



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ

ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΣΗΠΤΗΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ"

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ Χ. ΣΑΜΑΡΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Λάρισα, 2012

© 2012 Σταυρούλα Σαμαρά

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) Δρ. Κωνσταντίνος Ν. **Μαλίζος**
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Παναγούλα **Κόλλια**
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ζωή **Νταϊλιάνα**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Εμμανουήλ **Καναβάκης**
Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Κουκούλης**
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ασπασία **Τσέζου**
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας.
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Σωκράτης **Βαρυτιμίδης**
Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στους γονείς μου, Ερμιόνη και Χρήστο

και στην αδερφή μου Νικολέττα.....

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, το Εργαστήριο Γενετικής Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) καθώς και το Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας και Τεχνολογίας Λάρισας.

Φτάνοντας στο τέλος αυτής της προσπάθειας, αισθάνομαι ευγνώμων που είχα την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη διατριβή και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνέβαλαν σε αυτή, ο καθένας με τον δικό του ξεχωριστό τρόπο.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής μου, τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Κωνσταντίνο Μαλίζο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την έρευνα, όσο και για την επιστημονική καθοδήγηση, την επίβλεψη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στις άλλες δύο κυρίες της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κυρία Ζωή Νταϊλιάνα και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ κυρία Παναγούλα Κόλλια. Τις ευχαριστώ θερμά τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση και την επίβλεψη, όσο και για την εμπιστοσύνη, τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσαν, αλλά και την υποστήριξη (επαγγελματική και προσωπική) που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής, ΕΚΠΑ κύριο Εμμανουήλ Καναβάκη, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Γεώργιο Κουκούλη, την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κυρία Ασπασία Τσέζου και τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Σωκράτη Βαρυτιμίδα, που δέχθηκαν να συμμετάσχουν και να βοηθήσουν με τις παρατηρήσεις τους στην ορθή συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και συναδέλφους Χρήστο Χασανίδη, Θεοδώρα Κορομηλά, Ιωάννα Χιώτογλου, Ανδρομάχη Βαγενά και Μαρία Σαμαρά για την μεγάλη βοήθεια, την άψογη συνεργασία και για τη συνολική υποστήριξη. Επίσης πολλές ευχαριστίες στην ιατρό Λουκία Παπαθεοδώρου αλλά και στους υπόλοιπους ιατρούς και το προσωπικό της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για τη συνεργασία αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν σε κλινικά ζητήματα.

Τέλος πάνω από όλους οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου Ερμιόνη και Χρήστο και την αδερφή μου Νικολέττα για την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια. Με τη δική τους στήριξη, κατάφερα να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις των σπουδών μου και να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή.

Σταυρούλα Σαμαρά

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- **Samara S, Kollia P, Dailiana Z, Chassanidis C, Papatheodorou L, Koromila T, Malizos KN:** Predictive Role of Cytokine Gene Polymorphisms for the Development of Avascular Necrosis (AVN). *Disease Markers* 2012 Sep 13 [Ahead of Print].

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψεις των ανακοινώσεων δημοσιεύτηκαν στα:

- **Journal of Bone and Joint Surgery 2009** (περίληψεις No 123 & 141 & 142).
- **Proceedings of the 2010 Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS)** (περίληψη No 118)

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **64ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Ε.Ε.Χ.Ο.Τ., 2008, Αθήνα, Ελλάδα:**
Σαμαρά Σ, Χασανίδης Χ, Νταϊλιάννα Ζ, Παπαθεοδώρου Λ, Κόλλια Π, Μαλίζος ΚΝ: Επίπεδα mRNA των γονιδίων οστεοπροτεγερίνης, RANK, RANKL στην μηριαία κεφαλή ασθενών με άσηπτη νέκρωση.
- **6ο Ετήσιο Συνέδριο Τμήματος Ορθοπαιδικής Έρευνας, 2009, Αθήνα, Ελλάδα:**
Σαμαρά Σ, Νταϊλιάννα Ζ, Χασανίδης Χ, Κορομηλά Θ, Παπαθεοδώρου Λ, Μαλίζος ΚΝ, Κόλλια Π: Μελέτη της έκφρασης των BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) σε Μηριαίες Κεφαλές Ασθενών με Άσηπτη Νέκρωση (AVN).
- **65^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Ε.Ε.Χ.Ο.Τ., 2009, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα:**
 - Σαμαρά Σ, Νταϊλιάννα Ζ, Μαλίζος ΚΝ, Βαρυτιμίδης Σ, Χασανίδης Χ, Κορομηλά Θ, Κόλλια Π: Μελέτη της έκφρασης των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) σε μηριαίες κεφαλές ασθενών με άσηπτη νέκρωση.
 - Σαμαρά Σ, Κόλλια Π, Νταϊλιάννα Ζ, Χασανίδης Χ, Παπαθεοδώρου Λ, Κορομηλά Θ, Μαλίζος ΚΝ: Προγνωστικός ρόλος των πολυμορφισμών των γονιδίων των κυτταροκινών στην εμφάνιση της άσηπτης νέκρωσης.

- **66ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Ε.Ε.Χ.Ο.Τ, 2010, Αθήνα, Ελλάδα:**
Σαμαρά Σ, Νταϊλιάννα Ζ, Χασσανίδης Χ, Κορομηλά Θ, Κόλλια Π, Μαλίζος ΚΝ: Έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ισορροπία οστεοβλαστών-οστεοκλαστών σε ασθενείς με άσηπτη νέκρωση.

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **10th European Congress of European Federation of National Association of Orthopaedics and Traumatology, EFFORT, 2009 ,Vienna, Austria:**
Samara S, Kollia P, Chassanidis C, Koromila T, Papatheodorou L, Malizos K, Dailiana Z: Osteoprotegrin, RANK and RANKL expression in the femoral head of patients with AVN
- **AAOS Annual Meeting, March 9-13, 2010 , New Orleans , USA:**
Samara S, Dailiana Z, Chassanidis C, Koromila T, Papatheodorou L, Kollia P, Malizos ΚΝ: Osteoprotegerin, RANK and RANKL Expression in the Femoral Head of Patients with Avascular Necrosis (AVN)

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- **European Human Genetics Conference, 2007, Nice, France:**
Samara S, Chassanidis C, Dimitroulias A, Dailiana Z, Koromila T, Malizos ΚΝ, Kollia P: Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of osteonecrosis.
- **10th European Congress of European Federation of National Association of Orthopaedics and Traumatology, EFFORT, 2009 ,Vienna, Austria:**
 - Samara S, Dailiana Z, Chassanidis C, Dimitroulias A, Koromila T, Kollia P, Malizos ΚΝ: Predictive role of cytokine gene polymorphisms for the development of osteonecrosis
 - Samara S, Dailiana Z, Chassanidis C, Koromila T, Papatheodorou L, Malizos K, Kollia P: Expression profile of BMPS in the femoral head of patients with AVN.

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΣΗΠΤΗΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ "**

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΣΑΜΑΡΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- *(Επιβλέπων)*,
2. **Δρ. Παναγούλα Κόλλια**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ),
3. **Δρ. Ζωή Νταϊλιάννα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η οστεονέκρωση (ON) είναι μια νόσος που οδηγεί σε καταστροφή της μηριαίας κεφαλής (ΜΚ). Η ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών-οστεοκλαστών είναι πολύ σημαντική για την οστική μάζα και ορισμένα από τα μόρια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων είναι οι BMPs, η ομάδα των OPG-RANK-RANKL καθώς και οι κυτταροκίνες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η έκφραση των BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, OPG, RANKL και RANKL σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο, στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή των ΜΚ ασθενών με ON. Επίσης μελετήθηκε η παρουσία ή απουσία πολυμορφισμών των γονιδίων των κυτταροκινών IL-1α/IL-1R/IL-1RA/IL-4Rα/IL-1β/IL-12/γIFN/TGF-β/TNF-α/IL-2/IL-4/IL-6/IL-10 σε ασθενείς με ON.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ: Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων μελετήθηκε με ποσοτική RT-PCR σε φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή 42 ΜΚ, που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής ισχίου. Τα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών μελετήθηκαν με τη Western Blot ανάλυση. Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς των κυτταροκινών, απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα 112 ασθενών με ON και 438 φυσιολογικών ατόμων. Το DNA μελετήθηκε με την PCR-SSP μέθοδο και τη χρήση του Protrans kit. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χ^2 -test ($p < 0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Τα επίπεδα mRNA μεταγράφων των BMP-2 και BMP-6 γονιδίων ήταν υψηλότερα στη φυσιολογική περιοχή σε σχέση με τη νεκρωτική (BMP-2 και BMP-6, φυσιολογική vs νεκρωτική: 16,8 vs 6,8 και 1,75 vs 1,64, αντίστοιχα) σε αντίθεση με την BMP-4 που ήταν υψηλότερη στη νεκρωτική περιοχή. Τα επίπεδα

μεταγράφων OPG, RANKL και RANK ήταν υψηλότερα στη νεκρωτική περιοχή (φυσιολογική vs νεκρωτική, OPG: 3,53 vs 4,45, RANK: 0,83 vs 0,98, RANKL: 0,27 vs 0,77). Στο πρωτεϊνικό επίπεδο, η BMP-2 ήταν υψηλότερη στη φυσιολογική περιοχή, ενώ οι BMP-4 και BMP-6 στη νεκρωτική (φυσιολογική vs νεκρωτική: BMP-2: 0,67 vs 0,64, BMP-4: 0,51 vs 0,61, BMP-6: 0,52 vs 0,56). Η έκφραση της BMP-7, τόσο σε γονιδιακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, δεν εμφάνισε καμία διαφορά μεταξύ φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής. Επίσης τόσο η πρωτεΐνη OPG όσο και η RANKL ήταν υψηλότερες στη νεκρωτική περιοχή (φυσιολογική vs νεκρωτική, OPG: 0,57 vs 0,62, RANKL: 0,48 vs 0,50), ενώ η RANK δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί. Τέλος από την γονοτύπηση των κυτταροκινών προέκυψε πως οι γονότυποι TC (θέση -889) της IL-1α και ο GA (θέση -238) του TNFα είναι συχνότεροι στους ασθενείς σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, ενώ αντίθετα ο γονότυπος CC (codon 25) του TGF-β και ο GG (θέση -1082) της IL-10 είναι συχνότεροι στα φυσιολογικά άτομα ($p < 0.05$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των BMPs και των OPG-RANK-RANKL γονιδίων μεταξύ φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής υποδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο αλλά και τη διαφορετικού βαθμού συμμετοχή των μορίων αυτών στην ανάπτυξη της ON. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ένα διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης των παραπάνω γονιδίων ανάμεσα στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή των MK. Η παρατήρηση ανομοιογένειας (ειδικά στην νεκρωτική περιοχή) των επιπέδων των mRNA και των αντίστοιχων πρωτεϊνών, υποδεικνύει την ύπαρξη μετα-μεταγραφικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων ειδικά σε αυτή την περιοχή. Η μελέτη των συχνοτήτων των πολυμορφισμών και η σύνδεση ορισμένων γονοτύπων με την ομάδα των ασθενών, υποδεικνύει πως η παρουσία ενός ή και περισσότερων από τους προαναφερθέντες

πολυμορφισμούς μπορεί να συμβάλει στον κίνδυνο εμφάνισης οστεονέκρωσης, ιδιαίτερα σε άτομα με υψηλό κίνδυνο όπως οι χρήστες κορτικοστεροειδών.

SUMMARY

INTRODUCTION: Osteonecrosis (ON) is a disease leading to femoral head (FH) destruction. Osteoblasts and osteoclasts balance is very important for the maintenance of bone mass. Molecules involved in the development and differentiation of these cells are BMPs, the group of OPG-RANK-RANKL and cytokines. In this study the expression of BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, OPG, RANKL and RANK genes was analyzed between the normal and the necrotic area of the FH of patients with ON. Also, the presence or absence of certain cytokines gene polymorphisms for the IL-1a/IL-1R/IL-1RA/IL-4Rα/IL-1β/IL-12/γIFN/TGF-β/TNF-α/IL-2/IL-4/IL-6/IL-10 genes were analyzed in ON patients.

MATERIAL-METHODS: Quantitative RT-PCR for the mentioned genes was performed in the normal and necrotic site of 42 FHs with ON, retrieved during surgical procedures (total hip arthroplasties) for the treatment of ON FHs. Protein levels were estimated by Western Blot analysis. As far as cytokines polymorphisms are concerned, DNA was extracted from 112 patients and 438 healthy individuals. DNA analysis was performed by the PCR-SSP method and the use of the Protrans kit. Statistical analysis was performed using the t-test ($p < 0.05$).

RESULTS: mRNA levels of BMP-2 and BMP-6 were higher in the normal area than the necrotic (BMP-2 and BMP-6, normal vs necrotic: 16.8 vs 6.8 and 1.75 vs 1.64, respectively), while BMP-4 was higher in the necrotic area. OPG, RANKL and RANK mRNA levels were higher in the necrotic area (normal vs necrotic, OPG: 3.53 vs 4.45, RANK: 0.83 vs 0.98, RANKL: 0.27 vs 0.77). In the protein level, BMP-2 was higher in the normal, while BMP-4 and BMP-6 in the necrotic area (normal vs necrotic: BMP-2:

0.67 vs 0.64, BMP-4: 0.51 vs 0.61, BMP-6: 0.52 vs 0.56). However, no divergence for BMP-7 mRNA and protein levels were observed between the normal and the necrotic area. In addition, OPG and RANKL proteins were higher in the necrotic regions ((normal vs necrotic, OPG: 0.57 vs 0.62, RANKL: 0.48 vs 0.50), while RANK protein could not be estimated. Finally, genotyping of cytokines revealed that the genotypes of TC (-889) of IL-1 α and GA (-238) of TNF α are more prevalent in the patients than the healthy individuals, while the CC (codon 25) genotype of TGF- β and GG (-1082) of IL-10 are more prevalent in the healthy donors ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Differential expression levels of BMPs and OPG-RANK-RANKL genes between the normal and the necrotic area suggest the important and different role these molecules have in ON progression. Moreover, this study shows a differential expression mechanism for the above genes between the normal and the necrotic area of the FHs. The absence of homogeneity (especially in the necrotic area) between the levels of mRNA and the corresponding proteins, indicate the existence of post-transcriptional mechanisms that regulate the expression of these genes in this particular area. The genotyping of the cytokines polymorphisms suggests that the presence of one or the simultaneous carriage of more than one of the above mentioned polymorphisms may further increase the risk of osteonecrosis, especially in those people receiving corticosteroids.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
1. ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (ΟΝ)	22
1.1. ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ	22
1.2. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (Traumatic osteonecrosis)	24
1.3. ΜΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (Nontraumatic Osteonecrosis)	24
1.3.1.Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Systemic Lupus Erythematosus-SLE)	25
1.3.2. Δρεπανοκυτταρική Αναιμία (Sickle Cell Anemia).....	25
1.3.3. Μεταμόσχευση Οργάνων (Organ Transplant	26
1.3.4. Inflammatory Bowel Disease (IBD)	26
1.4. ΤΟ ΙΣΧΙΟ.....	27
1.5. Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ	30
1.6. Η ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗΡΙΑΙΑΣ ΚΕΦΑΛΗΣ	34
1.6.1. Το σύστημα STEINBERG	34
1.6.2. Το σύστημα JAPANESE INVESTIGATION COMMITTEE	35
1.6.3. Το σύστημα ARCO	36
1.6.4. Το σύστημα τρισδιάστατης εκτίμησης των Ιωαννίνων	38
1.7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ	40
1.7.1. Θεραπευτική αντιμετώπιση με διασωστικές επεμβάσεις	40
1.7.2. Θεραπευτική αντιμετώπιση με επεμβάσεις αντικατάστασης της άρθρωσης.....	43
1.7.3. Μελλοντικές θεραπείες αντιμετώπισης	44
2. ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	46
3. OPG-RANKL-RANK	48

3.1. ΔΟΜΗ ΜΟΡΙΩΝ-ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ	49
3.2. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	50
3.3. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	52
3.3.1. Πρωτεΐνες πρόσδεσης	52
3.3.2. Σηματοδότηση μέσω του NF-kB.....	53
3.3.3. Σηματοδότηση μέσω της MAPK.....	54
3.4. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	57
3.5. ΠΙΘΑΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ RANK-RANKL-OPG ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	58
4. ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ BMPs	61
4.1. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (BMPs Receptors, BMPs).....	62
4.1.1. Υποδοχείς TGF-β πρωτεϊνών_	62
4.1.2. Υποδοχείς BMPs (BMP Receptors)	64
4.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΜΕΣΩ ΤΩΝ BMPs.....	64
4.2.1. Πρωτεΐνες πρόσδεσης στους BMPRs	64
4.2.2. Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών	65
4.2.3. Το μονοπάτι σηματοδότησης Smad_	65
4.2.4. Καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης Smad	66
4.2.5. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAP-κινάσης μέσω του μονοπατιού TAB1/TAK1.....	67
4.2.6. Καταστολή του μονοπατιού TAB1/TAK1	68
4.2.7. Συνεργάτες/καταστολείς του μονοπατιού των BMPs_	68
4.3. ΑΝΑΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ BMPs	69
4.3.1. Εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs_	69
4.3.2. Μη σηματοδοτικοί BMP ψευδο-υποδοχείς και ενδοκυτταρικοί ανταγωνιστές	70
4.3.3. Ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση των σηματοδοτικών μεσολαβητών των BMPs.....	71

5. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ (CYTOKINES).....72

5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ (Antigen Presenting Cells-APCs).....	74
5.1.1. Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor-TNF).....	74
5.1.2. Ιντερλευκίνη 1(IL-1)	76
5.1.3. Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)	77
5.2. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	78
5.2.1. Ιντερλευκίνη 4 (IL-4)	78
5.2.2. Ιντερλευκίνη 10 (IL-10)	79
5.2.3. Ιντερλευκίνη 11 (IL-11)	79
5.2.4. Ιντερφερόνες (INF).....	80
5.3. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	80
5.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	81

ΣΚΟΠΟΣ..... 81

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... 84

1. ΥΛΙΚΟ.....84

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA87

2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ (οστικό τεμάχιο)

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

3. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA90

4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR93

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ 101

5.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό

5.2. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ WESTERN BLOT 103

7. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 106

7.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	106
7.1.1. MC3T3-E1 κυτταρική σειρά	106
7.1.2. C7 κυτταρική σειρά	106
7.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΗΡΙΑΙΑ ΚΕΦΑΛΗ	
7.2.1. Καλλιέργεια κυττάρων	107
7.2.2. Ανάπτυξη κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες	108
7.2.3. Μονιμοποίηση των κυττάρων	108
7.2.4. Χρώση με αλκαλική φωσφατάση	109
8. ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ	110
8.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ	110
8.2. ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ	111
9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	112
 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
 1. ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR	113
1.1. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ OPG, RANK RANKL	113
1.2. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7	115
1.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ, ΤΟ ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ...	117
1.3.1. Έκφραση OPG-RANKL-RANK σε σχέση με την ηλικία , το φύλο και το κάπνισμα	117
1.3.2. Έκφραση των BMPs σε σχέση με την ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα	120
 2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ WESTERN BLOT	123
2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ OPG, RANK ΚΑΙ RANKL	123
2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BMP-2, BMP-4, BMP6 ΚΑΙ BMP- 7	125
2.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	128

3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	129
3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	129
3.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΗΡΙΑΙΑ ΚΕΦΑΛΗ	129
3.3 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	131
4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ	132
 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	139
 1. OPG-RANK-RANKL	140
2. BMPs.....	144
2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	149
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	155

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (ΟΝ)

Η οστεονέκρωση (ΟΝ) είναι μια καταστροφική νόσος του ανθρώπινου σκελετού, με συχνά κακή εξέλιξη παρά τη θεραπεία. Είναι επίσης γνωστή ως άσηπτη νέκρωση (Aseptic Necrosis), ανάγγειος νέκρωση (Avascular Necrosis, AVN) ή υποχόνδρια ανάγγειος νέκρωση (Subchondral Avascular necrosis). Εντοπίζεται συχνότερα στην μηριαία κεφαλή, μπορεί όμως να προσβάλλει διάφορα σημεία του ανθρώπινου σκελετού, το γόνατο, τον ώμο, τον αγκώνα, το σκαφοειδές και τον αστράγαλο και έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο ερυθηματώδης λύκος και η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Περίπου 500.000 αρθροπλαστικές ισχίου πραγματοποιούνται συνολικά ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) και τη Δυτική Ευρώπη σε ασθενείς με ΟΝ σε προχωρημένο στάδιο. Αν και ο αριθμός των περιστατικών ΟΝ ανά έτος είναι 10.000- 20.000 στις ΗΠΑ, η αιτιολογία και η παθογένεια της ασθένειας παραμένουν άγνωστα ⁽¹⁻⁴⁾.

1.1. ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ

Περίπου το 1860, ο James Paget στις διαλέξεις του στην χειρουργική παθολογία περιέγραφε καθαρά την εικόνα που έχει ένα οστό με νέκρωση ⁽⁵⁾. Το 1888 ανακοινώθηκε η πρώτη μελέτη νέκρωσης στη μηριαία κεφαλή από τον Twynham, ο οποίος συνέδεσε τη νέκρωση με την ασθένεια του Caisson ⁽⁶⁾. Στην συνέχεια το 1911 οι Borstein και Plate ανακοίνωσαν τη μελέτη τους που περιελάμβανε 500 άτομα, ανάμεσα στα οποία περιέγραφαν λεπτομερώς τις περιπτώσεις 3 ασθενών με πόνο στο ισχίο, των οποίων οι ακτινογραφίες έδιναν την τυπική εικόνα υποχόνδριας νέκρωσης της μηριαίας κεφαλής. Ο Phemister το 1915, περιέγραψε τα μικροσκοπικά

ευρήματα στο νεκρό οστό, συγκρίνοντας τις αλλαγές που προέρχονται από μόλυνση του οστού με εκείνα που προέρχονταν από διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος (άσηπτη νέκρωση) ⁽⁷⁾, ενώ το 1920 συνέδεσε τα παθολογικά με τα ακτινολογικά ευρήματα που παρατηρούνται στο νεκρό οστό ⁽⁸⁾. Δέκα χρόνια αργότερα περιέγραψε αναλυτικά στο άρθρο του μια διαδικασία επούλωσης, η οποία παρατηρείται γύρω από το νεκρό οστό μετά το κάταγμα και την αγγειακή απόφραξη. Αυτή τη διαδικασία ονόμασε **έρπουσα υποκατάσταση (creeping substitution)**, για να περιγράψει εκείνη ακριβώς την κατάσταση όπου το νεκρό οστό τελικά αντικαθίσταται, αφού ένα στρώμα νέου ζωντανού οστού έχει εναποτεθεί στο προϋπάρχον νεκρό οστό ⁽¹⁾.

Το 1922 ο Axhausen περιέγραψε την εμφάνιση νέκρωσης σε ασθενείς με αλκοολισμό ⁽⁹⁾, η οποία στην συνέχεια αναπτύχθηκε εκτενέστερα από τον Jones και τους συνεργάτες του το 1968 ⁽¹⁰⁾. Η πρώτη μελέτη που συνέδεσε την οστεονέκρωση με τα στεροειδή περιγράφηκε αρχικά από τους Pietrogrande και Mastromarino το 1957 ⁽¹¹⁾, ενώ η μελέτη των Madell και Freeman ενός ασθενούς με το σύνδρομο Cushing επιβεβαίωσε αυτή την υπόθεση ⁽¹²⁾. Τέλος, η Catto το 1965 δημοσίευσε δύο εξαιρετικές εργασίες στις οποίες περιγράφει λεπτομερώς τις διαδικασίες καταστροφής και επούλωσης που συμβαίνουν κατά την υποχόνδρια οστεονέκρωση στην μηριαία κεφαλή, προσπαθώντας να περιγράψει τις μεταβολές που συμβαίνουν στη μηριαία κεφαλή μετά από υποκεφαλικά κατάγματα καθώς και την παθολογική εξέλιξη αυτών ^(13,14).

1.2. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (Traumatic osteonecrosis)

Η ΟΝ μπορεί να προκύψει μετά από σκελετικό τραύμα το οποίο επηρεάζει την ενδοοστική αιμάτωση. Η τραυματική νέκρωση διαφέρει ανάλογα με την περιοχή του σκελετού, το μέγεθος της κάκωσης, το είδος καθώς και το χρόνο έναρξης της θεραπείας. Η ΟΝ του ισχίου είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο μετά από ένα υποκεφαλικό κάταγμα του μηριαίου ανεξάρτητα από την ηλικία του ασθενούς ^(15,16,17). Άλλες τραυματικές καταστάσεις όπως είναι η επιφυσιολίσθηση της μηριαίας κεφαλής και το εξάρθρημα ισχίου, μπορεί να οδηγήσουν σε ΟΝ. Σε αντίθεση με την ΟΝ μετά από υποκεφαλικό κάταγμα, η ΟΝ που εμφανίζεται δευτερογενώς μετά από εξάρθρημα ισχίου φαίνεται πως συνδέεται με την αυξημένη ηλικία. Αν και η μηριαία κεφαλή είναι το πιο κοινό σημείο εμφάνισης της ΟΝ μετά από τραυματισμό, άλλα οστά όπως είναι η κεφαλή του βραχιονίου και ο αστράγαλος είναι πιθανό να εμφανίσουν ΟΝ. Επίσης, ο ώμος, το γόνατο, ο αγκώνας και ο καρπός είναι σημεία στα οποία μπορεί να εμφανιστεί ΟΝ ⁽¹⁾.

1.3. ΜΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗ (Nontraumatic Osteonecrosis)

Η μη τραυματική οστεονέκρωση είναι μια ασθένεια που επηρεάζει κυρίως το νεαρό πληθυσμό. Αν και ο ακριβής αριθμός των περιστατικών δεν είναι γνωστός υπολογίζεται ότι περίπου 10.000-20.000 άτομα εμφανίζουν ΟΝ κάθε χρόνο. Ο μέσος όρος ηλικίας υπολογίζεται στα 38 έτη, με μόλις το 20% των ασθενών να ξεπερνούν την ηλικία των 50 ετών.

Η ΟΝ που δεν οφείλεται σε τραύμα συνήθως συνδέεται με έναν ή περισσότερους προδιαθεσικούς παράγοντες. Περίπου τα 2/3 των περιστατικών με μη τραυματική ΟΝ συσχετίζονται με την λήψη κορτικοστεροειδών και τον αλκοολισμό. Στο

υπόλοιπο 1/3 περιλαμβάνονται οι αιμοσφαιρινοπάθειες, η εγκυμοσύνη, η θρομβοφιλία και άλλες διαταραχές της πήξης του αίματος ως προδιαθεσικοί παράγοντες εμφάνισης της ON. Σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως ο ερυθηματώδης λύκος (systemic lupus erythematosus, SLE), η δρεπανοκυτταρική αναιμία (sickle cell anemia, SS) και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (inflammatory bowel disease) το ποσοστό εμφάνισης της ON ξεπερνά το 1% ^(1,18-20).

1.3.1 Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Systemic Lupus Erythematosus-SLE)

Η ON στους ασθενείς με SLE περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Dubois και Cozen το 1960 ⁽²¹⁾, οι οποίοι ανέφεραν ποσοστό εμφάνισης έως και 5%, ενώ ο Mont το 1997 σε έρευνα του παρουσίασε πως 31 από τους 103 ασθενείς με SLE (30%) παρουσίασαν ON. Υπάρχει σαφής σύνδεση της ON με την λήψη κορτικοστεροειδών. Σε μια ειδική έρευνα όπου συμμετείχαν 54 ασθενείς με SLE, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένης δόσης πρεδνιζόνης και εμφάνισης οστικών εμφράκτων ^(1,22).

1.3.2. Δρεπανοκυτταρική Αναιμία (Sickle Cell Anemia)

ON έχει αναφερθεί πως εμφανίζεται στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbS/HbS), HbS/HbC και HbS/β-θαλασσαιμία ^(23,24). Το μηριαίο οστό προσβάλλεται τρεις φορές πιο συχνά από το βραχιόνιο. Έχει δειχθεί πως το ποσοστό εμφάνισης της ON είναι υψηλότερο στην HbS/HbC. Η έρευνα των Κνοx-Macaulay στην Σιέρα Λεόνε έδειξε ποσοστό 8.2% των ασθενών με HbS/HbS εμφάνισαν ON και 20% των ασθενών με HbS/HbC ⁽²⁵⁾. Παρόμοια έρευνα που έγινε στη Γκάνα από τους Konotey-Ahulu ανέδειξε ότι ασθενείς με ON παρουσίαζαν HbS/HbS και HbS/HbC σε ποσοστό 2.8% και 6.6% αντίστοιχα ^(1,26).

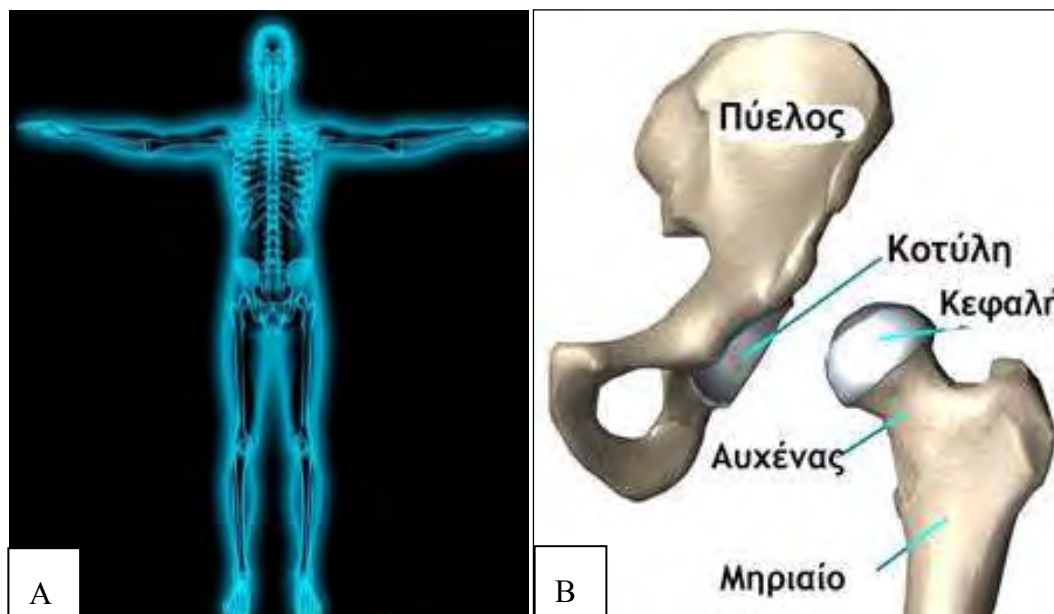
1.3.3. Μεταμόσχευση Οργάνων (Organ Transplant)

Έχει παρατηρηθεί ότι ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών που έχουν υποστεί μεταμόσχευση κάποιου οργάνου εμφανίζουν ON ^(27,28). Η ετερόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών συνδέεται με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης ON. Ο Einright και οι συνεργάτες του σε μια έρευνα που περιελάμβανε 902 ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού των οστών, έδειξε ότι αυτοί που εμφάνισαν ON είχαν υποστεί ετερόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών ⁽²⁹⁾. Δεν υπήρξαν περιπτώσεις ON σε αυτόλογη ή συγγενική μεταμόσχευση μυελού των οστών, υποδεικνύοντας πως η αντίδραση δότη- ξενιστή μπορεί να παίζει ρόλο στην αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της ON σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ετερόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών ⁽¹⁾.

Η εμφάνιση της ON σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού διαφέρει ανάλογα με το ιστορικό και την καταγωγή ⁽³⁰⁾. Φαίνεται πως η χρήση της κυκλοσπορίνης μετά την μεταμόσχευση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης ON στο ισχίο. Έρευνες έχουν δείξει πως ο κίνδυνος εμφάνισης της ON μειώνεται με την μείωση της ημερησίας δόσης κορτικοστεροειδών στους ασθενείς ⁽¹⁾.

1.3.4. Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Το ποσοστό εμφάνισης της ON στους ασθενείς, με IBD προσεγγίζει το 2.5- 4.3%, αν και οι ασθενείς αυτοί έχουν μάλλον προδιάθεση για στεροειδο-επαγόμενη ON, καθώς η δόση και η διάρκεια χορήγησης των κορτικοστεροειδών είναι συνήθως πολύ μικρότερη από ότι σε άλλες ασθένειες ^(1,31,32).



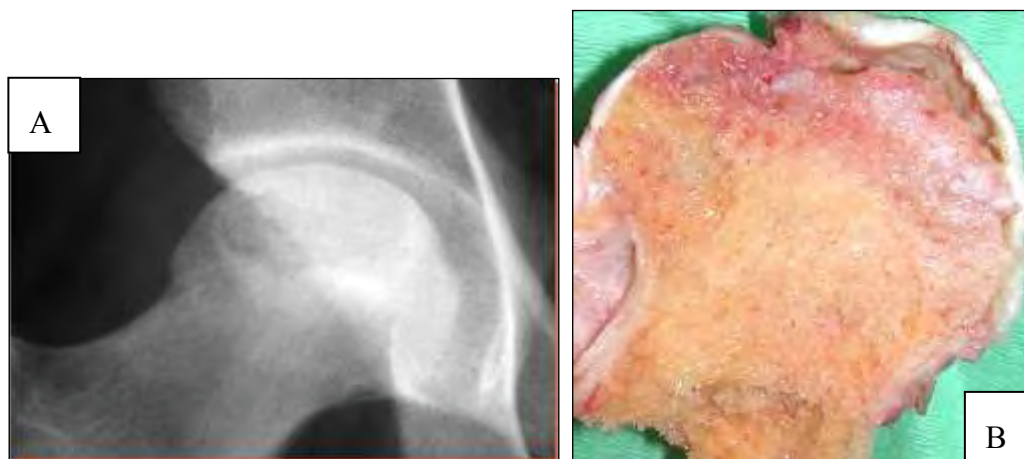
ΕΙΚΟΝΑ 1. (Α) Ο ανθρώπινος σκελετός (Β) Η άρθρωση του ισχίου δημιουργείται μεταξύ του μηριαίου οστού και της κοτύλης.

1.4. ΤΟ ΙΣΧΙΟ

Η άρθρωση του ισχίου είναι διάρθρωση μεταξύ της κεφαλής του μηριαίου και της κοτύλης του ανώνυμου οστού (Εικ. 1). Πρόκειται για πολυαξονική σφαιροειδή διάρθρωση σχεδιασμένη έτσι, ώστε να είναι σταθερή και να αντέχει στο βάρος, στοιχεία που περιορίζουν την κινητικότητα της. Οι αρθρικές επιφάνειες της άρθρωσης είναι δυο: η σφαιρική κεφαλή του μηριαίου οστού και η μηνοειδής επιφάνεια της κοτύλης του ανώνυμου οστού. Η κοτύλη περιβάλλει σχεδόν πλήρως την ημισφαιρική κεφαλή του μηριαίου οστού και συμβάλλει ουσιαστικά στη σταθερότητα της άρθρωσης. Ο μη αρθρικός κοτυλιαίος βόθρος περιέχει χαλαρό συνδετικό ιστό. Η μηνοειδής επιφάνεια καλύπτεται από υαλοειδή χόνδρο και είναι πλατύτερη προς τα άνω.

Ο σύνδεσμος της μηριαίας κεφαλής (στρογγύλος σύνδεσμος) είναι μια πλατειά ταινία ευπαθούς συνδετικού ιστού, η οποία προσφύεται με το ένα άκρο της στο

βοθρίο της μηριαίας κεφαλής και με το άλλο άρθρο στον κοτυλιαίο βόθρο, στον εγκάρσιο σύνδεσμο της κοτύλης και στα χείλη της κοτυλιαίας εντομής. Ο σύνδεσμος αυτός περιέχει ένα μικρό κλάδο της θυροειδούς αρτηρίας, ο οποίος τροφοδοτεί με αίμα την κεφαλή του μηριαίου ^(33,34).



ΕΙΚΟΝΑ 2. (Α) Ακτινολογική εικόνα μηριαίας κεφαλής με ON. **(Β)** Ανατομικό παρασκεύασμα μετά από αφαίρεση μηριαίας κεφαλής με ON στα πλαίσια ολικής αρθροπλαστικής ισχίου.

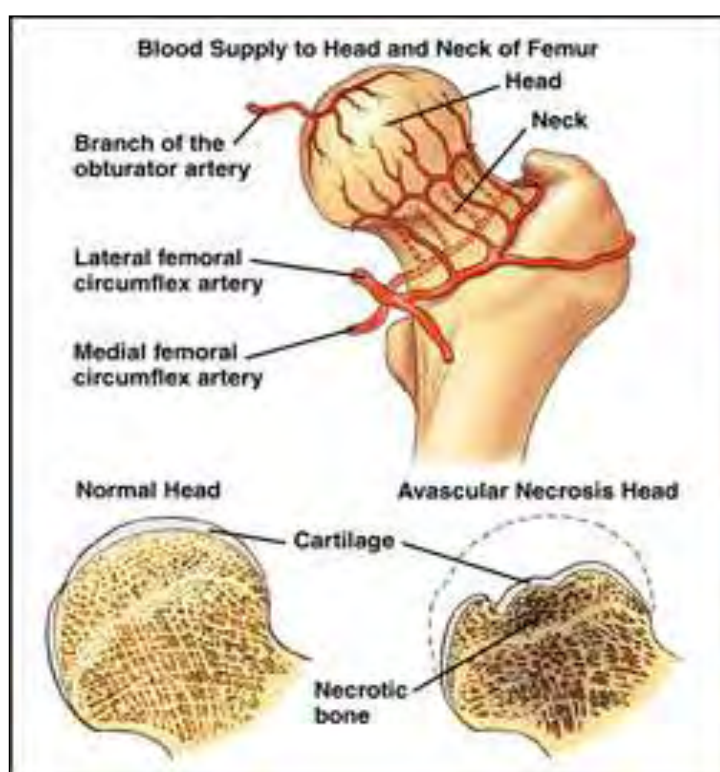
Η κεφαλή του μηριαίου οστού

Η μηριαία κεφαλή καλύπτεται από υαλοειδή χόνδρο και αποτελεί τα 2/3 μιας σφαίρας (Εικ. 2). Εμφανίζει ένα κεντρικό εντύπωμα, το βοθρίο της κεφαλής στο οποίο προσφύεται ο στρογγύλος σύνδεσμος. Ο αυχένας του μηριαίου οστού βρίσκεται κάτω από την κεφαλή, ενώ στη βάση του βρίσκονται ο μείζων και ο ελάσσων τροχαντήρας ^(33,34).

Αγγείωση

Η διάρθρωση υποδέχεται κλάδους της θυροειδούς αρτηρίας, της άνω και κάτω γλουτιαίας αρτηρίας και των περισπώμενων αρτηριών του μηρού, είτε απευθείας είτε μέσω του δακτυλίου που δημιουργείται στο επίπεδο της βάσης του αυχένα (τροχαντήρια αναστόμωση) (Εικ.3). Οι τροφοφόρες αρτηρίες ξεκινούν από την

τροχαντήρια αναστόμωση στη βάση του αυχένα και ανέρχονται πορευόμενες μέσα στις καθεκτικές ίνες για να εισέλθουν σε τρήματα της άνω μοίρας του αυχένα καταλήγοντας στην κεφαλή του μηριαίου οστού. Επιπρόσθετη αιμάτωση προέρχεται από έναν κλάδο της θυροειδούς αρτηρίας, ο οποίος πορεύεται εντός του στρογγυλού συνδέσμου προς την κεφαλή του μηριαίου οστού. Επίσης αιμάτωση παρέχει και μια διατιτρώσα της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας μέσω μιας τροφοφόρου αρτηρίας, η οποία εισέρχεται στο σώμα και αιματώνει τον αυχένα και την κεφαλή του μηριαίου οστού ^(33,34).



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η αγγείωση της μηριαίας κεφαλής (www.physio-pedia.com).

Νεύρωση

Η νεύρωση της διάρθρωσης προέρχεται από το νεύρο του ορθού μηριαίου (κλάδος του μηριαίου νεύρου), από κλάδους του θυροειδούς νεύρου (πρόσθιος κλάδος) και από το νεύρο του τετράγωνου μηριαίου (κλάδος του ιερού πλέγματος) ^(33,34).

1.5 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ

Ο όρος «οστεονέκρωση» αναφέρεται στο θάνατο του οστού και ειδικότερα ο όρος «οστεονέκρωση της μηριαίας κεφαλής» περιγράφει τις λειτουργικές και δομικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν σταδιακά στην καθίζηση της μηριαίας κεφαλής και τελικά στην καταστροφή του ισχίου ⁽¹⁾.

Σύμφωνα με τον Bullong (1997) συνολικά τέσσερα στάδια αναγνωρίζονται κατά την ανάπτυξη της ΟΝ μορφολογικά, τα οποία έχουν παρατηρηθεί με τυπικές ακτινολογικές απεικονίσεις ⁽³⁵⁾. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από την παρουσία νέκρωσης τόσο στο φλοιό όσο και στο μυελό των οστών, χωρίς κάποια ένδειξη επούλωσης. Στο δεύτερο στάδιο η διαδικασία επούλωσης είναι εμφανής περιφερικά της οστεονεκρωτικής περιοχής, ενώ στο τρίτο στάδιο είναι εμφανής η τμηματική καθίζηση του υποχόνδριου οστού. Τέλος, στο τέταρτο στάδιο χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη δευτερογενούς οστεοαρθρίτιδας ^(1,35).

Στάδιο I

Σε αυτό το στάδιο το σχήμα της κεφαλής παραμένει φυσιολογικό και η επιφανειακή εξέταση της άρθρωσης δεν παρουσιάζει ανωμαλίες. Σε μακροσκοπική παρατήρηση όμως παρασκευασμάτων του οστού, η νεκρωτική περιοχή αναγνωρίζεται ως μια σφηνοειδής περιοχή, όπου ο μυελός φαίνεται με σκούρο κίτρινο, αδιαφανές χρώμα, η οποία αναγνωρίζεται άμεσα και διαχωρίζεται από τον υγιή μυελό των οστών που την περιβάλλει με μια παχιά κόκκινη υπεραιμική περιοχή. Ο μυελός πέρα από αυτή την περιοχή σε αυτό το στάδιο παρουσιάζεται φυσιολογικός εκτός από τις ειδικές περιπτώσεις της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με τον σκούρο κόκκινο μυελό και την ασθένεια Gaucher όπου ο μυελός εμφανίζεται ωχρός. Σε αυτό το στάδιο οι αλλαγές στην αρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού δεν μπορούν να εκτιμηθούν με την

μακροσκοπική παρατήρηση και την ακτινογράφιση των δειγμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να δείξουν τυχόν ανωμαλίες ^(1,35).

Στην μικροσκοπική εξέταση των παρασκευασμάτων ο αρθρικός χόνδρος εμφανίζεται ζωντανός στην ζώνη ασβεστοποίησης, αλλά το οστό είναι νεκρό. Το υποχόνδριο οστό, που αντιστοιχεί στην αδιαφανή κίτρινη ζώνη που παρατηρείται μακροσκοπικά, χαρακτηρίζεται από νεκρές δοκίδες και μυελικούς χώρους. Τα συστατικά του μυελού έχουν αντικατασταθεί από κοκκώδη ιωσινοφολικά παράγωγα τα οποία δεν έχουν κυτταρικά συστατικά. Επίσης μπορεί να υπάρχουν κύστες λιπώδους ουσίας που φαίνονται ως σαπονοποιημένο λίπος. Εντός του οστού, περιέχονται κυτταρικά υπολείμματα ή κύτταρα με ωχρούς πυρήνες. Τέλος κοντά στο όριο της νεκρωτικής περιοχής υπάρχει αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα καθώς και αναπτυσσόμενοι ινοβλάστες και τριχοειδή. Αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στην κόκκινη υπεραιμική περιοχή που αναγνωρίζεται μακροσκοπικά. Πέρα από αυτή την περιοχή το οστό καθώς και ο μυελός των οστών εμφανίζονται φυσιολογικά ^(1,35).

Στάδιο II

Όπως και στο στάδιο I, το σχήμα της μηριαίας κεφαλής σε αυτό το στάδιο διατηρείται και ο επιφανειακός χόνδρος παραμένει άθικτος. Με *μακροσκοπική* παρατήρηση όμως, παρουσιάζεται μια σκληρή οστική περιοχή περιφερικά της νεκρωτικής ζώνης στα όρια μεταξύ νεκρωτικής περιοχής και φυσιολογικού οστού. Αυτή η περιοχή είναι καλύτερα διακριτή στις ακτινογραφίες. Η κεντρική περιοχή της νέκρωσης παραμένει ίδια, όμως η υπεραιμική περιοχή παρουσιάζεται πιο παχιά σε σχέση με το στάδιο I.

Η *μικροσκοπική* παρατήρηση δείχνει ένα μέτωπο από μακροφάγα που περιέχουν λιπώδη κυστίδια, αναπτυσσόμενους ινοβλάστες και τριχοειδή που εκτείνονται ως

την κεντρική νεκρωτική περιοχή. Στην συνέχεια και πίσω από αυτό το μέτωπο, εκτείνεται ένα δεύτερο μέτωπο που αποτελείται από οστεοβλάστες, οι οποίοι εναποθέτουν ένα στρώμα νέου οστού στο προϋπάρχον νεκρωτικό οστό, ενώ σε κοντινή απόσταση μικρές ποσότητες του παλιού νεκρωτικού και του νέου ζωντανού οστού αφαιρούνται από τους οστεοκλάστες. Το επιθυμητό αποτέλεσμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι να αφαιρέσει το νεκρωτικό οστό και τις μυελικές κοιλότητες διατηρώντας τη δομική ακεραιότητα του οστού. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται «έρπουσα υποκατάσταση» (creeping substitution). Όταν όμως η βλάβη του οστού είναι εκτεταμένη η έρπουσα υποκατάσταση δεν είναι αποτελεσματική και οδηγεί τελικά στην καθίζηση του υποχόνδριου οστού ^(1,35).

Στάδιο III

Η πρώτη παρατήρηση αλλαγών στο σχήμα του οστού συμβαίνει συνήθως σε αυτό το στάδιο. Οι αλλαγές αυτές είναι το αποτέλεσμα της καθίζησης της νεκρωτικής περιοχής και εξωτερικά μπορεί να είναι εμφανείς ως ένα εξόγκωμα ή μια καθίζηση του αρθρικού χόνδρου. Στη *μακροσκοπική* παρατήρηση των παρασκευασμάτων του οστού, είναι εμφανές πως η κατάρρευση οφείλεται σε κάταγμα των οστικών δοκίδων της νεκρωτικής περιοχής ή της περιοχής επούλωσης που παρουσιάζει σαφώς αυξημένη σκλήρυνση. Το κάταγμα των οστικών δοκίδων οφείλεται σε έναν από τους παρακάτω λόγους: (1) στο αθροιστικό αποτέλεσμα των μικρο-καταγμάτων που δημιουργούνται από το λίπος στην νεκρωτική περιοχή, (2) στην αδυναμία των δοκίδων στην περιοχή επούλωσης εξαιτίας της οστεοκλαστικής δραστηριότητας, είτε τέλος (3) στην συγκέντρωση τοπικά πίεσης μεταξύ των πολύ σκληρών δοκίδων της ζώνης επούλωσης και των νεκρωτικών δοκίδων. Ωστόσο, ο επιφανειακός χόνδρος μπορεί να παρουσιάζεται ακόμη βιώσιμος ⁽¹⁾.

Μικροσκοπικά οι δοκίδες που έχουν υποστεί το κάταγμα στην νεκρωτική περιοχή παρουσιάζονται ως κονιοποιημένα οστικά και χονδρικά υπολείμματα. Ο περιβάλλον χόνδρος εξακολουθεί να φαίνεται βιώσιμος ενώ τα τμήματα του οστού μέσα στην ζώνη επούλωσης περιέχουν πληθώρα ινώδους ιστού και χόνδρου και έχουν την τυπική εικόνα ενός οποιουδήποτε άλλου κατάγματος στον ανθρώπινο σκελετό ^(1,35).

Στάδιο IV

Το κυρίως γνώρισμα αυτού του σταδίου είναι η παρουσία μορφολογικών αλλαγών που συνδέονται συνήθως με την οστεοαρθρίτιδα. Ανάλογα με τον βαθμό των οστεοαρθριτικών αλλαγών, μπορεί να μην είναι εύκολο να αναγνωριστεί η οστεονέκρωση στην αρχική παρατήρηση των ακτινογραφιών. Όταν πλέον οι αλλαγές που επιφέρει η οστεοαρθρίτιδα είναι εμφανείς, το μόνο στοιχείο πως η αρχική αιτία ήταν η υποχόνδρια οστεονέκρωση είναι η ιδιομορφία του σχήματος της μηριαίας κεφαλής. Κατά την *μακροσκοπική* παρατήρηση της περιοχής του κατάγματος, παρουσιάζονται υπολείμματα χόνδρου και πυκνού ινώδους συνδετικού ιστού που περιβάλλονται από ένα πλαίσιο σκληρού οστού. Σε ιδιαίτερα καταστροφικές περιπτώσεις, η επιφάνεια της άρθρωσης μπορεί να αποτελείται από κονιοποιημένα υπολείμματα οστού.

Η *μικροσκοπική* παρατήρηση λιγότερο κατεστραμμένων δειγμάτων δείχνει τμήματα ζωντανού ή νεκρού χόνδρου που περιλαμβάνει επίσης ινώδη ιστό και πρωτογενές αντιδραστικό οστό ^(1,35).

1.6. Η ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗΡΙΑΙΑΣ ΚΕΦΑΛΗΣ

Η χρήση ενός συστήματος ταξινόμησης είναι ουσιαστική στη μελέτη της οστεονέκρωσης της μηριαίας κεφαλής, καθώς η νόσος είναι προοδευτική και έτσι η σταδιοποίηση και η ταξινόμηση είναι πολύ σημαντική για την παρακολούθηση της πορείας του ασθενούς και την επιλογή της θεραπευτικής μεθόδου. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο ένα ακριβές και αξιόπιστο σύστημα ταξινόμησης που θα δίνει τη δυνατότητα να προσδιοριστεί η πρόγνωση της βλάβης και να γίνει σωστά η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής μεθόδου. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλά συστήματα ταξινόμησης που βασίζονται στις διάφορες απεικονιστικές μεθόδους, παλαιότερα μόνο στις απλές ακτινογραφίες, σήμερα και στη μαγνητική τομογραφία, και/ή στα κλινικά ευρήματα ⁽³⁶⁻⁴¹⁾.

1.6.1. Το σύστημα STEINBERG

Στις αρχές τις δεκαετίας του '80 εμφανίζεται το σύστημα ταξινόμησης του Steinberg που στηρίζεται στην απλή ακτινογραφία, τη μαγνητική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα, ενώ δε λαμβάνει υπόψη τα κλινικά δεδομένα. Επίσης περιλαμβάνει στοιχεία σχετικά με το μέγεθος της βλάβης και το βαθμό συμμετοχής της αρθρικής επιφάνειας ⁽⁴²⁾ (Πιν. 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Στάδια ταξινόμησης του συστήματος Steinberg

ΣΤΑΔΙΟ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
Ο.	Όλες οι απεικονιστικές τεχνικές (ακτινογραφία, μαγνητική τομογραφία και σπινθηρογράφημα) είναι αρνητικές. Στο στάδιο αυτό κατατάσσονται ισχία ασθενών με διαγνωσμένη οστεονέκρωση στο ετερόπλευρο ισχίο και με παρουσία κάποιου αιτιολογικού παράγοντα. Δηλώνει «υψηλού κινδύνου» ισχία για εμφάνιση της νόσου.
Ι.	Οι ακτινογραφίες παραμένουν φυσιολογικές, ενώ η οστεονέκρωση διαγιγνώσκεται στη μαγνητική τομογραφία ή/και στο σπινθηρογράφημα. Η έκταση της βλάβης εκτιμάται στη μαγνητική τομογραφία και διακρίνεται σε: <i>ΙΑ: Ήπια (<15% της κεφαλής προσβεβλημένο).</i> <i>ΙΒ: Μέτρια (15% ως 30% προσβεβλημένο).</i>

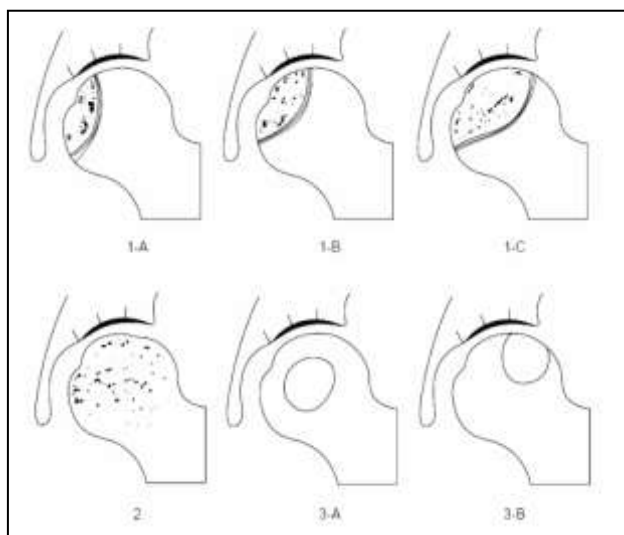
II.	<p><i>IC: Σοβαρή (>30% προσβεβλημένο).</i> Η οστεονέκρωση εμφανίζεται στην ακτινογραφία με τη μορφή διαυγάσεων ή/και σκληρύνσεων. Η έκταση της βλάβης υπολογίζεται σε προσθιοπίσθιες και πλάγιες ακτινογραφίες. Ανάλογα με το ποσοστό της κεφαλής που έχει καταλάβει, χαρακτηρίζεται:</p> <p><i>IIA: Ήπια (<15% της κεφαλής προσβεβλημένο).</i> <i>IIB: Μέτρια (15% έως 30% προσβεβλημένο).</i> <i>IIC: Σοβαρή (>30% προσβεβλημένο).</i></p>
III.	<p>Η ακτινογραφία εμφανίζει υποχόνδρια καθίζηση, σημείο της υποχόνδριας ημισελήνοειδούς γραμμής (Crescent Sign), χωρίς επιπέδωση της κεφαλής. Για την εκτίμηση της έκτασης της καθίζησης χρησιμοποιείται είτε η προσθιοπίσθια είτε η πλάγια ακτινογραφία, ανάλογα με το ποια εμφανίζει μεγαλύτερο μέγεθος. Έτσι, το στάδιο III ανάλογα το βαθμό καθίζησης διακρίνεται σε:</p> <p><i>IIIA: Ήπια (η καθίζηση καταλαμβάνει <15% της αρθρικής επιφάνειας).</i> <i>IIB: Μέτρια (15% ως 30% της αρθρικής επιφάνειας προσβεβλημένο).</i> <i>IIC: Σοβαρή (>30% προσβεβλημένο).</i></p>
IV.	<p>Η ακτινογραφία αποκαλύπτει επιπέδωση της αρθρικής επιφάνειας της κεφαλής. Η έκταση της επιπέδωσης υπολογίζεται είτε στην προσθιοπίσθια είτε στην πλάγια ακτινογραφία. Διακρίνεται σε:</p> <p><i>IVA: Ήπια (<15% επιφάνειας και <2mm καθίζηση).</i> <i>IVB: Μέτρια (15% ως 30% επιφάνειας ή 2-4mm καθίζηση).</i> <i>IVC: Σοβαρή (>30% επιφάνειας ή >4mm καθίζηση).</i></p>
V.	<p>Στένωση μεσαρθρίου διαστήματος ή/και συμμετοχή της κοτύλης. Βαθμολόγηση σε VA, VB, VC ανάλογα με την έκταση της βλάβης στην κεφαλή (όπως γίνεται και στο στάδιο IV) και την εκτιμώμενη προσβολή της κοτύλης.</p>
VI.	<p>Η ακτινογραφία δείχνει προχωρημένες εκφυλιστικές αλλοιώσεις με προσβολή της κοτύλης στην ακτινογραφία.</p>

1.6.2. Το σύστημα JAPANESE INVESTIGATION COMMITTEE

Το 1987 η Japanese Investigation Committee δημιουργεί ένα νέο σύστημα ταξινόμησης, προσθέτοντας σε αυτό των Ficat και Arlet στοιχεία που αφορούν τη θέση της βλάβης. Έτσι η διαφοροποίηση αφορά κυρίως τα στάδια II και III. Η βάση της ταξινόμησης αυτής είναι η απλή ακτινογραφία ^(43,44) (Εικ.4). Η τοπογραφία της βλάβης κρίθηκε ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας (Πιν. 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Στάδια ταξινόμησης του συστήματος Japanese

ΣΤΑΔΙΟ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
1.	Η βλάβη διαχωρίζεται από την υγιή περιοχή με μια «σκληρυντική» ζώνη. Διακρίνεται σε: 1-A: Η βλάβη καταλαμβάνει ποσοστό $<1/3$ της περιοχής φόρτισης της κεφαλής. 1-B: Η βλάβη καταλαμβάνει ποσοστό $1/3 - 2/3$ τη έκταση της περιοχής φόρτισης. 1-C: Η βλάβη εκτείνεται $> 2/3$ της περιοχής φόρτισης.
2.	Διάχυτες οστεοσκληρυντικές γραμμές. Η «σκληρυντική» ζώνη είναι ασαφής. Επιπλέον, παρατηρείται επιπέδωση της κεφαλής.
3.	Βλάβη με μορφή κύστης. Διακρίνεται, ανάλογα με τη θέση της βλάβης, σε: III-A: Η κύστη είναι μακριά από την περιοχή φόρτισης ή κοντά στο κέντρο της κεφαλής. III-B: Η κύστη στα έσω $2/3$ της περιοχής φόρτισης.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Ακτινολογική απεικόνιση σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Japanese Investigation Committee. (Ohzono K, Saito M, Sugano N et al. The fate of nontraumatic avascular osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop. 1992;277:73-8).

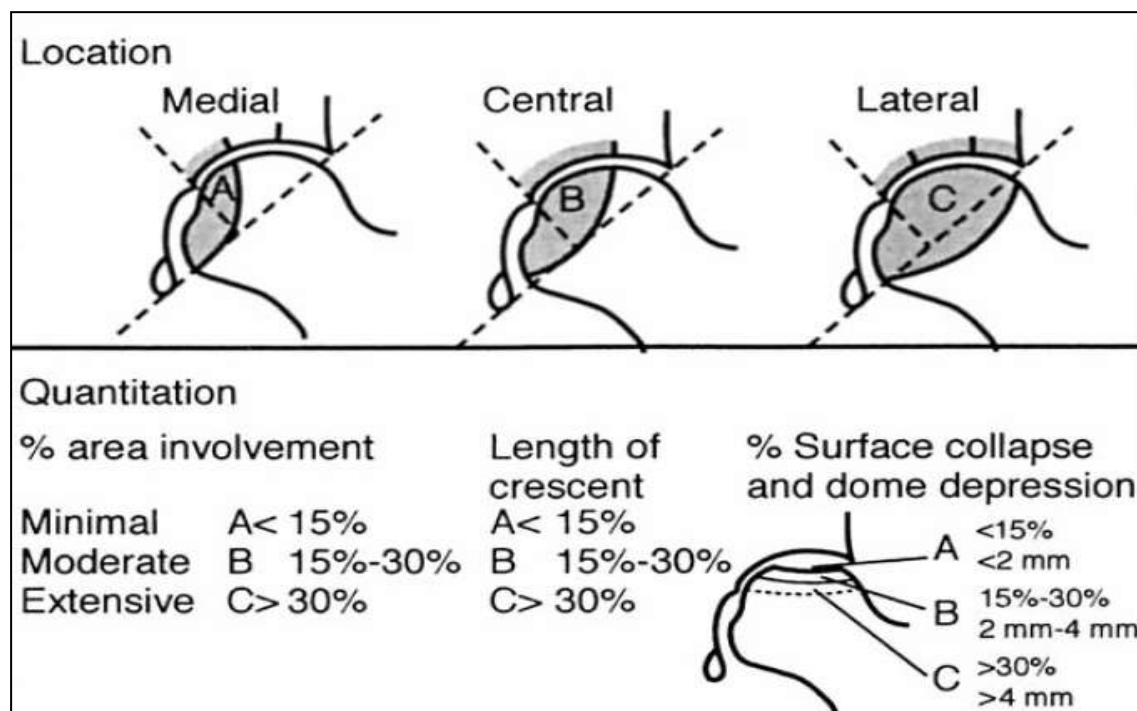
1.6.3. Το σύστημα ARCO

Το 1993 η ARCO (Association Research Circulation Osseous) δημιούργησε ένα πιο λεπτομερές σύστημα ταξινόμησης που συμπεριλαμβάνει σημαντικές πληροφορίες για την πρόγνωση της βλάβης (Εικ. 5). Ουσιαστικά η ταξινόμηση αυτή αποτελεί έναν συνδυασμό όλων των παραπάνω προτάσεων συμπληρώνοντας στο σύστημα των Ficat και Arlet, την έκταση της βλάβης από την ταξινόμηση του Steinberg και την θέση της βλάβης από την ταξινόμηση της Japanese Investigation Committee ⁽⁴⁵⁾ (Πιν. 3).

Η ταξινόμηση αυτή παρόλο που είναι σχετικά πολύπλοκη, καταγράφει και αξιοποιεί όλες τις πληροφορίες που είναι δυνατό να προκύψουν από όλες τις απεικονιστικές μεθόδους. Έτσι παρέχει μια πλήρη καταγραφή της βλάβης ώστε να είναι ευκολότερη τόσο η επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας όσο και πιο άρτια παρακολούθηση της εξέλιξης της βλάβης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Στάδια ταξινόμησης του συστήματος ARCO

ΣΤΑΔΙΟ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
I.	Θετική η βιοψία της κεφαλής. Οι απεικονιστικές τεχνικές δίνουν φυσιολογική εικόνα.
II.	Θετική η μαγνητική τομογραφία ή/και το σπινθηρογράφημα, ενώ η ακτινογραφία και η αξονική τομογραφία παραμένουν αρνητικές. Με βάση την έκταση της βλάβης, η οποία εκτιμάται ποσοτικά στην μαγνητική τομογραφία διακρίνεται σε : <i>A: <15% κεφαλής προσβεβλημένο. B: 15% ως 30% προσβεβλημένο. C: >30% προσβεβλημένο.</i>
III.	Θετική η απλή ακτινογραφία, η αξονική τομογραφία, η μαγνητική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα. Η κεφαλή διατηρεί την ακεραιότητά της. Η βλάβη κατατάσσεται ανάλογα με την εντόπιση σε: <i>A: Έσω. B: Κεντρική. C: Έξω.</i> Ποσοτικά η βλάβη ταξινομείται με βάση τη μαγνητική τομογραφία και την απλή τομογραφία σε: <i>A: 15% κεφαλής προσβεβλημένο. B: 15% ως 30% προσβεβλημένο. C: >30% προσβεβλημένο.</i>
IV.	Στην απλή ακτινογραφία και στην αξονική τομογραφία, σημείο της υποχόνδριας ημισελινοειδούς γραμμής (Crescent Sign) ή και επιπέδωση της αρθρικής επιφάνειας της μηριαίας κεφαλής. Τόσο η εντόπιση όσο και η έκταση της βλάβης ταξινομείται μόνο με βάση την απλή ακτινογραφία σε: <u>Εντόπιση:</u> <i>A: Έσω B: Κεντρική C: Έξω</i> <u>Έκταση βλάβης:</u> <i>A: 15% κεφαλής προσβεβλημένο. B: 15% ως 30% προσβεβλημένο. C: >30% προσβεβλημένο.</i> <u>Έκταση υποχόνδριας ημισελινοειδούς γραμμής (Crescent Sign):</u> <i>A: 15% της αρθρικής επιφάνειας B: 15% ως 30% της αρθρικής επιφάνειας. C: >30% της αρθρικής επιφάνειας.</i> <u>% καθίζηση της αρθρικής επιφάνειας και βάθος καθίζησης:</u> <i>A: <15% της αρθρικής επιφάνειας ή <2mm καθίζηση. B: 15-30% της αρθρικής επιφάνειας ή 2-4mm καθίζηση. C: >30% της αρθρικής επιφάνειας ή >4mm καθίζηση.</i> Στην απλή ακτινογραφία μόνο, επιπέδωση αρθρικής επιφάνειας, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος και αλλοιώσεις στην κοτύλη με καταστροφή της άρθρωσης.



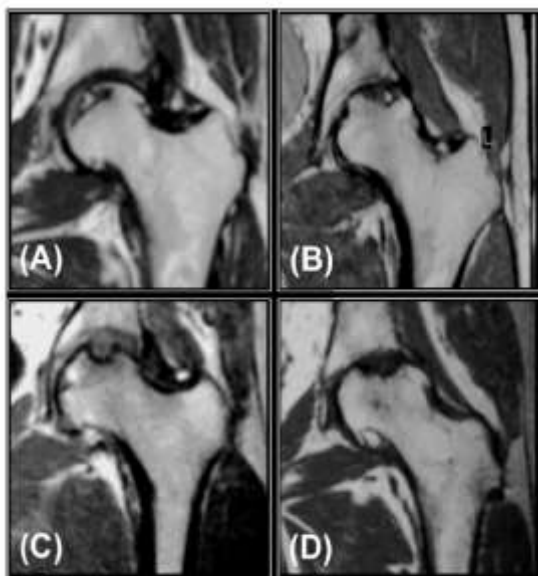
ΕΙΚΟΝΑ 5. Απεικόνιση του συστήματος ταξινόμησης ARCO. (Gardeniers JMW. ARCO Committee on Terminology and Staging. Report on the committee meeting at Santiago de Cobostella. ARCO Newsletter 1993; 5:79-82).

1.6.4. Το σύστημα τρισδιάστατης εκτίμησης των Ιωαννίνων

Το προτεινόμενο σύστημα κατάταξης της οστεονέκρωσης βασίζεται σε όλες τις απεικονιστικές τεχνικές (ακτινογραφία, μαγνητική τομογραφία και σπινθηρογράφημα), ενώ λαμβάνεται υπόψη η παρουσία κάποιου αιτιολογικού παράγοντα. Τα βασικά κριτήρια του συστήματος είναι η ακεραιότητα της κεφαλής (καθίζηση ή όχι της αρθρικής επιφάνειας) καθώς και η έκταση της βλάβης σε σχέση με την κοτύλη (αν εκτείνεται εκτός των ορίων της κοτύλης ή όχι) (Εικ. 6). Το σύστημα κατάταξης περιλαμβάνει 5 κλάσεις (Ο έως IV), ενώ οι κλάσεις II και III διακρίνονται σε δύο επιμέρους υποκλάσεις, με κριτήριο την έκταση της βλάβης⁽⁴⁶⁾ (Πιν. 4).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Στάδια ταξινόμησης των Ιωαννίνων

ΚΛΑΣΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
0	Οι ακτινογραφίες, η μαγνητική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα είναι φυσιολογικά αλλά η οστεονέκρωση έχει ήδη διαγνωστεί στο άλλο ισχίο του ασθενούς και επιπλέον υπάρχει ένας τουλάχιστον αιτιολογικός παράγοντας. Ουσιαστικά, η κατάταξη ενός ισχίου στην κλάση 0 σημαίνει ότι υπάρχει σημαντική πιθανότητα εμφάνισης οστεονέκρωσης στο ισχίο, το οποίο για το λόγο αυτό πρέπει να παρακολουθείται.
I.	Οι ακτινογραφίες είναι φυσιολογικές αλλά η μαγνητική τομογραφία η/και το σπινθηρογράφημα είναι θετικά. Συχνά, στο στάδιο αυτό ο ασθενής δεν παρουσιάζει πόνο ή άλλα κλινικά συμπτώματα («σιωπηλό» ισχίο).
II.	Η οστεονέκρωση εντοπίζεται με όλες τις τεχνικές απεικόνισης. Η κεφαλή διατηρεί την ακεραιότητά της, δηλαδή το σφαιρικό της σχήμα (δεν υπάρχει καθίζηση της αρθρικής επιφάνειας). Η κλάση II διαιρείται σε δύο υποκλάσεις: <i>IIa: Η βλάβη περιορίζεται (σε όλες τις τομές της μαγνητικής τομογραφίας) μέσα στα όρια της κοτύλης</i> <i>IIb: Η βλάβη εκτείνεται έξω από το «χείλος» της κοτύλης σε μία τουλάχιστον από τις τομές της μαγνητικής τομογραφίας.</i>
III.	Όλες οι απεικονιστικές τεχνικές είναι θετικές. Η αρθρική επιφάνεια έχει υποστεί καθίζηση με αποτέλεσμα την παραμόρφωση του σφαιρικού σχήματος (επιπέδωση) της κεφαλής. Η κλάση III διαιρείται σε δύο υποκλάσεις: <i>IIIa: Η βλάβη περιορίζεται (σε όλες τις τομές της μαγνητικής τομογραφίας) μέσα στα όρια της κοτύλης</i> <i>IIIb Η βλάβη εκτείνεται έξω από το «χείλος» της κοτύλης σε μία τουλάχιστον από τις τομές της μαγνητικής τομογραφίας</i>
IV	Προχωρημένος εκφυλισμός της άρθρωσης (αρθρίτιδα) με έντονο πόνο και περιορισμό της κινητικότητας του ισχίου



ΕΙΚΟΝΑ 6. Μαγνητική τομογραφία ισχίων με

νέκρωση. (Α) στάδιο IIa: βλάβη μικρής έκτασης που περιορίζεται στα όρια της κοτύλης, **(Β)** στάδιο IIb: η βλάβη εκτείνεται έξω από τα όρια της κοτύλης ενώ η κεφαλή παραμένει σφαιρική, **(C)** στάδιο IIIa: η κεφαλή έχει υποστεί καθίζηση μικρής έκτασης που όμως περιορίζεται στα όρια της κοτύλης, **(D)** στάδιο IIIb: βλάβη μεγάλης έκτασης (και εκτός των ορίων της κοτύλης), η κεφαλή έχει υποστεί καθίζηση (Bassounas AE, Karantanis AH, Fotiadis DI, Malizos KN. Femoral head osteonecrosis: volumetric MRI assessment and outcome. Eur J Radiol. 2007; 63(1):10-15).

1.7.ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΣΗΣ

Οι θεραπευτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της οστεονέκρωσης έχουν ως σκοπό την πρόληψη της καθίζησης και συνεπώς της καταστροφής της μηριαίας κεφαλής. Για το σκοπό αυτό, γίνεται προσπάθεια υποστήριξης ή/και προστασίας του υποχόνδριου οστού.

1.7.1. Θεραπευτική αντιμετώπιση με διασωστικές επεμβάσεις

A) Συντηρητική αντιμετώπιση

Όταν η βλάβη είναι μικρότερη από το 15% της αρθρικής επιφανείας και επίσης βρίσκεται εκτός περιοχής φόρτισης τότε η θεραπεία μπορεί να περιοριστεί σε συντηρητικά μέτρα όπως αναλγητικά και αποφόρτιση. Τα μέτρα αυτά ανακουφίζουν τον ασθενή αλλά συνήθως δεν αναστέλλουν την πρόοδο και την εξέλιξη της νόσου ^(47,48).

B) Αποσυμπίεση με τρυπανισμούς

Για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η μέθοδος το 1962 από τους Ficat et al ⁽⁴⁹⁾. Οι τρυπανισμοί (συνηθέστερα τρεις με φρέζα 4,5mm) γίνονται από το όριο του μείζονος τροχαντήρα και με τέτοια κατεύθυνση ώστε να καλύψουν όλη την περιοχή της νεκρωτικής βλάβης. Στόχος της επέμβασης είναι να προκαλέσει αποσυμπίεση του μυελού, ελάττωση της αυξημένης ενδοστικής πίεσης και διακοπή αυτού του φαύλου κύκλου που επιδεινώνει την ισχαιμία. Με αυτό τον τρόπο έχει σαν άμεση συνέπεια την θεαματική ανακούφιση από το άλγος. Γενικά θεωρείται μέθοδος μικρής επεμβατικότητας και ασφαλής.

Γ) Αντιμετώπιση με χρήση τσιμέντου (cementation)

Η μέθοδος στηρίζεται στην έγχυση, εντός της νεκρωτικής βλάβης, τσιμέντου χαμηλού ιξώδους με σκοπό την ανάταξη και διατήρηση της σφαιρικότητας της αρθρικής επιφάνειας ⁽⁵⁰⁾.

Δ) Χρήση αγγειούμενων οστικών μοσχευμάτων

Κατά την τεχνική αυτή γίνεται ένας σχετικά ευρύς τρυπανισμός και προσπάθεια να αφαιρεθεί όσο το δυνατό περισσότερο τμήμα του νεκρωμένου ιστού. Στη συνέχεια αυτόλογο σπογγώδες οστικό μόσχευμα από την περιοχή του τροχαντήρα και του αυχένα εμπακτώνεται στην υποχόνδρια περιοχή ⁽⁵¹⁻⁵⁵⁾. Παρόμοια τεχνική περιγράφεται από τους Mont et al. με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούν για την πλήρωση της υποχόνδριας περιοχής BMP (οστική μορφογενετική πρωτεΐνη) και αλλομόσχευμα ⁽⁵⁶⁾.

Ε) Χρήση μοσχεύματος αγγειούμενης περόνης

Αποτελεί την πιο βιολογική μέθοδο αντιμετώπισης της οστεονέκρωσης της μηριαίας κεφαλής η οποία προσφέρει: α) με την διάνοιξη της σήραγγας τοποθέτησης της περόνης, αποσυμπίεση της μηριαίας κεφαλής, πτώση της ενδοοστικής πίεσης και διακοπή του φαύλου κύκλου παρακώλυσης της αιμάτωσης, β) αφαίρεση του νεκρωμένου σπογγώδους οστού που παρακωλύει την επαναγγείωση, γ) τοποθέτηση υγιούς σπογγώδους αυτόλογου οστικού μοσχεύματος που ευνοεί την οστεογένεση, δ) μεταμόσχευση υγιούς φλοιοσπογγώδους οστού που αφενός αποτελεί άριστο υποστήριγμα στην υποχόνδρια περιοχή, αφετέρου είναι φορέας αιμοφόρων αγγείων στο επίκεντρο της βλάβης προσφέροντας αιτιολογική αντιμετώπιση και

ευοδώνοντας την επαναγγείωση ⁽⁵⁷⁾.

ΣΤ) Οστεοτομίες

Σκοπός αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης είναι να απομακρύνει τη βλάβη λόγω νέκρωσης από την περιοχή φόρτισης της άρθρωσης. Πρόκειται για διατροχαντήριες οστεοτομίες στροφής ή κάμψης. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι αναφέρονται άριστα ή καλά αποτελέσματα σε ποσοστό 80% και επιβίωσης της μηριαίας κεφαλής σε ποσοστό 90% στην πενταετία, είναι επέμβαση με υψηλό ποσοστό επιπλοκών και κυρίως επέμβαση που επηρεάζει αρνητικά την μελλοντική αντικατάσταση του ισχίου με ολική αρθροπλαστική ⁽⁵⁸⁾.

Ζ) Χρήση εμφυτεύματος πορώδους ράβδου τανταλίου

Η ράβδος τανταλίου τοποθετείται σε σήραγγα που διανοίγεται από την υποτροχαντήρια περιοχή μέχρι την υποχόνδρια περιοχή στο κέντρο της περιοχής της νέκρωσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται τόσο αποσυμπίεση της μηριαίας κεφαλής όσο και στήριξη της υποχόνδριας περιοχής. Επίσης το ταντάλιο λόγω της δομής του προσελκύει τις οστεοβλάστες και έτσι επιτυγχάνεται υψηλός βαθμός ενσωμάτωσης ^(59,60,61).

1.7.2. Θεραπευτική αντιμετώπιση με επεμβάσεις αντικατάστασης της άρθρωσης

Α) Ημιαρθροπλαστική ισχίου

Η μέθοδος αφορά προχωρημένα στάδια οστεονέκρωσης όπου δεν είναι εφικτή η διάσωση της μηριαίας κεφαλής αλλά δεν υπάρχουν βλάβες στην κοτύλη. Σκοπός της μεθόδου είναι να αντικαταστήσει το φθαρμένο μέρος της αρθρικής επιφάνειας και να διατηρήσει όσο το δυνατό περισσότερο οστικό απόθεμα για μια πιθανή αναθεώρηση ⁽⁶²⁾.

Β) Ημιαρθροπλαστική επιφανείας

Μια εξέλιξη της προηγούμενης μεθόδου αποτελεί η ημιαρθροπλαστική επιφανείας. Έτσι προχωρώντας ακόμα περισσότερο στην προσπάθεια διάσωσης ακόμα περισσότερου οστικού αποθέματος, περιορίζεται μόνο στην επιφάνεια της μηριαίας κεφαλής ^(63,64).

Γ) Ολική αρθροπλαστική ισχίου

Είναι βιβλιογραφικά τεκμηριωμένο ότι η ολική αρθροπλαστική του ισχίου έχει σημαντικά χειρότερα αποτελέσματα στους ασθενείς με οστεονέκρωση σε σχέση με τους ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ⁽⁶⁵⁾. Ωστόσο νεώτερες βιβλιογραφικές αναφορές έρχονται να ανατρέψουν αυτή την ισχύουσα άποψη και παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα με επιβίωση των εμφυτευμάτων σε ποσοστό που φτάνει το 93,4% στα 11,2 έτη ⁽⁶⁶⁾. Ένα άλλο ζήτημα που ανακύπτει στην βιβλιογραφία είναι γύρω από το ποιος είναι ο καταλληλότερος τύπος ολικής αρθροπλαστικής για τους ασθενείς με οστεονέκρωση που κατά κανόνα είναι νεαρής ηλικίας και με πολύ αυξημένες κινητικές απαιτήσεις.

1.7.3. Μελλοντικές θεραπείες αντιμετώπισης

Η θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο έχει σαν σκοπό την αύξηση της οξυγόνωσης των ιστών με στόχο την προαγωγή σύνθεσης κολλαγόνου, τη διήθηση των ιστών με ινοβλάστες και την αγγειογένεση. Μάλιστα μικρές βλάβες σταδίου I κατά Steinberg είναι δυνατό να αποκατασταθούν πλήρως ή να μείνουν σταθερές ⁽⁶⁷⁾. Ωστόσο περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται για να προκύψουν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Φαρμακευτικοί παράγοντες όπως τα αντι-υπερλιπιδαιμικά (Lovastatin) είναι δυνατό να έχουν ευεργετική δράση στη θεραπεία της οστεονέκρωσης ⁽⁶⁸⁾. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να αναστέλλουν τη διήθηση του μυελού των οστών με λιποκύτταρα όπως συμβαίνει στη λήψη κορτικοστεροειδών, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την αύξηση της ενδοστικής πίεσης και του επακόλουθου φαύλου κύκλου. Ακόμη, η αγωγή με Enoxaparin σε ασθενείς με οστεονέκρωση μηριαίας κεφαλής σε πολύ πρώιμα στάδια και οπωσδήποτε πριν την καθίζηση, είναι δυνατό να επιβραδύνουν την εξέλιξη, να σταθεροποιήσουν τις βλάβες ή ακόμα και να τις αναστρέψουν παρέχοντας επίσης σημαντική ανακούφιση από το άλγος ⁽⁶⁹⁾.

Όπως με πολλές παθήσεις του μυοσκελετικού ένας πιθανός τρόπος αντιμετώπισης της οστεονέκρωσης μπορεί να είναι η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής ή της γονιδιακής θεραπείας. Έχουν απομονωθεί πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών ασθενών με οστεονέκρωση τα οποία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την ανακατασκευή οστεοχόνδρινων ελλειμμάτων στην περιοχή του οστικού

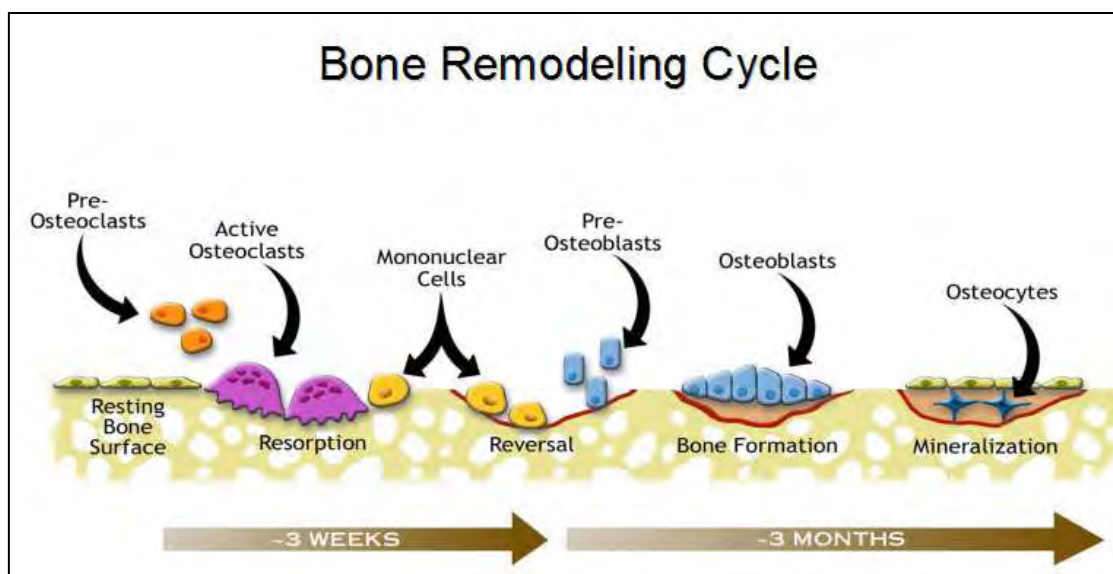
εμφράκτου. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) φαίνεται πως διεγείρει την αγγειογένεση και προάγει την επούλωση (Mont 1998). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCD-hVEGF165 (το οποίο περιέχει το γονίδιο για τον VEGF) με την ενσωμάτωση κολλαγόνου για τη θεραπεία ενός μοντέλου οστεονέκρωσης σε πειραματόζωα στα οποία παρατηρήθηκε τόσο αυξημένη αγγειογένεση όσο και οστεογένεση ⁽⁷⁰⁾.

2. ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο σκελετός μαζί με τους τένοντες και τους σκελετικούς μύες αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς διεκπεραιώνει διάφορες σημαντικές λειτουργίες όπως είναι η κίνηση, η προστασία των εσωτερικών οργάνων όπως ο εγκέφαλος και η αιμοποίηση που συντελείται εντός του μυελικού σωλήνα των οστών. Κατά τη διάρκεια της ζωής μας, τα οστά αναδομούνται συνεχώς, με την βοήθεια της απορρόφησης από τους οστεοκλάστες και την εναπόθεση νέου οστού από του οστεοβλάστες (Εικ. 7). Μάλιστα έχει υπολογιστεί πως κάθε 10 με 25 χρόνια ολόκληρος ο σκελετός αντικαθίσταται από νέο οστό, ο οποίος απαιτείται να ανταπεξέλθει στις καθημερινές συνθήκες κόπωσης αλλά και στους διάφορους μικροτραυματισμούς που συντελούνται καθημερινά. Αν όμως εξαιτίας κάποιου γεγονότος αυτή η ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών διαταραχθεί, δημιουργούνται σκελετικές ανωμαλίες οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα της καθημερινής ζωής.

Η καταστροφή της οστεονεκρωτικής μηριαίας κεφαλής είναι το αποτέλεσμα της αυξανόμενης αποδόμησης της νεκρωτικής περιοχής και της περιορισμένης αναδόμησης στο υποχόνδριο οστού. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει πολλές μελέτες για την κατανόηση του μεταβολισμού των οστών με σκοπό την εύρεση μεθόδων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εξέλιξη νόσων που σχετίζονται με απώλεια οστικής μάζας όπως είναι η οστεοπόρωση και η οστεονέκρωση. Αυτές οι μελέτες έφεραν στην επιφάνεια μόρια που σχετίζονται με την λειτουργία των βασικών ομάδων κυττάρων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των οστών, τις οστεοβλάστες και τις οστεοκλάστες. Συγκεκριμένα ανακαλύφθηκαν τρία ουσιαστικά

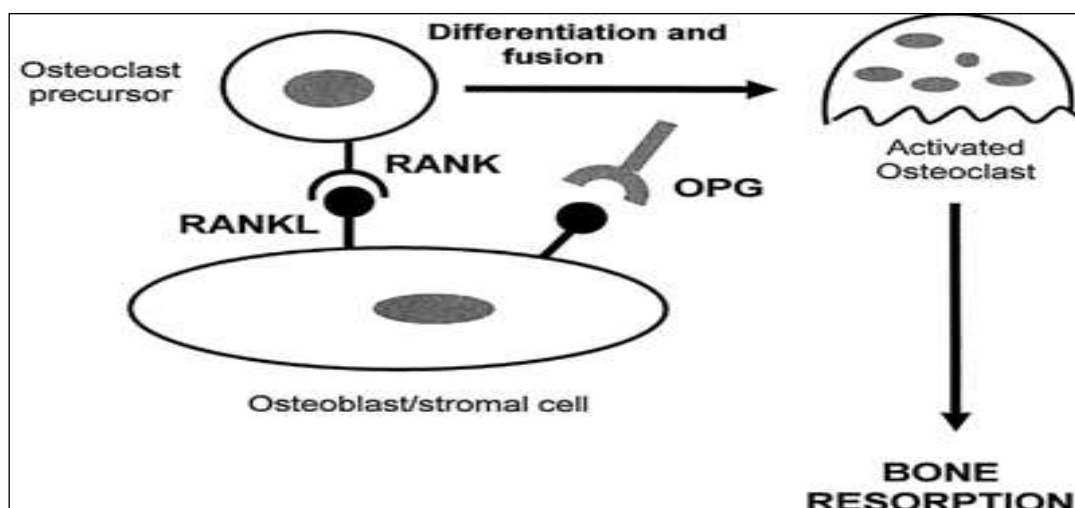
μόρια που είναι απαραίτητα για τη λειτουργικότητα των οστεοκλαστών: το **RANK**, ο προσδέτης του **RANKL** (RANK Ligand), και ο αναστολέας του RANKL, η οστεοπροτεγερίνη (**OPG**). Ακόμη η ανακάλυψη μιας ομάδας πρωτεϊνών που έχουν οστεοεπαγωγική ικανότητα, οι **BMPs**, έδωσε νέα ώθηση στη μελέτη της δράσης και της λειτουργίας των οστεβλαστών ⁽⁷¹⁾.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Ο κύκλος του μεταβολισμού των οστών. Ο μεταβολισμός των οστών είναι μία δια βίου διαδικασία όπου το ώριμο ή κατεστραμμένο οστό απομακρύνεται από το σκελετό (μια διαδικασία που ονομάζεται απορρόφηση οστού) και σχηματίζεται νέο οστό (μια διαδικασία που ονομάζεται οστεοποίηση ή σχηματισμός νέου οστού). Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των οστών είναι οι οστεοβλάστες, που εκκρίνουν το οργανικό υπόστρωμα, οι οστεοκλάστες, που αναρροφούν (διαλύουν) το οστό, και τα οστεοκύτταρα, που συμβάλλουν στη συντήρηση της οστικής ουσίας.

3. OPG-RANKL-RANK

Μέσω της αλληλεπίδρασης του RANK (υποδοχέας που βρίσκεται στα προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών) με το RANKL (προσδέτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών) ενεργοποιείται η οστεοκλαστογένεση. Η οστεοπροτεγερίνη (**OPG**) είναι ένας διαλυτός υποδοχέας που εμποδίζει την οστεοκλαστογένεση με την πρόσδεση της στο **RANKL** την αλληλεπίδραση RANKL-RANK ⁽⁷²⁻⁷⁷⁾. Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα του **RANK** παρέχει το σήμα για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών από τα αιμοποιητικά προγενετικά κύτταρα καθώς και την ρύθμιση την ωρίμανσης των οστεοκλαστών ⁽⁷⁸⁻⁸²⁾. Ειδικότερα το RANKL ενεργοποιεί την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, την ενεργοποίησή τους καθώς και προσκόλλησή τους στην επιφάνεια του οστού. Η OPG εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ RANKL-RANK και δρα ως ένας ρυθμιστής της ωρίμανσης των οστεοκλαστών και της αποκατάστασης του οστού (Εικ. 8).



ΕΙΚΟΝΑ 8. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος RANKL/RANK/OPG. Το RANKL σηματοδοτεί την σχηματισμό των οστεοκλαστών μέσω της αλληλεπίδρασης με το RANK, το οποίο εκφράζεται στους πρώιμους οστεοβλάστες. Η OPG εξουδετερώνει αυτή τη δράση με τη σύνδεση της στο RANKL

(Coetzee M et al, Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? South Med J. 2004;97(5):506-11).

3.1. ΔΟΜΗ ΜΟΡΙΩΝ-ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ

Η OPG αρχικά συντίθεται ως ένα πεπτίδιο 401 αμινοξέων, με ένα προπεπτίδιο 21 αμινοξέων το οποίο αποκόπτεται, δημιουργώντας μια ώριμη πρωτεΐνη 380 αμινοξέων. Η ομολογία της αλληλουχίας μεταξύ της ανθρώπινης OPG και του ποντικού ανέρχεται στο 86%. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους TNF υποδοχείς, η OPG δεν φέρει διαμεμβρανική και ενδοκυτταρική περιοχή, αλλά συντίθεται ως μια διαλυτή πρωτεΐνη. Η OPG περιέχει τέσσερις κωδικοποιητικές περιοχές (Coding Region Domain-CRDs) (CRD1-CRD4) στην N-τελική περιοχή. Η C-τελική περιοχή περιέχει 2 ομόλογες περιοχές θανάτου (DHH1 και DHH2), μια περιοχής πρόσδεσης ηπαρίνης, και κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys400) απαραίτητο για το διμερισμό. Η OPG μπορεί να υπάρξει ως μονομερές ή διμερές με τη βοήθεια του σχηματισμού ενός δισουλφιδικού δεσμού στην Cys400. Η μεταλλαγή της Cys400 σε Ser δεν επηρεάζει την κατασταλτική ικανότητα της OPG στην οστεοκλαστογένεση, γεγονός που αποδεικνύει πως ο διμερισμός δεν είναι απαραίτητος για αυτή την κατασταλτική της ικανότητα ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾.

Χρησιμοποιώντας την OPG σαν ανιχνευτή απομονώθηκε και η πρωτεΐνη πρόσδεσης σε αυτή, η οποία αρχικά ονομάστηκε osteoprotegerin ligand (OPGL) ή παράγοντας διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (Osteoclasts Differentiation Factor, ODF). Η μοριακή ανάλυση έδειξε πως αυτός ο παράγοντας είναι ίδιος με το RANKL που είχε αρχικά απομονωθεί και επίσης είναι όμοιος με τον TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine), ο οποίος αρχικά είχε αναγνωριστεί ως ρυθμιστικός παράγοντας

των Τ κυττάρων. Τελικά επικράτησε ο όρος RANKL για αυτή την τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία φέρει μια μικρή ενδοκυτταρική ουρά και μια διαμεμβρανική περιοχή που συνδέεται εξωκυττάρια μέσω ενός μίσχου. Η RANKL πρωτεΐνη στον άνθρωπο και τον ποντικό έχει 317 και 316 αμινοξέα αντίστοιχα και παρουσιάζουν 87% ομοιότητα⁽⁸³⁻⁸⁶⁾.

Τέλος, ο υποδοχέας του RANKL, το RANK, είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των TNF υποδοχέων. Η ανθρώπινη RANK πρωτεΐνη αποτελείται από 616 αμινοξέα, στα οποία περιλαμβάνονται ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 28 αμινοξέων, ένα Ν-τελικό εξωκυττάριο άκρο, μια μικρή διαμεμβρανική περιοχή 21 αμινοξέων και μια μεγάλη C-τελική ενδοκυτταρική περιοχή^(83,87).

3.2. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Η OPG ήταν το πρώτο μόριο που αναγνωρίστηκε από την ομάδα των OPG-RANKL-RANK και κλωνοποιήθηκε ως ένα πιθανός καταστολέας της οστεοκλαστογένεσης⁽⁴⁴⁾. Τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν OPG καθώς και ποντίκια που λαμβάνουν ανασυνδυασμένη OPG παρουσιάζουν μια αύξηση στην πυκνότητα του οστού καθώς και οστεοπέτρωση^(73,88). Η αποσιώπηση του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα πρόωμη οστεοπόρωση. Αυτές οι μελέτες ανέδειξαν για πρώτη φορά τον ρόλο της OPG στην διατήρηση της οστικής μάζας.

Ο παράγοντας ο οποίος καταστέλλεται από την OPG, αναγνωρίστηκε τελικά πως ήταν το RANKL μέσα από μια σειρά πειραμάτων. Το RANKL επάγει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών από τα κύτταρα του μυελού των οστών όπως φάνηκε σε καλλιέργειες οστεοκλαστών (δράση η οποία καταστέλλεται από την OPG)

και ενεργοποιεί τις ώριμες οστεοκλάστες να απορροφήσουν οστό τόσο in vivo όσο και in vitro. Έτσι το RANKL αναγνωρίστηκε σαν ένας παράγοντας που εμπλέκεται στην ρύθμιση της λειτουργίας των οστεοκλαστών. Με την μελέτη διαγονιδιακών ποντικών στα οποία υπήρχε έλλειψη του λειτουργικού γονιδίου του RANKL, αποδείχθηκε πως το RANKL είναι απαραίτητο για την οστεοκλαστογένεση in vivo ⁽⁸⁸⁾. Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση του γονιδίου του RANKL, τα ποντίκια ανέπτυξαν οξεία οστεοπέτρωση και ελαττωματική οδοντοστοιχία, τα οποία ήταν αποτέλεσμα της παντελούς ελλείψεως οστεοκλαστών ^(89,90).

Σε μελέτες στις οποίες έγινε καταστολή του γονιδίου του RANK, ποντίκια ανέπτυξαν επίσης τον φαινότυπο της έλλειψης του γονιδίου του RANKL, δηλαδή οστεοπέτρωση, ελαττωματική οδοντοστοιχία και όλα εκείνα τα συμπτώματα της ελλείψεως οστεοκλαστών. Αυτό απέδειξε για πρώτη φορά τον σημαντικό ρόλο που έχει η αλληλεπίδραση RANKL-RANK για την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, συνεργαζόμενη όμως και ρυθμιζόμενη από την OPG ^(91,92).

Η σημαντική λειτουργία των OPG-RANKL-RANK στην οστεοκλαστογένεση και την οστική ανακατασκευή σχετίζεται επίσης με διάφορες ασθένειες του ανθρώπινου σκελετού. Για παράδειγμα ένας διπλασιασμός του σηματοδοτικού πεπτιδίου RANK έχει συνδεθεί με οστεόλυση καθώς και τη νόσο του Paget (μια σπάνια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από δυσπλασία των οστών και αυξημένη αναδόμηση σε διάφορες περιοχές του σκελετού) σε 4 διαφορετικές οικογένειες. Δυο ενθέσεις (μια 18 και μια 27 ζευγών βάσεων στο εξώνιο 1 του RANK) έχουν αναγνωριστεί πως οδηγούν σε μείωση της έκφρασης και αυξημένη σηματοδότηση μέσω του

μονοπατιού NF- κ B⁽⁹³⁾. Επίσης σε ασθενείς που πάσχουν από επεκτατική σκελετική υπερφωσφατασία (expansile skeletal hyperphosphatasia), μια μεταβολική ασθένεια των οστών που χαρακτηρίζεται από υπεροστωτικά μακρά οστά, πρόωγη κώφωση και απώλεια των δοντιών, έχει βρεθεί πως υπεύθυνη είναι μια ένθεση στο εξώνιο 1 του RANK^(94,95). Τέλος, μεταλλάξεις που σχετίζονται με την περιοχή της OPG έχουν βρεθεί σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Paget⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾.

3.3. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Όταν το RANKL συνδέεται στον υποδοχέα του, το RANK, ενεργοποιεί μια σειρά από μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Η σύνδεση RANK-RANKL σηματοδοτεί την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως είναι τα **MAPS**, **P13K** ή **NF- κ B** μονοπάτια, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα πολύπλοκο δίκτυο για να ενεργοποιήσουν την οστεοκλαστογένεση. Επομένως είναι πολύ σημαντική η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο λειτουργούν αυτά τα μονοπάτια, καθώς και του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους^(71,98-104) (Εικ. 9).

3.3.1. Πρωτεΐνες πρόσδεσης

Καθώς το RANK είναι μέρος της υπερικογένειας των TNF υποδοχέων (Tumor Necrosis Factor-receptor, **TNFR**), δεν έχει δραστηριότητα κινάσης. Επομένως ασκεί την δράση του μέσω της υποδοχής και πρόσδεσης παραγόντων που μεταφέρουν το σήμα μετά την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα. Οι TNFRs συνήθως προσδένουν ειδικούς παράγοντες πρόσδεσης, οι οποίοι ονομάζονται TNFR-associated factors (**TRAFs**) και προσδένονται σε διάφορες περιοχές της κυτταροπλασματικής ουράς του

TNFR και μεταδίδουν το σήμα ⁽¹⁰⁵⁾. Το γονίδιο του RANK κωδικοποιεί για διάφορες περιοχές πρόσδεσης των TRAFs: η περιοχή των αμινοξέων 235-258 προσδένει την TRAF6, η περιοχή των 359-531 προσδένει επίσης την TRAF6, ενώ η περιοχή των 532-625 προσδένει τις TRAF2, TRAF5 και TRAF6. Λειτουργικά, αυτές οι περιοχές πρόσδεσης των TRAFs ενεργοποιούν τελικά τις RANK-εξαρτώμενη NF-κB και c-Jun NH2-terminal (JNK) κινάσες ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾. Διαγράφοντας την περιοχή πρόσδεσης της TRAF6, καταστέλλεται εντελώς η μετάδοση σήματος μέσω της RANK-εξαρτώμενη NF-κB κινάσης, αλλά όχι μέσω της JNK. Η σπουδαιότητα της TRAF6 έγινε εμφανής σε μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε διαγραφεί η TRAF6, τα οποία παρουσίασαν το φαινότυπο των RANK^{-/-} και RANKL^{-/-} ποντικών, δηλαδή καταστολή της οστεοκλαστογένεσης και ατελής ενεργοποίηση των ώριμων οστεοκλαστών. Η προσφορά των TRAF2 και TRAF5 στην οστεοκλαστογένεση αποδείχτηκε μηδαμινή σε σχέση με την TRAF6. Ποντίκια στα οποία είχε σβηστεί το Traf 5 γονίδιο είχαν μια ήπια μεταβολή στην οστεοκλαστογένεση, ενώ η ενεργοποίηση μέσω των NF-κB και JNK δεν επηρεάστηκε καθόλου. Επίσης σε καλλιέργειες προγενετικών Traf2^{-/-} κυττάρων από ήπαρ, αποδείχθηκε μείωση μόλις 20% στις πολυπύρηνες οστεοκλάστες και την ενεργοποίηση των NF-κB και JNK από το RANKL ^(109,110). Από αυτές τις μελέτες αποδεικνύεται πως το TRAF6 είναι το κύριο μόριο επαγωγής του σήματος από RANK στο μονοπάτι του NF-κB που ενεργοποιεί την οστεοκλαστογένεση.

3.3.2. Σηματοδότηση μέσω του NF-κB

Η σηματοδότηση μέσω των RANK-RANKL περιλαμβάνει και την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μορίου NF-κB. Τα θηλαστικά εκφράζουν πέντε **Rel** ή **NF-κB**

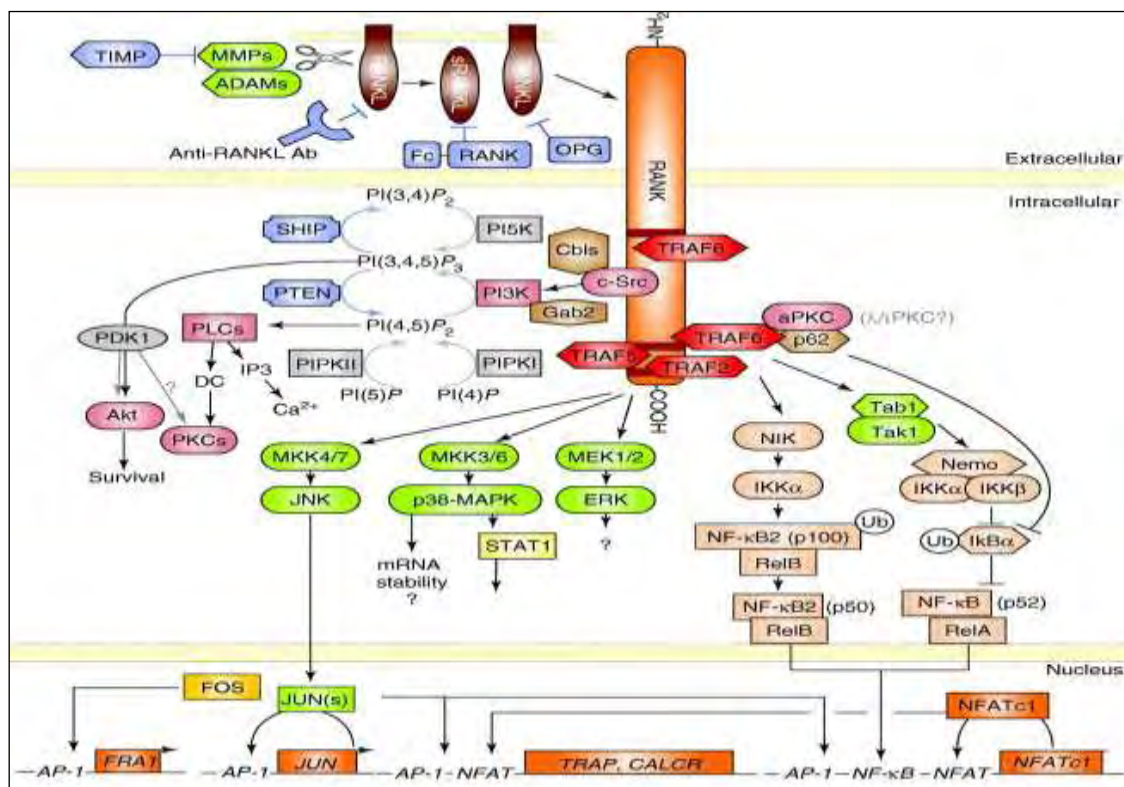
πρωτεΐνες που χωρίζονται σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις **RelA (p65)**, **c-Rel** και **RelB** που συντίθενται ως ώριμα προϊόντα, ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις **NF-kB1** και **NF-kB2** που συντίθεται ως μεγάλα πρόιμα μόρια που στη συνέχεια πρωτεολυτικά δίνουν τις p50 και p52 NF-kB πρωτεΐνες αντίστοιχα. Οι RelA και c-Rel διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα προσδεμένες με τις IκB κατασταλτικές πρωτεΐνες, οι οποίες αμέσως μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού καταβολίζονται από τις IκB κινάσες (IKK). Αυτές οι IKK πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο ομόλογες υπομονάδες, τις IKKα και IKKβ, καθώς και μια ρυθμιστική υπομονάδα την IKKγ. Η ενεργοποίηση των διμερών p50:RelA αναφέρεται ως το μονοπάτι που εξαρτάται κυρίως από την δραστηριότητα της IKKβ, p50:RelNF-kB, ενώ άλλα μονοπάτια όπως αυτό του διμερούς NF-kB2:p100 απαιτεί τη δράση της IKKα^(111,112).

Για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών, απαιτείται η έκφραση των p50 και p52 NF-kB, καθώς τα p50^{-/-} και p52^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν οστεοπέτρωση εξαιτίας της ελλείψεως οστεοκλαστών και βλάβης στην ενεργοποίησή τους, αντίστοιχα^(113,114). Επίσης η μελέτη ποντικών όπου είχαν διαγραφεί οι IKKα και IKKβ έδειξαν πως η IKKβ, αλλά όχι η IKKα, είναι σημαντική για την οστεοκλαστογένεση in vivo. Επομένως, είναι εμφανές πως η σηματοδότηση της οστεοκλαστογένεσης μέσω της πρόσδεσης RANK-RANKL γίνεται μέσω της IKKβ και του κλασσικού μονοπατιού NF-Kb⁽¹¹⁵⁾.

3.3.3. Σηματοδότηση μέσω της MAPK

Οι Mitogen-activated πρωτεϊνικές κινάσες (**Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK**) είναι μια οικογένεια κινασών Ser/Thr και αποτελούνται από εξωκυτταρικές κινάσες που ρυθμιζόμενες από το σήμα (Erk1/2), p38-MAPKs (α/β/γ/δ), c-Jun N-

τελικές κινάσες (JNK1,2,3) καθώς και "μεγάλες" MAPKs (Erk 5,7,8). Έχει βρεθεί πως αρκετές κινάσες ενεργοποιούνται από το μονοπάτι σηματοδότησης του RANK και βοηθούν ώστε η μετάδοση του σήματος από το RANK να μετατραπεί σε μια αντίδραση του κυττάρου. Για παράδειγμα έχει βρεθεί πως η καταστολή της p38-MAPK εμποδίζει την επαγόμενη από το RANK διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, γεγονός που δείχνει το σημαντικό ρόλο που έχει η p38-MAPK στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών από τα προγενετικά κύτταρα του μυελού των οστών. Επίσης έχει αποδειχτεί πως οι κινάσες JNKs και η MKK7 συνδέονται με την οστεοκλαστογένεση *in vitro*. Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 ενεργοποιείται από την JNK και είναι πολύ σημαντικός για την οστεοκλαστογένεση. Άλλες πρωτεΐνες της ομάδας του AP-1 όπως οι JunB, c-Fos και Fra, συμμετέχουν επίσης στην οστεοκλαστογένεση, επιβεβαιώνοντας τον πολύ σημαντικό ρόλο του μονοπατιού RANKL-RANK-MAPK-JNK-AP1 στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾.



ΕΙΚΟΝΑ 9. Απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού RANK-RANKL που ελέγχει την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των οστεοκλαστών. Το RANKL (είτε αυτό που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη των οστεοβλαστών είτε το διαλυτό RANKL) διασπάται από τις MMPs ή τις πρωτεΐνες ADAMS, δεσμεύει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα RANK. Η διέγερση του RANK ενεργοποιεί το NF-κΒ, την MAPK, και μονοπάτια φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης για την ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης μέσω των TRAFs και Gab2. Τα μόρια στα μπλε κουτιά και οι μπλε γραμμές υποδηλώνουν ανασταλτικές οδούς της οστεοκλαστογένεσης. Τα μόρια στα γκριζα κουτιά θεωρείται πως συμμετέχουν στην σηματοδότηση μέσω του RANK. (Wada T et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006;12(1):17-25.)

3.4. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Αν και η σηματοδότηση μέσω του RANK είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την οστεοκλαστογένεση, η διασταύρωση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι επίσης σημαντική. Για παράδειγμα, το RANKL εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων, όμως τα Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν επίσης έναν παράγοντα που επηρεάζει αρνητικά τη σηματοδότηση μέσω του RANK. Αυτός ο παράγοντας αναγνωρίστηκε πως είναι η γ -INF (γ -ιντερφερόνη). Αυτή η ιντερφερόνη επάγει την αποδόμηση της TRAF6 μέσω του συμπλόκου της ουβικουιτίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα ισχυρή καταστολή της ενεργοποίησης των NF- κ B και JNK από το RANKL. Επίσης, το RANKL μπορεί να επάγει την παραγωγή INF- β στους πρώιμους οστεοκλάστες, και η INF- β μπορεί να καταστείλει την οστεοκλαστογένεση με την εμπλοκή της στην επαγόμενη από το RANKL έκφραση του c-Fos. Όλη αυτή η διαδικασία αποτελεί έναν αυτορυθμιζόμενο μηχανισμό στον οποίο το επαγόμενο από το RANKL c-Fos επάγει τον καταστολέα του INF- β ^(120,121).

Ένας ακόμη παράγοντας που εδώ και χρόνια έχει συνδεθεί με ασθένειες των οστών είναι οι ορμόνες των φύλων. Συγκεκριμένα στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, η απώλεια της παραγωγής οιστρογόνων από τις ωοθήκες έχει ως αποτέλεσμα την οστική απώλεια και την οστεοπόρωση. Οι φυλετικές ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, δεν μειώνουν μόνο την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μέσω της καταστολής του JNK-μονοπατιού, αλλά επίσης ελέγχουν την έκφραση της OPG. Μάλιστα η χορήγηση OPG σε θηλυκά ποντίκια μετά από υστερεκτομή μπορεί να αυξήσει τον αριθμό των οστεοκλαστών και να αναστρέψει την οστική απώλεια. Σε άλλη μελέτη, όπου έγινε αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα α του

οιστρογόνου (ERα), τα θηλυκά ποντίκια παρουσίασαν οστική απώλεια, ενισχύοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο των οιστρογόνων στην οστεοκλαστογένεση ^(122,123).

Αρκετές κυτταροκίνες επηρεάζουν επίσης την οστεοκλαστογένεση. Για παράδειγμα η IL-4 καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση μέσω καταστολής του εξαρτώμενου από STAT6 NF-κβ ⁽¹²⁴⁾. Η M-SCF είναι μια ακόμη κυτταροκίνη που ενεργεί μέσω του υποδοχέα τυροσίνης c-FMS, και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την επιβίωση των οστεοκλαστών. Ασκεί τη δράση της μέσω της P13K, αλλά επίσης ενεργοποιεί την έκφραση του RANK από τα μονοκύτταρα μακροφάγα. Η επαγωγή παραγωγής του RANK από αυτά τα κύτταρα τα καθιστά δεκτικά στην ενεργοποίηση από το RANKL και επομένως δρομολογεί την διαφοροποίηση των προγενετικών κυττάρων προς την οστεοκλαστική σειρά. Τέλος σημαντική είναι και η επίδραση του TNF-α στους πρόδρομους οστεοκλάστες μέσω του υποδοχέα του TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) ^(125,126).

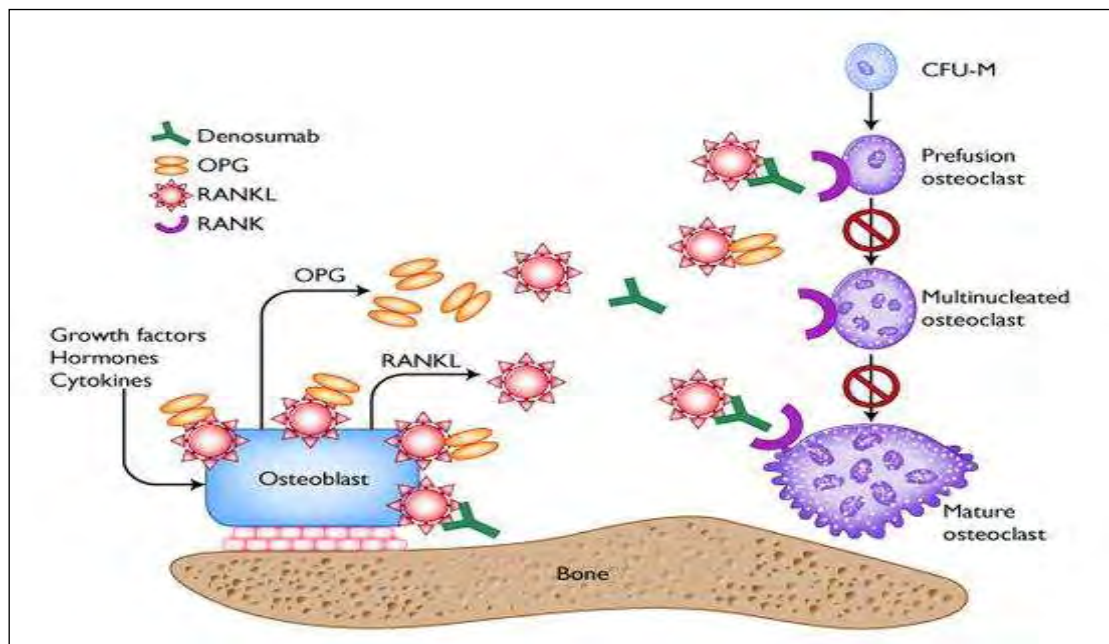
3.5. ΠΙΘΑΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ RANK-RANKL-OPG ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Εξαιτίας του ειδικού ρόλου αυτών των γονιδίων στο σχηματισμό και την αποκατάσταση των οστών, οι ερευνητές έχουν εστιάσει τα τελευταία χρόνια στη χρήση αυτών των γονιδίων ως θεραπευτικούς παράγοντες για τη θεραπεία ασθενειών όπως η οστεοπόρωση, η οστεοαρθρίτιδα, ο καρκίνος και η πόρωση των καταγμάτων ⁽¹²⁷⁻¹³¹⁾.

Διάφορες κλινικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διευκρίνιση της βιολογικής δραστηριότητας διαφόρων ανασυνδυασμένων δομών της OPG,

εστιάζοντας στην οστεοπόρωση και σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνου. Η πιο γνωστή ανασυνδυασμένη δομή από αυτά είναι το Denosumab (Abgenix, Fremont, CA) (Εικ. 10). Τα ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινο RANKL, οδηγώντας σε μια ανοσοποιητική αντίδραση που είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανοσοειδικών, πλήρως ανθρώπινων IgGs, τα οποία προσδένουν και καταστέλλουν το RANKL. Η OPG και το denosumab έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης, μάλιστα η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη OPG-Fc και το denosumab επιφέρουν τα ίδια αποτελέσματα (καταστολή της απορρόφησης του οστού) σε διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να εκφράζουν μια χιμαιρική μορφή του RANKL, που αναγνωρίζεται τόσο από την OPG όσο και από το denosumab ⁽¹³²⁾.

Η χορήγηση του denosumab σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση που έπασχαν από οστεοπόρωση, έδειξε αύξηση στην BMD στο ισχίο και στον αυχένα του μηριαίου. Μάλιστα η χορήγηση με διαφορετικές συγκεντρώσεις του denosumab για 2 χρόνια, έδειξε πως παρουσίασαν μεγαλύτερη βελτίωση από την ομάδα placebo ($p < 0.000.1$). Όσον αφορά την οστεοαρθρίτιδα, το denosumab είχε επίσης θεαματικά αποτελέσματα αυξάνοντας την οστική πυκνότητα στη σπονδυλική στήλη, το ισχίο και τον αυχένα του μηριαίου καθώς και καταστολή των αντίστοιχων βιολογικών δεικτών. Τέλος, η κλινική μελέτη σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο των οστών έδειξε πως ρυθμίζει την αναδόμηση του οστού, αλλά οι κλινικές μελέτες της χορήγησης denosumab σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο δεν έχουν ολοκληρωθεί ακόμη ^(131,133,134).



ΕΙΚΟΝΑ 10. Καταστολή του μονοπατιού που ενεργοποιείται από τη σύνδεση RANKL-RANK από το **denosumab**. Η απεικόνιση αυτή παρουσιάζει το μονοπάτι καθώς και την αλληλεπίδραση των μορίων RANKL και RANK, η οποία ρυθμίζει το μεταβολισμό των οστών, καθώς και τον ρόλο του denosumab σε αυτό το μονοπάτι (Atlas of osteoporosis).

4. ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (BMPs)

Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (**Bone Morphogenetic Proteins, BMPs**) είναι λειτουργικοί αναπτυξιακοί παράγοντες που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των TGF-β μεταγραφικών παραγόντων. Ο ρόλος τους στην εμβρυική ανάπτυξη και τις κυτταρικές λειτουργίες έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Υπάρχουν 43 μέλη αυτής της οικογένειας γονιδίων, τα οποία έχουν αναγνωριστεί στα περισσότερα είδη όπως ο *Caenorhabditis elegans*, η δροσόφιλα, ο *Xenopus*, η κότα, το ποντίκι και ο άνθρωπος. Η παρουσία αυτών των υψηλά διατηρημένων μορίων σε τόσο διαφορετικά είδη, δείχνει πως προέρχονται από μια αρχαία ομάδα προγονικών γονιδίων τα οποία έχουν διπλασιαστεί με τον καιρό και των οποίων η λειτουργία έχει αλλάξει για να ανταπεξέλθει στις ανάγκες του κάθε είδους.

Οι BMPs συντίθενται ως μεγάλα πρόδρομα μόρια με μια πρώιμη περιοχή και ένα καρβοξυτελικό άκρο 100 με 125 αμινοξέων. Αποτελούν διμερικές πρωτεΐνες 30-38 kDa που χωρίζονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τις ομοιότητες που παρουσιάζουν στην αμινοξική αλληλουχία. Μέσα στο καρβοξυτελικό άκρο των περισσότερων BMPs υπάρχουν επτά υψηλά διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης υπεύθυνα για τη σωστή αναδίπλωση αυτών των διμερών μορίων. Καθώς το καρβοξυτελικό άκρο των πρόδρομων μορίων απομακρύνεται με πρωτεόλυση, ακολουθεί ο διμερισμός, η ωρίμανση και η έκκριση δραστικών ομοδιμερών ή ετεροδιμερών BMPs ⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾.

Κατά την εμβρυική ανάπτυξη, οι BMPs ρυθμίζουν την νευρογένεση και την αιμοποίηση και επάγουν το σχηματισμό σωματιών. Μετά τη γέννηση οι BMPs

παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της οστικής μάζας. Επάγουν τη διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων του μυελού προς την οστεοβλαστική σειρά καθώς και την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, μέσω της σηματοδότησης που επιφέρουν μέσω των υποδοχέων τους. Η δράση των BMPs στα οστά έχει επιβεβαιωθεί με τη δημιουργία μοντέλων ποντικών στους οποίους διάφοροι προσδέτες των BMPs και των επιμέρους μεσολαβητών του σήματος έχουν τροποποιηθεί γενετικά με ιστο-ειδικό τρόπο. Επίσης προκλινικές μελέτες συνδέουν τις BMPs με την πόρωση των καταγμάτων ⁽¹³⁸⁾.

Περίπου 20 μέλη της οικογένειας των BMPs έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Οι BMP1-7 εκφράζονται στον σκελετικό ιστό, και μάλιστα οι BMP-2, BMP-4 και BMP-6 είναι οι πιο ανιχνεύσιμες στις καλλιέργειες οστεοκλαστών ^(139,140). Στα σκελετικά κύτταρα είναι παρών ένας μηχανισμός αυτορύθμισης των BMPs, και μάλιστα σε καλλιέργειες οστεοβλαστών βρέθηκε πως τα επίπεδα mRNA της BMP-4 εξαρτώνται άμεσα από τις υπόλοιπες BMPs. Οι υποκινητές των BMP-2 και BMP-4 περιέχουν αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Runx2, ο οποίος ρυθμίζει την οστεοβλαστογένεση καθώς και την λειτουργία των ώριμων οστεοβλαστών ^(141,142).

4.1. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (BMPs Receptors, BMPs)

4.1.1. Υποδοχείς TGF-β πρωτεϊνών

Αν και οι BMPs αναγνωρίστηκαν αρχικά ως πρωτεΐνες που επάγουν την παραγωγή οστού σε εξωσκελετικές περιοχές, νεότερες έρευνες δείχνουν πως αποτελούν περίπλοκες κυτταροκίνες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των

οστεοβλαστών, χονδροκυττάρων, νευρικών και επιθηλιακών κυττάρων. Οι υποδοχείς των TGF-β υποδοχέων, και των BMPs, έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Τα περισσότερα μέλη των TGF-β υποδοχέων δρουν μέσω του σχηματισμού συμπλόκων δύο διαφορετικών τύπων υποδοχέων κινάσης σερίνης-θρεονίνης: του υποδοχέα τύπου I 50-55 kDa και του υποδοχέα τύπου II 75 kDa.

Οι TGF-β υποδοχείς τύπου I και II (**TβR-I, TβR-II**) είναι απαραίτητοι για την επαγωγή του σήματος. Μετά την πρόσδεση του επαγωγέα σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο υποδοχέων. Οι δυο τύποι υποδοχέων αποτελούνται από τρία μέρη: μια μικρή εξωκυτταρική δομή που φέρει 10-12 κατάλοιπα κυστεΐνης, μια μεμβρανική δομή και ενδοκυτταρικές περιοχές με περιοχές πρόσδεσης κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Οι περιοχές πρόσδεσης της κινάσης σερίνης-θρεονίνης παρουσιάζουν 41% ομοιότητα ανάμεσα στους δυο τύπους υποδοχέων. Ο υποδοχέας τύπου I έχει μια περιοχή που φέρει το μοτίβο SGSGS (GS domain) και αυτό είναι που τον κάνει να διαφέρει από τον υποδοχέα τύπου II ^(143,144).

Η πρόσδεση της TGF-β πρωτεΐνης στον υποδοχέα TβR-II, που φέρει και την δραστική κινάση, επιφέρει την προσκόλληση του TβR-I σε αυτό το σύμπλοκο. Στη συνέχεια η κινάση του TβR-II φωσφορυλιώνει την περιοχή GS στον TβR-I, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης του TβR-I. Επομένως, όπως φαίνεται η εξειδίκευση του σήματος οφείλεται κυρίως στον TGF-β υποδοχέα τύπου I. Η φωσφορυλίωση του TβR-I είναι απαραίτητη για την επαγωγή του σήματος, καθώς η επαγωγή καταστέλλεται σε κύτταρα με ανενεργό TβR-II, μετά από μετάλλαξη των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στη GS περιοχή του TβR-I ή μετά από μετάλλαξη του TβR-II που τον καθιστά ανίκανο να φωσφορυλιώσει τον TβR-I. Αυτές οι παρατηρήσεις

υποδεικνύουν πως ο TβR-II είναι η αρχική πρωτεΐνη που προσδένει την TGB-β πρωτεΐνη και πως ο TβR-I είναι ένας απλός επαγωγέας του σήματος ^(145,146).

4.1.2. Υποδοχείς BMPs (BMP Receptors)

Η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης BMP σε έναν τουλάχιστον τύπου I και έναν τύπου II υποδοχέα (**BMPr-I, BMPr-II**) είναι απαραίτητη για την επαγωγή του σήματος. Υπάρχουν τρεις BMPr-I: Alk2, Alk3 (BR1a) και Alk6 (BR1b) και άλλοι τρεις τύπου II: BR2, ActR2 και ActR2B. Οι τύπου I υποδοχείς είναι εκείνοι με την υψηλή ικανότητα πρόσδεσης, ενώ οι τύπου II προσδένουν τις BMPs με χαμηλή προσδεσιμότητα. Επίσης είναι γνωστό πως οι BMPs προσδένονται με διαφορετική ικανότητα σε ειδικού τύπου I και II υποδοχείς. Αυτό αποδεικνύει πως η προσδεσιμότητα των BMPs στους υποδοχείς είναι σημαντική για την επαγωγή του σήματος και οδηγεί στην υπόθεση πως κάποιες BMPs προτιμούν ορισμένους τύπους υποδοχέων. Επίσης έχει γίνει γνωστό πως διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, εκφράζουν διαφορετικούς συνδυασμούς υποδοχέων και ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων που οδηγούν στην ποικιλότητα των σηματοδοτικών αντιδράσεων στα κύτταρα, όμως αυτός ο τομέας δεν έχει διερευνηθεί πλήρως ⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾.

4.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΜΕΣΩ ΤΩΝ BMPs

4.2.1. Πρωτεΐνες πρόσδεσης στους BMPrs

Σε αντίθεση με τους TGF-β υποδοχείς, λίγες πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί που να προσδένονται στους υποδοχείς των BMPs. Οι πρωτεΐνες **R-Smads** μπορούν να προσδεθούν σε όλους τους τύπου I υποδοχείς και εμπλέκονται στο μονοπάτι

σηματοδότησης των Smad. Επίσης η πρωτεΐνη XIAP είναι μια ακόμη πρωτεΐνη που προσδένεται στους BMP υποδοχείς, η οποία προσδένει την TAB1 και επομένως αποτελεί τον σύνδεσμο για το μονοπάτι TAB1/TAK1. Έχει βρεθεί μάλιστα πως η XIAP1 αλληλεπιδρά με την TAB1 και τον υποδοχέα Alk3. Μια ακόμη πρωτεΐνη που προσδένεται στους BMPRs είναι η BRAM1. Η BRAM1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και επίσης προσδένει την TAB1, γεγονός που δείχνει πως και αυτή είναι ικανή να προσδεθεί στην Alk3 και την TAB1^(147,150-152).

4.2.2. Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες Smad μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τις πρωτεΐνες Smad που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (**R-Smads**), τις Smad που δρουν σαν απλοί μεσολαβητές (**Co-Smad**) και τις κατασταλτικές Smad (**I-Smad**). Οι R-Smads (Smad1, Smad5 και Smad8) φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I. Όσον αφορά τις Co-Smads, έχει απομονωθεί μόνο μια στα θηλαστικά (Smad4) και δυο στον Χενopus (Smad4α, Smad4β). Οι R-Smads και οι Co-Smads, έχουν δυο υψηλά διατηρημένες περιοχές, Mad-ομόλογες περιοχές MH1 και MH2, στην N-τελική και C-τελική περιοχή των πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Η περιοχή MH1 των R-Smads και Co-Smads χρησιμεύει στον σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών συμπλόκων. Τέλος, οι I-Smads (Smad6, Smad7) είναι πρωτεΐνες που εμποδίζουν την μεταγωγή του σήματος από τους TGF-β υποδοχείς, εμποδίζοντας τη δράση των R-Smads και Co-Smads^(147,153).

4.2.3 Το μονοπάτι σηματοδότησης Smad

Όταν οι R-Smads προσδένονται στους BMPR-I, ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου τους στην περιοχή SSXS. Η ενεργοποίηση του

BMPR-I από τον BMPR-II είναι απαραίτητη για την άμεση ενεργοποίηση των R-Smads. Μόλις οι R-Smads ενεργοποιηθούν, απελευθερώνονται από τους BMPR-I και αλληλεπιδρούν με τις Co-Smads για το σχηματισμό ετεροδιμερών και ομοδιμερών, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν στον πυρήνα για τη ρύθμιση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων στόχων. Στον πυρήνα οι Smads πρωτεΐνες ασκούν τη μεταγραφική δραστηριότητά τους είτε με άμεση πρόσδεση στο DNA είτε μέσω άλλων DNA-προσδεμένων πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί τις Smad πρωτεΐνες να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, τα οποία αποτελούνται είτε μόνο από R-Smads είτε από R-Smads και Co-Smads ^(147,154).

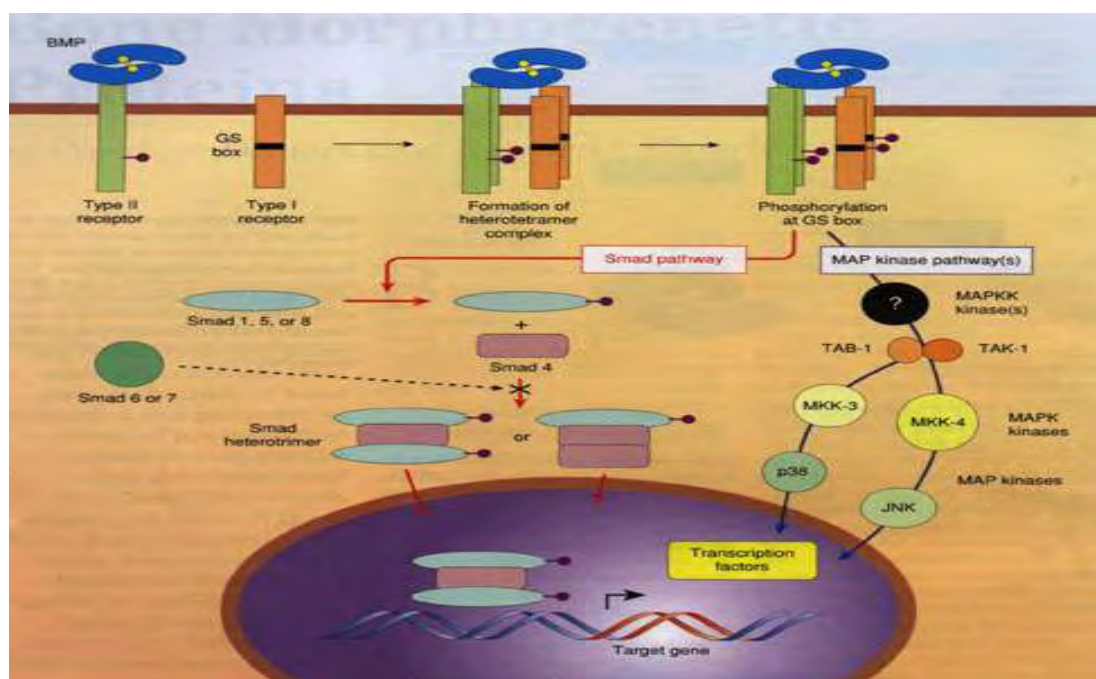
4.2.4. Καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης Smad

Όταν δεν προσδένεται BMP πρωτεΐνη στον υποδοχέα, οι I-Smads εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά εξάγονται στο κυτταρόπλασμα με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Οι I-Smads ανταγωνίζονται τη σηματοδότηση μέσω των BMPs αλληλεπιδρώντας με τον ενεργοποιημένο BMPR-I και εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση σε αυτόν των R-Smads. Έχει επίσηςδειχθεί πως η Smad6 εμποδίζει τη σηματοδότηση ανταγωνιζόμενη με τη Smad4 για το σχηματισμό ετεροδιμερών με την ενεργοποιημένη Smad1. Τέλος ένας τρίτος μηχανισμός καταστολής περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της Smad7 με τις Smurf1 και Smurf2. Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιέχει καταλυτικές περιοχές χαρακτηριστικές των E3 λιγασών της ουβικουιτίνης, με τις οποίες ετοιμάζει τις Smad πρωτεΐνες για πρωτεασωματική και λυσοσωματική αποικοδόμηση ^(147,155) (Εικ. 11).

4.2.5. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAP-κινάσης μέσω του μονοπατιού TAB1/TAK1

Η πρωτεΐνη TAB1 μπορεί να συνδεθεί στις XIAP και TAK1 αυξάνοντας έτσι τη δραστικότητα της TAK1. Επίσης μπορεί να προσδεθεί στην p38 και επίσης αυτοφωσφορυλιώνεται από την TAB1. Η TAK1 είναι μια MAP κινάση, η οποία ενεργοποιείται από την BMP-2 και την BMP-4. Αυτό δείχνει πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού p38 από τις BMP-2 και BMP-4 οφείλεται στην ενεργοποίηση των TAK1/TAB1^(156,157) (Εικ.11).

).



ΕΙΚΟΝΑ 11. Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης των TGF-β υποδοχών από τα διμερή των BMPs. Ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I. Ένα από τα δύο μονοπάτια, ο καταρράκτης Smad, ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών Smad από υποδοχείς τύπου I, ενώ η άλλη οδός περιλαμβάνει δύο MAPK κινάσες. Σε κάθε περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι η ρύθμιση της μεταγραφής ειδικών γονιδίων (Demers C. et al. Bone morphogenetic proteins. Science & Medicine 1999; 6:8-17).

4.2.6. Καταστολή του μονοπατιού TAB1/TAK1

Οι BMPs όπως έχει δειχθεί ενεργοποιούν δυο μονοπάτια, το μονοπάτι των Smad και εκείνο της p38 MAPK. Η έκφραση των Smad6 και Smad7 εμποδίζει δραματικά την επαγόμενη από την BMP-2 ανάπτυξη των νευριτών καθώς και την ενεργοποίηση του p38. Αυτό υποδεικνύει πως οι Smad6 και Smad7 έχουν κατασταλτική δράση στο μονοπάτι TAK1-p38.

Η Smad6 φυσιολογικά αλληλεπιδρά με την TAK1. Αυτό αποδείχτηκε μετά από καλλιέργεια COS7 κυττάρων και MH60/Smad6 κλώνων, όπου βρέθηκε πως η ενδογενής TAK1 βρέθηκε πως συνδέεται στην Smad6. Αυτό δείχνει πως η Smad6 καταστέλλει άμεσα την δραστικότητα της TAK1 με φυσική αλληλεπίδραση ^(147,158,159)

4.2.7. Συνεργάτες/καταστολείς του μονοπατιού των BMPs

Οι πρωτεΐνες Smad1, Smad5 και Smad 8 μπορούν να προσδεθούν στο DNA μέσω της περιοχής MH1. Για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων είναι απαραίτητοι κάποιοι συνεργάτες. Αυτοί είναι οι p300 και CB, οι οποίοι μπορούν να προσδένονται στην MH2 περιοχή των Smad1, Smad 4 και Smad5 και να ενεργοποιούν την μεταγραφή μέσω της ικανότητας ακετυλίωσης των ιστονών. Οι πρωτεΐνες Tob και Ski δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής, μέσω της πρόσδεσής τους στην MH2 περιοχή των Smad1, Smad 4 και Smad5 και την στρατολόγηση ακετυλασών των ιστονών ^(147,160,161).

4.3. ΑΝΑΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ BMPs

Η δραστηριότητα των BMPs ρυθμίζεται για να διατηρεί τις κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις για μεταγραφική αυτορρύθμιση της έκφρασης των BMPs στις οστεοβλάστες, η οποία δρα ως μηχανισμός ρύθμισης για να μειώσει την έκθεση των κυττάρων στις BMPs. Η δραστηριότητα των BMPs ελέγχεται από ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες. Μάλιστα οι BMPs ρυθμίζονται και σε διαφορετικά στάδια: (1) με καταστολή της αλληλεπίδρασης BMP-BMPR, (2) με την παρουσία μη σηματοδοτικών ψευδο-υποδοχέων, (3) με καταστολή της σηματοδότησης μέσω των κατασταλτικών Smads (I-Smads), (4) με καταστολή της σηματοδότησης μέσω ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που προσδένονται στις Smads και (5) με ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση των σηματοδοτικών μεσολαβητών των BMPs ⁽¹³⁸⁾.

4.3.1. Εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs

Οι εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs αντιπροσωπεύουν μια ομάδα πεπτιδίων, τα οποία προσδένουν τις BMPs με υψηλή συγγένεια και εμποδίζουν την αλληλεπίδραση τους με τους υποδοχείς. Οι ανταγωνιστές των BMPs προσδένουν τις BMPs με διαφορετική συγγένεια. Τα περισσότερα που γνωρίζουμε για αυτές τις πρωτεΐνες, οφείλονται σε μελέτες στον *Xenopus*. Η πρωτεϊνική αλληλουχία των εξωκυτταρικών ανταγωνιστών χαρακτηρίζεται από μια συντηρημένη αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνες. Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την ικανότητα αυτών των μορίων να αναδιπλώνονται και να εκθέτουν υδροφοβικά κατάλοιπα, χάρη στα οποία συμβαίνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Με βάση την αλληλουχία κυστεϊνών διάφορες μελέτες έχουν κατατάξει αυτές τις πρωτεΐνες σε υποκατηγορίες

οι οποίες περιλαμβάνουν: (1) τη noggin, (2) την οικογένεια της chordin, (3) twisted gastrulation, (4) και την οικογένεια Dan. Αυτά τα μόρια συντίθενται στα οστεοβλαστικά κύτταρα και η έκφραση τους εξαρτάται συχνά από τις BMPs υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs ^(138,162-164).

4.3.2. Μη σηματοδοτικοί BMP ψευδο-υποδοχείς και ενδοκυτταρικοί ανταγωνιστές

Ο BMP ψευδο-υποδοχέας και προσδέτης επίσης της ακτιβίνης (**BMP and activin membrane-bound inhibitor, BAMBI**) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με εξωκυτταρική περιοχή παρόμοια με εκείνη των υποδοχέων TGF- β τύπου IA και IB και εμποδίζει τη δράση των ενεργοποιημένων υποδοχέων χωρίς άμεση αλληλεπίδραση με κάποια TGF- β πρωτεΐνη ή BMP. Η BAMBI εκφράζεται μαζί με την BMP-4 κατά την εμβρυογένεση. Επίσης, εκφράζεται στους πλήρως διαφοροποιημένους οστεοβλάστες και τα μετάνωστα αυξάνονται από τις BMPs, τις TGF- β πρωτεΐνες και την Wnt.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω η λειτουργία των BMPs αναστέλλεται από τις Smad6 και Smad7 (I-Smads), οι οποίες συνδέονται στους τύπου I υποδοχείς των BMPs και εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση των Smad1/5/8 και τον ετεροδιμερισμό με την Smad4. Επίσης η Smad6 μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση των BMPs με πρόσθετους μηχανισμούς και να μεταβάλλει την αλληλεπίδραση των Smad1/5/8 με τους καταστολείς τους.

Μετά την φωσφορυλίωσή τους οι Smad1/5/8 διμερίζονται με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων των BMPs μέσω σύνδεσής τους σε GCCG,CAGA ή GC μοτίβα στην αλληλουχία του DNA

στους υποκινητές των γονιδίων. Σε αυτή τη λειτουργία βοηθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες p300/CBP, c-Ski, SnoN και Tob^(138, 165-170).

4.3.3. Ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση των σηματοδοτικών μεσολαβητών των BMPs

Το ubiquitin-proteasome μονοπάτι είναι πολύ σημαντικό για βιολογικές διαδικασίες όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος, η μεταγραφή των γονιδίων και η μεταγωγή του σήματος. Ασκεί τη δράση του μέσω των τριών ενζύμων του: ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin conjugate enzyme (E2) και ubiquitin ligases (E3). Οι **Smurfs 1** και **2** (Smad specific E3 ubiquitin ligases) αλληλεπιδρούν με τις Smad1/5/6/7. Η Smurf 1 εντοπίζεται στον πυρήνα και εξάγεται στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα, όπου επάγει την αποικοδόμηση των τύπου I και BMP υποδοχέων καθώς και των Smad και Smad 5. Επίσης η Smurf 1 επάγει την αλληλεπίδραση των I-Smads με τους υποδοχείς τύπου I αυξάνοντας έτσι την καταστολή του σήματος^(138,171,172).

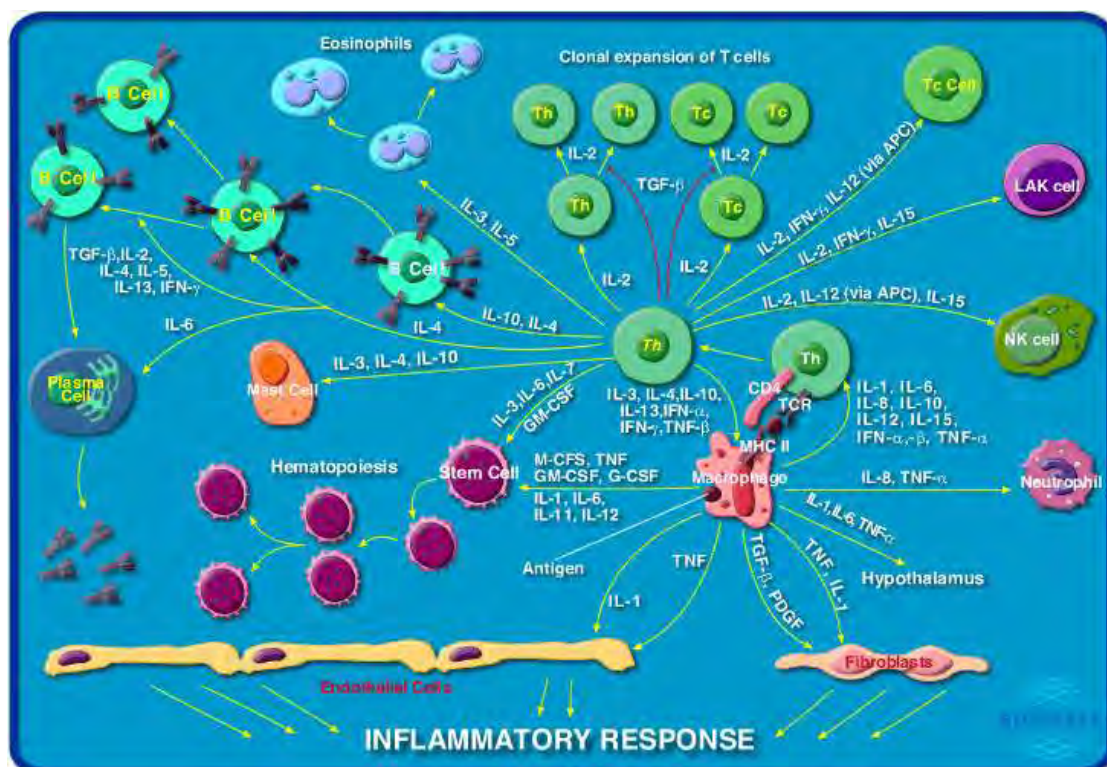
5. ΑΣΗΠΤΗ ΝΕΚΡΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Η οστεονέκρωση όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, που συνδέεται τόσο με τη γενετική προδιάθεση όσο και με συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη χρήση κορτικοστεροειδών, το αλκοόλ, το κάπνισμα, και διάφορες άλλες χρόνιες ασθένειες όπως είναι η νεφρική ανεπάρκεια και οι αιματολογικές ασθένειες ⁽¹⁷³⁾.

Τελευταία η έρευνα επικεντρώνεται σε θεραπευτικές μεθόδους που έχουν ως σκοπό τη διάσωση της μηριαίας κεφαλής προκειμένου να αποφευχθεί η αρθροπλαστική σε νεαρή ηλικία. Οι μη χειρουργικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων και ηλεκτρική διέγερση. Αρκετοί από τους παρακάτω παράγοντες αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους: οι κυτταροκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες και ο TNF, και οι αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF- β , οι BMPs και οι αγγειογενετικοί παράγοντες ^(174,175).

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και με εκείνους τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στην ανοσοποιητική αντίδραση και ρυθμίζουν τη φύση της, την κυκλοφορία των ανοσοποιητικών κυττάρων και τη διευθέτηση των κυττάρων στα ανοσοποιητικά όργανα. Εμπλέκονται σε όλα τα στάδια ανοσοποίησης και φλεγμονής όπως η πρωτογενής ανοσοποίηση, η παρουσίαση του αντιγόνου, η διαφοροποίηση του μυελού των οστών, η στρατολόγηση και η ενεργοποίηση των κυττάρων, καθώς και η έκφραση των μορίων προσκόλλησης. Το είδος της κυτταροκίνης που θα παραχθεί ως ανοσοποιητική αντίδραση σε μια εισβολή, καθορίζει αρχικά αν θα αναπτυχθεί

ανοσοποιητική αντίδραση και μετέπειτα αν αυτή η αντίδραση θα είναι κυτταροτοξική, χυμική, κυτταρο-επαγόμενη ή αλλεργική. Υπάρχει ένας καταρράκτης αντιδράσεων στις κυτταροκίνες και συχνά πολλές κυτταροκίνες απαιτείται να συνεργαστούν για την καλύτερη λειτουργία τους (Εικ. 12). Πολύ σημαντικό γεγονός στο διαχωρισμό των κυτταροκινών είναι πως κάθε κυτταροκίνη μπορεί να έχει εντελώς διαφορετική λειτουργία, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου από το οποίο παράγεται, τον στόχο και κυρίως τη φάση της ανοσοποιητικής αντίδρασης στην οποία παρουσιάζεται. Πολλές κυτταροκίνες έχουν και προ-φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη ικανότητα. Ποια από τις δυο θα παρατηρηθεί εξαρτάται από την παρουσία των ανοσοποιητικών κυττάρων και το στάδιο αντίδρασής τους στις κυτταροκίνες ⁽¹⁷⁶⁾.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Διαγραμματική απεικόνιση της πολυπλοκότητας του δικτύου παραγωγής και αλληλεπίδρασης των κυτταροκινών (Cellular-immunity.blogspot.com).

5.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ (Antigen Presenting Cells-APCs)

Οι κυτταροκίνες που προέρχονται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και άλλα κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου (APCs) είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματικές στην προώθηση του ελέγχου και της καταστροφής κυττάρων στους ιστούς τοπικά στην φλεγμονή. Η επαγωγή των αντιγόνων, καθώς αυτά δεσμεύονται από τα APCs και παρουσιάζονται στα Τ-λεμφοκύτταρα παρέχει ένα μονοπάτι παραγωγής αυτού του τύπου κυτταροκινών. Διαφορετικά τα μονοπύρρηνα ενεργοποιούνται πιθανά για την παραγωγή κυτταροκινών μέσω της πρωτογενούς αντίδρασης, χρησιμοποιώντας πρότυπα αναγνώρισης υποδοχέων που αναγνωρίζουν δομικά συστατικά των παθογόνων που δεν υπάρχουν στα κύτταρα των θηλαστικών. Αυτοί οι υποδοχείς συνεισφέρουν στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να διαχωρίσει τις παθογόνες από τις μη παθογόνες πρωτεΐνες στις οποίες μπορεί να εκτεθεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι κυτταροκίνες που παράγονται κυρίως από τα μονοπύρρηνα περιλαμβάνουν τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor-TNF) και διάφορες ιντερλευκίνες (IL) όπως οι IL-1, IL-6, IL8, IL-12, IL-15, IL-18 και IL-23⁽¹⁷⁵⁾.

5.1.1. Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor-TNF)

Η οικογένεια του TNF περιλαμβάνει δυο ομόλογες πρωτεΐνες που προέρχονται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (**TNF-α**) και από τα λεμφοκύτταρα (**TNF-β**). Η ενεργός μορφή και των δύο αυτών κυτταροκινών είναι ομοτριμερής. Επίσης εκτός από τα μονοπύρρηνα μακροφάγα, ο TNF-α μπορεί να παράγεται από τα ενεργά λεμφοκύτταρα, τα φονικά κύτταρα (natural killer, NK), τα ενδοθηλιακά κύτταρα και

τα σιτευτικά κύτταρα. Ο ικανότερος επαγωγέας των TNF είναι ο πολυσακχαρίτης LPS (lipopolysaccharite), ο οποίος δρα μέσω των υποδοχέων toll (TLR2, TLR4). Οι υποδοχείς toll αντιπροσωπεύουν μια ομάδα υποδοχέων που αναγνωρίζει δομές που χρησιμοποιούνται από παθογόνα αλλά όχι από κύτταρα θηλαστικών και έτσι ενεργοποιούν την ανοσοποιητική αντίδραση. Οι TNF-α και TNF-β προσδένονται στην ίδια περιοχή των κυτταρικών υποδοχέων (TNFR I, TNFR II) και με την ίδια ικανότητα, επιφέρουν όμως παρόμοια και όχι πανομοιότυπα αποτελέσματα. Επίσης οι TNFs έχουν αντικαρκινική ικανότητα μέσω άμεσης κυτταροτοξικής επίδρασης στα καρκινικά κύτταρα, διαμέσου αντικαρκινικής ανοσοποιητικής αντίδρασης. Ακόμη ο TNF ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, τους παράγοντες προσκόλλησης και τη χημειοταξία. Τέλος ελπιδοφόρες είναι οι μελέτες σχετικά με την ικανότητα του TNF να θεραπεύσει διάφορες κακοήθειες ⁽¹⁷⁶⁻¹⁷⁹⁾.

Ο TNF-α είναι μια πιθανή φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία παράγεται από τα μακροφάγα στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση και την ανοσολογική απάντηση μέσω της ενεργοποίησης της έκφρασης άλλων κυτταροκινών. Μάλιστα εκτιμάται πως ο TNF-α δρα στους οστεοβλάστες ή τα στρωματικά κύτταρα του μυελού, έτσι ώστε να συνθέσουν και να απελευθερώσουν κυτταροκίνες όπως οι IL-3, IL-6, IL-11 και IL-12, των οποίων ο ρόλος συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη και την ωρίμανση των οστεοκλαστών ^(180,181).

Διάφορες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τους πολυμορφισμούς στον υποκινητή του TNF-α. Οι πιο γνωστοί από αυτούς είναι οι -238, -308, -857 και -863. Ο πολυμορφισμός στη θέση -238 (G→A) που επιφέρει υψηλή παραγωγή TNF-α έχει συνδεθεί με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα ^(182,183). Όσον αφορά στον πολυμορφισμό -

308A παρουσιάζει επίσης μεγαλύτερη μεταγραφική ικανότητα για το γονίδιο του TNF-α από ότι το -308G αλληλόμορφο και έχει επίσης συνδεθεί με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τις ηπατίτιδες B και C ⁽¹⁸⁴⁻¹⁸⁷⁾.

5.1.2. Ιντερλευκίνη 1(IL-1)

Η οικογένεια της IL-1 περιλαμβάνει τέσσερα διαφορετικά πεπτίδια [**IL-1α, IL-1β, IL receptor antagonist (IL-1RA)** και **IL-18**]. Οι IL-1α και IL-1β έχουν τις ίδιες ικανότητες και μαζί με την IL-1RA προσδέονται με την ίδια ικανότητα στους δυο υποδοχείς της IL-1 (IL-Rs). Ο υποδοχέας τύπου I είναι εκείνος που επιφέρει την βιολογική αντίδραση στην IL-1. Η πρόσδεση της IL-1 από τον υποδοχέα τύπου II έχει αντιφλεγμονώδη ικανότητα και μερικές φορές αναφέρεται σαν decoy receptor (υποδοχέας δόλωμα). Η ικανότητα της IL-1RA να προσδένεται στον υποδοχέα τύπου I χωρίς να επάγει βιολογική δραστηριότητα αποτελεί την απόδειξη πως αποτελεί έναν ανταγωνιστή των κυτταροκινών. Η IL-1 παράγεται κυρίως από τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα αλλά επίσης παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αρθρικά κύτταρα, τους οστεοβλάστες και πολλά άλλα κύτταρα. Η παραγωγή της IL-1 ενεργοποιείται από διάφορους παράγοντες όπως είναι οι ενδοτοξίνες, άλλες κυτταροκίνες, οι μικροοργανισμοί και αντιγόνα. Μια ακόμη δράση της IL-1 είναι να επάγει την παραγωγή της IL-2 και των IL-2 υποδοχέων στα T- λεμφοκύτταρα και την παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης στα B-λεμφοκύτταρα. Ακόμη αλληλεπιδρά με το κεντρικό νευρικό σύστημα για να επιφέρει πυρετό, λήθαργο, υπνηλία και ανορεξία. Τέλος, η IL-1RA εκκρίνεται φυσιολογικά στη φλεγμονώδη αντίδραση και η παραγωγή της αυξάνεται από πολλές κυτταροκίνες όπως οι IL-4, IL-6, IL-13 και ο TNF-β. Η

παραγωγή της IL-1RA ρυθμίζει τις επιπτώσεις της IL-1 κατά την πορεία της φλεγμονής⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾.

Η IL-1α είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη εξαιτίας της ικανότητάς της να ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και την ανοσοποίηση. Πολυμορφισμοί μιας βάσεως (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) του γονιδίου της IL-1α έχει αναφερθεί πως συνδέονται με επιδεκτικότητα σε φλεγμονώδεις ασθένειες. Ένας πολυμορφισμός εντοπίστηκε στη θέση -889 (rs1800587) στην 5' περιοχή και ένας στην θέση +4845 (rs17561), ο οποίος περιλαμβάνει μια αντικατάσταση του 114 αμινοξέως της pre-IL-1A. Μάλιστα έχει δημοσιευτεί πως πολυμορφισμός στη θέση -889 συνδέεται με φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η περιοδοντίτιδα⁽¹⁹¹⁾, η νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα⁽¹⁹²⁾, το Alzheimer⁽¹⁹³⁾ η προ-εκλαμψία⁽¹⁹⁴⁾ και ο ερυθματώδης λύκος⁽¹⁹⁵⁾ και πως ο πολυμορφισμός θα μπορούσε να προβλέψει την αντίδραση στη θεραπεία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την ανοσοανεπάρκεια σε μόλυνση από ιούς^(196,197).

5.1.3. Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)

Αν και η κυριότερη πηγή της IL-6 είναι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, η IL-6 παράγεται επίσης από τα T και B λεμφοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα του μυελού των οστών. Υπό την επίδραση της IL-6, τα B-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα του πλάσματος και εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες. Επίσης η IL-6 επάγει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους. Η IL-6 όμως έχει και αντιφλεγμονώδη δράση. Αν και η IL-1 μαζί με τον TNF-α επάγουν την σύνθεση της IL-6 και άλλων κυτταροκινών, η IL-6 εμποδίζει αυτή την αύξηση της φλεγμονώδους αντίδρασης και

εμποδίζει τη σύνθεση της IL-1 και του TNF. Επίσης ενεργοποιεί τη σύνθεση της IL-1RA⁽¹⁹⁸⁾.

Η IL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που εμπλέκεται στο οστικό μεταβολισμό και την ανοσολογική απάντηση. Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL-6 και τα επίπεδα της IL-6 του πλάσματος σχετίζεται με μια μεταλλαγή G/C στη θέση -174 στην 5' περιοχή του γονιδίου της IL-6. Αυτή η μεταλλαγή έχει βρεθεί πως σχετίζεται με διάφορες ασθένειες όπως ο ερυθματώδης λύκος, ο διαβήτης και η απώλεια οστικής μάζας⁽¹⁹⁹⁻²⁰²⁾.

5.2. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Οι ανοσολογικές αντιδράσεις ενάντια στους ιούς και τα νεοπλασματικά κύτταρα παράγονται αρχικά από τα CD8⁺ και τα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer-NK). Οι κυτταροκίνες που ενεργοποιούν την κυτταροτοξική αντίδραση είναι οι: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15. Επίσης σημαντικό ρόλο έχει και ο TNF-α, ο TNF-β καθώς και οι ιντερφερόνες⁽¹⁷⁵⁾.

5.2.1. Ιντερλευκίνη 4 (IL-4)

Η IL-4 είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται από τα ενεργοποιημένα CD4⁺ λεμφοκύτταρα, τα σιτευτικά κύτταρα και τα βασεόφιλα. Η IL-4 έχει πολλαπλή ρυθμιστική δράση στην ανοσοποιητική αντίδραση πάνω σε διάφορους τύπους κυττάρων. Επάγει την παραγωγή της IgE ανοσοσφαιρίνης από τα Β λεμφοκύτταρα και δρα ως ρυθμιστής του IgG ισοτύπου. Επίσης η IL-4 ρυθμίζει την διαφοροποίηση των πρώιμων Τ βοηθητικών κυττάρων (T helpers) σε Th2 και βοηθά στη χυμική

απάντηση και την παραγωγή των αντισωμάτων. Τέλος η IL-4 καταστέλλει τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις IL-1 και IL-2. Τρεις γνωστοί πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί στον υποκινητή της IL-4 βρίσκονται στις θέσεις -1098, -590 και -33 και έχουν συνδεθεί με διάφορες ασθένειες όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η αιμορροφιλία ⁽²⁰³⁻²⁰⁷⁾.

5.2.2. Ιντερλευκίνη 10 (IL-10)

Η IL-10 είναι μια πολύ σημαντική ρυθμιστική κυτταροκίνη, η οποία παράγεται από τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα T- κύτταρα, τα B-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα ηωσινόφιλα. Ως μια κυτταροκίνη που παράγεται από τα Th2 κύτταρα, η IL-10 καταστέλλει την έκκριση κυτταροκινών από τα Th1 κύτταρα, περιορίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση και ρυθμίζει την διαφοροποίηση και την ανάπτυξη αρκετών ανοσοποιητικών κυττάρων όπως τα T- και B-κύτταρα, τα NK, και τα κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου ^(208,209).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-10 έχει βρεθεί στο χρωμόσωμα 1q31-32. Έχουν αναγνωριστεί πολλές πολυμορφικές θέσεις στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της IL-10, ανάμεσα σε αυτές και οι πολυμορφισμοί στις θέσεις -1082, -819 και -592 στο σημείο έναρξης της μεταγραφής. Έρευνες μάλιστα έδειξαν πως τα αλληλόμορφα -1082 G/G, -819 C/C, -592 C/C και οι GCC/GCC γονότυποι σχετίζονται με υψηλότερη παραγωγή της IL-10 σε σχέση με άλλους γονότυπους ^(210,211).

5.2.3. Ιντερλευκίνη 11 (IL-11)

Η IL-11 παρατηρήθηκε αρχικά ως ένας παράγοντας ενεργοποίησης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Συνεισφέρει στην παραγωγή των λεμφοκυττάρων από τον μυελό των οστών καθώς επίσης συνεργάζεται με άλλους παράγοντες ανάπτυξης για

την παραγωγή ερυθρών κυττάρων, αιμοπεταλίων και σιτευτικών κυττάρων. Τέλος η IL-11 συμμετέχει στην διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού και αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα για κύτταρα του συνδετικού ιστού όπως οι ινοβλάστες, όπου βοηθά στην ανάπτυξή τους και στην εναπόθεση κολλαγόνου ⁽²¹²⁾.

5.2.4. Ιντερφερόνες (INF)

Υπάρχουν τρία μέλη της TNF οικογένειας (α , β και γ) και η ονοματολογία τους προέρχεται από την ικανότητά τους να παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη των ιών. Η **INF- α** παράγεται αρχικά από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα β-λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Έχει σημαντική αντική ικανότητα καθώς εμποδίζει την αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα, προστατεύει τα υγιή κύτταρα από μόλυνση και επάγει την τοξική αντίδραση από τα λεμφοκύτταρα και τα NK. Η **INF- β** έχει πολλές από τις ιδιότητες της INF- α . Όσον αφορά στην **INF- γ** , παράγεται αρχικά από τα T-λεμφοκύτταρα και τα NK και σε μικρότερο βαθμό από τα μακροφάγα. Οι βιολογικές δράσεις της INF- γ καθώς και η καταγωγή της από τα T-λεμφοκύτταρα δείχνουν πως πρόκειται περισσότερο για μια ιντερλευκίνη παρά για ιντερφερόνη ^(175,213).

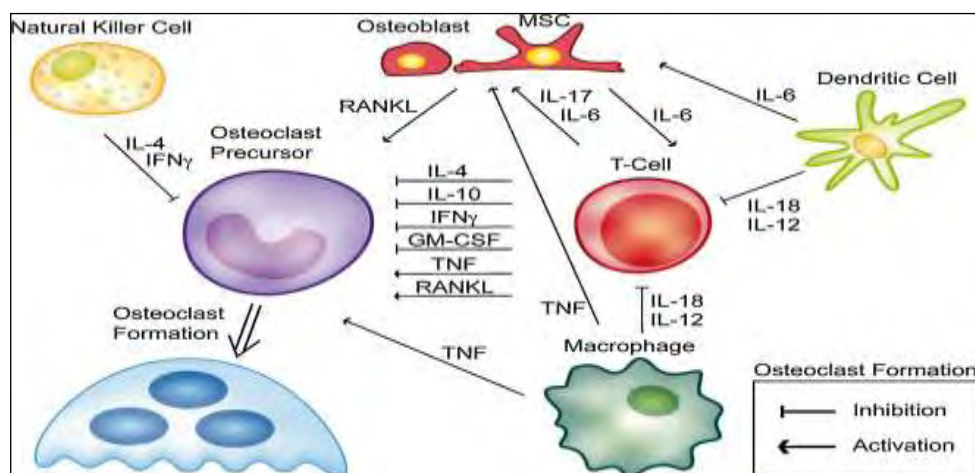
5.3. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Τουλάχιστον δυο κυτταροκίνες συμμετέχουν στην ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων στον μυελό των οστών, οι IL-7 και IL-11. Η IL-7 είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη των B- και T-λεμφοκυττάρων μέσω της παραγωγής της από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού και του θύμου, μέσα από τον οποίο αντιδρά με τα προγονικά λεμφοκύτταρα. Μετά την έξοδο των β-λεμφοκυττάρων από τον μυελό, ο καθορισμός των ισοτύπων και η ενεργοποίηση των ώριμων B-λεμφοκυττάρων εξαρτάται από τα

T-λεμφοκύτταρα. Οι κυτταροκίνες που εμπλέκονται στον καθορισμό των ισοτύπων είναι οι IL-4 και IL-13. Άλλες κυτταροκίνες που επηρεάζουν την ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων είναι οι: INF- γ , IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15 και IL-21 ^(175,214).

5.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων από αντιγόνα και ταυτόχρονα η αποστολή βοηθητικών σημάτων από τις IL-1 και IL-6 καθώς και τα CD28 κύτταρα, επάγουν την παραγωγή IL-2 και IL-2R. Η πρόσδεση της IL-2 στα IL-2R θετικά T-λεμφοκύτταρα επάγει την ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων. Η στρατολόγηση της ταυτόχρονης παραγωγής της IL-2 και της έκφρασης IL-2R για την ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων επιβεβαιώνει πως μόνο T-ειδικά κύτταρα για το συγκεκριμένο αντιγόνο θα ενεργοποιηθούν. Επίσης εκτός από την δράση της ως παράγοντας ανάπτυξης των T κυττάρων, η IL-2 εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση των NK, των B κυττάρων, των κυταροτοξικών T κυττάρων και των μακροφάγων ⁽¹⁷⁵⁾.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Απεικόνιση των διασταυρούμενων μονοπατιών που περιλαμβάνουν κυτταροκίνες ανάμεσα στα κύτταρα των οστών και των ανοσοποιητικών κυττάρων. Αρκετές κυτταροκίνες που ρυθμίζουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών παράγονται άμεσα από τα ανοσοποιητικά κύτταρα, ενώ άλλες επηρεάζουν έμμεσα το σχηματισμό των οστεοκλαστών επιδρώντας στα ανοσοποιητικά κύτταρα. Παρουσιάζεται ένα διάγραμμα προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών που επηρεάζουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών. (Schoengraf P et al. Does complement play a role in bone development and regeneration? Immunology 2012 [Epub ahead of print]).

ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάσαμε στα γονίδια και τους μηχανισμούς της οστεονέκρωσης, ενός σπάνιου νοσήματος του ανθρώπινου σκελετού που επηρεάζει κυρίως τη μηριαία κεφαλή και οδηγεί στην καταστροφή της. Αν και υπάρχουν αρκετές αναφορές για την οστεονέκρωση στην βιβλιογραφία τα τελευταία 25 χρόνια, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα που να αναφέρονται στο ρόλο γονιδίων ή μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην οστεονέκρωση στον άνθρωπο. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε γονίδια αλλά και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη λειτουργία και την ισορροπία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών (δύο κυτταρικών τύπων απαραίτητων για την αναδόμηση των οστών), όπως είναι οι **BMPs**, η **OPG**, το **RANKL**, το **RANKL** και οι **κυτταροκίνες**. Προσπαθήσαμε επίσης να εστιάσουμε στους μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων αλλά και στον τρόπο που αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μάλιστα θα πρέπει να τονιστεί ότι για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σπάνια σειρά δειγμάτων, 42 οστικών από μηριαίες κεφαλές ασθενών με οστεονέκρωση που υποβλήθηκαν σε επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής και 550 δείγματα αίματος συνολικά (112 από ασθενείς με ON και 438 από υγιή άτομα). Λαμβάνοντας υπόψη τη σπανιότητα τέτοιων δειγμάτων καθώς και την έλλειψη παρόμοιων αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία, πιστεύουμε πως πρόκειται για μια καινοτόμο μελέτη που στοχεύει στην διαλεύκανση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση της οστεονέκρωσης.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΟ

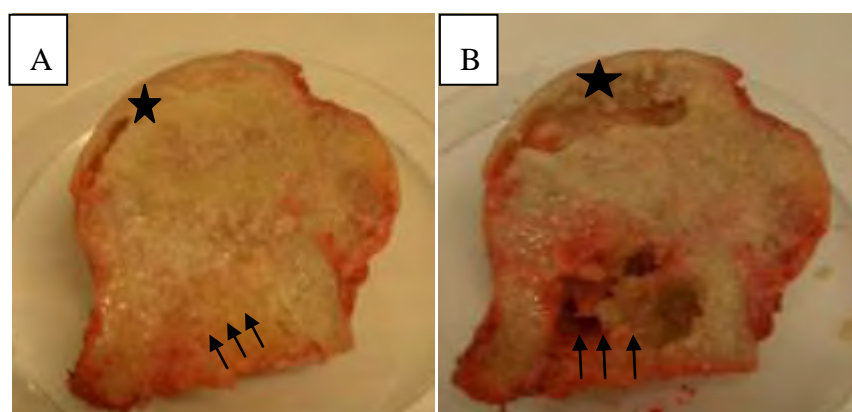
Για την παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν 42 μηριαίες κεφαλές από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική ισχίου στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα (www.ortho-uth.gr). Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωστεί με οστεονέκρωση μηριαίας κεφαλής σταδίου III-IV σύμφωνα με την κλίμακα ARCO. Η διεξαγωγή της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και είναι σε συμφωνία με την συνθήκη του Ελσίνκι (1964).

Οι 42 μηριαίες κεφαλές προήλθαν από 42 διαφορετικούς ασθενείς Καυκάσιας καταγωγής (από την Ελλάδα και την Κύπρο), από τους οποίους 4 ασθενείς βρισκόταν στο στάδιο III και 38 στάδιο IV (ARCO). Σε σχέση με την αιτιολογία της οστεονέκρωσης, 15 ασθενείς είχαν λάβει στεροειδή για κάποια χρονική περίοδο και 10 είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού και λάμβαναν ανοσοκαταστολή. Επίσης, 3 είχαν δρεπανοκυτταρική αναιμία, 3 είχαν διαγνωστεί με ερυθρεματοειδή λύκο και 4 ήταν αλκοολικοί. Στους υπόλοιπους 7 ασθενείς δεν βρέθηκε κάποια αιτιολογία που να σχετίζεται άμεσα με την οστεονέκρωση και διαγνώστηκαν ως ιδιοπαθείς περιπτώσεις (primary).

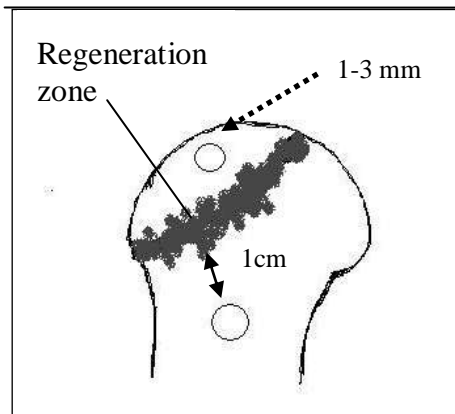
Από τους 42 ασθενείς οι 12 ήταν καπνιστές και οι 30 μη-καπνιστές, ενώ ο μέσος όρος της ηλικίας τους ήταν 43 (εύρος: 20-70). Ακόμη, από τους 42 ασθενείς οι 19 είχαν διαγνωστεί με αμφωτερόπλευρη ΟΝ ενώ οι 23 με ΟΝ μόνο στη μια κεφαλή.

Τέλος, από τις 42 διαφορετικές ΜΚ που χρησιμοποιήσαμε για τη συγκεκριμένη διατριβή, οι 22 προερχόταν από το δεξιό ισχίο και οι 20 από το αριστερό.

Τα οστικά δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια επεμβάσεων ολικής αρθροπλαστικής ισχίου στην αίθουσα του χειρουργείου. Οι μηριαίες κεφαλές κόπηκαν διαμετρικά στη μέση στο μετωπιαίο επίπεδο. Εν συνεχεία, φωτογραφήθηκαν στο εργαστήριο, ταυτοποιήθηκαν οι νεκρωτικές και φυσιολογικές περιοχές και εντοπίστηκαν τα όρια από τους επιβλέποντες κλινικούς ιατρούς, και απομονώθηκε RNA και πρωτεΐνες από την νεκρωτική και φυσιολογική περιοχή (Εικ.14). Οι ιστοί από την νεκρωτική περιοχή απομονώθηκαν από την υποχόνδρια περιοχή (σε απόσταση 1-3mm από τον χόνδρο) σε ασφαλή απόσταση από τη ζώνη αναγέννησης, ενώ οι φυσιολογικοί ιστοί απομονώθηκαν από τον αυχένα της μηριαίας κεφαλής σε απόσταση περίπου 1cm από τη ζώνη αναγέννησης (Εικ. 15). Όλα τα οστικά τεμάχια ξεπλένονταν με NaCl (0,9%) για 5 λεπτά με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ για την απομάκρυνση μυελού των οστών και στοιχείων του αίματος.



ΕΙΚΟΝΑ 14. Νεκρωτική μηριαία κεφαλή μετά από ολική αρθροπλαστική ισχίου. (Α) Μηριαία κεφαλή με εμφανή καθίζηση του υποχόνδριου οστού και απώλεια της σφαιρικότητάς της. **(Β)** Η μηριαία κεφαλή μετά την συλλογή μικρής ποσότητας φυσιολογικού και νεκρωτικού οστού για την απομόνωση mRNA και πρωτεΐνης. Ο νεκρωτικός ιστός επισημαίνεται με αστερίσκους και ο φυσιολογικός με βέλη.



ΕΙΚΟΝΑ 15. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών από όπου συλλέχθηκαν τα οστικά τεμάχια. Τα οστικά τεμάχια από τη νεκρωτική περιοχή απομονώθηκαν από την υποχόνδρια περιοχή (σε απόσταση 1-3mm από τον χόνδρο), ενώ τα φυσιολογικά τεμάχια απομονώθηκαν από τον αυχένα της μηριαίας κεφαλής σε απόσταση περίπου 1cm από τη ζώνη αναγέννησης.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ (ΟΣΤΙΚΟ ΤΕΜΑΧΙΟ)

Ημέρα πρώτη:

- Η μηριαία κεφαλή τεμαχίζεται σε δυο ισομερή τμήματα.
- Με τη βοήθεια κοχλιαρίου και νυστεριού τεμαχίζεται το οστό σε μικρά τμήματα, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε σωληνάριο τύπου falcon.
- Τα οστικά τεμάχια ξεπλένονται με NaCl (0,9%) για 5 λεπτά με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ για την απομάκρυνση μυελού των οστών και στοιχείων του αίματος.
- Προσθήκη RNAzol (INVITROGEN) ανάλογο του όγκου των οστικών τεμαχίων.
- Ομογενοποίηση του διαλύματος RNAzol και τεμαχίων με τη βοήθεια ομογενοποιητή.
- Μεταφορά σε σωληνάριο τύπου erpendorf και προσθήκη χλωροφορμίου σε όγκο 1/10 του RNAzol.
- Παραμονή στον πάγο για 15 λεπτά με περιοδική ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση. Το RNA έχει απομονωθεί στην υδατική φάση.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης.
- Διατηρούμε overnight στους -20°C.

Ημέρα δεύτερη:

- Φυγοκέντρηση επί 30' στις 12000 rpm στους 4 °C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο.

Το ίζημα, το οποίο αποτελεί το ολικό RNA που απομονώθηκε, καθαρίζεται με τη βοήθεια του kit της Qiagen (RNAeasy mini kit) ακολουθώντας το ειδικό πρωτόκολλο του κατασκευαστή (RNA cleanup). Το τελευταίο στάδιο ακολουθείται έτσι ώστε το RNA να απαλλαγεί από τις πρωτεΐνες που μπορεί να έχουν απομονωθεί από τον ιστό καθώς το οστό αποτελεί έναν ιστό πλούσιο με μεταλλοπρωτεΐνες.

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ημέρα πρώτη:

- Συλλογή των κυττάρων σε σωληνάριο τύπου falcon και υπολογισμός των κυττάρων που περιέχονται στον πληθυσμό (ο ιδανικός πληθυσμός τους είναι 8×10^6 - 10×10^6).
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε το ίζημα με διάλυμα PBS χωρίς Ca^{+2}/Mg .
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Επανάληψη της έκπλυσης και της φυγοκέντρωσης.
- Μετά την απομάκρυνση του PBS, προσθέτουμε RNAzol (INVITROGEN).
- Μεταφορά σε eppendorf και προσθήκη χλωροφορμίου σε όγκο 1/10 του RNAzol.
- Παραμονή στον πάγο για 15 λεπτά με περιοδική ανάδευση.

- Φυγοκέντρωση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση. Το RNA έχει απομονωθεί στην υδατική φάση.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης.
- Διατηρούμε overnight στους -20°C.

Ημέρα δεύτερη:

- Φυγοκέντρωση επί 30' στις 12000 rpm στους 4 °C.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml αιθανόλης (70%).
- Φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες επί 20'.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας δύο ακόμη φορές.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Διάλυση του RNA σε νερό ddH₂O ελεύθερο από RNάσες.
- Αποθήκευση στους -80°C.

Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 1,5% gel αγαρόζης. Ο ποσοτικός έλεγχος του RNA γίνεται με φωτομέτρηση στα 260 και 280nm και ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm/280 nm πρέπει να κυμαίνεται από 1,7 έως 1,9. Η συγκέντρωση του RNA (μg/ml) βρίσκεται από τον τύπο $OD_{260} \times 40 \times$ αραιώση.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το ολικό κυτταρικό RNA που απομονώνεται από τα δείγματα του ιστού και των κυττάρων (η μέθοδος περιγράφηκε παραπάνω), μεταγράφεται *in vitro* σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV (AMV kit) τηρώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Roche). Ο τελικός όγκος του cDNA (20 μ l) αραιώνεται σε αναλογία 1:10 σε τελικό όγκο 200 μ l όπως συνιστάται (Πιν. 5).

Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση

- Ανάμειξη του RNA με ddH₂O
- Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα). Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 μ g RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 μ l.

Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 99°C για 5 λεπτά
4. 4°C

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Πίνακας αντιδραστηρίων σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφή

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
cDNA	* μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4.0 μ l
ddH ₂ O	* μ l
Random Primers	2.0 μ l
RNAase inhibitor (50 μ l)	1.0 μ l
AMV (50 μ l)	0.8 μ l
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20 μl

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RAR α (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 3 μ l του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πιν. 6) χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RAR α cDNA (RAR6/RAR8, Πίν. 7).

Συνθήκες της αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

στάδιο αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό

στάδιο σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1 λεπτό

στάδιο επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό

-τελική επιμήκυνση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Πίνακας αντιδραστηρίων ενίσχυσης του γονιδίου RARα

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα: cDNA	3 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	2 μ l
dNTPs (40mM)	1 μ l
RAR6 (10pm/ μ l)	2 μ l
RAR8 (10pm/ μ l)	2 μ l
Taq DNA πολυμεράση (5 units/ μ l)	0,4 μ l
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μ l

4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων **BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, οστεοπροτεγερίνη, RANKL και RANK** χρησιμοποιήθηκε το kit “Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes” ενώ όλα τα πειράματα επιτεύχθηκαν στο μηχάνημα Light Cycler (Roche). (Εικ. 16)



ΕΙΚΟΝΑ 16. Α. Μηχάνημα Light Cycler ((Roche). **Β.** Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) **Γ.** Υάλινα τριχοειδή (Glass capillaries)

Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με “εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία”. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου (Πιν. 8). Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο human porphobilinogen deaminase (h-PBGD). Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η

ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου h-PBGD που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων (5×10^{-6} – 5×10^{-2} ανά 5 µl δείγματος) (Πιν. 9).

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς (h-PBGD):

-ddH ₂ O	: 7.6 µl
- MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 µl
-Διάλυμα ανίχνευσης h-PBGD (10X)	: 2.0 µl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 µl
-Γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 µl

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15 µl προστίθενται 5 µl cDNA του δείγματος.

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (OPG):

-ddH ₂ O	: 5.6 µl
-MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 µl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 µl
-Εκκινητής OPG S (Πίνακας 7)	: 1.0 µl
-Εκκινητής OPG A (Πίνακας 7)	: 1.0 µl
-Ανιχνευτής OPG FL (Πίνακας 7)	: 1.0 µl
-Ανιχνευτής OPG LC (Πίνακας 7)	: 1.0 µl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 µl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (RANKL):

-ddH ₂ O	: 7.2 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 0.8 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής RANKL S (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής RANKL A (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής RANKL FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής RANKL LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (RANK):

-ddH ₂ O	: 7.2 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 0.8 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής RANK S (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής RANK A (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής RANK FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής RANK LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (BMP-2):

-ddH ₂ O	: 5.6 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής BMP2 F (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής BMPR R (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP2 FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP2 LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (BMP-4):

-ddH ₂ O	: 5.6 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής BMP4 S (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής BMP4 R (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP4 FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP4 LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (BMP-6):

-ddH ₂ O	: 7.2 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 0.8 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής BMP6 S (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής BMP6 R (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP6 FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP6 LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (BMP-7):

-ddH ₂ O	: 7.2 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 0.8 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής BMP7 F (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Εκκινητής BMP7 A (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP7 FL (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής BMP7 LC (Πίνακας 7)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Στον τελικό όγκο της αντίδρασης που είναι 15 μl προστίθενται 5 μl cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10) σε όλες τις αντιδράσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT
OPG S	5'-CAAGCTGGAACCCAGAG
OPG A	5'-GTGTTGCATTTCTTTCTGAGTTA
RANKL S	5'-GCAAAAGGAATTACAACATATCGTT
RANKL A	5'-ACTTTATGGGAACCAGATGGG
RANK S	5'-AGGGAAAGCACTCACAGCTAAT
RANK A	5'-ACATGCTCCCTGCTGACC
BMP2 F	5'-AGTTTTCTCGTGCGTACT
BMP2 R	5'-AAACCCGTCTGTAGCTTCTTTA
BMP4 S	5'-CTTGTTTTCTGTCAAGACACCATGATT
BMP4 R	5'-GCAGAAGTGTCGCCTCGAAG
BMP6 S	5'-CTCTACCCAGTCCCAGGA
BMP6 R	5'-TCCCAGGTCTTGGAACCT
BMP7 F	5'-CAGAGCATCAACCCAAGTT
BMP7 A	5'-CTGACATACAGCTCGTGCTTCTTA
OPG FL	5'-CAATTTGTGTGTTTTCTACAGGGTGCTT--FL
OPG LC	5'-LC640-AGATGACGTCTCATTTGAGAAGAACCCAT--PH
RANKL FL	5'-CCAGATCTAACCATGAGCCATCCACC--FL

RANKL LC	5'-LC640-TCGCTTTCTCTGCTCTGATGTGCTGTG--PH
RANK FL	5'-AGTGGAGATAAGGAGTCCTCAGGTGACA--FL
RANK LC	5'-LC640-TTGTGTCAGTACACACACGGCAAACCTT-PH
BMP2 FL	5'-TGGGCTATTTGGACTGTGCTGTT--FL
BMP2 LC	5'-LC640-TTCAATTAGTGATAATGTATGGGAAGTCCT--PH
BMP4 FL	5'-CCCGTCTCAGGTATCAAACCTAGCATGGCTC--FL
BMP4 LC	5'-LC640-CGCCTCCTAGCAGGACTTGGCA--PH
BMP6 FL	5'-AGGCTGTTTTCAATTCAGTGT--FL
BMP6 LC	5'-LC640-GTAATCTGAAGCACTGGAGACCCGC--PH
BMP7 FL	5'-ACCAGGAAGCCCTGCGGATG--FL
BMP7 LC	5'-LC640-CCAACGTGGCAGAGAACAGCAGCA--PH

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης

<i>Γονίδιο</i>	<i>Αρχική αποδιάταξη</i>	<i>Κύκλοι</i>	<i>Αποδιάταξη</i>	<i>Σύνδεση</i>	<i>Επιμήκυνση</i>	<i>Temp. transition rate</i>
OPG	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	55°C για 10s	72°C για 6 s	20°C/s
RANKL	95°C για 10 min	50	95°C για 10s	54°C για 10s	72°C για 7s	20°C/s
RANK	95°C για 10 min	50	95°C για 10s	54°C για 10s	72°C για 6s	20°C/s
BMP2	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	53°C για 10s	72°C για 10s	20°C/s
BMP4	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	57°C για 10s	72°C για 8s	20°C/s
BMP6	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	50°C για 10s	72°C για 5s	20°C/s
BMP7	95°C για 10 min	50	95°C για 10s	55°C για 10s	72°C για 10s	20°C/s

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Τα μεγέθη των προϊόντων PCR για τα κάθε γονίδιο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
BMP-2	257bp
BMP-4	207bp
BMP-6	114bp
BMP-7	250bp
OPG	147bp
RANKL	164bp
RANK	132bp

Η μέτρηση του αριθμού των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου h-PBGD γίνεται εις διπλούν και ο αριθμός των μεταγράφων για το κάθε γονίδιο ορίζεται ως ο μέσος όρος των τιμών των δύο μετρήσεων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων (του γονιδίου στόχου) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων γονιδίου-στόχου/γονιδίου αναφοράς h-PBGD, έτσι όπως αναφέρονται και στα αποτελέσματα.

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

5.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΙΣΤΟ

- Συλλογή του ιστού σε σωληνάριο τύπου falcon.
- Τα οστικά τεμάχια ξεπλένονται με NaCl (0,9%) για 5 λεπτά με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ για την απομάκρυνση μυελού των οστών και στοιχείων του αίματος.
- Προσθέτουμε διάλυμα NET-Triton Lysis Buffer (0.01 M Tris-Cl, 0.1 NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate και ένα διάλυμα αναστολέων πρωτεασών), σε ποσότητα ανάλογη του όγκου του ιστού.
- Ομογενοποίηση του ιστού με τη βοήθεια ομογενοποιητή.
- Μεταφορά του ομογενοποιημένου ιστού σε erpendorf.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Συλλογή του υπερκειμένου μέσα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
- Για να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε την μέθοδο Bradford και φωτομετρούμε στα 595nm.

5.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

- Συλλογή των κυττάρων σε σωληνάριο τύπου falcon και υπολογισμός των κυττάρων που περιέχονται στον πληθυσμό (ο ιδανικός πληθυσμός τους είναι 8×10^6 - 10×10^6).
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.

- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και έκπλυση του ιζήματος με PBS χωρίς Ca^{+2}/Mg .
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Επανάληψη της έκπλυσης και της φυγοκέντρησης.
- Μετά την απομάκρυνση του PBS, προσθέτουμε διάλυμα NET-Triton Lysis Buffer (0.01 M Tris-Cl, 0.1 NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate και ένα διάλυμα αναστολέων πρωτεασών), σε ποσότητα ανάλογη του ιζήματος που έχουμε, και μεταγγίζουμε σε σωληνάρια eppendorf.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Συλλογή του υπερκειμένου μέσα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
- Για να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε την μέθοδο Bradford και φωτομετρούμε στα 595nm.

6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ WESTERN BLOT

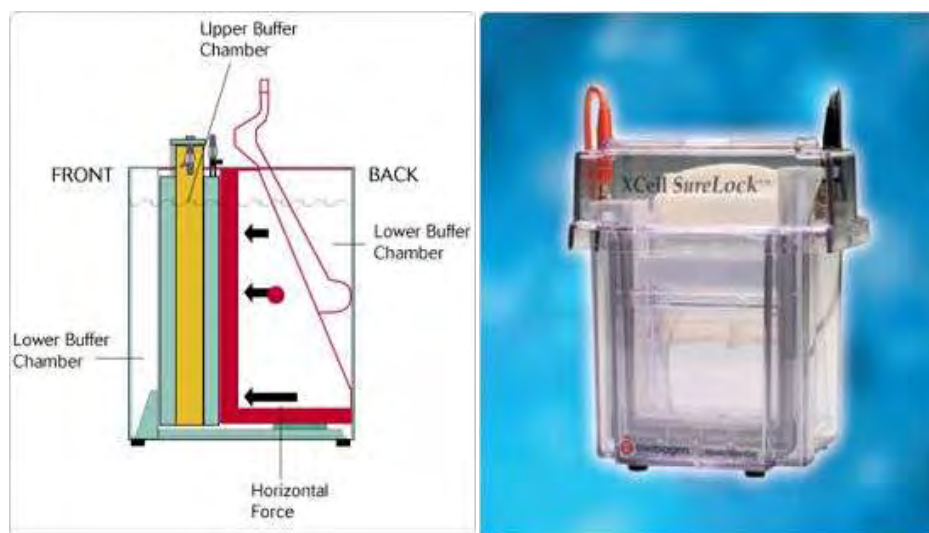
Το Western Blot πραγματοποιήθηκε με το kit NuPAGE (Novex Bis-Tris Gels) της εταιρίας Invitrogen. Αρχικά οι πρωτεΐνες απομονώνονται με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και στη συνέχεια αποδιατάσσονται στους 70°C για 10 λεπτά αφού προηγουμένως αναμειχθούν με διάλυμα NuPAGE LDS Sample (4x), διάλυμα NuPAGE Sample reducing Agent (10x) και H₂O μέχρι τελικό όγκο 10μl.

Τοποθετούμε την πηκτή ακρυλαμίδης (4-12%) στην ειδική συσκευή που συνοδεύει το συγκεκριμένο kit για Western Blot (Εικ.17). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία 600 μl διαλύματος Running (1x) έξω και με 200 μl διαλύματος Running Buffer μέσα και 500 μl NuPAGE Antioxidant (η σύσταση των διαλυμάτων και των λοιπών αντιδραστηρίων παρατίθεται στον Πιν. 10). Στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε ~20 μgr αποδιαταγμένων πρωτεϊνών στα 200V για περίπου 35-45 λεπτά. Για μάρτυρα χρησιμοποιούμε τον μάρτυρα SeeBlue Plus 2 (Invitrogen).

Ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Για να φτιάξουμε τη συσκευή μεταφοράς τοποθετούμε από τη μια πλευρά του πηκτώματος ακρυλαμίδης τη μεμβράνη και ένα φύλλο Whatman και από την άλλη επίσης ένα Whatman, ενώ και από τις δυο πλευρές τοποθετούμε τα ειδικά σφουγγαράκια. Καλύπτουμε καλά με το διάλυμα Transfer Buffer και το εξωτερικό μέρος της συσκευής το γεμίζουμε με νερό για ψύξη. Η μεταφορά διαρκεί 2 ώρες στα 30 V. Στη συνέχεια ξεπλύνουμε τη μεμβράνη με ειδικό απορρυπαντικό, το TBS-Tween (0,001%). Μετά από 3 εκπλύσεις (5 λεπτά η καθεμία) επωάζουμε τη μεμβράνη με γάλα για 1 ώρα και αφού ξεπλύνουμε επίσης 3 φορές επωάζουμε με το πρώτο

αντίσωμα για περίπου 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα ξεπλένουμε και επωάζουμε με αντίσωμα για την ακτίνη, Mouse Anti-Human ACTIN (SIGMA), για 2,30 ώρες. Τέλος μετά από ένα ακόμη ξέπλυμα της μεμβράνης κάνουμε την τελική επώαση με το δεύτερο αντίσωμα Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling), για 1 ώρα.

Η αποτύπωση της μεμβράνης γίνεται πάνω σε φιλμ XAR-5 film (Kodak, USA) αφού προσθέσουμε ίση ποσότητα χημειοφθοριζόντων διαλυμάτων (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruse Biotechnology). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την Western Blot ανάλυση παρατίθενται στον πίνακα 10. Η ένταση των ζωνών εκτιμήθηκε μετά από ψηφιακή φωτογράφιση των φιλμ και ποσοτικοποίηση τους με το πρόγραμμα Image J. Στη συνέχεια υπολογίσθηκε ο λόγος της έντασης των ζωνών γονιδίου/ ακτίνη για το κάθε δείγμα.



ΕΙΚΟΝΑ 17. Συσκευή ηλεκτροφόρησης για το ανοσοαποτύπωμα western blot. Χρησιμοποιούνται έτοιμες προς χρήση πηκτής ακρυλαμίδης (Novex Bis-Tris Gels) καθώς και το kit NuPAGE της εταιρίας Invitrogen.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Σύσταση διαλυμάτων ανοσοαποτυπώματος western blot

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ
Διάλυμα Running Buffer(1x)	- 50ml NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x) - 950ml H ₂ O
NuPAGE Antioxidant	
Transfer Buffer	- 50ml NuPAGE Transfer Buffer (20x) - 850ml H ₂ O - 100ml Μεθανόλη - 1μl NuPAGE Antioxidant
TBS (10x)	- 24,2 gr Tris - 80 gr NaCl, pH= 7.6 - 1Lt H ₂ O
TWEEN 20(SIGMA)	
TBS-Tween	- 100ml TBS(1x) - 900ml H ₂ O - 1ml TWEEN 20(SIGMA)
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	

7. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

7.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

7.1.1. MC3T3-E1 κυτταρική σειρά

Η κυτταρική αυτή σειρά αποτελείται από εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να διαφοροποιούνται προς την οστεοβλαστική σειρά και να παράγουν κολλαγόνο. Αναπτύσσονται ως προσκολλώμενα κύτταρα, σχηματίζοντας στιβάδα (monolayer). Για τη συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκαν σε 25cm² φιάλες καλλιέργειών σε θρεπτικό alpha-MEM +10-20% FBS +2Mm L-γλουταμίνη + 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, το οποίο ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες.

7.1.2. C7 κυτταρική σειρά

Η κυτταρική αυτή σειρά αποτελείται από μακροφάγα ποντικών, τα οποία έχουν απομονωθεί από το μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά με την παρουσία του παράγοντα M-CSF έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοκλάστες. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται ως προσκολλώμενα κύτταρα με την παρουσία θρεπτικού υλικού alpha-MEM+ 10% FBS+ 1ng/ml M-CSF, το οποίο ανανεώνεται κάθε 3-4 ημέρες.

7.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΗΡΙΑΙΑ ΚΕΦΑΛΗ

7.2.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα που απομονώθηκαν από τις μηριαίες κεφαλές καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Tuli et al. ⁽²¹⁵⁾ για την ανάπτυξη μεσεγχυματικών κυττάρων από οστό. Το πρωτόκολλο της καλλιέργειας παρατίθεται παρακάτω:

- Τεμαχισμός του οστού σε πολύ μικρά κομμάτια με τη βοήθεια κοχλιαρίου και νυστεριού.
- Ξέπλυμα των οστικών τεμαχίων με διάλυμα NaCl (0,9%).
- Επώαση με DMEM/F-12K (50μg/MI ascorbate, 256U/mL collagenase type XI, 2Mm L-γλουταμίνη, 50 μg/mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) (SIGMA) σε φιάλες καλλιέργειών για 3-4 ώρες με περιοδική ανάδευση ανά 30 λεπτά με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur.
- Ξέπλυμα των τμημάτων με διάλυμα NaCl (0,9%) και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου falcon.
- Ξέπλυμα με PBS και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1200rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε το ξέπλυμα.
- Μεταφέρουμε τα οστικά τεμάχια μαζί με τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί σε φιάλες καλλιέργειών 25cm² και προσθέτουμε θρεπτικό: DMEM/F-12K (10% FBS, 50μg/MI ascorbate, 2Mm L-γλουταμίνη, 50 μg/MI πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Αλλάζουμε το θρεπτικό ανά 3-4 μέρες.

- Όταν υπάρξει κάλυψη της φιάλης καλλιιεργειών σε ποσοστό 70-80% ξεκολλάμε τα κύτταρα με θρυψίνη (1mM EDTA).

7.2.2. Ανάπτυξη κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες

- Αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη (1mM EDTA) και απενεργοποίηση της θρυψίνης με πλήρες θρεπτικό.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1200 rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα.
- Μέσα σε ένα τρυβλίο με διάμετρο 10cm έχουμε τοποθετήσει μια αντικειμενοφόρο πλάκα θετικά φορτισμένη (MENZEL-GLASER superfrost, positively charged).
- Διαλύουμε τα κύτταρα σε 1ml θρεπτικό υλικό DMEM/F-12K χωρίς phenol/red (10% FBS, 50μg/ml ascorbate, 2Mm L-glutamine, 50 μg/ml penicillin/streptomycin).
- Προσθέτουμε άλλα 9 ml θρεπτικού υλικού περιφερικά μέσα στο τρυβλίο.
- Επώαση των κυττάρων σε κλίβανο και αλλαγή του θρεπτικού ανά 3-4 μέρες.

7.2.3. Μονιμοποίηση των κυττάρων

- Αφαιρούμε το υπερκείμενο από τα τρυβλία και ξεπλένουμε με PBS.
- Προσθέτουμε παγωμένη μεθανόλη για 5sec.
- Αφαιρούμε τη μεθανόλη και προσθέτουμε ακετόνη 5sec.

- Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω στάδιο.
- Αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν σε ξηρό αέρα.
- Διατηρούμε τα πλακάκια στους -20°C .

7.2.4. Χρώση με αλκαλική φωσφατάση

Η χρώση των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας το ειδικό kit της SIGMA, το οποίο περιέχει αλκαλική φωσφατάση και ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή χρωματίζει κόκκινους τους οστεοβλάστες.

8. ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

8.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 550 ατόμων Καυκάσιας καταγωγής (από την Ελλάδα και την Κύπρο). Έγινε λήψη περιφερικού αίματος από 112 άτομα διαγνωσμένα με AVN και 438 υγιή άτομα ηλικίας μεταξύ 20-50 ετών. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωστεί με οστεονέκρωση μηριαίας κεφαλής στα στάδια II-IV σύμφωνα με την κλίμακα ARCO. Η διεξαγωγή της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και είναι σε συμφωνία με την συνθήκη του Ελσίνκι (1964).

Σε σχέση με την αιτιολογία της οστεονέκρωσης, 76 ασθενείς είχαν λάβει στεροειδή για κάποια χρονική περίοδο και 5 είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού και λάμβαναν ανοσοκαταστολή. Επίσης, 4 είχαν δρεπανοκυτταρική αναιμία, 2 είχαν διαγνωστεί με ερυθματώδη λύκο και 5 ήταν αλκοολικοί. Στους υπόλοιπους 20 ασθενείς δεν βρέθηκε κάποια αιτιολογία που να σχετίζεται άμεσα με την οστεονέκρωση και διαγνώστηκαν ως ιδιοπαθείς περιπτώσεις (primary). Ακόμη από τους 112 ασθενείς οι 73 ήταν άντρες και οι 39 γυναίκες, ενώ οι 79 είχαν διαγνωστεί με ON στο δεξιό και οι 33 στο αριστερό ισχίο.

Τα υγιή άτομα ήταν της ίδιας γεωγραφικής περιοχής και εθνικότητας, χωρίς κάποιο ιστορικό ασθένειας των οστών.

Απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας το QIAmp DNA Mini Kit, QIAGEN. Η ποιότητα του DNA εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

αγαρόζης (1%) και φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm, έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της συγκέντρωσης (μg/ml) των δειγμάτων.

8.2. ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Η μελέτη των πολυμορφισμών στα γονίδια των κυτταροκινών ολοκληρώθηκε με τη βοήθεια του Protrans kit (Protrans HLA Cytokines 2, Roche) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR-SSP (Sequence Specific Primers). Αυτό το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές για συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις διαφορετικών γονιδίων των κυτταροκινών, οι οποίοι περιέχονται στις υποδοχές της πλάκας (48 πηγάδια), και έτσι γίνεται δυνατή η ταυτοποίηση 22 διαφορετικών πολυμορφισμών σε 13 διαφορετικές κυτταροκίνες. Η παρουσία ή η απουσία προϊόντος PCR εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) και παρατήρηση σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία. Κάθε μείγμα εκκινητών περιέχει επίσης ένα ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς (control), το οποίο είναι είτε το γονίδιο της β-σφαιρίνης (89-bp) είτε τμήμα του γονιδίου της C-reactive protein (CRP)(440-bp). Οι πολυμορφικές θέσεις των γονιδίων των κυτταροκινών που μελετήθηκαν είναι: IL-1a (T/C -889), IL-1β (C/T -511, T/C +3962), IL-1R (C/T pst11970), IL-1RA (T/C mspra111100), IL-4Rα (G/A +1902), IL-12 (C/A -1188), ιντερφερόνη-γ (IFN)-γ (A/T UTR 5644), αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β (TGF)-β (C/T codon 10, G/C codon 25), TNF-α (G/A -308, G/A -238), IL-2 (T/G -330, G/T +166), IL-4 (T/G -1098, T/C -590, T/C -33), IL-6 (G/C -174, G/A nt565), IL-10 (G/A -1082, C/T -819, C/A -592).

9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται με μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διαμέσους και ελάχιστες-μέγιστες τιμές, ενώ οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται με απόλυτη και σχετική συχνότητα. Για τις συγκρίσεις των ποσοστών χρησιμοποιήθηκαν το χ^2 και το Fisher exact test. Το Wilcoxon signed rank test χρησιμοποιήθηκε για ζευγαρωτές συγκρίσεις.

Επίσης το χ^2 ή το Fisher's exact X test χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της σύγκρισης των συχνοτήτων των διαφόρων αλληλομόρφων ανάμεσα στους ασθενείς και τα υγιή άτομα. Ακόμη, υπολογίστηκε ο λόγος των πιθανοτήτων (Odds Ratio, OR) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Confidence Interval, CI).

Όλες οι αναφερόμενες τιμές των πιθανοτήτων p είναι αμφίπλευρες. Η στατιστική σημαντικότητα (statistical significance) ορίστηκε στο $p < 0.05$ και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το SigmaPlot program package version 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) και το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (version 17.0).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

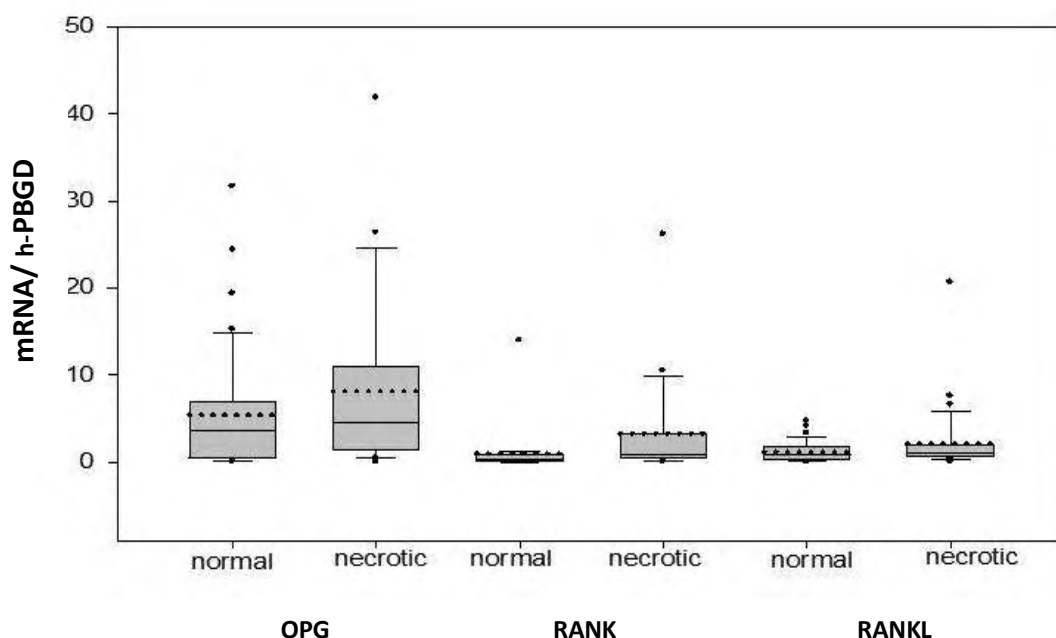
1. ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR

1.1. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ OPG, RANKL ΚΑΙ RANK

Τα επίπεδα mRNA της ομάδας γονιδίων OPG, RANKL και RANK μεταξύ της φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής, μετρήθηκαν σε 42 μηριαίες κεφαλές με οστεονέκρωση με την τεχνική της ποσοτικής RT-PCR. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο h-PBGD, ενώ συγκρίθηκε ο λόγος του αριθμού των μεταγράφων mRNA του γονιδίου / αριθμό των μεταγράφων mRNA του h-PBGD (Πιν. 11, Εικ 18). Η μέση τιμή του λόγου OPG/h-PBGD mRNA ήταν υψηλότερη στη νεκρωτική περιοχή (μέση τιμή: 4,45 και εύρος: 0-41,9) από ότι στη φυσιολογική (μέση τιμή: 3,53 και εύρος: 0,033-31,7) της νεκρωτικής κεφαλής αν και η διαφορά αυτή δεν αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($p>0,05$). Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων RANKL και RANK ακολούθησε εκείνο της OPG αν και τα επίπεδα τιμών ήταν πολύ χαμηλότερα από εκείνα της OPG. Η μέση τιμή του λόγου RANKL/h-PBGD mRNA ήταν 0,77 (εύρος: 0,015-26,2) για τη νεκρωτική περιοχή και 0,27 (εύρος: 0-13,98) για τη φυσιολογική, αντίστοιχα ($p<0,05$). Τέλος, η μέση τιμή του λόγου RANK /h-PBGD mRNA για τη νεκρωτική και φυσιολογική περιοχή ήταν 0,97 (εύρος: 0-20,7) και 0,83 (εύρος: 0,01-4,7), αντίστοιχα ($p<0,05$). Το ποσοστό των δειγμάτων που εμφάνισε υψηλότερα OPG, RANK και RANKL στη νεκρωτική περιοχή σε σχέση με τη φυσιολογική ήταν 64,3%, 73,8% και 66,6% αντίστοιχα, ενώ το 47,6% των δειγμάτων παρουσίασε ταυτόχρονη αύξηση στη νεκρωτική περιοχή και για τα 3 γονίδια.

ΠΙΝΑΚΣ 11. Η μέση τιμή του λόγου των επιπέδων OPG, RANK, RANKL, καθώς και το εύρος τιμών στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή.

MEDIAN mRNA	OPG	RANK	RANKL
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	3,53 (0,033-31,7	0,83 (0.01-4,7)	0,27 (0-13,98)
ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ	4,45 (0-41,9)	0,97 (0-20,7)	0,77 (0,015-26,2)
p	p>0,05	p<0,05	p<0,05



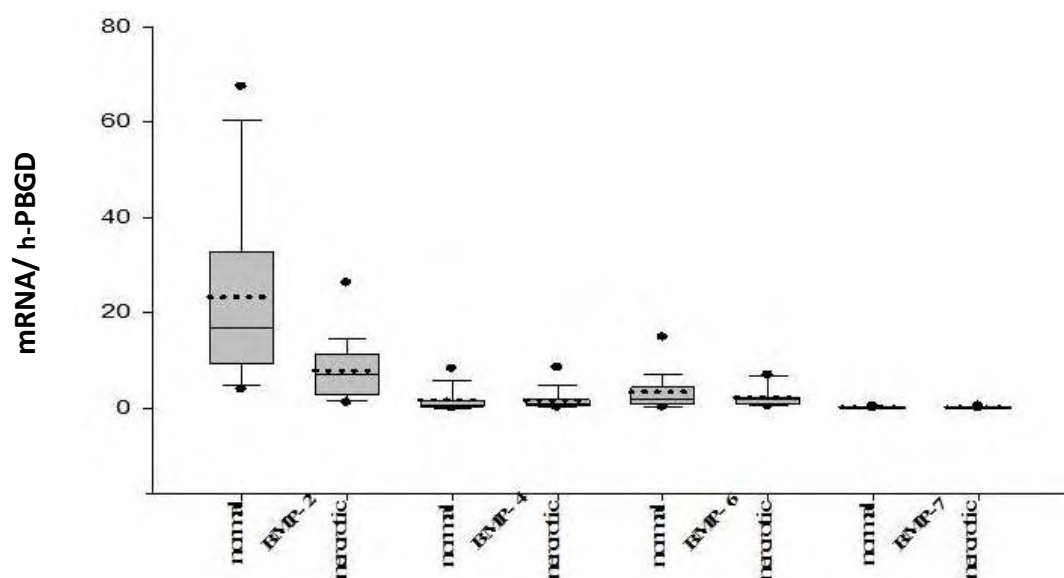
ΕΙΚΟΝΑ 18. Αποτελέσματα ποσοτικής RT-PCR των γονιδίων OPG, RANK και RANKL 42 μηνιαίων κεφαλών με AVN. Οι στήλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τις στατιστικές τιμές. Το όριο της στήλης πλησιέστερα στο μηδέν αντιπροσωπεύει το 5%. Η γραμμή στο εσωτερικό της στήλης αντιστοιχεί στη μέση τιμή, ενώ το πιο απομακρυσμένο όριο της στήλης από το μηδέν αντιπροσωπεύει το 75%. Οι οριζόντιες μπάρες πάνω και κάτω από τη στήλη υποδεικνύουν το 90% και 10% αντίστοιχα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο και τα σημεία εκτός τις ακραίες τιμές. Η διαφορά για τα γονίδια RANK και RANKL αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($p<0.05$).

1.2. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2,BMP-4,BMP-6,BMP-7

Για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε η τεχνική της ποσοτικής RT-PCR. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο h-PBGD, ενώ συγκρίθηκε ο λόγος του αριθμού των μεταγράφων mRNA του γονιδίου / αριθμό των μεταγράφων mRNA του h-PBGD (Πιν.12, Εικ. 19). Τα επίπεδα mRNA της BMP-2 ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φυσιολογική περιοχή στο 88% των μηριαίων κεφαλών. Μετρήθηκαν συνολικά 42 μηριαίες κεφαλές και η μέση τιμή του λόγου του BMP-2/PBGD mRNA ήταν 16,8 (εύρος: 3,8-68) στη φυσιολογική περιοχή και 6,8 (εύρος: 0,93-32,3) στη νεκρωτική περιοχή ($p < 0,05$). Αντίθετα, η BMP-4 ήταν χαμηλότερη στη φυσιολογική (μέση τιμή: 0,62 και εύρος: 0,008-9,6) από ότι στη νεκρωτική περιοχή (μέση τιμή: 0,75, εύρος: 0,06-10,3), ενώ η BMP-6 ακολούθησε το πρότυπο της BMP-2 και ήταν χαμηλότερη στη νεκρωτική (μέση τιμή: 1,64 και εύρος: 0,05-9) από τη φυσιολογική περιοχή (μέση τιμή: 1,75 και εύρος: 0,15-27,1) των μηριαίων κεφαλών με οστεονέκρωση. Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως η διαφορά των επιπέδων έκφρασης των BMP-4 και BMP-6 ανάμεσα στις δυο περιοχές της μηριαίας κεφαλής δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Όσον αφορά στην BMP-7, τα επίπεδα έκφρασης κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα τόσο στη φυσιολογική (μέση τιμή: 0,06, εύρος: 0-0,4) όσο και στη νεκρωτική περιοχή (μέση τιμή: 0,03 και εύρος: 0,003-0,57) ($p > 0,05$) (Πίν. 12).

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Η μέση τιμή του λόγου των mRNA BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 /PBGD, καθώς και το εύρος τιμών ανάμεσα στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή.

MEDIAN mRNA	BMP-2	BMP-4	BMP-6	BMP-7
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	16,8 (3,8-68)	0,62 (0,008-9,6)	1,75 (0,15-27,1)	0,06 (0-0,4)
ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ	6,8 (0,93-32,3)	0,75 (0,06-10,3)	1,64 (0,05-9)	0,003 (0-1,5)
p	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05



ΕΙΚΟΝΑ 19. Αποτελέσματα ποσοτικής RT-PCR των γονιδίων BMP2, BMP4, BMP6 και BMP7 της φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής 42 μηριαίων κεφαλών. Οι στήλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τις στατιστικές τιμές. Το όριο της στήλης πλησιέστερα στο μηδέν αντιπροσωπεύει το 5%. Η γραμμή στο εσωτερικό της στήλης αντιστοιχεί στη μέση τιμή, ενώ το πιο απομακρυσμένο όριο της στήλης από το μηδέν αντιπροσωπεύει το 75%. Οι οριζόντιες μπάρες πάνω και κάτω από τη στήλη υποδεικνύουν το 90% και 10% αντίστοιχα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο και τα σημεία εκτός τις ακραίες τιμές. Μόνο η διαφορά του BMP2 γονιδίου ανάμεσα στις δυο περιοχές αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική (p<0,05).

1.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ, ΤΟ ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Προκειμένου να εξεταστεί η σύνδεση των επιπέδων έκφρασης της OPG, του RANKL και του RANK με την ηλικία χωρίσαμε τα δείγματα μας σε 3 ηλικιακές ομάδες (20-35, 36-50, 50 + ετών) και συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης σε αυτές τις τρεις ομάδες για την κάθε περιοχή των ΜΚ (φυσιολογική-νεκρωτική). Συνεχίσαμε τη μελέτη μας εξετάζοντας τη συσχέτιση μεταξύ ανδρών και γυναικών, καθώς και μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών για τα φυσιολογικά και τα νεκρωτικά δείγματα.

1.3.1 Έκφραση OPG-RANKL-RANK σε σχέση με την ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα

Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία ή το φύλο ($p > 0,05$). Όσον αφορά στο κάπνισμα, η έκφραση του RANKL στα νεκρωτικά δείγματα των καπνιστών (μέση τιμή: 11,49), ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα νεκρωτικά δείγματα των μη-καπνιστών (μέση τιμή: 1,66) ($P < 0,05$) (Πιν. 13,14,15, Εικ. 20,21,22).

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANKL και RANK με το φύλο

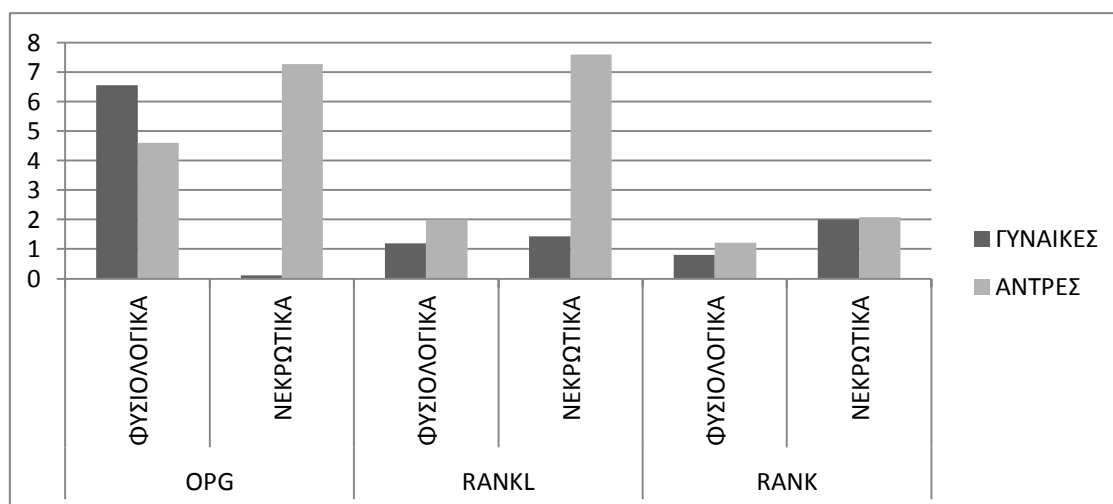
Μέση τιμή	OPG		RANKL		RANK	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	6,56	0,11	1,20	1,43	0,80	2,00
ΑΝΤΡΕΣ	4,60	7,27	2,00	7,59	1,22	2,08
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANKL και RANK με το κάπνισμα

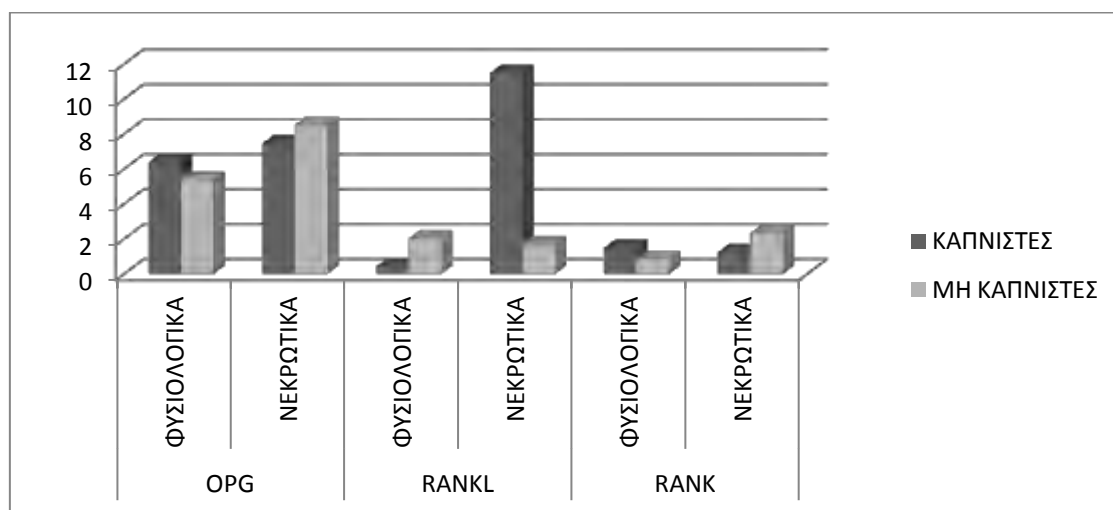
Μέση τιμή	OPG		RANKL		RANK	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	6,39	7,46	0,42	11,49	1,49	1,23
ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	5,38	8,51	2,02	1,66	0,84	2,33
p	p>0,05	p>0,05	p>0.05	p<0,05	p>0,05	p>0.05

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANKL και RANK με την ηλικία

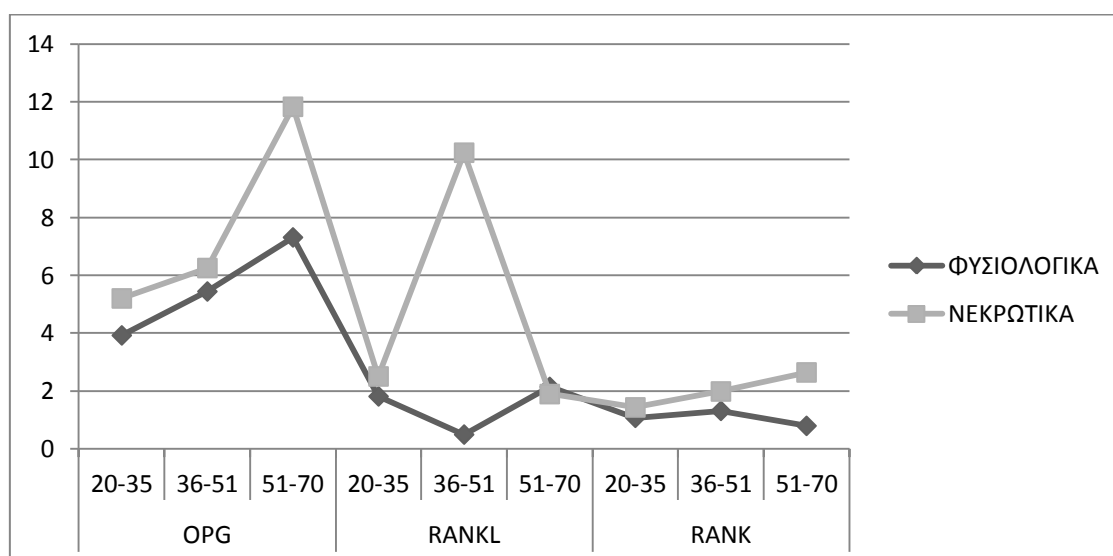
Μέση τιμή	OPG		RANKL		RANK	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΗΛΙΚΙΑ						
20-35	3,92	5,20	1,81	2,50	1,07	1,43
36-50	5,44	6,25	0,49	10,24	1,31	1,98
51-70	7,31	11,83	2,14	1,89	0,79	2,64
p	p>0,05	p>0,05	p>0.05	p>0,05	p>0,05	p>0.05



ΕΙΚΟΝΑ 20. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANK και RANKL με το φύλο



ΕΙΚΟΝΑ 21. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANK και RANKL με το κάπνισμα



ΕΙΚΟΝΑ 22. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OPG, RANK και RANKL με την ηλικία

1.3.2 Έκφραση των BMPs σε σχέση με την ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα

Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση όσον αφορά την ηλικία ($p>0.05$). Αντίθετα στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε ανάμεσα στους άντρες και τις γυναίκες, καθώς στα φυσιολογικά δείγματα είχαμε υψηλότερη BMP-4 στις γυναίκες (μέση τιμή:1,42) σε σχέση με τους άντρες (μέση τιμή:0,88) και στα νεκρωτικά δείγματα επίσης υψηλότερη BMP-6 στις γυναίκες (μέση τιμή:2,91) σε σχέση με τους άντρες (μέση τιμή:1,67) ($p<0.05$). Επίσης διαφοροποίηση είχαμε ανάμεσα στους καπνιστές και στους μη-καπνιστές καθώς η μέση τιμή της BMP-4 παρουσιάστηκε υψηλότερη στους καπνιστές από ότι στους μη καπνιστές τόσο στα φυσιολογικά (καπνιστές:1,97, μη-καπνιστές:0,85) όσο και στα νεκρωτικά δείγματα (καπνιστές:4,44, μη-καπνιστές:1,18) ($p<0,05$) (Πιν. 16,17,18, Εικ. 23,24,25).

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με το φύλο

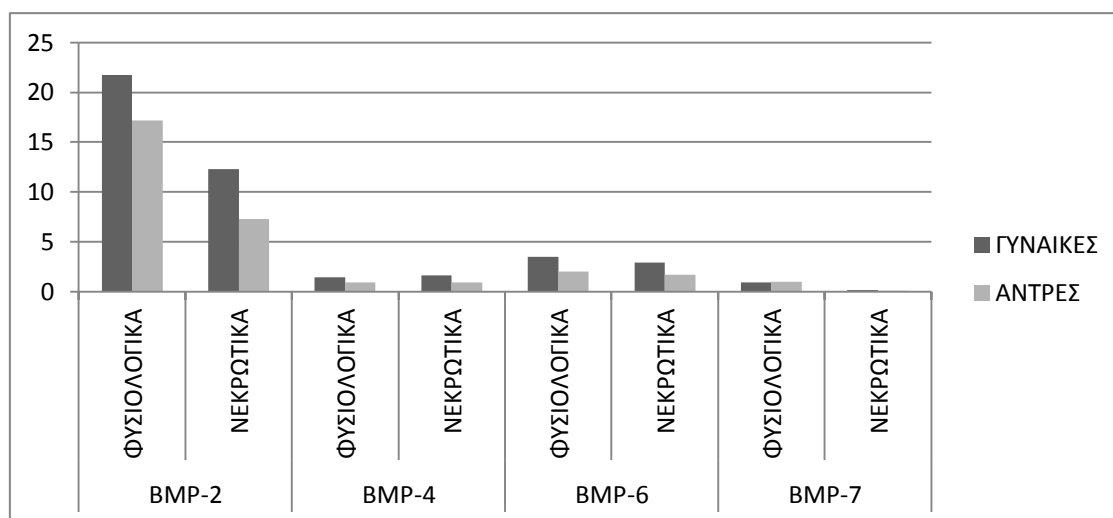
Μέση τιμή	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	21,72	12,26	1,42	1,60	3,49	2,91	0,89	0,15
ΑΝΤΡΕΣ	17,14	7,29	0,88	0,89	2,01	1,67	0,94	0,08
p	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0.05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0.05$	$p>0,05$	$p>0,05$

ΠΙΝΑΚΑΣ 17. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με το κάπνισμα

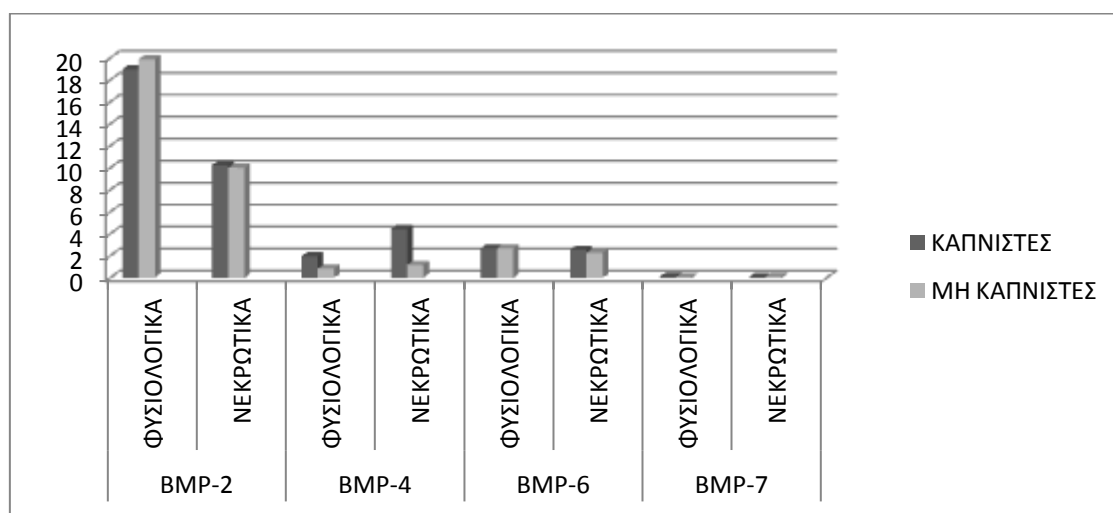
Μέση τιμή	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	18,96	10,24	1,97	4,44	2,68	2,54	0,11	0,09
ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	19,88	10,02	0,85	1,18	2,67	2,28	0,08	0,11
p	p>0,05	p>0,05	p<0.05	p<0,05	p>0,05	p>0.05	p>0,05	p>0,05

ΠΙΝΑΚΑΣ 18. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με την ηλικία

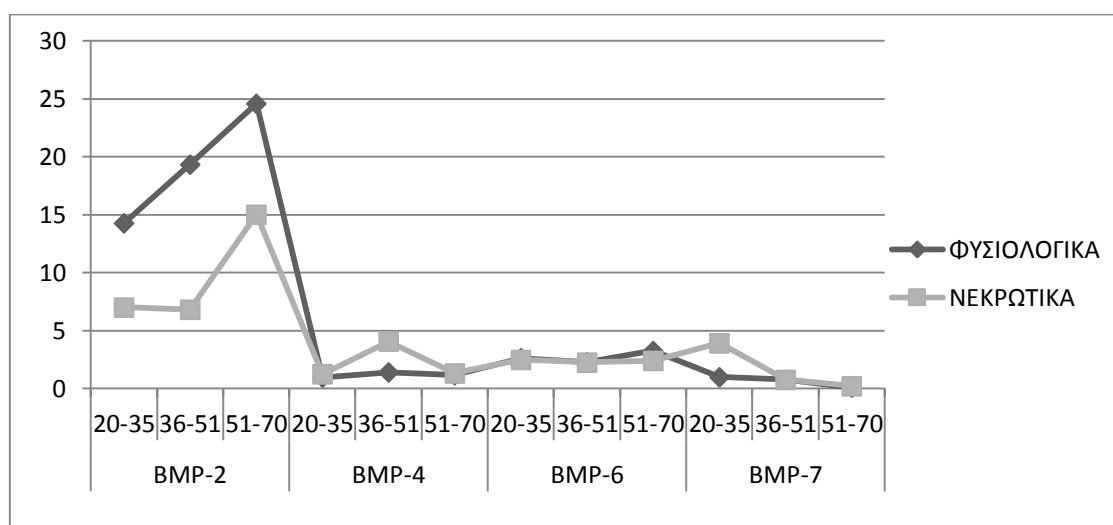
Μέση τιμή	BMP-2		BMP-4		BMP-6		BMP-7	
	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΦΙΚΑ	ΝΕΚΡΩΤΙΚΑ
ΗΛΙΚΙΑ								
20-35	14,27	7,00	0,96	1,25	2,63	2,48	0,99	3,92
36-50	19,33	6,81	1,41	4,07	2,29	2,25	0,76	0,76
51-70	24,58	15,01	1,17	1,32	3,25	2,4	0,09	0,21
p	p>0,05	p>0,05	p>0.05	p>0,05	p>0,05	p>0.05	p>0,05	p>0,05



ΕΙΚΟΝΑ 23. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με το φύλο



ΕΙΚΟΝΑ 24. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με το κάπνισμα



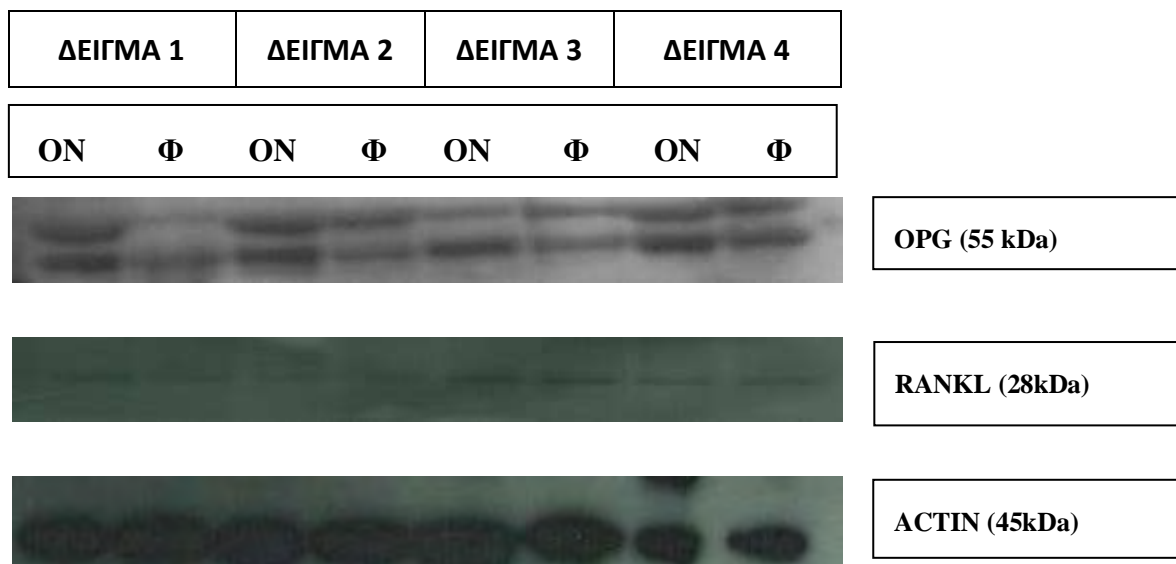
ΕΙΚΟΝΑ 25. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των BMPs με την ηλικία

2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ WESTERN BLOT

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο του αποτυπώματος western blot με τη χρήση φθορισμού ECL και την αποτύπωση σε φωτογραφικό φιλμ. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη, ενώ για τη σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο λόγος της έντασης της πρωτεΐνης/ακτίνη με τη χρήση του ειδικού προγράμματος Image J.

2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ OPG, RANKL ΚΑΙ RANK

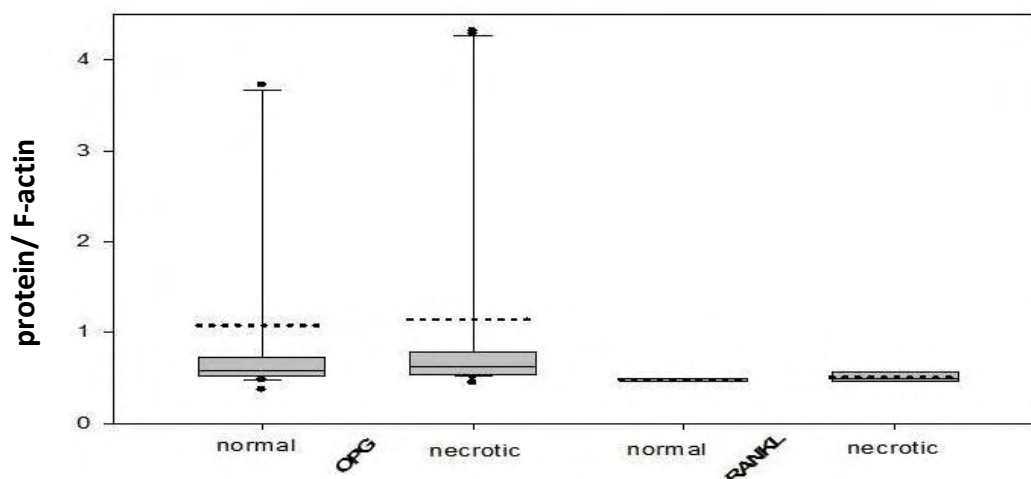
Μετρήθηκαν τα ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών OPG, RANKL και RANK μεταξύ της φυσιολογικής και της νεκρωτικής περιοχής σε 42 μηριαίες κεφαλές. Η φυσιολογική περιοχή όλων των μηριαίων κεφαλών έδειξε συγκρίσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα της OPG, με μέση τιμή του λόγου της έντασης OPG/F-actin 0,57 (εύρος: 0,37-4,91). Στη νεκρωτική περιοχή τα επίπεδα ήταν σχεδόν ίσα με τα επίπεδα της φυσιολογικής (μέση τιμή: 0,62 και εύρος: 0,45-4,32). Επίσης η πρωτεΐνη RANKL ανιχνεύτηκε και στις 42 μηριαίες κεφαλές τόσο στη φυσιολογική (μέση τιμή: 0,48 και εύρος: 0,45-0,49) όσο και στη νεκρωτική περιοχή (μέση τιμή: 0,5 και εύρος: 0,45-0,48). Όσον αφορά την RANK, δεν ήταν δυνατή η μέτρησή της, λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων της (Πιν. 19, Εικ.26,27).



ΕΙΚΟΝΑ 26. Απεικόνιση αποτυπώματος Western blot σε 4 διαφορετικές μηριαίες κεφαλές για τις πρωτεΐνες **OPG (55 kDa)** και **RANKL (28 kDa)**. Η ακτίνη (45kDa) χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. **ΟΝ:** πρωτεΐνες από τη νεκρωτική περιοχή της μηριαίας κεφαλής. **Φ:** πρωτεΐνες από τη φυσιολογική περιοχή της μηριαίας κεφαλής.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Ο λόγος της μέσης τιμής των επιπέδων έκφρασης των OPG, RANKL/β-ακτίνη, το εύρου τιμών και η τιμή του p στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	OPG/β-ακτίνη	RANKL/β-ακτίνη
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	0,57 (0,37-4,91)	0,48 (0,45-0,49)
ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ	0,62 (0,45- 4,32)	0,50 (0,45-0,58)
p	p>0.05	p>0,05

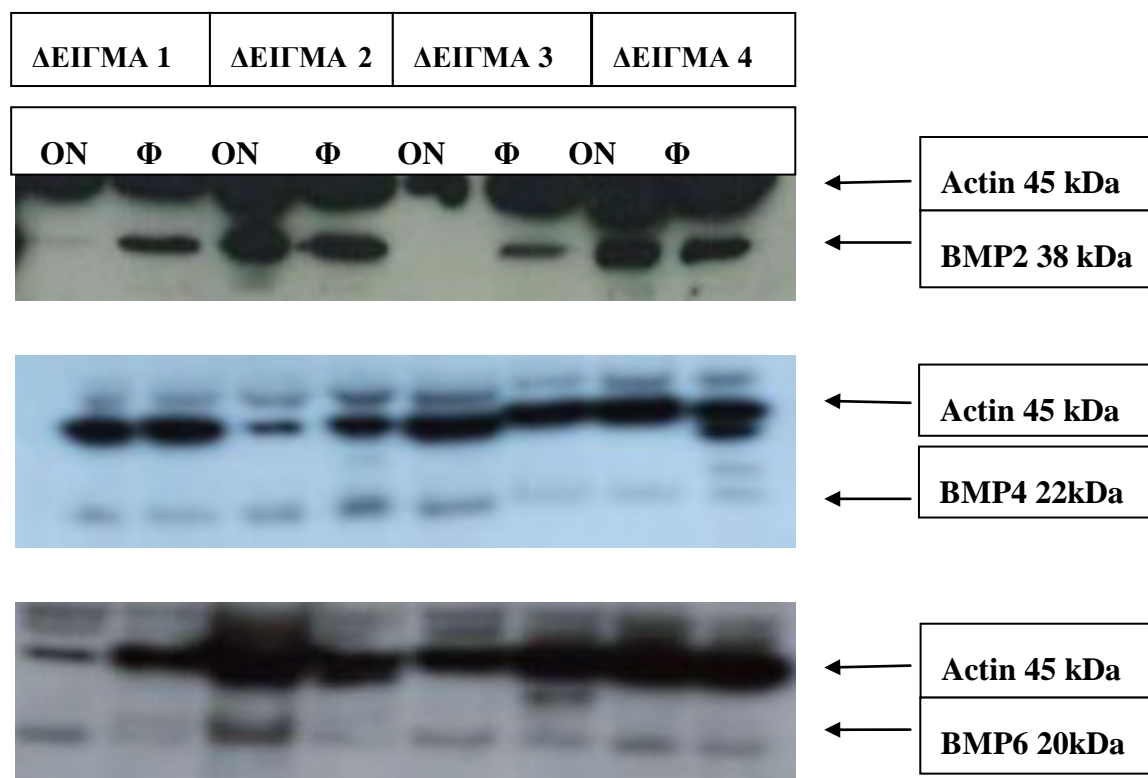


ΕΙΚΟΝΑ 27. Σχηματική απεικόνιση της μέσης τιμής έκφρασης των πρωτεϊνών OPG και RANKL μεταξύ φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής 42 ημερών κεφαλών με οστεονέκρωση χρησιμοποιώντας την ανάλυση Western Blot. Οι στήλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τις στατιστικές τιμές. Το όριο της στήλης πλησιέστερα στο μηδέν αντιπροσωπεύει το 5%. Η γραμμή στο εσωτερικό της στήλης αντιστοιχεί στη μέση τιμή, ενώ το πιο απομακρυσμένο όριο της στήλης από το μηδέν αντιπροσωπεύει το 75%. Οι οριζόντιες μπάρες πάνω και κάτω από τη στήλη υποδεικνύουν το 90% και 10% αντίστοιχα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο και τα σημεία εκτός τις ακραίες τιμές. Δεν παρατηρούνται αξιόλογες διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανάμεσα στις δυο περιοχές.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BMP-2, BMP-4, BMP6 ΚΑΙ BMP-7

Μετρήθηκαν οι πρωτεΐνες BMP-2, BMP-4, BMP6 και BMP-7 σε 42 ημερών κεφαλές. Η μέση τιμή της BMP-2 ήταν υψηλότερη στη φυσιολογική περιοχή (μέση τιμή: 0,67 και εύρος: 0,36-1,19) σε σχέση με τη νεκρωτική περιοχή (μέση τιμή: 0,64 και εύρος: 0,23-1,12) ($p > 0,05$). Σε αντίθεση με την BMP-2, οι πρωτεΐνες BMP-4 και BMP-6 ήταν υψηλότερες στη νεκρωτική περιοχή. Η μέση τιμή της BMP-4 για τη φυσιολογική ήταν 0,51 (εύρος: 0,25-1,19) και για τη νεκρωτική 0,61 (εύρος: 0,25-1,51), ενώ για την BMP-6 ήταν 0,51 (εύρος: 0-1,16) και 0,56 (εύρος: 0-2,39), αντίστοιχα ($p < 0,05$). Η

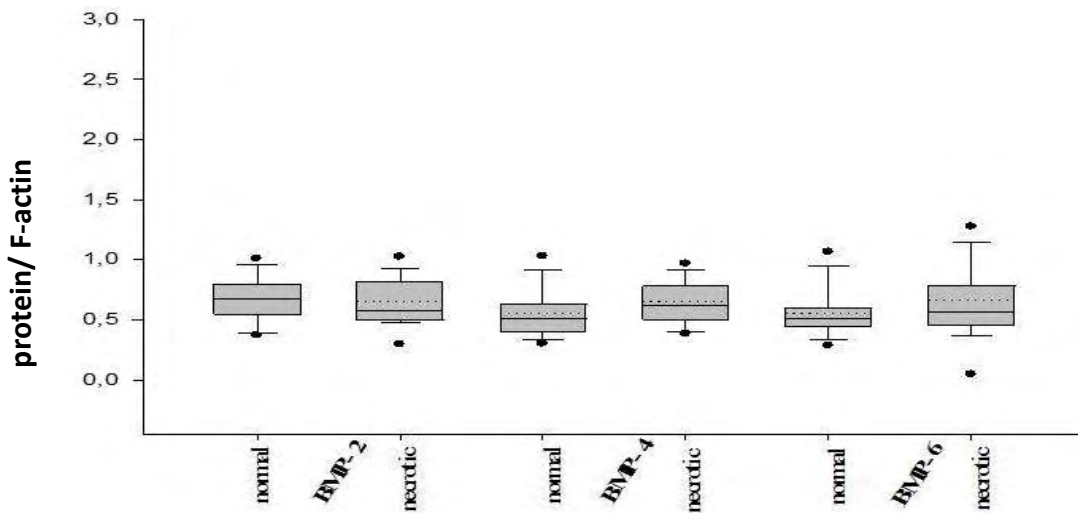
BMP-7 δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί εξαιτίας των πολύ χαμηλών επιπέδων, ήδη από το επίπεδο του mRNA (Πιν. 20, Εικ. 28,29).



ΕΙΚΟΝΑ 28. Απεικόνιση αποτυμώματος Wester blot σε 4 διαφορετικές οστεονεκρωτικές μηριαίες κεφαλές για τις πρωτεΐνες BMP2, BMP4 και BMP6. Το γονίδιο αναφοράς είναι η ακτίνη (45kDa). ON: πρωτεΐνη από τη νεκρωτική περιοχή, Φ: πρωτεΐνη από τη φυσιολογική περιοχή των μηριαίων κεφαλών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 20. Ο λόγος της μέσης τιμής των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών BMP-2, BMP-4, BMP-6/β-ακτίνη, το εύρος τιμών και η τιμή του p στη φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	BMP-2/β-ακτίνη	BMP-4/β-ακτίνη	BMP-6/β-ακτίνη
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	0,67 (0,36- 1,19)	0,51 (0,25- 1,19)	0,51 (0-1,16)
ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ	0,64 (0,23-1,12)	0,61 (0,25- 1,51)	0,56 (0-2,39)
p	p>0,05	p<0,05	p>0,05



ΕΙΚΟΝΑ 29. Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης τιμής των επιπέδων των BMP-2, BMP-4 και BMP-6 πρωτεϊνών ανάμεσα στη φυσιολογική και τη νεκρωτική περιοχή 42 ημερών κεφαλών με AVN χρησιμοποιώντας την Western Blot ανάλυση. Οι στήλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τις στατιστικές τιμές. Το όριο της στήλης πλησιέστερα στο μηδέν αντιπροσωπεύει το 5%. Η γραμμή στο εσωτερικό της στήλης αντιστοιχεί στη μέση τιμή, ενώ το πιο απομακρυσμένο όριο της στήλης από το μηδέν αντιπροσωπεύει το 75%. Οι οριζόντιες μπάρες πάνω και κάτω από τη στήλη υποδεικνύουν το 90% και 10% αντίστοιχα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη διάμεσο και τα σημεία εκτός τις ακραίες τιμές. Μόνο η διαφορά της BMP-4 αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$).

2.3 Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης

Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 BMP-7 όσο και των OPG, RANKL και RANK στα περισσότερα των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν δείγματα που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο mRNA, ενώ αντίστοιχα έχουν χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης, καθώς και το αντίστροφο (Πίν.21).

ΠΙΝΑΚΑΣ 21. Συσχέτιση επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης του κάθε γονιδίου στην φυσιολογική και νεκρωτική περιοχή.

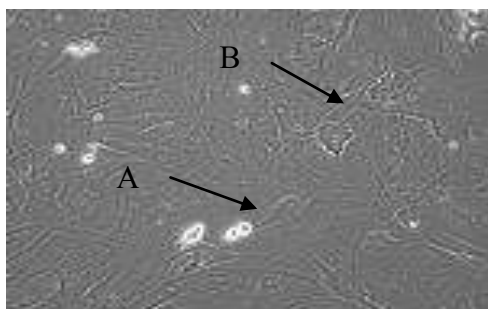
	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ						ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ					
	OPG	RANKL	RANK	BMP-2	BMP-4	BMP-6	OPG	RANKL	RANK	BMP-2	BMP-4	BMP-6
mRNA	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓
πρωτεΐνες	↓	↓	-	↑	↓	↓	↑	↑	-	↓	↑	↑

3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι καλλιέργειες κυτταρικών σειρών σε δείγματα φυσιολογικά και νεκρωτικά πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση ζωντανών κυττάρων και την απομόνωση γενετικού υλικού από την νεκρωτική περιοχή.

3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Τα κύτταρα που περιέχονται στην συγκεκριμένη σειρά κυττάρων είναι οστεοβλάστες ποντικών (Εικ 30). Καλλιεργήσαμε τέτοια κύτταρα ώστε να απομονώσουμε mRNA και πρωτεΐνες με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί δείκτες στα πειράματά μας, καθώς εκφράζουν τα γονίδια που θέλαμε να μελετήσουμε.

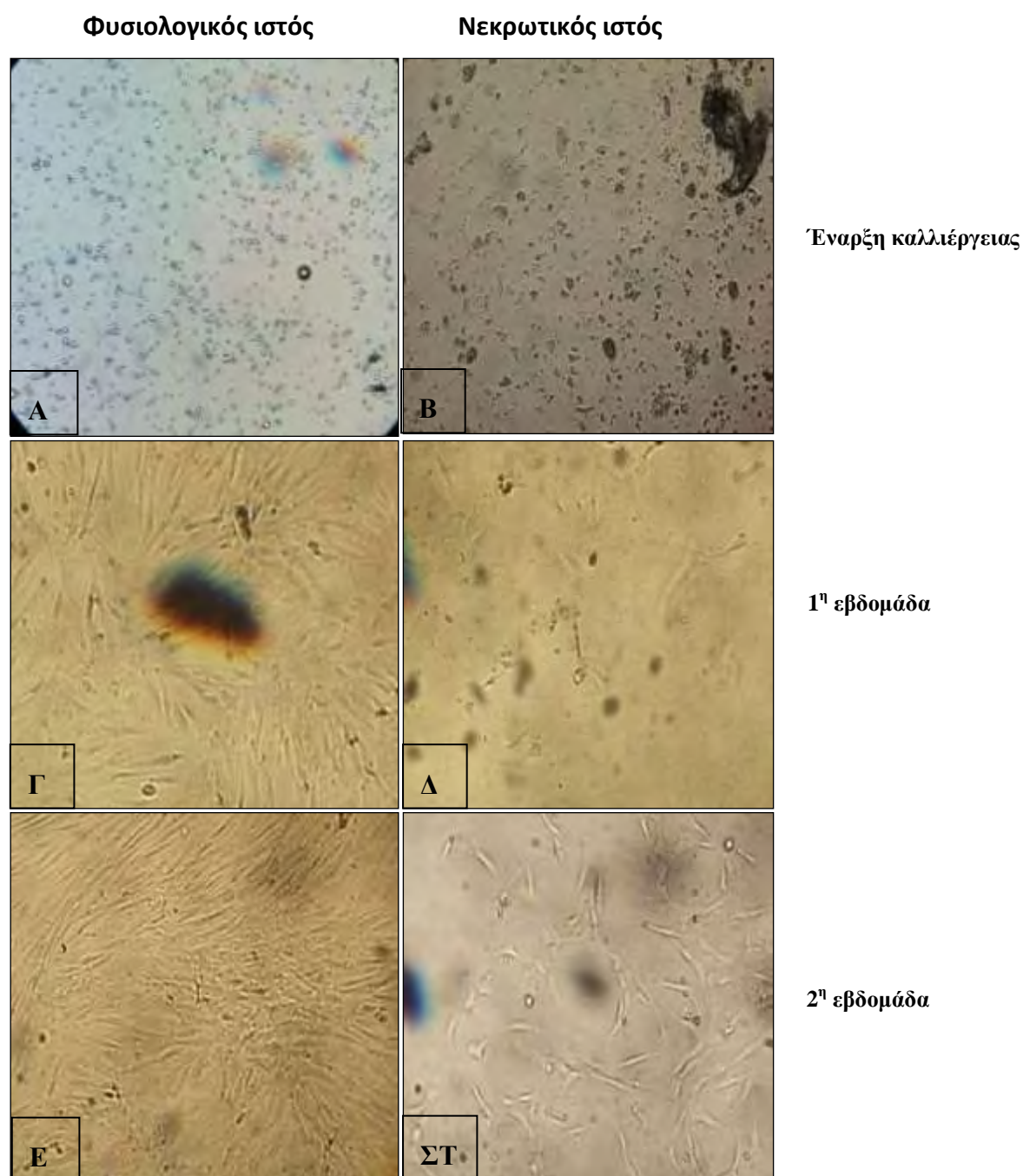


ΕΙΚΟΝΑ 30. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς MC3T3-E1.. **A:** μεμονωμένος οστεοβλάστης, **B:** συσσωμάτωμα κυττάρων.

3.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΗΡΙΑΙΑ ΚΕΦΑΛΗ

Η καλλιέργεια των μεσεγχυματικών κυττάρων από μηριαίες κεφαλές πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Tuli R. et al ⁽²¹⁵⁾. Όπως παρατηρούμε στις παρακάτω φωτογραφίες, τα κύτταρα από τις δυο διαφορετικές περιοχές της μηριαίας κεφαλής, φυσιολογική και νεκρωτική, παρουσιάζουν διαφορές ως προς την μορφολογία και το σχήμα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην έλλειψη υγρών (αίμα και μυελού των οστών) που οδηγεί στην αφυδάτωση των κυττάρων στη νεκρωτική περιοχή.

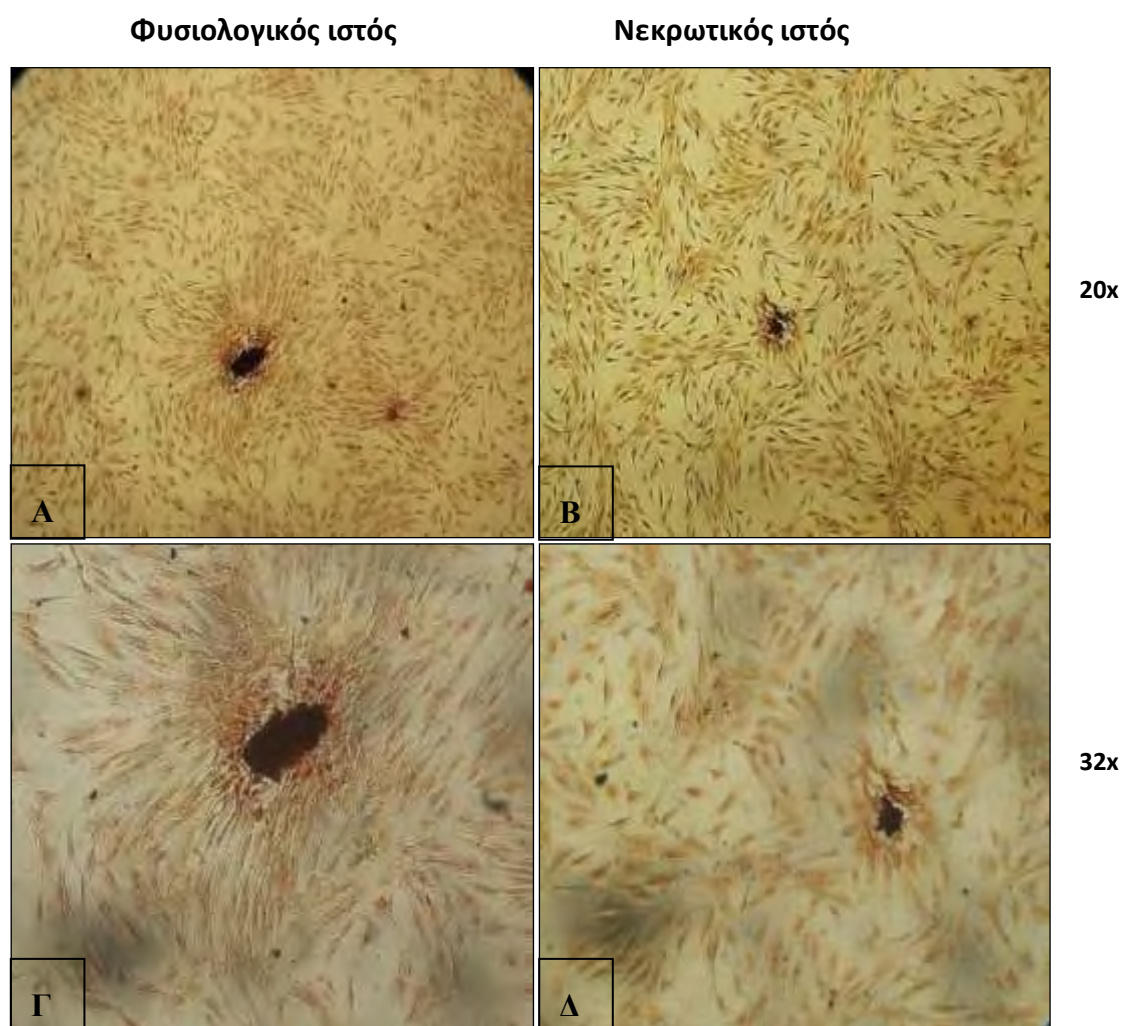
Επίσης παρατηρούμε πως μετά από καλλιέργεια μιας και δυο εβδομάδων των οστικών τεμαχίων, τα κύτταρα που προέρχονται από τη φυσιολογική περιοχή αναπτύσσονται με γρηγορότερο ρυθμό σε σχέση με τη νεκρωτική. Σημαντική επίσης είναι και η ανάπτυξη των οστεοβλαστών γύρω από τα οστικά τεμάχια, ιδιαίτερα στα οστικά τεμάχια που προέρχονται από την νεκρωτική περιοχή (Εικ. 31).



ΕΙΚΟΝΑ 31. Καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από μηριαίες κεφαλές με ON (32x). Α, Γ, Ε: κύτταρα από την φυσιολογική περιοχή, Β, Δ, ΣΤ: κύτταρα από την νεκρωτική περιοχή.

3.3 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tuli R, et al ⁽²¹⁵⁾ σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια ακολούθησε μονιμοποίηση. Η χρώση έγινε με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία χρωματίζει ερυθρούς τους ζωντανούς οστεοβλάστες. Τόσο στην ανάλυση των 20x όσο και 32x υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός ζωντανών οστεοβλαστών στα κύτταρα που προέρχονται από τη φυσιολογική περιοχή σε σχέση με τη νεκρωτική (Εικ. 32).



ΕΙΚΟΝΑ 32. Καλλιέργειες μεσεγχυματικών κυττάρων από μηριαία κεφαλή, ανάπτυξη σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρώση με αλκαλική φωσφατάση. Α: κύτταρα από φυσιολογικό ιστό, Β: κύτταρα από νεκρωτικό ιστό, Γ: κύτταρα από φυσιολογικό ιστό, Δ: κύτταρα από νεκρωτικό ιστό.

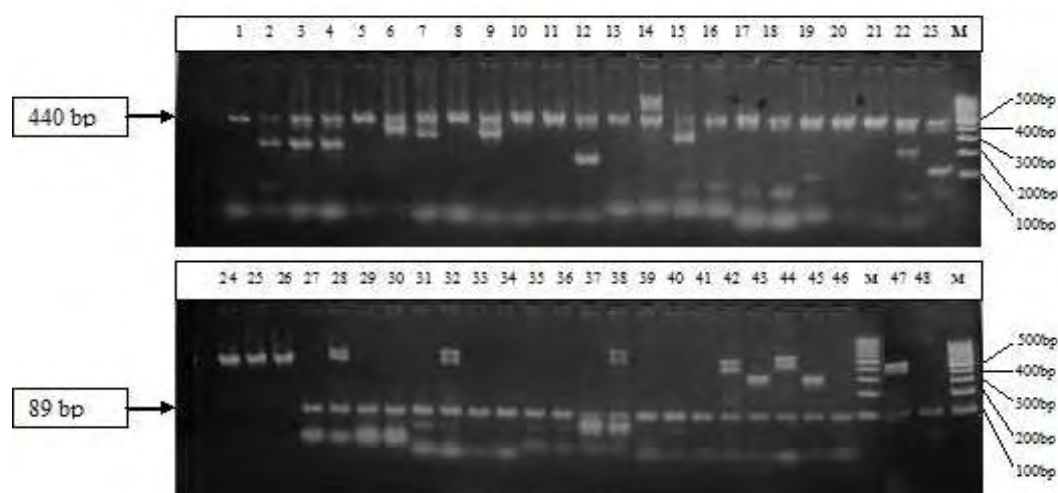
4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Με την τεχνική που προαναφέραμε, έγινε μελέτη των αλληλομόρφων και γονοτύπων των γονιδίων των κυτταροκινών σε δείγματα αίματος που είχαν διαγνωστεί με ΟΝ καθώς και σε ομάδα υγιών ατόμων (Εικ. 33). Οι συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίν. 22,23). Προχωρήσαμε επίσης στη δημιουργία απλοτύπων συνδυάζοντας δυο ή και τρεις διαφορετικές θέσεις πάνω στο ίδιο γονίδιο. Όλες οι συχνότητες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Από τη γονοτύπηση λοιπόν των γονιδίων των κυτταροκινών IL-1α (T/C -889), IL-1β (C/T -511, T/C +3962), IL-1R (C/T pst11970), IL-1RA (T/C msra111100), IL-4Rα (G/A +1902), IL-12 (C/A -1188), ιντερφερόνης (IFN)-γ (A/T UTR 5644), αυξητικού παράγοντα (TGF)-β (C/T codon 10, G/C codon 25), TNF-α (G/A -308, G/A -238), IL-2 (T/G -330, G/T +166), IL-4 (T/G -1098, T/C -590, T/C -33), IL-6 (G/C -174, G/A nt565), IL-10 (G/A -1082, C/T -819, C/A -592) παρατηρήσαμε τα παρακάτω αποτελέσματα. Ο **γονότυπος TC της IL-1α** στη θέση **-889** βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα (51,8%) στους ασθενείς με ΟΝ με τη συχνότητα του **T** αλληλομόρφου να φτάνει στο 34,8% ($p<0,05$). Στο **κωδικόνιο 25 του TGFβ**, ο πολυμορφισμός από **G** σε **C** στην ομόζυγη κατάσταση βρέθηκε μόνο στο 1,8% της ομάδας των ασθενών και η συχνότητα του **αλληλομόρφου C** ήταν 8,9%, ενώ η συχνότητα του **G** ήταν 91,1% ($p<0,05$). Στη θέση **-238** του υποκινητή του γονιδίου του **TNFα**, 10,8% των ασθενών έφεραν το **γονότυπο GA** και μόνο 2,1% από την ομάδα των υγιών ατόμων. Η συχνότητα του

αλληλομόρφου A και στις δυο ομάδες ήταν πολύ χαμηλή (ασθενείς: 5,4%, υγιή άτομα: 1,05%).

Δημιουργώντας έναν απλότυπο για τις **θέσεις -308/ -238 του TNFα**, είδαμε πως ο απλότυπος **GG/GG** είναι ο πιο συχνός και στις δυο ομάδες, ενώ ο **GG/GA** ήταν 10,8% στους ασθενείς και 2,1% στην ομάδα των υγιών ατόμων ($p < 0,05$). Τέλος στη θέση **-1082 του γονιδίου της IL-10 ο γονότυπος GG** βρέθηκε σε ποσοστό 16,2% της ομάδας στα υγιή άτομα, ενώ στους ασθενείς με οστεονέκρωση ήταν μόλις 7,2%. Δημιουργήσαμε ακόμη ένα απλότυπο για τις θέσεις **-1082/-819/-592 του IL-10** και είδαμε πως ο απλότυπος **GCC/GCC** ήταν υψηλότερος στα υγιή άτομα (16,2%) σε σχέση με τους ασθενείς (7,2%).



ΕΙΚΟΝΑ 33. Ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος για την γονοτύπηση 22 διαφορετικών πολυμορφισμών σε 13 διαφορετικές κυτταροκίνες. Τα αλληλο-ειδικά προϊόντα για τις κυτταροκίνες IL-1α (θέσεις 1-2), IL 1β (θέσεις 3-6), IL-1R (θέσεις 7-8), IL-1RA (θέσεις 9-10), IL-4Rα (θέσεις 11-12), γIFN (θέσεις 15-16), TGF-β (θέσεις 17-22) και TNF-α (θέσεις 23-26) είναι <340 bp, για την κυτταροκίνη IL-12 (θέσεις 13-14) είναι >800 bp και για την IL-2 (θέσεις 27-30), IL-4 (θέσεις 31-38), IL-6 (θέσεις 39-42) και IL-10 (θέσεις 43-48) είναι >300 bp. **M:** marker 100bp.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22. Συχνότητες γονοτύπων των γονιδίων των κυτταροκινών σε ασθενείς με οστεονέκρωση και υγιή άτομα (**OR:** Odds Ratio, **CI:** Confidence Interval)

Κυτταροκίνες	Γονότυπος	Ασθενείς	CONTROLS	P- value	OR (95% CI)
IL-1α	CC	44 (39,3%)	211 (48,2%)	0,09	1,62 (1,07-2,47)
	CT	58 (51,8%)	174 (39,7%)	0,02	
	TT	10 (8,9%)	53 (12,1%)	0,34	
IL-1β	CC	46 (41,1%)	197 (45%)	0,45	
	CT	49 (43,7%)	186 (42,4%)	0,80	
	TT	17 (15,2%)	55 (12,6%)	0,46	
IL-1β	CC	50 (44,7%)	233 (53,2%)	0,10	
	TC	53 (47,3%)	183 (41,8%)	0,29	
	TT	9 (8%)	22 (5%)	0,22	
IL-1R	CC	54 (48,2%)	191 (43,6%)	0,38	
	CT	49 (43,8%)	192 (43,8%)	0,98	
	TT	9 (8%)	55 (12,6%)	0,18	
IL-1RA	TT	55 (49,1%)	211 (48,2%)	0,86	
	TC	49 (43,7%)	186 (42,5%)	0,80	
	CC	8 (7,2%)	41 (9,3%)	0,46	
IL-4Ra	AA	82 (73,2%)	340 (77,6%)	0,32	
	GA	27 (24,1%)	87 (19,9%)	0,32	
	GG	3 (2,7%)	11 (2,5%)	0,92	

IL-12	AA	69 (61,6%)	248 (56,6%)	0,34	
	CA	36 (32,1%)	162 (37%)	0,34	
	CC	7 (6,3%)	28 (6,4%)	0,95	
γINF	AA	27 (24,1%)	116 (26,5%)	0,60	
	AT	58 (51,8%)	219 (50%)	0,73	
	TT	27 (24,1%)	103 (23,5%)	0,89	
TGF-β (codon 10)	CC	41 (36,6%)	139 (31,7%)	0,32	
	CT	44 (39,3%)	200 (45,7%)	0,22	
	TT	27 (24,1%)	99 (22,6%)	0,73	
TGF-β (codon 25)	GG	94 (84%)	352 (80,3%)	0,39	
	GC	16 (14,2%)	49 (11,2%)	0,36	
	CC	2 (1,8%)	37 (8,5%)	0,02	0,19 (0,04-0,83)
TNF-α (-308)	GG	94 (84%)	369 (84,3%)	0,93	
	GA	17 (15,2%)	58 (13,2%)	0,59	
	AA	1 (0,8%)	11 (2,5%)	0,31	
TNF-α (-238)	GG	100 (89,2%)	429 (97,9%)	0,04	
	GA	12 (10,8%)	9 (2,1%)	0,00	0,17 (0,07-0,42)
	AA	0 (0%)	0 (0%)	0,49	
IL-2 (-330)	TT	45 (40,2%)	168 (38,4)	0,72	
	TG	44 (39,3%)	202 (46,1%)	0,19	

	GG	23 (20,5%)	68 (15,5%)	0,20
IL-2 (+166)	GG	62 (55,4%)	235 (53,6%)	0,74
	GT	39 (34,8%)	165 (37,7%)	0,57
	TT	11 (9,8%)	38 (8,7%)	0,70
IL-4 (-1098)	TT	92 (82,1%)	360 (82,2%)	0,99
	TG	18 (16,1%)	64 (14,6%)	0,69
	GG	2 (1,8%)	14 (3,2%)	0,43
IL-4 (-590)	TT	6 (5,4%)	17(3,9%)	0,48
	TC	22 (19,6%)	114 (26%)	0,16
	CC	84 (75%)	307 (70,1%)	0,30
IL-4 (-33)	TT	16 (14,3%)	98 (22,4%)	0,06
	TC	11 (9,8%)	24 (5,5%)	0,09
	CC	85 (75,9%)	316 (72,1%)	0,42
IL-6 (-174)	GG	73 (65,2%)	248 (56,6%)	0,10
	GC	35 (31,2%)	169 (38,6%)	0,15
	CC	4 (3,6%)	21 (4,8%)	0,58
IL-6 (nt565)	GG	74 (66,1%)	245 (56%)	0,05
	GA	34 (30,3%)	153 (34,9%)	0,36
	AA	4 (3,6%)	40 (9,1%)	0,06

IL-10 (-1082)	GG	8 (7,2%)	71 (16,2%)	0,01	0,39 (0,18- 0,85)
	GA	64 (57,1%)	220 (50,2%)	0,19	
	AA	40 (35,7%)	147 (33,6%)	0,66	
IL-10 (-819)	CC	64 (57,1%)	250 (57%)	0,99	
	CT	39 (34,8%)	167 (38,2%)	0,51	
	TT	9 (8,1%)	21 (4,8 %)	0,18	
IL-10 (-592)	CC	64 (57,1%)	250 (57%)	0,99	
	CA	39 (34,8%)	167 (38,2%)	0,51	
	AA	9 (8,1%)	21 (4,8 %)	0,18	

ΠΙΝΑΚΑΣ 23. Συχνότητες απλοτύπων στους ασθενείς με ΟΝ και στα υγιή άτομα

Κυτταροκίνες	Θέση	Γονότυπος	Ασθενείς	CONTROLS	P- value	OR (95% CI)
TNFα	(-308-238/ -308-238)	GG/GG	82 (73,2%)	360 (82,2%)	0,03	0,59 (0,36-0,96)
		GG/AG	17 (15,2%)	58 (13,2%)	0,59	
		GG/GA	12 (10,8%)	9 (2,1%)	0,00	5,72 (2,34-13,94)
		AG/AG	1 (0,8%)	11 (2,5%)	0,31	
IL-10	(-1082-819/ -1082-819)	GC/AC	43 (38,3%)	110 (25,1%)	0,00	1,85 (1,19-2,87)
		GC/AT	21 (18,7%)	110 (25,1%)	0,15	
		GC/GC	8 (7,2%)	71 (16,2%)	0,01	0,39 (0,18-0,85)
		AC/AT	18 (16,1%)	57 (13,1%)	0,40	
		AC/AC	13 (11,6%)	69 (15,7%)	0,27	
		AT/AT	9 (8,1%)	21 (4,8%)	0,18	
IL-10	(-1082-592/ -1082-592)	GC/AC	43 (38,3%)	110 (25,1%)	0,00	1,85 (1,19-2,87)
		GC/AA	21 (18,7%)	110 (25,1%)	0,15	
		GC/GC	8 (7,2%)	71 (16,2%)	0,01	0,39 (0,18-0,85)
		AC/AA	18 (16,1%)	57 (13,1%)	0,40	
		AC/AC	13 (11,6%)	69 (15,7%)	0,27	
		AA/AA	9 (8,1%)	21 (4,8%)	0,18	
IL-10	(-1082-819-592/ -1082-819-592)	GCC/ACC	43 (38,3%)	110 (25,1%)	0,00	1,85 (1,19-2,87)
		GCC/ATA	21 (18,7%)	110 (25,1%)	0,15	
		ACC/ATA	18 (16,1%)	57 (13,1%)	0,40	0,39 (0,18-0,85)
		ACC/ACC	13 (11,6%)	69 (15,7%)	0,27	
		ATA/ATA	9 (8,1%)	21 (4,8%)	0,18	
		GCC/GCC	8 (7,2%)	71 (16,2%)	0,01	

OR: Odds Ratio, **CI:** Confidence Interval

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεονέκρωση της μηριαίας κεφαλής είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που επηρεάζει κυρίως τα νεαρά άτομα, οδηγώντας στην καταστροφή του υποχόνδριου οστού, σε καθίζηση της μηριαίας κεφαλής και τελικά σε καταστροφή της άρθρωσης του ισχίου. Η ισορροπία μεταξύ των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, η οποία είναι πολύ σημαντική για την οστική αναδόμηση, διαταράσσεται σημαντικά μέσα στον νεκρωτικό ιστό και τελικά η μηριαία κεφαλή οδηγείται σε καθίζηση. Αυτό ακτινολογικά είναι εμφανές σε σχετικά προχωρημένο στάδιο της οστεονέκρωσης της μηριαίας κεφαλής, όπου εμφανίζεται το σημείο της ημισεληνοειδούς γραμμής στο νεκρωτικό υποχόνδριο οστό, η καθίζηση του υποχόνδριου οστού και η απώλεια της σφαιρικότητας της μηριαίας κεφαλής σε τελικό στάδιο ⁽¹⁾.

Η ανάπτυξη, η εξέλιξη και η διατήρηση του οστού είναι αυστηρά ελεγχόμενες διαδικασίες. Το επίπεδο της οστικής μάζας αντανakλά την ισορροπία μεταξύ απορρόφησης οστού και δημιουργίας νέου, η οποία σε κυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνει τον συντονισμένο έλεγχο των κυττάρων που απορροφούν οστό (οστεοκλάστες) και εκείνων που είναι υπεύθυνα για την αναδόμησή του (οστεοβλάστες) ⁽⁷³⁾.

Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία οστεοβλαστών και οστεοκλαστών παίζουν διάφορα μόρια: η OPG, το RANK και το RANKL στην ωρίμανση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών και οι Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (BMPs) και οι μεταγραφικοί τους παράγοντες (RUNX2,) που παίζουν ρόλο στη λειτουργία των οστεοβλαστών, καθώς και διάφορα σηματοδοτικά μόρια που παίρνουν μέρος στην οστεογενετική δραστηριότητα ⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾. Έτσι λοιπόν πέρα από τη μελέτη της

έκφρασης αυτών των γονιδίων στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες, έχει ενδιαφέρον και ο τρόπος με τον οποίο αυτοί οι δυο κυτταρικοί τύποι συνεργάζονται για να διατηρήσουν την οστική μάζα αλλά και για να δημιουργήσουν νέα.

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την έκφραση των OPG, RANK και RANKL αλλά και των BMP2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 σε μηριαίες κεφαλές ασθενών με οστεονέκρωση, όπου είναι γνωστή η διαταραχή της ισορροπίας οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Η έρευνά μας βασίστηκε στην παράλληλη μελέτη τόσο των επιπέδων του mRNA όσο και των αντίστοιχων πρωτεϊνών από τη φυσιολογική αλλά και τη νεκρωτική περιοχή των 42 μηριαίων κεφαλών που συλλέχθηκαν. Επίσης μελετήθηκε η παρουσία συγκεκριμένων πολυμορφισμών των κυτταροκινών σε 112 δείγματα αίματος ασθενών με ON και 438 υγιών ατόμων.

OPG-RANK-RANKL

Η OPG είναι ο καταστολέας της ωρίμανσης των οστεοκλαστών, ενώ το RANK και ο προσδέτης του (RANKL) είναι τα βασικά μόρια για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ οστεοβλαστών-οστεοκλαστών. Επίσης, το RANK και το RANKL είναι υπεύθυνα για την ωρίμανση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών ⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση RANK και RANKL είναι υπεύθυνη για την έναρξη της σηματοδότησης και της έκφρασης ενός γονιδιακού καταρράκτη που οδηγεί στη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των πρώιμων οστεοκλαστών σε ώριμους οστεοκλάστες ικανούς για απορρόφηση οστού ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾.

Αρκετές έρευνες έχουν συνδέσει την έλλειψη ισορροπίας μεταξύ RANK, RANKL και OPG με διάφορες σκελετικές διαταραχές. Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν OPG στην κυκλοφορία του αίματός τους και ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε

ανασυνδυασμένη OPG, εμφάνισαν αυξημένη οστική πυκνότητα και οστεοπέτρωση. Αντίθετα, η αποσιώπηση του γονιδίου της OPG είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πρώιμης οστεοπόρωσης ^(73,88-90). Η αλληλεπίδραση RANK-RANKL περιλαμβάνει την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το MAPK, το PI3K και το NF-κΒ μονοπάτι, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα πολύπλοκο ιστό για την ενεργοποίηση της οστεοκλαστογένεσης ^(71,99-104). Όταν αποσιωπήθηκε το γονίδιο του RANKL σε ποντίκια, αυτά εμφάνισαν οστεοπέτρωση και ελαττωματική ανάπτυξη των δοντιών ⁽¹⁰⁵⁾. Επίσης, όταν αποσιωπήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το RANK, τα ποντίκια παρουσίασαν τον ίδιο φαινότυπο με τα RANKL-/- ποντίκια, δηλαδή εμφάνισαν ελαττωματική ανάπτυξη των δοντιών και παντελή έλλειψη οστεοκλαστών ^(91,92). Αντίθετα, ο διπλασιασμός στο σηματοδοτικό πεπτίδιο του RANK έχει συνδεθεί με τέσσερις διαφορετικές οικογένειες που εμφάνισαν οστεόλυση ή τη νόσο του Paget ^(71,93). Ακόμη, δυο μεταλλάξεις προσθήκης στο εξώνιο 1 του RANK είχαν ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του γονιδίου και επίσης την αύξηση της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού NF-κΒ από το RANK. Σε ασθενείς με επεκτατική σκελετική υπερφωσφατασία, μια γνωστή μεταβολική ασθένεια, μια προσθήκη στο εξώνιο 1 του RANK έχει χαρτογραφηθεί ως αιτία της ασθένειας. Τελευταία, πολλές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την περιοχή πρόσδεσης της OPG έχουν βρεθεί σε ασθενείς με τη νόσο του Paget ^(94,96).

Στην παρούσα μελέτη, υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα mRNA της OPG μεταξύ της φυσιολογικής και της νεκρωτικής περιοχής των μηριαίων κεφαλών, με πιο υψηλή έκφραση στη νεκρωτική περιοχή, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η έκφραση της OPG πρωτεΐνης όμως ήταν σχεδόν παρόμοια

και στις δύο περιοχές της μηριαίας κεφαλής. Όσον αφορά στον αριθμό των mRNA μεταγράφων του RANK και του RANKL υπήρξαν αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στη φυσιολογική και τη νεκρωτική περιοχή, με αυξημένη έκφραση στην νεκρωτική περιοχή και μάλιστα για το RANKL έως και 3 φορές υψηλότερη από τη φυσιολογική. Παρόμοια όμως με τα επίπεδα έκφρασης της OPG πρωτεΐνης, ούτε και η RANKL πρωτεΐνη παρουσίασε διαφοροποίηση της έκφρασης μεταξύ φυσιολογικής και νεκρωτικής περιοχής, ενώ τέλος τα επίπεδα της πρωτεΐνης RANK δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθούν (ήταν ιδιαίτερα χαμηλή ακόμη και στο επίπεδο του mRNA). Γενικά τα επίπεδα τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης του RANKL ήταν πολύ χαμηλά σε σύγκριση με την OPG.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, τα επίπεδα του mRNA της OPG είναι υψηλότερα στη νεκρωτική σε σχέση με τη φυσιολογική περιοχή των μηριαίων κεφαλών. Αυτό το αποτέλεσμα σε συνδυασμό με την μακροσκοπική εικόνα του ιδιαίτερος σκληρού οστού στη νεκρωτική περιοχή, καθώς και με το γεγονός πως η υπερέκφραση της OPG ή η χορήγηση ανασυνδυασμένης OPG στα ποντίκια οδηγεί σε οστεοπέτρωση ⁽⁹²⁾, οδηγεί στο ερώτημα αν η αυξημένη OPG (αν και μη στατιστικώς σημαντική) είναι αποτέλεσμα της οστεονέκρωσης στη μηριαία κεφαλή ή αν είναι αρχικός παράγοντας και υπεύθυνος για το σχηματισμό αυτής της πολύ σκληρής οστικής περιοχής, που οδηγεί σε νέκρωση.

Η ανάλυση με Western blot δεν έδειξε κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανάμεσα στη φυσιολογική και τη νεκρωτική περιοχή, αν και σε επίπεδο mRNA υπήρξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δυο περιοχές. Παρατηρήσαμε πως στην πλειονότητα των δειγμάτων από τη φυσιολογική περιοχή, τα επίπεδα

πρωτεϊνών βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα επίπεδα του mRNA του κάθε γονιδίου. Σε αντίθεση, στα περισσότερα δείγματα της νεκρωτικής περιοχής, τα επίπεδα mRNA δεν επιβεβαίωναν πάντα ισότιμη σύνθεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών, και το αντίθετο. Για την ανομοιογένεια αυτή, υπάρχουν μια σειρά εξηγήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν κυτταρική διαφοροποίηση μέσα στην μηριαία κεφαλή, διαφορετική ζωτικότητα των κυττάρων κτλ. Παρόλα αυτά όμως, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποτελούν ισχυρή ένδειξη της δράσης μετα-μεταγραφικών μηχανισμών οι οποίοι συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης των OPG και RANKL στη νεκρωτική περιοχή των μηριαίων κεφαλών.

Οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες είναι δυο πολύ σημαντικοί τύποι κυττάρων για την ομοιοστάση και την αναδόμηση του οστού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η OPG, το RANK και το RANKL είναι γονίδια κλειδιά για την ωρίμανση και τη λειτουργικότητα των οστεοκλαστών. Συμπερασματικά λοιπόν, η παρούσα μελέτη ανέδειξε υψηλότερα επίπεδα του mRNA της OPG στην νεκρωτική περιοχή, τα οποία ως γνωστόν συνδέονται με μειωμένη οστεοκλαστική δραστηριότητα. Επίσης, οι διαφορές στα επίπεδα τόσο του RANK όσο και του RANKL ήταν σημαντικές μεταξύ της φυσιολογικής και της νεκρωτικής περιοχής (υψηλότερα στη νεκρωτική, ιδίως στο RANKL). Τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν ένδειξη του ρόλου της OPG, του RANK και του RANKL στην εξέλιξη της διαδικασίας της οστικής αναδόμησης στην νεκρωτική περιοχή, μέσω της διατάραξης της ισορροπίας οστεοβλαστών/οστεοκλαστών.

BMPs

Οι BMPs είναι μια ομάδα 30 πρωτεϊνών, γνωστών για την οστεοεπαγωγική τους ικανότητα, οι οποίες έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών. Είναι μέλη της υπέρ-οικογένειας TGF-β και δρουν μέσω της πρόσδεσής τους σε ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο διαμεμβρανικών υποδοχέων (BMP υποδοχείς I και II). Συγκεκριμένα ο κύριος μηχανισμός σηματοδότησης αποτελείται από έναν ετεροδιμερή υποδοχέα (τύπου I και II) και από μια οικογένεια κινασών (Smads) που μεταφέρουν το σήμα εντός του πυρήνα^(143,147-150). Οι BMPs είναι η μεγαλύτερη ομάδα πρωτεϊνών της οικογένειας TGF-β. Είναι γνωστές για τη συμμετοχή τους σε αξιόλογες εργασίες όπως η σηματοδότηση κατά την εμβρυογένεση καθώς επίσης και η διατήρηση και επιδιόρθωση των οστών και άλλων ιστών στα ενήλικα άτομα. Τα μέλη της μεγάλης οικογένειας των BMPs συνδέονται στενά μεταξύ τους λόγω της μεγάλης ομοιότητας των αλληλουχιών τους, ένα γεγονός που εξηγεί τη συμμετοχή τους σε μεγάλο αριθμό βιολογικών λειτουργιών. Τα μέλη της οικογένειας φέρουν ένα γνωστό μοτίβο 7 κυστεϊνικών καταλοίπων στο ώριμο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η δράση των BMPs που εκκρίνονται μπορεί επίσης να διαφοροποιηθεί από εξωκυτταρικούς ανταγωνιστές^(135,137,138). Οι BMPs με τη μεγαλύτερη οστεοεπαγωγική ικανότητα είναι οι BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 και BMP-9. Από αυτές, οι BMP-2 και BMP-4 είναι στενά συγγενικές, και οι BMP-5 BMP-6 και BMP-7 είναι επίσης πολύ συγγενικές και όχι πολύ μακριά από τις BMP-2 και BMP-4. Όλες αυτές οι BMPs εκτός από την BMP-7 έχουν εντοπιστεί σε περιοχές οστεογένεσης^(136,216,217).

Για τους παραπάνω λόγους στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε την έκφραση των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) στη νεκρωτική και φυσιολογική περιοχή της μηριαίας κεφαλής ασθενών με ON που υποβλήθηκαν σε αρθροπλαστική ισχίου (στάδια III-VI κατά ARCO). Η ανάλυση μας βασίστηκε σε παράλληλη εκτίμηση των επιπέδων των mRNA των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 καθώς και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο στη φυσιολογική και όσο και στη νεκρωτική περιοχή των μηριαίων κεφαλών από 42 ασθενείς με ON. Τα επίπεδα mRNA των BMPs ήταν διαφορετικά στις δυο περιοχές. Η BMP-2, η κυρίως οστεοεπαγωγική πρωτεΐνη ^(135,137,217), έδειξε υψηλότερα επίπεδα mRNA από τις BMP-4 και BMP-6, τόσο στη φυσιολογική όσο και στη νεκρωτική περιοχή των μηριαίων κεφαλών, αν και το πρότυπο έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων ήταν διαφορετικό ανάμεσα στις δυο περιοχές.

Αν και τα επίπεδα mRNA της BMP2 στη φυσιολογική περιοχή είναι υψηλότερα από τη νεκρωτική, η αντίστοιχη BMP-2 πρωτεΐνη εμφανίζεται σχεδόν σε παρόμοια επίπεδα στις δυο περιοχές. Για το λόγο αυτό η έκφρασή της συνεχίζει να είναι σημαντική τόσο στη φυσιολογική όσο και στη νεκρωτική περιοχή. Αυτό το γεγονός συμφωνεί με πρόσφατες έρευνες στις οποίες προσπάθησαν να κατατάξουν τις BMPs με βάση την οστεοεπαγωγική τους ικανότητα σε πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα (C3H10T1/2) και οστεοβλάστες (C2C12, TE-85), μελετώντας την επαγωγή αλκαλικής φωσφατάσης, οστεοκαλσίνης και της επιμετάλλωσης των οστών. Αυτές οι μελέτες έδειξαν πως οι BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 και BMP-9 είναι πρωτεΐνες που αυξάνουν είτε την αλκαλική φωσφατάση είτε την οστεοκαλσίνη στα πολυδύναμα κύτταρα ή στους πρώιμους οστεοβλάστες, ελέγχοντας έτσι την

αναδόμηση του οστού και διατήρησή του. Ειδικότερα ο Chen και οι συνεργάτες του πρότειναν πως η BMP-2 είναι η κυρίως οστεοεπαγωγική πρωτεΐνη ακολουθούμενη από τις BMP-4, BMP-6 και BMP-9 ⁽²¹⁷⁾, ένα ιεραρχικό μοντέλο που επιβεβαιώθηκε και από τη δική μας έρευνα αν και δεν μελετήσαμε την έκφραση της BMP-9.

Τα επίπεδα των mRNA των BMP-4 και BMP-6 ήταν σχεδόν παρόμοια και στις δυο περιοχές (φυσιολογική και νεκρωτική), αν και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, παρατηρήθηκε μια ενδιαφέρουσα αύξηση των BMP-4 και BMP-6 στη νεκρωτική περιοχή. Αυτή η παρατήρηση εγείρει το ερώτημα εάν αυτές οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στη νεκρωτική περιοχή επηρεάζοντας την αγγείωση ή την αναδόμηση του οστού στη συγκεκριμένη περιοχή. Έρευνες σχετικά με την BMP-4 σε εμβρυικά κύτταρα και ιστούς έχουν δείξει πως ο ρόλος της BMP-4 σχετίζεται όχι μόνο με την ανάπτυξη του σκελετού και των δοντιών αλλά και με διαφοροποίηση των νευρώνων και την απόπτωση ⁽²¹⁸⁾. Ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο της BMP-4 δεν είναι βιώσιμα και έμβρυα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο της BMP-4 εμφανίζουν μικρή ή ανύπαρκτη μεσοδερμική διαφοροποίηση ⁽²¹⁹⁾. Αντίθετα, τα ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της BMP-6 είναι βιώσιμα και δεν εμφανίζουν ελαττώματα σε ιστούς που είναι γνωστό πως εκφράζουν την BMP-6. Η BMP-6 εκφράζεται κυρίως σε υπερτροφικούς χόνδρους και καθώς η BMP-2 και η BMP-6 συν-εκφράζονται σε αυτό το είδος ιστού, η BMP-2 μπορεί να αναπληρώνει την απώλεια της στα BMP-6^{-/-} ποντίκια ^(135,220). Αυτές οι έρευνες δείχνουν το σημαντικό ρόλο που παίζουν αυτές οι πρωτεΐνες στον οστικό ιστό και επίσης εξηγούν το γεγονός πως 23 από τα 42 νεκρωτικά δείγματα της έρευνάς μας έχουν ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα BMP-4 και

BMP-6 πρωτεΐνης, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, και επίσης την ίδια στιγμή εμφανίζουν πολύ χαμηλά επίπεδα BMP-2 πρωτεΐνης. Καθώς, οι BMP-2 και BMP-6 πρωτεΐνες συν-εκφράζονται και η BMP-2 μπορεί να αναπληρώσει λειτουργικά την BMP-6 στα BMP-6^{-/-} ποντίκια ^(135,220), τίθεται το ερώτημα αν οι δυο αυτές πρωτεΐνες έχουν συνεργικό ρόλο ή αν η BMP-6 πρωτεΐνη αντικαθιστά την BMP-2 στο νεκρωτικό οστό. Το παραπάνω μάλιστα γεγονός θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός της ταυτόχρονης αύξησης της BMP-4 & BMP-6 και της μείωσης της BMP-2 πρωτεΐνης στη νεκρωτική σε σχέση με την φυσιολογική περιοχή σε 23 από τις μηνιαίες κεφαλές της συγκεκριμένης έρευνας.

Σε μια άλλη μελέτη, ερευνήθηκε ο ρόλος της συνδυασμένης χρήσης των BMP-2, BMP-5 και BMP-6 στη δημιουργία οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η BMP-2 μόνη της ή σε συνδυασμό με την BMP-5 προάγει σημαντικά την οστεοκλαστογένεση. Η ταυτόχρονη παρουσία των BMP-2, BMP-5 και BMP-6 δεν βελτίωσε το αποτέλεσμα, το οποίο μας οδηγεί σε σκέψη για το συνεργικό ρόλο συγκεκριμένων BMPs καθώς και για τον ρόλο της BMP-6 ειδικά στην οστεοκλαστογένεση ⁽²²¹⁾. Ακόμη, σε κάποιες άλλες έρευνες έδειξαν ότι η BMP-6 εμποδίζει την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών του μυελού, την επιβίωσή των πρόδρομων μυελικών κυττάρων και την *in vitro* αγγειογένεση ⁽²²²⁾. Με βάση τα αποτελέσματά μας, η BMP-6 αυξάνεται ιδιαίτερα στο νεκρωτικό οστό, μια περιοχή με μεγάλη ανάγκη από πλήρως λειτουργική οστεοκλαστογένεση και αγγειογένεση για την αναδόμηση του οστού. Δεν υπάρχουν προηγούμενα στοιχεία σε έρευνες σχετικά με την έκφραση της BMP-6 και το ρόλο της στην ON και έτσι τα

αποτελέσματά μας υποστηρίζουν έναν ενισχυτικό ρόλο της BMP-6 στην οστική αναδόμηση των οστών σε συνδυασμό με το ρόλο της σε άλλα κύτταρα και ιστούς .

Οι BMP-2 και BMP-7 είναι οι πιο καλά μελετημένες από τις BMPs εξαιτίας των πιθανών ρόλων τους στην αγγειακή αποτιτάνωση (vascular calcification). Όμως η μελέτη μας έδειξε πολύ χαμηλά επίπεδα του γονιδίου BMP-7 και των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης τόσο στη φυσιολογική όσο και στη νεκρωτική περιοχή των μηριαίων κεφαλών. Οι BMP-2 και BMP-7 έχουν και οι δυο πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστών. Ποντίκια που έχουν τροποποιηθεί γενετικά έτσι ώστε να μην φέρουν το γονίδιο της BMP-2 πεθαίνουν μεταξύ της 7-10^{ης} μέρας της κυοφορίας εξαιτίας ατελειών στην καρδιά πριν ακόμη από το σχηματισμό των οστών ⁽²²³⁾. Τα ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της BMP-7 πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση με σκελετικές ανωμαλίες και μειωμένη επιμετάλλωση στα πλευρά, το κρανίο και τα οστά των ποδιών, καθώς και νεφρική δυσπλασία και οφθαλμικές ατέλειες ^(224,225). Στο σχηματισμό των οστών, αυτές οι δυο BMPs δρουν μέσω της επαγωγής της έκφρασης των σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων Runx2 και Osterix στα μεσεγχυματικά κύτταρα, οδηγώντας τα έτσι να διαφοροποιηθούν σε ώριμους οστεοβλάστες ⁽¹³⁶⁾. Αυτές οι δύο BMPs (BMP-2 και BMP-7) χρησιμοποιούνται σε ασθένειες όπως η οστεοπόρωση και η ON με θετικά αποτελέσματα ⁽²²⁶⁻²²⁸⁾, αν και τα ευρήματά μας δεν μπορούν να υποστηρίξουν αυτά τα δεδομένα, τουλάχιστον για την ON, όπου τα αποτελέσματά μας δείχνουν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της BMP-7.

Επιπλέον, διαφορές εμφανίστηκαν μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των BMPs mRNA και πρωτεϊνών στη νεκρωτική περιοχή των μηριαίων κεφαλών, ενώ αντίθετα τα

επίπεδα έκφρασης mRNA-πρωτεΐνης ήταν ανάλογα στη φυσιολογική περιοχή. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης των BMPs στη φυσιολογική σε σχέση με τη νεκρωτική περιοχή, ειδικότερα για την BMP-4 και την BMP-6, οι οποίες εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένες στο νεκρωτικό οστό. Υπάρχει ένας αριθμός πιθανών εξηγήσεων για τις διαφορές αυτές όπως η κυτταρική ετερογένεια στα διάφορα τμήματα των μηριαίων κεφαλών και η διαφορετική κυτταρική βιωσιμότητα. Ανεξαρτήτως όμως των παραπάνω διαφορών, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να εκτιμηθούν ως μια πρώτη απόδειξη της δράσης μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών που θα μπορούσαν να ελέγχουν την έκφραση των BMPs mRNA στη νεκρωτική περιοχή.

Για το λόγο αυτό, η κατανόηση των εμπλεκόμενων μοριακών μηχανισμών που επηρεάζουν την έκφραση αυτών των μορίων και η πιθανή συνεργασία αυτών των μορίων μεταξύ τους, θα μπορούσε να συμβάλλει στην αξιοποίησή τους στην πρόγνωση και τη θεραπεία οστικών νόσων όπως η ON.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως η οστεονέκρωση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, της οποίας η παθογένεια περιλαμβάνει ισχαιμικά γεγονότα ακολουθούμενα από το θάνατο του οστού και των συστατικών του μυελού των οστών^(51,59). Για τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο οι κυτταροκίνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη και τη θεραπεία της οστεονέκρωσης, είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί ο ρόλος αυτών των μορίων στην ανάπτυξη της ασθένειας, καθώς και να εκτιμηθεί ο ρόλος τους στα υγιή άτομα⁽⁸⁶⁾. Έχει γίνει αρκετή προσπάθεια χρησιμοποιώντας τόσο in vivo όσο και in vitro μοντέλα για την

κατανόηση της επίδρασης που έχουν οι κυτταροκίνες στους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες, καθώς και των τελικών επιπτώσεων στην απορρόφηση του οστού και το σχηματισμό νέου. Είναι πλέον δεδομένο ότι οι δράσεις αυτών των μορίων είναι αλληλοσυνδεόμενες. Η οστεοκλαστική δραστηριότητα, και επομένως η απορρόφηση του οστού, φαίνεται πως ρυθμίζεται από κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τους οστεοβλάστες. Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια των κυτταροκινών μπορούν να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση της μεταγραφικής ρύθμισης και τελικά σε διαφοροποιημένη έκφραση των κυτταροκινών. Έχει μάλιστα βρεθεί πως τα διάφορα αλληλόμορφα των κυτταροκινών θα μπορούσαν να έχουν φαινοτυπικό αποτέλεσμα και μάλιστα να επηρεάσουν το μικροπεριβάλλον του οργανισμού ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾.

Για να μελετήσουμε λοιπόν τη συχνότητα συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα γονίδια των κυτταροκινών μεταλλάγών μελετήσαμε 112 άτομα διαγνωσμένα με ΟΝ και 438 υγιή άτομα ηλικίας μεταξύ 20-50 ετών (Καυκάσιοι από την Ελλάδα και την Κύπρο). Μελετήσαμε τη συχνότητα αλληλομόρφων και γονοτύπων σε 13 κυτταροκίνες στους ασθενείς με ΟΝ και στην ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα μελετήσαμε πολυμορφισμούς στα γονίδια των IL-1α, TGF-β, IL-10 και TNF-α κυτταροκινών που θα μπορούσαν να συνδεθούν με την παθογένεια πολύπλοκων ασθενειών, όπως η οστεονέκρωση. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να φανεί χρήσιμο στην πρόγνωση και τη θεραπεία ασθενών που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο, όπως οι χρόνιοι χρήστες κορτικοστεροειδών ⁽²³⁰⁾.

Οι συχνότητες των πολυμορφισμών των κυτταροκινών στα δείγματά μας, που είναι όλοι Καυκάσιοι από την Ελλάδα και την Κύπρο, βρίσκονται σε αναλογία με τα

ευρήματα των Costeas et al. εκτός από τις συχνότητες των πολυμορφισμών στα κωδικόνια 10 και 20 του TGF-β⁽²²⁹⁾.

Η ιντερλευκίνη 1-α (IL-1α) είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων που συνδέονται με την φλεγμονή και ανοσοποίηση. Πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο της IL-1α έχουν συνδεθεί με προδιάθεση σε φλεγμονώδεις ασθένειες. Στο γονίδιο της IL-1α έχουν ταυτοποιηθεί ένας πολυμορφισμός στη θέση -889 (rs 1800587) στην 5'- περιοχή και ένας στη θέση +4845 (rs17561), ο οποίος περιλαμβάνει την αντικατάσταση του 114^{ου} αμινοξέος της IL-1α. Σχετικά πρόσφατα έχει δημοσιευτεί πως ο πολυμορφισμός στη θέση -889 συνδέεται με προδιάθεση σε φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η περιοδοντίτιδα⁽¹⁹¹⁾, η νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα⁽¹⁹²⁾, το Alzheimer⁽¹⁹³⁾ η προ-εκλαμψία⁽¹⁹⁴⁾ και ο ερυθματώδης λύκος⁽¹⁹⁵⁾ και ότι ο πολυμορφισμός θα μπορούσε να επηρεάσει την απόκριση στη θεραπεία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την ανοσοανεπάρκεια σε μόλυνση από ιούς^(196,197). Στην παρούσα εργασία⁽²³⁰⁾, η συχνότητα του γονοτύπου CT στην πολυμορφική θέση -889 ήταν υψηλότερη στους ασθενείς από ότι στην ομάδα των υγιών ατόμων. Είναι γνωστό πως το αλληλόμορφο T σε αυτή τη θέση αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης, οπότε οι ετεροζυγώτες (TC) έχουν υψηλότερη πρωτεϊνική σύνθεση από ότι οι ομοζυγώτες (CC) για το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Ο TGF-β είναι μια πολυπαραγοντική κυτταροκίνη που ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας κυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro. Ο TGF-β επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την κυτταρική μετακίνηση, τη λειτουργία των ανοσοποιητικών κυττάρων και της

παραγωγής εξωκυτταρικής ουσίας. Η παραγωγή του TGF-β διαφέρει από άτομο σε άτομο και εξαρτάται μερικώς από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο του TGF-β σε διάφορες θέσεις. Είναι γνωστό ότι το μονοπάτι του TGF-beta ρυθμίζει την ανάπτυξη διαφόρων τύπων ασθενειών όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρυνση και οι ασθένειες του ανοσοποιητικού ^(231,332). Τα αποτελέσματα μας δείχνουν υψηλότερο ποσοστό των ετεροζυγωτών για τον πολυμορφισμό (GC) στο κωδικόνιο 25 του TGF-β στην ομάδα των υγιών ατόμων. Η μεταλλαγή G→C (rs1800471) έχει συνδεθεί με μειωμένη έκφραση του TGF-β. Για το λόγο αυτό, οι CC ομοζυγώτες στα υγιή άτομα (που εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα σε σχέση με τους ασθενείς) θα έχουν χαμηλότερη παραγωγή TGF-β, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να επάγει την ενεργοποίηση των BMPs και να βοηθήσει στην αναδόμηση των οστών, καθώς είναι γνωστό ότι ο TGF-β ανταγωνίζεται τις BMPs στην ενεργοποίηση των οστεοκλαστών ⁽²³³⁾. Αντίθετα, στους ασθενείς όπου οι GG έχουν τη μεγαλύτερη συχνότητα (84%), έχουν και αυξημένη παραγωγή TGF-β, ο οποίος περιορίζει τη δράση των BMPs.

Η IL-10 είναι μια αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, ικανή να εμποδίζει τη σύνθεση άλλων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-2, IL-3 και TNF-α ^(234,235). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο απλότυπος GCC προερχόμενος από τις πολυμορφικές θέσεις -1082, -819 και -592 του γονιδίου της IL-10 (rs 1800896, rs1800871 και rs1800872, αντίστοιχα) συνδέεται με την ομάδα των υγιών ατόμων. Αυτός ο απλότυπος είναι υπεύθυνος για την υψηλή παραγωγή IL-10, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας ευρήματα. Επίσης, ο απλότυπος GC/GC στις θέσεις (-1082/ -819) και (-1082/ -592) της IL-10 εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα υγιή άτομα και έχει συνδεθεί με υψηλά επίπεδα της IL-10. Έχοντας

υπόψη τον κατασταλτικό ρόλο της IL-10 στις άλλες κυτταροκίνες, μπορούμε να υποθέσουμε πως ειδικά η ομάδα των υγιών ατόμων θα μπορούσε να επωφεληθεί από την αυξημένη IL-10, καθώς αυτό το μόριο έχει ένα περιοριστικό ρόλο στις υπόλοιπες κυτταροκίνες και την επίδρασή τους. Αντίθετα στους ασθενείς, όπου εμφανίζονται υψηλότερες οι συχνότητες των υπολοίπων γονοτύπων που αντιστοιχούν σε χαμηλότερα επίπεδα IL-10, περιορίζεται ο ρυθμιστικός ρόλος της IL-10.

Ο TNFα είναι μια πολυδύναμη κυτταροκίνη που απελευθερώνεται από τα μακροφάγα κατά την ανοσοποιητική αντίδραση, ρυθμίζοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση και την ανοσοποιητική απάντηση μέσω της ενεργοποίησης της έκφρασης άλλων κυτταροκινών. Είναι γνωστό πως ο TNFα δρα στους οστεοβλάστες ή τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών για τη σύνθεση και την απελευθέρωση κυτταροκινών, όπως οι IL-3, IL-6, IL-11 και IL-12 των οποίων ο ρόλος είναι άμεσα συνδεδεμένος με την ανάπτυξη και την ωρίμανση των οστεοκλαστών ⁽¹⁸¹⁾. Ειδικότερα, ο TNFα δρα ως ένας καταλυτικός σκελετικός παράγοντας που ενεργοποιεί την οστεοκλαστογένεση παρεμποδίζοντας τη λειτουργία των οστεοβλαστών ⁽²³⁶⁾. Ο TNFα και το RANKL είναι κυτταροκίνες που απαντώνται σε αφθονία σε περιοχές φλεγμονώδους ενεργοποίησης των οστών και καθώς είναι ικανοί οστεοκλαστικοί παράγοντες και δρουν μέσω κοινών μονοπατιών, θεωρείται πως κάτω από προ-φλεγμονώδεις συνθήκες οι RANKL και TNF-α θα μπορούσαν να συνεργάζονται αρμονικά για να επάγουν την οστεοκλαστογένεση μέσω συνεργαζόμενων μηχανισμών ⁽²³⁷⁾. Το υψηλότερο ποσοστό του γονοτύπου GA στην πολυμορφική θέση -238 του TNF παρατηρήθηκε στους ασθενείς καθώς και οι

απλότυποι GG/GA στις θέσεις -308 και -238. Η μετάλλαξη G→A στη θέση -238 (rs361525) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε πως αυτή η αύξηση οδηγεί σε ενεργοποίηση της ανάπτυξης των οστεοκλαστών και διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών.

Έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια in vivo και in vitro για την κατανόηση της επίδρασης των κυτταροκινών στους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες καθώς και στη απορρόφηση του οστού και το σχηματισμό νέου ⁽²³⁰⁾. Είναι πλέον προφανές πως οι δράσεις αυτών των δυο κυτταρικών τύπων αλληλοσυνδέονται και πως η ισορροπία τους επηρεάζει άμεσα την αναδόμηση του οστού. Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια των παραπάνω κυτταροκινών μπορούν να επηρεάσουν αυτή την ισορροπία. Η παρουσία ενός ή και η ταυτόχρονη παρουσία περισσότερων από τους παραπάνω πολυμορφισμούς θα μπορούσε επιπλέον να αυξήσει τον κίνδυνο για εμφάνιση άσηπτης νέκρωσης, ειδικότερα σε άτομα που είναι χρόνιοι χρήστες κορτικοστεροεδών. Η χρήση των κυτταροκινών στη πρόγνωση και τη θεραπεία της οστεονέκρωσης φαίνεται ελπιδοφόρα, αν και περαιτέρω μελέτες για την εφαρμογή και την ασφάλεια της χρήσης τους είναι απαραίτητες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Urbaniak J.R., Jones J.P.** "Osteonecrosis: etiology, diagnosis and treatment".
In: Urbaniak JR, Jones JP, editors. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1997, 43-65
- [2] **Mankin HJ.** Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). N Engl J Med. 1992, 326(22):1473-1479
- [3] **Zalavras C, Dailiana Z, Elisaf M, Bairaktari E, Vlachogiannopoulos P, Katsaraki A, Malizos KN.** Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. Eur J Clin Invest. 2000, 30(3):215-21
- [4] **Malizos KN, Karantanas AH, Varitimidis SE, Dailiana ZH, Bargiotas K, Maris T.** Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment. Eur J Radiol. 2007, 63(1):16-28
- [5] **Paget J.** Mortification Lecture on Surgical Pathology. 1860, Lecture XIX:301-302
- [6] **Twynham GE.** A case of Caisson Disease. Br Med J 1888, 1:190-191
- [7] **Phemister DB.** Necrotic bone and the subsequent changes which it undergoes. JAMA. 1915, 64:211-216
- [8] **Phemister DB.** The recognition of dead bone based on pathological and X-ray studies. Ann Surg. 1920, 72:466-485

- [9] **Axhausen G.** Die nekrose des proximalen Bruhstücks beim Schenkelhasbuh und ihre Bedeutung für das Hüftgelenk. Langerbeck Arch Klin Chir. 1922, 120:325-346
- [10] **Jones JP Jr, Jameson RM, Engleman EP.** Abstract: Alcoholism, fat embolism and avascular necrosis. J Bone Joint Surg. 1968, 50A:1065
- [11] **Pietrogrande V, Mastromarino R.** Osteopat da prolungata trattamento cortisonico. Ortop Traum Appar Mat. 1957, 25:791-810
- [12] **Madell SH, Freeman LM.** Avascular necrosis of bone in Cushing's syndrome. Radiology. 1964, 83:1068-1070
- [13] **Catto M.** The histological appearances of late segmental collapse of the femoral head after transcervical fracture. J Bone Joint Surg Br. 1965, 47(4):777-791
- [14] **Catto M.** A histological study of avascular necrosis of the femoral head after transcervical fracture. J Bone Joint Surg Br. 1965, 47(4):749-776
- [15] **Kruczynski J.** Avascular necrosis of the proximal femur in developmental dislocation of the hip. Incidence, risk factors, sequelae and MR imaging for diagnosis and prognosis. Acta Orthop Scand Suppl. 1996, 268:1-48
- [16] **Hougaard K, Thomsen PB.** Traumatic posterior dislocation of the hip-- prognostic factors influencing the incidence of avascular necrosis of the femoral head. Arch Orthop Trauma Surg. 1986, 106(1):32-35

- [17] **Herndon JH, Aufranc OE.** Avascular necrosis of the femoral head in the adult. A review of its incidence in a variety of conditions. Clin Orthop Relat Res. 1972, 86:43-62
- [18] **Zalavras CG, Malizos KN, Dokou E, Vartholomatos G.** The 677C-->T mutation of the methylene-tetrahydrofolate reductase gene in the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head. Haematologica. 2002, 87(1):111-2
- [19] **Zalavras CG, Vartholomatos G, Dokou E, Malizos KN.** Genetic background of osteonecrosis: associated with thrombophilic mutations? Clin Orthop Relat Res. 2004, 422:251-5.
- [20] **Zalavras CG, Vartholomatos G, Dokou E, Malizos KN.** Factor V Leiden and prothrombin gene mutations in femoral head osteonecrosis. Thromb Haemost. 2002, 87(6):1079-80
- [21] **Dubois EL, Cozen L.** Avascular (aseptic) bone necrosis associated with systemic lupus erythematosus. JAMA. 1960, 174:966-971
- [22] **Zizic TM, Marcoux C, Hungerford DS, Dansereau JV, Stevens MB.** Corticosteroid therapy associated with ischemic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1985, 79(5):596-604
- [23] **Chung SM, Ralston EL.** Necrosis of the humeral head associated with sickle cell anemia and its genetic variants. Clin Orthop Relat Res. 1971, 80:105-117
- [24] **Orzincolo C, Castaldi G, Scutellari PN, Bariani L, Pinca A.** Aseptic necrosis of femoral head complicating thalassemia. Skeletal Radiol. 1986, 15(7):541-4

- [25] **Knox-Macaulay HH.** Sickle cell disease in Sierra Leone: a clinical and haematological analysis in older children and adults. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983, 77(4):411-419
- [26] **Konotey-Ahulu FI.** The sickle cell diseases. Clinical manifestations including the "sickle crisis". *Arch Intern Med.* 1974, 133(4):611-9
- [27] **Patton PR, Pfaff WW.** Aseptic bone necrosis after renal transplantation. *Surgery.* 1988, 103(1):63-68
- [28] **Malizos KN, Soucacos PN, Beris AE, Korobilas AB, Xenakis TA.** Osteonecrosis of the femoral head in immunosuppressed patients: hip salvaging with implantation of a vascularised fibular graft. *Microsurgery.* 1994, 15(7):485-91
- [29] **Enright H, Haake R, Weisdorf D.** Avascular necrosis of bone: a common serious complication of allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Med.* 1990, 89(6):733-738
- [30] **Carlson L.** Aseptic necrosis following transplant. *ANNA J.* 1993,20(2):185-201
- [31] **Fishman EK, Wolf EJ, Jones B, Bayless TM, Siegelman SS.** CT evaluation of Crohn's disease: effect on patient management. *AJR Am J Roentgenol.* 1987, 148(3):537-540
- [32] **Vakil N, Sparberg M.** Steroid-related osteonecrosis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1989, 96(1):62-67
- [33] **Σκανδαλάκης Π.** Ανατομία Μεταφραση από: Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. *Gray's Anatomy for students.* 2005, 489-451

- [34] **Αναγνωστοπούλου Σ.** Εγχειρίδιο ασκήσεων ανατομικής. μετάφραση από: Gosling JA, Harris PF, Whitmore I, Willan PLT K. Human Anatomy. 2002, 262-264
- [35] **Bullong PG.** The morbit anatomy of subchodral osteonecrosis. Από το: “Osteonecrosis: etiology, diagnosis and treatment”. **Urbaniak J.R., Jones J.P.** American Academy of Orthopaedic Surgeons
- [36] **Bassounas AE, Karantanas AH, Fotiadis DI, Malizos KN.** Femoral head osteonecrosis: volumetric MRI assessment and outcome. Eur J Radiol. 2007, 63(1):10-5
- [37] **Zibis AH, Karantanas AH, Roidis NT, Hantes ME, Argiri P, Moraitis T, Malizos KN.** The role of MR imaging in staging femoral head osteonecrosis. Eur J Radiol. 2007, 63(1):3-9
- [38] **Malizos KN, Zibis AH, Dailiana Z, Hantes M, Karachalios T, Karantanas AH.** MR imaging findings in transient osteoporosis of the hip. Eur J Radiol. 2004 Jun;50(3):238-44. Erratum in: Eur J Radiol. 2005, 53(2):322
- [39] **Karachalios T, Zibis A, Papanagiotou P, Karantanas AH, Malizos KN, Roidis N.** MR imaging findings in early osteoarthritis of the knee. Eur J Radiol. 2004, 50(3):225-30
- [40] **Malizos KN, Siafakas MS, Fotiadis DI, Karachalios TS, Soucacos PN.** An MRI-based semiautomated volumetric quantification of hip osteonecrosis. Skeletal Radiol. 2001, 30(12):686-93

- [41] **Theodorou DJ, Malizos KN, Beris AE, Theodorou SJ, Soucacos PN.** Multimodal imaging quantitation of the lesion size in osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 2001, 386:54-63
- [42] **Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR.** A new method for evaluation and treatment of avascular necrosis of the femoral head. In: Arlet J, Ficat PR, Hungerford DS, editors. Bone circulation. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 1984, 398-403
- [43] **Ono K.** Diagnostic criteria, staging system and roentgenographic classification of avascular necrosis of the femoral head (steroid induced, alcohol associated or idiopathic nature. In: Ono K, editor. Annual report of Japanese Investigation Committee for Intractable Disease. Tokyo: Ministry of Health and Welfare, 1987, 331-336
- [44] **Ohzono K, Saito M, Sugano N, Takaoka K, Ono K.** The fate of nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. A radiologic classification to formulate prognosis. Clin Orthop Relat Res. 1992, 277:73-8
- [45] **Gardeniers JWM, ARCO Committee of Technology and Staging.** Report on the committee meeting at Santiago de Compostela. ARCO Newsletter, 1993, 5:79-82
- [46] **Malizos KN, Siafakas MS, Fotiadis DI, Karachalios TS, Soucacos PN.** An MRI-based semiautomated volumetric quantification of hip osteonecrosis. Skeletal Radiol. 2001, 30(12):686-93.
- [47] **Musso ES, Mitchell SN, Schink-Ascani M, Bassett CA.** Results of conservative management of osteonecrosis of the femoral head. A retrospective review. Clin Orthop Relat Res. 1986; 207:209-15

- [48] **Stulberg BN, Davis AW, Bauer TW, Levine M, Easley K.** Osteonecrosis of the femoral head. A prospective randomized treatment protocol. Clin Orthop Relat Res. 1991, 268:140-51
- [49] **Ficat RP.** Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. J Bone Joint Surg Br. 1985, 67(1):3-9
- [50] **Malizos KN, Quarles LD, Dailiana ZH, Rizk WS, Seaber AV, Urbaniak JR.** Analysis of failures after vascularized fibular grafting in femoral head necrosis. Orthop Clin North Am. 2004, 35(3):305-314, viii.
- [51] **Dailiana ZH, Zachos V, Varitimidis S, Papanagiotou P, Karantanas A, Malizos KN.** Scaphoid nonunions treated with vascularised bone grafts: MRI assessment. Eur J Radiol. 2004, 50(3):217-24
- [52] **Malizos KN, Soucacos PN, Vragalas V, Dailiana ZH, Schina I, Fotopoulos A.** Three phase bone scanning and digital arteriograms for monitoring vascularized fibular grafts in femoral head necrosis. Int Angiol. 1995, 14(3):319-26
- [53] **Malizos KN, Soucacos PN, Beris AE.** Osteonecrosis of the femoral head. Hip salvaging with implantation of a vascularized fibular graft. Clin Orthop Relat Res. 1995, 314:67-75
- [54] **Hernigou P, Bachir D, Galacteros F.** Avascular necrosis of the femoral head in sickle-cell disease. Treatment of collapse by the injection of acrylic cement. J Bone Joint Surg Br. 1993, 75(6):875-80

- [55] **Rijnen WH, Gardeniers JW, Buma P, Yamano K, Slooff TJ, Schreurs BW.** Treatment of femoral head osteonecrosis using bone impaction grafting. Clin Orthop Relat Res. 2003, 417:74-83
- [56] **Mont MA, Etienne G, Ragland PS.** Outcome of nonvascularized bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res. 2003, 417:84-92
- [57] **Beris AE, Soucacos PN.** Optimizing free fibular grafting in femoral head osteonecrosis: the Ioannina aiming device. Clin Orthop Relat Res. 2001, 386:64-70
- [58] **Hisatome T, Yasunaga Y, Takahashi K, Ochi M.** Progressive collapse of transposed necrotic area after transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head induces osteoarthritic change. Mid-term results of transtrochanteric rotational osteotomy for osteonecrosis of the femoral head. Arch Orthop Trauma Surg. 2004, 124(2):77-81
- [59] **Malizos KN, Papasoulis E, Dailiana ZH, Papatheodorou LK, Varitimidis SE.** Early results of a novel technique using multiple small tantalum pegs for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a case series involving 26 hips. J Bone Joint Surg Br. 2012, 94(2):173-178
- [60] **Varitimidis SE, Dimitroulias AP, Karachalios TS, Dailiana ZH, Malizos KN.** Outcome after tantalum rod implantation for treatment of femoral head osteonecrosis: 26 hips followed for an average of 3 years. Acta Orthop. 2009, 80(1):20-5
- [61] **Tsao AK, Roberson JR, Christie MJ, Dore DD, Heck DA, Robertson DD, Poggie RA.** Biomechanical and clinical evaluations of a porous tantalum implant for

- the treatment of early-stage osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2005, 87 Suppl 2:22-7
- [62] **Ito H, Matsuno T, Kaneda K.** Bipolar hemiarthroplasty for osteonecrosis of the femoral head. A 7- to 18-year followup. *Clin Orthop Relat Res.* 2000, 374:201-11
- [63] **Malizos KN, Bargiotas K, Papatheodorou L, Hantes M, Karachalios T.** Survivorship of monoblock trabecular metal cups in primary THA : midterm results. *Clin Orthop Relat Res.* 2008, 466(1):159-66
- [64] **Adili A, Trousdale RT.** Femoral head resurfacing for the treatment of osteonecrosis in the young patient. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 , 417:93-101
- [65] **Ortiguera CJ, Pulliam IT, Cabanela ME.** Total hip arthroplasty for osteonecrosis: matched-pair analysis of 188 hips with long-term follow-up. *J Arthroplasty.* 1999, 14(1):21-8
- [66] **Xenakis TA, Gelalis J, Koukoubis TA, Zaharis KC, Soucacos PN.** Cementless hip arthroplasty in the treatment of patients with femoral head necrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2001, 386:93-9
- [67] **Reis ND, Schwartz O, Militianu D, Ramon Y, Levin D, Norman D, Melamed Y, Shupak A, Goldsher D, Zinman C.** Hyperbaric oxygen therapy as a treatment for stage-I avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 2003, 85(3):371-5
- [68] **Li X, Cui Q, Kao C, Wang GJ, Balian G.** Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARGgamma2 and

- increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone*. 2003, 33(4):652-9
- [69] **Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN, Tracy T, Wang P.** Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2001, 386:19-33
- [70] **Yang C, Yang S, Du J, Li J, Xu W, Xiong Y.** Vascular endothelial growth factor gene transfection to enhance the repair of avascular necrosis of the femoral head of rabbit. *Chin Med J (Engl)*. 2003, 116(10):1544-1548
- [71] **Leibbrant A., Penninger J.M.** RANK/RANKL: Regulators of Immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci*. 2008, 1143:123-150
- [72] **Kutlar A, Kutlar F, Turker I, Tural C.** The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potencial risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease. *Hemoglobin*. 2001, 25(2):213-217
- [73] **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 89:309-318
- [74] **Hofbauer L.C., Heufelder A.E.** Osteoprotegerin: a novel local player in bone metabolism. *Eur J Endocrin*. 1997, 137: 345-346
- [75] **Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo**

- J, Delaney J, Boyle WJ.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998, 93:165-176
- [76] **Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K.** Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem*. 1998, 254(3):685-691
- [77] **Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K.** Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998,139(3):1329-1337
- [78] **Aubin J.E., Bonnellye E.** Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis. *Osteoporosis Int*. 2000, 11:905-913
- [79] **Kostenuik P.J., Shalhoub V.** Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Cur Pharmacol Design*. 2001, 7:613-635
- [80] **Kostenuik P.J.** Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005, 5:618-625
- [81] **Rogers A., Eastell R.** Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90(11):6323-6331

- [82] **Wada T., Nakashima T.** Hiroshi N, Penninger J.M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. 2006, 12(1):17-25
- [83] **Ito S, Hata T.** Crystal structure of RANK ligand involved in bone metabolism. Vitam Horm. 2004, 67:19-33
- [84] **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997, 89(2):309-319
- [85] **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K.** Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology. 1998, 139(3):1329-1337
- [86] **Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi YJ Biol Chem.** TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem. 1997, 272(40):25190-25194
- [87] **Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L.** A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997, 390(6656):175-179

- [88] **Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S.** Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998, 12(9):1260-1268
- [89] **Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998, 93(2):165-176
- [90] **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(7):3597-3602
- [91] **Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J.** RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999, 13(18):2412-2424
- [92] **Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ.** RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls

osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97(4):1566-1571

- [93] **Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM.** Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet.* 2000, 24(1):45-48
- [94] **Whyte MP, Hughes AE.** Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res.* 2002, 17(1):26-29
- [95] **Whyte MP, Mills BG, Reinus WR, Podgornik MN, Roodman GD, Gannon FH, Eddy MC, McAlister WH.** Expansile skeletal hyperphosphatasia: a new familial metabolic bone disease. *J Bone Miner Res.* 2000, 15(12):2330-2344
- [96] **Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawcner M, Banovic T, Callon KE, Grey AB, Reid IR, Middleton-Hardie CA, Cornish J.** *Hum Mol Genet.* A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2002, 11(18):2119-2127
- [97] **Chong B, Hegde M, Fawcner M, Simonet S, Cassinelli H, Coker M, Kanis J, Seidel J, Tau C, Tüysüz B, Yüksel B, Love D.** Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res.* 2003, 18(12):2095-2104

- [98] **Mizuno A., Amizuka N., Irie K., Murakami A., Fujise N., Kanno T., Sato Y, Nakagawa N., Yasuda H., Mochizuki S., Gomibuchi T., Yano K., Shima N., Washida N., Tsuda E., Morinaga T, Higashio K, Ozawa H.** Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 247(3):610-615
- [99] **Inoue J., Ishida T., Tsukamoto N., Kobayashi N., Naito A., Azuma S., Yamamoto T.** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res.* 2000, 254(1):14-24
- [100] **Darnay B.G., Haridas V., Ni J., Moore P.A., Aggarwal B.B.** 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(32):20551-20555
- [101] **Kanazawa K., Azuma Y., Nakano H., Kudo A.** TRAF5 functions in both RANKL- and TNFalpha-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2003, 18(3):443-450
- [102] **Matsumoto M., Sudo T., Saito T., Osada H., Tsujimoto M.** Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem.* 2000, 40:31155-31161.
- [103] **David J.P., Sabapathy K., Hoffmann O., Idarraga M.H., Wagner E.F.** JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-

dependent and -independent mechanisms. J Cell Sci. 2002, 115(Pt 22):4317-4325

- [104] **Takayanagi H., Kim S., Koga T., Nishina H., Isshiki M., Yoshida H., Saiura A., Isobe M., Yokochi T., Inoue J., Wagner E.F., Mak T.W., Kodama T., Taniguchi T.** Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell. 2002, 3(6):889-901
- [105] **Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T.** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. Exp Cell Res. 2000, 254(1):14-24
- [106] **Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB.** 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(32):20551-20555
- [107] **Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskiaia M, Steinman RM, Choi Y.** The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. J Biol Chem. 1998, 273(43):28355-28359
- [108] **Wong BR, Josien R, Choi Y.** TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. J Leukoc Biol. 1999, 65(6):715-724

- [109] **Kanazawa K, Azuma Y, Nakano H, Kudo A.** TRAF5 functions in both RANKL- and TNF α -induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2003, 3:443-50
- [110] **Kanazawa K, Kudo A.** TRAF2 is essential for TNF- α -induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2005, 5:840-847
- [111] **Karin M, Lin A.** NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002, 3:221-227
- [112] **Hayden MS, Ghosh S.** Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell.* 2008, 132(3):344-362
- [113] **Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U.** Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* 1997, 11(24):3482-3496
- [114] **Iotsova V, Caamaño J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R.** Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat Med.* 1997, 11:1285-1289
- [115] **Ruocco MG, Maeda S, Park JM, Lawrence T, Hsu LC, Cao Y, Schett G, Wagner EF, Karin M.** 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(10):1677-1687
- [116] **David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EFJ.** JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Cell Sci.* 2002, 115(Pt 22):4317-4325

- [117] **Wagner EF.** Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum.* 2002, 61(2):ii40-42
- [118] **Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, Takayanagi H, Miura T, Nishina H, Katada T, Wakabayashi K, Oda H, Nakamura K, Tanaka S.** Possible involvement of I κ B kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *J Bone Miner Res.* 2002, 17(4):612-621
- [119] **Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF.** Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol.* 2004, 164(4):613-623
- [120] **Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T.** T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature.* 2000, 408(6812):600-605
- [121] **Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T.** RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- β . *Nature.* 2002, 416(6882):744-749
- [122] **Syed F, Khosla S.** Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 328(3):688-696
- [123] **Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger**

- D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S.** Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007, 130(5):811-823
- [124] **Abu-Amer Y.** IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest*. 2001, 107(11):1375-1385
- [125] **Takayanagi H.** Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007, (4):292-304
- [126] **Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer YJ Biol Chem.** Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem*. 2001, 276(1):563-568
- [127] **Yano K, Tsuda E, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y.** Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone Miner Res*. 1999, 14(4):518-527
- [128] **Jorgensen H.L, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen J.B.** Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab*. 2004, 22(2):132-138

- [129] **Browner W.S., Lui L.Y., Cummings S.R.** Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86(2):631-637
- [130] **Schett G., Kiechl S., Redlich K., Oberhollenzer F., Weger S., Egger G., Mayr A., Jocher J., Xu Q., Pietschmann P., Teitelbaum S., Smolen J., Willeit J.** Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA.* 2004, 291(9):1108-1113
- [131] **Morony S., Capparelli C., Sarosi I., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kostenuik P.J.** Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res.* 2001, 61(11):4432-4436
- [132] **Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ.** Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008, 29(2):155-192
- [133] **Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, Wang A, Siddhanti S, Fitzpatrick LA; AMG 162 Bone Loss Study Group.** Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res.* 2007, 22(12):1832-1841
- [134] **Body JJ, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, Holloway D, Peterson MC, Bekker PJ.** A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple

- myeloma or bone metastases from breast cancer. Clin Cancer Res. 2006, 12(4):1221-1228
- [135] **Wonzey JM, Rosen V.** Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein Gene Family in Bone Formation and Repair. Clin Orthop Relat Res. 1998, 346:26-37
- [136] **Hruska KA, Mathew S, Saab G.** Bone morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. Circ Res. 2005, 97(2):105-114
- [137] **Chen DI, Zhao M, Mundy GR.** Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors. 2004, 22(4):233-241
- [138] **Gazzerro E, Canalis E.** Bone morphogenetic proteins and their antagonists. Rev Endocr Metab Disord. 2006, 7:51-56
- [139] **Canalis E, Economides AN, Gazzerro E.** Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev. 2003, 24(2):218-235
- [140] **Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE.** Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. J Histochem Cytochem. 2000, 48(11):1493-1502
- [141] **Helvering LM, Sharp RL, Ou X, Geiser AG.** Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes. Gene. 2000, 256(1-2):123-138

- [142] **Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G.** A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* 1999, 13(8):1025-1023
- [143] **Yamashita H, Duke PT, Miyazono K.** Bone Morphogenetic Receptors. *Bone.* 1996, 19(6):569-574
- [144] **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994, 370(6488):341-347
- [145] **Cárcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massagué J.** Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol.* 1994, 14(6):3810-3821
- [146] **Cárcamo J, Zentella A, Massagué J.** Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol.* 1995,15(3):1573-1581
- [147] **Nohe A, Keating E, Knaus P, Peterson NO.** Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004, 16:291-299
- [148] **Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, Dijke P, Heldin CH, Miyazono K.** Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(17):7632-7636

- [149] **Dijke T, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL.** Identification of Type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein -4. *J Biol Chem.* 1994, 269:16985-16988
- [150] **Chen YG, Massagué J.** Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem.* 1999, 274(6):3672-3677
- [151] **Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T.** Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* 1999, 112(Pt 20):3519-3527
- [152] **Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M, Miyazono K.** Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci.* 2001, 114(Pt 8):1483-1489
- [153] **Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J.** Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature.* 1996, 383(6603):832-836
- [154] **Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE.** Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell.* 1998, 1(4):611-617
- [155] **Zhu HJ, Iaria J, Sizeland AM.** Smad7 differentially regulates transforming growth factor beta-mediated signaling pathways. *J Biol Chem.* 1999, 274(45):32258-32264

- [156] **Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K.** Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*. 1995, 270(5244):2008-2011
- [157] **Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E.** TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 1997, 272(13):8141-8144
- [158] **Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T.** BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem*. 2000, 275(23):17647-17652
- [159] **Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, Ochiai W, Takizawa T, Ueno M, Takizawa M, Shibuya H, Taga T.** Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes Cells*. 2001, 6(12):1091-1099
- [160] **Pouponnot C, Jayaraman L, Massagué J.** Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem*. 1998, 273(36):22865-22868
- [161] **Topper JN, DiChiara MR, Brown JD, Williams AJ, Falb D, Collins T, Gimbrone MA Jr.** CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(16):9506-9511

- [162] **Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ.** Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol.* 2001, 15(5):681-694
- [163] **Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ.** Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004, 18(1):1-12
- [164] **Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S.** Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002, 420(6916):636-642
- [165] **Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LE, Wang HW, Shin DG, Rowe DW.** Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *Biol Chem.* 2005, 280(26):24618-24626
- [166] **Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K.** Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* 2000, 275(9):6075-6079
- [167] **Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S.** Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J.* 2001, 20(15):4132-4142

- [168] **Wang W, Mariani FV, Harland RM, Luo K.** Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(26):14394-14399
- [169] **Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T.** Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell.* 2000, 103(7):1085-1097
- [170] **Zhao M, Qiao M, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D.** E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2003, 278(30):27939-27944
- [171] **Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, Li C, Cheng SY, Deng CX, Zhang YE.**Cell. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell.* 2005, 1:101-113
- [172] **Mont MA, Hungerford DS.** Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am.* 1995, 77(3):459-474
- [173] **Aldridge JM 3rd, Urbaniak JR.** Avascular necrosis of the femoral head: etiology, pathophysiology, classification, and current treatment guidelines. *Am J Orthop.* 2004, 33:327-332
- [174] **Yuan B, Liu Z.** Treatment of osteonecrosis of the femoral head: combination of operation and multiple cellular mediators. *Med Hypotheses* 2007, 68(3):502-505

- [175] **Borish LC, Steinke JW.** 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, 111(2 Suppl):S460-475
- [176] **Beutler B, Cerami A.** The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989, 7:625-655
- [177] **Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M.** A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell.* 1990, 63(2):251-258
- [178] **Tartaglia LA, Goeddel DV.** Two TNF receptors. *Immunol Today.* 1992, 13(5):151-153
- [179] **Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A.** Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 1987, 330(6149):662-664
- [180] **Ling Lv, Kerzic P, Lin G, Schnatter AR, Bao L, Yang Y, Zou H, Fu H, Ye X, Gross SA, Armstrong TW, Irons RD.** The TNF-238A polymorphism is associated with susceptibility to persistent bone marrow dysplasia following chronic exposure to benzene. *Leukemia Research.* 2007, xxx-xxx
- [181] **Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY, Hsieh MY, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Yu ML.** Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis.* 2006, 13:770-774
- [182] **Ugialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE.** Identification of three new single

- nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens*. 1998, 52(4):359-367
- [183] **Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL.** Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm*. 1995, 46(1):32-41
- [184] **Fabris M, Di PE, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G.** Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002, 29(1):29-33
- [185] **Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC, Verweij CL.** Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol*. 1997, 36(5):516-521
- [186] **Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY, Hsieh MY, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Yu ML.** Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2006, 13(11):770-774
- [187] **Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Kim JH.** Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006, 21(7):1163-1169
- [188] **Dinarello CA, Wolff SM.** The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*. 1993, 328(2):106-113

- [189] **Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K.** Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90(13):6155-6159
- [190] **Arend WP.** Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993, 54:167-227
- [191] **Laine ML, Farre MA, Gonzalez G, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG, Crusius JB, Vandenbroucke JP, van Winkelhoff AJ, Pena AS.** Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res.* 2001, 80(8):1695-1699.
- [192] **McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW.** A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum.* 1995, 38(2):221-228
- [193] **Rainero I, Bo M, Ferrero M, Valfrè W, Vaula G, Pinessi L.** Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2004, 25(10):1293-1298
- [194] **Haggerty CL, Ferrell RE, Hubel CA, Markovic N, Harger G, Ness RB.** Association between allelic variants in cytokine genes and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193(1):209-215.
- [195] **Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Feghali-Bostwick CA, Cooper GS.** Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF-beta in a population-based study of systemic

- lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1alpha-889 C/T polymorphism. *Hum Immunol.* 2004, 65(6):622-631
- [196] **Camp NJ, Cox A, di Giovine FS, McCabe D, Rich W, Duff GW.** Evidence of a pharmacogenomic response to interleukin-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2005, 6(6):467-471
- [197] **Price P, James I, Fernandez S, French MA.** Alleles of the gene encoding IL-1alpha may predict control of plasma viraemia in HIV-1 patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004, 18(11):1495-1501
- [198] **Akira S, Taga T, Kishimoto T.** Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993, 54:1-78
- [199] **Malik MH, Jury F, Bayat A, Ollier WE, Kay PR.** Genetic susceptibility to total hip arthroplasty failure: a preliminary study on the influence of matrix metalloproteinase 1, interleukin 6 polymorphisms and vitamin D receptor. *Ann Rheum Dis.* 2007, 66(8):1116-1120
- [200] **Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M.** Interleukin-6 promoter polymorphism (–174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2001, 40(4):393-400
- [201] **Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG.** A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res.* 2000, 20(10):885-888

- [202] **Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Jeffery R, Woo P, Delmas PD.** Association between a functional interleukin-6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women: the OFELY study. *Bone*. 2002, 31(1):43-50
- [203] **Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M.** The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005, 26(1):48-51
- [204] **Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA.** Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J*. 1999, 18(2):420-432
- [205] **Wenner CA, Szabo SJ, Murphy KM.** Identification of IL-4 promoter elements conferring Th2-restricted expression during T helper cell subset development. *J Immunol*. 1997, 158(2):765-773
- [206] **Castro A, Sengupta TK, Ruiz DC, Yang E, Ivashkiv LB.** IL-4 selectively inhibits IL-2-triggered Stat5 activation, but not proliferation, in human T cells. *J Immunol*. 1999, 162(3):1261-1269
- [207] **Vannier E, Miller LC, Dinarello CA.** Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(9):4076-4080

- [208] **Zhang X, Hei P, Deng L, Lin J.** Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13(2):135-140
- [209] **Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ.** Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax.* 2003, 58(2):154-156
- [210] **Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G.** Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogen.* 1997, 46(2):120-128
- [211] **Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV.** An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997, 24(1):1-8
- [212] **Minshall E, Chakir J, Laviolette M, Molet S, Zhu Z, Olivenstein R, Elias JA, Hamid Q.** IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, 105(2 Pt 1):232-238
- [213] **Farrar MA, Schreiber RD.** The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* 1993, 11:571-611
- [214] **Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE.** Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.* 1990, 8:303-333

- [215] **Tuli R., Seghatolescami M.R., Tuli S., Wang M.L., Hozack W.J., Manner P.A., Danielson K.G., Tuan R.S.** A simple high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Molecular Biotechnology*. 2003, 23(1):37- 49
- [216] **Rosen V, Wosney JM.** Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. (2002) San Diego: Academic Press.
- [217] **Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, AN N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He T-C.** Osteogenic Activity of Fourteen Types of Human Bone Morhpogenetic proteins (BMPs). *J BONE Join Surg* 2003, 85A(8), 1544-1552
- [218] **Leong LM, Brickell PM.** Bone morphogenetic protein-4. *Molecules in Focus*. 1996, 28(2):1293-1296V
- [219] **Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BLM.** Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 1995, 9:2105-2116
- [220] **Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ.** Mice lacking BMP-6 function. *Dev Genet*. 1998, 22:321-339
- [221] **Wutzl A, Rauner M, Seemann R, Millesi W, Krepler P, Pietschmann P, Ewers R.** Bone Morphogenetic Proteins 2, 5, and 6 in combination stimulate osteoblasts but not osteoclasts in vitro. *JOR* 2010, 28:1431-1439

- [222] **Seckinger A, Meissner T, Moreaux J, Goldschmidt H, Fuhler GM, Benner A, Hundemer M, Rème T, Shaughnessy JD, Barlogie B, Bertsch U, Hillengass J, Ho AD, Pantesco V, Jauch A, Vos JD, Rossi JF, Möhler T, Klein B, Hose D.** Bone morphogenic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 2009, 28(44):3866- 3879
- [223] **Zhang H, Bradley A.** Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 1996, 122:2977-2986
- [224] **Luo G, Hofman C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G.** BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995, 9:2808-2820
- [225] **Dudley AT, Robertson EJ.** Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Develop Dynamics*. 1997, 208:349-362
- [226] **Enhorn T.** Clinical Applications of Recombinant Human BMPs: Early Experience and Future Development. *J Bone Joint Surg*. 2003, 85A:82-88
- [227] **De Biase P, Capanna R.** Bone morphogenetic proteins and growth factors: emerging role in regenerative orthopaedic surgery. *Injury*. 2007, 8:43-48
- [228] **Bilic R, Simic P, Jelic M, Stern-Padovan R, Dodig D.** Osteogenic protein-1(BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop*. 2006, 30:128-134

- [229] **Costeas PA, Koumas L, Koumouli A, Kyriakou-Giantsiou A, Papaloizou A.** Cytokine polymorphism frequencies in the Greek Cypriot population. *Eur J Immunogenet.* 2003, 30:341-343
- [230] **Samara S, Kollia P, Dailiana Z, Chassanidis C, Papatheodorou L, Koromila T, Malizos KN.** Predictive Role of Cytokine Gene Polymorphisms for the Development of femoral head osteonecrosis. *Disease Markers.* 2012 Sept 13 [Ahead of print].
- [231] **Amirzargar M, Yavangi M, Basiri A, Moghadam SH, Khosravi F, Solgi G, Gholiaf M, Khoshkho F, Dadaras F, Mahmmodi M, Ansaripour B, Amirzargar A, Nikbin B.** Genetic Association of Interleukin-4, Interleukin-10, and Transforming Growth Factor Gene Polymorphism With Allograft Function in Renal Transplant Patients. *Transplant Proc.* 2007, 39:954–957
- [232] **Brazova J, Sismova K, Vavrova V, Bartosova J, Macek Jr. M, Lauschmand H, Sediva A.** Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients. *Clin Immunol.* 2006, 121:350–357
- [233] **De Gorter DJ, van Dinther M, Korchynskyi O, Ten Dijke P.** Biphasic effects of transforming growth factor β on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2011, 26:1178-1187
- [234] **Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K.** Influence of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphisms on Disease Progression in Patients Chronically Infected With Hepatitis B Virus. *Am J Gastroenterol.* 2002, 97: 2086-2092

- [235] **Zhang X, Hei P, Deng L, Lin J.** Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in peritoneal fluid in patients with Endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13:135–140
- [236] **Nanes MS.** Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene.* 2003, 321:-1-15
- [237] **Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y.** Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001, 276(1): 563-568