασή του αναβαθμίζεται κατόπιν αποκοκκίωσης των σιτευτικών κυττάρων

Οι ενζυματικά ενεργείς υπομονάδες του FXIIIa ευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων, αιμοπεταλίων, ηπατοκυττάρων και μονοκυττάρων.

Κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, η ενεργός υπομονάδα-A του FXIIIa, αθροίζεται στους πυρήνες των αντιστοιχών κυττάρων. Ο λειτουργικός ρόλος του FXIIIa, δεν φαίνεται να περιορίζεται στην αιμόσταση. Αντιθέτως αρκετές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, (π.χ. actin, myosin, vinculin) είναι υποστρώματα του FXIIIa.

Σε μια ενδιαφέρουσα εργασία οι Cupurdija και συν. 2004, έδειξαν ότι, τα μακροφάγα του φθαρού του πρώτου τριμήνου της κύησης, εκφράζουν εντόνως FXIIIa. Υποστήριξαν δε επί τη βάσει της δικής τους εμπειρίας ότι, η έκφραση του FXIIIa σχετίζεται με την εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων τύπου 2.

Τα ανωτέρω και σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης, συνιστούν καινοφανείς παρατηρήσεις και ενδεχομένως σημαντικές στην μελέτη της βιολογίας της περιπρωθετικής ιστιοκυτταρικής αντιδράσεως.

Μέχρι τώρα, οι μορφολόγοι θεωρούσαν ότι, η πλήρης απουσία πολυμορφοπυρήνων και η σχετική απουσία λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων, οφειλόταν στην μη ενεργοποίηση των μακροφάγων με διαδικασίες τύπου 1. Εθεωρείτο απλώς ότι, τα εν λόγω μακροφάγα συνιστούσαν μια αντίδραση τύπου ξένου σώματος, χωρίς εμπλοκή κυτταροκινών, οι οποίες θα μπορούσαν να κινητοποιήσουν ευρύτερους μηχανισμούς φλεγμονής.

Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης υποδεικνύουν ότι, η εμπειρικά κατοχυρωμένη απουσία άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση μακροφάγων με αντιφλεγμονώδη ρόλο.

Η σημασία του εν λόγω ευρήματος, θα διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες αναλυτικότερα, διότι πιστεύεται ότι, η εν λόγω παρατήρηση μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές εφαρμογές στην διαχείριση της άσηπτης χαλάρωσης.

5.7. CD1a

Το μόριο CD1a, ανήκει στην οικογένεια των CD1 αντιγόνων. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφανείας, ανάλογη του μείζονος παράγοντος ιστοσυμβατότητας, MHC class I (major histocompatibility factor I). Το μόριο CD1a, εκφράζεται σε συνεργασία με την β_2 -microglobulin (Van de Rijn και συν. 1983). Έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει έκφραση στα λεμφοκύτταρα του φλοιού του θύμου αδένου (Reinherz και συν. 1980, Mokhtar και συν. 1984, Bradstock και συν. 1980), στα κύτταρα Langerhans (Fithian και συν. 1981, Murphy και συν. 1981), στα διαπλεκόμενα δενδριτικά κύτταρα του δέρματος καθώς και στα διαπλεκόμενα δενδριτικά κύτταρα της αμυγδαλής (Van derValk και συν. 1984, Weiss και συν. 1986). Για τον λόγο αυτό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD1a, χρησιμοποιείται στην διάγνωση της ιστοκυτταρώσεως Langerhans (Murphy 1983, Becksred και συν. 1984), στην ταξινόμηση των θυμωμάτων (Mokhtar και συν. 1984) καθώς και στην διερεύνηση κακοήθους εξεργασίας των T-πρόδρομων κυττάρων (Reinherz και συν. 1980, Bradstock και συν. 1980, Bernard και συν. 1981).

Η ανοσοϊστοχημική εφαρμογή δείκτη για το CD1a, στην παρούσα μελέτη, αποσκοπούσε στη ανίχνευση πιθανών δηνδριτικών κυττάρων μέσα στον πληθυσμό των μακροφάγων.

Από τα ευρήματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στην συνολική φλεγμονώδη αντίδραση, η συμμετοχή δηνδριτικών-αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων είναι πρακτικά αμελητέα. Το συμπέρασμα αυτό βρίσκεται σε αρμονία, με την γνωστή ανοσοϊστοχημικώς αδρανή φύση των χρησιμοποιούμενων υλικών των προθεμάτων.

Βεβαίως, σε έναν μικρό αριθμό περιπτώσεων, παρατηρήθηκαν κύτταρα των οποίων ο φαινότυπος και εν μέρει η μορφολογία, υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαν να είναι κύτταρα τύπου Langerhans. Η πιθανή παρουσία τους θα μπορούσε να αποδοθεί σε εγκατάσταση άωρων δηνδριτικών κυττάρων, υπό την επίδραση ευδοτικού ανοσολογικού περιβάλλοντος.

Κλινικές και θεραπευτικές επιπτώσεις δεν είναι εφικτό να εκτιμηθούν, αλλά από τα παρόντα δεδομένα, η συμμετοχή τους στην διατήρηση της φλεγμονής δεν θεωρείται κρίσιμη.

5.8. EGFR (υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGFR, HER-1, c-erbB-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία μπορεί να προσδεθεί και να καταστεί δραστική μέσω διαφόρων συνδετών, συμπεριλαμβανομένων του EGF (epidermal growth factor) και του TGF (transforming growth factor. Η πρόσδεση του συνδέτη ενεργοποιεί την δράση της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα, η οποία σχετίζεται με το ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου. Η ενεργοποίηση της κινάσης επιφέρει άμεση αυτοφωσφορυλίωση του EGFR και επακόλουθη φωσφορυλίωση και άλλων κυτταρικών μορίων, όπως της φωσφολιπάσης C-II. Οι διαδικασίες αυτές οδηγούν σε μια σηματοδοτική διεργασία, η οποία έχει ως αποτέλεσμα διάφορες κυτταρικές απαντήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της σύνθεσης του DNA, του πολλαπλασιασμού και την αύξησης των κυττάρων, την χημειοταξία, την αγγειογένεση. (Gullick 1991, Carpenter και συν. 1987, Margollis και συν. 1989, Schlessinger και συν. 1983).

Ο παράγοντας EGFR εκφράζεται σε πολλούς φυσιολογικούς επιθηλιακούς ιστούς, κυρίως στην βασικές στιβάδες των πολύστιβων επιθηλίων (π.χ. στο δέρμα, τον οισοφάγο). Επίσης εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα, στους νεφρούς, στους όρχεις, στους συγκυτιοτροφοβλάστες του πλακούντα, στον τράχηλο της μήτρας, στα ενδομητρικά αδένια και στον προστάτη αδένια (Gusterson και συν. 1984).

Υπερέκφραση του EGFR, επίσης έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους νεοπλασιών, ως αποτέλεσμα της ενίσχυσης του γονιδίου (gene amplification) ή/και της αυξημένης πρωτεϊνικής μεταγραφής. Στα νεοπλάσματα περιλαμβάνονται, το ενδομητριοειδές καρκίνωμα της μήτρας, νεοπλάσματα των πνευμόνων (πλακώδες καρκίνωμα, αδενοκαρκίνωμα), πολύμορφο γλοιοβλάστωμα του εγκεφάλου. Επίσης έκφραση του EGFR έχει αναφερθεί και σε αρκετά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου. Ποικίλη έκφραση παρουσιάζει στα καρκινώματα εκ μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστεως, στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, τον γαστρικό καρκίνο και τον καρκίνο του μαστού (Wikstrand και συν. 1995, Gullick και συν. 1991, Sainsbury και συν. 1985).

Ο EGFR μπορεί να προκαλέσει οστική απορρόφηση, λόγω της ικανότητάς του να αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την συγχώνευση των πρόδρομων κυττάρων των οστεοκλαστών (Takahashi και συν. 1986, Raisz και συν. 1980).

Ο ρόλος του EGFR στην μακροφαγική αντίδραση, η οποία σχετίζεται με την άσηπτη χαλάρωση έχει διερευνηθεί σε μια μόνο μελέτη (Bainbrigde και Saffar, 1998).

Στην εν λόγω μελέτη, παρατηρήθηκε ανοσοχρώση για EGFR, στα μακροφάγα, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανοσοχρώση σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα-μακροφάγα.

Στην συγκεκριμένη εργασία υπήρξε σαφής ανοσοχρώση για EGFR των μακροφάγων.

Η εν λόγω ανοσοχρώση, παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Στο υλικό της παρούσης μελέτης, η ανοσοχρώση ήταν κυρίως μεμβρανική. Η κυτταροπλασματική χρώση για EGFR γενικώς έχει αποδειχθεί σε αυξημένη ενδοκυττάρια ανακύκλωση του EGFR και ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο ανίχνευσης και το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό αντίσωμα σε τομέ παραφίνης και όχι τομές κρυοστάτου.

Επίσης, στην μελέτη των Bainbrigde και Saffar δεν δίδονται στοιχεία για το μέγεθος του πληθυσμού των ανοσοθετικών κυττάρων.

Βασικά, το συμπέρασμα και από τις δύο μελέτες είναι ότι, περιπροθετικά μακροφάγα εκφράζουν EGFR στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους.

Δεδομένου ότι, στην μελέτη των Bainbrigde και Saffar απεδείθει επίσης η παρουσία των συνδετών (ligands) του EGFR στην ίδια περιοχή, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι η μακροφαγική απάντηση είναι δυνατόν να ελέγχεται με μηχανισμούς αύξησης αντίστοιχα μ' αυτούς των επιθηλιακών κυττάρων (EGF, TGF).

Προκύπτουν επομένως ερωτήματα εάν η παρουσία του υποδοχέως και των συνδετών σχετίζεται με πιθανή MIB-1 ανοσοθετικότητα. Αυτό δεν έχει διερευνηθεί στην μελέτη των Bainbrigde και Saffar. Στην παρούσα μελέτη έγιναν ανοσοχρώσεις σε ορισμένα επιλεγμένα περιστατικά.

Η μη ανεύρεση αυξημένου δείκτη MIB-1, όπως η μη ανεύρεση μιτώσεων σε συνήθεις τομές Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, υποδηλώνει ότι δεν εμπλέκονται μηχανισμοί τοπικού πολλαπλασιασμού μακροφάγων. Επίσης, υποδηλώνει ότι όλα τα μακροφάγα της συγκεκριμένης περιπροθετικής φλεγμονής, προέρχονται από μονοκύτταρα μυελικής προέλευσης.

Μελλοντικές μελέτες, θα μπορούσαν να αναζητήσουν άλλες πιθανές μεταβολές των μακροφάγων, σηματοδοτούμενες μέσω EGFR, π.χ. τοπικά αυξημένη αγγειοβρίθεια.

5.9. HIF-1alpha

Το μοριακό οξυγόνο (O₂) είναι απαραίτητο για τις μεταβολικές λειτουργίες των θηλαστικών, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επομένως, η επιβίωση εξαρτάται από την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων που διατηρούν την ομοιοστασία του οξυγόνου. Η μεταγραφική ρύθμιση κρίσιμων για την επιβίωση γονιδίων (π.χ. Glut-1, p53, p21 ή bcl-2) μεσολαβείται και από τον παράγοντα HIF-1 (hypoxia inducible factor-1). Ο παράγοντας HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές, του οποίου οι υπομονάδες α και β (HIF-1α και HIF-1β) ανήκουν στην οικογένεια του μεταγραφικού παράγοντα PAS (Per-Arnt-SIM).

Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν γλυκόλυση, ερυθροποίηση και αγγειογένεση με σκοπό την διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες O₂, ο ανθρώπινος παράγοντας HIF-1α υδροξυλύνεται, σε Pro402 ή Pro564 μέσω μιας σειράς προλυλ-υδροξυλασών και βασικά αποδομείται σε πρωτεοσώματα. Υπό συνθήκες υποξίας, η έλλειψη υδροξυλίωσης προλαμβάνει την αποδόμηση του παράγοντα HIF και αυξάνει την μεταγραφική του δραστηριότητα. Επομένως, η συγκέντρωση του HIF-1α και ειδικά του πυρηνικού αυξάνει στο κύτταρο. Ο παράγοντας HIF-1β παραμένει σταθερός κάτω από οποιοσδήποτε συνθήκες. Επομένως ο παράγοντας HIF-1α είναι σημαντικός για την γονιδιακή μεταγραφή μέσω HIF-1 σε απάντηση στην υποξία.

Σε μελέτη των Giatsromanolaki και συν. 2003, διαπιστώθηκε ανοσοϊστοχημικά αυξημένη έκφραση του HIF-1alpha στα κύτταρα του αρθρικού υμένα, ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και οστεοαρθρίτιδα, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Η βιολογική σύνδεση του HIF-1alpha με την λειτουργία των μακροφάγων έχει πολύ πρόσφατη και σύντομη βιβλιογραφική ιστορία.

Υπάρχουν σημαντικά ευρήματα, τα οποία συνδέουν την αύξηση δράσεως του HIF-1alpha με τις κάτωθι ομάδες και δράσεις μακροφάγων:

- 1) Αντίδραση μακροφάγων με κλασσική ενεργοποίηση τύπου 1 σε λοιμώξεις.
- 2) Αντίδραση μακροφάγων στα πλαίσια αποκαταστάσεως τραύματος ή φλεγμονής, με επακόλουθη ίνωση.
- 3) Αντίδραση μακροφάγων με ανοσορυθμιστικές ιδιότητες και ενδεχόμενη αντιφλεγμονώδη δράση (M2) (Dehne & Brune, 2009).

Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη οι Oda και συν. (2006), παρουσίασαν στοιχεία, ότι ο HIF-1alpha εμπλέκεται στην διαφοροποίηση μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Επίσης, παρατήρησαν ότι ο HIF-1alpha δεν είναι απολύτως απαραίτητος για να ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση.

Είναι όμως απολύτως απαραίτητος για να ολοκληρωθεί η λειτουργική ωρίμανση των μακροφάγων. Επίσης, υπάρχουν και άλλα δεδομένα τα οποία αναδεικνύουν την σημαντική εμπλοκή του HIF-1alpha στην διαδικασία της φαγοκυτταρώσεως. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας HIF-1alpha αυξάνει την φαγοκυττάρωση των μακροφάγων σε σημαντικό βαθμό.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην οποία διερευνήθηκε η παρουσία και η ενεργοποίηση του HIF-1alpha-pathway σε περιπροθετικά μακροφάγα.

Η εστιακή κατανομή της θετικής ανοσοχρώσεως για HIF-1alpha, υποδεικνύει ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας δεν είναι θεμελιώδης και απολύτως απαραίτητος διεγέρτης μακροφάγων στους περιπροθετικούς ιστούς.

Τα ευρήματα όμως αναδεικνύουν ότι, ο παράγων HIF-1alpha εμπλέκεται έστω και εστιακά στην διαδικασία ενεργοποίησης των περιπροθετικών μακροφάγων.

Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να οδηγήσει είτε σε προσπάθειες μείωσης της υποξίας των περιπροθετικών ιστών, είτε σε φαρμακευτικές παρεμβάσεις αναστολής του HIF-1 α -pathway, οι οποίες ήδη διερευνώνται παγκοσμίως με έντονο ενδιαφέρον σε φαρμακευτικό επίπεδο.

Περισσότερες μελέτες θα μπορούσαν να αναδείξουν τους ακριβείς μηχανισμούς του HIF-1 α και σε πειραματικό επίπεδο.

5.10. NF κ B

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF κ B (Nuclear Factor-kappa B) διαδραματίζει κριτικό ρόλο στην φλεγμονή, την καρκινογένεση, την νεοπλασματική διήθηση και τις μεταστάσεις.

Τα μέλη της οικογενείας του NF κ B, p65 (Rel A), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1), βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα μη διεγερμένων κυττάρων, δεσμευμένα με πρωτεΐνες της οικογενείας I κ B, με την μορφή ομοιο- ή ετεροδιμερών μορίων (Matthews και συν. 2000). Είναι γνωστό, ότι για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B, είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 (Takada και συν. 2004), η οποία τελικά οδηγεί στην μεταγωγή του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα του κυττάρου και την σηματοδότησή του. Σε μια μελέτη από τους Malcolm και συν. 1995, αναφέρεται η παρουσία των πρωτεϊνών p50 και p65, στα μακροφάγα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρθρικού υμένα, ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Υπάρχουν αρκετές εργασίες, οι οποίες εστίασαν στην παρουσία φλεγμονωδών μεταβιβαστών (IL-1 β , IL-6, PDGF), στους περιπροθετικούς ιστούς. Επίσης, πολλοί ερευνητές έχουν αποδεχθεί ότι τα μακροφάγα, που φαγοκυτταρώνουν σωματίδια από τα υλικά των προθεμάτων, απελευθερώνουν κυτταροκίνες με φλεγμονώδη δράση.

Σ' αυτές συμπεριλαμβάνονται οι προαναφερθείσες καθώς και άλλες σημαντικές, όπως ο TNF- α , η IL-1 α και προσταγλανδίνη E2.

Πιστεύεται από το σύνολο των ερευνητών, ότι αυτές οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκαλούν και οστεόλυση, η οποία συμβάλλει τα μέγιστα στην άσηπτη χαλάρωση.

Με βάση τα ανωτέρω, οι ερευνητές εστίασαν σε μηχανισμούς που ελέγχουν την απελευθέρωση των εν λόγω προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα.

Ένας κρίσιμος σχετικός μηχανισμός, συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Στην κλασσική ενεργοποίηση μια πρωτεϊνική κίνηση φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη I κ B. Εν συνεχεία η υπομονάδα p65 μετατίθεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί διάφορες ειδικές θέσεις, που ελέγχουν μεταγραφή γονιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί σε κυτταροκαλλιέργειες μονοκυττάρων/μακροφάγων.

Σε αντίστοιχες in vitro μελέτες, οι ερευνητές ασχολήθηκαν με παραμέτρους, που αφορούν τα σωματίδια των προθεμάτων και την πιθανή τους επίδραση στην ενεργοποίηση μακροφάγων in vitro. Τα αποτελέσματα συμφωνούν στο ότι ο μηχανισμός είναι σημαντικός, αλλά διαφωνούν στο ποια παράμετρος ενδέχεται να είναι κρισιμότερη. Άλλοι συγγραφείς θεωρούν ότι χρειάζεται παρουσία ενδοτοξίνης στα σωματίδια (Akisue και συν. 2002), ενώ αντίθετα άλλοι συγγραφείς, όπως οι Baumann και συν. (2005), πιστεύουν ότι η ενεργοποίηση του NF- κ B-pathway σε καλλιέργειες μονοκυττάρων/μακροφάγων επιτυγχάνεται και επί της απουσίας ενδοτοξινών ή λιποπολυσακχαριδών.

Σημειώνεται ότι, μέχρι την παρούσα μελέτη, ουδείς έχει αναλύσει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Λόγω της αναδρομικής φύσεως της μελέτης, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η παρουσία προσροφημένης (adsorbed) ενδοτοξίνης στα σωματίδια, όπου παρατηρήσαμε πυρηνική χρώση για NF-kB (καθολική ή τμηματική). Εντούτοις, δεδομένης της απουσίας πολυμορφοπυρήνων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, όπως επίσης και της μη παρουσίας δεικτών τύπου M1 ενεργοποίησης, πιστεύουμε ότι τα φαγοκυτταρωμένα σωματίδια προκαλούν ενεργοποίηση του NF-kB και συμφωνούμε με τα συμπεράσματα των Baumann και συν. (2005).

Οι πιθανές θεραπευτικές-κλινικές επιπτώσεις των σχετικών ευρημάτων διαφαίνονται από τα εντυπωσιακά αποτελέσματα in vitro μελετών των Clohisy και συν. (2004). Στην μελέτη αυτή, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αναστολείς του NF-kB σε μακροφάγα ενεργοποιημένα από PMMA (poly-methyl-methacrylate) («τσιμέντο» οστών). Οι εν λόγω αναστολείς εμπόδισαν την μετάθεση του NF-kB στον πυρήνα των κυττάρων και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους. Επίσης, οι ίδιοι αναστολείς παραμπόδισαν την οστεοκλαστογένεση προδρόμων οστεοκλαστών μέσω RANKL.

Επομένως, πιθανή αναστολή του NF-kappaB-pathway θα μπορούσε να αναστείλει τα δύο πλέον κρίσιμα στοιχεία της άσηπτης χαλάρωσης, δηλ. την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών και την οστεοκλαστογένεση υπό την επίδρασή της.

Τονίζεται, ότι η παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη μελέτη ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB σε περιπροθετικά μακροφάγα σε ανθρώπινο ιστικό υλικό.

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.

Βασικά στοιχεία επιδημιολογικής φύσεως

Φύλο	N	M.O. (έτη)
A	20	65,5 (39-80)
Θ	40	64,7 (34-78)

N: αριθμός ασθενών

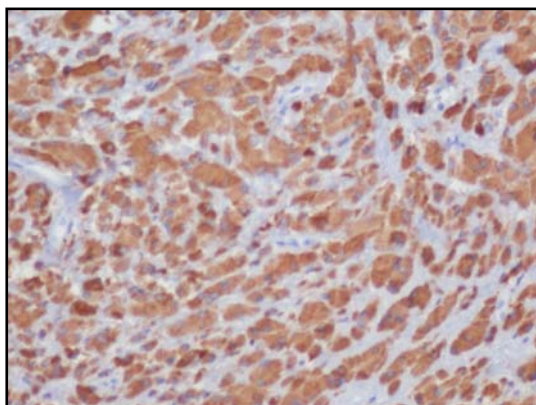
M.O.: μέσος όρος ηλικίας ασθενών

Πίνακας 2.

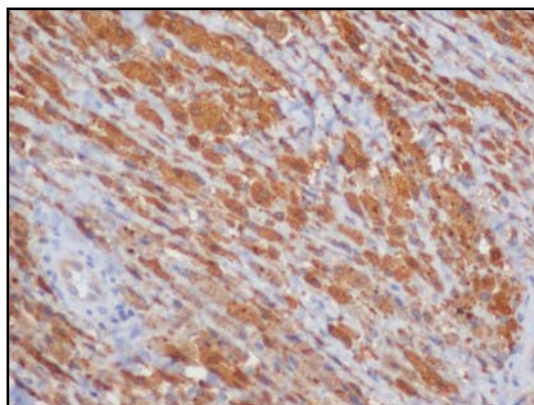
Ανοσοχρώσεις για δείκτες μακροφάγων, δείκτες ενεργοποίησης μακροφάγων και δείκτες δενδριτικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων

Αντίσωμα	Ένταση χρώσεως
CD68	εντόνως θετική (ιδέ εικόνα 1)
Galectin-3	εντόνως θετική (ιδέ εικόνες 2,3,4,5)
Indoleamin	αρνητική (ιδέ εικόνα 6&7)
MyD88	αρνητική (ιδέ εικόνα 8,9)
MUM-1	αρνητική (ιδέ εικόνα 10,11)
Factor XIIIa	εντόνως θετική (ιδέ εικόνες 12,13)
CD1α	θετική (ιδέ εικόνα 14)
EGFR	θετική (ιδέ εικόνα 15)
HIF-1α	θετική (ιδέ εικόνες 16,17)
NF-kappaB	μέτρια-έντονη (ιδέ εικόνες 18,19,20)

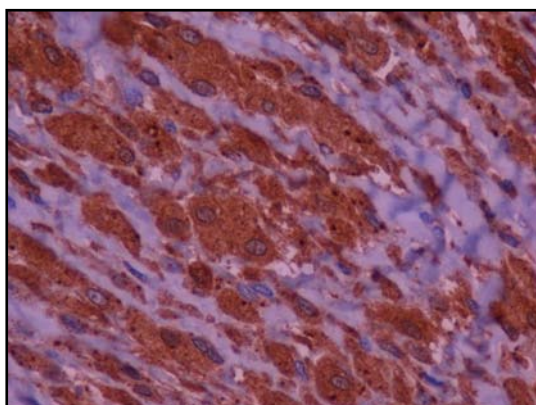
ΕΙΚΟΝΕΣ



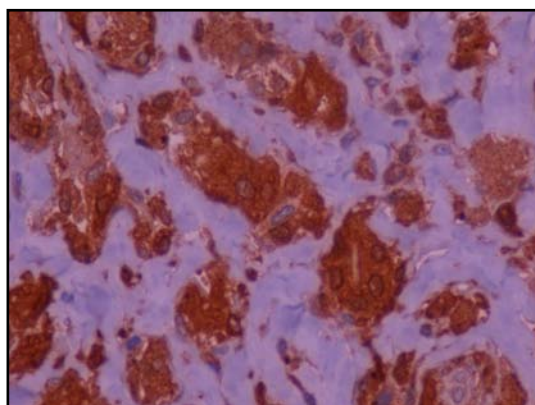
Εικ. 1 Mouse monoclonal antibody CD68 (PGM1)[DakoCytomation]
Παρατηρείται εκτεταμένη ανοσοχρώση μακροφάγων.



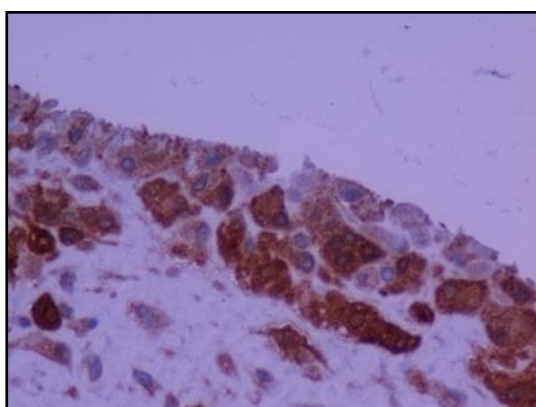
Εικ.2 Mouse monoclonal antibody galectin-3 (9C4) [Novocastra]
Όλα τα ιστοκύτταρα παρουσιάζουν έντονη ανοσοχρώση.



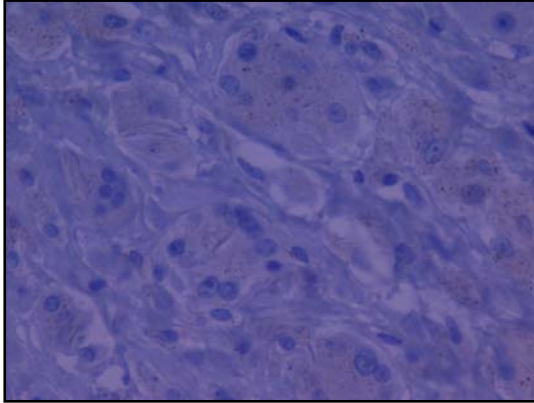
Εικ. 3 Mouse monoclonal antibody galectin-3 (9C4) [Novocastra]
Παρατηρείται έντονη, κυτταροπλασματική ανοσοχρώση στα μονοπύρρηνα και στα πολυπύρρηνα μακροφάγα.



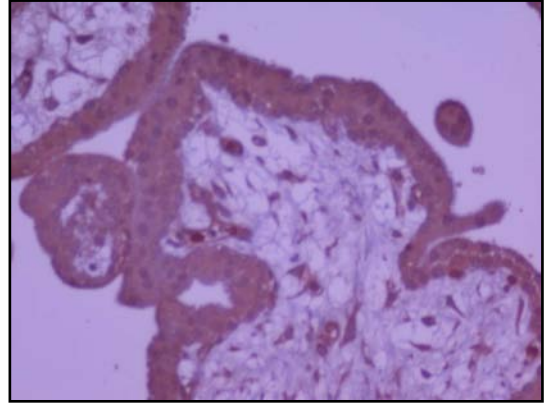
Εικ. 4 Ομοίως με εικόνα 3.



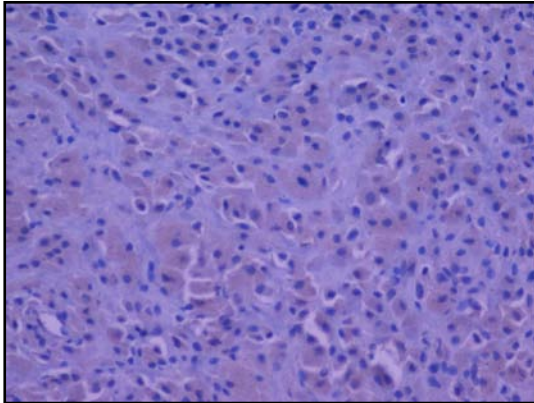
Εικ. 5 Mouse monoclonal antibody galectin-3 (9C4) [Novocastra]
Συνοβιακά στοιχεία, αντιστοιχούντα με κύτταρα τύπου A, παρουσιάζουν ανοσοχρώση αντίστοιχη με αυτή των μακροφάγων.



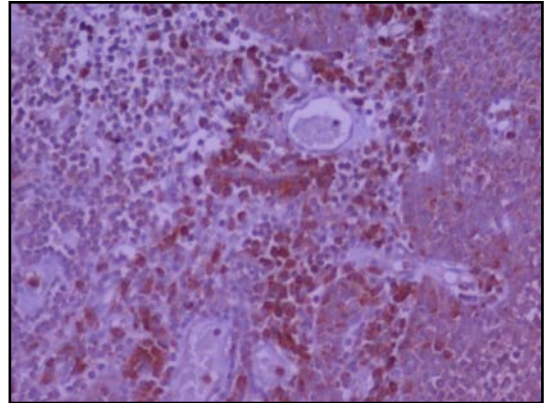
Εικ. 6 Sheep polyclonal antibody Indoleamine 2,3 dioxygenase [Abcam Inc]
Δεν παρατηρείται πειστική ανοσοχρώση μακροφάγων, στο παρόν υλικό.



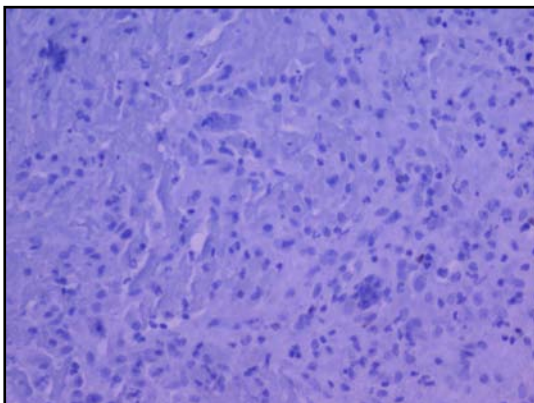
Εικ. 7 Sheep polyclonal antibody Indoleamine 2,3 dioxygenase [Abcam Inc]
Παρατηρείται σαφής ανοσοχρώση τροφωβλάστης.
(Πλακούντας-control)



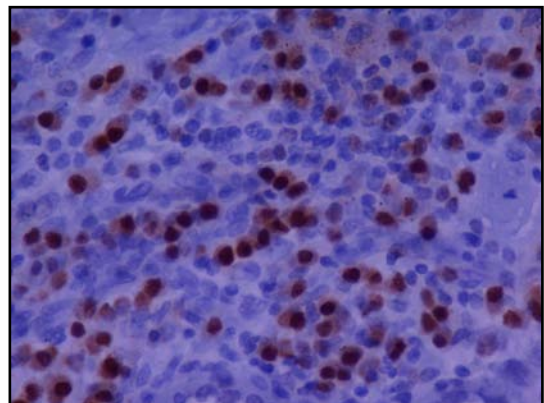
Εικ. 8 Rabbit polyclonal antibody MyD88 [IMGENEX, San Diego]
Δεν παρατηρείται πειστική ανοσοχρώση μακροφάγων, στο παρόν υλικό



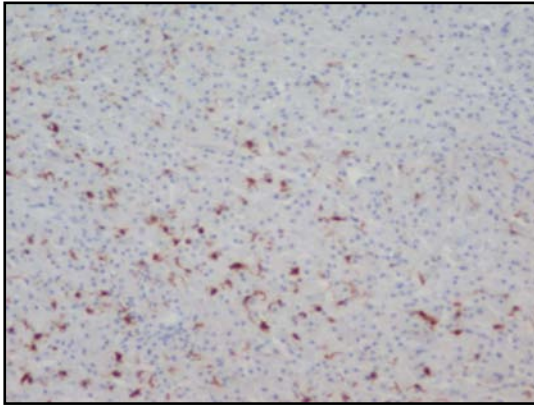
Εικ. 9 Rabbit polyclonal antibody MyD88 [IMGENEX, San Diego] Παρατηρείται σαφής χρώση ανοσοκυττάρων.
(Παρίσθμια αμυγδαλή-control)



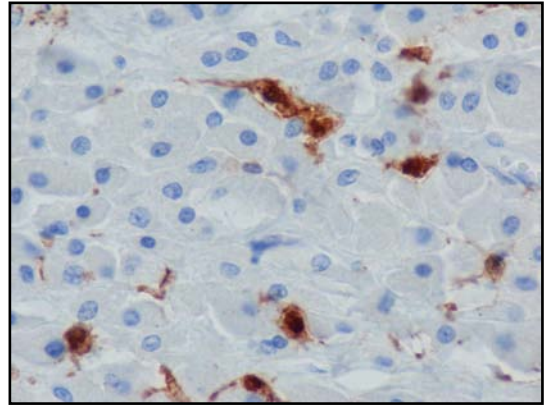
Εικ. 10 Mouse monoclonal antibody MUM-1 (MUM1p) [DakoCytomation]
Δεν παρατηρείται ανοσοθετικότητα στα μονοπύρρηνα μακροφάγα.



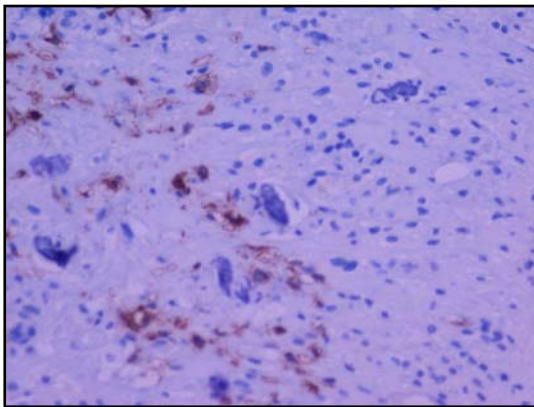
Εικ.11 Mouse monoclonal antibody MUM-1 (MUM1p) [DakoCytomation]
Παρατηρείται ανοσοθετικότητα πλασματοκυττάρων, σε παρακείμενη συνοβιακή μεμβράνη.



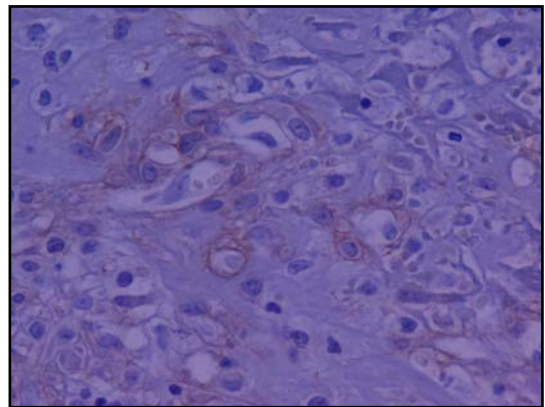
Εικ. 12 Mouse monoclonal antibody XlIIa (E980.1) [Novocastra]
Παρατηρείται ανοσοχρώση δένδριτικών κυττάρων.



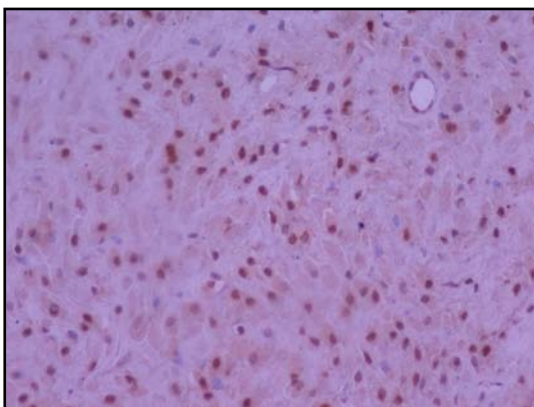
Εικ. 13 Ομοίως με Εικ. 12



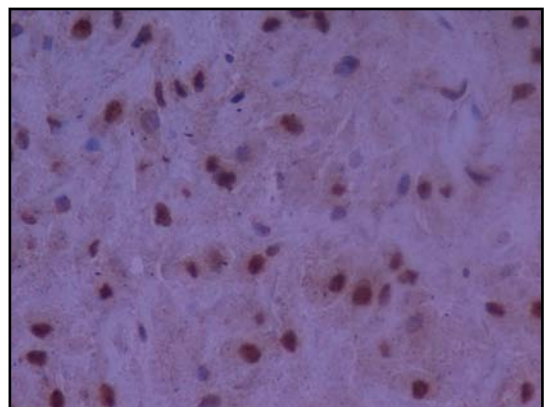
Εικ.14 Mouse monoclonal antibody CD1a (MTB1) [Novocastra]
Παρατηρείται ανοσοχρώση ιστοκυττάρων.



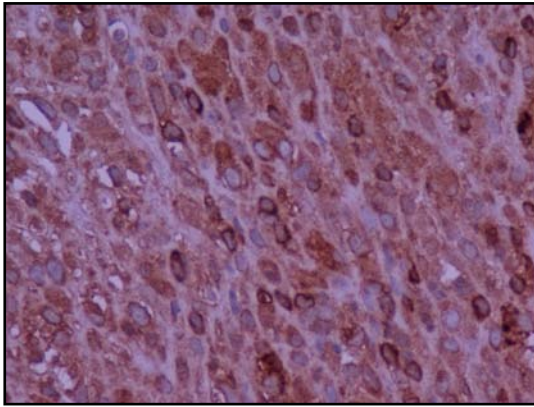
Εικ.15 Mouse monoclonal antibody EGFR (31g7) [Zymed Laboratories]
Παρατηρείται εστιακή μεμβρανική ανοσοχρώση μακροφάγων.



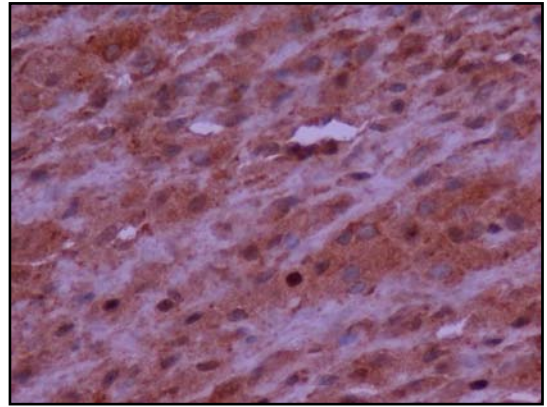
Εικ.16 Mouse monoclonal antibody HIF-1a (H1alpha67) [Novus Biologicales]
Παρατηρείται πυρηνική και ασθενής κυτταροπλασματική ανοσοχρώση στα μονοπύρηνα μακροφάγα



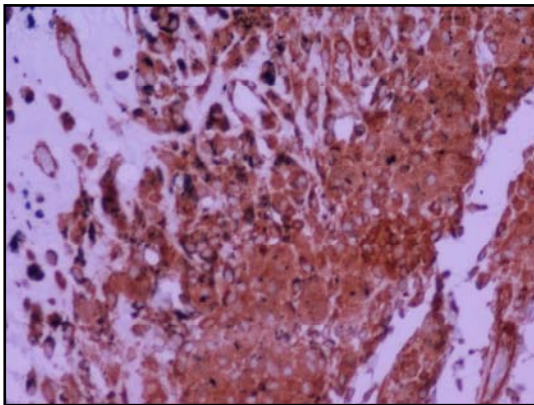
Εικ.17 Ομοίως με Εικ. 16.



Εικ.18 Mouse monoclonal antibody NFκB (p65)
[SantaCruz, Biotechnology INC]
Παρατηρείται έντονη ανοσοχρώση στην
πυρηνική μεμβράνη και προς την περιφέρεια
του πυρήνα.



Εικ.19 Mouse monoclonal antibody
NF-kB (p65)
[SantaCruz, Biotechnology INC]
Παρατηρείται εστιακή ολική πυρηνική
ανοσοχρώση.



Εικ.20 Mouse monoclonal antibody NF-kB(p65)
[SantaCruz, Biotechnology INC]
Συνυπάρχει, ανοσοθετικότητα των μακροφάγων,
μαζί με φαγοκυττάρωση σωματιδίων
μεταλλικής προελεύσεως.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη παραγματοποιήθηκε μια συστηματική προσπάθεια ανοσοφαινοτυπικής μελέτης των περιπροθετικών μακροφάγων.

Τα τελευταία θεωρούνται ως οι κύριοι κυτταρικοί πρωταγωνιστές της άσηπτης χαλάρωσης, η οποία ως γνωστόν αποκαλείται και «particle disease».

Αντίστοιχες μελέτες είναι λίγες και περιορισμένες σε ένα-δύο φαινοτυπικούς δείκτες.

Οι περισσότερες μελέτες έχουν προσεγγίσει το παθογενετικό πρόβλημα σαν πρόβλημα διερεύνησης της συνολικής επίδρασης φλεγμονωδών κυτταροκινών, στους περιπροθετικούς. Όμως οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και των αντίστοιχων mRNA, καίτοι ενδεικτικές, είναι ευμετάβλητες και χωρίς σαφή οριοθέτηση, μεγίστης ή μέσης ή ελαχίστης τιμής, που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο «activity status» της «particle disease».

Στην παρούσα μελέτη, θεωρήσαμε ότι ο ανοσοφαινότυπος των μακροφάγων, θα αντανakλούσε ακριβέστερα την δραστηριότητα τους και επομένως την δραστηριότητα της «particle disease».

Τα μακροφάγα της περιπροθετικής αντιδράσεως είναι ενεργοποιημένα χωρίς δείκτες M1 ενεργοποίησης και με σοβαρή ένδειξη τύπου 2 ενεργοποίησης .

Στην διαδικασία ενεργοποίησης τους φαίνεται να υπάρχει αξιόλογη συμμετοχή μηχανισμών υποξίας και μικρή συμμετοχή του EGFR-σηματοδοτικού «μονοπατιού».

Αντίθετα το NF-kappaB «μονοπάτι», φαίνεται να αποτελεί εμφανή ενεργοποιητικό μηχανισμό.

Η ανωτέρω ανάλυση διανοίγει νέους δρόμους προσπέλασης και μελλοντικής φαρμακευτικής παρέμβασης, για τον πιθανό έλεγχο της άσηπτης χαλάρωσης, μέσω πρόληψης ή ελαχιστοποίησης της «particle disease».

Summary

Aseptic loosening has been studied extensively. Most of the investigative work has been focused on proinflammatory cytokines.

The macrophages that produce most of these cytokines, and eventually enhance osteoclastogenesis and periprosthetic osteolysis have not been studied in a comparable detail.

In the present study we have selected FFPE samples from 60 cases of arthroplasty revisions with aseptic loosening. The samples included periprosthetic macrophage reactions and adjacent reactive synovitis.

Monoclonal and polyclonal antibodies to CD68, galectin-3, indoleamin, MyD88, MUM-1, FXIIIa, EGFR, HIF1 α and NF-kappaB were applied to 3 μ sections from these FFPE samples.

Immunoreactivity patterns were analyzed and an overall immunoprofile of these macrophages, was made.

This immunoprofile consisted of: CD68(+), galectin-3 (+), indoleamine (-), MyD88 (-), MUM-1 (-),FXIIIa, (+),EGFR (+) trace, HIF1 α (+) focal, NF-kappaB (+) strong.

Based on the above immunoprofile, the macrophages of this «particle disease» are activated, not through M1 patterns, although an M2 type could be suggested.

EGFR-based activation was minimal, but a hypoxia-mediated activation mechanism could be significant.

Activation could be NFkB-mediated and this finding may invite novel therapeutics approaches, first in experimental animals and if successful in patients, with an attempt to ameliorate aseptic loosening

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas S et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinases mediate PMMA-induction of osteoclasts. *J Orthop Res* 2003;21:1041

Abu-Amer Y, et al. IL-4 abrogate osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001;107:1375.

Adachi et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998;9:143

Agins HJ, et al. Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:347

Akisue T, et al. The effect of particle wear debris on NFkappaB activation and pro-inflammatory cytokine release in differentiated THP-1 cells. *J Biomed Mater Res* 2002;259:507

Allen M, et al. The effects of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface. A study in rats. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:32

Anderson DM, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature* 1997;390:175

Antony PP, et al. Localised endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:971

Archibek MJ et al. The basic science of periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82-A:1478

Archibek MJ et al. The basic science of periprosthetic osteolysis. *Instr Course Lect* 2001;50:185

Arora A, et al. The role of the Th1 AND Th2 immune responses in loosening and osteolysis of cemented total hip replacements. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:693

Aspenberg P & Herbertsson P. Periprosthetic bone resorption. Particles versus movement. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:641

Aspenberg P, et al. Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis. Particles are not the only thing. *Acta Orthop Scand* 1998;69:1

Aspenberg P, et al. Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth. Titanium implants in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1992;63:141

Athanasou N.A., Quinn J.: Immunohistochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. *Ann Rheum Dis* 1991;50: 311

Athanasou N.A.: Synovial macrophages. *Rheum Dis* 1995; 54: 392

- August AC, et al. The McKee-Farrar hip arthroplasty. A long term study. *J Bone Joint Surg Br* 1986;68:520
- Austad ED. Breast implant-related silicone granulomas: the literature and the litigation. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:1724
- Bainbridge & Saffar. Persistent expression of mitogenic/transforming factors at the site of failed orthopaedic implants: the impact on immune reactivity. *J Mater Science* 1998;9:695
- Baldwin L, et al. A study of tissue interface membranes from revision accord knee arthroplasty: the role of T lymphocytes. *Biomaterials*. 2002;23:3007-3014.
- Barland P., Novikoff A.B., Hamerman D.: Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol.* 1962;14:207
- Barrack RL, et al. Concerns about ceramics in THA. *Clin Orthop Relat Res* 2004;73
- Baumann B, et al. Effects of polyethylene and TiALV wear particles on expression of RANK, RANKL, and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand* 2004;75:295
- Baumann B et al. Activation of NF- κ B signalling and TNF- α expression in THP-1 macrophages by TiAlV- and polyethylene-wear particles. *J Orthop Res* 2005;23:1241
- Barondes SH, et al. Galectins : a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994;76:597
- Battistini A, et al. IRF regulation of HIV-1 long terminal repeat activity. *J Interferon Cytokines Res* 2002; 22:27
- Bechtold JE, et al. A controlled experimental model of revision implants: Part I. Development. *Acta Orthop Scand* 2001;72:642
- Becker S, et al. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:611
- Bekker PJ, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res* 2005;20:2275
- Bellinghausen I, et al. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003;108:167
- Bendek MP. Macrophage matrix metalloproteinase-9 regulates angiogenesis in ischemic muscle. *Circ Res* 2004;94:138

- Berrebi D, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003;101:729
- Berton G & Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 1999;11:621
- Bi Y, et al. Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts. *J Bone Joint Surg* 2001;83A:501
- Bi Y, et al. Adherent endotoxin on orthopaedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclasts differentiation. *J Bone Miner Res* 2001;16:2082
- Bi Y, et al. Adherent endotoxin mediates biological responses of titanium particles without stimulating their phagocytosis. *J Orthop Res* 2002;20:696
- Blaine TA, et al. Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particle. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:1181
- Blaine TA, et al. Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents: the role of cAMP-mediated signalling mechanisms. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1519
- Bauer WT & Schils J. The pathology of total joint arthroplasty. II. Mechanisms of joint failure. *Skeletal Radiol* 1999;28:483
- Baumann B, et al. Effects of polyethylene and TiALV wear particles on expression of RANK, RANKL, and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand* 2004;75:295.
- Beatty et al. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. *Cellular Microbiol* 2002;4:167
- Beckstead JH, et al. Histiocytosis X cells and Langerhans cells: enzyme histochemical and immunologic similarities. *Hum Pathol* 1984;15:826
- Bernard A, et al. Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies: evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukaemia and lymphoblastic lymphoma. *Blood* 1981;57:1105
- Bertazzo et al. Tryptophan catabolism in synovial fluid of various arthropathies and its relationship with inflammatory cytokines. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:565
- Bobyn JD, et al. The susceptibility of smooth implant surfaces to periimplant fibrosis and migration of polyethylene wear debris. *Clin Orthop* 1995;311:21
- Boissy P, et al. RANKL induces formation of avian osteoclasts from macrophages but not from macrophage polykaryons. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:340

- Bonizzi G, et al. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280
- Bosca L. et al. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* 2005;208:249
- Bossard MJ, et al. Mechanism of inhibition of cathepsin K by potent, selective 1,5-diacylcarbohydrazides: a new class of mechanism-based inhibitors of thiol proteases. *Biochemistry* 1999;38:15893
- Boyle WJ, et al. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337
- Bradstock KF, et al. Sub-population of normal and leukemic human thymocytes: an analysis with the use of monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:33
- Brodbeck WG. Et al. Lymphocytes and foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and function. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:222
- Brooks RA, et al. The effects of the concentration of high density polyethylene particles on the bone-implant interface. *J Bone Joint Surg Br* 200;82:595
- Brooks RA, et al. Endotoxin contamination of particles produces misleading inflammatory cytokine responses from macrophages in vitro. *J Bone Joint Surg* 2002;84B:295
- Brown KD, et al. Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J Biol Chem* 2002;277:19433
- Bucay N, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260
- Buckland J. Macrophages: bacterial defence. 2001;1:173
- Buly RL, et al. Titanium wear debris in failed cemented total hip arthroplasty. An analysis of 71 cases. *J Arthroplasty* 1992;7:315
- Burges TL, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527
- Burns K, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signalling. *J Biol Chem* 1998;273:12203
- Campbell P, et al. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* 1995;29:127
- Carlin et al. Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experimentia* 1989;45:535

Carmody E, et al. vIL-10 inhibits wear debris-induced cytokine production, osteoclastogenesis and bone resorption. *Trans Orthop Res Soc* 2002;27:5

Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem* 1987;56:881

Champagne CM, et al. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002;30:26

Giatromanolaki A, et al. Upregulated hypoxia inducible factor-1 α and 2 α pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R193

Chiba J, et al. The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;300:304

Childs LM, et al. Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 2001; 16:338

Childs LM, et al. In vivo RANK signaling blockade using the receptor activator of NF-KAPPA β :Fc effectively prevents and ameliorates wear debris-induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2002;17:192

Cho DR, et al. The role of adsorbed endotoxin in particle induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res* 2002;20:704

Clark MT et al. Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 2004:132

Clohisy JC, et al. RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* 2003;21:202

Clohisy JC, et al. NF-kB blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* 2004;22:13

Clohisy JC, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates polymethylmethacrylate particle-induced NF-kB activation in osteoclast precursor cells. *J Orthop Res* 2002;20:174

Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005:7-11

Costerton JW. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318

Cristenson EM, et al. Biostability and macrophage-mediated foreign body reaction of silicone-modified polyurethanes. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:141

- Crotti TN, et al. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF- κ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* 2004;25:565
- Crowther M, et al. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001;70:478
- Cupurdija et al. Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *AJRI* 2004;51:117
- Cutolo M, et al. Evidence for the presence of androgen receptors in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Arthritis Rheum* 1992;35:1007
- Dai S, et al. The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J Biol Chem* 2004;279:37219
- Dalton DK, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993;259:1793
- Daniels AU, et al. Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000;49:469
- Darnay BG, et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273:20551
- David JP, et al. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and in-dependent mechanisms. *J Cell Sci* 2002;115:4317
- Davies AP, et al. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissue around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:18
- Decker T, et al. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:121
- DeFife K, et al. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J Immunol* 1997;158:3385
- DeFife K, et al. Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. *J Histochem Cytochem* 1999;47:65
- Dehne & Brune. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res* xx (2009)xxx-xxx (article in press)
- DeHeer DH, et al. In situ complement activation by polyethylene wear debris. *J Biomed Mater Res* 2001;54:12

Delgado M, et al. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001;7:563

Demarchi F, et al. Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2001;276:31738

DeWaal Malefyt R, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915

Donlan RM et al. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167

Doorn PF, et al. Metal wear particle characterization from metal on metal hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles, *J Biomed Mater Res* 1998;42:103

Dorr LD, et al. Total hip arthroplasty with use of the Metasul metal on metal articulation. Four to seven-year results. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:789

Dougall WC, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412

Dowd JE, et al. Aseptic loosening in uncemented total hip arthroplasty in a canine model. *Clin Orthop* 1995;319:106

Dowd JE, et al. Characterization of long-term femoral-head-penetration rates. Association with and prediction of osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82:1102

Dunne WM et al. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155

Dunne & O'Neil. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defence. *Sci STKE* 2003;171:re3

Duran A, et al. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell* 2004;6:303

Edwards J.C.W.: The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J Anat* 1994; 184:493

Edwards J.C.W.: Fibroblast biology: Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:344

Elliot DM, et al. Joint degeneration following meniscal allograft transplantation in a canine model: mechanical properties and semiquantitative histology of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002;10:109

- Engl CA & Bobyn JD. The influence of stem size and extend of porous coating on femoral bone resorption after primary cementless hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1988;231:7
- Engl CA, et al. In vivo deterioration of tibial baseplate locking mechanisms in contemporary modular total knee components. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:1660
- Engl CA, et al. Conventional ultrahigh molecular weight polyethylene: a gold standard of sorts. *Instr Course Lect* 2005;54:183
- Epstein NJ, et al. Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation. *J Orthop Res* 2005;23:501
- Faber A, et al. Chronic antigen-specific immune-system activation may potentially be involved in the loosening of cemented acetabular components. *J Biomed Mater Res* 2001;55:433
- Falini ey al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;95:2084
- Felix R, et al. Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis. *Eur J Endocrinol* 1996;134:143
- Fell H.B., Glauert A.M., Barrat M.E.J., Green R.: The pig synovium. The intact synovium in vivo and in organ culture. *J Anat* 1976;122:663
- Fiorentino DF, et al. Two types of mouse T helper cell.IV.Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081
- Fiorentino DF, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444
- Fiorito S, et al. Pro-inflammatory and inflammatory circulating cytokines and periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:1202
- Fithian E, et al. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2541
- Fox S, et al. TGF-beta 1 and IFN-gamma direct macrophage activation by TNF-alpha to osteoclastic or cytosolic phenotype. *J Immunol* 2000;165:4957
- Franzoso G, et al. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997;11:3482
- Fryzek JP, et al. Incidence of cancer among patients with knee implants in Sweden, 1980-1994. *Cancer* 2002;94:3057

Frokjaer J, et al. Polyethylene particles stimulate monocyte chemotactic and activating factor production in synovial mononuclear cells in vivo. An immunohistochemical study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1995;66:303

Frokjaer J, et al. Failure of migration by injected polyethylene particles around press fit implants: an experimental study in rabbits. *Hip International* 1999;9:173

Fuller K, et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998;188:997

Ganea D & Delgado M. Inhibitory neuropeptide receptors on macrophages. *Microbes Infect* 2001;3:141

Garin et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 2001;152:165

Gessani S & Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:117

Ghadially F.N.: Fine structure of synovial joints. Butterworth, London, 1983

Ghadially F.N., Lalonde J-M.A. Dick C.E.: A mechanism of formation of desmosome-like structures between synovial intimal cells. *Experientia* 1978;34:1212

Charlebois S, et al. Metabolic heat production as a measure of macrophage response to particles from orthopaedic implant materials. *J Biomed Mater Res* 2002;59:166

Glant TT, et al. Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 1994;12:720.

Glant TT, et al. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J Bone Miner Res* 1993;8:1071

Clohisy et al. NF- κ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteolysis. *J Orthop Res* 2004;22:13

Goater JJ, et al. Efficacy of ex vivo OPG gene therapy in preventing wear debris induced osteolysis. *J Orthop Res* 2002;20:169.

Golab J, et al. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18-a bridge too far? *Immunol Lett* 2000;72:153

Goldring SR, et al. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65:575

Goldring SR, et al. Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis Rheum* 1986;29:836

- Gonzalez O, et al. Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res* 1996;30:463
- Goodman SB, et al. The histological effects of the implantation of different sizes of polyethylene particles in the rabbit tibia. *J Biomed Mater Res* 1990;24:517
- Goodman SB, et al. Prostaglandin E2 production by the membrane surrounding loose and fixated cemented tibial hemiarthroplasties in the rabbit knee. *Clin Orthop Relat Res* 1992;284:283.
- Goodman S, et al. T-lymphocytes are not necessary for particulate polyethylene-induced macrophage recruitment: histologic studies of the rat tibia. *Acta Orthop Scand* 1994;65:157
- Goodman SB, et al. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation. Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthop Scand (Suppl 258)* 1994;65:1
- Goodman S, et al. Tissue ingrowth and differentiation in the bone-harvest chamber in the presence of cobalt-chromium-alloy and high-density-polyethylene particles. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1025
- Goodman SB, et al. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces: study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:531.
- Goodman SB, et al. Effects of TGFbeta on bone ingrowth in the presence of polyethylene particles. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:1069
- Cooperstock MS, et al. Possible pathogenic role of endotoxin in Reye's syndrome. *Lancet* 1975;1:1272
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111:927.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23
- Graabaek P.M.: Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane. *J Ultrastr. Res* 1982;78: 321
- Graabaek P.M.: Characteristics of the two types of synoviocytes in rat synovial membrane. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1984;50:690
- Graabaek P.M.: Fine structure of the lysosomes in the two types of synoviocytes of normal rat synovial membrane. A cytochemical study. *Cell Tiss Res* 1985;239 :293
- Graabaek P.M: Absorption of intraarticularly injected horse-radish peroxidase in synoviocytes of rat synovial membrane: An ultrastructural-cytochemical study. *J Ultrastr Res* 1985b;92: 86

Gracie JA, et al. A proinflammatory role of IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;104:1393.

Granchi D, et al. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:912.

Gravallese EM, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;43:250.

Green TR, et al. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 1998;19:2297.

Greenfield EM, et al. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res* 2002;20:1.

Gristina AG, et al. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:264

Groth H-P. Cellular contacts in the synovial membrane of the cat and the rabbit: An ultrastructural study. *Cell Tiss. Res* 1975;164: 525

Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991;47:87

Gupta et al. Lineage-specific modulation of Interleukin 4 signaling by Interferon Regulatory Factor 4. *J Exp Med* 1999;190:1837

Hallab N, et al. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:428

Hallab N, et al. Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2005 ;23 :384

Harris WH, et al, Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:612

Hart AJ, et al. The association between metal ions from hip resurfacing and reduced T-cell counts. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88:449

Hatton A, et al. Alumina-alumina artificial hip joints. Part I: a histological analysis and characterization of wear debris by laser capture microdissection of tissues retrieved at revision. *Biomaterials* 2002;23:3429

Hatton A, et al. Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF-alpha production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *Biomaterials* 2003;24:1193

Haynes DR, et al. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:825

- Hayden MS, et al. Shared principles in NF-kappaB signalling. *Cell* 2008;132:344
- Haynes DR, et al. Variation of cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin Orthop Relat Res* 1998;352:223
- Haynes DR, et al. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:902
- Haynes DR, et al. Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. *Biomaterials* 2004;25:4877
- He KL & Ting AT. A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor I complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:6034
- Hellman C, et al. Down-regulated IL-5 receptor expression on peripheral blood eosinophils from budesonide-treated children with asthma. *Allergy* 2002;57:323
- Henderson B., Pettipher E.R.: The synovial lining cell: biology and pathobiology. *Semin Arth Rheum* 1985;15: 1
- Hendrix RW, et al. Arthrography after total hip arthroplasty: a modified technique used in the diagnosis of pain. *Radiology* 1983;148:647
- Herman JH, et al. Polymethylmethacrylate induced release of bone-resorbing factors. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:1530
- Hernigou P, et al. Interleukin-6 in the blood of patients with total hip arthroplasty without loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1999;366:147
- Higuchi F, et al. Metal-on-metal CoCrMo McKee-Farrar total hip arthroplasty: characteristics from a long-term follow-up study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116:121
- Hitchins VM, et al. Decontaminating particles exposed to bacterial endotoxin (LPS). *J Biomed Mater Res* 1999;46:434
- Ho M, et al. Mac-2, a novel 32,000Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982;128:1221
- Hoebe et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003;424:743
- Hofbauer LC, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2
- Hofbauer LC, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367

Holness & Simmons. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. 1993;81:1607

Horiki M, et al. Localization of RANKL in osteolytic tissue around a loosened joint prosthesis. J Bone Miner Metab 2004;22:346

Horkey D.: Ultrastructure of the bovine synovial membrane in ontogenesis. Acta Vet Brno. 1984;53: 107

Horowitz SM, et al. Pharmacologic inhibition of particulate-induced bone resorption. J Biomed Mater Res 1996;31:91

Howie DW, et al. A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. J Bone Joint Surg Am 1988;70:257

Howie DW, et al. The response to particulate debris. Orthop Clin North Am 1993;24:571

Hsu H, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:3540

Huang S, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 1993;259:1742

Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. Biochimie 2001;83:667

Huo MH, et al. Metallic debris in femoral endosteolysis in failed cemented total hip arthroplasties. Clin Orthop 1992;276:157

Iida et al. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. Nat Genet 1997;17:226

Inada K, et al. Establishment of a new perchloric acid treatment method to allow determination of the total endotoxin content in human plasma by the limulus test and clinical application. Microbiol Immunol 1991;35:303

Ince A, et al. 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

Ingham E, et al. Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. Biomaterials 200;21:1005

Inoue J, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. Exp.Cell Res 2000;254:14

- Inufusa H, et al. Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int J Oncol* 2001;19:913
- Iotsova V, et al. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 1997;3:1285
- Ishiguro N, et al. Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components. *J Biomed Mater Res* 1997;35:399
- Ito A, et al. In-vitro evaluation of the cytocompatibility of wear particles generated by UHMWPE/zirconia friction. *Cin Mater* 1993;12:203
- Jacobs JJ, et al. Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1447
- Jacobs JJ, et al. Metal degradation products: a cause for concern in metal-metal bearings. *Clin Orthop Relat Res* 2003;417:139
- Jacobsson SA, et al. Twenty-year results of McKee-Farrar versus Charnley prosthesis. *Clin Orthop* 1996;(329 Suppl):S60
- Janssens & Beyaert. A universal role of MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 2002;27:474
- Jantsch S, et al. Long-term results after implantation of McKee-Farrar total hip prostheses. *Arch Orthop Trauma Surg* 1991;110:230
- Jasty MJ, et al. Localized osteolysis in stable, non-septic total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 1986;68:912
- Jasty M, et al. The initiation of failure in cemented femoral components of hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:551
- Jilani M., Ghadially F.N.: An ultrastructural study of age-associated changes in the rabbit synovial membrane. *J Anat* 1986;146: 201
- Jiranek W, et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components: analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:863
- Jiranek W, et al. Tissue response to particulate polymethylmethacrylate in mice with various immune deficiencies. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1650
- Johansson H.-E., Rejno S.: Light and electron microscopic investigation of equine synovial membrane. *Acta Vet Scand* 1976;17: 153
- Jones LC & Hungerford DS. Cement disease. *Clin Orthop* 1987;225:192

- Juo P, et al. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998;8:1001
- Jutras I & Desjardins M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:511
- Kaar SG, et al. Rapid repair of titanium particle-induced osteolysis is dramatically reduced in aged mice. *J Orthop Res* 2000;18:849
- Kaiso et al. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:5688
- Kalebo P, et al. Temporary bone tissue ischemia in the hind limb of the rabbit. A vital microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1986;105:321
- Kanangat S, et al. Enhanced extracellular growth of *Staphylococcus aureus* in the presence of selected linear peptide fragments of human interleukin (IL)-1 β and IL-1 receptor antagonist. *J Infect Dis* 2001;183:65
- Kanazawa K, et al. TRAF5 functions in both RANKL- and TNF α -induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2003;18:443
- Kanazawa K, et al. TRAF2 is essential for TNF- α -induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2005;20:840
- Kanis JA, et al. Bone and cancer: pathophysiology and treatment of metastases. *Bone* 1995;17(suppl):S101
- Karin M, et al. NF- κ B at the cross-roads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221
- Kawai et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115
- Kerr MA, et al. The role of CD15-Le(X)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem* 1992;24:811
- Kido A, et al. Protease expression in interface tissues around loose arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 2004;425:230
- Kiener PA, et al. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* 1995;155:4917
- Kim KJ, et al. A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 1993;287:142
- Kim KJ, et al. Osteolysis model with continuous infusion of polyethylene particles. *Clin Orthop* 1998;352:46

- Kitamura H.P., Yanase H., Kitamura H., Iwanaga T. Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joint of horse. *J Histochem. Cytochem* 1999; 47 : 343
- Kobayashi N, et al. Segregation of TRAF6-mediated signalling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO* 2001;20:1271
- Kobayashi N, et al. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* 2003;19:353
- Kong YY, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304
- Kong YY, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315
- Koseki T, et al. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell Signal* 2002;14:31
- Kotake S, et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:1003
- Kottinen YT, et al. Cytokines in aseptic loosening of total hip replacement. *Curr Orthop* 11:40
- Kottinen YT, et al. Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacements prosthesis. *J Bone Miner Res* 2001;16:1780
- Krey P.R., Cohen A.S., Fine structural analysis of rabbit synovial cells. The normal synovium and changes in organ culture. *Arthritis Rheum* 1973;16: 324
- Kraemer WJ, et al. Migration of polyethylene wear debris in hip arthroplasties: a canine model. *J Appl Biomater* 1995;6:225
- Kudo et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing of human placenta. *J Reproductive Immunol* 2004;61:87
- Kwiatkowska K & Sobota A. Signalling pathways in phagocytosis. *Bioassays* 1999;21:422
- Labow RS, et al. Polycarbonate-urethane hard segment type influences esterase substrate specificity for human macrophage-mediated biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005;16:1167
- Lacey DL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165
- Lam KH, et al. The effect of phagocytosis of poly(L-lactic acid) fragments on cellular morphology and viability. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1569

- Lammas DA, et al. Heterogeneity in the granulomatous response to mycobacterial infection in patients with defined genetic mutations in the interleukin 12-dependent interferon-gamma production pathway. *Int J Exp Pathol* 2002;83:1
- Lalor PA, et al. Migration of polyethylene particles around stable implants in an animal model. *J Long Term Eff Med Implants* 1999;9:261
- Landy MM, et al. Wear of ultra-high-molecular-weight polyethylene components of 90 retrieved knee prostheses. *J Arthroplasty (Suppl)* 1998;3:73
- Langkamer VG, et al. Tumors around implants. *J Arthroplasty* 1997;12:812
- Lark MW, et al. Antagonism of the osteoclast vitronectin receptor with an orally active non-peptide inhibitor prevents cancellous bone loss in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 2001;16:319
- Lark MW, et al. A potent small molecule, nonpeptide inhibitor of cathepsin K (SB 331750) prevents bone matrix resorption in the ovariectomized rat. *Bone* 2002;30:746
- Lassus J, et al. Macrophage activation results in bone resorption. *Clin Orthop* 1998;352:7
- Lassus J, et al. Increased interleukin-8 (IL-8) expression is related to aseptic loosening of total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120:328
- Leach D.H., Caldwell S.J., Ferguson J.G.: Ultrastructural study of synovial membrane from the antebrachioacarpal joint of calves. *Acta Anat* 1988;133: 234
- Lee DH, et al. Synergistic induction of cyclooxygenase-II by bacterial lipopolysaccharide in combination with particles of medical device materials in a murine macrophage cell line J774A.1. *J Biomed Mater Res* 2001;55:547
- Lennon AB, et al. Evaluation of cemented orthopaedic implants. *J Biomech Eng* 2001;123:623
- Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res* 1997;38:155
- Lewis G. Properties of crosslinked ultra-high-molecular-weight polyethylene. *Biomaterials* 2001;22:371
- Li J, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1566
- Li TF, et al. No lymphokines in T-cells around loosening hip prostheses. *Acta Orthop Scand.* 2001;72:241-247.
- Liew FY, et al. Role of interleukin 18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(suppl 2):ii48

- Linck G., Porte A. B-cells of the synovia; membrane. A comparative study in some mammals. *Cell Tiss Res* 1978;187: 251
- Linck G & Porte A. B-cells of the synovial membrane. Ultrastructural evidence of secretory variations in hypophysectomized or propylthiouracil-treated mice. *Cell Tiss Res* 1981;218: 123
- Linckhart TA, et al. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19:1S
- Linder L. Implant stability, histology, RSA and wear—more critical questions are needed. A view point. *Acta Orthop Scand* 1994;65:654
- Lohmann CH, et al. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. *Biomaterials*. 2002;23:1855-1863.
- Lohmann CH, et al. Phagocytosis of wear debris by osteoclasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials* 2000;21:551
- Lomaga MA, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015
- Lombardi AV, et al. Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:1337
- Lu J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002;63:408
- Lu Z & McKellop H. Effects of cement creep on stem subsidence and stresses in the cement mantle of a total hip replacement. *J Biomed Mater Res* 1997;34:221
- Lum L, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-converting enzyme like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*. 1999;274:13613
- Ma J. et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2334
- MacEwan MR, et al. Monocyte/lymphocyte interactions and the foreign body response: in vitro effects of biomaterial surface chemistry. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:285
- MacKinnon et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 2008;180:2650
- Malone et al. Interferon gamma induces production of indoleamine 2,3 dioxygenase in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 1994;21:1011

Maloney WJ, et al. Isolation and characterization of wear debris generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am* 1994;77:1301

Maloney WJ, et al. Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate debris. *Instr Course Lect* 1996;45:171

Maloney WJ, et al. Skeletal response response to well fixed femoral components inserted with and without cement. *Clin Orthop* 1996;333:15

Maloney WJ, et al. Effects of serum protein opsonization on cytokine release by titanium-alloy particles. *J Biomed Mater Res* 1998;41:371

Mandelin J, et al. Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:1196

Manlapaz M, et al. In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *J Orthop Res* 1996;14:465

Manolagas SC, et al. Bone marrow, cytokines, and bone remodelling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305

Margevicius KT, et al. Isolation and characterization of debris from around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:1664

Margolis B, et al. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGFR signalling. *Cell* 1989;57:1101

Mariani BD, et al. Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 1996;331:11

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75

Martin SF. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134:186-198.

Matsumoto M, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *J Biol Chem* 2000;275:31155

Matthews JB, et al. Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *J Biomed Mater Res A* 2000;52:296

McGregor DB, et al. Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies. A report of an IARC Monographs Programme Meeting. International Agency for Cancer Research on Cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:307

- McKellop H, et al. In vivo wear of three types of metal on metal hip prostheses during two decades of use. *Clin Orthop* 1996;(329 Suppl):S128
- McLaughlin RA, et al. Interleukin -1 β induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. *Microb Pathog* 2006;41:67-79.
- McNally AK, et al. Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity. *Am J Pathol* 1996;149:975
- McNally AK, et al. Beta 1 and beta 2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. *Am J Pathol* 2002;160:621
- Meduri GU, et al. Cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α enhance in vitro growth of bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:961-967.
- Meldrum DR, et al. Adaptive and maladaptive mechanisms of cellular priming. *Ann Surg* 1997;226:587
- Merkel KD, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 1999;154:203
- Meylan E, et al. RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 2002;3:1201
- Micklem et al. A human macrophage-associated antigen CD68 detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1989;73:6
- Miller L & Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 1996;59:1
- Millet PJ, et al. Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:236
- Mirra JM, et al. The pathology of failed total joint arthroplasty. *Clin Orthop* 1982;170:175
- Miyanishi K, et al. Periprosthetic osteolysis: induction of vascular endothelial growth factor from human monocyte/macrophages by orthopaedic biomaterial particles. *J Bone Miner Res* 2003;18:1573.
- Mizuno A, et al. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) gene and its expression in embryogenesis. *Gene* 1998;215:339.
- Mjoberg B. Theories of wear and loosening in hip prostheses. Wear-induced loosening vs loosening-induced wear-a review. *Acta Orthop Scand* 1994;65:361
- Mokhtar N, et al. Lymphoid and epithelial components mirror the phenotype of normal thymus. *Hum Pathol* 1984;15:378

Mombaerts P, et al. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274

Moodley Y, et al. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 2003;162:771

Morishita M, et al. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periontol* 1999;70:757

Mostov K, et al. Journey across the osteoclast. *Science* 1997;276:219

Moutsatsos IK, et al. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6452

Muller U, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defence. *Science* 1994;264:1918

Munder M, et al. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998;187:2103

Mundy G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946

Murphy GF, et al. Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab Invest* 1981;45:465

Murphy GF, et al. Distribution of cell surface antigens in histiocytosis X cells: quantitative immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *Lab Invest* 1983;48:90

Murray DW, et al. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:988

Naito A, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signaling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 1999;4:353

Najagawa N, et al. RANK is the essential signalling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:395

Nakashima Y, et al. Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:694-700.

Nakashima Y, et al. Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:155

Nakashima Y, et al. Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:603

Nakayama F, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3 fucosyltransferase IV. *J Biol Chem* 2001;276:16100

Neale SD & Athanasou NA. Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. *Acta Orthop Scand* 1999;70:452

Neale SD, et al. Human bone-derived cells support formation of human osteoclasts from arthroplasty-derived cells in vitro. *J Bone Surg* 2000;82B:892

Neidhart M, et al. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1873

Nishihira J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) : its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann New York Acad Sci* 2003;995:171

Nishijima T. The fine structure of the synovial membrane of the knee joint in rats with special reference to regional differences. *J Jap Orthop Ass* 1981;55:601

Nivbrant B, et al. Cytokine levels in synovial fluid from hips with well-functioning or loose prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:163

Nuno N, et al. Modelling debonded stem-cement interface for hip implants: effect of residual stresses. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2002;17:41

Oh I, et al. Proximal strain distribution in the loaded femur. An in vitro comparison of the distributions in the intact femur and after insertion of different hip-replacement femoral components. *J Bone Joint Surg Am* 1978;60:75

Okamura H, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995;378:88

Okamura H, et al. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998;10:259

Okada Y., Nakanishi I., Kajikawa K.: Secretory granules of B-cells in the synovial membrane. An ultrastructural and cytochemical study. *Cell Tiss Res* 1981;216: 131

Okada Y., Nakanishi I., Kajikawa K.: Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 835

- Okazaki T, et al. Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial factor production in skeletal muscle and promotes tumorangiogenesis. *J Immunol* 2005;174:7531
- Oda et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C104
- O'Keefe RJ, et al. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in pigmented villonodular synovitis may mediate bone and cartilage destruction. *Iowa Orthop J* 1998;18:26
- O'Neil et al. The Toll-IL-1receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003;24:286
- Olee T, et al. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 1999;162:1096
- Oshiumi et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4:161
- Oswald IP, et al. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992;148:3578
- Palecanda A, et al. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med* 1999;189:1497
- Palmbos PL, et al. Macrophage exposure to particulate titanium induces phosphorylation of the protein tyrosine kinase lyn and the phospholipases Cgamma-1 and Cgamma-2. *J Orthop Res* 2002;20:483
- Park Y, et al. Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87A:1515
- Parks NL, et al. Modular tibial insert micromotion. A concern with contemporary knee implants. *Clin Orthop* 1998 ;356 :10
- Parwaresgh et al. Monocyte/macrophage reactive monoclonal antibody Ki-M6 recognizes an intracytoplasmic antigen. *Am J Pathol* 1986;125:141
- Pasparakis M, et al. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement in TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996;184:1397.
- Perkins et al. Distinct combinations of NF-kB subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:1529
- Petrova TV, et al. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4668

- Pfeilschifter J, et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002;23:90
- Phillips JM, et al. Macrophage adhesion on gelatin-based interpenetrating networks grafted with PEGylated RGD. *Tissue Eng* 2005;11:964
- Pioletti DP, et al. Gene expression analysis of osteoblastic cells contacted by orthopedic implant particles. *J Biomed Mater Res* 2002;61:408
- Polan ML, et al. Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 beta messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:1200
- Popoff SN, et al. Animal models of osteopetrosis: the impact of recent molecular developments on novel strategies for therapeutic intervention. *Mol Med Today* 1996;2:349
- Pu Z, et al. Distinct recognition by two subsets of T cells of an MHC class II-peptide complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8844
- Purdue PE, et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 2007;454:251
- Quinn JM, et al. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* 1998;62:527
- Quinn JM, et al. Fibroblastic stromal cells express receptor activator NF-kappaB ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2000;15:1459
- Rader CP, et al. Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J Arthroplasty* 1999;14:840
- Ragab AA, et al. Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res* 1999;17:803
- Ragab AA, et al. Stimulation of cytokine production by titanium wear particles is due to adherent endotoxin. *Trans Orthop Res Soc* 1998;23:355
- Rahbek O, et al. Sealing effect of hydroxyapatite coating: a 12-month study in canines. *Acta Orthop Scand* 2000;71:563
- Rahbek O, et al. Sealing effect of hydroxyapatite coating on peri-implant migration particles. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:441
- Raisz LG et al. Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor. *Endocrinology* 1980;107:270
- Rakshit DS, et al. Involvement of complement receptor 3 (CR3) and scavenger receptor in macrophage responses to wear debris. *J Orthop Res* 2006;24:2036

Rakshit DS, et al. Wear debris inhibition of anti-osteoclastogenic signaling by interleukin-6 and interferon-gamma: mechanistic insights and implications for periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:788

Rakshit DS, et al. Wear debris inhibition of anti-osteoclastogenic signaling by interleukin-6 and interferon-gamma: mechanistic insights and implications for periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:788

Ralston SH, et al. Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1990;5:983

Randal M & Kossiakoff AA. The structure and activity of a monomeric interferon-gamma: alpha-chain receptor signaling complex. *Structure (Camb)* 2001;9:155

Reddi AH. Bone morphogenesis and modeling: soluble signals sculpt osteosomes in the solid state. *Cell* 1997;89:159

Reinherz EL, et al. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocyte and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1588

Rezzonico R, et al. Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *Blood* 2000;95:3868

Rezzonico R, et al. Ligation of CD11b and CD11c beta(2) integrins by antibodies or soluble CD23 induces macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta production in primary human monocytes through a pathway dependent on nuclear factor-kappaB. *Blood* 2001;97:2932

Robertsson MW, et al. Human IgE-binding protein : a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry* 1990;29:8093

Robertsson O, et al. Intracapsular pressure and loosening of hip prostheses. Preoperative measurements in 18 hips. *Acta Orthop Scand* 1997;68:231

Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308

Rosen CJ, et al. The pathophysiology and treatment of postmenopausal osteoporosis: an evidence-based approach to estrogen replacement therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26:295

Roy S., Ghadially F.N.,:Ultrastructure of normal rat synovial membrane. *Ann Rheum Dis.* 1967;26: 26

Roy S., Ghadially F.N.,:Synthesis of hyaluronic acid by synovial cells.L *Pathol Bact.* 1967;93: 29-42.

Ruocco MG, et al. I κ B kinase (IKK) β , but not IKK α , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 2005;201:1677

Ryd L. Micromotion in knee arthroplasty. A roentgen stereophotogrammetric analysis of tibial component fixation. *Acta Orthop Scand (Suppl 220)* 1986;1-80

Ryd L. Roentgen stereophotogrammetric analysis of prosthetic fixation in the hip and knee joint. *Clin Orthop* 1992;(276):56

Ryd L & Linder L. On the correlation between micromotion and histology of the bone cement interface. Report of three cases of knee arthroplasty followed by roentgen stereophotogrammetric analysis. *J Arthroplasty* 1989;4:303

Sabokbar A, et al. Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 1995;10:810

Sabokbar A, et al. Osteoclastic differentiation by mononuclear phagocytes containing biomaterial particles. *Acta Orthop Trauma Surg* 1998;117:136

Sabokbar A, et al. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 1997;56:414

Sabokbar A, et al. Arthroplasty membrane-derived fibroblast directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res* 2005;23:511

Saika M, et al. 17 β -estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 2001;142:2205

Sandhu J, et al. The role of T cells in polyethylene particulate induced inflammation. *J Rheumatol* 1998;25:1794

Sainsbury JRC, et al. Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985;i:364

Saito et al. A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J Biol Chem* 1993;268:15496

Saito et al. Mechanism of delayed increase in kynurenine pathway metabolism in damaged brain regions following transient cerebral ischemia. *J Neurochem* 1993;60:180

Saito et al. Early increases in TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett* 1996;206:149

Sano H, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000;165:2156

- Santavirta S, et al. Aggressive granulomatous lesions in cementless total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:980
- Schlessinger J, et al. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1983;14:93
- Schlessinger J, et al. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rpts* 1984;8:649
- Schmalzried TP, et al. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty: polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:849
- Schmalzried TP, et al. The mechanism of loosening of cemented acetabular components in total hip arthroplasty. Analysis of specimens retrieved at autopsy. *Clin Orthop* 1992;274:60
- Schmalzried TP, et al. Autopsy studies of the bone-cement interface in well fixed cemented total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 1993;8:179
- Schmalzried TP, et al. Long duration metal-on-metal total hip arthroplasties with low wear of the articulating surfaces. *J Arthroplasty* 1996;11:322
- Schmalzried TP, et al. The role of access of joint fluid to bone in periarticular osteolysis. A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:447
- Schmalzried TP, et al. The John Charnley Award. Wear is a function of use, not time. *Clin Orthop* 2000;(381):36
- Schwarz EM, et al. NF-kB and TNF-alpha are stimulated by titanium particles and are essential for in vitro bone resorption. *Trans Orthop Res Soc.* 1999;24:paper No.305.
- Schwarz EM, et al. Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 2000;18:472
- Schwarz EM, et al. Use of volumetric computerized tomography as a pre- or periprosthetic osteolysis: a 1-year clinical pilot of etanercept vs. placebo. *J Orthop Res* 2003;21:1049
- Schwarz EM, et al. Breakthrough in bone: the molecular mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed. *Curr Opin Orthop* 2000;11:329
- Selvik G. Roentgen stereophotogrammetry. A method for the study of the kinematics of the skeletal system. *Acta Orthop Scand (Suppl 232)* 1989:1-51
- Skoglund B, et al. Bone-resorptive effects of endotoxin-contaminated high-density polyethylene particles spontaneously eliminated in vivo. *J Bone Joint Surg* 2002;84B:767
- Schroeksnadel et al. Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006;25:334

- Schwarz EM, et al. Quantative small-animal surrogate to evaluate drug efficacy in preventing wear debris-induced osteolysis. *J Orthop Res* 2005;18:849
- Seabold JM, et al. Toll-like receptor 4 mediates osteolysis induced by titanium particles in mice. *Trans Orthop Res Soc* 2002;27:1061
- Seabold JM, et al. Systemic endotoxin and titanium-induced osteolysis. *Trans Orthop Res Soc* 2003;28:285
- Seabold JM, et al. Endotoxin accumulation during polyethylene (PE) induced osteolysis in murine calvaria. *Trans Orthop Res Soc* 2004;29:1515
- Seitz M, et al. Enhanced prostanoid release from monocytes of patients with rheumatoid arthritis and active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1985;44:438
- Sethi RK, et al. Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE. *Biomaterials* 2003;24:2561
- Shakespeare WC, et al. Novel bone-targeted Src tyrosine kinase inhibitor drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2003;6:729
- Shanbhag AS, et al. Cellular mediators secreted by interfacial membrane obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 1995;10:498
- Shanbhag AS, et al. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res* 1994;28:81
- Shanbhag AS, et al. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1994;76:60
- Shanbhag AS, et al. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop Relat Res* 1997;334:33
- Shannon S.L., Graham R.C.: Protein uptake by synovial cells. Ultrastructural study of the fate of intraarticularly injected peroxidases. *J Histochem Cytochem* 1971;19: 29
- Shively J.A., Van Sickle D.C.: Scanning electron microscopy of equine synovial membrane. *Am J Vet Res* 1977;38: 681
- Shu U, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* 1995;25:1125
- Signorello LB, et al. Nationwide study of cancer risk among hip replacement patients in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1405
- Simonet WS, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309

- Singh J.A. Arayssi T., Duray P., Schumacher H.R.: Immunohistochemistry of normal knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis* 2004;63: 785
- Skoglund B, et al. Bone-resorptive effects of endotoxin-contaminated high density polyethylene particles spontaneously eliminated in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2002 ;84 :767
- Schart DH, et al. Relationship of acetabular wear to osteolysis and loosening in total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1999;(363):135
- Soballe K, et al. Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J Orthop Res* 1992;10:285
- Solheim E, et al. Biocompatibility and effect on osteogenesis of poly(orthoester) compared to poly(DL-lactic acid). *J Biomed Mater Res* 2000;49:257
- Southwick W.O., Bensch K.G., :Phagocytosis of colloidal gold by cells of synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 1971;53-A:729
- Spector M, et al. Tissue changes around loose prostheses. A canine model to investigate the effects of an anti-inflammatory agent. *Clin Orthop Relat Res* 1990;261:140
- Stea S, et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine* 2000;12:1575
- Stock M, et al. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* 2003;278:17360
- Stoll S, et al. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 1998;28:3231
- Stoll S, et al. Production of IL-18 (IFN-gamma inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* 1997;159:298
- Suh KT, et al. The role of inducible nitric oxide synthase in aseptic loosening after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:753
- Sun DH, et al. Human serum opsonization of orthopaedic biomaterial particles: protein-binding and monocyte/macrophage activation in vitro. *J Biomed Mater Res*;65A:290
- Sundfeldt M, et al. Effect of submicron polyethylene particles on an osseointegrated implant: an experimental study with a rabbit patello-femoral prosthesis. *Acta Orthop Scand* 2002;73:416
- Sundfeldt M, et al. Long-term results of a cementless knee prosthesis with a metal-backed patellar component: clinical and radiological follow-up with histology from retrieved components. *J Long Term Eff Med Implants* 2003;13:341

- Sutterwala FS, et al. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 1997;185:1977
- Syed F, et al. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:688
- Takahashi N, et al. A new treatment for osteoporosis using fully human monoclonal antibody to RANKL, AMG 162. *Clin Calcium* 2005;14:43
- Takayanagi H, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744
- Takebe J, et al. Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:207
- Takei I, et al. Messenger ribonucleic acid expression of 16 matrix metalloproteinases in bone-implant interface tissues of loose artificial joints. *J Biomed Mater Res.* 2000;52:613-620.
- Taki N, et al. Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms. *J Orthop Res* 2005;23:376
- Takikawa et al. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3 dioxygenase. *J Biol Chem* 1986;261:3648
- Tanaka R, et al. Serum interleukin 8 levels in patients with aseptic loosening of hip prosthesis. *J Arthroplasty* 2005;20:1049
- Teitelbaum SI. The osteoclast and osteoporosis. *Mt Sinai J Med.* 1996;63:399-402.
- Thadani PJ, et al. Inhibition of particulate debris-induced osteolysis by alendronate in a rat model. *Orthopedics* 2002;25:59
- Theill LE, et al. RANKL and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795
- Thomassen MJ & Kavuru MS. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1479
- Topoleski LD, et al. Microstructural pathway of fracture in poly(methyl methacrylate) Bone cement. *Biomaterials* 1993;14:1165
- Tschopp J, et al. Apoptosis: silencing the death receptors. *Curr Biol* 1999;9:R381
- Tsuboi et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000;14:449
- Tunney MM, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:568-572.

Tunney MM, et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999;37:3281

Udagawa N, et al. Interleukin18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 1997;185:1005

Ulrich-Vinther M, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. *J Bone Jt Surg Am* 2002;84-A:1405

Underhill DM & Ozinsky Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002;20:825

Van de Rijn M, et al. The thymic differentiation markers T6 and M241 are two unusual MHC class I antigens. *J Immunol* 1983;131:851

Van der Valk P, et al. Analysis of lymphoid and dendritic cells in human lymph node, tonsil and spleen. *Virchows Arch {Cell Pathol}* 1984;45:169

Van Der Vis HM, et al. Benign cellular responses in rats to different wear particles in intra-articular and intramedullary environments. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:837

Van Der Vis HM, et al. Short periods of oscillating fluid pressure directed at a titanium-bone interface in rabbits leads to bone lysis. *Acta Orthop Scand* 1998;69:5

Vermes C, et al. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:201

Vermes C, et al. Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappaB, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2000;15:1756

Vignery A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 2000;81:291

Visentin L, et al. A selective inhibitor of the osteoclastic V-H(+)-ATPase prevents bone loss in both thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest* 2000;106:309

Von Knoch F, et al. The effect of simvastatin on polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 2005;26:3549

Visuri T. Long-term results and survivorship of the McKee-Farrar total hip prosthesis *Arch Orthop Trauma Surg* 1987;106:368

Visuri T, et al. Decreased cancer risk in patients who have been operated on with total hip and knee arthroplasty for primary osteoarthritis: a meta-analysis of 6 Nordic cohorts with 73,000 patients. *Acta Orthop Scand* 2003;74:351

Wajant H & Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:19

Wang ML, et al. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2002;20:1175

Warashima H, et al. Biological reaction to alumina, zirconia, titanium and polyethylene particles implanted onto murine calvaria. *Biomaterials* 2003;24:3655

Warme BA, et al. Proinflammatory mediator expression in a novel murine model of titanium-particle-induced intramedullary inflammation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;71:360

Wei S, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:282

Wei S, et al. Fibroblasts express RANKL and support osteoclastogenesis in a COX-2-dependent manner after stimulation with titanium particles. *J Bone Miner Res* 2005;20:1136

Weiss ML, et al. Leu-6-expressing cells in lymph nodes: dendritic cells phenotypically similar to interdigitating cells. *Hum Pathol* 1986;17:179

Wikstrand CJ, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Canc Res* 1995;55:3140

Wilkinson L.S., Pitsillides A.A., Worrall J.G., Edwards J.C.W.: Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum* 1992;35: 1179

Wilkinson L.S., Pitsillides A.A., Worrall J.G., Edwards J.C.W.: Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum* 1992 ;35: 1179

Willert HG. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1977;11:157

Willert HG, et al. Wear behaviour and histopathology of classic cemented metal on metal hip endoprostheses. *Clin Orthop* 1996;(329 Suppl):S160

Willert HG, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:28

Wimhurst JA, et al. Inflammatory responses of human primary macrophages to particulate bone cements in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:278

Wong BR, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355

Wong BR, et al. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999;65:71

Wooley PH, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials* 2002;23:517

Wooley PH & Schwarz EM. Aseptic loosening. *Gene Therapy* 2004;11:402

Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med* 1999;189:605-609

Xia Z, et al. Macrophages in degradation of collagen/hydroxyapatite (CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An in vivo study. *Chin Med J (Engl.)* 1994;107:845

Xia Z, et al. Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res A* 2004;71:538

Xing S, et al. Changes in macrophage morphology and prolonged cell viability following exposure to polyethylene particulate in vitro. *Microsc Res Tech* 2002;57:523

Xu D, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:282

Xu JW, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR). *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:643

Yagil-Kelmer E, et al. Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to different sizes of alumina ceramic particles. *J Orthop Res* 2004;22:832

Yang RY, et al. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;25:6737

Yang S, et al. IL-1RA and vIL-10 gene transfer using retroviral vectors ameliorates particle-associated inflammation in the murine air pouch model. *Inflamm Res* 2002;51:342

Yang SY, et al. Diverse cellular and apoptotic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation. *Biomaterials* 2002;23:3535

Yang SY, et al. Protective effects of IL-1RA and vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis. *Gene Ther* 2004;11:483

Yao J, et al. The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis : fibroblast response to titanium particles. 1995 ;10 :1417

Yao J, et al. Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:107

Yasuda H, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597

Yasuda H, et al. Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329

Yaszay B, et al. Fibroblast expression of C-C chemokines in response to orthopaedic biomaterial particle challenge in vitro. *J Orthop Res* 2001;19:970

Yu X, et al. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004;19:2065

Zambonin G, et al. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro. *Calcif Tissue Int* 1998;62:362

Zhang X, et al. Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 2001;16:660

Zhang X, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signalling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:563

Zwerina J, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004;50:277

