

**Fibroblaszt közvetített patológiás csontvesztés vizsgálata
ex vivo és in vivo modelleken**

Tézisfüzet

Dr. Tunyogi-Csapó Miklós



Mozgásszervi Sebészeti Intézet

Ortopédiai Klinikai Tanszék

PTE-KK

**PÉCS
2011**

Fibroblaszt közvetített patológiás csontvesztés vizsgálata ex vivo és in vivo modelleken

Tézisfüzet

Dr. Tunyogi-Csapó Miklós

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel DSc.

Programvezető: Prof. Dr. Illés Tamás DSc.

Témavezető: Prof. Dr. Glant T. Tibor DSc.

Dr. Vermes Csaba PhD.

Mozgásszervi Sebészeti Intézet

Ortopédiai Klinikai Tanszék

PTE-KK

PÉCS

2011

1. BEVEZETÉS

Köszönhetően a csontfelszívódásban és csontátépülésben betöltött szerepüknek az osteoclastok és osteoblastok megszabják a csont tömegét, szerkezetét és teherbírását. A csont remodelláció térben zajló, élethosszig tartó folyamat, amely során az elöregedett csontot az osteoclastok eltávolítják, majd a csontformáló osteoblastok pótolják. A lebontás és felépítés egyensúlyának felbomlása amennyiben az előbbi javára történik a csonttömeg csökkenéséhez vezet. Ez a csontvesztés lehet generalizált (pl.: oszteoporózisban) vagy körülírt reakció (pl.: a rheumatoid arthritisben észlelt csontdestrukció vagy a periprotetikus osteolysis). A csont felszívódás egy a TNF (tumor necrosis factor) családba tartozó citokin a RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) által közvetített folyamat, mely citokin nélkülözhetetlen az osteoclastok megfelelő képződéséhez, aktivitásához és túléléséhez mind normál, mind patológiás körülmények között. A RANKL katabolikus hatását a TNF receptorok családjába sorolt OPG (osteoprotegerin) gátolja, amely a RANKL megkötésével annak RANK receptorával való interakcióját, ezáltal a receptor aktiválódását gátolja. Így feltételezhető, hogy az osteoclast aktivitás a RANKL és az OPG relatív egyensúlyának függvénye. Különböző csontbetegségekre alkalmazott állat modelleken végzett tanulmányok azt mutatták, hogy a RANKL gátlása a csontfelszívódás jelentős csökkenéséhez, valamint a corticalis és a szivacsos csontállomány, továbbá a csont denzitás és a csontszilárdság növekedéséhez vezetett. Rheumatoid arthritis állatmodelljein pedig azt tapasztalták, hogy a RANKL inhibitorok a focalis csont defektusok előfordulását is csökkentették. Az endoprotézisek körül tapasztalt kóros csontfelszívódás igen nagy jelentőségű az ortopéd sebészetben, hiszen a protézisfelületek kopásából képződő finom törmelék gyulladáshoz vezet. Rheumatoid arthritisben a gyulladt synoviumból kiinduló, az ízületi porc felszínét, marginális csontrészt, valamint a periarticularis- és subchondralis csontállományt támadó gyulladáshoz vezet focalis csont defektusok kialakulásához. A fentebb említett két patológiás állapot esetén a destruktív csontfelszívódási zóna körül képződő gyulladáshoz vezető számos hasonlóságot mutat. A szomszédos csontállományba betörő sejtek túlnyomó többsége synovialis fibroblast, és mindkét szövetben hasonló pro- és anti-inflammatorikus citokinek detektálhatók. A gyulladáshoz vezető folyamat során – köszönhetően a gyulladáshoz vezető sejtek proliferációjának, beáramlásának, valamint a szövetet alkotó sejtek túlélésének és szaporodásának – a synovia szerű szövet vastagsága növekszik, a szöveti mátrix pedig túlnyomó részben annak széli részein 10-15 sejt réteg vastagságban fibroblaszt szerű sejteket tartalmaz. A gyulladt szövetre az angiogenezis fokozódása is jellemző, megkönnyítve ezzel a gyulladáshoz vezető sejtek beáramlását. E patológiás folyamatok során az osteoclastogenezis, a szabályozatlan csontképződés, a granulomatosus szövet képződése és a neovascularisatio szimultán, egymással átfedést mutató, ezáltal egymástól külön nem választható folyamatok. Akár a RA-nek megfelelő állatmodellt, akár a periprotetikus osteolysist tekintjük, T-sejtek

és más gyulladásozó sejtek ritkán láthatóak a csontfelszívódás területén, jellemzően inkább fibroblaszt és macrophag-szerű sejtek, kevésbé gyakran osteoblastok töltik be a felszívódott csontterületet. Ebben az értekezésben a synovialis fibroblasztoknak a protézis kilazuláshoz és rheumás ízületi destrukcióhoz vezető patológiás csontfelszívódásban betöltött szerepére fektettük a hangsúlyt.

2. CÉLOK ÉS HIPOTÉZIS

Azért, hogy bepillantást nyerjünk az arthritikus ízületekben és a protézis/csont érintkezési felületein lejátszóó patológiás csontfelszívódás és angiogenezis folyamataiba, és hogy megértsük, milyen szereppel bírnak ezekben a folyamatokban - citokin gazdag környezetben - a synovialis fibroblasztok, a következő hipotézis bebizonyítását tűztük ki célul.

» Az ízületi destrukció és protézis lazulás során a synovialis fibroblasztok aktívan közreműködnek a csontfelszívódás és neovaszkularizáció folyamatában azáltal, hogy számos osteoclastogén és angiogén faktort termelnek. Ezen vegyületek jelentős szereppel bírnak a rheumatoid arthritis és a periprotetikus osteolysis kóros folyamataiban. «

Célunk eléréséhez a következő kísérleteket hajtottuk végre:

I. Vizsgálat: Megvizsgáltuk, hogy a proinflammatorikus citokin terápia vagy a kiválasztott citokinek teljes hiánya képes-e módosítani az osteoclastogén faktorok (RANKL és OPG) termelődését fibroblasztokban

- Eltérő citokin környezetek létrehozásával, humán- valamint egér fibroblasztok alkalmazásával in vitro és in vivo kísérleteket végeztünk. Összehasonlítottuk a RANKL és OPG termelődését normál, RA és IFM eredetű human fibroblasztokon in vitro.
- Ugyanezen vizsgálatot megismételtük normál és arthritikus egér térdízületekből nyert fibroblasztok alkalmazásával.
- Legvégül, felhasználva a proteoglikán indukált arthritis egér modellt (proteoglycan [PG]-induced arthritis; PGIA), az in vitro körülmények során tapasztaltakat alakítottuk in vivo, még hozzá az antiinflammatorikus és antiosteoclastogén IFN γ és IL-4 citokinek valamint az osteoclastogén IL-17 citokin teljes hiánya mellett, naív és arthritikus gén-deficiens állatokban.

II. vizsgálat: Meghatároztuk a synovialis fibroblasztok és a fibroblasztokból származó növekedési faktorok szerepét a periprotetikus angiogenezisben.

- A második vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk a synovialis fibroblasztok esetleges kulcsszerepét a periprotetikus szövetekben lezajló angiogenezis folyamatában.
- Ezt a kopási partikulumok, valamint a proinflammatorikus cytokinek hatására a synovialis fibroblasztok (Interfaciális és Rheumatoid SF) által termelt fő angiogénikus faktorok mérésével becsültük meg.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1.1. Vegyületek és citokinek

Minden vegyület, amennyiben külön nem jelöltük a Sigma (St. Louis, MO) illetve a Fisher Scientific (Chicago, IL) cégtől került beszerzésre. A fibroblasztok kezeléséhez szükséges humán és egér rekombináns fehérjéket pedig, mint a TNF α , IL-1 β , INF γ , IL-17 és IL-4 az R&D System (Minneapolis, MN) vagy a Sigma cégektől vásároltuk.

3.1.2 Fibroblaszt izolálás és humán synovialis kultúrák

A fibroblaszt izolálás pronáz és kollagenáz emésztéssel történt. Mind a friss szövetből, mind pedig a 7 napos synovialis szövettenyészetből végeztünk fibroblaszt izolálást, a különböző szöveti mintákból nyert fibroblasztok mennyiségének és életképességének összehasonlítása céljából. A szétválasztott sejtek PBS mosást követően 10 cm átmérőjű petri csészékbe kerültek DMEM/10% FBS oldatokban. A meg nem tapadt sejteket másnap reggel mosással eltávolítottuk, a megtapadt sejteket (főként fibroblasztok) DMEM/10% FBS-ben tenyésztjük. Mielőtt felhasználtuk a kísérletekhez az egybefüggő monolayer fibroblaszt kultúrákat öt sejtpaszázson keresztül szaporítottuk, ameddig el nem érték a $\sim 0,7-0,8 \times 10^6$ sejtdenzitást a Petri csészében. A fibroblaszt fenotípust flow cytometria és immunhisztokémia segítségével igazoltuk CD-90 (Thy-1) monoklonális antitest segítségével. A sejtkultúrákat normál, interfaciális membrán vagy reumatoid synoviális fibroblaszt csoportokba soroltuk (FLS).

3.1.3 Statisztikai analízis

A csoport átlagok és az átlag standard hiba meghatározásához deskriptív statisztikát alkalmaztunk. A „Pillai's trace” kritériumokat használtuk a multivariábilis szignifikancia detektálására. Ezt követően „Mann Whitney U”-tesztet használtunk a kísérleti csoportok eredményeinek összehasonlítására. A szignifikancia határának $p < 0.05$ értéket tekintettük. Minden statisztikai számítást számítógépes statisztikai software alkalmazásával végeztünk. (SPSS/PC+ v 15 SPSS Inc, Chicago, IL).

3.2. A humán és egér osteoclastogenesis vizsgálat módszerei (I. vizsgálat)

3.2.1. Egerek, immunizáció, egér fibroblaszt tenyészetek

Minden állatprotokoll az Institutional Animal Care and Use Committee of Rush University Medical Center felülvizsgálatával és engedélyével készült. A felnőtt BALB/c egerek a National Cancer Institute-től kerültek megvásárlásra. IL-4^{-/-} és az IFN γ ^{-/-} BALB/c egereket a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), a IL-17^{-/-} BALB/c típusú egereket Dr. Y. Iwakura (University of Tokyo) biztosította. PGIA indukálására vad típusú és gén deficiens egerek intraperitoneális oltását végeztük 2-3 alkalommal, 100 μ g emberi porcából származó PG-t (aggrecan) és dimethyldioctadecylammonium bromide adjuváns (DDA) anyagot tartalmazó oltóanyaggal, 3 hetes intervallumokban. A súlyos arthritis 7-10 nappal a második PG oltást követően alakult ki az IL-4^{-/-} egerekben és számos példányban az IL-17^{-/-} BALB/c egerek közül. A nonarthriticus, vad típusú és az IL-17^{-/-} egerek egy harmadik injekciót is kaptak, csakúgy, mint az IFN γ ^{-/-} egerek, melyekben viszonylag mérsékelt arthritis alakult ki a harmadik PG injekciót követően. Arthritis mind a vad típusú, mind a gén deficiens egerekben kialakult, a gyulladás mértékét szemmértékkel állapítottuk meg. Az azonos korú normál, PG immunizált vad típusú és gén deficiens egerek térd ízületeit synovialis fibroblaszt izolálásra használtuk fel, a korábban a humán mintáknál leírt technikát alkalmazva. A fibroblasztokat 4-5 sejtciklust követően használtuk fel, amikor a sejtenyészet több, mint 98 %-os synovialis fibroblaszt fenotípust mutatott, ahogy a humán FLS esetében is. Szöveti vizsgálatra a hátsó lábakat formalinnal fixáltuk, decalcifikáltuk és paraffinba ágyasztuk.

3.2.2. A synovialis fibroblasztok citokin kezelése

A szérumentesített, egybefüggő fibroblaszt tenyészetet 5% FBS tartalmú DMEM oldatban tároltuk 24 óráig. A médiumot ezt követően eltávolítottuk, helyére a megfelelő citokin összetételű (előzetes humán és egér egészséges illetve arthritikus fibroblaszt tenyészeteken végzett kísérletek során meghatározott) médium került.

A humán és egér FLS sejtek citokinekre adott válaszát TNF α (1.25-10 ng/ml), IL-1 β (0.2-5 ng/ml), IL-4 (2-10 ng/ml), IFN γ (1-15 ng/ml), és IL-17 (25-100 ng/ml) segítségével vizsgáltuk, dózis és idő függvényében. A végső vizsgálatokban TNF α (1.25-10 ng/ml), IL-1 β (0.2-5 ng/ml), IL-4 (2-10 ng/ml), IFN γ (1-15 ng/ml), és IL-17 (25-100 ng/ml) hatását vizsgáltuk önmagukban vagy 5 ng/ml IL-4 vagy 5 ng/ml IFN γ -val kombinációban.

3.2.3. RNS izolálás, komplementer DNS szintézis (cDNS) és real-time kvantitatív polimeráz lánc reakció (qRT-PCR)

RNS izolálást humán és egér synoviális fibroblasztokból végeztünk TRIzol reagens segítségével a gyártó protokolljának megfelelően. Az izolált RNS mennyiségi meghatározásához RiboGreen kitet, a minőségi meghatározáshoz formamid agaróz gél elektroforézist használtunk. A RANKL, OPG, GAPDH real time kvantitatív PCR analízise fibroblasztokból származó, reverse transzkriptáz által átírt RNS segítségével történt TaqMan Gene Expression Assay alkalmazásával. A cDNS sorozathígítását 1:1 arányú hígítástól 1:8 arányú hígításig végeztük, majd a sokszorosításhoz GeneAmp Fast PCR Master Mixet használtunk. Minden mintánál a GAPDH normalizáló gént használtuk referenciának.

3.2.4. RANKL, OPG protein és citokin enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálata (ELISA)

Humán és egér fibroblaszt tenyészetek kondicionált médiumában, egér szérumban, valamint egér mancs extraktumokban mértünk szolubilis RANKL (sRANKL), OPG, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-4, és IFN γ citokineket DuoSet ELISA Kit-ek (R&D System) alkalmazásával, a gyártó utasításának megfelelő módon. Miután számos kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kit szenzitivitását és specificitását teszteltük, a humán sRANKL ELISA kit a BioVision cégtől került beszerzésre. A RANKL, OPG és citokin koncentrációt (ng) 1 millió fibroblasztra, a szérumok esetén ng/ml, az egér mancs extraktumok esetén ng/mg-os mennyiségben adtuk meg. A sRANKL/OPG mennyiségét cross-capture ELISA technikával vizsgáltuk, vagyis OPG capture antitesthez sRANKL detekciós antitestet használtunk és fordítva. Kb. 8-10% OPG és 50% sRANKL-ot találtunk komplexben.

3.3 A humán angiogenezis vizsgálatának módszerei (II. vizsgálat)

3.3.1. Explantációs tenyészetek és kondicionált médiumok

A szövetminták 5-20 perccel az eltávolítást követően steril DMEM tápoldatban kerültek a műtőből a laboratóriumba. A mintákat szérum mentes DMEM oldatban apró darabokra (2-4 mm³) vágtuk, átmostuk, ezt követően a szövetmintákat tenyésztésre, RNS és fibroblaszt izolálásra és szövettani vizsgálatokra osztottuk szét. Nagyjából 0,5 g tömegű synovialis vagy interfaciális membránból származó szövet került tenyésztésre 2,5 ml DMEM oldatban, mely 5% endotoxin mentes FBS-t, antibiotikus/antimikotikus oldatot tartalmazott, 50 ug/ml gentamycinnel kiegészítve. A mintákat 12 lyukű edényekbe osztottuk szét, az alkalmazott médium 90 %-át 7 napig naponta cseréltük. A naponta leöntött médiumot lecentrifugáltuk 2500 g-vel 10 percig, majd későbbi citokin assay végzése céljából – 20C°-on tároltuk az explantáció szövetkultúrák elkészültéig. A szövetminta nélküli 5 % FBS tartalmú DMEM-et (médium kontroll) 24 órán keresztül 37C°-on inkubáluk, majd lecentrifugálást követően tároltuk a fent említett módon. Ugyanazon betegpopulációkat, szöveteket, explantációs szöveteket,

fibroblaszt kultúrákat alkalmaztunk, mint a RANKL/OPG expressziós és in vitro osteoclastogenezis vizsgálatok esetén.

3.3.2. Specifikus protein termékek detektálása ELISA módszerrel

Kondicionált médiumokat gyűjtöttünk 6-96 óra között. Mind a szöveti, mind a kezelt és kezeletlen fibroblasztok médiuma összegyűjtésre került, ELISA analízis végzése céljából. A médiumokat összegyűjtést követően centrifugáltuk, és az aliquotokat - 70 C°-on tároltuk. TNF- α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, IL-8, TGF β 1 és VEGF meghatározás történt „capture ELISA” technikával.

3.3.3. Fibroblaszt izolálás, a tenyésztés körülményei, kezelés és médium szétválasztás

Fibroblaszt izolálást végeztünk normál ízületből származó synovialis szövetekből, illetve periprotetikus interfaciális membránokból a korábban ismertetett módon. A fibroblaszt tenyészetek médiumát heti 2 alkalommal cseréltük, a tenyésztést $0,7 \times 10^6$ sejt denzitásig végeztük 10 cm átmérőjű Petri csészékben. In vitro kísérletekhez a fibroblaszt tenyészeteket 6-7 sejtpasszázst követően használtuk. A fibroblaszt tenyészeteket különböző vegyületekkel előkezeltük, a gátló koncentrációk meghatározása előzetes vizsgálatokkal történt. A transzkripció gátlására Actinomycin D (2 μ g/ml), a protein szintézis és transzláció gátlására cyclohexamide (10 μ g/ml), a frissen szintetizált fehérjék endoplazmatikus retikulumból, a Golgi komplexumba történő transzportjának megakadályozására brefeldin A (1 μ g/ml), a szintetizálódó fehérjék Golgi komplexumból történő kiáramlásának gátlására monesin (2 μ g/ml), a citoskeleton destabilizálása révén a fagocytózis gátlására pedig cytochalasin D (0,5 μ g/ml) került felhasználásra. A fibroblasztokat a fent említett vegyületekkel 6 órán át előkeztük kontroll médiumban (DMEM és 10% foetalis marha szérum), majd a médiumot a gátló anyagot az eredeti koncentrációban tartalmazó friss DMEM-re és CM- IFM-re cseréltük titánium partikulumokkal vagy azok nélkül.

3.3.4. RNS izolálás és „RNase protection assay” (RPA)

A friss (kb. 0,2-0,4 g) és a 7 napig tenyésztett szövetmintákat polytron homogenizátorral homogenizáltuk. RNS izolálás TRIzol reagens segítségével történt a korábban ismertetett módon. Szintén Trizol reagenst használtunk a fibroblaszt kultúrákból történő totál RNS izolálásához a kezelések előtt illetve után. Az RPA-t 8 μ g RNS alkalmazásával „Roboquant Multiprobe RNaseProtection assay” rendszerrel végeztük a gyártó utasítása szerint. Miután kiválasztottuk milyen kereskedelmi forgalomban lévő citokin, kemokin és növekedési faktor templátokat tudunk használni, további 5 rendelésre készült RPA templátot vásároltunk a BD Pharmingen/Bioscience cégtől. A rendelésre készített #65184 templát különböző angiogenikus faktorok, így a RANTES, IP-10, COX-1, COX-2, bFGF, FGF-R, IL-8, Angioprotein-1, VEGF és c-myc kimutatására készült. A #65238 templát a IL-12, GM-CSF-R α , aFGF, IL-6R α , M-CSF, IL-6, LIF, TIMP-1 és TIMP-2 ábrázolására alkalmas, a

#65184-os templát pedig a humán TNF- α , IL-1RI, IL-4, MMP-1, IFN- γ expressziójának mennyiségi meghatározására alkalmas.

3.3.5. VEGF izoformák detektálása Western blot hibridizációval

Az aktivált fibroblaszt kultúrák által termelt szolubilis VEGF izoformák, mint a lepotensebb angiogénikus faktor, detektálásához az összegyűjtött szövetenyészet médiumokat 10%-os sodium duodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide géltre (PAGE) töltöttük. A nem sekretált és/vagy membránhoz kötött VEGF kimutatásához a kezelt és kezeletlen sejteket jéghideg proteáz inhibitorokat (1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid és 1 U/ml aprotinin), foszfátáz inhibitorokat (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na-pyrophosphate, 50 mM KF, és 1 mM Na₃VO₄) és 0.1% NaN₃-t tartalmazó lízis pufferben lizáltuk 4 C°-on 1 órán keresztül. A sejt lizátumokat centrifugálással tisztítottuk, majd sávonként 15 μ g proteint választottunk szét 10%-os SDS- PAGE segítségével redukáló közegben. A fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük fel, a membránokat 1%-os zsírmentes tejjel blokkoltuk, majd VEGF elleni monoclonális antitesttel vagy egér polyclonális antitesttel kezeltük. Rekombináns humán VEGF-et használtunk kontrollként, a lejátszódó immunreakciókat a növekező kemilimnieszencia alapján mutattuk ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Humán szinoviális fibroblasztok RANKL és OPG expressziójának és regulációjának vizsgálata (I. Vizsgálat)

4.1.1. Normál és rheumatoid humán szinoviális fibroblasztok RANKL és OPG kibocsátása proinflammatorikus citokin kezelések hatására

Számos tanulmány igazolta, hogy a humán synovialis fibroblasztok különböző proinflammatorikus citokinek, mint például TNF α , IL-1 β , vagy IL-17 hatására a sejtfelszínükön RANKL, a környezetükbe pedig mind RANKL mind OPG termelésével reagálnak. Elsőként végeztünk szisztématis RANKL és OPG expresszió meghatározást, dózis és idő függvényében, 2 független humán és 3 rheumatoid fibroblaszt populáción. A RANKL és az OPG gén expressziót kvantitatív real time PCR segítségével, a protein koncentrációkat ELISA módszerrel határoztuk meg. A dózis-függő vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a TNF α hatása 5ng/ml, az IL-1 β hatása pedig 1 ng/ml-es koncentráció esetén érte el a platót. Ezen citokin koncentrációkat használtuk fel az idő függvényében végzett vizsgálataink során. Egyéb citokinek koncentrációit azonos módszerrel vizsgáltuk meg, ahogy az *Anyag és Módszer* fejezetben tárgyaltuk 5 ng/ml IL-4, 5 ng/ml IFN γ , és 25 ng/ml IL-17 került alkalmazásra minden további humán synovialis fibroblaszttal végzett kísérletünk során. A rheumatoid arthritises

synoviumból származó fibroblasztok következetesen több RANKL-t és OPG-t expresszáltak, mint a normál synoviumból származó fibroblasztok ugyanolyan dózisu TNF α vagy IL-1 β hatására. 72 óra elteltével az RA synovialis fibroblasztok által termelt RANKL és OPG termelés kettő-négyszer magasabb volt a normál synovialis fibroblasztok által termelt mennyiségnél ugyanazon körülmények között. A sRANKL/OPG arány egyenlőnek bizonyult a kezeletlen és citokinnel kezelt sejtek esetén.

4.1.2. A RANKL és OPG termelés csökkenésének vizsgálata IL-4 és IFN γ hatására citokin aktivált normál és RA synovialis fibroblasztok esetén

A T-sejtek által termelt citokinek [Th1 (IFN γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17)] a csont metabolizmus fontos szabályozójaként ismertek a gyulladt szinóviomban. Míg az IFN γ és az IL-4 antiosteoclastogén hatású citokinnek tekintendő, addig az IL-17 elősegíti az osteoclastok differenciálódását és aktiválódását. Mind az IL-4, mind az IFN γ szignifikánsan csökkentette a TNF α és IL-1 β indukált sRANKL szintet. Így módon mindkét citokinnek lehet antiosteoclastogén hatása azáltal, hogy csökkentik a fibroblasztok TNF α és IL-1 β indukált RANKL expresszióját. Az IL-4 önmagában indukálja az OPG szekréción, mely hatás ezáltal szinergista a TNF α és IL-1 β hatásával. Az IFN γ önmagában nem gyakorolt hatást az OPG expresszióra, de szignifikánsan csökkentette az OPG szintet a TNF α - és IL-1 β -stimulált humán fibroblaszt kultúrákban. Tehát a Th2 típusú IL-4 erős antiosteoclastogén hatással bír mindkét synovialis fibroblaszt típus esetén, a TNF α és IL-1 β indukált RANKL expresszió csökkentése és az OPG expresszió növelése révén, míg az IFN γ antagonizálja a TNF α - és IL-1 β -indukált OPG szekréción. Míg a kombinált TNF α és IL-4 vagy IL-1 β és IL-4 kezelés szignifikánsan csökkentette a RANKL/OPG arányt (kritikus faktora az osteoclastogenezisnek), addig a RANKL/OPG arány változatlanak bizonyult TNF α plusz IFN γ vagy IL-1 β plusz IFN γ kombinált kezelése hatására. IL-17 önmagában fokozta mind a RANKL mind az OPG expressziót, bár mindkettő faktort szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben találtuk az IL-17 stimulált tenyészetekben a TNF α vagy IL-1 β kezelt tenyészetekhez képest. A kombinált kezelése esetén pedig csak additív hatásokat sikerült kimutatni. Habár a szekretált sRANKL és OPG mennyiség egyenletesen és szignifikánsan magasabb volt RA FLS tenyészetekben, a RANKL/OPG arány hasonlóan bizonyult az RA és normál FLS kultúrák esetén azonos citokin koncentrációk használata esetén.

4.2 A RANKL és OPG expresszió és szabályozás vizsgálata egér szinóviális fibroblasztok esetében (I. Vizsgálat)

4.2.1. RANKL és OPG expresszió vad-típusú egér synovialis fibroblasztok által, normál és arthritikus ízületekben

A humán és egér rendszerek proinflammatorikus citokin kontrollált RANKL és OPG expressziójának összehasonlításához vad típusú és gén deficiens ($IFN\gamma^{-/-}$ és $IL-4^{-/-}$) BALB/c egerek normál (naiv) és arthritikus (PGIA) térd ízületeiből izolált synovialis fibroblasztokat használtunk (4-5 sejtciklust követően). Ahogy a humán sejtek esetén, arthritikus ízületekből származó egér synovialis fibroblasztok esetén is körülbelül kétszer annyi sRANKL és három-négyszeres mennyiségű OPG termelődik $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, vagy $IL-17$ hatására, mint a normál egér térdizületekből izolált fibroblasztok esetén. Humán sejtekkel összehasonlítva az egér synovialis fibroblasztok szignifikánsan több sRANKL ($p < 0.001$) és kevesebb OPG ($p < 0.05$) termeléssel válaszoltak az $IL-1\beta$ kezelésre a $TNF\alpha$ kezeléshez képest. Így tehát egerek esetén az $IL-1\beta$ kifejezettebb osteoclastogén hatással bíró citokin, mint a $TNF\alpha$. A vizsgált citokinek közül az $IL-17$ -nek önmagában jelentéktelen hatása volt a RANKL és az OPG expresszióra, mind naiv, mind arthritikus vad típusú BALB/c fibroblasztok esetén. A kombinációs kezelések esetén ($TNF\alpha$ plusz $IL-17$ vagy $IL-1\beta$ plusz $IL-17$) additív hatást nem tapasztaltunk. Mivel úgy tűnik, hogy az $IL-17$ -nek nincs additív hatása a sRANKL vagy OPG expresszióra nézve arthritikus vad típusú egerekben csak limitált szerepe valószínű a RANKL/OPG egyensúly fenntartásában pathológiás állapotok esetén.

4.2.2. Citokin-mediált RANKL és OPG expresszió gén-deficiens egerekből származó synovialis fibroblasztokban

A gén-deficiens állatok normál és arthritikus térdizületeiből izolált fibroblasztok sRANKL és OPG expresszióját illetően az általános elképzelés a vad típusú fibroblasztoknál (BALB/c) leírtakéval volt megegyező. Az exogén $IL-4$ és $IFN\gamma$ képesek voltak teljesen közömbösíteni a gén deficienciát szignifikánsan csökkentve ($p < 0.001$) mind a $TNF\alpha$ - mind az $IL-1\beta$ -indukált sRANKL szekréción, főleg arthritikus egér ízületekből származó fibroblaszt tenyészetek esetén. Az $IFN\gamma$ -val összehasonlítva az $IL-4$ -nek sokkal erősebb hatása volt az OPG szint növekedésére, mind $TNF\alpha$, mind az $IL-1\beta$ -stimulált fibroblaszt tenyészetek esetén. A legmarkánsabb különbség abban mutatkozott, hogy a gén deficiens egerekből származó fibroblasztok kettő-négyszer több RANKL és három-öttször kevesebb OPG termelésére voltak képesek, mint a vad típusú naiv vagy arthritikus egerekből származóak, azonos kísérleti körülmények között. Nyilvánvaló, hogy a sRANKL/OPG arány drámaian, akár egy-két nagyságrenddel is növekedett $IL-4$ - vagy $IFN\gamma$ gén-deficiens egerekben. Az $IL-17$ -nek szinergista

hatása volt az sRANKL expresszióra, amennyiben TNF α vagy IL-1 β kombinációban alkalmaztuk, és csökkentette vagy teljesen blokkolta az OPG szekréciót gén-deficiens fibroblasztokban.

4.2.3. RANKL és OPG szabályozás vad típusú és gén-deficiens arthritikus egerekben

A jellemzően jól összhangban lévő RANKL és OPG termelődés, melyet a normál és arthritikus fibroblaszt tenyészetek esetén tapasztalt (kezelt és kezeletlen esetekben is) állandó RANKL/OPG arány is jól mutat, teljesen érvénytelen a gén-deficiens synovialis fibroblasztok esetén, főként, amennyiben azokat kombinált proinflammatorikus citokinekkal kezeljük, jelezvén további szabályozó mechanizmusok fennállását in vivo körülmények esetén. Mind a RA betegség illetve az ennek megfelelő állatmodellek is autoimmun állapotnak tekinthetők, ahol a Th1/Th2 típusú citokin egyensúlya Th1 dominancia felé tolódik el, ezért mind a vad típusú, mind pedig az IL-4^{-/-}, IL-17^{-/-}, és IFN γ ^{-/-} egereket immunizáltuk porc proteoglikánnal, arthritis indukció céljából. Sem citokinek sem sRANKL nem volt izolálható a naiv egerek szérumból, az IFN γ , IL-4, és IL-17 pedig hiányzott a megfelelő gén-deficiens egerek szérumból. A mért szérumból citokinek (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IFN γ , és IL-17) szintje magasabb volt a proteoglikán indukált arthritissben szenvedő vad típusú egerekben, míg alacsonyabb volt (>50%) az IL-4^{-/-} egerekben. Az összes citokin szérumból szintje nagyon alacsonynak vagy mérhetetlennek bizonyult PG-immunizált IFN γ ^{-/-} egerekben. A szérumból IL-17 szintje alig volt mérhető arthritikus vad típusú egerek esetén. Az IL-4^{-/-} egerek sRANKL (mind a szabad, mind pedig az OPG-val komplexet alkotó) szérumból szintje kifejezetten magasnak bizonyult és meghaladta a vad típusú arthritikus vagy IL-17^{-/-} BALB/c egerekben detektált szinteket. Szemben a sRANKL-val az OPG szérumból szintek alig, szinte egyenletesen emelkedtek a vad típusú és a gén deficiens arthritikus egerekben a naivokhoz viszonyítva. Az OPG szintek arthritikus, vad típusú BALB/c egerekben hasonlóak voltak a nem immunizált IL-4^{-/-} egerekével, az OPG koncentráció alacsonyabb volt az IFN γ ^{-/-} naív és arthritikus egerekben összehasonlítva a vad típusú egerek esetén mért értékekkel. Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy habár a RANKL szint magasnak bizonyult minden PG immunizált egér esetén és elegendő mennyiségű OPG is jelen volt, mégis csak limitált mennyiségű RANKL volt OPG-vel „közömbösítve”, az IL-4^{-/-} egerek kivételével. Ez a fenomén egyértelműen a végtag extraktumok esetén volt észlelhető, ahol a RANKL/OPG arány a legmagasabb volt az IL-4^{-/-} egerek közül. Sokkal súlyosabb, korábbi kezdetű, masszív csont destrukcióval járó arthritis alakult ki az IL-4^{-/-} BALB/c egerekben. Még a harmadik PG injekciót követően is sokkal enyhébb típusú arthritis alakult ki az IFN γ ^{-/-} egerekben összehasonlítva az IL-17 deficiens BALB/c egerekben kialakuló PGIA súlyosságával.

4.3 A humán synovialis fibroblasztok által termelt angiogén faktorok vizsgálata

4.3.1. Steady-state mRNS szintek a synovialis szövetekben és az IFM-ban, valamint az angiogén faktorok kiválasztása

A kísérlet első fázisában a normál és rheumatoid ízületekből származó synovialis szövetminták kerültek analízisra. A génexpresszió és a megfelelő citokinek/kemokinek szekréciójának a szintjét hasonlítottuk össze a periprotetikus szövetekében mértekkel. Ehhez, kereskedelmi forgalomban lévő „Riboquat Multiprobe RNS” templátokat használtunk. Miután kiválogattuk a felregulálódott géneket a különböző RNS templátokon, három rendelésre készült templátot terveztünk a változó génexpresszió megmérésére, mind friss és explantált szövettenyészetek, mind pedig fibroblaszt tenyészetek esetén. A TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, VEGF és MCP-1 citokineken túl, további 4 vegyület mennyiségi meghatározására került sor normál, rheumatoid synovialis szövetek illetve IFM szövetek esetén.

4.3.2. A fibroblasztok angiogén faktorokat termelnek titánium partikulumok, citokinek, kemokinek és növekedési faktorok hatására

Kimutattuk, hogy a fibroblasztok aktiválódnak titánium, gyulladáscsökkentő citokinek, valamint CM-IFM stimuláció hatására, és partikulumokat fagocytálnak in vivo és in vitro körülmények között egyaránt. A választ mind transzkripciós mind transzlációs szinten vizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a Ti és CM indukálta génexpresszió hogyan korrelál, milyen szintű és milyen idő-kerettel bír, illetve, hogy mely angiogénikus faktorok és csont felszívódást okozó anyagokat kódoló gének érintettek a titánium és CM stimuláció esetén. A CM-IFM kezelt tenyészetek esetén az MCP-1, IL-6, IL-8, b-FGF, a-FGF, TGF β 1, VEGF, Cox-1 és Cox-2 expresszió bizonyult kimagaslónak, a nem kezelt tenyészetekhez viszonyítva, az expresszió még kifejezettebb fokozódását tapasztaltuk kombinált CM-IFM és titánium kezelés esetén. Összességében a kombinált kezelés additív hatást fejtett ki a VEGF, b-FGF és TGF β génexpresszióra, ami szinergista hatással bírt az IL-8 és Cox-2 esetében. A titániumnak önmagában nem volt hatása a Cox-1 expresszióra a fibroblasztokban, szemben CM-IFM-el, mely hatására 48 órás kezelést követően szignifikáns CM-IFM indukált Cox-1 gén expresszió fokozódást tapasztaltunk. Ezzel szemben mind a titániumnak, mind a CM-IFM-nek egy jöllehet kezdeti, de szignifikáns Cox-2 génexpressziót csökkentő hatását tapasztaltuk, mely 72 órát követően lett kimagasló.

4.3.3. Az angiogénikus faktorok transzkripcionális szabályozása a fibroblasztokban Ti és/vagy CM-IFM stimuláció hatására

Ahogy korábban említettük minden fibroblaszt (normál, rheumatoid szövetből származó vagy IFM) azonos reakciót mutatott az egyedüli (Ti vagy CM-IFM) és a kombinált kezelésekre. Ahhoz, hogy megértsük, hogy hogyan és milyen szinten érintett a fibroblaszt aktiváció Ti partikulumok, CM vagy kombinált kezelés hatására, inhibitorokat használtunk, a transzkripciós (Actinomycin D) és transzlációs (cycloheximide) események blokkolására, illetve a citoszkeleton dezorganizációjával gátoltuk az

intracelluláris protein transzportot és a fagocitózist. Minden alkalommal mikor az IL-6 és a VEGF szekréció megszűnt (pl.: brefeldin vagy monensin kezelés) egy negatív feed-back út hatására az IL-6 és VEGF specifikus mRNS expresszió csökkenését ($p < 0.01$) is tapasztaltuk. Más citokinek, kemokinek vagy növekedési faktorok különböző tulajdonságokkal bírtak, legtöbbjük főleg transzkripcionális szinten, és csak kis mértékben translációs szinten szabályozott. Az intracelluláris fehérje transzport és szekréció blokkolása nem gyakorolt hatást a transzkripcionális eseményekre. Csak a TGF β expresszió fokozódott monensin kezelt fibroblaszt tenyészetekben, amikor a táptalajba történő TGF β szekréció gátolt volt.

4.3.4. A VEGF transzkripcionális szabályozása a fibroblasztokban Ti és/vagy CM-IFM stimuláció hatására

Egy kiterjesztettebb vizsgálatban a VEGF expresszióját és szekrécióját – a három izoformát is beleértve – IFM fibroblasztok segítségével vizsgáltuk. A várakozásainknak megfelelően a VEGF génexpressziós szintje időfüggőnek bizonyult, és a legnagyobb hatást a CM-IFM kezelés váltotta ki titániummal kombinálva vagy anélkül. A CM-IFM kezelés hatására expresszáldott VEGF proteinek többsége az 55kDa (189 aminosav hosszú) izoforma volt, mely sejt felszíni, főként heparán szulfáthoz kötött, így csak sejt lizátumokból kimutatható.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A synovialis fibroblasztok citokin kontrollált osteoclastogén faktor termelése (I. Vizsgálat)

Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy mind a humán, mind az egér eredetű synovialis fibroblasztok alapvető forrásai az sRANKL és OPG fehérjéknek, valamint, hogy ezen mediátorok termelődése különböző citokinek, úgy mint TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-4, és IFN γ által szabályozott folyamat. Jelentékeny megállapítás, hogy az általunk talált proinflammatorikus citokin hatások nagyon hasonlóan bizonyultak a különböző eredetű synovialis fibroblasztok esetén. A proinflammatorikus citokinek (TNF α , IL-1 β , és IL-17) egyértelműen növelték a RANKL mRNAs és fehérje expressziót mind humán mind egér fibroblasztok esetén, történetesen ugyanolyan szinten, ahogy azt humán osteoblaszt és egér lép T-sejt tenyészeteken mértük. Ez a citokin indukált sRANKL expresszió szoros korrelációt mutatott az emelkedett OPG expresszióval.

Ezen eredmények azt mutatják, hogy a RANKL termelés inkább citokin szabályozott, mint sejt specifikus folyamat, annak ellenére, hogy a különböző sejt típusok eltérően válaszolnak a citokin stimulusokra. Azzal szemben, hogy számos faktor részt vesz az osteoclastogenezis folyamatában, a csont-protéktív és csont-resorptív antagonisták citokinek és növekedési hormonok repertoárja limitált. Ebben a vizsgálatban az IL-4 és IFN γ citokineket vizsgáltuk, hogy igazoljuk osteoclastogenezis gátló képességüket és, hogy megértsük, hogy hatnak ezen citokinek a RANKL/OPG arányra in vitro citokin

stimulált humán synovialis fibroblasztokban és gén deficiens egerekben a gyulladásoz ízületi destrukció folyamatában.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az IL-4 szelektíven gátolja a TNF jeladást, közvetlenül hatva mind az osteoclast prekursor sejtekre, mind az érett osteoclastokra és reverzibilisen gátolja az osteoclastogenezist a NF- κ B és JNK aktiváció gátlása révén STAT-6 dependens módon. Az IL-4 gátolja a synovialis fibroblasztok általi RANKL expressziót, és ezzel szimmultán növeli az OPG szerkréciót. A RANKL/OPG arány drámai elmozdulása direkt hatással van az osteoclast progenitor sejtek differenciálódására és gátolja a T sejtek felszínhez kötött molekulák expresszióját. Ezen vizsgálatunkban megfigyeltük, hogy az IL-4 önmagában, vagy kombinációban egyéb proinflammatorikus citokinnel, csökkenti a RANKL expressziót és szimmultán növeli az OPG expressziót fibroblasztokban. További megerősítés céljából gén deficiens egér fibroblasztokat vizsgáltunk, mely során a RANKL expresszió kifejezett up-regulációját és az OPG termelés csökkenését tapasztaltuk, IL-4 hiányában. Ezáltal a RANKL/OPG arány szignifikánsan emelkedett a vad típusú sejtekben tapasztaltakhoz viszonyítva. Ez az emelkedés még látványosabban kimutatható volt a proteoglikán indukált arthritises vad típusú versus az arthritises gén deficiens egerekből származó mancs-extraktumok esetén. Ez jól magyarázza, miért tapasztaltunk szokatlanul agresszív csont felszívódást az IL-4 deficiens egerekben, támogatva azt a hipotézist, mely szerint az IL-4 az egyik legpotensebb antiosteoclastogén faktor, mely a lokális csontfelszívódás folyamatában részt vesz. Habár az IFN γ szintén csökkentette a proinflammatorikus citokin indukálta RANKL gén és protein expressziót, ez a Th1-típusú citokin nincs hatással, vagy inkább csökkentette az OPG szerkréciót proinflammatorikus citokinek jelenlétében. Ezen eredmények, mind a gén, mind pedig a fehérje expresszió szintjére nézve állandónak, egyenletesnek bizonyultak a különböző normál és RA humán synovialis fibroblaszt tenyészeteken, és PGIA-s IFN γ ^{-/-} egereken végzett kísérletek esetén is, és ellentmondanak az IFN γ feltételezett anti osteoclastogénikus effektusának.

Elmondhatjuk, hogy habár a különböző proinflammatorikus citokinek látszólag bebizonyított osteoclastogén hatása van a RANKL up-regulációnak köszönhetően, ezen hatásokat közömbösíti az OPG növekvő expressziója, és az, hogy a kiválasztódott sRANKL többsége OPG-vel alkotott komplexben található. A TNF α és az IL-1 β , valamint az IL-17 talán kevésbé kifejezett, osteoclastogenezis elősegítő hatása elsősorban az antiinflammatorikus hatású IL-4 által szabályozott, sokkal inkább mint az IFN γ , avagy egyéb napjainkban vizsgálat citokin által.

Összefoglalva elmondható hogy a synovialis fibroblasztok erősen aktivált sejtek a gyulladt synoviumban, valamint a citokin gazdag sejtörnyezetük lehetőséget ad robosztus RANKL/OPG termelésre in vivo. A RANKL és az OPG expresszió elsősorban pro- és antiinflammatorikus citokinek által regulált folyamat, mely jelezheti a synovialis fibroblasztok csonthomeosztázis felborulásában játszott szubsztanciális szerepét a gyulladásoz környezetben.

5.2. A synovialis fibroblasztok angiogenezisben játszott szerepe (II. Vizsgálat)

E második tanulmány első kísérleti fázisához szinoviális szöveteket gyűjtöttünk normál, rheumatoid, osteoarthritis izületekből, valamint interfaciális membránokból, hogy megmérjük a gén expressziós profilt a friss és explantált kultúrákban, a gyulladáshoz citokinek és növekedési hormonokat a médiumokban, valamint detektáltuk a citokinek, kemokinek és növekedési hormonok hatására bekövetkező fibroblaszt választ.

Végül soron a periprotetikus mikrokörnyezet nagyon hasonlóan bizonyult a rheumatoid szövethez kiegészítve egy még drasztikusabb környezeti tényezővel: a periprotetikus üreg folyamatosan frissen generált, nem lebontható, szemcsés kopási törmelék bocsát ki magából. Ezen szemcsés partikulumok és/vagy különböző citokinek (CM-IFM) stimuláló hatására számos angiogénikus és osteoclastogénikus faktor (VEGF, MCP-1, M-CSF, IL-8, Cox-1, Cox-2, a-FGF, b-FGF, LIF-1, RANKL és OPG) overexpresszióját sikerült kimutatnunk humán IFM fibroblasztokban. A periprotetikus szövet sejtjei, így a fibroblasztok is erős aktiváció alatt állnak, a folyamatosan képződő szemcsés kopási törmeléknek köszönhetően, mely egy krónikus gyulladáshoz állapotot tart fenn.

A fibroblasztok aktív részesei e káros folyamatnak, hiszen (i) folyamatos stimulációnak vannak kitéve a szemcsés kopási törmelék, illetve az aktivált makrofágok, osteoblasztok és önmaguk által termelt citokinek és növekedési hormonok következtében, (ii) gátolják az osteoblaszt funkciót, (iii) direkt és indirekt módon elősegítik az osteoclast aktivációt.

Fibroblasztok különböző stimulusok hatására nagy mennyiségű VEGF termelésével reagálnak, azonban a Flt-1 és KDR/Flk-1 VEGF receptorok hiánya végett nem reagálnak a VEGF stimulusra. Exogén TNF- α szignifikánsan felszabályozza a IL-1 β , IL-6, M-CSF, MCP-1 and RANKL, és VEGF termelődését.

Mindent egybevéve, a makrofág és fibroblaszt aktiváció egy természetes folyamat az interfaciális membránban, és a fibroblaszt aktiváció angiogenezisre és osteoclastogenezisre kifejtett hatása legalább olyan döntő és kritikus, mint maga a makrofág aktiváció. Ráadásul az aktivált fibroblasztok nagy mennyiségű csont-felszívó metalloproteinázokat termelnek, mely a szövet-specifikus metalloproteináz inhibitor csökkent termelődésével és a fibroblaszt indukált csökkent osteoblaszt funkcióval, a fibroblasztok és az általuk termelt faktorok jelentős szerepét sugallja a periprotetikus osteolysis kialakulásában.

6. ÚJ EREDMÉNYEK

Humán és egér synovialis fibroblasztok által termelt osteoclastogén factorok (Study I.)

- A kísérletünk során bemutattuk, hogy a human és egér eredetű synovialis fibroblasztok a sRANKL és OPG szubsztanciális forrásai
- A synovialis fibroblasztokban végbemenő sRANKL és OPG expresszió pro és antiinflammatorikus citokinek által szabályozott folyamat
- sRANKL termelés inkább citokinszabályozott, mint sejt specifikus folyamat
- sRANKL expresszió szorosan korrelál az emelkedett OPG expresszióval
- Megfigyeltük, hogy az IL-4 önmagában vagy egyéb proinflammatorikus citokinekkal kombinációban csökkentette a RANKL produkciót és ezzel párhuzamosan növelte az OPG expressziót fibroblasztokon. Megfigyelésünk további megerősítése céljából gendeficiens egér synovialis fibroblasztokat is vizsgáltunk. IL-4 hiánya esetén magasan felregulált RANKL expressziót, ezzel egyideűleg csökkent OPG termelést tapasztaltunk. Ezáltal a RANKL/OPG arány szignifikánsan emelkedett a vad típusú sejtekkel összehasonlítva. Ez magyarázatot ad arra, hogy miért tapasztaltunk feltűnően agresszív csont felszívódást IL-4 hiányos egerekben, alátámasztva hipotézisünként miszerint az IL-4 az egyik legpotensebb antiosteoclastogén faktor a lokális csontvesztés folyamatában.
- Megcáfoltuk azt az elképzelést, mely szerint az IFN- γ erős antiosteoclastogén hatással bír, hiszen az IFN- γ csökkentette a proinflammatorikus citokinek általi RANKL protein expressziót, ám ez a Th1 típusú citokin nem volt hatással, sőt csökkentette az OPG szekréción proinflammatorikus citokinek jelenlétében.

Humán synovialis fibroblasztok által termelt angiogenikus faktorok(Study II)

- második vizsgálatunkban számos angiogenikus és osteoclastogén factor (VEGF, MCP-1, M-CSF, IL-8, Cox-1, Cox-2, a-FGF, b-FGF, LIF-1, RANKL és OPG) overexpresszióját igazoltuk human IFM fibroblasztokban szemcsés kopási törmelék és/vagy citokin stimuláció hatására.
- IFM-ből vagy rheumatoid synoviumból származó sejtek szignifikánsan több bioreaktív vegyületet termeltek in vitro, mint a normál synovialis szövet
- Habár a fibroblasztok nagy mennyiségű VEGF termelésével reagálnak számos stimulusra, ők maguk nem válaszolnak a VEGF stimulusra, köszönhetően a Flt-1 and KDR/Flk-1 sejt felszíni VEGF receptorok hiányának
- Mind az MCP-1 mind az IL-6 jó markere a fibroblaszt aktivációnak, és mindkét szekretált komponens indirect, osteoclast aktiváló hatással rendelkezik.
- Fibroblasztoknak a TNFRp55-ön keresztül szerepük lehet a RANKL-dependens osteoclastogenezisben, TNF α , IL-1 és növekedési hormon receptoraikon keresztül pedig az IFM neovascularizációjának folyamatában
- Tehát számos IFM-ban detektált angiogenikus és osteoclastogén faktor eredhet az aktivált fibroblasztokból. E fibroblasztok és makrofágok az osteoclastok szomszédságában helyezkednek el, az aktivált fibroblasztok RANKL, VEGF és M-CSF termelésük következtében kulcsfontosságú sejt-ként vannak jelen a periprotetikus térben lejátszódó angiogenesis és osteoclastogenezis folyamatában.

7. BIBLIOGRÁFIA

Folyóiratban megjelent publikációk

Illés T, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeöy S; *Breakthrough in three-dimensional scoliosis diagnosis: significance of horizontal plane view and vertebra vectors*. Eur Spine J. 2011 Jan;**20**(1):135-43. [IF:1,956]

Tunyogi-Csapó M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT.: *Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption*. Arthritis Rheum. 2008 Aug;**58**(8):2397-408 [IF:6.787]

Tunyogi-Csapó M, Koreny T, Vermes C, Galante JO, Jacobs JJ, Glant TT.: *Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis*. J. Orthop Res. 2007 Oct;**25**(10):1378-88 [IF:2.437]

Cao Y, Brombacher F, **Tunyogi-Csapó M**, Glant TT, Finnegan A: *Interleukin-4 regulates proteoglycan-induced arthritis by specifically suppressing the innate immune response*. Arthritis Rheum. 2007 Mar;**56**(3):861-70. [IF:7.677]

Adarichev VA, Vermes C, Hanyecz A, Ludanyi K, **Tunyogi-Csapó M**, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT.: *Antigen-induced differential gene expression in lymphocytes and gene expression profile in synovium prior to the onset of arthritis*. Autoimmunity. 2006 Dec;**39**(8):663-73 [IF:2.033]

Koreny T, **Tunyogi-Csapó M**, Gál I, Vermes C, Jacobs JJ, Glant TT. :*The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis*. Arthritis Rheum. 2006 Oct;**54**(10):3221-32. [IF:7.751]

Kaplan CD, Cao Y, Verbeek JS, **Tunyogi-Csapó M**, Finnegan A.: *Development of proteoglycan-induced arthritis is critically dependent on Fcγ receptor type III expression*. Arthritis Rheum. 2005 May;**52**(5):1612-9. [IF:7.421]

Bárdos T, Szabó Z, Czipri M, Vermes C, **Tunyogi-Csapó M**, Urban RM, Mikecz K, Glant TT.: *A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis. 2005 Jul;**64**(7):981-7. [IF:6.956]

összegzett impakt faktor: **43,02**

Publikált absztraktok

Tunyogi-Csapó M, Kis-Tóth K, Vermes Cs, Radács M, Farkas B, Glant T.T, Illés T: *The role of synovial fibroblasts in pathologic bone resorption: RANKL and OPG expression by human and mouse fibroblasts in arthritis*. Bone October 2008 (Vol. 43 S1, Page S40) [IF: 4.145]

Koreny T, **Tunyogi-Csapó M**, Vermes C, Gal I, Jacobs J.J, Glant T.T: *The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis*, Orthopedic Transactions, 2006, 31: 360

Adarichev V.A, Ludanyi K, Nesterovitch AB, **Tunyogi-Csapó M**, Mikecz K, Finnegan A, Glant T.T; *Genetic Control of Immunoglobulin Isotypes in Proteoglycan-induced Murine Arthritis (PGIA) Arthritis Rheum*, 2006, Arthritis & Rheumatism 2006;54(9) Abstract Supplement 53 No:302 [IF: 7.751]

Tunyogi-Csapó M, Koreny T, Polgár A, Jacobs J.J, Nyárády J, Glant TT; *Synovial Fibroblast as a Potential Regulator of Bone Resorption in Arthritic Joint*, Arthritis Rheum, 2006, Arthritis & Rheumatism 2006;54(9) Abstract Supplement 53, No:1381 [IF: 7.751]

Tunyogi Csapó M, Ludányi K, Koreny T, Radács M, Glant TT; *RANKL Expression by Fibroblasts is Controlled by IL-4 via Stat-6 Mediated Pathway Arthritis Rheum*, 2006, 53 No:1278 [IF: 7.751]

Doodes P; Cao Y, **Tunyogi-Csapó M**, Finnegan A; *T-bet is Required for IFN- γ Production and IL-17 Inhibition in Proteoglycan Induced Arthritis*, Arthritis Rheum, 2006, 53 No:300 [IF: 7.751]

Adarichev VA, Szabo Z, Ludanyi K, Nesterovitch A, Murad Y, **Tunyogi-Csapó M**, Mikecz K, Glant TT; *Two Loci on Chromosome 15 Independently Control Incidence and Severity of Murine Proteoglycan-Induced Arthritis (PGIA) in Sex-Biased Fashion: Congenic Approach Arthritis Rheum*, 2005, 52 [IF: 7.421]

Vegvari A, Adarichev VA, Szabo Z, Ludanyi K, Nesterovitch AB, Murad Y, **Tunyogi-Csapó M**, Mikecz K, Glant TT; *Chromosomes 3, 7, 8, 10 or 19 on Balb/c Background Confirm the Loci Positions and Effects Upon Clinical and Immunological Phenotypes of Murine Proteoglycan-Induced Arthritis (PGIA)*, Arthritis Rheum, 2005, 52 [IF: 7.421]

Koreny T, Vermes C, **Tunyogi-Csapó M**, Polgar A, Jacobs J.J, Glant T.T: *The role of fibroblasts and fibroblast-derived RANKL in periprosthetic osteolysis*, Arthritis and Rheumatism, 2005, 52: S526 [IF: 7.421]

Szabo Z; Vegvari A; Szanto S; Adarichev V.A; Nesterovitch A.B; **Tunyogi-Csapó M**; Glant T.T: *Spondylitis induced by systemic immunization with cartilage proteoglycan aggrecan in genetically susceptible inbred strains and their F1 and F2 hybrids*, 2004 Arthritis Rheum. 50 S212 [IF: 7.332]

Összegzett impakt faktor: **64.744**

További előadások és poszter prezentációk

Tunyogi-Csapó M; Somoskeőy Sz, Illés T; *Frontal and Sagittal Plane Angulation Measurements Based on Vertebra Vectors*, 17th International Meeting on Advanced Spine Techniques (IMAST), Toronto, Canada, 2010.07.20-24

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *Treatment options of late posttraumatic spinal deformities*, 8th Central European Orthopedic Congress, 2010, Pécs, Hungary

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *Experiences gained with the treatment of spondyloptosis*, 8th Central European Orthopedic Congress, 2010, Pécs, Hungary

Illés T, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz; *The role of vertebra vector in characterization and quantification of vertebral position and orientation the horizontal plane*, 8th Central European Orthopedic Congress, 2010, Pécs, Hungary

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *Degeneratív szegmentális instabilitások kezelése intézetünkben*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2010, Pécs

Illés T, **Tunyogi-Csapó M**, Bogyó Cs, Somoskeőy Sz; *A scoliotikus gerinc 3D megjelenítése és jellemzése "csigolyavektorok" használatával: előzetes klinikai tanulmány*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2010, Pécs

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *A spinopelvicus egyensúly szerepe a spondylolisthesis kialakulásában*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2010, Pécs, Hungary

Bogyó Cs, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz, Illés T; *Early onset scoliosis és kezelési eredményei*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2010, Pécs

Bogyó Cs, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz, Illés T; *A congenitalis gerinc deformitások kezelésével szerzett tapasztalataink*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2010, Pécs

Somoskeőy Sz, **Tunyogi-Csapó M**, Bogyó Cs, Illés T; *EOS 2D/3D: A new era in three-dimensional diagnosis of spinal deformities*; 8th Central European Orthopedic Congress, 2010, Pécs, Hungary

Illés T, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz; *A gerincdeformitások 3D megjelenítése: Csigolyavektor*, IV. Magyar Biomechanikai Konferencia, Pécs, 2010

Somoskeőy Sz, **Tunyogi-Csapó M**, Bogyó Cs, Illés T; *Frontal and sagittal plane angulations measurements based on vertebra vectors*, 8th Central European Orthopedic Congress, 2010, Pécs, Hungary

Naumov I, Vámhidy L, Bukovecz T, **Tunyogi-Csapó M**; *Minimal invasive acut screw fixation in the pelvic fracture treatment*, 10th European Congress of Trauma and Emergency Surgery, 2009, Antalya Turkey

Tunyogi-Csapó M, Vermes Cs, Glant T.T, Illés T; *Humán és egér szinoviális fibroblasztok citokin kontrollált RANKL és OPG expressziója: Fibroblaszt mediálta pathológiás csontreszorpció*, 9th Hungarian Congress of Osteology, 2008, Balatonfüred, Hungary

Tunyogi-Csapó M, Koreny T, Vermes Cs, Patczai B, Vámhidy L, Nyárády J, Glant TT; *A synovialis fibroblast mint a patológiás csontreszorpció potenciális regulátora*, Magyar Ortopéd Társaság éves kongresszusa, 2007, Nyíregyháza

Tunyogi-Csapó M, Koreny T, Polgár A, Jacobs J.J, Nyárády J, Glant TT; *Synovial Fibroblast as a Potential Regulator of Bone Resorption in Arthritic Joint*, The 70th annual meeting of the American College of Rheumatology and the 41st annual meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, in Washington DC, 2006

Tunyogi Csapó M, Ludányi K, Koreny T, Radács M, Glant TT; *RANKL Expression by Fibroblasts is Controlled by IL-4 via Stat-6 Mediated Pathway*, The 70th annual meeting of the American College of Rheumatology and the 41st annual meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, in Washington DC, 2006

Tunyogi-Csapó M, Naumov I, Vámhidy L, Nyárády J; *Nagy energiájú tibia proximális vég törések kezelése MIPPO-val*, Osztrák és Magyar Traumatológus Társaság Közös Kongresszusa 2002.10.03-05. Sopron

Tunyogi-Csapó M, Naumov I, Vámhidy L; *„ Proximal row carpectomy”- csuklótáji részleges amputáció megoldására*, Magyar Kézsebész Társaság IX. Kongresszusa, Debrecen, 2002

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni megbecsülésemet **Professzor Glant T. Tibornak**, mentoromnak, aki bevezetett a valódi akadémiai munkába és folyamatosan fenntartotta lekesedésemet a kutatás és a tudomány iránt. Ez az dolgozat nem jöhetett volna létre az ő vezetése és támogatása nélkül.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Professzor Illés Tamásnak** aki bevezetett az ortopédia és a gerincsebészet világába. Az Ő álhatatos bátorítása, támogatása és hasznos tanácsai nélkül nem tudtam volna megvalósítani a munkámat.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani **Vámhidy László Tanár Úrnak**, aki felettesem és mentorom volt a traumatológiai évek során, a folyamatos atyai támogatásáért és bátorításáért.

Ugyancsak szeretném megköszönni korábbi feletteseimnek **Nyárády József**, valamint **Bellyei Árpád Professzoroknak**, akik átsegítettek a pályakezdési nehézségeken és lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat barátomnak, **Dr. Bárdos Tamásnak** aki biztosította azt a lehetőséget számomra, hogy eltölthettem majdnem 3 évet Chicagóban és természetesen köszönöm a baráti segítségét. Köszönetet mondok **Dr. Vermes Csaba** és **Dr. Nót Gergely. László** kollégáimnak a baráti támogatásért és az értékes eszmecseréért.

Szintén köszönettel tartozom az Orthopédiai és Traumatológiai Klinika minden munkatársának, a Dr. Glant Tibor vezette labor összes munkatársának, főként **Professzor Mikecz Katalinnak, Dr. Koreny Tamásnak, Radács Mariannak, Dr. Szabó Zoltánnak, Dr. Végvári Anikónak** és **Kis-Tóth Katalinnak** a segítségükért és hasznos tanácsaikért.

És végül szeretném kifejezni őszinte köszönetemet és végtelen hálámat a családomnak, szüleimnek és feleségemnek a szeretetükért, a sok áldozatért és a szüntelen bátorításért.