



Ræsing og ferill bráðra bólguviðbragða

í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm

Óskar Örn Hálfðánarson



Líf- og umhverfisvísindadeild
Háskóli Íslands
2011

Ræsing og ferill bráðra bólguviðbragða

í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm

Óskar Örn Hálfánarson

12 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í líffræði

Leiðbeinendur
Björn Guðbjörnsson
Leifur Þorsteinsson
Hekla Sigmundsdóttir

Umsjónarkennari
Guðmundur Hrafn Guðmundsson

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, maí 2011

Ræsing og ferill bráðra bólguviðbragða
12 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í líffræði

Höfundarréttur © 2011 Óskar Örn Hálfðánarson
Öll réttindi áskilin

Líf- og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Askja, Sturlugata 7
101 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:
Óskar Örn Hálfðánarson, 2011, *Ræsing og ferill bráðra bólguviðbragða*, BS ritgerð, Líf-
og umhverfisvísindadeild, Háskóli Íslands, 33 bls.

Prentun: Háskólaprent
Reykjavík, maí 2011

Útdráttur

Þegar líkaminn verður fyrir skaðlegu áreiti bregst hann við með því að framkalla bólguvar. Við eðlilegt ástand þá hjaðnar bólgan að ákveðnum tíma liðnum en í einstaklingum sem glíma við króníska bólgusjúkdóma á borð við iktsýki og psoriasis viðhelst bólgan sem leiðir til þess sjúklega bólguástands sem einkennir þessa sjúkdóma. Það hefur reynst erfitt að kortleggja nákvæmlega ræsingu bólguferilsins í mönnum m.t.t. frumuboðefna og þeirra frumuhópa sem taka þátt í bólgusvarinu. Því hafa menn brugðið á það ráð að nota ýmis rannsóknarmódel til þess að rannsaka ræsingu ónæmiskerfisins í bólgusvari. Liðskiptaaðgerð á mjöðm er stöðluð valaðgerð sem framkallar kröftugt bólguvar og hefur því verið notuð sem módel við rannsóknir á ræsingu ónæmiskerfisins í bráðu bólgusvari. Markmið verkefnisins var að rannsaka ræsingu ónæmiskerfisins í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm m.t.t. valinna frumuhópa ónæmiskerfisins og viðloðunarsameinda á T-frumum. Það var gert með því að mæla tjáningu yfirborðssameinda á frumunum í frumuflæðisjá og heildarfjölda í sjálfvirku frumutalningartæki. 23 einstaklingar samþykktu þátttöku í rannsókninni. Tekin voru sýni á fjórum tímapunktum; fyrir aðgerð, 6 klst eftir aðgerð, 24 klst eftir aðgerð og 48 klst eftir aðgerð.

Helstu breytingarnar sem sáust voru á fjölda dauffrumna (e. neutrophils) sem jukust marktækt í kjölfar aðgerðar og náðu hámarki 6 klst eftir aðgerð. Sveiflur í fjölda annarra frumuhópa og viðloðunarsameinda voru mun hógværi sem bendir til þess að dauffrumur taki mestan þátt í því bráða bólgusvari sem verður í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm.

Abstract

Inflammation is the body's response to damage caused by mechanical injuries or microbial pathogens. In a normal inflammatory response the inflammation subsides after a while but in individuals who suffer from autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and psoriasis the inflammatory response is maintained which leads to the pathological condition that characterises these diseases. However, the picture of the initiation of the inflammatory response with regard to the cells of the immune systems and the cytokines they secrete is not well understood. Total hip replacement (THR) is a selective surgery that involves a powerful postoperative inflammatory response. By using THR as an inflammatory promoter it is possible to control the magnitude of the trauma as well as the time sequence. The objective of this project was to investigate the initiation of the early inflammatory response following THR with regard to specific cells of the immune system and adhesion molecules expressed on T-cells. The expression of specific receptor molecules was measured with a fluorescent-activated cell sorter (FACS) and the total number of cells in samples was measured with a Flow cytometer (Cell-Dyn 3200). 23 individuals agreed to participate in the study and four samples were collected; Pre-op, 6 hours post-op, 24 hours post-op and 48 hours post-op.

A significant increase was measured in the number of neutrophils following the surgery with a maximum peak 6 hours post-op. Fluctuation in the number of the other cell groups measured, as well as in the expression of adhesion molecules on T-cells, were much more modest. This indicates that neutrophils are the main participants in the acute inflammatory response that occurs following THR.

Efnisyfirlit

Myndir.....	vi
Töflur.....	vii
Skammstafanir.....	viii
Þakkir.....	ix
1 Inngangur.....	1
1.1 Ónæmiskerfið.....	2
1.1.1 Ónæmiskerfi mannsins.....	2
1.1.2 Náttúrulega ónæmiskerfið.....	2
1.1.3 Áunna ónæmiskerfið.....	3
1.1.4 Frumur ónæmiskerfisins.....	3
1.1.5 Skrið T-frumna til vefja.....	10
1.2 Bólga.....	11
1.2.1 Frumur í bólgusvari.....	11
1.2.2 Bólgumiðlar.....	11
1.2.3 Bólgusvarið.....	12
1.3 Fyrri rannsóknir.....	13
1.4 Slitgigt.....	14
1.5 Liðskiptaaðgerð á mjöðm.....	14
1.6 Frumuflæðisjá (FACS).....	15
1.7 Markmið rannsóknarinnar.....	16
2 Efni og aðferðir.....	17
2.1 Þátttakendur og sýnataka.....	17
2.2 Talning á heildarfjölda hvítra blóðkorna.....	17
2.3 Mótefnalitun fyrir yfirborðssameindum.....	18
2.4 Mæling á tjáningu yfirborðssameinda með frumuflæðisjá.....	19
2.5 Úrvinnsla gagna.....	19
3 Niðurstöður.....	21
3.1 Þátttakendur og sýnataka.....	21
3.2 Talning á heildarfjölda hvítra blóðkorna.....	21
3.3 Mæling á tjáningu yfirborðssameinda með frumuflæðisjá.....	23
3.1.1 Heildarfjöldi frumuhópa.....	23
3.1.2 Tjáning viðloðunarsameinda.....	24
4 Umræður.....	26
5 Ályktun.....	29
Heimildir.....	30

Myndir

Mynd 1. Proskunarferli blóðmyndandi frumna.....	4
Mynd 2. Hlutverk seytra mótefna	5
Mynd 3. T-frumu viðtakinn	6
Mynd 4. Virkni CD4 ⁺ og CD8 ⁺ frumna.....	7
Mynd 5. MHC II vefjaflokkasameindir binda mótefnavaka úr innanfrumublöðrum.....	8
Mynd 6. Smáætur aðgreinast í stórætur við skrið út í vefi	9
Mynd 7. Margvísleg áhrif frumuboðefna sem seytt er af stórætum.....	12
Mynd 8. Samanburður á heilbrigðum hnélið og hnélið með einkenni slitgigtar	14
Mynd 9. Liðskiptaaðgerð á mjöðm	15
Mynd 10. Frumufælðisjá	16
Mynd 11. Dæmi um niðurstöður talninga í Cell-Dyn 3200.....	18
Mynd 12. Sýnidæmi fyrir útreikninga á heildarfjölda frumna.....	20
Mynd 13. Brotfall þátttakenda úr rannsókninni	21
Mynd 14. Mat á samræmi milli mælinga í Cell-Dyn 3200 og MacsQuant Analyzer	22
Mynd 15. Heildarfjöldi CD3 ⁺ , CD4 ⁺ og CD8 ⁺ frumna	23
Mynd 16. Heildarfjöldi CD14 ⁺ , CD19 ⁺ , CD56 ⁺ og CD83 ⁺ frumna.....	24
Mynd 17. Tjáning CLA og CXCR6 á CD4 ⁺ og CD8 ⁺ frumum.....	24
Mynd 18. Tjáning CCR4, CCR7 og CXCR4 á CD4 ⁺ og CD8 ⁺ frumum.....	25

Töflur

Tafla 1. Mótefnin sem notuð voru í rannsókninni	18
Tafla 2. Samsetning mótefna í FACS keyrsluglösum.....	19
Tafla 3. Meðaltöl og staðalfrávik mælinga úr Cell-Dyn 3200).....	22

Skammstafanir

CRP	C–reactive protein
BCR	B-frumuviðtaki
MHC	Major histocompatibility complex
TCR	T-frumuviðtaki
CD	Cluster of differentiation
TNF	Tumor necrosis factor
IL	Interleukin
CXCL	Chemokine ligand
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
CR3	Complement receptor 3
LPS	Lipopolysaccharide
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CCR	C-C Chemokine receptor
CXCR	C-X-C Chemokine receptor
ROS	Reactive oxygen species
TGF	Transforming growth factor
IGF	Insulin-like growth factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
LSH	Landspítalinn

Þakkir

Verkefni á borð við þetta hefði ekki verið framkvæmanlegt án aðstoðar þeirra ótal mörgu aðila sem komu að vinnu verkefnisins á hinum ýmsu stigum þess.

Starfsfólk vöknunar og rannsóknarstofu LSH í Fossvogi fá kærar þakkir fyrir alla hjálpinu við sýnatökuna. Starfsfólk bæklunarskurðeilda B5 og B6 fá einnig þakkir fyrir veitta aðstoð.

Bestu þakkir fá Halldór Jónsson jr. og Rikka Mýrdal fyrir liðlegheitin og alla þá óeigingjörnu vinnu og aðstoð sem þau lögðu til verkefnisins.

Sérstakar þakkir fær Þórdís Emma Stefánsdóttir fyrir ómetanlega aðstoð og ráðleggingar. Sömuleiðis fær Íris Pétursdóttir þakkir fyrir alla hjálpinu og tilsögnina. Þeim báðum þakka ég góðan félagsskap á rannsóknarstofunni.

Guðmundur Hrafn Guðmundsson fær kærar þakkir fyrir veitta aðstoð.

Ég vil þakka Heklu Sigmundsdóttir kærlega fyrir tækifærið til þess að vinna verkefnið við fyrsta flokks aðstæður. Leifur Þorsteinsson fær einnig sérstakar þakkir fyrir alla þá óeigingjörnu aðstoð sem hann veitti; bæði við undirbúning verkefnisins og á meðan vinnu þess stóð. Fyrir endalausa þolinmæði, hjálp og ráðleggingar fá þau bæði mínar allra bestu þakkir.

Björn Guðbjörnsson fær einnig allar mínar bestu þakkir fyrir góð ráð og ómetanlega aðstoð í gegnum tíðina. Honum þakka ég einnig kærlega fyrir að gera mér kleift að öðlast reynslu af hinum ýmsu þáttum rannsóknarstarfsins með því að vinna verkefni á borð við þetta.

Fjölskyldu minni vil ég þakka fyrir alla hjálpinu og stuðninginn í gegnum tíðina.

Og síðast en ekki síst þakka ég Hugrúnu fyrir stuðninginn, hjálpinu og þolinmæðina á meðan vinnan við verkefnið og ritun þessarar ritgerðar fór fram.

1 Inngangur

Síðustu áratugi hafa orðið miklar framfarir á sviði ónæmisfræðinnar. Sá þekkingarauki sem hefur orðið til hefur meðal annars leitt til þróunar nýrra lyfja sem valdið hafa byltingu í meðferð sjúkdóma sem einkennast af truflunum í virkni og viðbrögðum ónæmiskerfisins. Þrátt fyrir það hefur reynst þrautin þyngrri að kortleggja ræsingu ónæmiskerfisins í mönnum með tilliti til bráðra bólguviðbragða. Rannsóknir á einstaklingum með bólgusjúkdóma eru þess eðlis að það er erfiðleikum háð að fylgjast með framþróun sjúkdómsferilsins frá upphafi. Það er vegna þess að þegar einstaklingur með einkenni bólgusjúkdóms kemst undir læknishendur þá hefur sjúkdómurinn oft á tíðum verið til staðar í þó nokkurn tíma. Af þessum sökum þurfa vísindamenn að styðja sig við ýmis rannsóknarmódel til að rannsaka ræsingu bráðra bólguviðbragða.

Liðskiptaaðgerð á mjöðm er valaðgerð sem hefur í för með sér kröftugt bólgusvar sem endurspeglast í marktækri hækkun á sökki og magni C-reactive proteins (CRP) í blóðvökva (Bjornsson et al. 2007, O. Bilgen et al. 2001, Laiho et al. 2001). Kostir þessara aðgerða eru þeir að mögulegt er að staðla aðgerðarferlið, auðvelt er að haga hlutunum þannig að allir einstaklingar sem gangast undir aðgerðina séu svæfðir á sama hátt, magni áreitis er stjórnað og áreitið sjálft er vel tímasett. Þetta gerir liðskiptaaðgerð á mjöðm að góðu módeli til rannsókna á ræsingu ónæmiskerfisins með tilliti til bráðra bólguviðbragða.

Slitgigt er sjúkdómur sem herjar á marga. Það sem skilur slitgigt frá mörgum öðrum gigtarsjúkdómum á borð við iktsýki og sóragigt er að þeir sjúkdómar einkennast af krónískum liðbólgu en slitgigt einkennist af eyðingu liðbrjóskis og hefur ekki verið talinn til kerfistengdra eða fjölkerfa bólgusjúkdóma. Af þeim sökum hefur það reynst mögulegt að fylgjast með ræsingu bráðra bólguviðbragða í slitgigtar-sjúklingum sem undirgangast liðskiptaaðgerðir á mjöðm. Slíkt væri ekki mögulegt í sjúklingum með króníska bólgusjúkdóma sökum þess að bólguferillinn í þeim sjúklingum er yfirleitt vel á veg kominn og sjúklingurinn með liðbólgujúkdóminn hefur sömuleiðis fengið meðferð með sjúkdómsdempandi lyfjum sem hafa bæði skammtíma og langtíma áhrif á bólguferilinn.

Vonir standa til að rannsóknir sem þessar auki þekkingu og bæti skilning manna á bólguferlinum; allt frá upphafi og ræsingu bólguviðbragða til þess tíma er bólgunni linnir og líkamsstarfsemi kemst í eðlilegt horf á ný. Þá er einnig áhugavert að skoða bólgusvarið með tilliti til þess sem fer úrskaiðis í sjúklingum sem þjást af sjálfsónæmissjúkdómum þar sem bólgan er viðvarandi og henni er beint gegn eigin sameindum líkamans. Hvað skyldi það vera sem verður til þess að bólgusvarið dempast af „sjálfsdáðum“ eða verður stjórnlaust og veldur langtíma langtíma bólgueinkennum?

Í kjölfar liðskiptaaðgerða á mjöðm fara í gang ógrynni lífefnafræðilegra ferla innan líkamans. Þeir verða vegna áhrifa áverkans sem aðgerðin veldur en einnig vegna undirliggjandi líkamlegra kvilla hvers sjúklings. Aukinn skilningur á þeim bólguferli sem fer í gang í kjölfar liðskiptaaðgerða á mjöðm getur leitt til bættrar meðferðar fyrir sjúklinga á tímanum eftir aðgerð og þannig stuðlað að betri líðan þeirra með tilliti til sársauka og sýkinga ásamt því að tryggja betri líftíma gerviliða.

1.1 Ónæmiskerfið

Ónæmiskerfið – vörn lífveru gegn utanaðkomandi skaðvöldum – er hugtak sem lýsir fjölbreyttu, flóknu og áhugaverðu líffræðilegu kerfi. Framfarir á sviði erfðatækni hafa leitt til raðgreininga á heilu erfðamengjum lífvera, allt frá plöntum (*Arapidopsis thaliana*) til spendýra (*Homo sapiens*, *Mus musculus*). Þær upplýsingar sem fengist hafa úr slíkum rannsóknum hafa gert vísindamönnum kleift að rekja þróunarsögu ónæmisfræðilegra ferla, allt frá fjarskyldustu ættingjum mannfólksins til náskyldari hryggdýra. Þær rannsóknir hafa leitt í ljós sameiginlega ferla sem taldir eru að hafi myndað grundvöll hins svokallaða **náttúrulega ónæmiskerfis** (e. *innate immunity*). Náttúruleg ónæmissvör eru til staðar í gríðarlegum fjölda lífvera, út í gegnum þróunartréð, og byggja á varnarferlum á borð við bakteríudrepani peptíð, sýklaát og kompliment kerfið. **Áunna ónæmiskerfið** (e. *adaptive immunity*), sem er til staðar í hryggdýrum, er talið hafa þróast í kjálkadýrum. Það kerfi byggir á áunnum ónæmisfræðilegum ferlum, sem fela í sér mun sérhæfðari varnir en náttúrulega ónæmiskerfið byggir á (Murphy, K et al. 2008).

1.1.1 Ónæmiskerfi mannsins

Ónæmiskerfi mannsins, líkt og annarra hryggdýra, má skipta niður í þau undirkerfi sem nefnd eru hér að ofan; náttúrulega og áunna ónæmiskerfið. Þó svo þessi kerfi séu ólík í eðli sínu þá vinna þau náið saman í átt að sama markmiði (Murphy, K et al. 2008).

Verkefni ónæmiskerfisins fela í sér að kerfið þarf að geta skynjað hvort sýking sé til staðar í líkamanum. Ef sýking er til staðar er nauðsynlegt að hindra útbreiðslu hennar með því að halda henni á upprunalega sýkingarstaðnum þar til henni hefur verið útrýmt. Þar koma til sögunnar ýmsir verkþættir ónæmiskerfisins á borð við kompliment kerfið, agnaát, eyðileggingarmátt hvíttra blóðkorna og framleiðslu mótefna. Ónæmisfræðilegt minni er sérstakur eiginleiki áunna ónæmiskerfisins sem leiðir til þess að líkaminn er verndaður gegn endurteknum sýkingum af völdum sömu sýkla og hann hefur komist í kynni við áður. Einn mikilvægasti eiginleiki ónæmiskerfisins snýr að stjórnun ónæmissvara. Ef sú stýring er ekki eðlileg getur það leitt til þess að líkaminn þekkir ekki muninn á utanaðkomandi sameindum og eigin sameindum. Það getur í framhaldinu leitt til þess að einstaklingur þrói með sér sjálfsonæmissjúkdóma á borð við psoriasis og iktsýki (Murphy, K et al. 2008).

1.1.2 Náttúrulega ónæmiskerfið

Náttúrulega ónæmiskerfið er breiðvirkt varnarkerfi gegn sýkingum sem byggir á ósérhæfðum ónæmissvörum. Sem dæmi um það hversu ósérhæfð starfsemi þessa kerfis er þá er oft talað um frumur húðarinnar sem framvarðarsveit þess. Ef húðin rofnar opnast leið fyrir utanaðkomandi sýkla inn í líkamann. Ákveðin hvít blóðkorn náttúrulega kerfisins hafa á yfirborði sínu viðtaka sem þekkja einkennandi örverusameindir eins og hluta úr bakteríuveggjum. Þessar sameindir verka sem efnatogar á átfrumur sem eru laðaðar að þeim svæðum þar sem húðin rofnaði. Þegar virkjaðar átfrumur koma á staðinn fara þær að seyta sínum eigin efnatogum í þeim tilgangi að laða enn fleiri hvít blóðkorn að sýkingarstaðnum. Þær frumur sem taka þátt í náttúrulegum ónæmissvörnum eru smáætur/stórætur, dauffrumur, sýrufrumur, basafrumur og mast-frumur (Murphy, K et al. 2008, Silverthorn 2010).

1.1.3 Áunna ónæmiskerfið

Ör þróun örvera leiðir til aukinnar hæfni þeirra til þess að yfirvinna náttúruleg ónæmissvör. Það leiðir til þess að þær geta haldið áfram að fjölga sér innan líkamans. Þar af leiðandi eru áunnin ónæmissvör nauðsynleg til þess að útrýma örverum og koma í veg fyrir endurteknar sýkingar seinna á æviskeiði einstaklings. Áunna ónæmiskerfið byggir á virkni eitilfrumna og hæfileikum þeirra til að þekkja sýkla í sundur. Slík virkni þrengir ónæmissvör þannig að þau verða sérhæf gegn þeim sýklum sem þarf að útrýma hverju sinni. Þessari sérhæfni er miðlað af viðtökum á yfirborði frumnanna sem þekkja ákveðna mótefnavaka. Meðal eitilfrumna er að finna gríðarlegan fjölbreytileika í gerð hinna sérhæfðu viðtaka. Talið er að á meðal þeirra billjón eitilfrumna sem hringsóla um líkamann á hverjum tíma þá megi ætíð finna frumu sem þekkir tiltekinn mótefnavaka. Eitilfrumum er skipt niður í tvo megin frumuflokka þar sem annars vegar er um T-frumur að ræða og hins vegar B-frumur. Virkni T-frumna stuðlar að frumubundnu ónæmissvari þar sem svarinu er beint gegn innanfrumusýklum eins og sveppum, veirum og bakteríum. T-frumu virkni leiðir einnig til örvunar á vessabundnu ónæmissvari. B-frumur eru megin verkfrumur vessabundna kerfisins þar sem mótefni sem þær frumur seyta ráðast gegn mótefnisvaka frá utanfrumusýkli (Murphy, K et al. 2008).

1.1.4 Frumur ónæmiskerfisins

Uppruna allra þeirra frumugerða sem mynda blóðið í líkamanum má rekja til blóðmyndandi stofnfrumu í beinmerg (sjá mynd 1) Þessar frumugerðir eru þrjár; rauð blóðkorn, blóðflögur og hvít blóðkorn, sem mynda grundvöll ónæmiskerfisins. Þroskunarferli hvítra blóðkorna felur í sér þroskun í tvær áttir út frá stofnfrumunni. Frumurnar verða þá annars vegar að mergfrumum (e. myeloid cells) og hins vegar að eitilfrumum (e. lymphoid cells). Mergfrumur eru forverafrumur kornfrumna og smáæta. Frekari þroskun eitilfrumna leiðir til myndunar T-eitilfrumna, B-eitilfrumna og NK-frumna (Murphy, K et al. 2008).

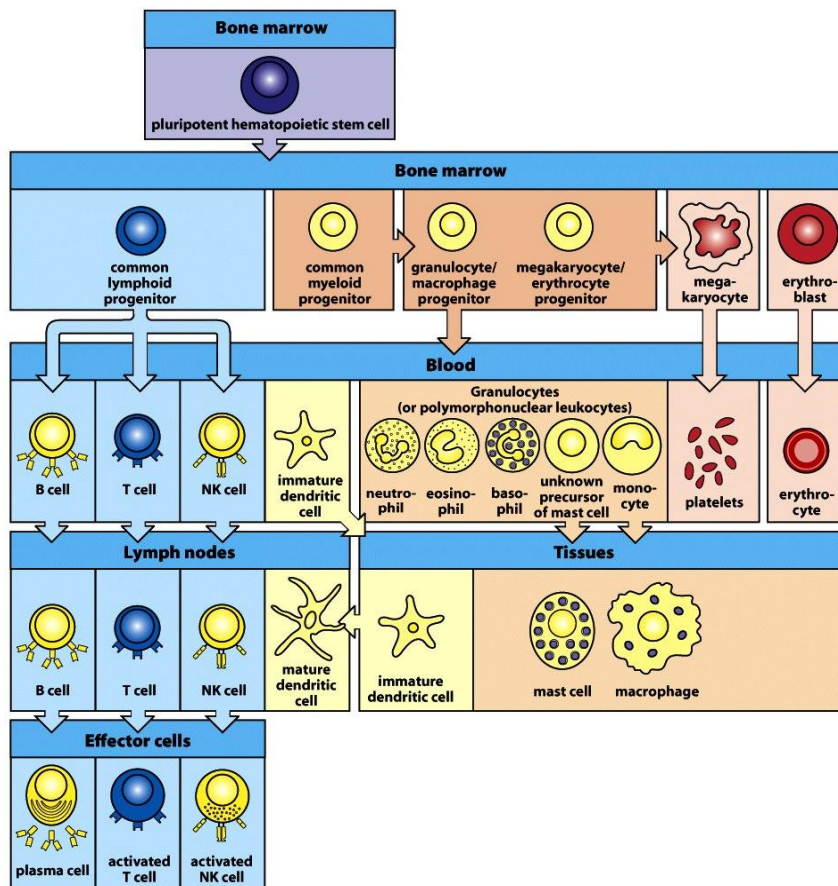


Figure 1-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Mynd 1. Yfirlit yfir þroskunarferli hvítra blóðkorna og annarra blóðfrumna (Murphy, K et al. 2008).

Fjórðungur utanfrumuvökva líkamans er blóð sem ferðast um hann með hringrás. Á ferð sinni ber það með sér efni frá einum hluta líkamans til annarra. Af þeim frumugerðum sem finnast í blóði þá eru hvítu blóðkornin þær einu sem eru að fullu virkar. En þrátt fyrir að hvítu blóðkornin noti blóðrásina til þess að ferðast um innan líkamans þá fer vinna þeirra yfirleitt fram í vefjum. Hvítum blóðkornum má skipta niður í sex megin frumuflokka: 1) Dauffrumur, 2) Eitilfrumur, 3) Smáætur/Stórætur, 4) Angafrumur, 5) Sýrufrumur og 6) Basafrumur (Silverthorn 2010). Frumur innan þessara frumuflokka sinna hlutverki sýnifrumna, en þær frumur gegna mikilvægu hlutverki þegar kemur að virkjun ónæmissvara (McCullough & Summerfield 2005).

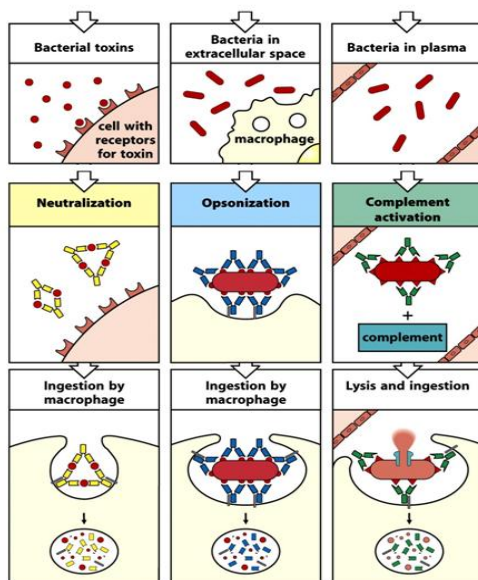
Eitilfrumur

Eitilfrumur (e. lymphocytes) eru 20-35% allra hvítra blóðkorna (Silverthorn 2010). Til eitilfrumna teljast T-frumur, B-frumur og NK-frumur. Þó svo að uppruni þessara þriggja frumugerða sé sameiginlegur þá feta þær sig eftir mismunandi þroskaferlum. Þroskun T-frumna fer fram í hóstarkirtli en B-frumur og NK-frumur þroskast í beinmerg (Murphy, K et al. 2008).

B-eitilfrumur

B-eitilfrumur tjá á yfirborði sínu B-frumu viðtaka (BCR) og honum svipar að ýmsu leyti til T-frumu viðtakans. Ígildi CD4 og CD8 sameindanna eru yfirborðs próteinin CD19, CD21 og CD81. B-frumu viðtakinn bindur m.a. glýkóprótein, fjölsykrur sem og heilar veiruagnir og bakteríufrumur. Það gerir hann með því að miðla tengslum við mótefnavísa (e. epitope) á yfirborði þeirra. Virkjun B-frumna fer fram í gegnum B-frumu viðtakann. Í gegnum hann fara í gang boðferlar innan frumunnar sem miðla þeim boðum áfram að mótefnavaki sé bundinn viðtakanum. B-frumuviðtakinn innlimar síðan mótefnavakann inn í frumuna þar sem hann er brotinn niður í smærri peptíð. Peptíð bútarnir bindast MHC vefjaflokkasameind af gerð II og sá flóki er fluttur út á yfirborð B-frumunnar; í því er sýnifrumuvirkni B-frumna fólgin. Mótefna sértækar T-hjálparfrumur þekkja peptíð bútinn á yfirborði B-frumunnar og bindast henni. Í gegnum þá bindingu fær B-fruman boð um að virkjast. Virk B-fruma sérhæfist í svokallaða plasmafrumu (Murphy, K et al. 2008).

Plasmafrumur framleiða mikið magn mótefna sem þær seyta út í utanfrumuvökva. Sú mótefnaseyting er grundvöllur vessabundins ónæmis (Sanz et al. 2008). Hlutverk hinna seyttu mótefna er þríþætt (sjá mynd 2). Hið fyrsta er að þau binda veiruagnir og bakteríur og með því koma þau í veg fyrir skaða af þeirra völdum. Þessum mótefnis:mótefnavaka flóka er að lokum eytt af stórætum. Annað hlutverk þeirra er að hjúpa bakteríufrumur með mótefnum og hlutleysa þær þannig. Stórætur þekkja þá mótefnavakann sem utanaðkomandi og taka hann upp til áts og eyðingar. Þriðja hlutverkið felur í sér ræsingu á kompliment kerfinu. Mótefnin sem eru bundin bakteríu mynda viðtaka fyrir fyrsta virka prótein kompliment kerfisins. Það leiðir til myndunar á prótein flóka á yfirborði bakteríunnar sem í sumum tilfellum drepur bakteríuna beint. Yfirleitt leiðir þó kompliment hjúpun til þess að flókin er tekinn upp af átfrumu. Af þessu sést að seyting mótefna leiðir til agnaáts sýkla og sýklaafurða (Murphy, K et al. 2008).



Mynd 2. Þríþætt hlutverk seytra mótefna. Lengst t.v.: Mótefni hlutleysa veiruagnir og sýklaafurðir sem hreinsaðar eru upp af stórætum. Í miðju: Mótefni hjúpa bakteríufrumur sem síðan eru teknar upp af stórætum. Lengst t.h.: Mótefni bindast við bakteríufrumu og stuðla að ræsingu komplimentkerfis (Murphy, K et al. 2008).

T-eitilfrumur

Blóðrásin ber T-frumur til hóstarkirtils (e. thymus) þar sem þroskun þeirra og sérhæfing fer fram (Skapenko et al. 2005). T-frumur eru skilgreindar út frá viðtökum sem myndast á yfirborði þeirra í þroskunarferlinu. T-frumu viðtakinn (TCR) miðlar sértækni frumnanna fyrir mismunandi mótefnavökum. Á yfirborði T-frumna er að finna CD3 viðtakann, sem myndar flóka ásamt T-frumu viðtakanum (sjá mynd 3). Sá flóki er mikilvægur fyrir miðlun boða sem stuðla að virkjun T-frumna (Murphy, K et al. 2008).

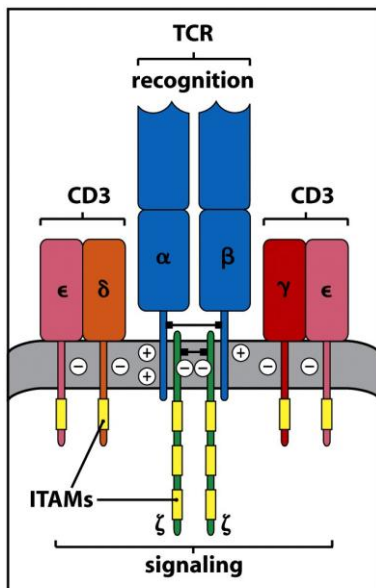


Figure 6-10 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Mynd 3. T-frumu viðtakinn myndar flóka með CD3 sameindum á yfirborði T-frumna (Murphy, K et al. 2008).

Virkjun, eða ræsing, T-frumna verður þegar yfirborðsviðtakar þeirra komast í snertingu við peptíðbút í seti MHC sameindar á sýnifrumu (Murphy, K et al. 2008). CD4 og CD8 eru viðtakar sem einnig finnast á T-frumum. Tjáning þeirra er mismunandi eftir frumum. Frumur sem tjá CD4 viðtakann eru skilgreindar sem T-hjálparfrumur en frumur sem tjá CD8 viðtakann skilgreinast sem T-drápsfrumur. Bæði afbrigðin koma að virkjun óvirkjaðra T-frumna með því að koma stöðugleika á CD3:TCR flókann þegar hann tengist mótefnavaka í gegnum MHC sameind. CD4⁺ frumur koma að tengingu við MHC II sameindir en CD8⁺ frumur tengjast MHC I sameindum (Skapenko et al. 2005).

Verkefni CD8⁺ og CD4⁺ T-frumna eru æði ólík. CD8⁺ T-frumur veita m.a. vörn gegn veirusýktum frumum og krabbameinsfrumum með því að stuðla að eyðingu þeirra. CD4⁺ T-frumur skiptast í fjóra megin undirflokka eftir virkni; Th₁-frumur virkja sýktar stórætur, Th₂-frumur ásamt Th₁-frumum örva mótefnaseytingu B-frumna, Th₁₇-frumur örva aðþælsfrumur til að seyta frumuboðefnum sem laða daufrumur að sýktum svæðum og T-stýrifrumur bæla virkni T-frumna sem þekkja eigin sameindir líkamans líkt og um

utanaðkomandi mótefnavaka væri að ræða (Murphy, K et al. 2008). Mynd 4 gefur myndrænt yfirlit yfir ólíka virkni CD8⁺ og CD4⁺ frumna.

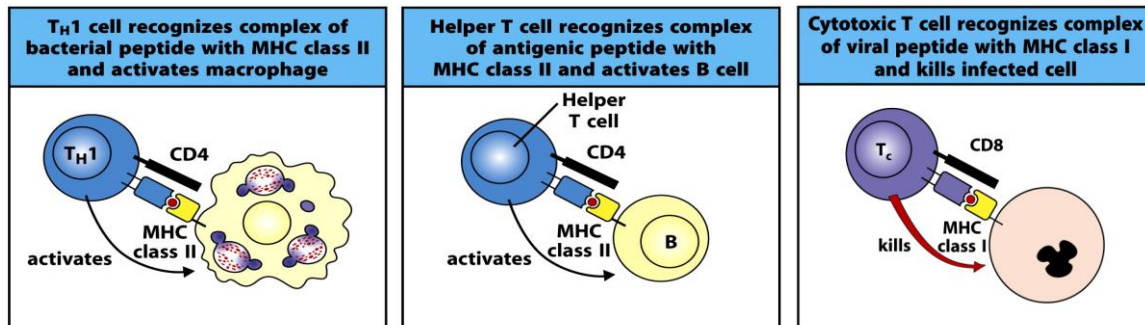


Figure 1-33 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Figure 1-32 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Mynd 4. Virkni CD4⁺ og CD8⁺T-frumna. Lengst t.v. : T_h1 fruma þekkir MHC:peptíð flóka og virkjar stórætu. Í miðju: T-hjálparfruma þekkir MHC:peptíð flóka og virkjar B-frumu. Lengst t.h. : T-drápsfruma þekkir MHC:peptíðflóka og drepur sýkta frumu (Murphy, K et al. 2008).

NK frumur

Ólíkt T- og B-eitilfrumum þá taka NK-frumur þátt í náttúrulegum ónæmissvörum. Virkni þeirra er skilgreind út frá hæfni þeirra til að drepa ákveðnar frumur með því að losa eitruð smákorn úr innanfrumu blöðrum í umfrymi þeirra. Þessar eitruðu agnir og prótein gera göt á frumuhimnu markfrumna (e. target cells). Frumudráp NK frumna byggir ekki á sértækum viðtökum, líkt og hjá CD8⁺ drápsfrumum, heldur á óbreytanlegum yfirborðviðtökum sem þekkjá yfirborð sýktra frumna (Murphy, K et al. 2008).

Sýnifrumur

Mikilvægi sýnifrumna (e. antigen presenting cells) felst í því að tengja saman náttúruleg og áunnin ónæmissvör. Þessum tengslum miðla þær með því að taka upp mótefnavaka og koma honum fyrir á yfirborði sínu (McCullough & Summerfield 2005). Mótefnavökum er komið fyrir í seti svokallaðra MHC vefjaflokkasameinda. MHC sameindir eru prótein flókar sem sýna hvaða mótefnavakar eru í umhverfi sýnifrumna með því að festa þá á yfirborði þeirra. MHC sameindir skiptast í tvo flokka; MHC I og MHC II. MHC I sameindir binda peptíðbúta sem eru afleiður nýmyndaðra próteina í umfrymi sýnifrumnanna. Þar af leiðandi getur sú MHC gerð bundið í seti sínu búta úr veirupróteinum og sýnt á yfirborði sýnifrumu. MHC II sameindir sýna hins vegar peptíðbúta sem eru afleiður próteina úr innanfrumublöðrum (sjá mynd 5). Ýmsar frumugerðir gegna hlutverki sýnifrumu en algengust er að um sé að ræða angafrumur, stórætur og B-eitilfrumur (Murphy, K et al. 2008). Sá kraftur sem býr í sýnifrumuvirkni angafrumna, og sú staðreynd að það virðist vera megin virkni þeirra, hefur orðið til þess að oft er talað um þær sem atvinnu-sýnifrumur (McCullough & Summerfield 2005).

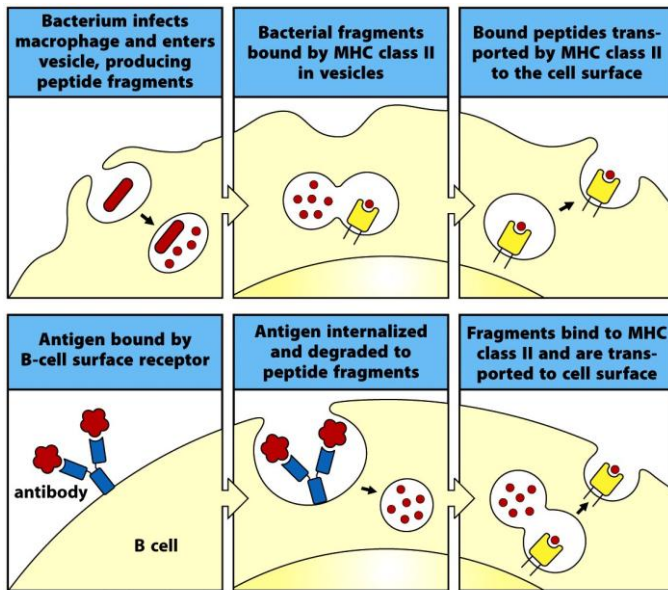


Figure 1-31 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Mynd 5. MHC vefjaflokkasameindir af flokki II binda mótefnavaka úr innanfrumublöðrum í set sitt og sýna á yfirborði sýnifrumna. Á efri mynd sýkir baktería stórætu og framleiðir peptíðbúta í innanfrumublöðru. MHC II sameind bindur peptíðbút og færist upp á yfirborð þar sem hann verður til sýnis fyrir nærliggjandi frumur. Á neðri mynd bindur mótefnaviðtaki á yfirborði B-frumu mótefnavaka sem er innlimaður inn í frumuna, brotinn niður og peptíðbútar eru sýndir á MHC II sameind á yfirborði B-frumunnar (Murphy, K et al. 2008).

Angafrumur

Angafrumur (e. dendritic cells) einkennast af löngum, þunnum öngum sem líkjast griplum taugafrumna. Angafrumur gegna hlutverki sýnifrumna og brjóta mótefnavaka niður í litla peptíð búta sem þær sýna á yfirborði sínu í MHC vefjaflokkasameindum. Með búta úr mótefnavökum til sýnis á yfirborði sínu þá ferðast þær til eitilvefja þar sem þær stuðla að virkjun eitilfrumna (Silverthorn 2010).

Dauffrumur

Dauffrumur (e. neutrophils) voru upprunalega uppgötvaðar af Elie Metchnikoff. Uppgötvunina gerði hann við skoðun á lirfustigi krossfiska. Ef hann stakk rósabyrnum í lirfurnar setti ónæmiskerfi lirfanna bólgusvar í gang sem leiddi til þess að Metchnikoff kom auga á dauffrumurnar. Í dag vita menn að dauffrumur eru mikilvægur hluti ónæmiskerfisins þar sem þær mynda fyrstu línu náttúrulegra ónæmissvara (Kumar & A. Sharma 2010). Mikilvægi þeirra endurspeglast í hreinsunarstarfi þeirra sem felst í agnaáti og eyðingu örvera í vefjum (Murphy, K et al. 2008). Til þess að komast yfir í vefi þá þurfa frumurnar að mynda tengsl við æðapelsfrumur. Við örvun sem leiðir til aukinnar seytingu frumuboddefna á borð við TNF- α , IL-1 β og IL-17 þá fara æðapelsfrumur að tjá viðloðunarsameindir sem miðla fari dauffrumna úr blóðrásinni og yfir í vefi (Borregaard 2010). E-selectin á æðapeli binst lauslega við bindil sinn (s-Le^x) á yfirborði dauffrumu. Dauffrumur hafa einnig á yfirborði sínu viðtaka fyrir efnatogann CXCL8 (IL-8). Í ónæmissvari er CXCL8 seytt í auknu magni og binding hans við dauffrumu leiðir til virkjunar integrina (LFA-1 og CR3) á dauffrumunni. TNF- α eflir tjáningu annarra integrina á æðapeli; ICAM-1 og ICAM-2, en ICAM-1 binst við LFA-1 á yfirborði

dauffrumunnar (Murphy, K et al. 2008). Dauffrumur í vefjum eru mun virkari en þær frumur sem halda til í blóðrás og seyta m.a. CXCL8 sem dregur fleiri ónæmisfrumur að svæðinu (Borregaard 2010).

Sýru- og basafrumur

Smáhorn þessara frumna innihalda ýmis ensím og eitruð prótein sem losna þegar frumurnar virkjast. Talið er að virkni þeirra felist aðallega í vörnum gegn sníkjudýrum sem eru of stór fyrir agnaát dauffrumna og stóræta. Báðar þessar frumugerðir koma einnig að ofnæmisviðbrögðum þar sem áhrif þeirra eru oftast en ekki skaðleg (Murphy, K et al. 2008). Sýrufrumur (e. eosinophils) og basafrumur (e. basophils) finnast í litlu magni í blóðrásinni (Silverthorn 2010).

Smáætur/Stórætur

Smáætur (e. monocytes) eru forverafrumur stóræta (e. macrophages) sem hringsóla með blóðrásinni þar til bólguviðbragð leiðir til þess að þær skríða yfir æðapél og úti í vefi (sjá mynd 6). Þegar smáætur berast yfir í vefi þá aðgreinast þær yfir í stórætur. Smáætur og stórætur mynda eina af þremur gerðum átfrumna í ónæmiskerfinu, en þar sem flestar sýkingar verða í vefjum líkamans, og stórætur eru nánast til staðar í þeim öllum, þá eru það þær sem sjá að mestu um vinnuna. Þetta eru tiltölulega langlífur frumur sem gegna margvíslegum hlutverkum í ónæmissvörum. Í hlutverki sínu sem átfrumur gegna þær mikilvægu hlutverki í svörum náttúrulega ónæmiskerfisins, sem snýr að áti og drápi örvera sem hafa rutt sér leið inn í líkamann. Stórætur koma einnig við sögu í ónæmissvörum áunna ónæmiskerfisins þar sem þær farga sýklum og sýktum frumum ásamt því að vinna sem sýnifrumur. Stórætur sinna einnig því mikilvæga verkefni að efla bólguvar. Það gera þær með því að seyta próteinum sem virkja aðrar frumur ónæmiskerfisins og stuðla að þátttöku þeirra í ónæmissvari. Stórætur og smáætur tjá á yfirborði sínu viðtakann CD14 (Ziegler-Heitbrock 2007), en sá viðtaki bindur LPS (e. lipopolysaccharide) á yfirborði Gram-neikvæðra baktería (Murphy, K et al. 2008).

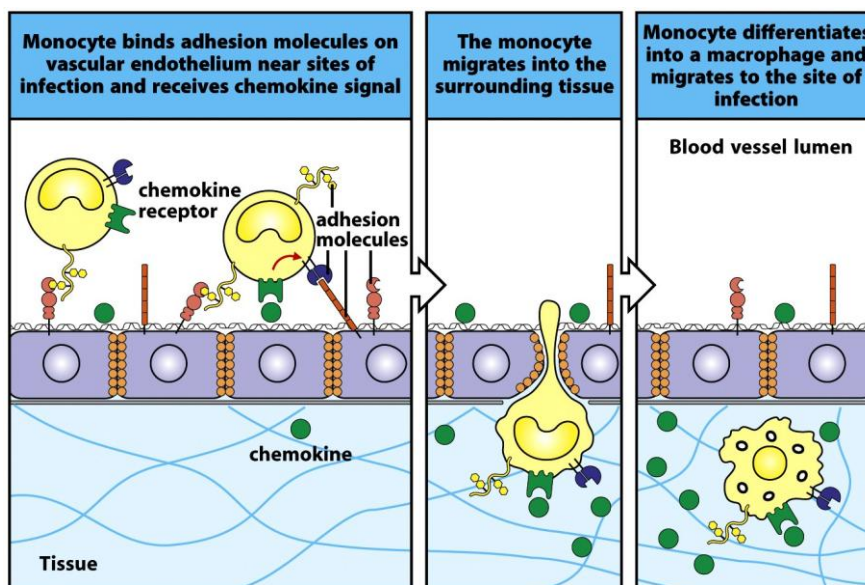


Figure 2-12 Immunobiology, 7ed. © Garland Science 2008

Mynd 6. Smáætur í blóðrás aðgreinast í stórætur þegar þær leita út í vefi (Murphy, K et al. 2008).

1.1.5 Skrið T-frumna til vefja

Í bólgusvari fara frumur á æðapeli að tjá viðloðunarsameindir og framleiða efnatoga, sem eiga að miðla fari T-frumna til sýktra eða skaddaðra vefja (Murphy, K et al. 2008). Efnatogar gegna því hlutverki að draga hvít blóðkorn úr blóðrás og út í vefi (Ebert et al. 2005). Virkar T-frumur í blóðrás tjá á yfirborði sínu viðloðunarsameindir og viðtaka fyrir efnatoga. Þessar yfirborðssameindir, ásamt sameindum á yfirborði æðapels, stuðla að skriði T-frumna til vefja (Murphy, K et al. 2008).

CLA og CCR4

CLA (e. cutaneous lymphocyte antigen) er viðloðunarsameind sem er tjáð á yfirborði T-frumna og er bindill fyrir E-selektín viðloðunarsameindina á æðapeli í húð (Murphy, K et al. 2008). Talið er að CLA miðli fari T-frumna til húðar en sýnt hefur verið fram á að T-frumur á leið til húðar tjá CLA í meira mæli en T-frumur sem eru á leið í aðra vefi (H Sigmundsdóttir et al. 2001). Þannig er tjáning CLA, á T-frumum á bólgusvæði í húð, yfir 80% samanborið við 5% tjáningu á T-frumum í öðrum vefjum (H Sigmundsdóttir et al. 2004).

T-frumur sem tjá CLA á yfirborði sínu tjá oft á tíðum einnig viðloðunarsameindina CCR4, sem er viðtaki fyrir CCL17. CCL17 er efnatogi sem finnst í miklu magni við æðapel í húð. Samverkun CLA við E-selektín veldur því að T-fruman rúllar meðfram æðaveggnum. Þegar T-fruman tengist CCL17 í gegnum bindingu við CCR4 styrkjast tengslin milli frumu og æðapels og fari T-frumunnar er miðlað til húðar (Murphy, K et al. 2008). CCR4 er þó ekki einvörðungu tjáður á frumum sem tjá líka CLA. Sýnt hefur verið fram á tjáningu CCR4 viðtakans á T_H -minnisfrumum í blóðrás sem tjá ekki CLA. Sumar þessara CLA/CCR4⁺ frumna hafa þó hlutverkum að gegna í húð. En auk þess þá virðist CCR4 hafa einhverja óskilgreinda aðkomu að ratvísi hvítra blóðkorna til lungna (Soler et al. 2003). Um 20% CD4⁺ T-frumna í blóðrás virðast tjá CCR4 viðtakann en einungis um 5% CD8⁺ T-frumna (Andrew et al. 2001).

CXCR6

CXCR6 er viðtaki fyrir efnatogann CXCL16 (Kim et al. 2001). Það hefur verið talið að CXCR6 stuðli að fari T-frumna til heilbrigðar húðar en viðtakinn er tjáður á um 50% T-frumna í húð. Tjáning hans á T-frumum í blóðrás er þó heldur minni en þar hefur hún mælst lægri en 1% á CLA⁺ T-frumum (Clark et al. 2006). CXCR6 tjáning hefur verið tengd fari T-eitilfrumna til bólginna vefja í iktsýki og psoriasis-gigt sem og til bólginnar lifrar (Kim et al. 2001). Að auki hefur verið tilkynnt um aukna tjáningu CXCR6 í sortuæxlum (Taghizadeh et al. 2010).

CCR7

CCR7 er viðtaki fyrir efnatogana CCL19 og CCL21 og er mikið tjáður á T-frumum (Murphy, K et al. 2008). CCL19 og CCL21 bindast CCR7 viðtakanum á yfirborði óvirkjaðra T-eitilfrumna og miðla fari þeirra til eitilvefja (Ebert et al. 2005). Sýnt hefur verið fram á mikilvægi CCR7, og þeirra bindla sem tengjast honum, í tengslum við ratvísi óvirkjaðra T-frumna í eitilvefi í músum með enga CCR7 tjáningu (Förster et al. 1999). Niðurstöður þeirrar rannsóknar sýndu fram á að í músunum fannst marktæk minnkun á fjölda óvirkjaðra T-frumna í eitilvefjum. Þá minnkun mátti rekja til þess að T-frumurnar tjáðu ekki CCR7 viðtakann á yfirborði sínu.

CXCR4

Auk þess að tjá CCR7 þá tjá óvirkjaðar T-frumur sem hringsóla um líkamann með blóðrásinni einnig viðloðunarsameindir á borð við CCR9 og CXCR4 (Ebert et al. 2005). CXCR4 tjáning er einnig til staðar eftir að T-frumur verða virkar verk- og minnisfrumur (Murphy, K et al. 2008). Það hefur verið sýnt fram á að CXCL12, sem er bindill fyrir CXCR4, kemur við sögu þegar fari T-frumna er miðlað til eitilvefja (Phillips & Ager 2002). Þar af leiðandi er ekki ólíklegt að CCR7 og CXCR4 vinni saman að því að koma óvirkjuðum T-frumum til eitla (Ebert et al. 2005).

1.2 Bólga

Bólga er svar líkamans við skaðlegu áreiti. Slík áreiti geta verið tilkomin vegna sýkla eða vegna vélrænna og efnafræðilegra áverka. Líkamleg einkenni bólgu eru hiti, sársauki, roði og þroti. Þessi einkenni koma fram fyrir tilstilli frumuboðefna og annarra bólgumiðla. Bólga í vef verður til þess að æðapelsfrumur fara í auknum mæli að tjá yfirborðssameindir sem miðla fari hvítra blóðkorna úr blóðrás og yfir í vefi. Dæmi um slíkar yfirborðssameindir eru viðloðunarsameindir og viðtakar fyrir efnatoga (Murphy, K et al. 2008).

1.2.1 Frumur í bólgusvari

Fyrstu frumurnar sem bregðast við sýkingu eða áverka eru átfrumur náttúrulega ónæmiskerfisins. Í sýktum eða sködduðum vefjum sinna átfrumurnar nokkurs konar hreinsunarstarfi, þ.e. þær gleypa og drepa sýkla eða hreinsa upp frumuleifar. Í bólgusvari hætta dauffrumur og smáætur að hringsóla með blóðrásinni og færast út í vefi. Dauffrumur eru fyrstu frumurnar sem koma á staðinn í bólgusvari. Þeirra hlutverk er að gleypa og drepa sýkla sem hafa komist inn í vefinn. Dauffrumur eru hins vegar skammlífar frumur og deyja skömmu eftir að þær koma inn í vefinn. Eins og áður hefur komið fram þá aðgreinast smáætur yfir í stórætur þegar þær skriða úr blóðrás og í vefi. Stórætur eru langlífir frumur sem halda til í vefjum. Hlutverk þeirra þar felst í því að gleypa og drepa sýkla ásamt því að seyta bólgumiðlum sem samhæfa bólguviðbrögð. Stórætur hreinsa einnig upp dauffrumur og dauðan vef. Auk þess seyta þær efnum sem stuðla að hjöðnun bólgu (Murphy, K et al. 2008).

1.2.2 Bólgumiðlar

Frumuboðefni eru leysanleg prótein sem miðla viðbrögðum ónæmiskerfisins. Frumur ónæmiskerfisins seyta þessum próteinum og öðrum efnum þegar þær bregðast við áreiti. Með því að seyta frumuboðefnum hafa þær samskipti hvor við aðra og við aðrar frumugerðir. Sérhæfðir viðtakar á markfrumum (e. target cells) binda frumuboðefnin og markfruman bregst við á þann hátt sem viðkomandi frumuboðefni býður. Virkar stórætur í vefjum seyta frumuboðefnum á borð við IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α og efnatoganum CXCL8 (IL-8). Seyting þessara efna hefur margvísleg áhrif; CXCL8 er efnatogi sem kemur við sögu í fari hvítra blóðkorna úr blóðrás yfir í vefi og IL-12 virkjar NK-frumur og eflir sérhæfingu CD4⁺ T-frumna yfir í T_H1 frumur. Einna mikilvægustu áhrifin verða fyrir tilstilli IL-1 β , IL-6 og TNF- α . Þessi frumuboðefni verka á lifrarfrumur sem leiðir til þess að lifrin fer að seyta frá sér svokölluðum bráðafasa próteinum. Eitt af þessum próteinum er C-reactive protein (CRP). CRP er mikilvægt prótein að því leyti að það getur bæði hjúpað

sýkla og virkjað kompliment-kerfið. Yfirlit yfir áhrif IL-1 β , IL-6 og TNF- α er gefið á mynd 7 (Murphy, K et al. 2008).

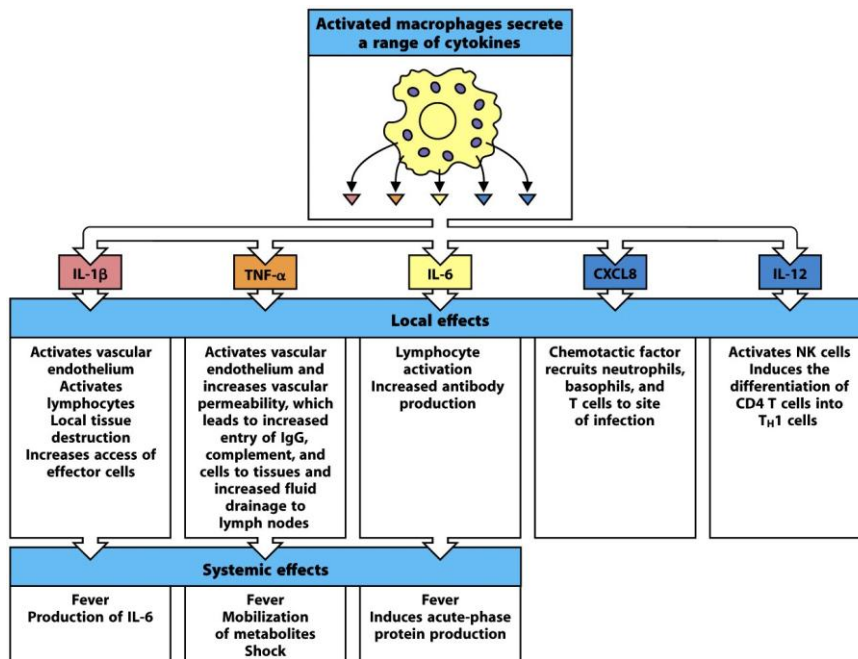


Figure 2-44 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Mynd 7. Virkar stórætur seyta frumuboðefnum sem hafa margísleg áhrif innan líkamans. TNF- α , IL-6 og IL-1 β leiða m.a. til hækkun á líkamshita og seytingu bráðafasa-próteina frá lifur (Murphy, K et al. 2008).

Agnaát er ekki eina leið átfrumna til að drepa sýkla. Þær framleiða einnig hvarfgjarnar súrefnis sameindir (ROS) sem eru skaðlegar sýklum. Einnig er talið að þær framleiði bakteríudrepandi peptíð (Murphy, K et al. 2008). Peptíðin stuðla að vörnum gegn bakteríum með því að hafa eyðileggjandi áhrif á himnur þeirra (Zasloff 2002).

1.2.3 Bólguvarið

Bólga getur verið tilkomin vegna tveggja ólíkra þátta. Annars vegar má rekja uppruna hennar til viðbragða ónæmiskerfisins við sýkingu en hins vegar getur bólguvari verið tilkomið vegna vefjaskemmda. Líkamanum stafar hættu af bæði sýkingum og vefjaskemmdum. Þess vegna er nauðsynlegt að hann búi yfir verkferlum sem geta útrýmt þeirri hættu sem skapast af þessum völdum. Ónæmiskerfið nemur bæði sýkingar og vefjaskemmdir og kemur af stað bólguvari til þess að útrýma þeim. Stórætur í vefjum nema sýkingar og áverka og virkjast í framhaldinu. Við virkjun fara þeir að seyta áðurnefndum frumuboðefnum og bólgumiðlum; nálægar blóðæðar víkka, blóðflæði eykst og æðapæl fer að tjá viðloðunarsameindir í auknum mæli. Fyrir tilstilli efnatoga fara dauffrumur og smáætur að tengjast æðapæli og færast úr blóðrás yfir í vefi. Í vefjunum fer hreinsunarstarf átfrumnanna í gang auk þess sem aukin seyting þeirra á frumuboðefnum og efnatogum stuðlar að aukinni bólgumyndun. Seyting frumuboðefna hefur einnig þau áhrif að sýkingu er haldið í skefjum og komið í veg fyrir útbreiðslu hennar um líkamann. Á

pennan hátt reynir náttúrulega ónæmiskerfið að útrýma þeim hættum sem kunna að skapast. Ef það tekst ekki fer í gang ferli sem leiðir til virkjunar áunna ónæmiskerfisins og ráðist er á hættuna með sérhæfðu ónæmissvari (Murphy, K et al. 2008).

Þegar hættan er liðin hjá; sýkingu hefur verið útrýmt eða vefjaskemmd grædd, þarf að draga úr þeirri bólgu sem hefur myndast. Sá skaði sem verður á frumu og vefjum er að miklu leyti tilkomin vegna skaðlegra áhrifa sýkla og vefjaskemmda. Hins vegar getur bólgusvarið sjálft einnig haft skaðleg áhrif á nærliggjandi vefi. Þar af leiðandi er mikilvægt að mögulegt sé að draga úr bólgunni. Þeirri virkni er einnig miðlað af þeim átfrumum sem sinna hreinsunarstarfinu í vefjunum. Dauffrumur og stórætur, ásamt því að drepa sýkla, seyta efnum sem draga máttinn úr bólgusvarinu. Það leiðir til þess að dauffrumur hætta að sækja út í vefina og þær frumur sem þegar eru úti í vefjum deyja og leifar þeirra eru hreinsaðar upp af stórætum (Soehnlein & Lindbom 2010). Át stórætanna á leifum dauffrumnanna veldur losun vaxtarþátta og bólguhamlandi efna á borð við TGF- β og IL-10. Þessi losun efna frá stórætum leiðir til viðgerða á vefjum með því að stuðla meðal annars að vexti nýrra blóðæða, fjölgun trefjakímfrumna og nýmyndun kollagens (DiPietro 1995). Bólgusvarinu lýkur síðan með því að stórætur hverfa úr vefjum með flutningi í gegnum vessaæðar (Serhan & Savill 2005).

1.3 Fyrri rannsóknir

Fyrri rannsóknir sem stuðst hafa við liðskiptaaðgerð á mjöðm sem rannsóknarmódel með tilliti til bráðra bólguviðbragða hafa sýnt fram á kröftugt bólgusvar í kjölfar aðgerðar. Það var gert með mælingu á styrk C-reactive protein (CRP) sem sýndi marktæka aukningu eftir aðgerð þar sem hámarksstyrk var náð á öðrum degi eftir aðgerð (Bjornsson et al. 2007)(Laiho et al. 2001)(O. Bilgen et al. 2001). Með tilliti til breytinga á styrk valinna frumuboðefna hafa flestar rannsókna sýnt fram á marktæka aukningu á IL-6 þar sem hámarksstyrk er náð frá 6 klst til 24 klst eftir aðgerð (Bjornsson et al. 2007)(Hall et al. 2001). IL-6 er frumuboðefni sem seytt er við örvun frá TNF- α og IL-1 en IL-6 hamlar hins vegar seytun TNF- α og IL-1. IL-6 er einnig talið örva virkni dauffrumna í bólgusvari (Lin et al. 2000). Sumar rannsóknir hafa einnig sýnt fram á aukna tjáningu CD11b á smáætum, sem stuðla að viðloðun þeirra við æðapæl (Bunescu et al. 2002). Þó að sýnt hafi verið fram á marktæka aukningu IL-6 þá hafa ekki fundist marktækar breytingar á styrk annarra frumuboðefna á borð við TNF- α og IL-1 β (Høgevoid et al. 2000). Marktækar breytingar hafa heldur ekki fundist á styrk IL-10, IL-12 og IL-8 (Bjornsson et al. 2007) í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm.

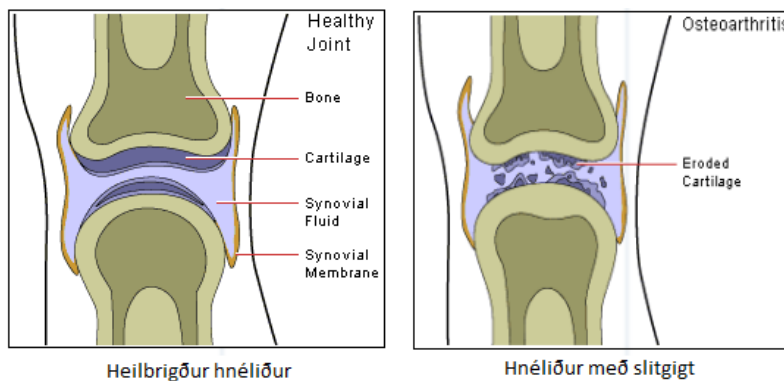
Í nýlegri íslenskri rannsókn var sýnt fram á jákvæða fylgni á milli styrks IL-6 og kortisóls á fyrstu 24 klst eftir aðgerð. Nánari greining á gögnunum leiddi í ljós að í þeim einstaklingum þar sem styrk aukning IL-6 mældist mest, mældist einnig herra kortisólsvar á meðan þeir einstaklingar sem ekki mældust með afgerandi IL-6 aukningu komu inn í aðgerðina með herra magn kortisóls samanborið við fyrri hópinn (Bjornsson et al. 2007). Þetta gefur til kynna að IL-6 sé mögulega að keyra áfram aukningu á styrk kortisóls eftir aðgerð en þekkt er að kortisól hefur mótandi áhrif á ónæmissvör og að styrkur þess eykst eftir liðskiptaaðgerð á mjöðm (Boumpas et al. 1993, Calcagni & Elenkov 2006). Enn fremur verður að hafa í huga að hár styrkur kortisóls í upphafi aðgerðar dempar bólgusvarið og hækkar eftir aðgerð hjá öðrum. Þannig má ætla að kortisól hækkinin hjá sjúklingunum verki til dempunar á eigin bólguviðbrögðum.

Önnur íslensk rannsókn skoðaði ræingu kompliment kerfisins í bráðum bólgusvörum í kjölfar liðskiptaaðgerðar á mjöðm. Niðurstöðurnar gáfu til kynna marktæka ræingu kompliment kerfisins strax á aðgerðardegi (Þórðardóttir, S 2008). Niðurstöður þeirrar rannsóknar, ásamt nokkrum þeirra sem nefndar eru hér á undan, benda til þess að ónæmiskerfið ræsist strax í kjölfar aðgerðarinnar.

1.4 Slitgigt

Slitgigt er ein helsta orsök liðskiptaaðgerða á hné og mjöðm ásamt því að vera einn algengasti gigtarsjúkdómurinn. Algengi slitgigtar eykst með aldri og dreifing á kynjahlutföllum sjúklinga hefur reynst vera háð aldri sjúklinga og því á hvaða lið sjúkdómurinn herjar (Felson et al. 2000). Ýmsir meinafræðilegir þættir tengjast þróun sjúkdómsins, sem erfitt hefur reynst að kortleggja nákvæmlega. Þó er talið að samspil á milli umhverfis- og erfðafræðilegra þátta gegni lykilhlutverki í því að slitgigt nær bólfestu í einstaklingi og eigi þátt í framþróun sjúkdómsins út frá því (Ingvarsson et al. 2000).

Slitgigt einkennist af niðurbroti á liðbrjóski (Glass 2006). Talið er að frumuboðefni og vaxtarþættir komi að meinafræðilegu hlið sjúkdómsins en IL-1 og TNF koma þar að virkjun ensíma sem tengjast niðurbroti liðbrjóskisins (Pelletier et al. 1993). Vaxtarþættir á borð við TGF- β og IGF-1 tengjast síðan tilraunum líkamans til þess að bæta þetta niðurbrot upp með því að auka nýmyndun brjóskis (Malemud 1993). Þegar niðurbrotið er orðið það mikið að nýmyndun brjóskis er ekki næg til þess að viðhalda eðlilegu ástandi þá koma slitgigtareinkenni fram (Pelletier et al. 1993). Á mynd 8 má sjá muninn á heilbrigðum hnélið og hnélið þar sem niðurbrot liðbrjóskis hefur orðið.

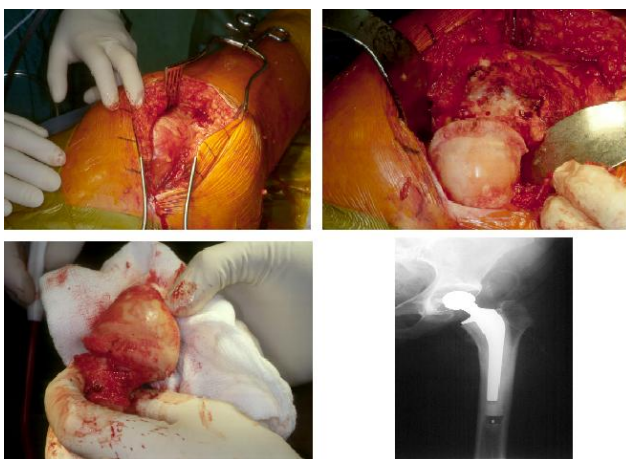


Mynd 8. T.v. sést hvernig heilbrigður hnéliður lítur út. T.h. sést hvernig liðbrjósk í hnéliðnum hefur brotnað niður og slitgigt myndast (Mynd aðlöguð út frá www.netretinus.com/rheumaweb/oa_grein.html).

1.5 Liðskiptaaðgerð á mjöðm

Liðskiptaaðgerðir á mjöðm er áhrifaríkasta leiðin til þess að takmarka sársauka og bæta færni þeirra sjúklinga sem þjást af slitgigt (Huo et al. 2010). Tíðni þessara aðgerða í

Bandaríkjunum er talin vera í kringum 300.000 aðgerðir árlega (Kurtz et al. 2007). Á Íslandi var tíðni mjaðmaskiptaraðgerða metin á tímabilinu frá 1982 – 1996. Heildarfjöldi aðgerða á þessu tímabili var 3403 þar sem árlegur fjöldi jókst frá því að vera 94 aðgerðir árið 1982 samanborið við 323 árið 1996 (Ingvarsson et al. 1999). Áætlað er að árið 2030 verði fjöldi slíkra aðgerða í Norður-Ameríku orðinn 2-3 milljónir árlega (Kurtz et al. 2007). Liðskiptaaðgerð á mjöðm er heilmikil aðgerð sem felur í sér rofnun æðapels og skurð í gegnum vefjalög á borð við húð og vöðva. Lærleggsháls er sagaður og liðpoki og liðkúla fjarlægð (sjá mynd 9). Mergholan á lærlegg er opnuð og beinmergnum er ýtt til hliðar svo hægt sé að koma gerviliðnum fyrir og hann er að lokum festur með sementi.



Mynd 9. Liðskiptaaðgerð á mjöðm. Á efri mynd t.v. sést hvar búið er að framkvæma húðskurð og opna inn að mjaðmalið. Á efri mynd t.h. sést hvar liðpoki er fjarlægður og liðkúlu er lyft úr augnkarli. Neðri mynd t.v. sýnir liðkúlu þar sem hún er þrífín eftir að búið er að fjarlægja hana. Neðri mynd t.h. sýnir röntgenmynd af nýjum sementeruðum gervilið.

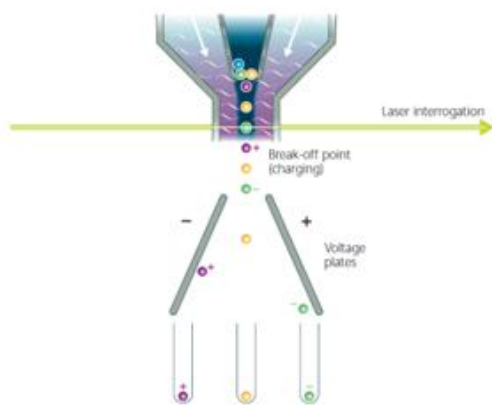
Skurðaðgerðir kalla fram skilgreindar hormóna-, efnaskipta-, blóðmeinafræðilegar og ónæmisfræðilegar breytingar á líkamsstarfsemi sjúklunga. Þessar breytingar eru taldar lýsa hinu svokallaða streituvíðbragði sem verður í kjölfar skurðaðgerða. Svar líkamans er áþekkt því sem verður við annað lífeðlisfræðilegt streituástand (Hall et al. 2000). Í kjölfar liðskiptaaðgerða á mjöðm verður kröftugt bólgusvar sem helst í hendur við hina áður nefndu marktæku aukningu á CRP í blóði (Bjornsson et al. 2007)(O. Bilgen et al. 2001)(Laiho et al. 2001).

1.6 Frumuflæðisjá (FACS)

Tæknin á bak við frumuflæðisjár byggir á samspili fjögurra kerfa. Þessi kerfi eru straumkerfið, sjónkerfið, greining boða og frumuflokkunarkerfið. Einn af grundvallar eiginleikum frumuflæðisjáa er að þær mæla eiginleika stakra einda. Straumkerfið sér til þess að frumum sé raðað í einfalda röð sem gerir tækinu kleift að mæla eiginleika hverrar frumu fyrir sig. Frumurnar fara síðan í gegnum einn eða fleiri ljósgeisla. Dreifingin á endurkasti ljóssins gerir tækinu kleift að greina þau boð sem berast út frá eiginleikum

frumnanna. Ef litaðar sameindir er að finna á yfirborði frumna þá gefa þær frá sér flúrljómun á ákveðnu bili sem tækið notar einnig til flokkunar á frumunum eftir eiginleikum. Þannig er hægt að lita yfirborðssameindir með mótefnum og meta tjáningu mismunandi viðtaka út frá flokkun frumnanna (Rahman, 2006).

Þegar sýnin hafa verið keyrð í gegnum FACS-tækið tekur við greining á þeim gögnum sem fást úr mælingunum. Þar eru ákveðnir frumuhópar með tiltekna eiginleika skoðaðir, t.a.m. frumur tjá CD4 viðtakann á yfirborði sínu. Það er gert með því að draga hlið í kringum frumuhópin sem á að taka til skoðunar. Innan þess hliðs eru þá einungis þær frumur sem áhugi er fyrir hendi að skoða. Þannig er lagt mat á hlutfallslegan fjölda CD4⁺ T-frumna í sýninu (Rahman, 2006).



Mynd 10. Frumuflæðisjá. Á myndinni t.v. sést hvernig agnir fara í gegnum FACS tæki í einfaldri röð. Þær fara í gegnum ljósgeisla og eru flokkaðar, í þessu tilfalli, eftir hleðslu og safnað í mismunandi ílát (Rahman, 2006). T.h. er mynd af FACS tækinu sem notað var í þessari rannsókn; MacsQuant Analyzer frá Milteny Biotec.

1.7 Markmið rannsóknarinnar

Liðskiptaaðgerð á mjöðm hefur áður verið notað sem rannsóknarmódel til þess að fylgjast með ræsingu ónæmiskerfisins í bráðum bólgusvörum. Þær rannsóknir hafa meðal annars sýnt fram á marktæka aukningu í styrk CRP og IL-6 í kjölfar aðgerðar. Einnig hefur verið sýnt fram á að kompliment kerfi ónæmiskerfisins ræsist síðla aðgerðardags í kjölfar mjaðmaliðaaðgerðar.

Markmið þessarar rannsóknar er að auka enn frekar þekkingu á ræsingu ónæmiskerfisins í bráðum bólgusvörum. Það verður gert með því að mæla tjáningu valinna viðtaka á yfirborði tiltekinnna frumuhópa sem taka þátt í ónæmissvörum. Með því má fylgjast með því hvort einstakir frumuhópar virkjast, letjast eða haldist óbreyttir í bólgusvarinu sem fylgir liðskiptaaðgerð á mjöðm. Einnig verður tjáning viðloðunarsameinda á T-frumum mæld sem gæti gefið til kynna hvert fari T-frumna er miðlað.

2 Efni og aðferðir

2.1 Þátttakendur og sýnataka

23 einstaklingum sem fóru í liðskiptaaðgerð á mjöðm á fyrstu þremur mánuðum ársins 2011 var boðið að taka þátt í rannsókninni. Um staðlaða aðgerð var að ræða þar sem allir þátttakendur voru deyfðir með mænudeyfingu og gerviliðurinn festur með sementi (methyl methacrylate). Af þeim 23 einstaklingum sem tóku þátt voru 15 konur og 8 karlar. Meðalaldur þátttakenda var 70 ár; sá elsti var 91 árs en sá yngsti 40 ára. Einstaklingar voru valdir til þátttöku með tilliti til þess að þeir væru allir að fara í liðskiptaaðgerð á mjöðm vegna slitgigtar og þjáðust ekki af öðrum bólgusjúkdómum. Þeir máttu ekki vera á neinum lyfjum sem skekkt gætu niðurstöður mælinga, s.s. bólgueyðandi og ónæmisbælandi lyfjum. Yfirlæknir Bæklunarskurðeildar LSH (HJjr) sá um að kynna rannsóknina fyrir þátttakendum og afla skriflegs samþykkis þeirra. Hann ásamt gigtarlækni (BG) tryggðu að einungis þeim einstaklingum sem uppfylltu áðurnefndar kröfur var boðin þátttaka í rannsókninni.

Blóðsýnum var safnað úr hverjum þátttakanda á eftirfarandi 4 tímapunktum

- 1) Á skurðstofu fyrir aðgerð (Pre-Op)
- 2) Á vöknun LSH 6 klst eftir aðgerð (6 klst Post-Op)
- 3) Á bæklunardeild LSH 24 klst eftir aðgerð (24 klst Post-Op)
- 4) Á bæklunardeild LSH 48 klst eftir aðgerð (48 klst Post-Op)

Fyrsta sýnið var tekið af svæfingarhjúkrunarfræðingi Bæklunarskurðeildar LSH. Annað sýnið var tekið af hjúkrunarfræðingum á Vöknunardeild LSH. Þriðja og fjórða sýnið var tekið af meinatæknum LSH. Þeir einstaklingar sem þurftu á blóðgjöf að halda á meðan sýnatökuferlinu stóð voru útilokaðir frá frekari þátttöku. Hið sama gilti fyrir þá einstaklinga sem þjáðust af fylgikvillum í kjölfar aðgerðarinnar, s.s sýkingum.

Við hverja sýnatöku var blóði úr þátttakendum safnað í tvö 4 mL blóðsýnaglös og 8,5 mL sermisglas. Annað blóðsýnið var notað fyrir mótefnalitun fyrir yfirborðssameindum en hitt blóðsýnið var notað fyrir heildartalningu hvíttra blóðkorna. Eftir heildartalninguna var glasið spunnið í skilvindu við 3000 rpm í 10 mínútur og plasmað síðan tekið ofan af og sett í 1,0 mL plastglas. Sermið var spunnið í skilvindu við 1300 rpm í 10 mínútur og flutt í 1,0 mL plastglas. Plasma- og sermissýnin voru fryst við -80°C og geymd til síðari rannsókna, en fyrirhugað er að nota sýnin til mælinga á svokölluðum beinvísnum.

2.2 Talning á heildarfjölda hvíttra blóðkorna

Heildarfjöldi hvítfruma var talinn með sjálfvirku frumutalningartæki, Cell-Dyn 3200, sem staðsett er í Blóðbankanum. Mæling í tækinu gefur heildarfjölda hvítfrumna í blóði sem og fjölda eitilfrumna, smáæta og kornfrumna sem hlutfall af heildarfjölda hvítfruma (sjá Mynd 11).

WBC	10.0	10e9/L	
NEU	7.66	76.5	%N
LYM	1.20	11.9	%L
MONO	.947	9.46	%M

Mynd 11. Dæmi um niðurstöður talningar á frumuffjölda í Cell-Dyn 3200. Með talningunni fást gildi fyrir heildarfjölda og hlutfall hvíttra blóðkorna í blóðsýni.

2.3 Mótefnalitun fyrir yfirborðssameindum

Sameindir á yfirborði þeirra frumna sem skoðaðar voru í rannsókninni voru litaðar með mótefnum sem eru sértækar fyrir sameindunum. Tafla 1 gefur yfirlit yfir mótefnin og yfirborðssameindirnar sem þau lita. Auk þeirra mótefna sem þar koma fram voru fjórar gerðir isótýpukontról-mótefna notaðar. Kontról mótefni nýtast við greiningu gagnanna til að ákvarða skil jákvæðrar og neikvæðrar tjáningar yfirborðssameinda á frumum. Kontról mótefnin sem notuð voru eru: APC Mouse IgG1 (BD Biosciences), FITC Mouse γ 1 IgG1 (BD Biosciences), rIgM (Beckton-Dickinson) og PE Mouse γ 1 IgG1 (BD Biosciences).

Tafla 1. Mótefnin sem notuð í rannsókninni. Í töflunni má sjá mótefnin sem notuð voru og yfirborðssameindirnar sem þær lita. Einnig má sjá á hvaða frumuhópum yfirborðssameindirnar eru tjáðar. Viðloðunarsameindirnar eru tjáðar á T-frumum og miðla fari þeirra til mismunandi staða innan líkamans.

Mótefni	Yfirborðssameindir	Tjáning
Pacific Blue™ anti-human CD14 (BioLegend)	CD14	Smáætur
PerCP (Sk7) CD3 (BD BioSciences)	CD3	T-frumur
Pacific Blue & PE/Cy7 anti-h CD4 (BioLegend)	CD4	T hjálparfrumur
APC/Cy7 anti-human CD8 (BioLegend)	CD8	T bælifrumur
FITC anti-human CD19 (BioLegend)	CD19	B-frumur
PE anti-human CD56 (BioLegend)	CD56	NK-frumur
APC anti-human CD83 (BioLegend)	CD83	Virkjaðar angafrumur
FITC rat-anti human CLA (BD Biosciences)	CLA	Miðlar fari T-frumna til húðar og í liði
PE anti-human CCR4 (R&D Systems)	CCR4	Miðlar fari T-frumna til húðar, lungna og í liði
APC anti-hCXCR6 (R&D Systems)	CXCR6	Miðlar fari T-frumna til húðar og vefja
FITC Mouse IgG anti-hCCR7 (R&D Systems)	CCR7	Miðlar fari T-frumna í eitla
PE Anti-human CD184 (CXCR4) (BioLegend)	CXCR4	Miðlar fari T-frumna í eitla
PE/Cy7 anti-human Cd11c (BioLegend)	CD11c	Stórætur í vefjum og angafrumur

Hundrað µl heilblóðs var komið fyrir í fjórum FACS keyrsluglössum. Glösin voru merkt frá 1 – 4. Í hvert glas var bætt sjö flúrmerktum mótefnum með sértækni fyrir tilteknum sameindum á yfirborði frumanna (sjá töflu 2). Tveimur µl af PerCP CD3 var blandað í glösin. Af öllum hinum mótefnum var einum µl blandað út í glösin. Glösin voru látin standa við herbergishita í 15 mín og að þeim tíma liðnum var einum ml af sprengilausn (e. lysis buffer) bætt út í og þau látin standa í 10 mín. Sprengilausn sprengir rauð blóðkorn og í framhaldinu er hægt að einangra hvítu blóðkornin. Glösin voru síðan spunnin í skilvindu í sex mínútur við 1300 rpm. Að því loknu var floti hellt ofan af og botnfallið leyst upp í einum ml af PBS lausn og glösin spunnin aftur í sex mínútur við 1300 rpm. Þetta skref var síðan endurtekið öðru sinni. Floti var að því loknu hellt ofan af og botnfallið leyst upp í 500 µl Fixation lausn (Fixation buffer frá BioLegend, 1:10 á móti PBS). Tjáning yfirborðssameindanna á þeim hvítu blóðkornum sem einangraðar voru úr blóðsýni með þessari aðferð var skoðuð með mælingum í MACSQuant Analyzer. Samsetningu mótefna í FACS keyrsluglössin má sjá í töflu 2.

Tafla 2. Mótefnalitun fyrir yfirborðssameindum.
Frumur voru litaðar með flúrmerktum mótefnum með sértækni fyrir tilteknum yfirborðssameindum. Í töflunni gefur að líta hvaða mótefni hin 4 mismunandi glösa innihéldu.

Litir	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4
FITC	CD19	CLA	CCR7	IgG1/IgM
PE	CD56	CCR4	CXCR4	IgG1
APC	CD83	CXCR6	CXCR6	IgG1
PerCP	CD3	CD3	CD3	CD3
PE-Cy7	CD4	CD11c	CD11c	CD11c
Pacific blue	CD14	CD4	CD4	CD4
APC-Cy7	CD8	CD8	CD8	CD8

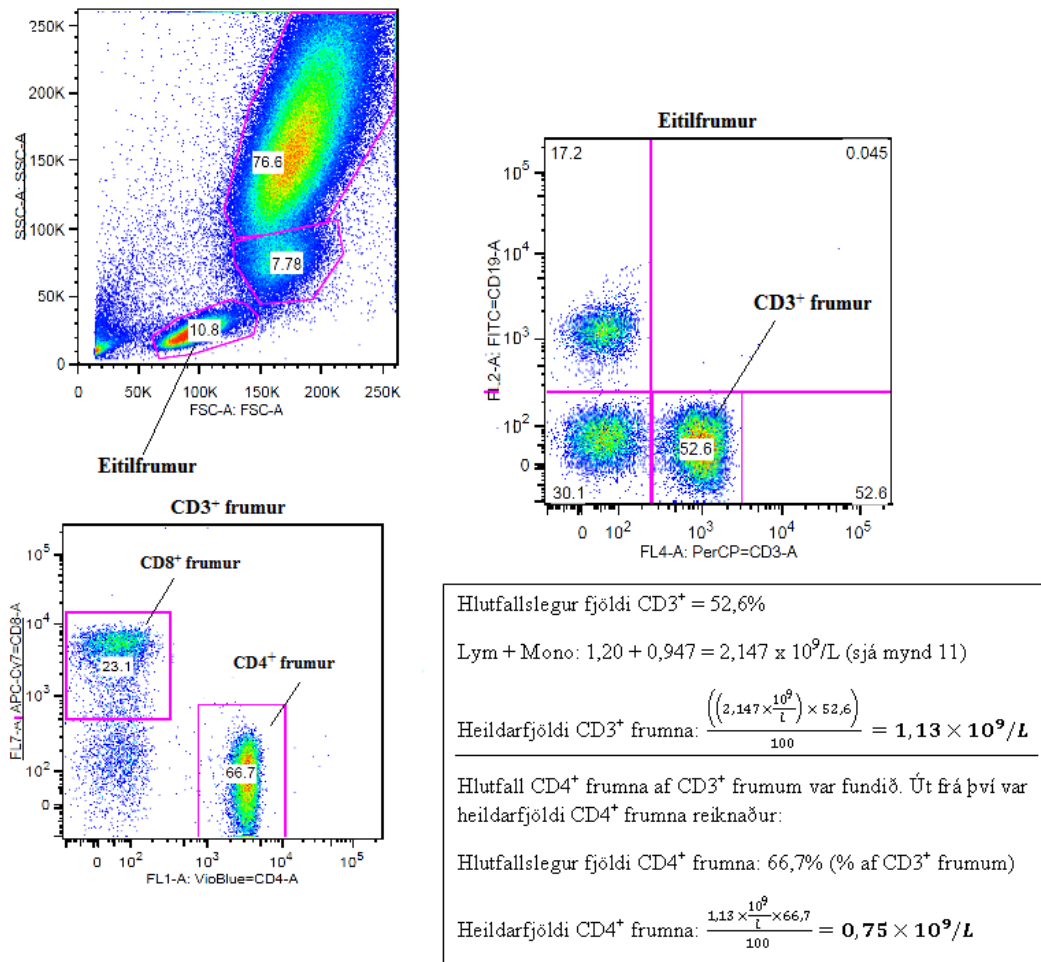
2.4 Mæling á tjáningu yfirborðssameinda með frumuflæðisjá

Tjáning þeirra yfirborðssameinda, sem litað var fyrir, var mæld í MacsQuant Analyzer (Milteny Biotec) á rannsóknarstofu í blóðmeinafræði, í K-byggingu Landspítalans við Hringbraut. Tækið telur frumur sem tjá þær yfirborðssameindir sem litað er fyrir. Með því móti má meta tjáningu ákveðinna yfirborðssameinda með tilliti til þess hversu hátt hlutfall frumna tjáir þá sameind og hvort sú tjáning einskorðist við eina eða fleiri frumugerðir.

2.5 Úrvinnsla gagna

Úrvinnsla úr gögnum sem fengust við mælingar í MacsQuant Analyzer fór fram í FlowJo frá Tree Star. Heildarfjöldi einkjarna frumna var reiknaður út frá mælingum á hlutfallslegum fjölda (FlowJo) annar vegar og á heildarfjölda (Cell-Dyn) þeirra hins vegar.

Á mynd 12 má sjá sýnidæmi fyrir útreikninga á heildarfjölda CD3⁺ frumna. Fyrst var hlutfall eitelfrumna fundið. Síðan var hlutfall CD3⁺ frumna af eitelfrumum fundið. Með því að styðjast við gögn sem fengin voru með heildartalningu á hvítum blóðkornum (sjá mynd 11) var heildarfjöldi CD3⁺ frumna fundinn. Hlutfallsleg tjáning CD4 og CD8 viðtakanna á CD3⁺ frumum var fundin til þess að finna heildarfjölda CD3⁺ CD4⁺ og CD3⁺CD8⁺ T-frumna.



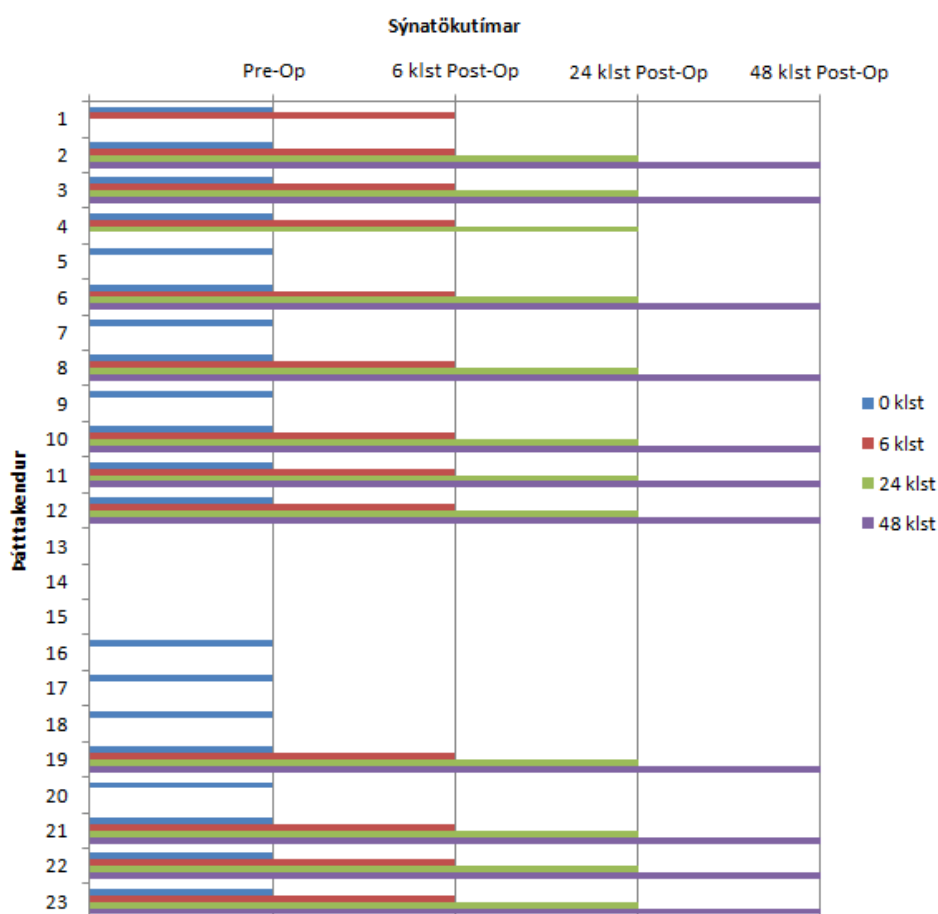
Mynd 12. Sýnidæmi um útreikninga á heildarfjölda frumna út frá hlutfallslegum fjölda CD3⁺ frumna og heildarfjölda einkyrninga (Lym + Mono). Einnig er sýnt hvernig heildarfjöldi CD3⁺CD4⁺ frumna var reiknaður út frá hlutfallslegri tjáningu CD4 viðtakans á CD3⁺frumum. Myndirnar eru dæmi um það hvernig gögnin líta í út í FlowJo.

Meðaltöl og staðalfrávik voru reiknuð í Microsoft Excel. Töflur og myndir voru settar upp í Microsoft Excel. Tölfræðiforritið GraphPad Prism var notað til að meta marktækni með þörfu t-prófi.

3 Niðurstöður

3.1 Þátttakendur og sýnataka

Af þeim 23 einstaklingum sem samþykktu þátttöku náðu 11 einstaklingar að ljúka sýnatökuferlinu (sjá mynd 13). Níu einstaklingar hættu þátttöku vegna blóðgjafar eftir aðgerð. Þar af voru sjö sem fengu blóðgjöf skömmu eftir aðgerð, einn vegna blóðgjafar að kvöldi aðgerðardags og annar vegna blóðgjafar að kvöldi annars dags. Að auki þurftu þrír einstaklingar að hætta þátttöku vegna tæknilegra örðugleika sem gerðu það að verkum að ekki reyndist unnt að framkvæma mælingar á blóðsýnum úr þeim.



Mynd 13. Brottfall þátttakenda úr rannsókninni vegna blóðgjafar og tæknilegra örðugleika. Röð þátttakenda á myndinni er í samræmi við aðgerðarröð þeirra, þ.e. einstaklingur nr. 1 var fyrsti þátttakandinn o.s.frv.

3.2 Talning á heildarfjölda hvítra blóðkorna

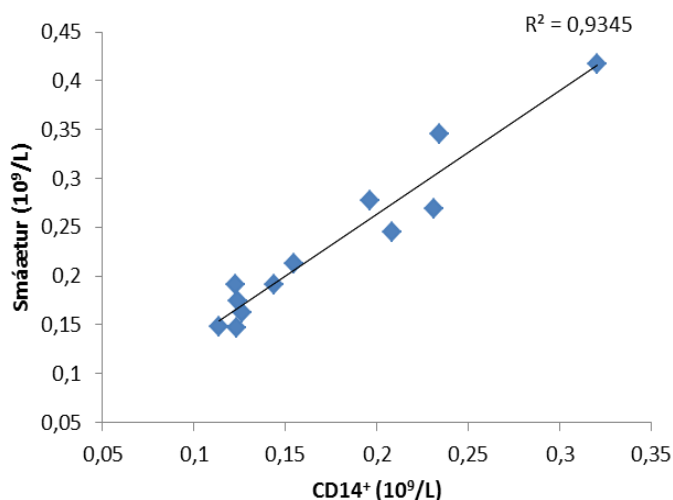
Niðurstöður mælinga á þeim fjölda frumugerða sem mældur var í sjálfvirka frumutalningartækinu Cell-Dyn 3200 má sjá í töflu 3. Fjöldi hvítra blóðkorna eykst marktækt ($P < 0,0001$) í kjölfar aðgerðarinnar og nær hámarki 6 klst eftir aðgerð. Frá 6 klst

til 24 klst eftir aðgerð dregur marktækt úr fjölda hvíttra blóðkorna ($P < 0,001$). Fjöldi hvíttra blóðkorna 24 klst og 48 klst eftir aðgerð helst þó marktækt hærri en fyrir aðgerð ($P < 0,001$). Fjöldi dauffrumna fylgir sama mynstri; fjöldi þeirra eykst marktækt eftir aðgerð ($P < 0,0001$) og nær hámarki 6 klst eftir aðgerð. Það verður marktæk lækkun á fjölda dauffrumna frá 6 klst til 24 klst ($P < 0,001$). Fjöldi dauffrumna er enn marktækt hærri 24 klst og 48 klst eftir aðgerð miðað við fjölda þeirra fyrir aðgerð ($P < 0,001$). Engar marktækar breytingar mælast á fjölda eitilfrumna eða smáæta í kjölfar aðgerðar.

Tafla 3. Meðaltöl og staðalfrávik mælinga úr Cell-Dyn 3200 frumutalningartækinu.

Tími	Hvítfrumur	Dauffrumur	Eitilfrumur	Smáætur
0 klst	6,2 ±2,1	3,4 ±2,0	2,0 ±0,33	0,24 ±0,08
6 klst	11,3 ±2,3	8,5 ±1,8	1,8 ±0,38	0,21 ±0,08
24 klst	8,4 ±1,7	6,0 ±1,4	1,4 ±0,40	0,23 ±0,13
48 klst	8,6 ±2,0	6,0 ±1,5	1,5 ±0,45	0,23 ±0,15

Heildarfjöldi frumna var reiknaður út frá mælingum í tveimur mælitækjum; Cell-Dyn 3200 og MacsQuant Analyzer. Á mynd 14 er lagt mat á það hvernig mælingar úr tækjunum samræmast hver annarri.

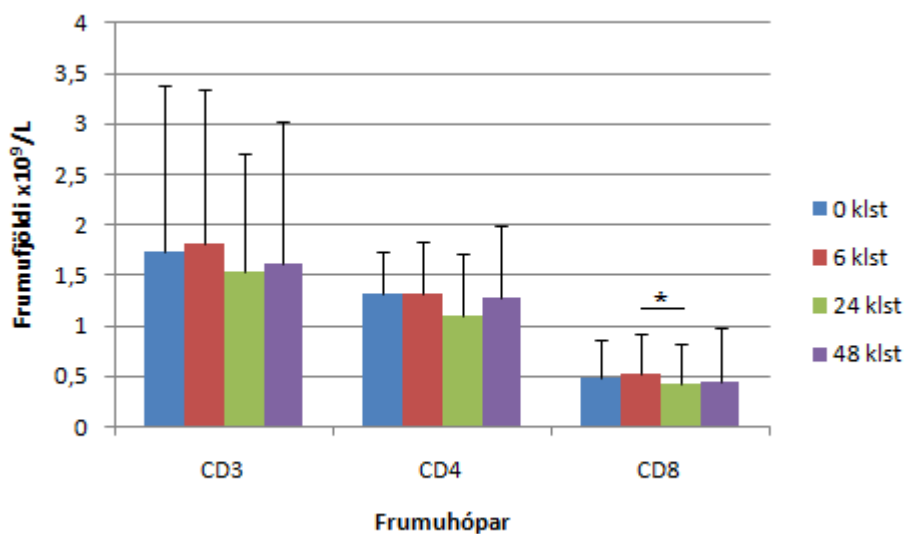


Mynd 14. Mat á samræmi mælinga milli Cell-Dyn 3200 (smáætur) og MacsQuant Analyzer (CD14⁺).

3.3 Mæling á tjáningu yfirborðssameinda með frumuflæðisjá

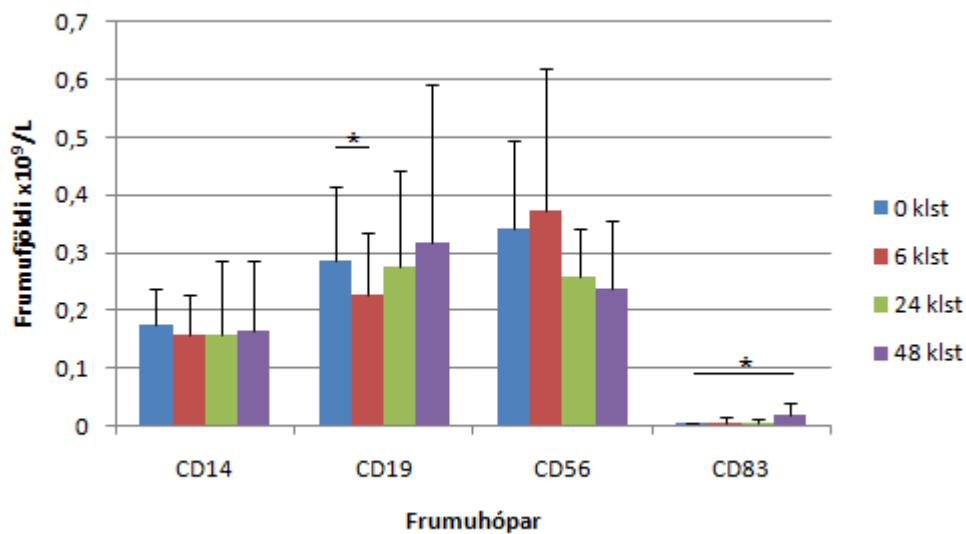
3.3.1 Heildarfjöldi frumuhópa

Samanburður var gerður á heildarfjölda frumuhópa á milli mismunandi tímapunkta, fyrir og eftir aðgerð. Á mynd 15 má sjá mældan heildarfjölda CD3⁺, CD4⁺ og CD8⁺ frumna. Engin marktæk breyting sást á fjölda CD3⁺ og CD4⁺ frumna. Það mældist marktæk lækkun á fjölda CD8⁺ frumna frá 6 klst til 24 klst eftir aðgerð.



Mynd 15. Heildarfjöldi frumuhópa á hinum 4 mismunandi sýnatökutímum; fyrir aðgerð (0), 6 klst eftir aðgerð (6), 24 klst eftir aðgerð (24) og 48 klst eftir aðgerð (48).

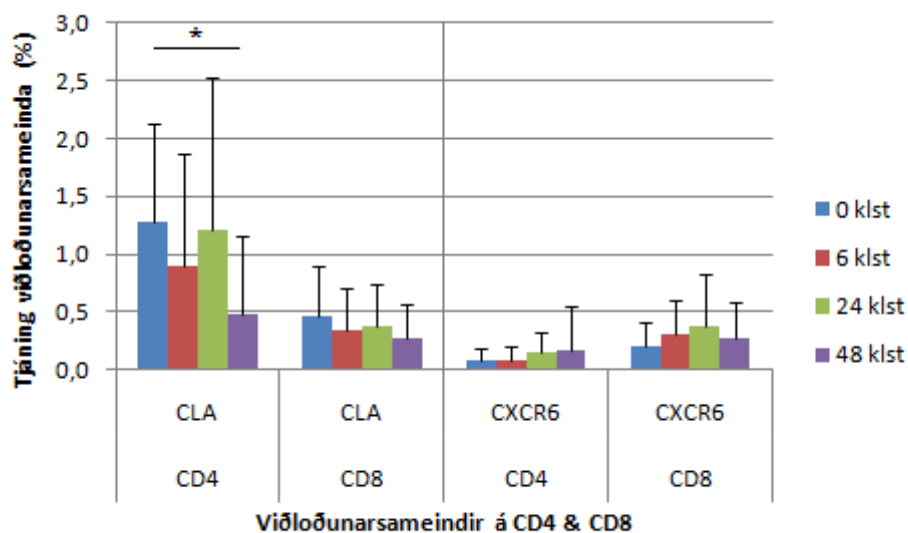
Á mynd 16 má sjá niðurstöður samskonar samanburðar á heildarfjölda CD14⁺, CD19⁺, CD56⁺ og CD83⁺. Engin marktæk breyting sást fyrir fjölda CD14⁺ frumna (smáæta). Fjöldi CD19⁺ frumna lækkaði marktækt 6 klst eftir aðgerð miðað við fjöldann fyrir aðgerð, en fjölgaði síðan aftur í sama fjölda og fyrir aðgerð. Fjöldi CD56⁺ frumna breyttist ekki marktækt á neinum tímapunkti. Hjá CD83⁺ frumum varð marktæk aukning á frumufjölda 48 klst eftir aðgerð miðað við fjöldann fyrir aðgerð.



Mynd 16. Heildarfjöldi frumuhópa á hinum 4 mismunandi sýnatökutímum; fyrir aðgerð (0), 6 klst eftir aðgerð (6), 24 klst eftir aðgerð (24) og 48 klst eftir aðgerð (48).

3.3.2 Tjáning viðloðunarsameinda

Mynd 17 sýnir hlutfallslega tjáningu viðloðunarsameindanna CLA og CXCR6 á CD4⁺ og CD8⁺ frumum á hinum fjóru mismunandi tímapunktum. Marktæk lækkun varð á tjáningu CLA á CD4⁺ frumum 48 klst eftir aðgerð. Engar marktækar breytingar sáust á tjáningu CLA á CD8⁺ frumum í kjölfar aðgerðarinnar.



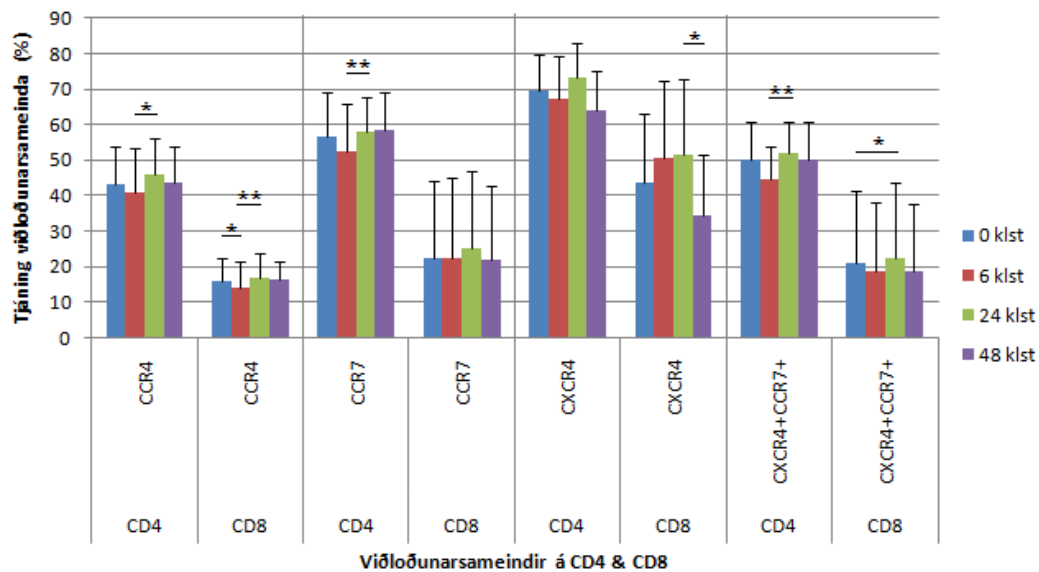
Mynd 17. Hlutfallsleg tjáning CLA og CXCR6 viðloðunarsameinda á CD4⁺ og CD8⁺ frumum.

Hlutfallsleg tjáning viðloðunarsameindanna CCR4, CCR7 og CXCR4 á CD4⁺ og CD8⁺ frumu sést á mynd 18. Einnig var hlutfall frumna sem tjáðu bæði CXCR4 og CCR7 skoðað. Tjáning CCR4 á CD4⁺ frumunum hækkaði marktækt 24 klst eftir aðgerð miðað við tjáninguna 6 klst eftir aðgerð. Tjáning CCR4 á CD8⁺ frumum sýndi marktæka lækkun 6 klst eftir aðgerð en hækkaði síðan marktækt 24 klst eftir aðgerð.

Það varð marktæk lækkun á tjáningu CCR7 eftir aðgerð á milli 6 klst og 24 klst hjá CD4⁺ frumum. Engin marktæk breyting sást á tjáningunni milli tímamarkna hjá CD8⁺ frumum.

Engin marktæk breyting sást á tjáningu CXCR4 eftir aðgerð hjá CD4⁺ frumum. Hjá CD8⁺ frumum sást marktæk lækkun á tjáningu CXCR4 eftir aðgerð frá 24 klst til 48 klst.

Hlutfallslegur fjöldi CD4⁺ og CD8⁺ frumna sem tjáir bæði CXCR4 og CCR7 á yfirborði sínu var einnig athugaður. Á milli 6 klst og 24 klst sást marktæk aukning á hlutfalli CD4⁺ sem tjáðu báðar viðloðunarsameindirnar. Hlutfall CD8⁺ frumna sem tjáði bæði CXCR4 og CCR7 jókst marktækt 24 klst eftir aðgerð.



Mynd 18. Hlutfallsleg tjáning viðloðunarsameindanna CCR4, CCR7 og CXCR4 á CD4⁺ og CD8⁺ frumum.

Tjáning CD11c viðtakans reyndist ósértækari en gert hafði verið ráð fyrir. Af þeim sökum var ekki hægt að greina tjáninguna nógu nákvæmlega. Þar af leiðandi var ekki unnið frekar með þau gögn sem fengust með mælingum á tjáningu CD11c.

4 Umræður

Liðskiptaaðgerð á mjöðm hefur áður verið notuð sem rannsóknarmódel til þess að rannsaka bólguferilinn vegna þess hversu kröftugt bólgusvar verður í kjölfar þeirrar stöðluðu skurðaðgerðar sem liðskipti eru. Markmið þessa rannsóknarverkefnis var að skoða viðbrögð tiltekinna frumugerða ónæmiskerfisins og viðloðunarsameinda þeirra í bráðu bólgusvari og þannig reyna að endurspeglar ræsingu ónæmiskerfisins. Upphaflega stóð til að safna sýnum úr 10 – 12 einstaklingum en þegar sýnasöfnun lauk höfðu 23 þátttakendur samþykkt þátttöku og hafið rannsóknina. Af þessum 23 þurftu níu einstaklingar, eða 39% þátttakenda, að hætta þátttöku vegna þess að þeir þurftu á blóðgjöf að halda í kjölfar aðgerðarinnar. Það er mun meira brotfall en sést hefur í fyrri rannsóknum sem stuðst hafa við sama rannsóknarmódel hér á landi (Bjornsson et al. 2007). Áhugavert væri að kanna nánar algengi blóðgjafar í kjölfar aðgerða sem þessarar og hvort rúmlega þriðji hver sjúklingur sé í raun í þörf á blóðgjöf. Auk þessara níu einstaklinga, sem þurftu frá að hverfa vegna blóðgjafar, þá var ekki hægt að framkvæma mælingar á sýnum úr þremur einstaklingum vegna tæknilegra örðugleika. Ellefu sjúklingar luku öllum rannsóknarferlinum og sitt hvor þátttakandinn lauk fyrsta og öðrum rannsóknardeginum, eða samtals 13 sjúklingar sem liggja að baki rannsóknarniðurstöðunum. Megin niðurstöður sýndu umtalsverða fjölgun á daufrumum en minni sérhæfa svörun með tilliti til viðloðunarsameinda og sértækra frumuflokka, sem endurspeglar óverulega ræsingu á starfsemi verkfrumna áunna ónæmiskerfisins.

Til þess að finna tölur fyrir heildarfjölda frumuhópa þá þurfti að styðjast við mælingar úr tveimur mismunandi mælitækjum; Cell-Dyn 3200 og MacsQuant Analyzer. Cell-Dyn 3200 er sjálfvirk frumutalningartæki sem mælir m.a. fjölda hvíttra blóðkorna í blóðsýni og hlutfall tiltekinna frumuhópa af þeim fjölda (sjá mynd 11). MacsQuant Analyzer er frumuflæðisjá sem gefur hlutfallslega tjáningu yfirborðsviðtaka á þeim frumugerðum sem áhugi er fyrir að mæla hverju sinni. Til þess að sýna fram á að mælingar úr þessum tveimur tækjum væru sambærilegar og hægt væri að nota þær til þess að finna heildarfjölda frumuhópa þá voru mælingar á fjölda CD14⁺ frumna (MacsQuant Analyzer) og smáæta (Cell-Dyn 3200) bornar saman og settar upp á mynd 14. Niðurstaðan gefur til kynna hátt R²-gildi eða upp á 0,9345 sem telst ásættanlegt.

4.1 Heildarfjöldi frumuhópa

Talsverðar sveiflur verða á heildarfjölda daufrumna sem eykst u.þ.b. þrefalt á fyrstu sex klukkustundunum í kjölfar aðgerðarinnar en þeim fækkar síðan á ný 24 klst eftir aðgerð, þó að fjöldi þeirra sé enn meiri á öðrum aðgerðardegi miðað við fjölda þeirra fyrir aðgerð. Hækkunin sem verður strax í kjölfar aðgerðar mældist vel marktæk sem og lækkunin sem verður eftir það. Sú aukning sem verður á fjölda daufrumna er í samræmi við að þetta sé sú frumugerð sem taki einna fyrst við sér í bólgusvari (Kumar & A. Sharma 2010). Þessar niðurstöður haldast einnig í hendur við kraftmikla ræsingu kompliment kerfisins í kjölfar aðgerðar (Þórðardóttir, S 2008) og aukningu IL-6, en styrkur þess nær hámarki 6 klst eftir aðgerð (Bjornsson et al. 2007). IL-6 er einmitt talið örva virkni daufrumna í bólgusvari og losa um hreyfanleika þeirra (Lin et al. 2000). Þannig þarf ekki að vera að um beina fjölgun daufrumna að ræða heldur endurspeglar þetta frekar aukna „umferð“ þessara hvítu blóðkorna í blóðrásinni.

Nokkuð óvænt sýndu niðurstöður mælinga á heildarfjölda smáæta ($CD14^+$) enga marktæka breytingu eftir aðgerð. Það gefur til kynna að fjöldi stóræta í vefjum sé ekki að aukast, en smáætur aðgreinast í stórætur þegar þær skríða yfir æðapél og út í vefi. Við myndum því búast við að sjá fækkun í fjölda þeirra ef stórætum væri að fjölga í vefjum. Vitað er að IL-6 er m.a. seytt frá virkum stórætum í vefjum (Murphy, K et al. 2008). Þessar niðurstöður gefa því ekki til kynna að sú aukning sem lýst hefur verið á styrk IL-6 eigi uppruna sinn að rekja til stóræta á skurðsvæðinu. Hins vegar mætti álíta að möguleg skýring í því sambandi sé að IL-6 hækkunin sé til komin vegna skemmda í æðapéli samhliða skurðinngrípinu, en sýnt hefur verið fram á samband þar á milli (Winkelman 2004).

Engar marktækar breytingar mældust á fjölda T-frumna á því tímabili sem mælt var, ef undan er skilin marktæk lækkun á fjölda $CD8^+$ frumna 24 klst eftir aðgerð samanborið við 6 klst eftir aðgerð. Fjöldi $CD3^+$ frumna helst nokkuð stöðugur allan rannsóknartímann. Það sama á við um fjölda $CD4^+$ og $CD8^+$ frumna upp að vissu marki. Niðurstöður mælinga á fjölda B-frumna ($CD19^+$) sýndu hins vegar fram á marktæka lækkun á fjölda þeirra í kjölfar aðgerðar. Fjöldinn eykst síðan á ný 24 klst eftir aðgerð en sú aukning mældist ekki marktæk. Þessar niðurstöður, á mælingum helst verkfrumna áunna ónæmiskerfisins, benda ekki til þess að virkni áunna ónæmiskerfisins aukist á fyrstu sólarhringunum eftir aðgerð. Þó ber að geta þess að talið er að verkfrumur áunna kerfisins fari ekki að láta til sína taka í ónæmissvari fyrr en eftir fjóra til sjö daga frá upphaflegri ræsingi ónæmiskerfisins (Murphy, K et al. 2008). Því væri áhugavert að prófa að kanna þennan þátt með því að lengja rannsóknartímann og sjá hvort aðrar niðurstöður kæmu í ljós með tilliti til þessara verkfrumna.

Niðurstöður mælinga á fjölda NK-frumna ($CD56^+$) sýndu enga marktæka breytingu á rannsóknartímanum sem gefur til kynna að NK-frumur taki ekki þátt í því bólguvari sem verður í kjölfar aðgerðarinnar. Mæling á tjáningu $CD83$ viðtakans sýndi marktæka hækkun tjáningar 48 klst eftir aðgerð. $CD83$ viðtakinn er tjáður á yfirborði virkjaðra angafrumna. Þær niðurstöður benda til þess að angafrumur séu að virkjast í auknum mæli og þar sem þær frumur eru aðallega virkar sem sýnifrumur þá gæti sú aukning leitt til sterkara áunnins ónæmissvars m.t.t. T- og B-frumna. Á sama hátt og getið er að ofan væri áhugavert að fylgjast með tjáningu $CD83$ yfir lengra tímabil og sjá hvort hún myndi aukast enn frekar eftir því sem frá líður frá skurðaðgerðinni. Enn fremur væri áhugavert að skoða nánar þá þætti sem dempa ræsingi þessara verkfrumna áunna ónæmiskerfisins.

4.2 Tjáning viðloðunarsameinda

T-frumur gegna eftirlitishlutverki sínu með því að hringsóla um líkamann með blóðrás og vessaæðum. Þannig ferðast þær um þar til þær virkjast við tengingu við sýnifrumu með mótefnavaka á yfirborði sínu. Fari þeirra er miðlað af viðloðunarsameindum á yfirborði þeirra. Þar af leiðandi getur verið gagnlegt að mæla tjáningu viðloðunarsameindanna til þess að fylgjast með því hvort breyting verði á ratvísi þeirra í bráðu bólguvari sem myndi lýsa sér með breyttu tjáningarmynstri viðloðunarsameinda.

Helstu niðurstöður mælinganna á tjáningu viðloðunarsameinda á yfirborði T-frumna leiddi í ljós að tjáningin er að mestu leyti mismunandi á milli $CD4^+$ og $CD8^+$ frumna. Engar afgerandi breytingar sáust á tjáningu sameindanna innan frumuhópanna eftir aðgerð, þó marktækar breytingar hafi mælst í einstaka tilfellum. Tjáning $CXCR6$ mældist undir

1%, sem er í samræmi við niðurstöður rannsóknar Clark et al (skoða). CCR7 viðloðunarsameindin er tjáð á tæplega 60% CD4+ frumna og rúmlega 20% CD8+ frumna. Talið er að CCR7 og CXCR4 komi saman að því að miðla fari óvirkjaðra T-frumna til eitla (heimild sjá inngang). Þær niðurstöður sem fengust í þessari rannsókn styðja við þá kenningu þar sem sameindirnar eru samtjáðar á u.þ.b. 50% CD4+ frumna og u.þ.b. 20% CD8+ frumna.

Í samræmi við það að engin kröftug aukning mældist á fjölda T-frumna í kjölfar aðgerðarinnar þá virðast þær litlu sveiflur sem verða á tjáningu viðloðunarsameindanna ekki benda til þess að afgerandi breytingar verði á ratvísi þeirra, þ.e. þær sækja ekki kerfisbundið í auknum mæli í ákveðna vefi, en búast mætti við aukinni sækni T-frumna í mjúkvæfi og húð í kjölfar svo stórrar aðgerðar, sem og í sjálfan liðinn, þ.e. gerviliðinn, enda er hann framandi fyrir líkama sjúklingsins.

4.3 Styrkleikar og takmarkanir rannsóknarinnar

Styrkleikar rannsóknarinnar felast einna helst í því að rannsóknarmódel á borð við liðskiptaaðgerð á mjöðm er mjög staðlað módel þar sem auðvelt er að tímasetja áreitið og umfang þess. Enn fremur er allt ferlið staðlað með tilliti til umönnun sjúklinganna; það er sams konar svæfing/deyfing, sömu aðkomuefni notuð (sement og gerviliður) og allir þátttakendur fá sömu meðferð á uppvöknun eftir að aðgerð er lokið. Þátttakendur eru einnig einsleitir hópur að því leyti að þeir deila allir sömu sjúkdómseinkennum. Sjúklingar með þekktu undirliggjandi bólgusjúkdóma voru útilokaðir frá þátttöku sem og sjúklingar sem voru á lyfjameðferðum sem hugsanlega geta haft áhrif á bólgusvarið. Þetta rannsóknarmódel hefur einnig sannað gildi sitt, bæði hérlendis og erlendis, í rannsóknum á bólguferlinum. Rannsóknin var einnig unnin við fyrsta flokks aðstæður á rannsóknarstofu í blóðmeinafræði.

Einn af veikleikum rannsóknarinnar er smæð þýðisins. Æskilegra væri að hafa fleiri þátttakendur, en hafa ber í huga að hver sjúklingur gefur fjögur lífsýni þar sem gerðar voru níu sérhæfar og kostnaðarsamar mælingar, samtals 36 mælingar. Þannig voru framkvæmdar rúmlega 400 mælingar hjá þátttakendum í þessari rannsókn. Einnig væri nauðsynlegt að lengja rannsóknartímann upp í 10-14 daga og jafnvel með seinkomnu eftirfylgisprófi eftir tvo mánuði. Notkun liðskiptaaðgerðar sem rannsóknarmódel er þó þeim annmörkum háð að flestir sjúklinganna útskrifast af legudeildum á þriðja degi eftir aðgerð. Það getur því reynst kostnaðarasamt með tilliti til vinnu og tíma, bæði fyrir rannsakenda og þátttakendur sem fyrstu dagana eftir liðskiptin eru með skerta hreyfigetu.

4.4 Frekari rannsóknir

Í þessari rannsókn var unnið með frumhópa sem eru til staðar blóðrás. Áhugavert væri að geta rannsakað bólguferil bráðra bólguviðbragða, m.t.t. bólgumiðla og frumuhópa, í rannsóknarmódeli sem þessu með tilliti til virkni þessara þátta ónæmiskerfisins bæði í blóðrásinni sjálfri (sbr. þessa og fyrri rannsóknir) og einnig í sjálfum vefnum á skurðsvæðinu sjálfur, þ.e. í undirhúð og vöðvum en ekki síst í sjálfum gerviliðnum. Það myndi þó hafa í för með sér þó nokkuð tilstand með tilheyrandi sýkingarhættu sjúklinga vegna inniliggjandi dreina og slangna. Óvíst er þó hvort síðanefndir leyfðu þannig rannsóknir á mönnum.

Í framhaldi af þessari rannsókn og fyrri rannsóknum væri áhugavert að rannsaka nánar þann bólguferil sem verður eftir liðskiptaaðgerð á mjöðm, þ.e. uppruna bólgumiðlanna. Til dæmis mætti velta fyrir sér hvort IL-6 sé seytt frá stórætum eða æðapeli á skurðsvæðinu. Enn fremur er áhugavert að kanna magn beinvísa í kjölfar aðgerðar sem þessarar og setja það í samband við bæði bólgusvarið og kortísól seytingu. Þá væri fróðlegt að kanna nánar algengi og ástæðu blóðgjafar í kjölfar liðskiptaaðgerða sem og áhrif mismunandi aðgerðar- og svæfingartækni á fyrr nefnda bólguferla.

5 Ályktun

Niðurstöður þessa rannsóknarverkefnis sýna fram á að af þeim frumugerðum sem fylgst var með þá virðast daufrumur taka mestan þátt í þeim bráðu bólgusvörum sem verða í kjölfar aðgerðarinnar. Þá benda niðurstöður rannsóknarinnar til þess að ekki megi rekja hækkun í styrk IL-6 til þeirra frumugerða ónæmiskerfisins sem hér var fylgst með. Það verður ekki afgerandi ræsing á áunnum ónæmissvörum á því tímabili sem rannsóknin náði yfir. Í því samhengi væri áhugavert að skoða hvort lengra rannsóknartímabil og aukin sýnasöfnun myndi leiða til annarrar niðurstöðu.

Heimildir

- Andrew, D.P. et al., 2001. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(1), pp.103-111.
- Bilgen, O. et al., 2001. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *The Journal of International Medical Research*, 29(1), pp.7-12.
- Bjornsson, G.L. et al., 2007. Inflammatory cytokines in relation to adrenal response following total hip replacement. *Scandinavian Journal of Immunology*, 65(1), pp.99-105.
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), pp.657-670.
- Boumpas, D.T. et al., 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Annals of Internal Medicine*, 119(12), pp.1198-1208.
- Bunescu, A. et al., 2002. Increases in circulating levels of monocyte-platelet and neutrophil-platelet complexes following hip arthroplasty. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 102(3), pp.279-286.
- Calcagni, E. & Elenkov, I., 2006. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, pp.62-76.
- Clark, R.A. et al., 2006. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(7), pp.4431-4439.
- DiPietro, L.A., 1995. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock (Augusta, Ga.)*, 4(4), pp.233-240.
- Ebert, L.M., Schaerli, P. & Moser, B., 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Molecular Immunology*, 42(7), pp.799-809.
- Felson, D.T. et al., 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*, 133(8), pp.635-646.
- Förster, R. et al., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1), pp.23-33.
- Glass, G.G., 2006. Osteoarthritis. *Disease-a-Month*, 52(9), pp.343-362.

- Hall, G.M. et al., 2000. Hip and knee arthroplasty: a comparison and the endocrine, metabolic and inflammatory responses. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 98(1), pp.71-79.
- Hall, G.M. et al., 2001. Relationship of the functional recovery after hip arthroplasty to the neuroendocrine and inflammatory responses. *British Journal of Anaesthesia*, 87(4), pp.537-542.
- Huo, M.H. et al., 2010. What's new in total hip arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 92(18), pp.2959-2972.
- Høgevoid, H.E. et al., 2000. Changes in plasma IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 after total hip replacement surgery in general or regional anaesthesia. *Cytokine*, 12(7), pp.1156-1159.
- Ingvarsson, T. et al., 1999. Incidence of total hip replacement for primary osteoarthritis in Iceland 1982-1996. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 70(3), pp.229-233.
- Ingvarsson, T. et al., 2000. The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis and Rheumatism*, 43(12), pp.2785-2792.
- Kim, C.H. et al., 2001. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(5), pp.595-601.
- Kumar, V. & Sharma, A., 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10(11), pp.1325-1334.
- Kurtz, S. et al., 2007. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89(4), pp.780-785.
- Laiho, K. et al., 2001. Rise in serum C reactive protein after hip and knee arthroplasties in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(3), pp.275-277.
- Lin, E., Calvano, S.E. & Lowry, S.F., 2000. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), pp.117-126.
- Malemud, C.J., 1993. The role of growth factors in cartilage metabolism. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 19(3), pp.569-580.
- McCullough, K.C. & Summerfield, A., 2005. Basic concepts of immune response and defense development. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 46(3), pp.230-240.
- Murphy, Kenneth, Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway's immuno biology*. 7th ed., New York: Garland Science.
- Pelletier, J.P. et al., 1993. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 19(3), pp.545-568.

- Phillips, R. & Ager, A., 2002. Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *European Journal of Immunology*, 32(3), pp.837-847.
- Rahman, M., 2006. Introduction to flow cytometry. Serotec. Sótt 20. apríl 2011. <http://keck.bioimaging.wisc.edu/Neuro670/Introduction%20to%20Flow%20Cytometry.pdf>
- Sanz, I. et al., 2008. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 20(1), pp.67-82.
- Serhan, C.N. & Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, 6(12), pp.1191-1197.
- Sigmundsdóttir, H et al., 2001. The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 126(2), pp.365-369.
- Sigmundsdóttir, Hekla et al., 2004. Differential effects of interleukin 12 and interleukin 10 on superantigen-induced expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) and alphaEbeta7 integrin (CD103) by CD8+ T cells. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 111(1), pp.119-125.
- Silverthorn, D., 2010. *Human physiology: an integrated approach* 5th ed., Upper Saddle River N.J.: Pearson Education.
- Skapenko, A. et al., 2005. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 7 Suppl 2, pp.S4-14.
- Soehnlein, O. & Lindbom, L., 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 10(6), pp.427-439.
- Soler, D. et al., 2003. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood*, 101(5), pp.1677-1682.
- Taghizadeh, R. et al., 2010. CXCR6, a newly defined biomarker of tissue-specific stem cell asymmetric self-renewal, identifies more aggressive human melanoma cancer stem cells. *PloS One*, 5(12), p.e15183.
- Winkelman, C., 2004. Inactivity and inflammation: selected cytokines as biologic mediators in muscle dysfunction during critical illness. *AACN Clinical Issues*, 15(1), pp.74-82.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), pp.389-395.
- Ziegler-Heitbrock, L., 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), pp.584-592.
- Þórðardóttir, S. 2008. Ræsing komplimentkerfisins í bráða bólgusvari með liðskiptaaðgerð á mjöðm vegna slitgigtar sem rannsóknarmódel.

