

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ
ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ
ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ

ΜΑΡΙΑ-ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΑΣΤΡΙΝΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Στα παιδιά μου

Ρούσο και Ερατώ

ΕΝΟΤΗΤΕΣ

1. ΣΥΝΟΨΗ

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.2 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΜΥΕΛΙΚΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.3 ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

2.3.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

2.3.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ

2.3.3 ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΑΡΘΡΩΣΗ

2.4 ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ

4.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

4.3 ΔΥΝΑΜΙΚΟ IN VITRO ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ

4.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

4.6 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

4.7 ΜΗΚΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΟΥΣ

4.8 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

4.8.1 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

4.8.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

7. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1.

ΣΥΝΟΨΗ

Σκοπός της μελέτης

Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δυνητικοί θεραπευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών αυτοάνοσων ασθενειών. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια αυτοάνοση νόσος, που χαρακτηρίζεται κυρίως από αρθρικές βλάβες, προκαλούμενες από το φλεγμονώδες αρθρικό περιβάλλον. Θεωρητικά τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αφενός στην επιδιόρθωση της κατεστραμμένης άρθρωσης, βάση των αναγεννητικών ιδιοτήτων τους και αφετέρου για να επανα-ρυθμίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών, καθώς διαθέτουν ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Η παρούσα μελέτη διερευνά τη συχνότητα, τη λειτουργικότητα, το μοριακό προφίλ και τη δυνατότητα διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών σε ασθενείς με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Μεθοδολογία

Με δοκιμές περιοριστικής αραίωσης υπολογίστηκε η συχνότητα των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων, σε ασθενείς και σε υγιή άτομα. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως και τα χαρακτηριστικά επιβίωσης, εκτιμήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων υπολογίστηκε με δοκιμασίες μέτρησης του χρόνου διπλασιασμού, ενώ το κλωνογονικό δυναμικό τους εκτιμήθηκε με δοκιμασίες σχηματισμού ινοβλαστικών αποικιών. Η ικανότητα της *in vitro* διαφοροποίησης των κυττάρων προς τρεις κυτταρικές γενεαλογίες, την οστεοβλαστική, τη χονδρογονική και τη λιπογονική, μετρήθηκε με ιστοχημικές χρώσεις καθώς και με εκτίμηση εξειδικευμένης γονιδιακής έκφρασης. Τα μοριακά χαρακτηριστικά αξιολογήθηκαν όσον αφορά την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών με δοκιμές ελέγχου γονιδιακής έκφρασης καθώς και με δοκιμές ELISA, ενώ το σχετικό μήκος του τελομερούς των κυττάρων μετρήθηκε με τη μεθοδολογία real-time PCR.

Αποτελέσματα

Τα αρχέγονα μυελικά μεσεγχυματικά κύτταρα των ασθενών (n=26) και των υγιών ατόμων (n=21)

ήταν παρόμοια όσον αφορά τη συχνότητα στο μυελό, την ικανότητα διαφοροποίησης, την επιβίωση και τον φαινότυπο. Εντούτοις τα κύτταρα των ασθενών, παρουσίασαν διαταραγμένο αναπτυξιακό δυναμικό, καθώς και πρόωρη για την ηλικία τους ελάττωση στο μήκος των τελομερών στα χρωμοσώματά τους. Διαπιστώθηκε ότι οι προηγούμενες θεραπείες (μεθοτρεξάτη, κορτικοστεροειδή, αντι-κυτταροκίνες και βιολογικοί παράγοντες ή άλλα αντιφλεγμονώδη φάρμακα) δεν σχετίζονται με την διαταραχή του αναπτυξιακού δυναμικού των κυττάρων. Το ελαττωμένο αναπτυξιακό δυναμικό πιθανόν οφείλεται σε πρόωρη κυτταρική γήρανση, που ενδεχομένως προκαλείται από το φλεγμονώδες μυελικό μικροπεριβάλλον.

Συμπέρασμα

Παρά τους περιορισμούς που σχετίζονται με το ελαττωμένο κλωνογονικό και πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων, τα συνολικά ευρήματα υποστηρίζουν μάλλον τη χρήση των αυτόλογων αρχέγονων μυελικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε θεραπευτικές προσεγγίσεις σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

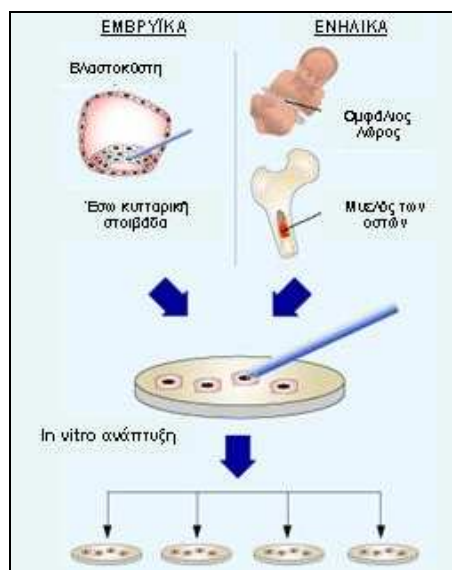
2.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ο όρος αρχέγονα κύτταρα (stem cells) χρησιμοποιείται για μια πληθώρα κυτταρικών τύπων. Τα κύτταρα αυτά, ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τύπο τους, μοιράζονται δύο κοινές χαρακτηριστικές ιδιότητες. Πρώτον, διαθέτουν ικανότητα απεριόριστης ή έστω παρατεταμένης αυτό-ανανέωσης και δεύτερον, έχουν την ικανότητα να παράγουν, μέσα από διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης, μια ποικιλία εξειδικευμένων κυτταρικών τύπων¹⁻³. Αυτό πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται μέσω ασύμμετρων μιτωτικών διαιρέσεων.

Καταρχάς κατατάσσουμε τα αρχέγονα κύτταρα σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο ενός οργανισμού: στα αρχέγονα κύτταρα των εμβρύων και των ενηλίκων. Τα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα (embryonic stem cells – ESC) δημιουργούνται κατά τις πρώτες ημέρες της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα θηλαστικά. Στην αρχή είναι ολοδύναμα κύτταρα (totipotent), με δυνατότητα διαφοροποίησης ουσιαστικά σε όλες τις κυτταρικές γενεαλογίες του οργανισμού. Στο εμβρυϊκό στάδιο της βλαστοκύστης απαντώνται στην εσωτερική κυτταρική μάζα, τον εμβρυοβλάστη (εικόνα 1)⁴. Στη συνέχεια, καθώς προχωρά η εμβρυϊκή ανάπτυξη, χάνουν την παντοδυναμία τους, αποκτώντας πιο περιορισμένες ικανότητες διαφοροποίησης και γίνονται πολυδύναμα (pluripotent), όπως τα κύτταρα που υπάρχουν στο αμνιακό υγρό, τον ομφάλιο λώρο ή και τον πλακούντα.



Εικόνα 1: Αρχέγονα κύτταρα στα έμβρυα και τους ενήλικες.

Τα αρχέγονα κύτταρα των ενηλίκων γενικά είναι περισσότερο διαφοροποιημένα από τα εμβρυϊκά, παρουσιάζοντας μια πολυδυναμικότητα (multipotency) που εκφράζεται ως ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους¹. Απομονώνονται από τους περισσότερους ιστούς και ανάλογα με τον ιστό διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους που σχετίζονται γενεαλογικά με τον ιστό προέλευσης. Πιστεύεται ότι κυρίως χρησιμεύουν σαν αποθήκες κυττάρων, έτοιμων να κινητοποιηθούν και να διαφοροποιηθούν, ανταποκρινόμενα σε μοριακά σήματα που στοχεύουν στη φυσιολογική αναγέννηση και ομοιόσταση του ιστού (πίνακας 1). Λόγω των εντυπωσιακών ιδιοτήτων τους, τα αρχέγονα κύτταρα αποτελούν ένα εντατικό πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ο πλέον χαρακτηρισμένος σήμερα πληθυσμός ενηλίκων αρχέγονων κυττάρων είναι των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic stem cells - HSC) του μυελού των οστών⁵.

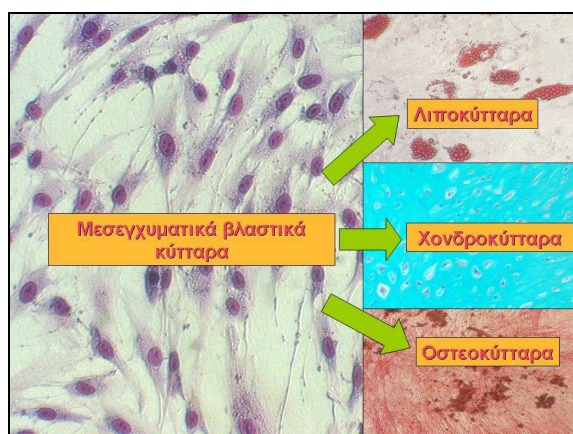
Πίνακας 1: Κατηγορίες αρχέγονων κυττάρων⁶		
Κατηγορία	Τοποθεσία απομόνωσης	Παραγόμενα κύτταρα ή ιστοί
Haematopoietic stem cells	Bone marrow (BM), peripheral blood	BM and blood cells
Mesenchymal stem cells	BM, synovial membrane / fluid, muscle, cartilage, bone, fat, placenta, amniotic fluid, umbilical cord	BM stroma, bone, cartilage, fat
Neural stem cells	Ependymal cells, astrocytes of the CNS	Neurons, astrocytes, oligodendrocytes
Hepatic stem cells	In or near the terminal bile ductules (canals of Hering)	Oval cells that subsequently generate hepatocytes and ductular cells
Pancreatic stem cells	Intraislet, nestin positive cells, oval cells, duct cells.	Beta cells
Skeletal-muscle stem cells (satellite cells)	Muscle fibers	Skeletal muscle fibers
Skin stem cells (keratinocytes)	Basal layer of epidermis, bulge zone of the hair follicles.	Epidermis, hair follicles
Lung epithelial stem cells	Tracheal basal and mucus-secreting cells, bronchiolar Clara cells, alveolar type II pneumocytes	Mucous and ciliated cells, type I and II pneumocytes
Intestinal epithelial stem cells	Epithelial cells located around the base of each crypt	Paneth's cells, brush-border enterocytes, mucus secreting goblet cells, enteroendocrine cells of villi

2.2 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΜΥΕΛΙΚΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στον μυελό των οστών εδράζει και ένας άλλος τύπος αρχέγονων κυττάρων, τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem cells - MSC), επίσης γνωστά σαν μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (mesenchymal stromal cells)⁷⁻¹⁰. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίστηκαν αρχικά από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του, πριν από 30 και πλέον χρόνια¹¹. Εδράζουν στο μυελικό στρώμα, παρέχοντας τα αναγκαία υποστηρικτικά θρεπτικά στοιχεία (κυτταροκίνες, εξωκυττάρια ουσίες, αλλά και τα διάφορα κυτταρικά στοιχεία) απαραίτητα για την φυσιολογική αιμοποίηση^{12;13}. Έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορα κύτταρα συνδετικού ιστού, όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, κύτταρα τένοντα, λιποκύτταρα και κύτταρα λείων μυϊκών ινών (εικόνα 2)^{11;14-16}. Εκτός από το μυελό, τα MSC απαντώνται και σε διάφορους άλλους ιστούς, όπως το λίπος, ο χόνδρος, το οστό, κ.ά.¹⁷⁻²². Τα MSC πιστεύουμε ότι συμμετέχουν στη φυσιολογική αναγέννηση/επιδιόρθωση των ιστών. Καθώς εδράζουν σε διάφορους ιστούς μπορούν να ανταποκριθούν σε τοπικές ομοιοστατικές ανάγκες ή/και τραυματισμούς και να εισέλθουν σε ένα στάδιο ενεργοποίησης/πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα τη διατήρηση/αναγέννηση του ιστού. Πιστεύεται ότι καθώς ο αριθμός των MSC ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου²³, η ιστική ανάπτυξη/αναγέννηση γίνεται λιγότερο αποτελεσματική σε μεγάλες ηλικίες.

Τα μυελικά MSC επηρεάζουν το τοπικό περιβάλλον τους εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες, ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται οι stem cell factor (SCF), ιντερλευκίνη (IL)-6, leukemia inhibitory factor (LIF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) και macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Επίσης παράγουν χημειοκίνες, όπως IL-6, IL-11, IL-15, LIF, και stromal derived factor-1 (SDF1). Μόρια συνάφειας, όπως intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), VCAM-1, CD44, καθώς και μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, όπως φιμπρονεκτίνες, κολλαγόνο και γλυκοζαμινοκλυκάνες. Έτσι πιστεύεται ότι κατευθύνουν και επηρεάζουν το κυτταρικό πεπρωμένο των γειτονικών αιμοποιητικών κυττάρων²⁴⁻²⁶, αλλά και το δικό τους.

Σε μια τυπική δυσδιάστατη *in vitro* καλλιέργεια έχουν ατρακτοειδές σχήμα ομοιάζοντας με ινοβλάστες. Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSC) δεν διαθέτουν εξειδικευμένους και μοναδικούς επιφανειακούς κυτταρικούς δείκτες, όπως π.χ. συμβαίνει με τα αιμοποιητικά, για τούτο και βιβλιογραφικά η περιγραφή τους ποικίλει. Η ποικιλία των περιγραφέντων χαρακτηριστικών τους μπορεί να εξηγηθεί με βάση την προέλευση, τη μεθοδολογία απομόνωσης ή τις συνθήκες της *in vitro* ανάπτυξης στα διάφορα εργαστήρια. Υπάρχουν πάντως κάποια κοινά βιβλιογραφικά χαρακτηριστικά των MSC. Γενικά εκφράζουν τα επιφανειακά αντιγόνα Stro-1, CD29 (β1-ιντεγκρίνη), CD44 (υποδοχέας υαλουρονικού), CD73 (μεμβρανική εκτο-5'-νουκλεοτιδάση), CD90 (Thy-1), CD105 (υποδοχέας του transforming growth factor-β, TGFβ-R), CD106 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), CD146 (μόριο συνάφειας) και CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM)²⁷⁻³⁴, ενώ παράλληλα δεν εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες αιμοποιητικών ή ενδοθηλιακών κυττάρων, CD11b (integrin alpha M chain), CD14 (μονοκυτταρικός δείκτης), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1), CD34 (δείκτης προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων) και CD45 (παν-λευκοκυτταρικό αντιγόνο)³⁵. Ο πραγματικός *in vivo* φαινότυπος των κυττάρων στο μυελό προς το παρόν ερευνάται και δύο ακόμη δείκτες έχουν προκύψει τελευταία, το CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR) και το SSEA-4 (carbohydrate embryonic stem cell antigen)³⁶⁻³⁸.



Εικόνα 2: Τα μυελικά MSC μπορούν να διαφοροποιηθούν σε περιορισμένους κυτταρικούς τύπους. Τα MSC (κυτταρική χρώση Giemsa), υπό την επίδραση των κατάλληλων σημάτων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα (χρώση Oil Red O), χονδροκύτταρα (χρώση Alcian blue) και οστεοβλάστες (χρώση αλκαλικής φωσφατάσης-νιτρικού αργύρου).

Εκτός από την ικανότητα διαφοροποίησης τα MSC διαθέτουν και άλλες εντυπωσιακές ιδιότητες. Διαφεύγουν από την αλλογενή αναγνώριση των T-κυττάρων. Το προνόμιο αυτό οφείλεται στο ότι δεν εκφράζουν καθόλου επιφανειακά αντιγόνα τάξης II του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (επαγόμενη έκφραση μετά από διέγερση με INF γ), ή κάποιο άλλο μόριο συν-διεγέρτη, παρότι εκφράζουν αντιγόνα τάξης I ³⁹⁻⁴². Έτσι δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και σε ετερόλογες μεταμοσχεύσεις.

Τα MSC επίσης διαθέτουν εντυπωσιακές ανοσοκατασταλτικές/ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Συνοπτικά: καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T και B-λεμφοκυττάρων, προάγουν λειτουργικά τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, ελέγχουν την παραγωγή TNF α από τα τύπου 1 δενδριτικά κύτταρα (DC-1), αυξάνουν την παραγωγή IL-10 από τα DC-2, ελαττώνουν την απελευθέρωση INF γ από τα βοηθητικά TH1 κύτταρα και τους φυσικούς φονιάδες (Natural Killer cells, NK) και επάγουν την παραγωγή IL-4 από τα TH2 κύτταρα ^{43;44}. Επίσης εμποδίζουν την αποτελεσματική ωρίμανση των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων καταστέλλοντας την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων CD40 και CD86 ⁴⁴⁻⁴⁷. Δεν είναι απαραίτητη η άμεση κυτταρική επαφή για να επιτευχθούν όλα τα παραπάνω. Οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των MSC κυρίως επιτυγχάνονται μέσω διαλυτών παραγόντων: των hepatocyte growth factor (HGF), IL10, TGF β 1, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), προσταγλανδινών και νιτρικού οξειδίου (NO) ^{45;48-53}.

Ο πλέον συνηθισμένος τρόπος απομόνωσης των μυελικών MSC είναι με μυελική αναρρόφηση από την οπίσθια λαγόνιο ακρολοφία. Καθώς αντιπροσωπεύουν ένα μικροσκοπικό κλάσμα των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων (περίπου 1 στα 10⁵ εμπύρηννα μυελικά κύτταρα) ⁵⁴ είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν και να εμπλουτισθούν με συνήθεις τεχνικές in vitro ανάπτυξης. Συνήθως το μυελικό δείγμα υπόκειται σε κλασμάτωση σε διαβάθμιση συγκέντρωσης φικόλης, από την οποία λαμβάνεται το κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων, που απλώνεται σε τρυβλία. Γενικά τα MSC αναπτύσσονται σε κάποιο βασικό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό εμβρύου αγελάδος (FCS). Στην καλλιέργεια τα κύτταρα έχουν μορφολογία ινοβλάστη και προσκολλώνται στο πλαστικό. Συνήθως μέσα στις πρώτες 15 μέρες της in vitro ανάπτυξης, τα

αιμοποιητικά κύτταρα, που δεν είναι προσκολλώμενα, απομακρύνονται πλήρως από την καλλιέργεια μετά από διαδοχικές ανανεώσεις του θρεπτικού μέσου.

Τα MSC, όπως προαναφέρθηκε, διαθέτουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα συνδετικού ιστού *in vitro*. Όσον αφορά την οστεογονική διαφοροποίηση, απαιτείται επώαση των κυττάρων με φωσφο-γλυκερόλη, ασκορβικό οξύ και δεξαμεθαζόνη. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα αποκτούν μορφολογία οστεοβλαστών, με αυξημένη ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης και εναποθέτουν μεταλλοποιημένη εξωκυττάρια ουσία πλούσια σε ασβέστιο. Για την χονδρογονική διαφοροποίηση απαιτείται τρισδιάστατη καλλιέργεια και θρεπτικό που περιέχει κάποιο μέλος της υπερ-οικογένειας του TGFβ (συνήθως TGFβ1, TGFβ3 ή BMP2). Τότε τα κύτταρα χάνουν την ατρακτοειδή μορφολογία τους και σύντομα εκφράζουν στοιχεία εξωκυττάριας ουσίας του περιαρθρικού χόνδρου, όπως aggrecan και κολλαγόνο τύπου II. Όταν τα MSC αναπτύσσονται παρουσία iso-butyl-methyl xanthine διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, παράγοντας μεγάλα κυστίδια με ουδέτερα λίπη.

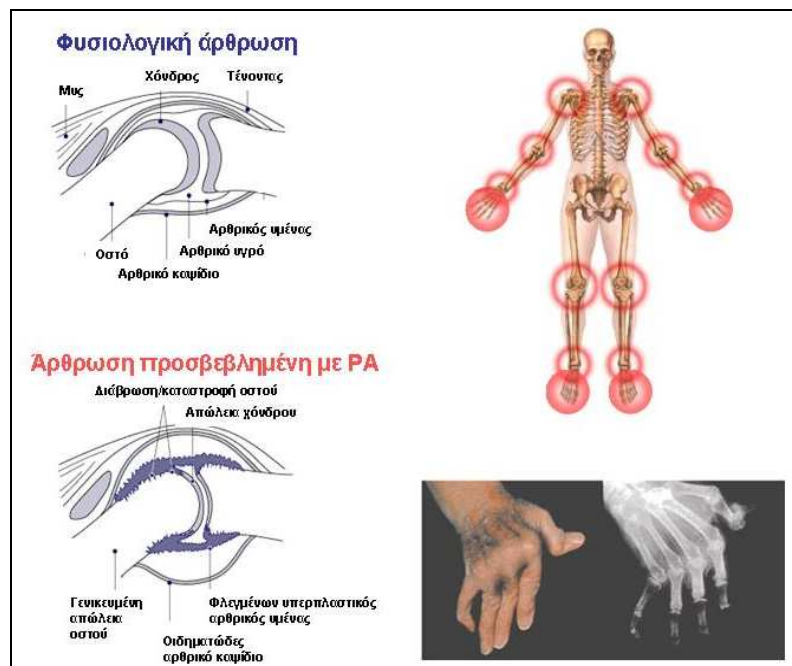
Η μη-εμβρυϊκή προέλευση αυτών των κυττάρων, καθώς και η ελαττωμένη πιθανότητα εξαλλαγής, σε συνδυασμό με το δυναμικό διαφοροποίησης, τα κάνουν θελκτικούς υποψήφιους για επικείμενες εφαρμογές της αναπλαστικής ιατρικής^{7;55;56}. Λόγω του πιθανολογούμενου ρόλου τους στην ιστολογική αναγέννηση, τα MSC μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία της ιστολογικής μηχανικής (tissue engineering), είτε χορηγώντας στον δέκτη αυτόλογα ή και ετερόλογα MSC, είτε ακόμα παρέχοντας τους κατάλληλους επαγωγικούς παράγοντες που θα ενεργοποιήσουν τα ενδογενή MSC⁵⁷⁻⁶⁶. Επιπρόσθετα καθώς τα MSC διαθέτουν ανοσοκατασταλτικές/ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε θεραπείες αυτοάνοσων νοσημάτων, όπου η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί ιστικές βλάβες, συχνά με ταυτόχρονη ύπαρξη φλεγμονής. Εντυπωσιακά ενθαρρυντικά αποτελέσματα υπάρχουν ήδη από τη θεραπευτική χρήση των MSC στη νόσο του μοσχεύματος έναντι ξενιστή (graft versus host disease, GvHD)^{67;68}. Αυτήν την περίοδο υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον διερεύνησης της πιθανής χρήσης των MSC στην αναπλαστική ιατρική και ιδιαίτερα στην επιδιόρθωση κατεστραμμένου οστού και χόνδρου^{7;55;69-71}. Μέσα στα πλαίσια αυτού του γενικού ενδιαφέροντος, μελετήσαμε τα μυελικά MSC σε ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή

αρθρίτιδα, ένα αυτοάνοσο νόσημα με παράλληλες ιστολογικές βλάβες σε οστό και χόνδρο.

2.3 ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

2.3.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μία χρόνια αυτοάνοση συστηματική νόσος που εκδηλώνεται κυρίως με φλεγμονή του αρθρικού υμένα, που έχει ως αποτέλεσμα βλάβες στον αρθρικό χόνδρο και το υποκείμενο οστό. Προσβάλλει περίπου το 1% του γενικού πληθυσμού, με τις γυναίκες να προσβάλλονται κατά κύριο λόγο, σε αναλογία 3:1 σε σχέση με τους άνδρες⁷².



Εικόνα 3: Ρευματοειδής αρθρίτιδα. Στο αριστερό κομμάτι της εικόνας αναπαρίσταται σχηματικά η ρευματοειδής άρθρωση, ενώ στο δεξιό κομμάτι της εικόνας σημειώνονται οι περιοχές εκδήλωσης της νόσου.

Η νόσος συνήθως εκδηλώνεται σαν μια συμμετρική πολυ-αρθρίτιδα, προσβάλλοντας κυρίως τις περιφερικές αρθρώσεις των άνω και κάτω άκρων (εικόνα 3). Εκτός από τις αρθρικές εκδηλώσεις στη ΡΑ, παρατηρούνται και εξω-αρθρικές επιπλοκές, όπως βλάβες στο δέρμα (ρευματοειδή οζίδια ή νεκρωτική δερματική αγγειίτιδα), στα μάτια (σύνδρομο Sjögren με έντονα συμπτώματα ξηρότητας των βλεννογόνων), στους πνεύμονες (διάμεση πνευμονική νόσος, νόσος του Carlan, πλευρίτιδα) και στην καρδιά με κύρια εκδήλωση περικαρδίτιδα. Μπορεί επίσης να προσβληθούν πολλά όργανα λόγω συστηματικής αγγειίτιδας ή λόγω δευτεροπαθούς

αμυλοείδωσης. Γενικά η πρόγνωση και η έκβαση των ασθενών με ΡΑ δεν είναι καλή, καθώς η μέση προσδόκιμη διάρκεια ζωής είναι ελαττωμένη στους ασθενείς ⁷³.

Οι μηχανισμοί που συντελούν στην έναρξη της παθογένειας της νόσου ουσιαστικά παραμένουν άγνωστοι μέχρι και σήμερα. Έχουν ενοχοποιηθεί τόσο περιβαλλοντικοί (λοιμώξεις), όσο και γενετικοί παράγοντες. Έχει προταθεί ότι μπορεί να οφείλεται σε τροφικές αλλεργίες ή σε διάφορους παθογόνους μικρο-οργανισμούς, όπως το mycoplasma, ο ιός Epstein-Barr, ο παρβοϊός B19, η rubella κ.ά., αλλά ποτέ δεν αποδείχθηκε με επιδημιολογικές μελέτες. Όπως και σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, έχει προταθεί η θεωρία της λανθασμένης ταυτότητας (mistaken identity), σύμφωνα με την οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση κάποιος μολυσματικός παράγοντας διεγείρει ανοσολογική απόκριση, αλλά καθώς τα παραχθέντα αντισώματα δεν είναι αρκετά εξειδικευμένα, αναγνωρίζουν και επιτίθενται στον αρθρικό υμένα, καθώς κάποιο από τα μόρια του υμένα «ομοιάζει» με μόριο του λοιμογόνου παράγοντα.

Εκτός από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν, φαίνεται πως ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη της νόσου διαδραματίζει το γενετικό υπόβαθρο. Η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται με κάποια συγκεκριμένα αλληλόμορφα των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-DR, που έχουν ονομαστεί «ρευματοειδείς επίτοποι». Ο ρευματοειδής επίτοπος εντοπίζεται στην τρίτη υπερμεταβλητή περιοχή της DRβ αλυσίδας ⁷⁴, κάτι που υπονοεί έναν πιθανό ρόλο στη δέσμευση και παρουσίαση «αρθριτογονικών» πεπτιδίων στους υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων (T-cell receptors, TcR). Πιστεύεται ότι τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα εμπλέκονται στην αντιγονική παρουσίαση αρθριτογονικών πεπτιδίων, οδηγώντας στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό T-λεμφοκυττάρων ειδικών για συγκεκριμένα αυτό-αντιγόνα ⁷². Τα άτομα που διαθέτουν τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα, όχι μόνο έχουν προδιάθεση να αναπτύξουν τη νόσο, αλλά εκφράζουν πιο βαριά και περισσότερο καταστροφική νόσο ⁷⁵. Το 90% των ασθενών διαθέτει τον ρευματοειδή επίτοπο, εν αντιθέσει προς τον υγιή πληθυσμό όπου το ποσοστό των ατόμων που διαθέτει τους συγκεκριμένους απλοτύπους ανέρχεται σε 40%.

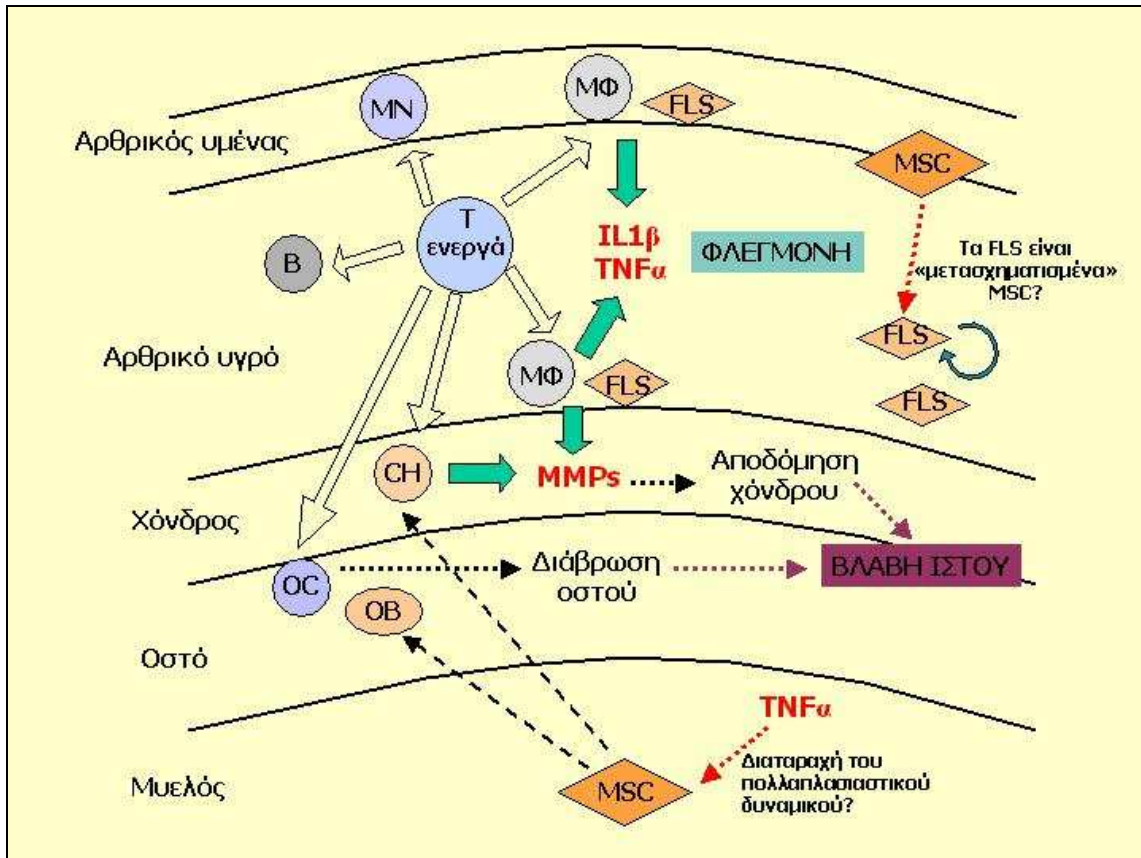
2.3.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ

Ο αρθρικός υμένας στην προσβεβλημένη άρθρωση αποτελείται κυρίως από αρθρικούς ινοβλάστες (fibroblast-like synoviocytes, FLS) και φλεγμονώδη κύτταρα, όπως μονοκύτταρα/μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρηννα και δενδριτικά κύτταρα. Τα παραπάνω κύτταρα πιστεύεται ότι διεισδύουν στον (φυσιολογικά ακυτταρικό) αρθρικό υμένα, μεταναστεύοντας διαμέσου του αγγειακού ενδοθηλίου, με τη βοήθεια μορίων συνάφειας (όπως η E-σελεκτίνη, ICAM-1 και VCAM) και χημειοτακτικών παραγόντων (όπως η IL-8 και παράγοντες του συμπληρώματος). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπλασία του υμένα (παθολογικός πάννος) ⁷⁵.

Στο αρθρικό υγρό της παθολογικής άρθρωσης εγκαθίσταται σταδιακά μια πληθώρα φλεγμονωδών κυττάρων, όπως ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα και αρθρικοί ινοβλάστες. Τα T-λεμφοκύτταρα θεωρούνται ως οι κύριοι μεσολαβητές της αυτοανοσίας στη PA ⁷⁶. Πιο συγκεκριμένα, τα ενεργοποιημένα CD4⁺ T-κύτταρα διεγείρουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στα μακροφάγα, στα μονοκύτταρα, καθώς και στους αρθρικούς ινοβλάστες. Έτσι παράγονται και εκκρίνονται οι IL-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α (TNFα), όπως και μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMP). Ο TNFα προκαλεί αύξηση της έκφρασης των μορίων συνάφειας στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και έτσι έλκονται περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα στην προσβεβλημένη άρθρωση. Οι παράγοντες IL-1β και TNFα επάγουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως IL-6), χημειοκινών (όπως IL-8), αυξητικών παραγόντων (όπως GM-CSF) και MMP από τους αρθρικούς ινοβλάστες. Ως απόρροια, η φλεγμονή εγκαθίσταται στην άρθρωση και προσβάλλει τον υποκείμενο χόνδρο και το οστό. Επιθετικοί και ταχέως πολλαπλασιαζόμενοι αρθρικοί ινοβλάστες, εισβάλουν και καταστρέφουν τον χόνδρο, παράγοντας κυρίως MMP ⁷⁷. Παράλληλα οι ενδογενείς οστεοκλάστες ενεργοποιούνται από τον TNFα, προκαλώντας επιπλέον βλάβες στο χόνδρο και το οστό ⁷⁶. Επιπρόσθετα η IL-1β διαμεσολαβεί στην καταστροφή του χόνδρου επάγοντας άμεσα την έκφραση MMP στα χονδροκύτταρα.

Φαίνεται πως ο συνδυασμός της επιταχυνόμενης ιστολογικής βλάβης λόγω του

φλεγμονώδους περιβάλλοντος και ενός ανεπαρκούς επιδιορθωτικού μηχανισμού, είναι υπεύθυνος για την καταστροφή των αρθρώσεων. Ο παθογενετικός μηχανισμός της PA φαίνεται συνοπτικά στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Μοντέλο καταστροφής της άρθρωσης στη PA. Σε αυτό το απλοποιημένο σχήμα, ένας άγνωστος αντιγονικός διεγέρτης ενεργοποιεί ανοσολογική απόκριση, κυρίως μέσω των T αυτο-ενεργών κυττάρων, που διεγείρουν περαιτέρω την απόκριση ενεργοποιώντας B-κύτταρα και ελκύοντας μονοκύτταρα (MN) και μακροφάγα (MΦ). Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα συντηρούν τη φλεγμονή και προκαλούν έμμεσες βλάβες στον ιστό, επάγοντας στα MN, MΦ και τους αρθρικούς ινοβλάστες (FLS), την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL1β, TNFα, αλλά και MMP. Τα χονδροκύτταρα (CH) επίσης παράγουν MMP, συνεισφέροντας στην αποδόμηση του χόνδρου. Διεγερμένοι οστεοκλάστες (OC) προκαλούν διαβρώσεις στο οστό. Τα MSC του αρθρικού υγρού γίνονται επιθετικά και ίσως μετατρέπονται σε FLS. Τα μυελικά MSC μπορούν να συνεισφέρουν στην επιδιόρθωση οστού και χόνδρου, αλλά το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό επηρεάζεται από το φλεγμονώδες μυελικό μικροπεριβάλλον.

2.3.3 ΤΑ ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΑΡΘΡΩΣΗ

Στον παθολογικό αρθρικό υμένα απομονώνονται MSC σε αφθονία ^{78;78}. Αν και αυτό θα μπορούσε κάλλιστα να είναι το αποτέλεσμα της φυσιολογικής προσπάθειας του οργανισμού να ανταποκριθεί στο τοπικό τραύμα (χόνδρου και οστού), μπορεί και να υποδηλώνει μια συνεισφορά των MSC στην παθολογία της νόσου ⁷⁹. Ειδικότερα έχει προταθεί ότι μυελικά MSC φθάνουν στη φλεγμαίνουσα άρθρωση μέσω καναλιών που ενώνουν το οστό με την άρθρωση και εγκαθίστανται στον αρθρικό υμένα. Τα MSC στην παθολογική άρθρωση εκφράζουν τους εμβρυϊκούς αναπτυξιακούς παράγοντες *wingless* (*wnt*) και *frizzled* (*fz*), που φυσιολογικά ενέχονται στην οργάνωση του εκβλαστήματος των άκρων (*limb bud*) κατά την εμβρυική ανάπτυξη, καθώς και στην ανάπτυξη των μυελικών αρχέγονων κυττάρων. Το σηματοδοτικό μονοπάτι *wnt/fz* εμπλέκεται τόσο στο μεταγραφικό έλεγχο της αυτοανανέωσης/διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων, όσο και στην επαγωγή της φλεγμονής μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C ^{80;81;81;82;82-85}. Έχει επίσης διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι αρθρικοί ινοβλάστες είναι μετασχηματισμένα μεσεγχυματικά κύτταρα, που κάτω από την επίδραση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος, μετασχηματίζονται και «παγώνουν» σε πρώιμα στάδια διαφοροποίησης. Σε ένα ζωικό μοντέλο της ΡΑ, δείχτηκε ότι οι αρθρικοί ινοβλάστες (FLS) περιέχουν μυελικά MSC με διαταραγμένη δυνατότητα λιπογονικής και οστεογονικής διαφοροποίησης, οφειλόμενη στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον (*IL-1β*) και μάλιστα μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα *NF-κB* ⁸⁶.

Σε ζωικά μοντέλα αρθρίτιδας (*collagen-induced arthritis, CIA*), τα MSC απομονώνονται σε πρώιμα στάδια της νόσου στο περίοστεο, στο φλοιό, στην επίφυση, στον αρθρικό υμένα, αλλά και σε κανάλια σύνδεσης οστού-άρθρωσης. Η θεραπεία με *anti-TNFα* έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του πλήθους των MSC στην άρθρωση, υποδηλώνοντας έναν άμεσο ρόλο αυτής της κυτταροκίνης στη στρατολόγηση των MSC στη φλεγμαίνουσα άρθρωση ⁷⁹. Είναι λοιπόν πιθανό η σταδιακή εγκατάσταση και ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός αυτών των άωρων MSC, να αυξάνει περαιτέρω την κυτταρική υπερπλασία, καθώς και τις καταστροφικές διεργασίες με αυτοκρινή ή/και παρακρινή τρόπο (παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών, ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, μορίων συναφείας και *MMP*) ^{82;86;87}.

Συνολικά, φαίνεται πως μυελικά MSC σε μια προσπάθεια επιδιόρθωσης της τοπικής ιστολογικής βλάβης στη PA εγκαθίστανται στην άρθρωση, αλλά κάτω από το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον παραμένουν σε άωρη κατάσταση και συνεισφέρουν στη διατήρηση της φλεγμονής.

2.4 ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Συνοπτικά, η ΡΑ είναι μια συστηματική αυτοάνοση νόσος, που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων (όπως ο TNFα και η IL-1β) στις προσβεβλημένες αρθρώσεις, η οποία έχει σαν κύρια επίπτωση βλάβες στο χόνδρο και το οστό. Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα που κυριαρχούν στην παθογένεια της άρθρωσης είναι τα μακροφάγα, τα T- και B-λεμφοκύτταρα και οι αρθρικοί ινοβλάστες. Η μέχρι τώρα θεραπευτική προσέγγιση στοχεύει σε κάποιο από παραπάνω κύτταρα. Για παράδειγμα η μεθοτρεξάτη καταστέλλει τα μακροφάγα, η κυκλοσπορίνη-A καταστέλλει τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Οι πιο πρόσφατες και πλέον αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις με μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν στους κύριους φλεγμονώδεις παράγοντες, TNFα και IL-1β. Εν τούτοις είναι αποτελεσματικές μόνο στο 40-70% των ασθενών και όταν σταματά η αγωγή, η νόσος επανέρχεται, κάτι που υποδηλώνει ότι αυτής της μορφής η θεραπεία είναι μάλλον κατασταλτική, παρά πραγματικά θεραπευτική.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει προταθεί ότι τα MSC μπορεί να σχετίζονται πρωτογενώς με την καταστροφή της άρθρωσης στη ΡΑ ^{82;88}. Επίσης έχει δειχθεί ότι η αυξημένη τοπική παραγωγή TNFα μπορεί να αλλοιώσει το μυελικό μικροπεριβάλλον και να επηρεάσει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ⁸⁹. Συνεπώς, ένα κρίσιμο υπό εξέταση ζήτημα είναι εάν και τα μυελικά MSC ελαττώνονται επίσης ή/και αλλάζουν λειτουργικά στους ασθενείς. Επιπροσθέτως, καθώς τα μυελικά MSC αποτελούν ένα υποσχόμενο μελλοντικό εργαλείο για την ανάπλαση του χόνδρου και του οστού που καταστρέφονται στους ασθενείς, θεωρήθηκε αναγκαία η μελέτη τους στους ασθενείς, ώστε να διευκρινιστεί η πιθανότητα μελλοντικής χρήσης τους σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις που θα στοχεύουν στην ανάπλαση του κατεστραμμένου ιστού.

Αυτή η μελέτη αξιολογεί τη συχνότητα και τη λειτουργικότητα των μυελικών MSC σε ασθενείς με ενεργό ΡΑ, όσον αφορά την πολλαπλασιαστική και κλωνογονική τους ικανότητα, καθώς και τη δυνατότητα της *in vitro* διαφοροποίησης. Επιπλέον μελετήθηκαν τα μοριακά χαρακτηριστικά των κυττάρων, με ιδιαίτερη εστίαση στην γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων.

3.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ,

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήσαμε μυελικά δείγματα 26 ασθενών με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα^{90;91}, καθώς και 21 υγιών μαρτύρων, αναλόγου φύλου και ηλικίας με τους ασθενείς. Τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών υπάρχουν στον πίνακα 2. Για την πραγματοποίηση των δειγματοληψιών μυελού των οστών πάρθηκε η γραπτή συγκατάθεση κάθε ασθενούς, σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι.

Πίνακας 2. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών		Προηγούμενη θεραπεία										Παρούσα θεραπεία ^{&}
		ΑΑ	Ηλικία/ Φύλο	Διάρκεια (μήνες)	DAS	DMARD					Βιολογική	
						NSAID	MTX	PDN	LEF	DMARD		
1	43/Θ	6	7.1	-	15 mg/w	-	LEF		Infliximab*	MTX, Infliximab		
2	61/A	36	5.3	-	20 mg/w	-	LEF, CSA, SSA		Etanercept**, Adalimumab†	MTX		
3	77/Θ	3	7.6	-	-	-	-	-	-	-		
4	58/A	72	8.4	-	20 mg/w	-	LEF, SSA		Kineret‡	Kineret		
5	71/A	6	4.6	-	20 mg/w	-	-	-	Infliximab	Infliximab		
6	32/Θ	3	5.1	-	15 mg/w	-	CSA, SSA, HCQ		-	MTX, HCQ, SSA		
7	77/Θ	9	5.4	-	15 mg/w	5 mg/d	LEF, CSA, SSA, D-Pen		-	LEF, PDZ		
8	58/A	15	3.8	-	20 mg/w	7.5 mg/d	LEF, CSA, SSA, D-pen		Adalimumab	MTX, LEF, PDZ		
9	73/Θ	4	5.6	-	15 mg/w	-	LEF, CSA, SSA, HCQ		Infliximab, Adalimumab	MTX, Adalimumab		
10	56/Θ	25	3.0	-	15 mg/w	5 mg/d	CSA		-	MTX, PDZ		
11	50/Θ	32	7.1	-	15 mg/w	5 mg/d	LEF, CSA, HCQ		Infliximab, Kineret, Rituximab#	LEF, Rituximab, PDZ		
12	66/Θ	240	6.1	-	15 mg/w	5 mg/d	LEF, CSA		Adalimumab	Adalimumab, PDZ		
13	54/Θ	6	5.8	+	15 mg/w	-	HCQ		-	MTX, HHQ		
14	77/A	60	2.6	-	20 mg/w	5 mg/d	CSA		-	MTX, PDZ		
15	75/Θ	15	3.9	-	15 mg/w	-	LEF, CSA, SSA, HCQ, D-pen		Adalimumab	MTX, Adalimumab		
16	62/A	156	5.8	-	20 mg/w	-	LEF, CSA		Infliximab, Rituximab	LEF, Rituximab		
17	53/A	72	6.8	-	20 mg/w	-	LEF, CSA		Infliximab, Rituximab	LEF, MTX, CSA, Infliximab		
18	31/Θ	12	2.2	-	-	-	-	-	-	-		
19	58/A	5	7.3	-	-	-	-	-	-	-		
20	59/Θ	48	8.4	+	15 mg/w	5 mg/d	LEF, CSA, D-pen		-	LEF, CSA, PDZ		
21	51/Θ	240	6.5	+	15 mg/w	-	-	-	-	MTX		
22	77/Θ	3	8.4	-	-	-	-	-	-	-		
23	58/Θ	60	6.8	+	15 mg/w	-	HCQ		-	HHQ, PDZ		
24	54/A	3	5.8	-	-	-	-	-	-	-		
25	33/Θ	6	2.6	-	-	-	-	-	-	-		
26	45/Θ	36	5.3	-	20 mg/w	5 mg/d	CSA		-	MTX, HHQ		

ΑΑ, αύξων αριθμός ασθενούς; DAS, βαθμός ενεργότητας νόσου (Disease Activity Score); NSAID, Μη-στεροειδής αντιφλεγμονώδης θεραπεία (Non steroidal anti-inflammatory drugs); MTX, methotrexate; PDN, prednisone; DMARD, Ανοσοτροποποιητικοί αντιρευματικοί παράγοντες (disease-modifying antirheumatic drugs); LEF, leflunomide (10-20 mg/d); CSA, cyclosporine-A (150 mg/d); SSA, sulphasalazine-A (2 g/d); HCQ, hydroxychloroquine (400 mg/d); D-Pen, D-penicillamine (200 mg/d).

& : Οι ασθενείς είχαν σταματήσει κάθε θεραπεία για τουλάχιστον 24 ώρες πριν τη λήψη του δείγματος μυελού.

*: Human/murine chimeric anti-TNFα mab (3 mg/kg every 4-8 weeks).

** : Recombinant human soluble p75 TNF receptor fusion protein (25 mg/biweekly).

† : Humanized anti-TNF mab (40 mg every 2 weeks).

‡ : IL-1β receptor antagonist (100 mg/d)

: Human/murine chimeric anti-CD20 mab (2 doses of 1 g within 2 weeks).

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ IN VITRO ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΥΕΛΙΚΩΝ MSC

Αναρροφήματα μυελικών κυττάρων λαμβάνονταν από την οπίσθια λαγόνιο ακρολοφία με παρακέντηση. Τα αναρροφήματα επιστρώνονταν σε διάλυμα Histopaque-1077 (Sigma, Saint Louis MO) και φυγοκεντρούντο για να παρθούν τα μυελικά μονοπύρρηνα κύτταρα (BMMC). Ακολούθως τα μονοπύρρηνα απλώνονταν σε καλλιεργητικές φλάσκες των 25-cm² με αρχική συγκέντρωση 200.000 BMMC/cm² και αναπτύσσονταν σε Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG; Gibco/Invitrogen, Paisley Scotland) / 10% ορό εμβρύου αγελάδος (FCS; Hyclone, Logan-Utah, USA) / 100 IU/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Pen-Strep, Gibco), όπως έχει περιγραφεί^{54;92}. Το αναλυτικό πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας μυελικών MSC περιγράφεται παρακάτω:

3.2.1 Απομόνωση και ανάπτυξη ανθρώπινων μυελικών MSC

1. Αναρρόφημα μυελικών κυττάρων λαμβάνεται από την οπίσθια λαγόνιο ακρολοφία με παρακέντηση (5-10 ml).
2. Το δείγμα αραιώνεται 1:1 σε MSC-medium (DMEM-LG / 10% FCS / 1% Pen-Strep).
3. Επιστοίβαση δείγματος σε Histopaque-1077, με αναλογία όγκου 4:3.
4. Φυγοκέντρηση στις 1700 rpm, για 30 min, χωρίς φρένο.
5. Απομόνωση της μεσόφασης του μυελικού μονοπυρηνικού κλάσματος (BMMC).
6. Επαναιώρηση των κυττάρων σε MSC-medium.
7. Μέτρηση των κυττάρων σε Neubauer.
8. Άπλωμα 200,000 BMMC/cm² σε φλάσκες των 25cm² και επώαση σε 37°C / 5% CO₂ / 90% υγρασία.
9. Τις πρώτες 24-48 ώρες, αφαίρεση των μη-προσκολλόμενων αιμοποιητικών κυττάρων, πλύσιμο των κυττάρων με PBS. Προσθήκη φρέσκου MSC-medium.
10. Πλήρης ανανέωση MSC-medium κάθε 3-4 ημέρες, μέχρι κάλυψη τάπητα κατά 70-90%.

3.2.2 Ανάπτυξη ανθρώπινων μυελικών MSC σε P1-P2-P3-... κ.λπ.

1. Τρυψινοποίηση των κυττάρων με 0.25% trypsin-1mM EDTA για 5min στους 37°C.

2. Προσθήκη ίσου όγκου MSC-medium για απενεργοποίηση της δράσης της τρυψίνης.
3. Πλύσιμο των κυττάρων και επαναιώρηση σε κατάλληλο όγκο MSC-medium.
4. Μέτρηση των κυττάρων σε Neubauer.
5. Επανακαλλιέργεια 2000 κύτταρα/cm² σε φλάσκες των 75cm².
6. Πλήρης ανανέωση MSC-medium κάθε 3-4 ημέρες, μέχρι κάλυψη τάπητα κατά 70-90%.

Δείγματα από τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών φυλάσσονταν (-72°C) για περαιτέρω μετρήσεις των επιπέδων των κυτταροκινών με τη μέθοδο ELISA (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN). Τρυψινοποιημένα κύτταρα από κυτταρικό πέρασμα (passage - P) 2 επάγωντο προς διαφοροποίηση με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

3.3 IN VITRO ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Πραγματοποιήθηκαν διαφοροποιήσεις σε τρεις κυτταρικές γενεαλογίες: λιποκυττάρων, οστεοκυττάρων και χονδροκυττάρων. Όλα τα υλικά των διαφοροποιητικών θρεπτικών προέρχονταν από την εταιρεία Sigma, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

3.3.1 Επαγωγή λιπογονικής διαφοροποίησης

Η επαγωγή της λιπογονικής διαφοροποίησης έγινε χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο για MSC εμπλουτισμένο με

10%FCS

0.5mM 1-methyl-3-butylisoxanthine (IBMX)

1μM dexamethasone (Dex)

0.2μM indomethacin

10μg/ml insulin

Απλώνονταν 80.000 MSC/cm² σε τρυβλία των 60-mm. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνονταν δύο φορές την εβδομάδα και τα κύτταρα παρέμεναν στην καλλιέργεια για 21 μέρες σε 37°C / 5%CO₂/ 90% υγρασία.

3.3.2 Επαγωγή οστεογονικής διαφοροποίησης

Η επαγωγή της οστεογονικής διαφοροποίησης έγινε σε θρεπτικό μέσο για MSC εμπλουτισμένο με

0.1μM Dex

0.15mM ascorbate-2-phosphate

3mM NaH₂PO₄

Τα κύτταρα απλώνονταν σε τρυβλία των 60-mm με συγκέντρωση 15.000 κύτταρα/cm² και παρέμεναν στην καλλιέργεια για 21 μέρες σε 37°C / 5%CO₂/ 90% υγρασία. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνονταν δύο φορές την εβδομάδα.

3.3.3 Επαγωγή χονδρογονικής διαφοροποίησης

Για την επαγωγή της χονδρογονικής διαφοροποίησης εφαρμόστηκε η τεχνική του κυτταρικού μικρο-ιζήματος (micro-pellet). Τα κύτταρα κατακρημνίζονταν στα 350g για 5 min, σε σωληνάρια των 15ml (250.000 MSC/ίζημα) και εν συνεχεία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο DMEM-High Glucose (Gibco), εμπλουτισμένο με:

6.25μg/ml insulin

6.25μg/ml transferrin

1.33μg/ml linoleic acid

1.25mg/ml bovine serum albumin

1mM sodium pyruvate

0.17mM ascorbate-2-phosphate

1μM Dex

0.35mM L-proline

6.25ng/ml selenous acid

0.01μg/ml TGFβ₃

Η ανάπτυξη των κυττάρων γινόταν για 21 μέρες σε 37°C / 5% CO₂ / 90% υγρασία, με πλήρη ανανέωση θρεπτικού 2 φορές την εβδομάδα.

3.4 ΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

Η ανίχνευση των διαφοροποιημένων κυττάρων έγινε και με κυτταροχημικές χρώσεις. Όλα τα υλικά των κυτταροχημικών χρώσεων προέρχονταν από την εταιρεία Sigma, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

3.4.1 Χρώση Oil Red O (χρώση ουδέτερων λιπών)

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και τα ξεπλένουμε 2x με PBS.
2. Μονιμοποίηση των κυττάρων σε 10%NBF (neutral-buffer formalin) για 15 min.
3. Αφαίρεση μονιμοποιητικού και πλύσιμο των κυττάρων 2X με PBS.
4. Παρασκευή working solution του Oil Red O αναμιγνύοντας 6ml από το stock sol. ORO (0.5% σε 99% isopropanol) με 4ml dH₂O. Φιλτράρισμα από διηθητικό χαρτί και φιλτράρισμα από 0,45 μm syringe filter.
5. Προσθήκη του ORO στα κύτταρα για 15-20 min.
6. Ξέπλυμα κυττάρων 2-3X με dH₂O.

3.4.2 Χρώσεις αλκαλικής φωσφατάσης και Von Kossa

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα των κυττάρων με PBS.
2. Μονιμοποίηση των κυττάρων σε 10%NBF για 15 min.
3. Αφαίρεση μονιμοποιητικού και ξέπλυμα των κυττάρων με dH₂O για 1 min και άλλη μία φορά με dH₂O για 15 min.
4. Παρασκευή φρέσκου υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης:
(α) 10mg naphthol AS MX-PO₄ διαλυμένο σε 400μl N,N,-DMF (N,N,-dimethylformamide)
(β) Προσθήκη του (α) σε 99.6ml Tris-HCl pH 8.3
(γ) Ανάδευση και προσθήκη 30-60mg Red Violet LB salt.
Το παρασκευασθέν διάλυμα φιλτράρεται σε 0.45μm syringe filter.
5. Προσθήκη του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης στα τρυβλία. Επώαση 45 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ξέπλυμα 3-4X με νερό βρύσης.

7. Χρώση κυττάρων με Von Kossa reagent (0.25gr/ml silver nitrate σε dH₂O) για 30 min.
8. Αφαίρεση διαλύματος νιτρικού αργύρου και ξέπλυμα 3X με dH₂O.

3.4.3 Χρώση Alcian blue (Σε τομές παραφίνης)

1. Τοποθετούμε τις αντικειμενοφόρους σε φούρνο 56°C για 50min.
2. Εμβαπτίζουμε σε χυλοί για 5min. Επαναλαμβάνουμε X2.
3. 96% ethanol για 3min. Επαναλαμβάνουμε X2.
4. 80% ethanol για 1min. Επαναλαμβάνουμε X2.
5. 70% ethanol για 1min. Επαναλαμβάνουμε X2.
6. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
7. Ξεπλένουμε με dH₂O.
8. Εμβαπτίζουμε σε Haematoxylin Harris για 20min.
9. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
10. Εμβαπτίζουμε σε 1% HCl σε 70% ethanol.
11. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
12. Παρασκευάζουμε υδατικό διάλυμα 3% w/v Alcian blue. Παρασκευάζουμε διάλυμα 3% w/v CH₃COOH. Αναμιγνύουμε 1:1 v/v τα δύο διαλύματα και εμβαπτίζουμε τις αντικειμενοφόρους για 10min.
13. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης.
14. Εμβαπτίζουμε X2 σε 96% ethanol.
15. Εμβαπτίζουμε X2 σε 100% ethanol.
16. Εμβαπτίζουμε X2 σε χυλοί.
17. Τοποθέτηση καλυπτρίδας.

3.4.4 Χρώση Giemsa

Για να γίνουν ευδιάκριτες οι αποικίες CFU-F ακολουθούσε κυτταρική χρώση Giemsa:

1. Πλύσιμο των κυττάρων X2 με PBS.
2. Μονιμοποίηση των κυττάρων σε μεθανόλη για 5min.

3.5 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ MSC ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Τρυψινοποιημένα MSC από P1-P6 χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα: anti-CD29 (4B4; Cyto-Stat/Beckman-Coulter, Florida, USA), anti-CD44 (J173; Immunotech/Coulter, Marseille, France), anti-CD73 (AD2; Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD90 (F15.42; Immunotech/Coulter), anti-CD105 (SN6; Caltag, Burlingame, CA), anti-CD146 (P1H12; Pharmingen), anti-CD45 (IMMU19.2; Immunotech/Coulter), anti-CD14 (RMO52; Immunotech/Coulter) και anti-CD34 (QBend10; Beckman-Coulter). Αναλυτικά:

3.5.1 Άνοσο-ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων με χρήση κυτταρομέτρου ροής

Σε κάθε κυτταρικό πέρασμα έγινε ανάλυση των κυττάρων για τα εξής επιφανειακά αντιγόνα: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD14, CD34 και CD45.

1. Πλένουμε τα κύτταρα σε διάλυμα κυτταρομετρίας (PBS / 0.5% FCS / 0.04% sodium azide).
2. Φυγοκεντρούμε στις 1700rpm, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Αφαίρεση υπερκλειμένου και προσθήκη 40μl διαλύματος 20mg/ml human γ-globulins, για την ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής πρόσδεσης αντισώματος. Επώαση 10min στον πάγο.
4. Προσθήκη φθορίζοντος μονοκλωνικού αντισώματος (η ποσότητα δίδεται από την παρασκευαστική εταιρεία). Επώαση στον πάγο.
5. Πλένουμε τα κύτταρα σε διάλυμα κυτταρομετρίας για να απομακρύνουμε την πλεονάζουσα ποσότητα αντισώματος.
6. Φυγοκεντρούμε στις 1700rpm, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαίρεση υπερκλειμένου και μονιμοποίηση κυττάρων με 200μl διαλύματος 2% παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, PFA).
8. Διατήρηση δειγμάτων στους 4°C, μέχρι την ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής.

3.5.2 Μέτρηση αποπτωτικών κυττάρων με χρώση 7-AAD

Η απόπτωση των κυττάρων μελετήθηκε επίσης με κυτταρομετρία ροής,

χρησιμοποιώντας τη χρώση με 7-actinoaminomycin-D (7-AAD; Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) ^{89;93}. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως 7-AAD^{neg} (ζωντανά κύτταρα), 7-AAD^{dim} (πρώιμα αποπτωτικά) και 7-AAD^{brigh} (όψιμα αποπτωτικά) κύτταρα. Αναλυτικά:

Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα και το πλύσιμο των κυττάρων, προχωρούμε με τα ακόλουθα βήματα:

1. Επωάζουμε τα κύτταρα με διάλυμα 20μg/ml 7-AAD.
2. Επωάζουμε 15 min στον πάγο.
3. Φυγοκεντρούμε στις 1700rpm, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 300μl διαλύματος 2% PFA.
5. Άμεση μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο ροής.

Η ποσοτική ανάλυση έγινε σε κυτταρόμετρο ροής Epics Elite (Coulter, Miami, FL).

3.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ MSC ΣΤΟ ΚΛΑΣΜΑ ΤΩΝ ΜΥΕΛΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ

Χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική περιοριστικής αραιώσης (limiting dilution assay - LDA) προκειμένου να υπολογίσουμε τη συχνότητα των MSC στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων. Χρησιμοποιήσαμε επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις BMMC (250-10.000 κύτταρα/πηγάδι) που απλώθηκαν σε ταψιά των 96-πηγαδιών ⁵⁴. Μετά από ανάπτυξη 6 εβδομάδων, τα πηγάδια που είχαν >50 προσκολλώμενα ατρακτοειδή κύτταρα, θεωρούντο θετικά και η συχνότητα των MSC αντιστοιχούσε στην αραιώση που θα έδιδε 37% αρνητικά πηγάδια ⁹⁴.

Αναλυτικά:

1. Την ημέρα-0 ετοιμάζουμε κυτταρικό εναιώρημα 100,000 BMMC/ml αναμιγνύοντας 1.1×10^6 κύτταρα σε 11ml MSC-medium.
2. Ετοιμάζουμε τις παρακάτω αραιώσεις:

	Αρχικό κυτταρικό εναιώρημα	MSC-medium	Συγκέντρωση BMMC / 100μl τελικού εναιωρήματος
1	4ml	-	10.000
2	3ml	1ml	7.500
3	2ml	2ml	5.000
4	1ml	3ml	2.500
5	0.4ml	3.6ml	1.000
6	0.2ml	3.8ml	500
7	0.1ml	3.9ml	250

3. Χρησιμοποιούμε 7 πλάκες των 96-πηγαδιών και προσθέτουμε dH₂O στα ακριανά πηγάδια.
4. Για κάθε αραιώση, χρησιμοποιούμε 30 πηγάδια από την πλάκα, στα οποία προσθέτουμε 100μl από την αντίστοιχη αραιώση.
5. Πλήρης ανανέωση θρεπτικού MSC-medium μία φορά την εβδομάδα, για 6 εβδομάδες.
6. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση θετικών και αρνητικών πηγαδιών σε κάθε αραιώση. Ανάλυση με στατιστική κατανομής Poisson.

3.7 ΚΛΩΝΟΓΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ MSC

Η κλωνογονική ικανότητα των κυττάρων μετρήθηκε με τη γνωστή δοκιμασία σχηματισμού ινοβλαστικών αποικιών, ενώ η πολλαπλασιαστική τους ικανότητα μετρήθηκε με μια χρωμομετρική δοκιμασία βασισμένη στο MTT, καθώς και χρησιμοποιώντας τον απλό τύπο: $2^n = N_x / N_0$ (όπου, N_x = κυτταρικός πληθυσμός μετά την τρυψινοποίηση, N_0 = αρχικός κυτταρικός πληθυσμός, n = αριθμός κυτταρικών πολλαπλασιασμών).

3.7.1 Δοκιμασία σχηματισμού ινοβλαστικών αποικιών (colony forming unit-fibroblastic assay - CFU-F)

Η δοκιμασία CFU-F χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η αναλογία των MSC στα μυελικά μονοκύτταρα: κύτταρα ημέρας-0 απλώνονταν σε τρυβλία 60-mm σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10000 - 20000 - 30000 BMMC) και καλλιεργούνται για 14 ημέρες με θρεπτικό για MSC. Ο αριθμός των CFU-F υπολογίστηκε με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression).

Η δοκιμασία CFU-F χρησιμοποιήθηκε και για τον υπολογισμό της κλωνογονικής ικανότητας των *in vitro* αναπτυσσόμενων κυττάρων. Τρυψινοποιημένα κύτταρα P1-P6 απλώνονταν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σε τρυβλία 60-mm (50 – 100 – 150 κύτταρα/τρυβλίο). Ο αριθμός των CFU-F υπολογιζόταν με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

Για να γίνουν ευδιάκριτες οι κυτταρικές αποικίες ακολουθούσε κυτταρική χρώση Giemsa.

3.7.2 Χρωμομετρική δοκιμή MTT

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα των MSC υπολογίστηκε με μία τεχνική βασιζόμενη στο Methyl Triazolyl Tetrazolium (MTT) σε P2 κύτταρα, καθώς και με την εκτίμηση του χρόνου διπλασιασμού των κυττάρων για τα περάσματα P1-P6.

1. Ξεκινάμε με 52,500 κύτταρα σε 21ml MSC-medium. Τελική συγκέντρωση 2,500 κύτταρα/ml.
2. Χρησιμοποιούμε 7 πλάκες των 24-πηγαδιών, και σε κάθε μία από αυτές χρησιμοποιούμε τρία πηγάδια, σε καθένα από τα οποία προσθέτουμε 2500 MSC (1ml/πηγάδι).

3. Ανανέωση θρεπτικού 2 φορές την εβδομάδα.
4. Επιτελούμε τη χρωμομετρική δοκιμή MTT τις μέρες 1, 3, 5, 7, 9, 11 και 13:
 - Αφαιρούμε όλο το θρεπτικό και προσθέτουμε 0.5ml 1mg/ml MTT /πηγάδι.
 - Επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C / 5% CO₂.
 - Προσθέτουμε 0.5ml 2-propanol σε κάθε πηγάδι.
 - Ανακατεύουμε ώστε να διαλυθεί το παραγόμενο formazan.
 - Σε πλάκα των 96-πηγαδιών προσθέτουμε 200μl από κάθε δείγμα και μετράμε σε φωτόμετρο την οπτική πυκνότητα στα 630nm (OD₆₃₀).

3.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

3.8.1 RT-PCR

Απομονώθηκε ολικό RNA από MSC P2, καθώς και από διαφοροποιημένα κύτταρα, αλλά και από κλώνους MSC κυττάρων. Το ολικό RNA απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας με το σύστημα RNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Σε όλες τις κατεργασίες δειγμάτων περιελήφθη το στάδιο επώασης των νουκλεϊκών οξέων με DNase, ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις γενωμικού DNA στα τελικά δείγματα. Για την απομόνωση RNA ειδικά από τα χονδροκύτταρα, εισήχθη ένα αρχικό στάδιο προ-επώασης των κυττάρων με Proteinase K πάλι σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθως 0.5μg RNA από κάθε δείγμα μετεγγράφηκε αντίστροφα σε cDNA (SUPERScript II; Gibco), επιλέγοντας ως εκκινητές της αντίστροφης μεταγραφής (RT), ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας. Το προϊόν της αντίδρασης RT πολλαπλασιάστηκε στη συνέχεια ειδικά σε αντιδράσεις PCR (RT-PCR). Οι αντιδράσεις PCR έγιναν με το $1/20$ του προϊόντος της RT με τις συνθήκες: 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1μM ειδικούς εκκινητές, 5U Taq DNA polymerase (Invitrogen) σε 1X PCR buffer (Invitrogen). Τα τελικά προϊόντα κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με την έκφραση της β₂-μικροσφαιρίνης (β₂m), χρησιμοποιώντας το software πυκνομετρικής ανάλυσης ImageJ. Οι αλληλουχίες των ειδικών εναρκτών για τις αντιδράσεις PCR αναφέρονται στον πίνακα 3.

3.8.2 Real-Time Quantitative PCR

Γονιδιακή έκφραση των IL1β και TNFα: Ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα P1-P6 και μετεγγράφη αντίστροφα, όπως συνοπτικά περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Για την ταυτοποίηση της έκφρασης των γονιδίων IL-1β, TNFα και GAPDH χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) και TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Οι μετρήσεις έγιναν με το ABI Prism 7000 Sequence Detection System software (Applied Biosystems). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ποσοτικοποιήθηκαν διαιρώντας τη μέση ποσότητα του γονιδίου-στόχου προς τη μέση ποσότητα

του γονιδίου-αναφοράς (GAPDH).

Μέτρηση του τελομερούς: Απομονώθηκε γενωμικό DNA από P2 MSC (QIAGEN). Το γονίδιο της β-σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό control μονογονιδιακού τύπου (single-copy-gene).^{95;96} Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε έτοιμο μίγμα iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Biorad, Hercules, CA). Οι αλληλουχίες των ειδικών εναρκτών παρατίθενται στον πίνακα 3. Το μήκος του τελομερούς αντικατοπτρίζεται από το σχετικό πηλίκο τελομερές/single-copy-gene (T/S): $T/S=2^{-\Delta CT}$, όπου $\Delta CT=CT^{\text{τελομερούς}}-CT^{\text{β-σφαιρίνης}}$.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες εναρκτών για τις αναλύσεις RT-PCR και Real-Time Quantitative PCR *				
Γονίδιο	Forward	Reverse	Tm	Κύκλοι
αP2	5'-GTACCTGGAAACTTGTCTCC-3'	5'-GTTCAATGCGAACTTCAGTCC-3'	60 °C	29
PPAR-γ	5'-GAATGTCGTCTGTGGAGA-3'	5'-TGAGGAGAGATTACTTGGTCG-3'	60 °C	29
ALP	5'-CTGGACCTCGTTGACACCTG-3'	5'-GACATTCTCTCGTTCACCCGC-3'	60 °C	29
CBF-1	5'-TTACTTACACCCCGCCAGTC-3'	5'-TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3'	60 °C	29
COLLII	5'-AACTGGCAAGCAA GGAGACA-3'	5'-AGTTTCAGGTCTCTGCAGGT-3'	57 °C	29
AGR	5'-ATGCCCAAGACTACCAGTGG-3'	5'-TCCTGGAAGCTCTTCTCAGT-3'	57 °C	29
β_{2m}	5'-TCCAACATCAACATCTTGGT-3'	5'-TCCCCCAAAATCTAAGCAGA-3'	60 °C	26
τελομερές	5'-CGGTTTGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'	5'-GGCTTGCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCT-3'		
β-σφαιρίνη	5'-GCTTCTGACACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'	5'-CACCAACTTCATCCACGTTCAACC-3'		

* Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των διαφοροποιημένων MSC έγινε ημιποσοτικό RT-PCR (αP2 - PPARγ για τη λιπογένεση, ALP - CBFA1 για την οστεογένεση και COLLII - AGR για τη χονδρογένεση).

Για τον προσδιορισμό του σχετικού μήκους του τελομερούς σε γενωμικό DNA από MSC P2, έγινε Real-Time ποσοτικό PCR.

3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση των δεδομένων από την τεχνική περιοριστικής αραίωσης έγινε με χρήση της κατανομής Poisson, στο στατιστικό πρόγραμμα Fig.P (Fig.P Software Corporation, Durham, NC).

Όλα τα υπόλοιπα δεδομένα αναλύθηκαν είτε με Mann-Whitney, είτε με one-way ANOVA tests στο στατιστικό πρόγραμμα GraphPAD (GraphPad Software, San Diego, CA). Τα ομαδοποιημένα δεδομένα εκφράζονται ως μέσες τιμές \pm απόκλιση από το μέσο (SEM).

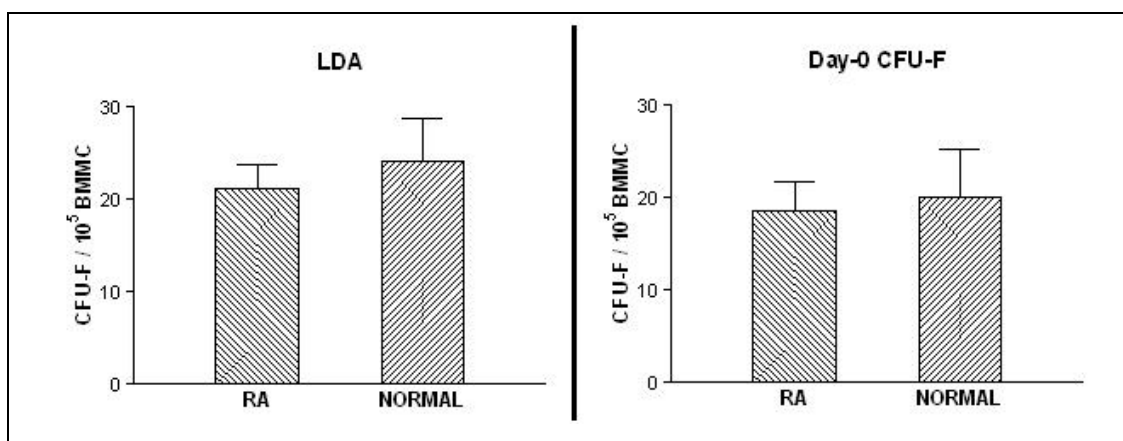
4.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ

Η εκτίμηση της συχνότητας των MSC στο μυελό των ασθενών έγινε χρησιμοποιώντας δύο μεθοδολογίες. Με την τεχνική περιοριστικής αραίωσης, η συχνότητα των MSC στο κλάσμα των μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων (BMMC) υπολογίστηκε και βρέθηκε παρόμοια στους ασθενείς ($20.74 \pm 12.41 / 10^5$ BMMC) και τους υγιείς μάρτυρες ($23.90 \pm 15.65 / 10^5$ BMMC; $P=0.8894$). Τα συνολικά αποτελέσματα φαίνονται στο αριστερό τμήμα της εικόνας 5.

Η συχνότητα των μυελικών MSC υπολογίστηκε και με μια δεύτερη μέθοδο, αυτή της δοκιμασίας σχηματισμού ινοβλαστικών αποικιών (CFU-F) από μυελικά μονοπύρηννα κύτταρα ημέρας-0. Τα αποτελέσματα (εικόνα 5) συμφωνούσαν με την προαναφερθείσα τεχνική περιοριστικής αραίωσης. Οι ασθενείς δίνουν 18.42 ± 13.75 CFU-F / 10^5 BMMC και οι μάρτυρες 19.85 ± 18.96 CFU-F / 10^5 BMMC ($P=0.3464$).

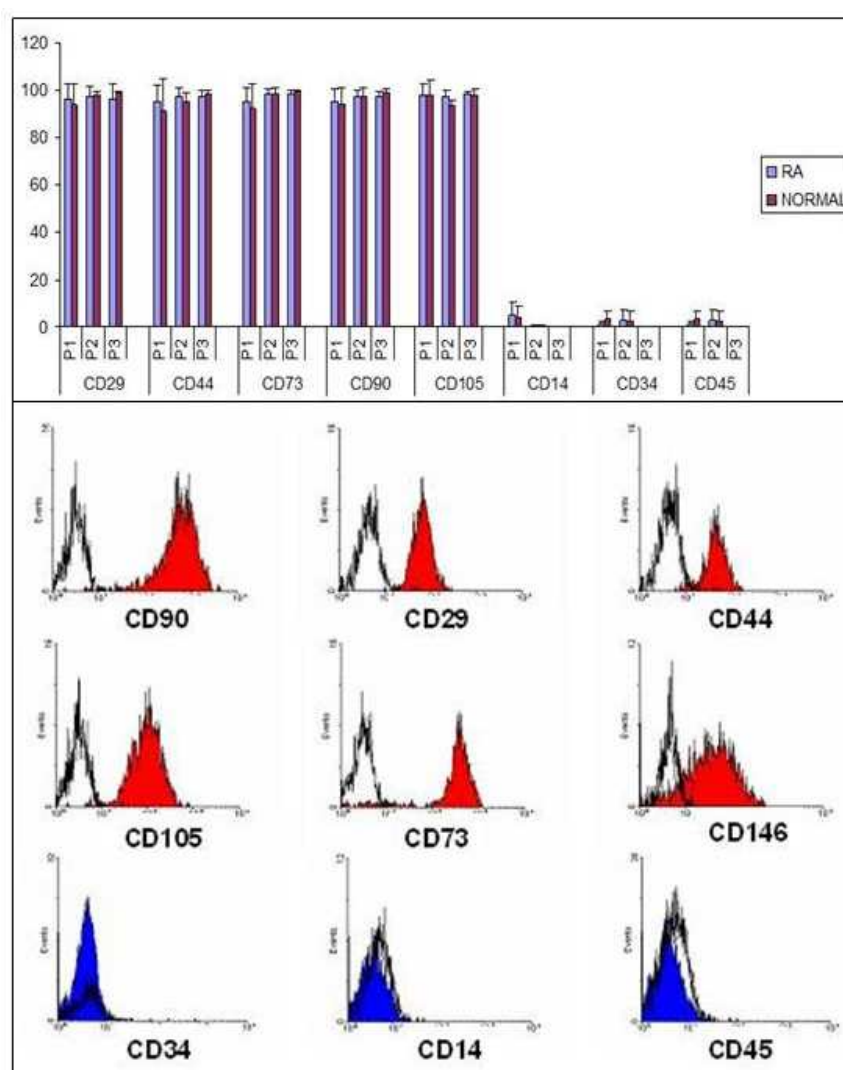


Εικόνα 5: Συχνότητα των MSC στο μυελό. Αριστερό ραβδόγραμμα: Συνολικά δεδομένα (μέση συχνότητα + SEM) από την τεχνική περιοριστικής αραίωσης, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Δεξί ραβδόγραμμα: Συνολικά δεδομένα (μέση συχνότητα + SEM) από τη δοκιμασία σχηματισμού ινοβλαστικών αποικιών από κύτταρα ημέρας-0, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της συχνότητας των MSC, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις παρατηρούμενες συχνότητες στους ασθενείς ($P=0.210$) ή τους υγιείς μάρτυρες ($P=0.199$). Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η συχνότητα των MSC είναι σε φυσιολογικά επίπεδα στο μυελό των ασθενών.

4.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

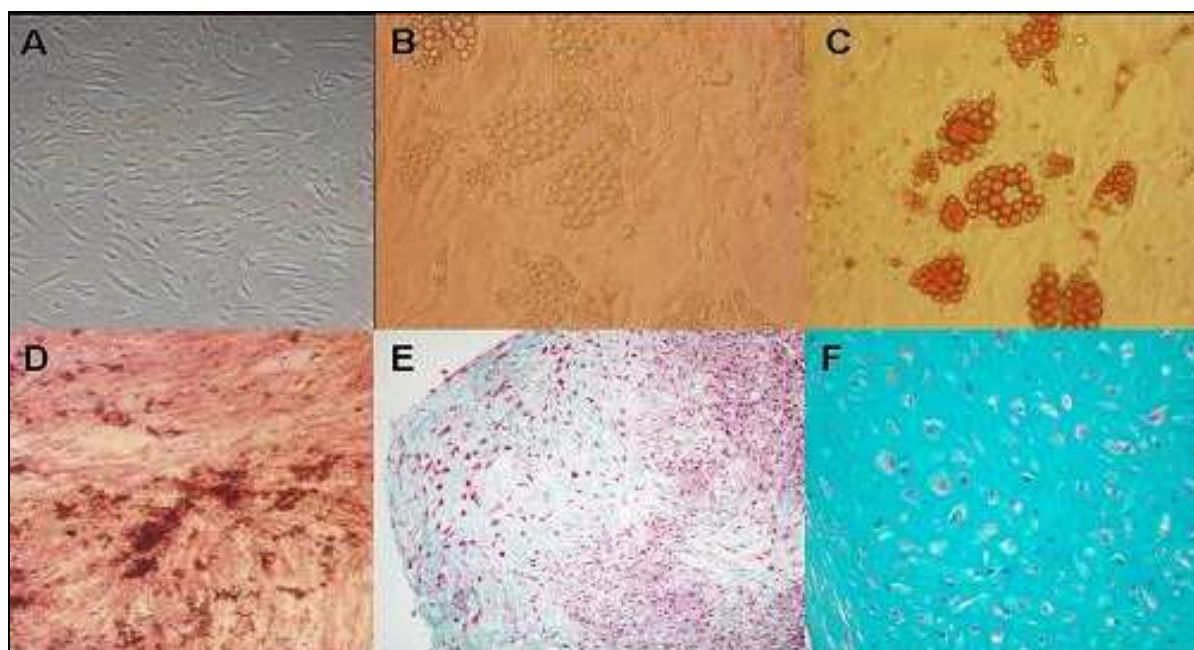
Πραγματοποιήθηκε ανοσοφαινοτυπική ανάλυση στο πέρας κάθε κυτταρικού περάσματος (passage, P), η οποία κατέδειξε ότι τα *in vitro* ανεπτυγμένα κύτταρα των ασθενών, όπως και των υγιών μαρτύρων, αποτελούσαν έναν ομοιογενή πληθυσμό θετικό για τα αντιγόνα επιφανείας CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 και CD146. Ταυτοχρόνως τα κύτταρα ήταν αρνητικά για τα αντιγόνα CD45, CD14 και CD34. Τα αποτελέσματα (εικόνα 6) καταδεικνύουν ότι τα κύτταρα των ασθενών έχουν φυσιολογικό φαινότυπο.



Εικόνα 6: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των MSC. Στο ανώτερο γράφημα παρουσιάζονται οι συνολικές αναλύσεις που έγιναν στο σύνολο των δειγμάτων για τρία κυτταρικά περάσματα P1-P2-P3 (μέσες τιμές + SEM). Στο κατώτερο γράφημα παρουσιάζεται μια τυπική εικόνα ανοσοφαινοτύπων κυτάρων ασθενούς από P2. Τα κόκκινα και μπλε ιστογράμματα δείχνουν τα θετικά και τα αρνητικά επιφανειακά αντιγόνα αντίστοιχα, συγκρινόμενα με τα ιστοτυπικά κοντρόλ (ανοικτά ιστογράμματα).

4.3 ΔΥΝΑΜΙΚΟ IN VITRO ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ελέγχθηκε ακολούθως η ικανότητα των κυττάρων των ασθενών να διαφοροποιούνται in vitro στις κυτταρικές γενεαλογίες των λιποκυττάρων, των οστεοβλαστών και των χονδροκυττάρων. Όλες οι διαφοροποιήσεις έγιναν σε κύτταρα P2. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο κυτταρικό πέρασμα, καθώς από τα δεδομένα της φαινοτυπικής ανάλυσης, κρίθηκε ότι τότε ο κυτταρικός πληθυσμός ήταν ομοιογενής, απαλλαγμένος πλέον από μικροπροσμίξεις αιμοποιητικών κυττάρων. Οι κυτταροχημικές χρώσεις έδειξαν ότι τα κύτταρα των ασθενών, όπως και των μαρτύρων, ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν in vitro. Φωτογραφία από τις σχετικές κυτταροχημικές χρώσεις από ένα δείγμα ασθενούς φαίνεται στην εικόνα 7.

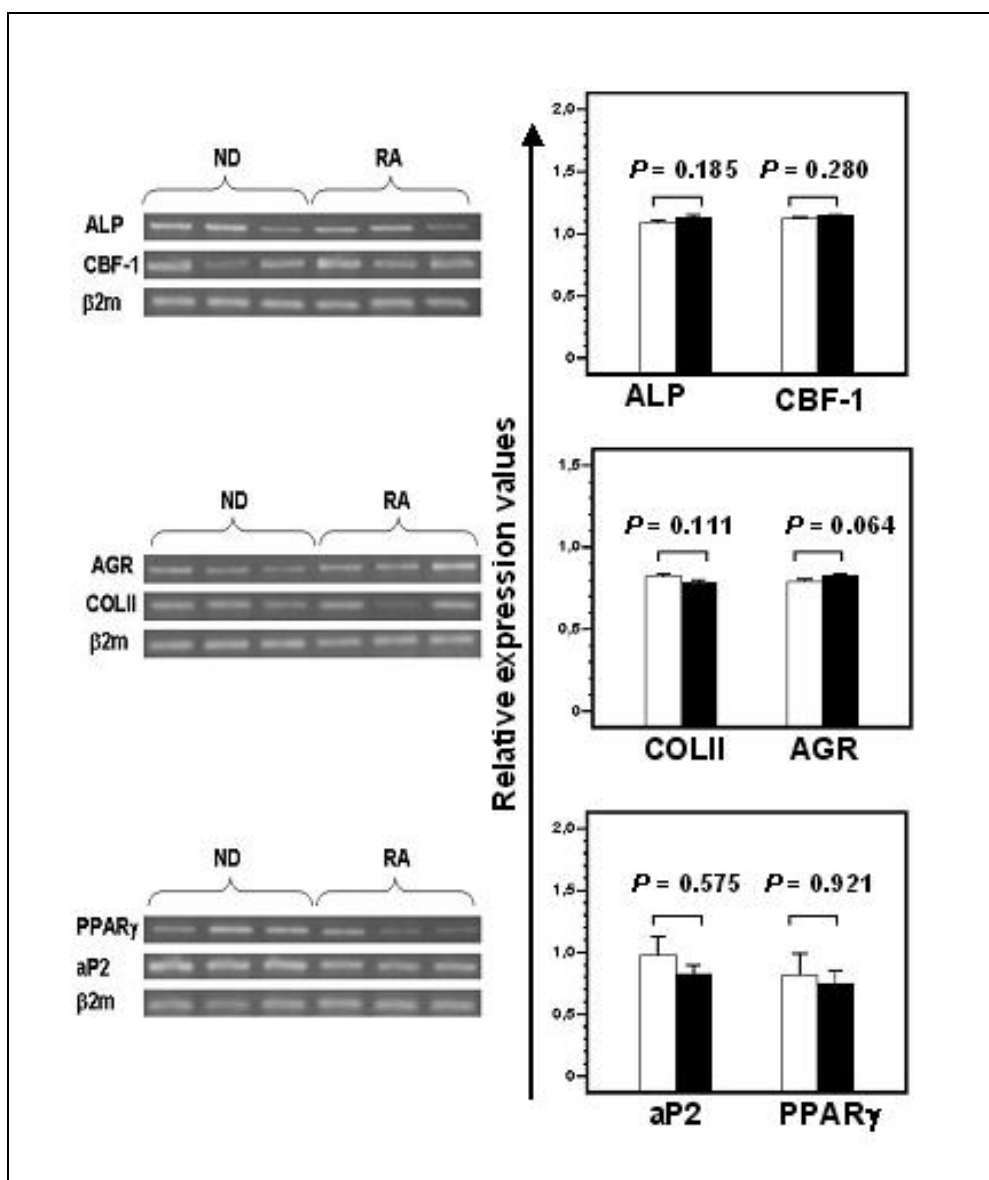


Εικόνα 7: In vitro διαφοροποιήσεις των MSC. Στην εικόνα παρουσιάζονται αδιαφοροποίητα MSC από P2 (A) και in vitro διαφοροποιημένα κύτταρα προς τη λιπογονική (B και C), οστεογονική (D) και τη χονδρογονική κυτταρική γενεαλογία (E και F) από έναν αντιπροσωπευτικό ασθενή με PA. Οι κυτταρικές διαφοροποιήσεις ταυτοποιήθηκαν με χρώση Oil red O (C), ALP/Von Kossa (D), Masson (E) και Alcian blue (F).

Επιπρόσθετα μετρήθηκε η σχετική έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων για τις τρεις συγκεκριμένες κυτταρικές γενεαλογίες, με σκοπό να υπολογιστεί κατά κάποιο τρόπο η ικανότητα της in vitro διαφοροποίησης των κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τέτοια γονίδια/δείκτες της διαφοροποίησης για κάθε κυτταρική γενεαλογία.

Το σχετικό δυναμικό της *in vitro* οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSC μετρήθηκε με την έκφραση των γονιδίων της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), ενός γονιδίου με ιδιαίτερα αυξημένη ενεργότητα στους οστεοβλάστες και του μεταγραφικού παράγοντα core binding protein factor-1 (CBF-1), που θεωρείται επαγωγέας της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Όσον αφορά το δυναμικό διαφοροποίησης των MSC προς λιποκύτταρα, μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων adipose fatty acid-binding protein (aP2), που συντελεί στο μεταβολισμό των λιπιδίων και είναι ιδιαίτερα ενεργό στα λιποκύτταρα και του μεταγραφικού παράγοντα peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ), ενός επαγωγέα της λιπογένεσης. Τέλος για το δυναμικό της χονδρογονικής διαφοροποίησης των MSC, μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου τύπου II (COLLII) και της πρωτεογλυκάνης aggrecan (AGR), τα οποία αποτελούν βασικά στοιχεία του χόνδρου. Η έκφραση όλων των παραπάνω γονιδίων κανονικοποιήθηκε ως προς την έκφραση του γονιδίου της β 2-μικροσφαιρίνης.

Μετά από ανάλυση των δεδομένων μας δεν διαπιστώθηκε στατιστική διαφορά του δυναμικού διαφοροποίησης ανάμεσα στα κύτταρα των ασθενών και των υγιών μαρτύρων (εικόνα 8). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα των ασθενών έχουν φυσιολογικό δυναμικό διαφοροποίησης.



Εικόνα 8: Δυναμικό *in vitro* διαφοροποίησης των MSC. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου της έκφρασης εξειδικευμένων γονιδίων σε μελικά P2 MSC, μετά από επαγωγή διαφοροποίησης στην οστεογονική, χονδρογονική και λιπογονική γενεαλογία σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών (n=3) και υγιών (n=3) ατόμων. Στο δεξί τμήμα παρουσιάζονται τα συνολικά δεδομένα (μέσες σχετικές τιμές + SEM) εξειδικευμένης γονιδιακής έκφρασης όλων των ασθενών με PA (■) και των υγιών μαρτύρων (□) που μελετήθηκαν. Η σύγκριση έγινε με το μη-παραμετρικό Mann-Whitney test.

4.4 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ

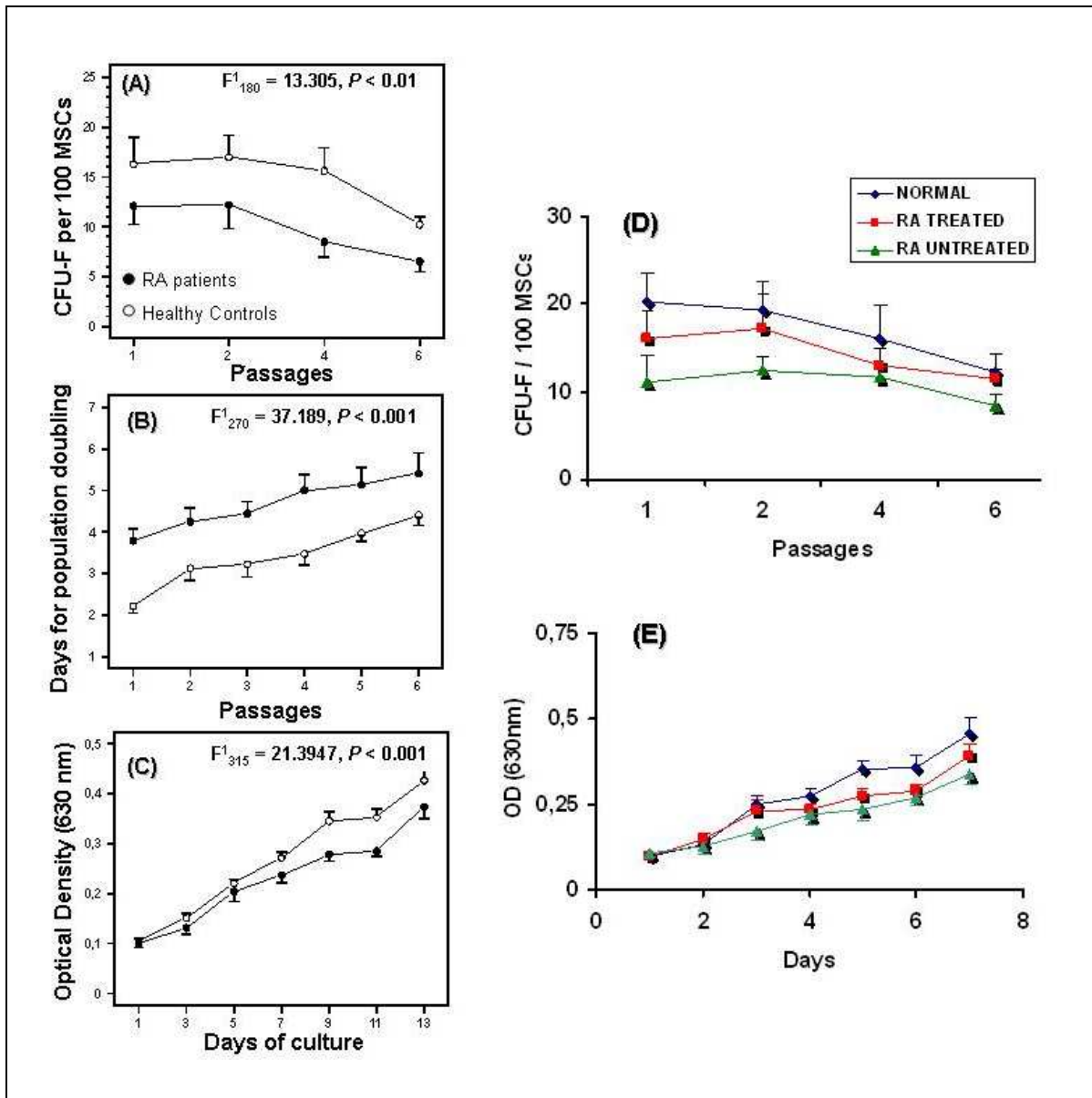
Μελετήθηκε το αναπτυξιακό δυναμικό των μυελικών MSC στους ασθενείς, εκτιμώντας την κλωνογονικότητα των κυττάρων, καθώς και το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων στην πάροδο του χρόνου.

Η κλωνογονικότητα εκφράζεται από τον αριθμό των κυττάρων που μπορούν να σχηματίσουν ινοβλαστικές αποικίες (CFU-F) και κατ' επέκταση είναι ικανά μιτωτικά. Μπορεί έτσι να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της πολλαπλασιαστικής ικανότητας, αλλά και της αωρότητας των κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι η απόδοση των *in vitro* αναπτυσσόμενων κυττάρων σε CFU-F ήταν αισθητά χαμηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, καθόλη την πάροδο των κυτταρικών περασμάτων P1-P6 ($P<0.01$) (εικόνα 9A), υποδηλώνοντας ελαττωματική ανάπτυξη και πιθανόν πρόωρη γήρανση των κυττάρων.

Το παραπάνω εύρημα ενισχύθηκε από τα δεδομένα υπολογισμού του χρόνου κυτταρικού διπλασιασμού στα P1-P6, όπου φαίνεται ότι τα κύτταρα των ασθενών πολλαπλασιάζονται πιο αργά από των μαρτύρων ($P<0.001$) (εικόνα 9B). Στην ύπαρξη ελαττωματικού πολλαπλασιαστικού δυναμικού συνηγορούν και τα δεδομένα από τη χρωμομετρική δοκιμή MTT, που αποτελεί μια τεχνική εκτίμησης του αριθμού των κυττάρων. Αναλυτικότερα, η δοκιμή MTT έγινε σε όλα τα πειράματα ξεκινώντας με έναν σταθερό σε μέγεθος αρχικό κυτταρικό πληθυσμό και εκτιμώντας την ανάπτυξη των κυττάρων για 2 εβδομάδες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9C, για το κυτταρικό πέρασμα P2 η ανάπτυξη των κυττάρων στους ασθενείς παρέμενε σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες ($P<0.001$). Συνολικά λοιπόν διαπιστώθηκε ελαττωματική ανάπτυξη στα κύτταρα των ασθενών σε σχέση με τα κύτταρα των υγιών μαρτύρων.

Καθώς η πλειοψηφία των ασθενών είχε προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπείες με κυτταροτοξικούς και/ή ανοσοκατασταλτικούς ή αντι-κυτταροκινικούς παράγοντες και με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανότητα πρόκλησης κάποιας βλάβης στα MSC συνέπεια αυτής της θεραπείας, έγινε μια νέα ανάλυση των δεδομένων σε δύο υπο-ομάδες: η μια αφορούσε τους ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε κάποια θεραπεία ($n=20$) και η άλλη τους ασθενείς που δεν είχαν ($n=6$). Οι ασθενείς που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία φαίνονται στον πίνακα 2 με κίτρινο χρώμα. Και

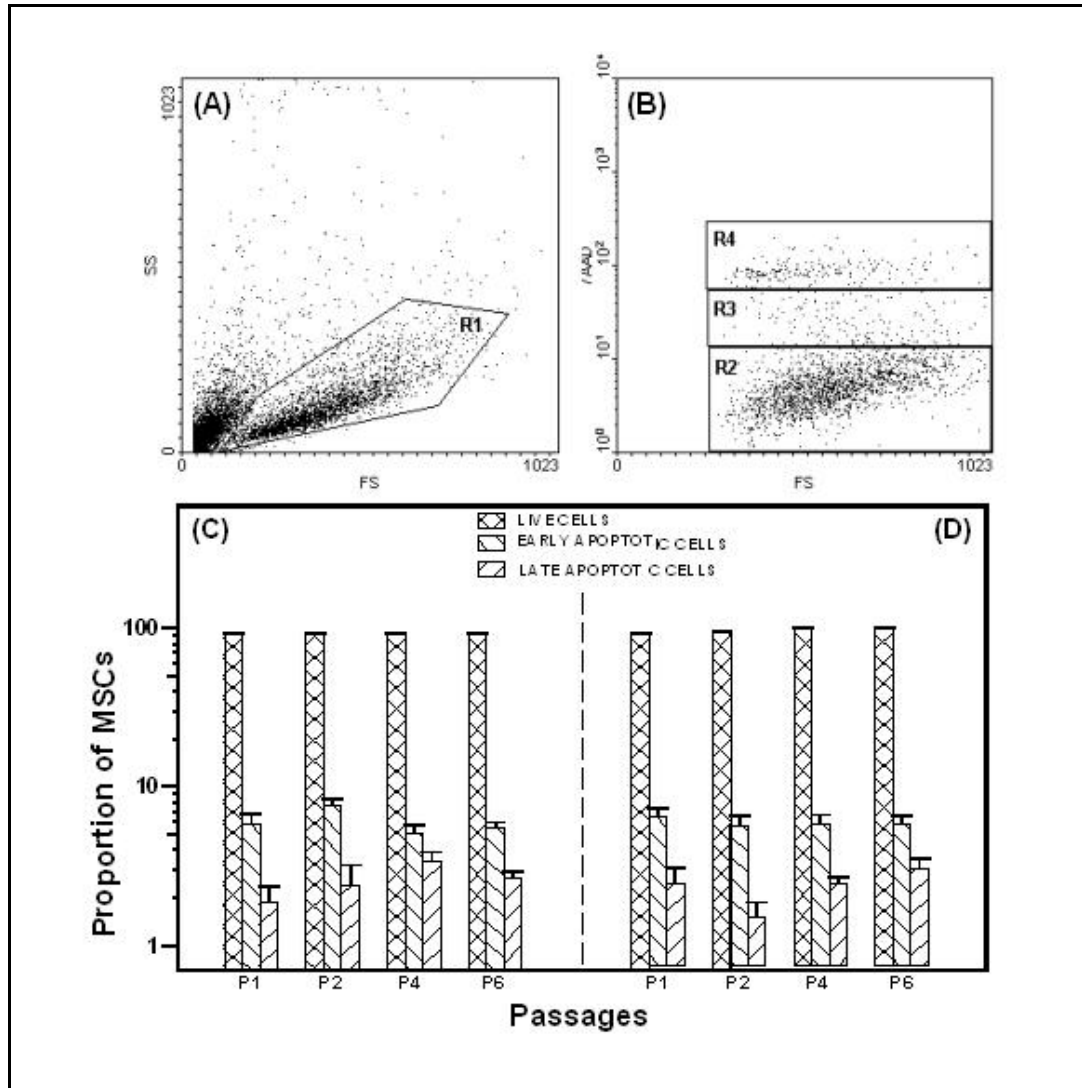
οι δύο υπο-ομάδες των ασθενών, συγκρινόμενες με τους υγιείς μάρτυρες, εμφάνιζαν ελαττωμένη κλωνογονικότητα κατά την πάροδο των P1-P6 (εικόνα 9D, $P < 0.001$ για τους ασθενείς με θεραπεία και $P < 0.05$ για τους ασθενείς χωρίς θεραπεία). Παρόμοια, και οι δύο υπο-ομάδες εμφάνιζαν αυξημένο χρόνο διπλασιασμού ($P < 0.001$ για τους ασθενείς με θεραπεία και $P < 0.05$ για τους ασθενείς χωρίς θεραπεία), καθώς και ελαττωματικό πολλαπλασιαστικό δυναμικό με την τεχνική MTT ($P < 0.001$ και $P < 0.05$, αντίστοιχα), συγκρινόμενες με τους μάρτυρες (εικόνα 9E). Τέλος δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υπο-ομάδων, όσον αφορά τις προηγούμενες παραμέτρους. Κατ' επέκταση, συμπεραίνουμε ότι είναι απίθανο να ευθύνεται για την ελαττωματική ανάπτυξη η προηγούμενη θεραπεία των ασθενών.



Εικόνα 9: Αναπτυξιακό δυναμικό στα μυελικά MSC. (A): Μέσος (\pm SEM) αριθμός των λαμβανομένων CFU-F, σε ασθενείς (●) και μάρτυρες (○). (B): Ημέρες που απαιτούνται για έναν πληθυσμιακό διπλασιασμό στην πάροδο των P1-P6, σε ασθενείς (●) και μάρτυρες (○). (C): Μέση (\pm SEM) οπτική πυκνότητα, που μετρήθηκε στη δοκιμασία MTT, η οποία αντιπροσώπευε το πλήθος των ζωντανών κυττάρων, σε κλειστή in vitro ανάπτυξη 13 ημερών, P2 MSC. (D) και (E): αναλύσεις των δεδομένων, με διαχωρισμό των ασθενών σε αυτούς που είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη θεραπεία (RA treated) και αυτούς που δεν είχαν (RA untreated). Στο διάγραμμα (D) αναλύεται το κλωνογονικό δυναμικό, ενώ στο (E) το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο υπο-ομάδες των ασθενών. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με 2-way ANOVA.

4.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Μια υπόθεση που εξετάστηκε στη συνέχεια, ήταν ενδεχομένως η ελαττωμένη ανάπτυξη των κυττάρων των ασθενών να οφείλεται σε αυξημένη κυτταρική απόπτωση αυτών. Έτσι μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά επιβίωσης των κυττάρων χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και τη χρωστική 7-AAD.



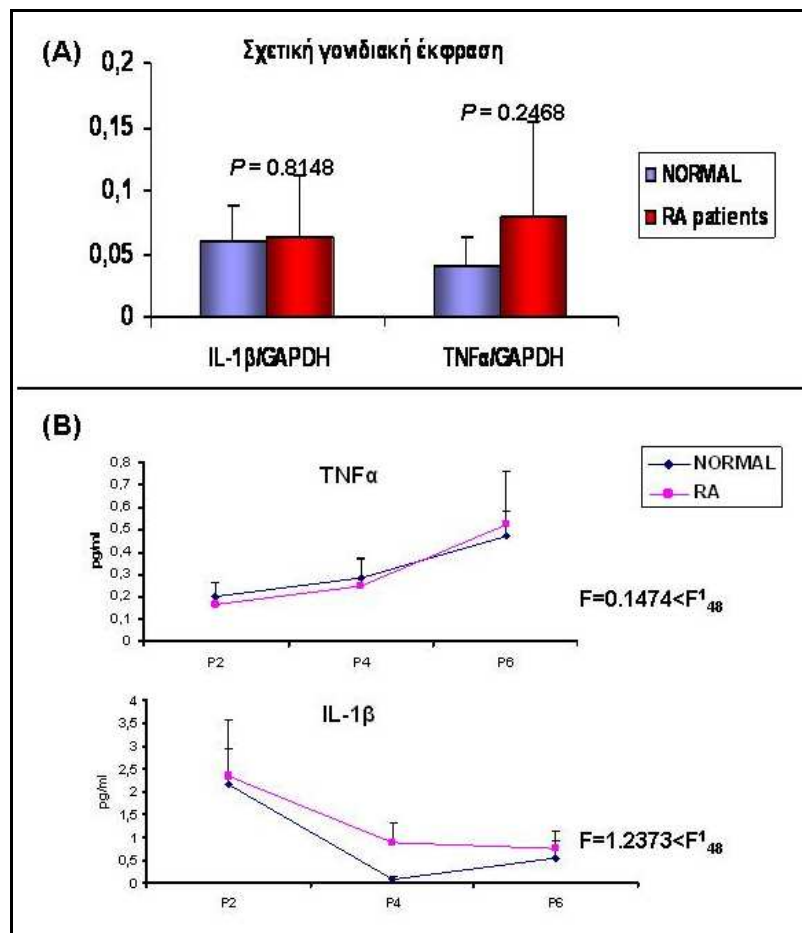
Εικόνα 10: Χαρακτηριστικά επιβίωσης των MSC. Για τη μελέτη της κυτταρικής απόπτωσης, MSC από P1-P6 επώαστηκαν με 7-AAD και αναλύθηκαν σε κυτταρομέτρο ροής. Στο νεφελόγραμμα (B) φαίνεται η αναλογία των 7-AAD^{low} ζωντανών κυττάρων (R2), 7-AAD^{dim} πρώιμα αποπτωτικών κυττάρων (R3) και 7-AAD^{bright} όψιμα αποπτωτικών κυττάρων (R4) στο παράθυρο R1 (νεφελόγραμμα A), ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από P2 MSC. Οι ράβδοι στο κατώτερο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν τη μέση (+SEM) αναλογία ζωντανών, πρώιμων και όψιμων αποπτωτικών κυττάρων σε ασθενείς (C) και υγιείς μάρτυρες (D) αναλυμένων ως ανωτέρω. Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες με ανάλυση 2-way ANOVA.

Διαπιστώθηκε ότι το συνολικό ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων κυμαινόταν από $7.68\% \pm 3.70\%$ στο P1, μέχρι 8.24 ± 2.01 στο P6 στους ασθενείς και από $8.25\% \pm 4.15\%$ στο P1, μέχρι 8.24 ± 2.85 στο P6 στους μάρτυρες (εικόνα 10). Συνολικά, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες στο ποσοστό των πρώιμα αποπτωτικών ($F=0.8206 < F^1_{84}$, N.S.) ή των όψιμα αποπτωτικών κυττάρων ($F=0.9977 < F^1_{84}$, N.S.) κατά την αναπτυξιακή περίοδο P1-P6.

Τα παραπάνω δεδομένα συνολικά υποστηρίζουν ότι η ελαττωμένη ανάπτυξη των κυττάρων των ασθενών δεν οφείλεται σε αυξημένη κυτταρική απόπτωση (εικόνα 10).

4.6 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Ακολούθως ερευνηθήκε το ενδεχόμενο τα κύτταρα των ασθενών να παρουσιάζουν ανώμαλη παραγωγή κυτταροκινών, όπως έχει ήδη αναφερθεί για τους ινοβλάστες της προσβεβλημένης άρθρωσης στους ασθενείς⁹⁷. Ο έλεγχος των κυτταροκινών παρουσιάζει ενδιαφέρον για δύο λόγους: από τη μια τα MSC μπορεί να παράγουν αναστολείς του πολλαπλασιασμού, που να επιδρούν στα ίδια και θα μπορούσε να αποτελεί μια εξήγηση της ελαττωμένης πολλαπλασιαστικής ικανότητας και από την άλλη τα MSC πιθανόν θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ίδια την παθογένεια της νόσου παράγοντας φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον μυελό, όπου παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα IL-1 β και TNF α .

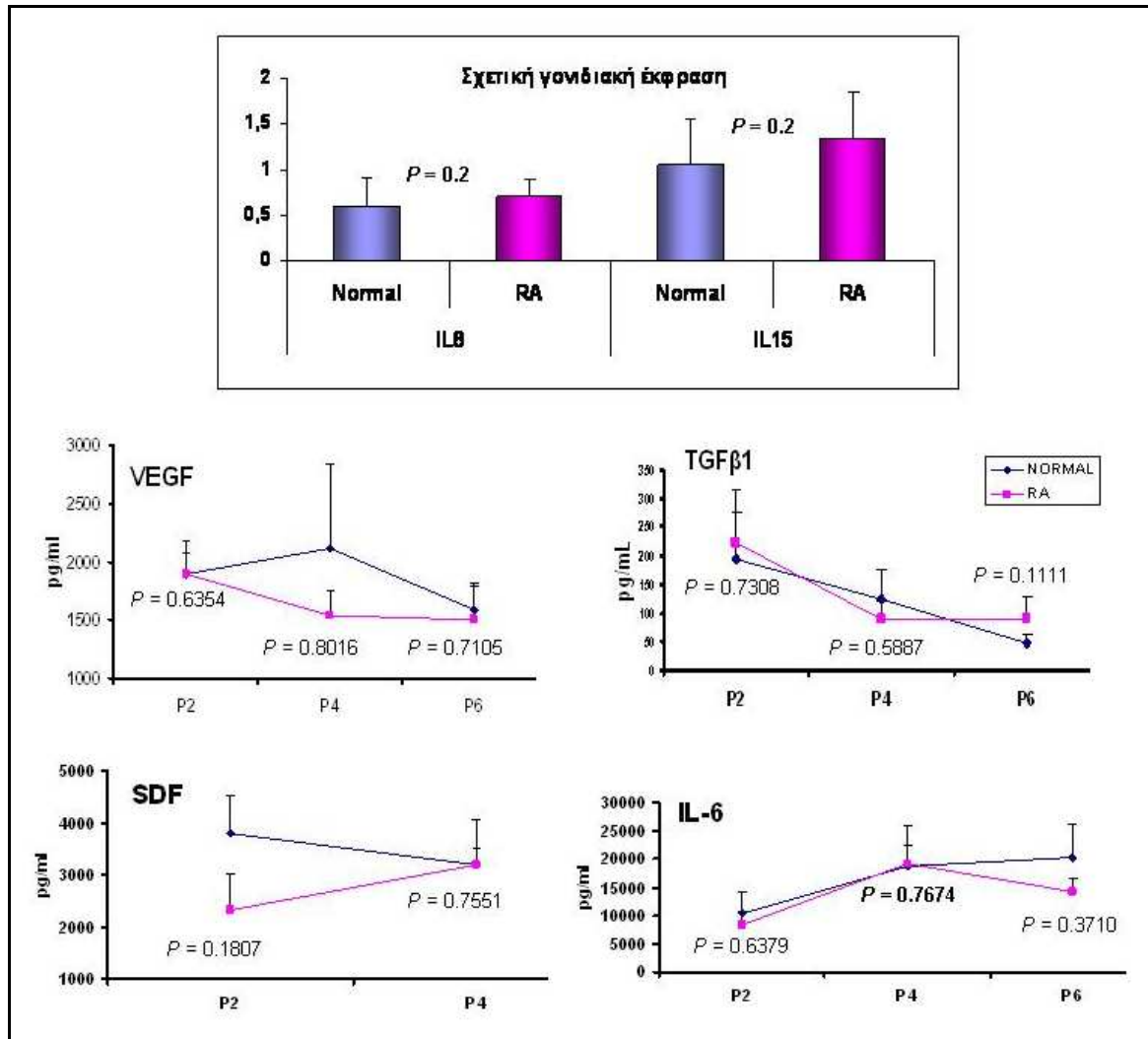


Εικόνα 11: Έκφραση των φλεγμονωδών παραγόντων IL-1 β και TNF α . (A): Συνολικά αποτελέσματα από τη σχετική γονιδιακή έκφραση των IL-1 β και TNF α , όπως αναλύθηκε με real-time PCR, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες (μέσες τιμές + SEM). (B): Συνολικά δεδομένα μέτρησης των παραγόμενων παραγόντων IL-1 β και TNF α στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών στα P2-P4-P6 (μέσες τιμές + SEM).

Έτσι, κατ' αρχάς εκτιμήθηκε η παραγωγή IL-1β και TNFα. Τα σχετικά επίπεδα του mRNA των IL-1β και TNFα (κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της GAPDH) στο P2 δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες (0.059 ± 0.029 και 0.040 ± 0.022 , αντίστοιχα). Παρόμοια με τα επίπεδα του mRNA, ήταν και τα επίπεδα των αντίστοιχων παραγόντων στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών, όπως αυτά καθορίστηκαν με χρήση της τεχνικής ELISA. Δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες κατά την αναπτυξιακή περίοδο P2-P6 ($F=0.1474 < F_{48}^1$ και $F=1.2373 < F_{48}^1$, αντίστοιχα). Κατά συνέπεια δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση των παραγόντων IL-1β και TNFα ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες (εικόνα 11). Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι είναι μάλλον απίθανο τα MSC των ασθενών να συμβάλλουν στην παθογένεια της PA, όσον αφορά την ανάπτυξη φλεγμονής στο μυελικό μικροπεριβάλλον.

Ακολούθως ερευνήθηκαν τα επίπεδα κυτταροκινών που προάγουν την ανάπτυξη των MSC στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών με την τεχνική ELISA. Συγκεκριμένα ερευνήθηκαν τα επίπεδα των VEGF και SDF-1, καθώς και τα επίπεδα παραγωγής των ανασταλτικών/φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TGFβ₁ στα P2-P6. Σε όλους τους παραπάνω παράγοντες δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα των ασθενών και των μαρτύρων (εικόνα 12). Τέλος μελετήσαμε τη γονιδιακή έκφραση των IL-8 και IL-15 σε κύτταρα P2, χωρίς πάλι να διαπιστωθούν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες (εικόνα 12).

Συνολικά και αφού δεν διαπιστώθηκαν διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες, τα προηγούμενα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η παραγωγή κυτταροκινών αφ' εαυτή δεν είναι υπεύθυνη για τις παρατηρούμενες διαταραχές στο αναπτυξιακό δυναμικό των MSC στους ασθενείς.



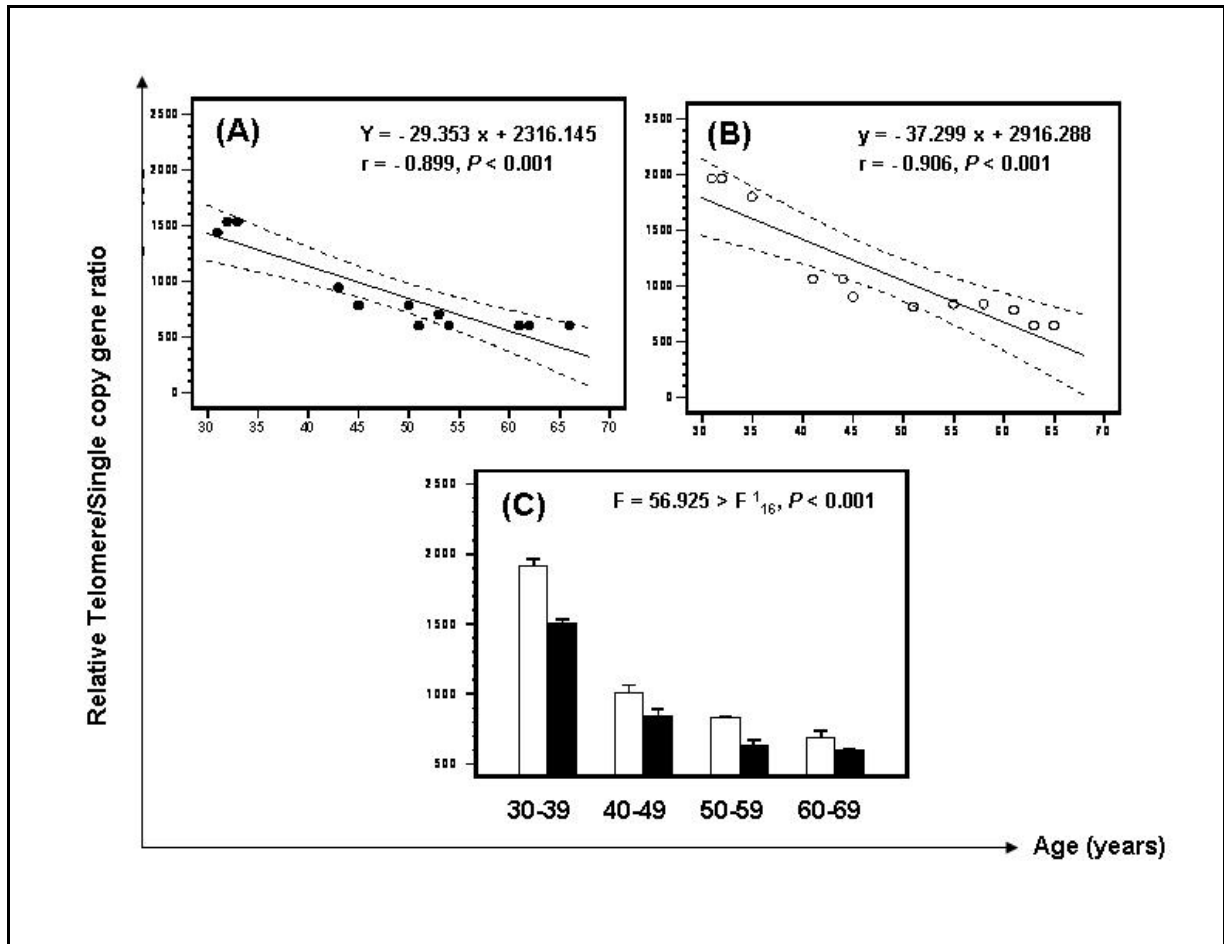
Εικόνα 12: Έκφραση αυξητικών παραγόντων και φλεγμονωδών κυτταροκινών. Τα δεδομένα για τους παράγοντες IL-8 και IL-15, αφορούν τη σχετική γονιδιακή έκφρασή τους, κανονικοποιημένη ως προς το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (μέσες τιμές + SEM). Για τους υπόλοιπους παράγοντες, παρουσιάζονται τα συνολικά δεδομένα μέτρησης των παραγομένων παραγόντων στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών στα P2-P4-P6 (μέσες τιμές + SEM).

4.7 ΜΗΚΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΟΥΣ

Το μήκος των τελομερών αποτελεί έναν δείκτη κυτταρικής γήρανσης, καθώς γενικά το μέγεθός του είναι αντιστρόφως ανάλογο της ηλικίας. Έχει περιγραφεί ελαττωμένη κυτταρική ανάπτυξη συνυφασμένη με πρόωρη απώλεια τελομερούς για τους περιαρθρικούς οστεοβλάστες στη PA ⁹⁸. Με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο κάτι ανάλογο ισχύει και για τα μυελικά MSC στους ασθενείς, υπολογίσαμε το σχετικό μήκος του τελομερούς (relative telomere length, RTL) σε P2 MSC, σε 12 ασθενείς και 12 ηλικιακά και φυλετικά ταιριαστούς υγιείς μάρτυρες. Η ανάλυση έγινε με μεθοδολογία real-time PCR, όπου με ειδικούς εκκινητές μετρήθηκαν τα τελομερή (T) και η β-σφαιρίνη ως γονίδιο μονού αντιγράφου (single-copy-gene, S). Το σχετικό μήκος του τελομερούς υπολογίστηκε από το πηλίκο $RTL=T/S$.

Παρατηρήθηκε μια αντιστρόφως ανάλογη με την ηλικία ελάττωση στο RTL και στους ασθενείς ($r=-0.899$, $P<0.001$), όπως και στους μάρτυρες ($r=-0.906$, $P<0.001$) (εικόνα 13). Για να χαρακτηρισθούν τα RTL των κυττάρων των ασθενών σαν πρόποντα ή μη-πρόποντα για μια δεδομένη ηλικία, καθορίσαμε το πηλίκο παρατηρούμενο/προβλεπόμενο RTL (observed/predicted, O/P) για κάθε ηλικιακό δείγμα, σύμφωνα με την εξίσωση που απορρέει από την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης συσχετίζοντας τα RTL και την ηλικία (χρόνια) των μαρτύρων. Βρήκαμε ότι το μέσο πηλίκο O/P των ασθενών (0.83 ± 0.20) ήταν εκτός των ορίων αξιοπιστίας 95% των μαρτύρων (μέσο πηλίκο O/P 0.67 ± 0.17 , $P=0.0226$), υπονοώντας μη-πρόπουσα απώλεια τελομερούς για τη δεδομένη ηλικία. Με μια διαφορετική ανάλυση, όπου αναλύθηκε το μέσο RTL ανά δεκαετία, σε ασθενείς και μάρτυρες παρατηρήθηκε πάλι στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.001$) (εικόνα 13C), επιπρόσθετα δείχνοντας πρόωρη απώλεια τελομερούς στα MSC των ασθενών.

Η ελάττωση του τελομερούς στα κύτταρα των ασθενών, καθώς σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση, αποτελεί μια ένδειξη πρόωρης κυτταρικής γήρανσης των κυττάρων των ασθενών συγκρινομένων με τα κύτταρα των μαρτύρων. Τα παραπάνω δεδομένα δεν αντιτίθενται στο ελαττωματικό αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων.



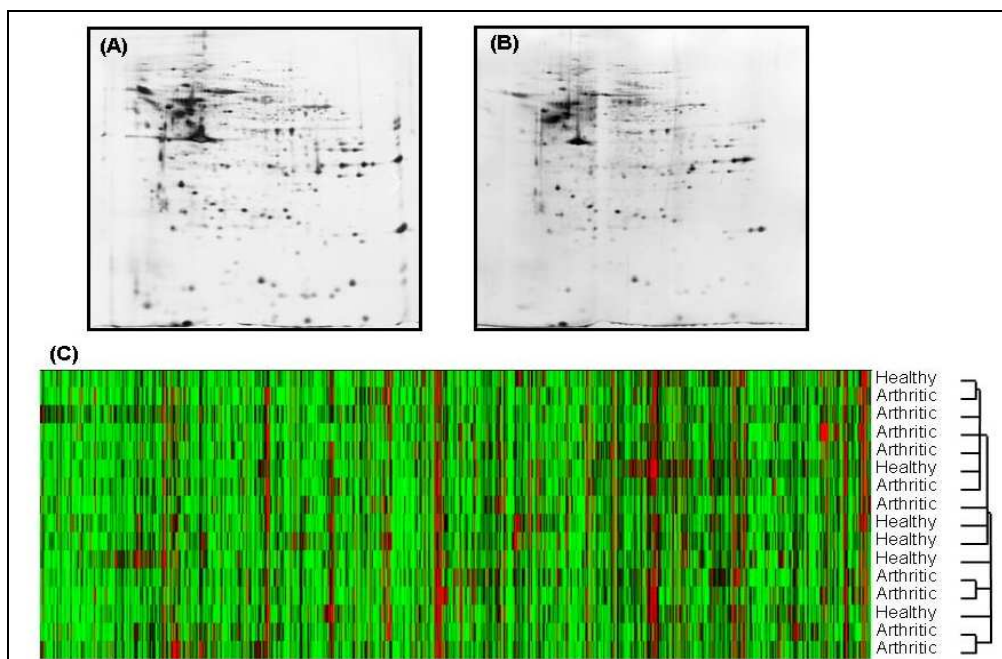
Εικόνα 13: Σχετικό μήκος του τελομερούς στα μυελικά MSC. Στα διαγράμματα (A) και (B) αναπαριστάται η συσχέτιση της ηλικίας και του λόγου T/S στα MSC (ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης \pm 95% όρια αξιοπιστίας), στα PA (●) και τα φυσιολογικά (○) άτομα. Στο διάγραμμα (C) αναπαριστάται το μέσο (\pm SEM) σχετικό μήκος του τελομερούς ανά δεκαετία στα PA (■) και τα φυσιολογικά (□) άτομα. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με 2-way ANOVA.

4.8 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Παρουσιάζονται δεδομένα που συμπληρώνουν τη μελέτη των μυελικών MSC στους ασθενείς, τα οποία δεν έγιναν από την υποψήφια διδάκτορα, αλλά δημοσιεύτηκαν στην ολοκληρωμένη ερευνητική εργασία.

4.8.1 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

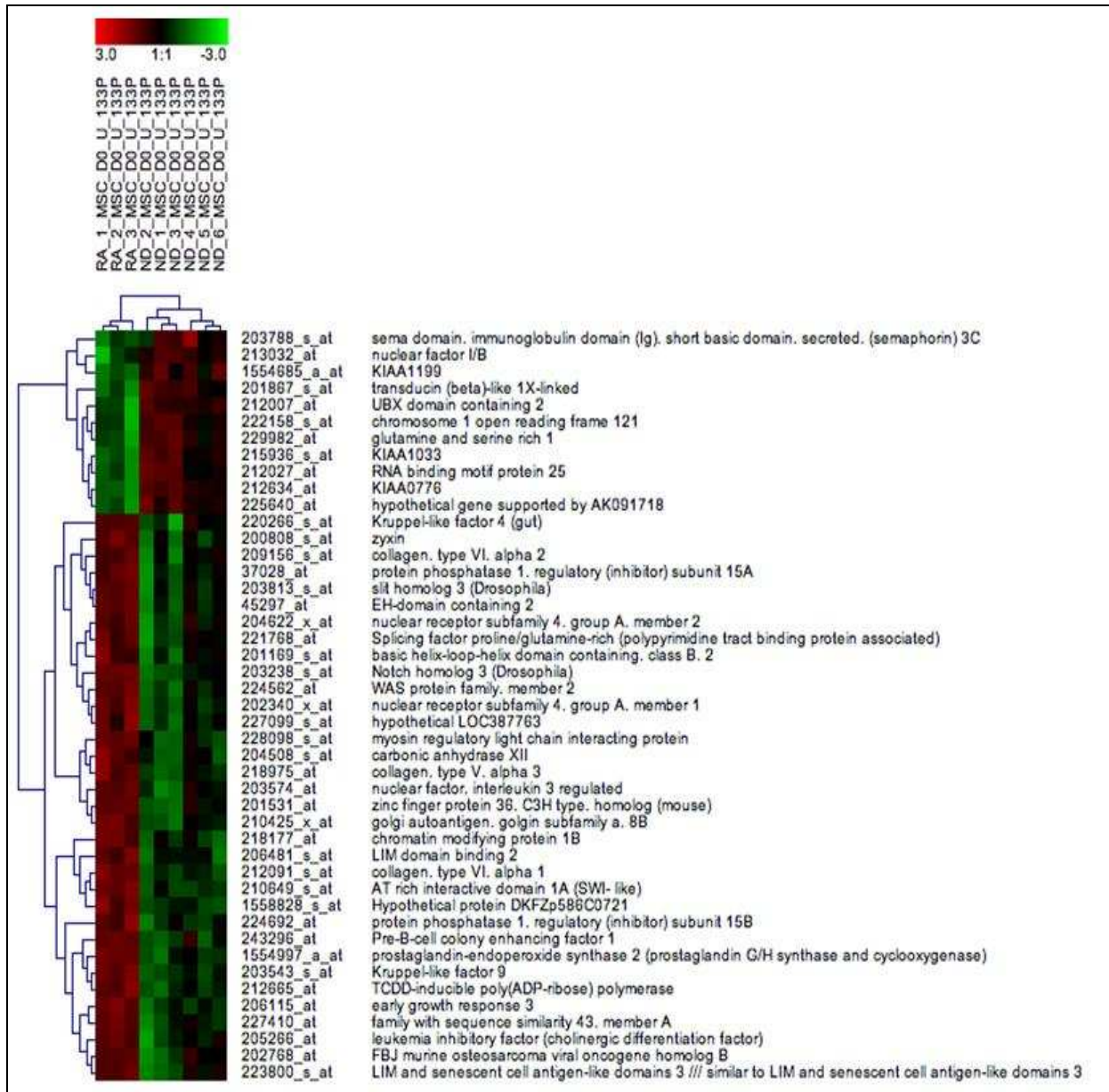
Έγινε ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2-D) σε κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από P2 κύτταρα ασθενών (n=10) και υγιών μαρτύρων (n=6) (εικόνα 14A-B). Μετά από κατάλληλη επεξεργασία των πηκτωμάτων και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ιεραρχικής ομαδοποίησης (Hierarchical Clustering) δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός σε ξεχωριστές ομάδες, των κυττάρων των ασθενών και των μαρτύρων (εικόνα 14C). Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα κύτταρα ασθενών και μαρτύρων ($r=0.933\pm 0.022$ και $r=0.929\pm 0.020$, αντίστοιχα). Τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν με την έλλειψη σημαντικών αλλαγών στην παραγωγή κυτταροκινών ανάμεσα στα κύτταρα ασθενών και μαρτύρων.



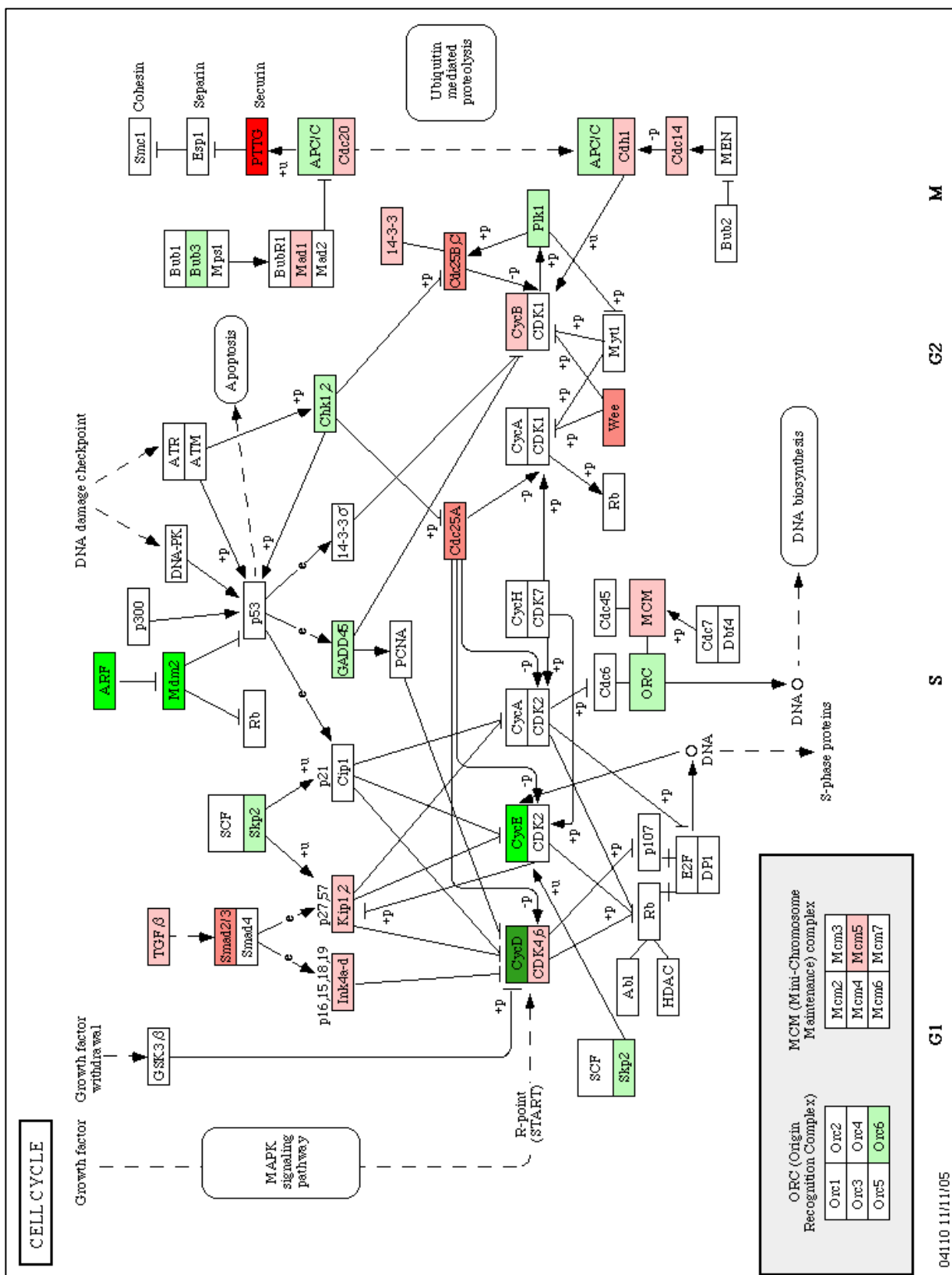
Εικόνα 14: Πρωτεομική ανάλυση των MSC. Ηλεκτροφόρηση 2-D με κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από P2 MSC ασθενών (n=10) (A) και μαρτύρων (n=6) (B). Δεν διαπιστώθηκε κλασμάτωση των ασθενών και των μαρτύρων σε ξεχωριστές ομάδες (C).

4.8.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

Έγινε ανάλυση γονιδιακού προφίλ με την τεχνική *micro-array*, με ιδιαίτερη διερεύνηση σε γονίδια που κωδικοποιούν για μόρια επιφανείας, κυτταροκίνες και δείκτες διαφοροποίησης. Η επιλογή γονιδίων που εκφράζονται διαφορεικά στους ασθενείς και τους μάρτυρες, επέτρεψε την ξεχωριστή ομαδοποίηση των δειγμάτων των ασθενών και των υγιών μαρτύρων με τη μέθοδο της ιεραρχικής ομαδοποίησης (εικόνα 15). Μετά τη συλλογή και ανάλυση των δεδομένων και χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), αναζητήθηκαν γονίδια που συμμετέχουν σε κανονικά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (*canonical pathways*). Τα γονίδια με την πλέον διαφορετική έκφραση, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση (*focal adhesion*) με την εξωκυτάρια ουσία. Πιο συγκεκριμένα, αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και κατ' επέκταση συνδέονται με κυτταρική κινητικότητα, πολλαπλασιασμό και επιβίωση, βρέθηκαν να έχουν διαφορετική έκφραση ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ελαττωμένη έκφραση της κυκλίνης-D στα κύτταρα των ασθενών και η αυξημένη έκφραση των αναστολέων της κυκλίνης-D, *Ink4a-d* και *Kip1,2*, καθώς και των επαγωγέων των τελευταίων *Smad2/3* και *TGF-β*. Η κυκλίνη-D διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από τη G1 στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 16).



Εικόνα 15: Ανάλυση γονιδιακού προφίλ των MSC. Χρησιμοποιήθηκε RNA από P2 MSC από ασθενείς (n=3) και υγιείς μάρτυρες (n=6). Η επιλογή για γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά στους ασθενείς και στους μάρτυρες επέτρεψε το διαχωρισμό των δειγμάτων των ασθενών από των υγιών μαρτύρων με τη μέθοδο της ιεραρχικής ομαδοποίησης.



Εικόνα 17: Από την ανάλυση γονιδιακού προφίλ, εντοπίστηκαν διαφορές σε γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Με πράσινο αναπαριστάται η ελαττωμένη γονιδιακή έκφραση, ενώ με κόκκινο η αυξημένη.

5.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε, αφενός με στόχο τη διερεύνηση πιθανής παθολογίας στα μυελικά MSC των ασθενών που πιθανόν θα μπορούσε να συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου, αλλά και αφετέρου με στόχο την δυναμική μελλοντική χρήση των αυτόλογων μυελικών MSC για επιδιόρθωση οστού και χόνδρου στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, μια νόσο υποψήφια για μελλοντική εφαρμογή των MSC στην επιδιόρθωση των περιαρθρικών δομών, οστού και χόνδρου. Η μελέτη των κυττάρων των ασθενών μπορεί να φανεί σημαντική και για έναν ακόμη λόγο, καθώς υπάρχουν κάποια δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα ετερόλογα MSC μπορεί να μην είναι τόσο προνομιούχα ανοσολογικά, όπως πιστευόταν ⁴⁷. Εκτιμήθηκε η συχνότητα των κυττάρων στο μυελό, μελετήθηκαν τα λειτουργικά και μοριακά χαρακτηριστικά τους, καθώς και το δυναμικό διαφοροποίησης.

Διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα των MSC στο μυελό δεν διέφερε ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες μεθοδολογίες για την εκτίμηση της μυελικής συχνότητας των κυττάρων, που από κοινού κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα. Καθώς τα δεδομένα μας συμφωνούν και με προγενέστερες μελέτες που αφορούν τη συχνότητα των MSC σε φυσιολογικούς μυελούς, υποστηρίζουν ότι οι ασθενείς διαθέτουν φυσιολογικές στον αριθμό αποθήκες μυελικών MSC ^{16;54}. Επιπρόσθετα διαπιστώθηκε ότι τα *in vitro* ανεπτυγμένα κύτταρα των ασθενών ήταν φαινοτυπικά πανομοιότυπα με τα αντίστοιχα των μαρτύρων. Συνοπτικά χαρακτηρίστηκαν ως CD29⁺/CD44⁺/CD73⁺/CD90⁺/CD105⁺/CD146⁺ και CD45⁻/CD14⁻/CD34⁻.

Ένα ακόμη φυσιολογικό στοιχείο των *in vitro* ανεπτυγμένων κυττάρων των ασθενών είναι η ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν. Μελετήθηκε η ικανότητα διαφοροποίησης σε τρεις κυτταρικές γενεαλογίες: την λιπογονική, την οστεογονική και την χονδρογονική. Η αξιολόγηση του δυναμικού διαφοροποίησης έγινε με τη βοήθεια των αντίστοιχων κυτταροχημικών χρώσεων, αλλά και με ημι-ποσοτική εκτίμηση (RT-PCR) της γονιδιακής έκφρασης εξειδικευμένων γονιδίων για κάθε γενεαλογία. Τα κύτταρα των ασθενών παρουσίασαν φυσιολογικό δυναμικό διαφοροποίησης για όλες τις προαναφερθείσες κυτταρικές γενεαλογίες. Είναι γνωστό ότι οι παρατηρούμενες βλάβες σε οστό και χόνδρο, στην προσβεβλημένη άρθρωση στους ασθενείς, είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους διάβρωσης και καταστροφής των ιστών. Ωστόσο είναι πιθανό να συνυπάρχει και ένας αναποτελεσματικός μηχανισμός επιδιόρθωσης. Για παράδειγμα, έχει

αναφερθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες ελαττωμένη χονδρογονική ενεργότητα στα μυελικά MSC σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, που συσχετίστηκε με τη διαταραχή του ομοιοστατικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του περιαρθρικού χόνδρου ⁹⁹. Τα δεδομένα μας, καθώς υποστηρίζουν ότι η διαφοροποιητική ικανότητα των κυττάρων των ασθενών είναι μέσα στα φυσιολογικά επίπεδα, υποδηλώνουν ότι μπορούν να συνεισφέρουν ικανοποιητικά στην ιστολογική επιδιόρθωση.

Επιπρόσθετα τα *in vitro* ανεπτυγμένα κύτταρα των ασθενών παρουσίασαν φυσιολογική παραγωγή διάφορων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-15, TGF β ₁, VEGF και SDF-1). Στο παραπάνω συμπέρασμα καταλήγουμε μετά και από εκτιμήσεις με τη μέθοδο ELISA από τα υπερκείμενα των *in vitro* ανεπτυγμένων κυττάρων, καθώς και μετά την εκτίμηση γονιδιακής έκφρασης με RT-PCR. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ανώμαλη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από τους ινοβλάστες της προσβεβλημένης άρθρωσης και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι ινοβλάστες της ρευματικής άρθρωσης είναι μυελικά MSC με διαταραγμένες ιδιότητες που εγκαθίστανται στον αρθρικό υμένα των ασθενών ^{82;97}. Η διαταραχή αυτή θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα είτε του φλεγμονώδους αρθρικού περιβάλλοντος, είτε να οφείλεται σε ενδογενή διαταραχή των μυελικών MSC των ασθενών. Καθώς από τα πειράματά μας δεν διαπιστώθηκε διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς και τους μάρτυρες στην έκφραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει κάποια ενδογενής διαταραχή στα κύτταρα των ασθενών. Εκτός από το αρθρικό υγρό οι IL-1 β και TNF α έχουν αναφερθεί υπερ-εκφρασμένες και σε υπερκείμενα μυελικών στρωματικών καλλιιεργειών των ασθενών ^{89;100}. Εντούτοις τα δεδομένα από τα πειράματά μας καταδεικνύουν ότι τα κύτταρα των ασθενών δεν φαίνονται υπεύθυνα για την αυξημένη έκφραση των παραπάνω κυτταροκινών στο μυελό των ασθενών. Έτσι αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στα μακροφάγα κύτταρα, που επίσης είναι παρόντα στις μυελικές μακρόχρονες στρωματικές καλλιιεργειες.

Παρόλα αυτά, το αναπτυξιακό δυναμικό των *in vitro* ανεπτυγμένων κυττάρων των ασθενών βρέθηκε διαταραγμένο συγκρινόμενο με των υγιών μαρτύρων. Διαπιστώθηκε ότι κατά την πάροδο των κυτταρικών περασμάτων ο μέσος χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων ήταν

σημαντικά ελαττωμένος στα κύτταρα των ασθενών. Επιπροσθέτως ελαττωμένο βρέθηκε και το κλωνογονικό δυναμικό των κυττάρων των ασθενών. Οι παραπάνω διαταραχές στην ανάπτυξη των κυττάρων δεν οφείλονται σε αύξηση του κυτταρικού θανάτου, καθώς το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων δεν διέφερε ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Επίσης δεν φαίνεται να οφείλονται και σε κάποια διαταραχή στην έκφραση των ενδογενών κυτταροκινών ή αυξητικών παραγόντων, εφόσον δεν διαπιστώθηκε αλλοιωμένη παραγωγή αυτών.

Η πλειοψηφία των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη είχε υποβληθεί σε κάποια προηγούμενη θεραπεία: μεθοτρεξάτη, κορτικοστεροειδή, αντι-κυτταροκίνες ή αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες. Προγενέστερες μελέτες αναφέρουν ότι η μεθοτρεξάτη δεν επηρεάζει την επιβίωση και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των MSC, ενώ τα κορτικοστεροειδή μπορεί να καταστρέφουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους¹⁰¹. Δεν έχουν αναφερθεί δεδομένα για την επίδραση αντι-κυτταροκινών, ούτε και αντι-φλεγμονωδών παραγόντων στα MSC. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα μιας επαγόμενης βλάβης λόγω θεραπείας στα κύτταρα των ασθενών, αναλύθηκαν τα συνολικά δεδομένα που σχετίζονταν με το αναπτυξιακό δυναμικό χωριστά στους ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε κάποια θεραπεία και στους ασθενείς χωρίς θεραπεία. Βρέθηκε ότι και στις δύο υπο-ομάδες το αναπτυξιακό δυναμικό ήταν σημαντικά ελαττωμένο. Επίσης δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο υπο-ομάδες. Τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ότι οι θεραπείες με τους διάφορους αντι-ρευματικούς παράγοντες στο σύνολό τους, δεν αποτελούν την αιτία της παρατηρούμενης αναπτυξιακής διαταραχής των μυελικών MSC των ασθενών.

Έχει δειχθεί ότι η γήρανση μπορεί να επηρεάζει το αναπτυξιακό δυναμικό των MSC¹⁰². Καθώς οι ασθενείς και οι υγιείς μάρτυρες ήταν αναλόγου ηλικίας, μοιάζει απίθανο οι διαταραχές στο αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων να είναι απόρροια της ηλικίας. Εντούτοις τα κύτταρα των ασθενών παρουσίασαν πρόωρη, δυνάμολογη προς την ηλικία, ελάττωση τελομερούς στα χρωμοσώματά τους. Καθώς υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του κυττάρου σχετίζεται με το αρχικό μήκος του τελομερούς^{103;104}, διατυπώνουμε την υπόθεση ότι η πρόωρη ελάττωση τελομερούς, ως δείκτη πρόωρης κυτταρικής γήρανσης, μπορεί να εξηγεί το ελαττωματικό αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων των ασθενών. Αν και δεν

διερευνήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης, υποθέτουμε ότι κάτω από την επίδραση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος στον μυελό των ασθενών⁸⁹, τα MSC υπόκεινται σε αυξημένη ανάπτυξη, με αποτέλεσμα την πρόωρη απώλεια τελομερούς και την πρόωρη γήρανση των κυττάρων. Παρομοίως ελαττωμένο αναπτυξιακό δυναμικό έχει περιγραφεί στους περιαρθρικούς οστεοβλάστες στους ασθενείς PA⁹⁸.

Η συμπληρωματική ανάλυση γονιδιακού προφίλ έδειξε ότι υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στα κύτταρα των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Διαπιστώθηκε διαφορικότητα στην έκφραση γονιδίων, που ενέχονται σε διεργασίες κυτταρικής προσκόλλησης και σύνθεσης εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνου), όπως επίσης διαπιστώθηκε υπο-έκφραση της κυκλίνης-D και υπερ-έκφραση καταστολέων της. Το τελευταίο υποδεικνύει μια κατασταλτική επίδραση στη μετάβαση από τη G1 στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα των ασθενών. Αυτό αποτελεί μια πιθανή άμεση μοριακή εξήγηση της διαταραχής στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων των ασθενών. Η υπο-έκφραση της κυκλίνης-D ίσως σχετίζεται με την αυξημένη τοπική παραγωγή TGF- β στο μυελικό μικροπεριβάλλον των ασθενών (μη δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου μας, από υπερκείμενα μυελικών μακρόχρονων καλλιιεργειών), που είναι πιθανόν να διεγείρει το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β και μια συνακόλουθη αυξημένη έκφραση καταστολέων της κυκλίνης-D στα κύτταρα των ασθενών. Η ανάλυση γονιδιακού προφίλ έδειξε ότι είναι πιθανόν τα MSC των ασθενών να εμφανίζουν έναν φαινότυπο περισσότερο προσκολλώμενων κυττάρων, με αυξημένη σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και λιγότερο ενεργών πολλαπλασιαστικά.

Εν κατακλείδι, τα δεδομένα μας αποδεικνύουν ότι τα αρχέγονα μυελικά μεσεγχυματικά κύτταρα των ασθενών εμφανίζουν φυσιολογικό αριθμό, φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά και δυναμικό διαφοροποίησης, υποστηρίζοντας εν γένη τη χρήση τους σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις για να επιδιορθωθούν βλάβες στο οστό και το χόνδρο των ασθενών, κάτι που συχνά απαιτείται μετά από τη μακρόχρονη νόσο. Παρά ταύτα το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων είναι ελαττωμένο συγκρινόμενο με τα κύτταρα υγιών ατόμων και το διαπιστωμένο πρόωρα ελαττωμένο μήκος του τελομερούς πιθανόν να σχετίζεται με αυτή τη διαταραχή. Ως εκ τούτου δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο αυτές οι διαταραγμένες ιδιότητες των

κυττάρων να επηρεάζουν τη χρήση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις στους ασθενείς. Συνολικά, αυτή είναι η πρώτη περιγραφείσα μελέτη χαρακτηρισμού των αρχέγονων μυελικών μεσεγχυματικών κυττάρων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, κάτω από καθορισμένες αναπτυξιακές συνθήκες, με στόχο τη μελλοντική δυνητική κλινική χρήση των κυττάρων για επιδιορθωτική θεραπεία της νόσου.

6.**ΕΠΙΛΟΓΟΣ**

Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μια ποικιλία σύγχρονων θεραπευτικών προσεγγίσεων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα:

- Με στόχο την αναγέννηση/επιδιόρθωση χόνδρου και οστού, αυτόλογα ή ετερόλογα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τοπική χορήγηση σε συνδυασμό με τα κατάλληλα τρισδιάστατα βιο-υλικά (biomaterials) ^{105;106}.
- Σε μια εναλλακτική προσέγγιση με στόχο πάλι την επιδιόρθωση της ιστολογικής βλάβης, γίνεται προσπάθεια να ενεργοποιηθούν τα ενδογενή κύτταρα του ασθενούς με εμφύτευση στον κατεστραμμένο ιστό των κατάλληλων βιο-υλικών σε συνδυασμό με διεγερτικούς παράγοντες ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.
- Βάση των ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων τους μπορούν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν με συστηματική ή και τοπική χορήγηση για να ανακουφίσουν από τη συμπτωματολογία της νόσου. Ετερόλογα MSC έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά με επιτυχία σε ζωικό μοντέλο της νόσου ¹¹⁰.

Εν κατακλείδι, η χρήση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων στην επιδιόρθωση οστού και χόνδρου είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας, αν και υπάρχουν ακόμη πολλά ανοικτά ερωτήματα που αφορούν π.χ. την ανάπτυξη πρακτικών απομόνωσης και εμπλουτισμού των κυττάρων, την αποσαφήνιση των μονοπατιών διαφοροποίησης οστού και χόνδρου, ή την ανάπτυξη των κατάλληλων βιο-υλικών που θα χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τα κύτταρα.

7.**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Πρώτη από όλους, επιθυμώ να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Ελένη Παπαδάκη, χωρίς τη βοήθεια της οποίας τίποτα από αυτά δεν θα είχα καταφέρει! Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συμπαράσταση, υπομονή, ευγένεια και συνέπεια, αρετές που την χαρακτηρίζουν γενικότερα.

Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές κ.κ. Δ. Μπούμπα και Π. Σιδηρόπουλο για τη γόνιμη συνεργασία που είχαμε καθόλη την διαδικασία.

Ευχαριστώ τις κ.κ. Αθηνά Δαμιανάκη και Ελένη Κουταλά για την τεχνική υποστήριξη που παρείχαν, όπως και την κ. Κλαυδία Γεμεντζή για την εν γένει υποστήριξή της, καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου μελέτης της αιμοποίησης, που βοήθησαν ώστε να γίνει ευχάριστη η μακρόχρονη διεργασία εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε πλήρως από το 6^ο Πρόγραμμα Πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FP6, GENOSTEM #503161).

8.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009;**217**:144-160.
2. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;**88**:287-298.
3. Scheper W, Copray S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev.Rep.* 2009;**5**:204-223.
4. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;**113** (1):5-10.
5. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu.Rev.Med.* 2005;**56**:509-538.
6. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N.Engl.J Med.* 2003;**349**:570-582.
7. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004;**36**:568-584.
8. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N.Y.Acad.Sci* 2009;**1176**:101-117.
9. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;**19**:180-192.
10. Owen M. Marrow stromal cells. *J Cell Sci Suppl* 1985;**10**:63-76.
11. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1966;**16**:381-390.
12. Moore KA. Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. *Curr.Opin.Hematol.* 2004;**11**:107-111.

13. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005;**105**:2631-2639.
14. Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J.Hematother.* 1996;**5**:15-23.
15. Gronthos S, Graves SE, Simmons PJ. Isolation, purification and in vitro manipulation of human bone marrow stromal precursor cells. In: Beresford JN, Owen M, eds. *Marrow stromal cell culture.* 1998:26-42.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143-147.
17. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:1522-1532.
18. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY et al. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J.Orthop.Res.* 2000;**18**:933-944.
19. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004;**22**:649-658.
20. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop.Res* 1991;**9**:465-476.
21. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;**7**:211-228.
22. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol.Biol.Cell* 2002;**13**:4279-4295.
23. Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* 2006;**5**:213-224.

24. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;**425**:841-846.
25. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006;**20**:161-171.
26. Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;**425**:836-841.
27. Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 2001;**289**:519-524.
28. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner.Res* 1998;**13**:655-663.
29. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;**181**:67-73.
30. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995;**85**:929-940.
31. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;**13**:69-80.
32. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;**276**:71-74.
33. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;**78**:55-62.
34. Xu W, Zhang X, Qian H et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow

- differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2004;**229**:623-631.
35. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 2003;**89**:1235-1249.
 36. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2008;**109**:1743-1751.
 37. Jones EA, Kinsey SE, English A et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:3349-3360.
 38. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp.Hematol.* 2002;**30**:783-791.
 39. Le Blanc K., Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp.Hematol.* 2003;**31**:890-896.
 40. Le BK. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.* 2006;**8**:559-561.
 41. Noel D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk.Lymphoma* 2007;**48**:1283-1289.
 42. Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch.Immunol Ther Exp (Warsz.)* 2008;**56**:1-8.
 43. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;**105**:1815-1822.
 44. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EWF, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;**105**:2821-2827.

45. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;**105**:2214-2219.
46. Jiang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;**105**:4120-4126.
47. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;**108**:2114-2120.
48. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009;**11**:377-391.
49. Meisel R, Zibert A, Laryea M et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;**103**:4619-4621.
50. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J.Inflamm.(Lond)* 2005;**2**:8.
51. Sato K, Ozaki K, Oh I et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;**109**:228-234.
52. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;**75**:389-397.
53. Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008;**47**:22-30.

54. In't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;**88**:845-852.
55. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 2004;**37**:97-110.
56. Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc.* 2009;**84**:893-902.
57. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008;**40**:815-820.
58. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert.Opin.Biol.Ther* 2008;**8**:255-268.
59. Ikehara S. A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 2008;**30**:108-115.
60. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. *Experimental Hematology* 2008;**36**:733-741.
61. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008;**15**:711-715.
62. Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Hum.Mol.Genet.* 2008;**17**:R93-R98.
63. Ozawa K, Sato K, Oh I et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *Journal of Autoimmunity* 2008;**30**:121-127.
64. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity

of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research* 2008;**314**:1937-1944.

65. Siddappa R, Fernandes H, Liu J, van BC, de BJ. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr.Stem Cell Res Ther* 2007;**2**:209-220.
66. Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert.Opin.Biol.Ther* 2008;**8**:885-893.
67. Le Blanc K., Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;**363**:1439-1441.
68. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;**81**:1390-1397.
69. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp.Hematol.* 2000;**28**:875-884.
70. Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* 2004;**15**:406-410.
71. Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K et al. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch.Surg.* 2001;**136**:263-270.
72. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;**423**:356-361.
73. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM et al. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003;**48**:54-58.
74. Nepom GT, Byers P, Seyfried C et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989;**32**:15-21.

75. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;**2**:527-535.
76. Panayi GS, Corrigall VM, Pitzalis C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. *Rheum Dis.Clin North Am* 2001;**27**:317-334.
77. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N.Engl.J Med.* 2001;**344**:907-916.
78. Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum.* 2000;**43**:2046-2055.
79. Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:507-513.
80. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004;**93**:1210-1230.
81. Rattis FM, Voermans C, Reya T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr.Opin.Hematol.* 2004;**11**:88-94.
82. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H et al. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000;**97**:2791-2796.
83. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr.Biol.* 1999;**9**:695-698.
84. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.*

2004;**93**:1210-1230.

85. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol.* 1999;**9**:695-698.
86. Li X, Makarov SS. An essential role of NF- κ B in the Γ Actumor-like Γ A ζ phenotype of arthritic synoviocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;**103**:17432-17437.
87. Corr M, Zvaifler NJ. Mesenchymal precursor cells. *Ann Rheum Dis.* 2002;**61**:3-5.
88. Nakagawa S, Toritsuka Y, Wakitani S et al. Bone marrow stromal cells contribute to synovial cell proliferation in rats with collagen induced arthritis. *J.Rheumatol.* 1996;**23**:2098-2103.
89. Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood* 2002;**99**:1610-1619.
90. Arnett F, Edworthy S, Bloch D et al. "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." . *Arthritis Rheum* 1988;**31**:315-324.
91. Pincus T, Sokka T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;**17**:753-781.
92. Delorme B, Charbord P. Culture and characterisation of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: Hauser H, Fussenegger M, eds. *Methods in Molecular Medicine, 2nd ed.: Tissue Engineering.*: Totowa,NJ: Humana Press Inc.; 2007:
93. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other

- techniques. *Blood* 1996;**87**:2244-2251.
94. Rizzo S, Scopes J, Elebute MO et al. Stem cell defect in aplastic anemia: reduced long term culture-initiating cells (LTC-IC) in CD34+ cells isolated from aplastic anemia patient bone marrow. *Hematol.J.* 2002;**3**:230-236.
 95. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;**30**(10):e47
 96. Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J et al. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J.Biol.Chem.* 2004;**279**:17826-17833.
 97. Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T et al. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;**42**:221-228.
 98. Yudoh K, Matsuno H, Osada R et al. Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2000;**43**:2178-2188.
 99. Murphy JM, Dixon K, Beck S et al. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;**46**:704-713.
 100. Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* 2002;**100**:474-482.
 101. Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br.J.Haematol.* 2004;**127**:326-334.

102. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J.Cell Biochem.* 2006;**97**:744-754.
103. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;**345**:458-460.
104. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J.Mol.Biol.* 1992;**225**:951-960.
105. Ando W, Tateishi K, Hart DA et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2007;**28**:5462-5470.
106. Ando W, Tateishi K, Katakai D et al. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A* 2008;**14**:2041-2049.
107. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat.Biotechnol.* 2005;**23**:47-55.
108. Watanabe J, Kashii M, Hirao M et al. Quick-forming hydroxyapatite/agarose gel composites induce bone regeneration. *J Biomed.Mater.Res A* 2007;**83**:845-852.
109. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif.Organs* 2005;**8**:131-136.
110. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:1175-1186.

9.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis

M-C Kastrinaki,¹ P Sidiropoulos,² S Roche,³ J Ringe,⁴ S Lehmann,³ H Kritikos,² V-M Vlahava,¹ B Delorme,⁵ G D Eliopoulos,¹ C Jorgensen,⁶ P Charbord,⁵ T Häupl,⁴ D T Boumpas,² H A Papadaki¹

► Supplementary tables 1–3 and supplementary fig 1 are published online only at <http://ard.bmj.com/content/vol67/issue6>

¹ Department of Haematology, University of Crete School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece; ² Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, University of Crete School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece; ³ Institut de Génétique Humaine, UPR1142 CNRS, Montpellier, France; ⁴ Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany; ⁵ Equipe INSERM-ESPRIVEA-3855, Faculty of Medicine, University Francois Rabelais, Tours, France; ⁶ Service d'Immunorhéumatologie, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, France

Correspondence to: H A Papadaki, University of Crete School of Medicine, P.O. Box 1352, Heraklion, Crete, Greece; epapadak@med.uoc.gr

Accepted 17 September 2007
Published Online First
5 October 2007

ABSTRACT

Objective: Bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs) are being considered as potential therapeutic agents in various inflammatory autoimmune diseases for their tissue-repair and anti-inflammatory tissue-protective properties. This study investigates the reserves and function, the molecular and proteomic profile and the differentiation potential of BM MSCs in patients with active rheumatoid arthritis (RA).

Methods: We evaluated the frequency of MSCs in the BM mononuclear cell fraction using a limiting dilution assay, the proliferative/clonogenic potential and the capacity of cells to differentiate towards the osteogenic/chondrogenic/adipogenic lineages using appropriate culture conditions. We also assessed the molecular and proteomic characteristics in terms of inflammatory cytokine gene and protein expression, the relative telomere length and the survival characteristics of BM MSCs.

Results: MSCs from patients with RA ($n = 26$) and age- and sex-matched healthy individuals ($n = 21$) were similar in frequency, differentiation potential, survival, immunophenotypic characteristics, and protein profile. Patient MSCs, however, had impaired clonogenic and proliferative potential in association with premature telomere length loss. Transcriptome analysis revealed differential expression of genes related to cell adhesion processes and cell cycle progression beyond the G1 phase. Previous treatment with methotrexate, corticosteroids, anti-cytokine and biological agents or other disease-modifying anti-inflammatory drugs did not correlate with the clonogenic and proliferative impairment of BM MSCs.

Conclusion: In spite of some restrictions related to the impaired clonogenic and proliferative potential, our findings support the use of autologous BM MSCs in RA and may have important implications for the ongoing efforts to repair tissue injury commonly seen in the course of the disease.

Adult multipotential stem cells isolated from a variety of tissues have been demonstrated to participate in tissue homeostasis and repair under the influence of appropriate signals. Among the most well characterised types of adult stem cells are the bone marrow (BM) derived mesenchymal stem cells (MSCs).^{1,2} These cells reside in BM stroma providing the supporting feeder cells necessary for the haematopoietic progenitor cell growth but they may also differentiate into cells of connective tissue such as osteocytes, chondrocytes, tenocytes, adipocytes and smooth muscle cells.^{3,4}

There is currently great interest in exploring the potential use of MSCs in regenerative medicine with particular target the bone and cartilage defects.^{5–10}

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterised by cartilage and bone destruction associated with local production of inflammatory mediators such as tumour necrosis factor α (TNF α) and interleukin (IL)1 β . Joint destruction renders RA a candidate disease for cartilage and bone repair using MSCs. There are, however, some specific issues concerning the reserves and function of BM MSCs in RA that need to be addressed before proceeding to clinical application. In addition to the concept that BM MSCs may be primarily involved in joint damage in RA,^{11–15} there are studies demonstrating that increased local production of TNF α may injure the BM microenvironment and may affect the reserves of BM haematopoietic progenitor cells.¹⁴ Accordingly, a critical issue is whether BM MSCs are also depleted or functionally altered in RA.

This study evaluates the reserves and function of BM MSCs in patients with RA in terms of their proliferative, clonogenic and differentiation potential. Molecular and proteomic characteristics of patient MSCs with special focus on inflammatory cytokine gene and protein expression were also studied.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We studied 26 patients with active RA^{15,16} and 21 healthy individuals, age- and sex-matched with the patients (table 1). The Institutional ethics committee approved the study and informed consent according to the Helsinki Declaration was obtained from all subjects.

MSC culture and differentiation

BM mononuclear cells (BMMCs) obtained from posterior iliac crest aspirates were cultured in Dulbecco modified Eagle medium, low glucose (DMEM-LG; Gibco/Invitrogen, Paisley, Scotland)/10% foetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, Utah, USA)/100 IU/ml penicillin–streptomycin (MSC medium) and MSCs were grown as previously described.^{17,18} Cell-free supernatants were stored (-72°C) for cytokine measurements by ELISA (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis,

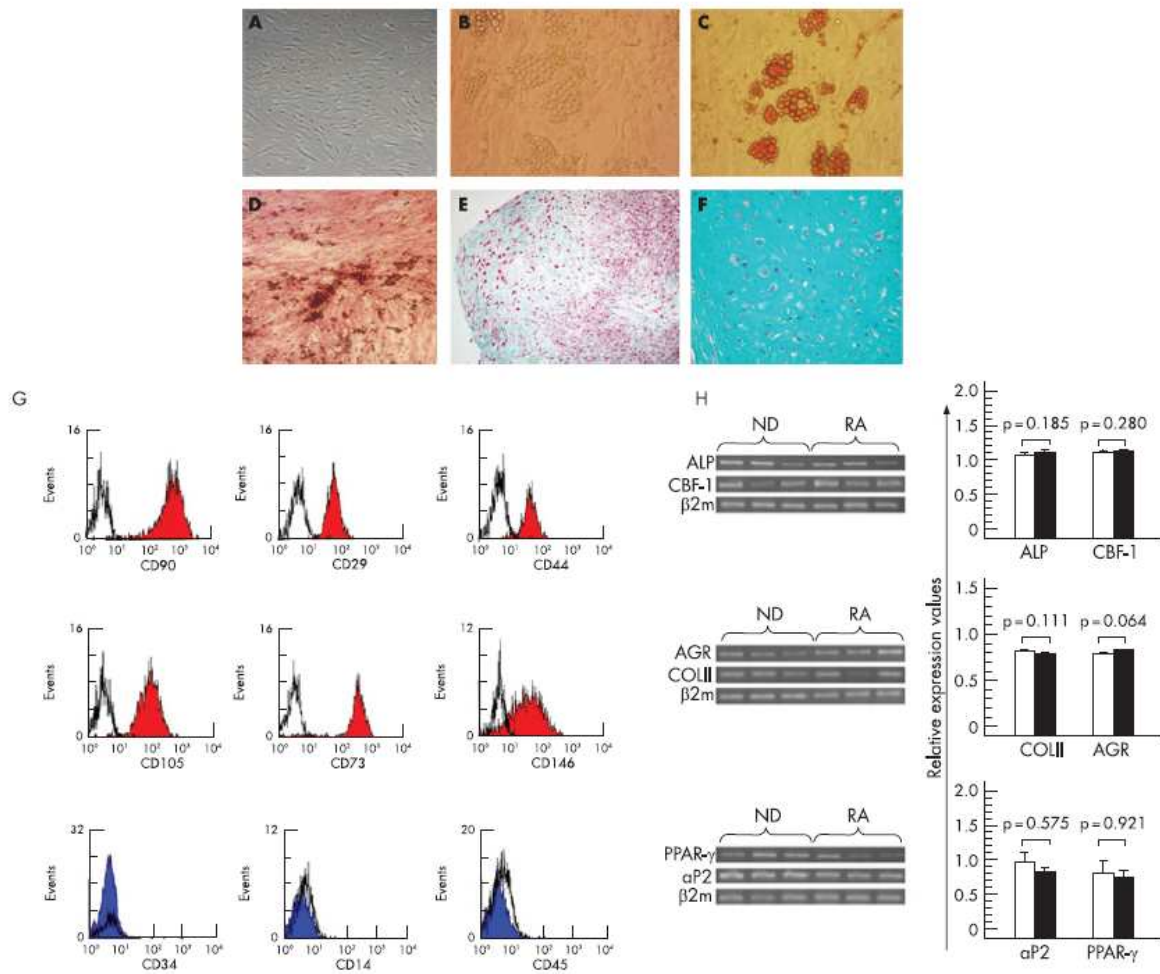


Figure 1 Differentiation potential and immunophenotypic characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs). The upper panel shows undifferentiated MSCs from passage 2 (P2) (A) and differentiated cells towards the adipogenic (B and C), osteogenic (D) and chondrogenic (E and F) lineages from a representative patient with rheumatoid arthritis (RA). Cell differentiation was identified with Oil Red O (C), alkaline phosphatase (ALP)/Von Kossa (D), Masson (E) and Alcian blue (F) staining. G. Immunophenotypic characteristics of patient MSCs at P2. The red and blue histograms depict the positive and negative markers, respectively, compared to the isotype-matched negative controls (open histograms). H. Specific gene mRNA expression (on the left) of P2 BM MSCs upon differentiation towards the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages in representative RA (n = 3) and control (n = 3) subjects as well as cumulative data (mean relative values (SEM)) of specific gene mRNA expression from all RA (solid squares) and controls (open squares) studied (on the right). Comparison has been performed by means of the non-parametric Mann-Whitney U test.

Minnesota, USA). Trypsinised MSCs from passage (P)-2 were induced for differentiation (fig 1A-F).

MSC adipogenic and osteogenic differentiation was induced as previously described and assessed by Oil Red O and alkaline phosphatase (ALP)/Von Kossa stains, respectively.¹⁹ For chondrogenic induction, MSCs were pelleted and cultured in DMEM high glucose (DMDM-HG, Gibco), supplemented with 6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin, 1.33 µg/ml linoleic acid, 1.25 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM sodium pyruvate, 0.17 mM ascorbate-2-phosphate, 0.1 µM dexamethasone, 0.35 mM L-proline, 6.25 ng/ml selenous acid and 0.01 µg/ml transforming growth factor (TGF)-β₃ (R&D Systems).²⁰ Chondrogenic differentiation was identified with Alcian blue and Masson trichrome stains. Reagents were purchased from Sigma (St Louis, Minnesota, USA) unless otherwise indicated.

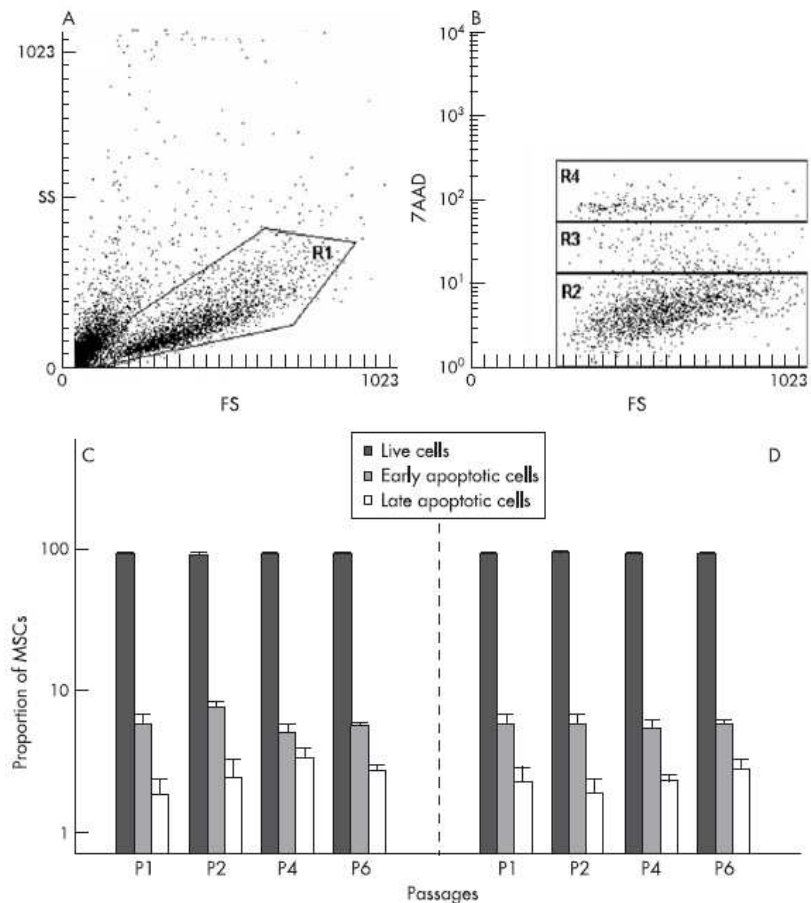
MSC immunophenotypic and survival characteristics

Trypsinised MSCs from passages 1-6 (P1-P6) were immunophenotypically characterised by flow-cytometry, using anti-CD29 (4B4; Cyto-Stat, Beckman-Coulter, Fullerton, California, USA), anti-CD44 (J173; Immunotech/Coulter, Marseille, France), anti-CD73 (AD2; Pharmingen, San Diego, California, USA), anti-CD90 (F15.42; Immunotech/Coulter), anti-CD105 (SN6; Caltag, Burlingame, California, USA), anti-CD146 (P1H12; Pharmingen), anti-CD45 (IMMU19.2; Immunotech/Coulter), anti-CD14 (RMO52; Immunotech/Coulter) and anti-CD34 (QBend10; Beckman-Coulter) monoclonal antibodies.

Apoptosis was studied by flow-cytometry using 7-aminoactinomycin-D (7-AAD; Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, California, USA).¹⁴⁻²¹ Results were expressed as 7-AAD^{neg} (live), 7-AAD^{dim} (early apoptotic) and 7-AAD^{bright} (late apoptotic) cells (fig 2A,B).

Extended report

Figure 2 Survival characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs from passages 1–6 (P1–P6) were stained with 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) and analysed by flow cytometry for the study of apoptosis. Scattergram B shows the proportion of 7-AAD^{low} (R2; live), 7-AAD^{dim} (R3; early apoptotic) and 7-AAD^{bright} (R4; late apoptotic) cells in the gate of R1 (scattergram A) representing MSCs from P2. Bars in the lower panel represent the mean (SEM) proportion of live, early and late apoptotic cells timecourse in patients (C) and healthy controls (D) analysed as above. No statistically significant differences were documented between patients and controls by means of two-way analysis of variance (ANOVA).



MSC quantification in the BMMC fraction

A limiting dilution assay (LDA) was used to evaluate MSC frequency within BMMCs following 6-week culture of seven different BMMC concentrations (250–10 000 cells/well) in 96-well plates.¹⁷ Wells with >50 adherent spindle shaped cells were considered positive and MSC frequency corresponded to the dilution resulting in 37% negative wells.²²

Clonogenic potential and proliferative potential of MSCs

A colony forming unit fibroblastic assay (CFU-F) was also used to evaluate MSC frequency within BMMCs. Briefly, day-0 BMMCs were seeded at three different concentrations, expanded for 14 days and CFU-F number was estimated using linear regression analysis. The clonogenic potential of trypsinised MSCs from P1–P6 was also evaluated by CFU-F. MSC proliferative potential was evaluated by a methyl triazolyl tetrazolium (MTT) based assay in P2 and also by estimating population doubling time through P1–P6.

RT-PCR

Total RNA isolated from P2 and differentiated MSCs (RNeasy mini kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was reverse transcribed (SUPERSCRIPT II; Gibco) and amplified by RT-PCR. Products were normalised according to β_2 -microglobulin (β_2m) using the ImageJ densitometry analysis system ([\[rsb.info.nih.gov/ij/\]\(http://rsb.info.nih.gov/ij/\)\). Primer sequences are listed in supplementary table 1.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Real time quantitative PCR

IL1 β and TNF α expression

Platinum[®]qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) and TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems; Foster City, California, USA) were used for IL1 β , TNF α and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) identification. Measurements were performed using the ABI Prism 7000 System (Applied Biosystems). Results were normalised according to GAPDH quantity.

Telomere length measurement

DNA was extracted from P2 MSCs (Qiagen). β -Globin was used as control single copy gene.^{23–24} iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Biorad, Hercules, California, USA) was used for the reactions. Primer sequences are listed in supplementary table 1. Telomere length was reflected by the relative telomere/single-copy-gene ratio (T/S): $T/S = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = Ct_{telomere} - Ct_{\beta\text{-globin}}$).

Two-dimensional gel electrophoresis

Whole cell lysates were obtained in 8 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

(CHAPS), 50 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma). For the first dimension, 30 µg proteins from P2 MSCs were added to rehydration buffer. Immobilised pH gradient (IPG) strips (pH 3–10) were re-hydrated and focalised (70 000 v/h). For the second dimension, strips were equilibrated and proteins were separated by SDS-PAGE. Gels were stained with silver nitrate²⁵ and scanned using the Labscan-3 software (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) after calibration by the Kaleidoscope LaserSoft Imaging software (Kodak ref: R020123; Eastman Kodak, Rochester, New York, USA). Spot detection and quantitation were performed by ImageMaster 2D Platinum software (GE Healthcare).

Microarray experiments

Hybridisation on HG-U133 Plus 2.0 microarrays was performed according to manufacturer (Affymetrix; Santa Clara, California, USA). Arrays were washed, stained and scanned on a Hewlett Packard Genearray Scanner (Affymetrix). Affymetrix GCOS 1.2 software was used to control washing and scanning, generate DAT/CEL/EXP files and process data. Group comparison and gene retrieval was performed by SiPaGene (BioRetis GmbH; Berlin, Germany). Cluster analysis was calculated with Genesis (A. Sturm; Graz University, Graz, Austria).

Statistical analysis

Data were analysed by Mann–Whitney U test, one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) tests (GraphPad Software; San Diego, California, USA). Two-dimensional gel electrophoresis data were analysed by the Hierarchical Clustering Explorer 3.0 software (<http://www.cs.umd.edu/hcil/multi-cluster/>) and Pearson correlation coefficient.²⁶ Grouped data are expressed as mean (SD).

RESULTS

MSC immunophenotype and differentiation potential

Immunophenotypic analysis at the end of each passage demonstrated that cultures constituted of a homogenous cell population positive for CD73, CD90, CD146, CD105, CD29, CD44 and negative for CD45, CD14, CD34 surface antigens (fig 1G).¹⁹

Culture-expanded MSCs from patients were able to differentiate into osteogenic/chondrogenic/adipogenic lineages as shown by the respective cytochemical staining (fig 1B–F). Furthermore, the osteogenic/chondrogenic/adipogenic differentiating capacity assessed by the relative expression of ALP and CBF-1 mRNA, COL1I and AGR (aggrecan) mRNA, and aP2 (adipose fatty-acid binding protein 2) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ mRNA expression, respectively, did not differ between patients and controls, suggesting normal differentiation potential of RA MSCs (fig 1H).

MSC frequency in the BMMC fraction

The estimated frequency of MSCs in the BMMC fraction did not differ significantly between patients (20.74 (12.41)/10⁵ BMMCs) and controls (23.90 (15.65)/10⁵ BMMCs) ($p = 0.8894$) by LDA. Quantification of BM MSCs by CFU-F analysis at day 0 was in accordance with LDA data. CFU-F number obtained by day-0 MSCs did not differ significantly between patients (18.42 (13.75)/10⁵ BMMCs) and controls (19.85 (18.96)/10⁵ BMMCs) ($p = 0.3464$), further suggesting normal numbers of MSCs in RA. No statistically significant difference was documented between the LDA and CFU-F assays in the estimation of MSC frequency in either patients ($p = 0.210$) or healthy controls ($p = 0.199$).

MSC clonogenic and proliferative potential

The growth potential of BM MSCs in patients with RA was studied by evaluating their clonogenic and proliferative capacity over time. CFU-F recovery by culture-expanded MSCs was significantly lower in patients with RA compared to controls through P1–P6 ($p < 0.01$) (fig 3A). In association to the lower clonogenic potential, patient MSCs displayed also defective proliferative capacity compared to controls as estimated by the population doubling time over P1–P6 ($p < 0.001$) (fig 3B). These findings were further substantiated by the MTT assay; as shown in fig 3C depicting results from a representative passage (P2), the number of live cells remained significantly lower in patients with RA compared to controls ($p < 0.001$).

The majority of patients had previously been treated with cytotoxic and/or immune suppressant or anti-cytokine agents. To exclude the possibility of a drug-related damage of MSCs, a subset analysis was performed in the group of previously treated ($n = 20$) and untreated ($n = 6$) patients. Compared to healthy controls, treated and untreated patient groups displayed lower CFU-F recovery through P1–P6 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Similarly, treated and untreated patients displayed increased MSC doubling time ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) and defective proliferative potential in the MTT assay ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) compared to controls. However, no statistically significant differences were found between the two patient groups in the above parameters. Thus drug-induced damage is unlikely to be the cause of the defective clonogenic/proliferative potential of MSCs in RA.

MSC survival characteristics

The impaired clonogenic and proliferative ability of MSCs in patients with RA might have resulted from increased cell apoptosis. The total proportion of apoptotic cells ranged from 7.68 (3.70)% (P1) to 8.24 (2.01)% (P6) in the patients and from 8.25 (4.15)% (P1) to 8.24 (2.85)% (P6) in the controls. Overall, no statistically significant differences were found between patients and controls in the proportion of early ($F = 0.8206 < F_{84}^1$, not significant) or late apoptotic ($F = 0.9977 < F_{84}^1$, not significant) cells throughout P1–P6 culture period, suggesting that the impaired clonogenic and proliferative potential of MSCs in RA is not due to accelerated cell apoptosis (fig 2C,D).

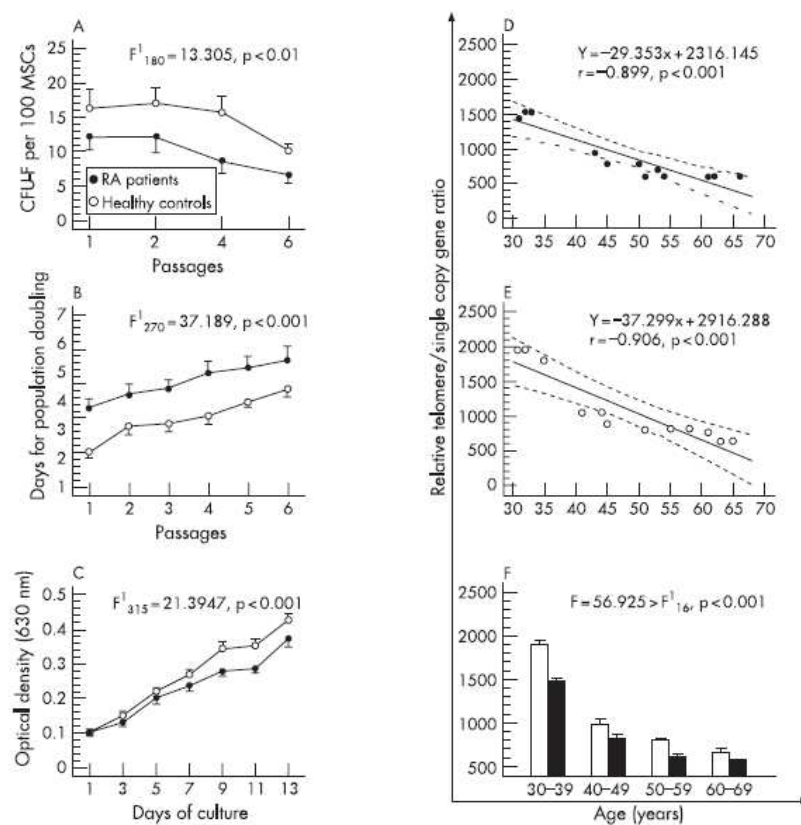
Cytokine production by MSCs

To investigate whether BM MSCs from patients with RA display abnormal cytokine production similar to RA synovial fibroblasts²⁷ we initially assessed IL1 β and TNF α production. The relative IL1 β /GAPDH and TNF α /GAPDH mRNA levels at P2 did not differ significantly between patients and controls (0.059 (0.029) and 0.040 (0.022), respectively). Similar to the mRNA data, protein levels of IL1 β and TNF α determined by ELISA in culture supernatants did not differ significantly between patients and controls through P2–P6 ($F = 0.1474 < F_{48}^1$ and $F = 1.2373 < F_{48}^1$, respectively).

The levels of the MSC growth-promoting cytokines vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor-1 and the values of the inhibitory/inflammatory cytokines IL6, TGF- β_1 , IL8 and IL15 in culture supernatants through P2–P6 did not differ significantly between patients and controls. These data indicate that abnormal cytokine production by MSC per se seems unlikely to be the cause of the impaired growth potential of MSCs in RA.

Extended report

Figure 3 Clonogenic/proliferative potential and relative telomere length of mesenchymal stem cells (MSCs). The left panel depicts the mean (SEM) number from colony forming unit fibroblastic assay (CFU-F) (A) and days for population doubling (B) over passages 1–6 (P1–P6) as well as the mean (SEM) optical density corresponding to the number of live cells over 13-day culture using the methyl triazolyl tetrazolium (MTT) assay in P2 (C). The right panel illustrates the correlation (regression line within 95% confidence limits) between age and relative MSC telomere/single-copy-gene values (diagrams D and E, respectively) and the mean (SEM) relative telomere length per decade of years (F) in RA (solid squares) and normal (open squares) subjects. Analyses have been performed by two-way analysis of variance (ANOVA).



Proteomic analysis

Two-dimensional electrophoresis was performed using P2 MSCs in patients with RA ($n = 10$) and healthy controls ($n = 6$) (fig 4A,B). By using the Hierarchical Clustering method, we could not define any cluster that might discriminate patient and control cells (fig 4C). The Pearson correlation coefficient was not significantly different between patient and control cells ($r = 0.933$ (0.022) and $r = 0.929$ (0.020), respectively). These data corroborate the lack of significant changes in cytokine production between patients and controls.

MSC telomere length

Decreased cellular growth associated with premature telomeric loss has previously been described in periarticular osteoblasts in RA.²⁸ We therefore evaluated the relative telomere length (RTL) of MSCs from P2 in 12 patients and 12 age- and sex-matched healthy controls. An age-related decrease of the RTL as estimated by the relative T/S ratio was observed in patients ($r = -0.899, p < 0.001$) and controls ($r = -0.906, p < 0.001$) (fig 3D,E). To characterise patient MSC RTLs appropriate or inappropriate for a given age, we defined the observed/predicted RTL ratio (O/P ratio) for each sample, according to the equation derived from the linear regression analysis of the correlation between RTL and age (years) of the controls. We found that the mean O/P ratio of the patients (0.83 (0.20)) was out of the 95% confidence limits of the controls (mean O/P ratio 0.67 (0.17), $p = 0.0226$), suggesting inappropriate MSC telomeric loss by

age. By analysing the mean RTL per decade of years in patients and controls, a highly significant difference was obtained ($p < 0.001$) (fig 3F), indicating further premature telomeric loss of MSCs in RA that might account, at least in part, for the defective clonogenic and proliferative potential of cells in culture.

Gene expression profiling of MSCs

Genes encoding for cell surface molecules, cytokines and differentiation markers were analysed in particular. Selection for genes differentially expressed in RA compared to normal MSCs allowed separation of the RA from normal samples by hierarchical clustering (fig 5). Affymetrix probe sets that were differentially expressed in more than 80% of the pairwise comparisons between three RA and six normal MSC samples were selected to identify objects in canonical pathways of the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) database. The most differentially expressed genes were those encoding for proteins implicated in focal adhesions (supplementary fig 1 and supplementary table 2). Specifically, several genes involved in cytoskeleton regulation and therefore linked to cell motility, proliferation and survival, were found to be differentially expressed between patients and controls. Of particular interest was the downregulation of cyclin-D, which plays an important role in the transition from G1 to S-phase in cell cycle progression, as well as the upregulation of cyclin-D inhibitors Ink4a-d and Kip1,2 and their upstream inducers Smad2/3 and TGF- β (supplementary table 3).

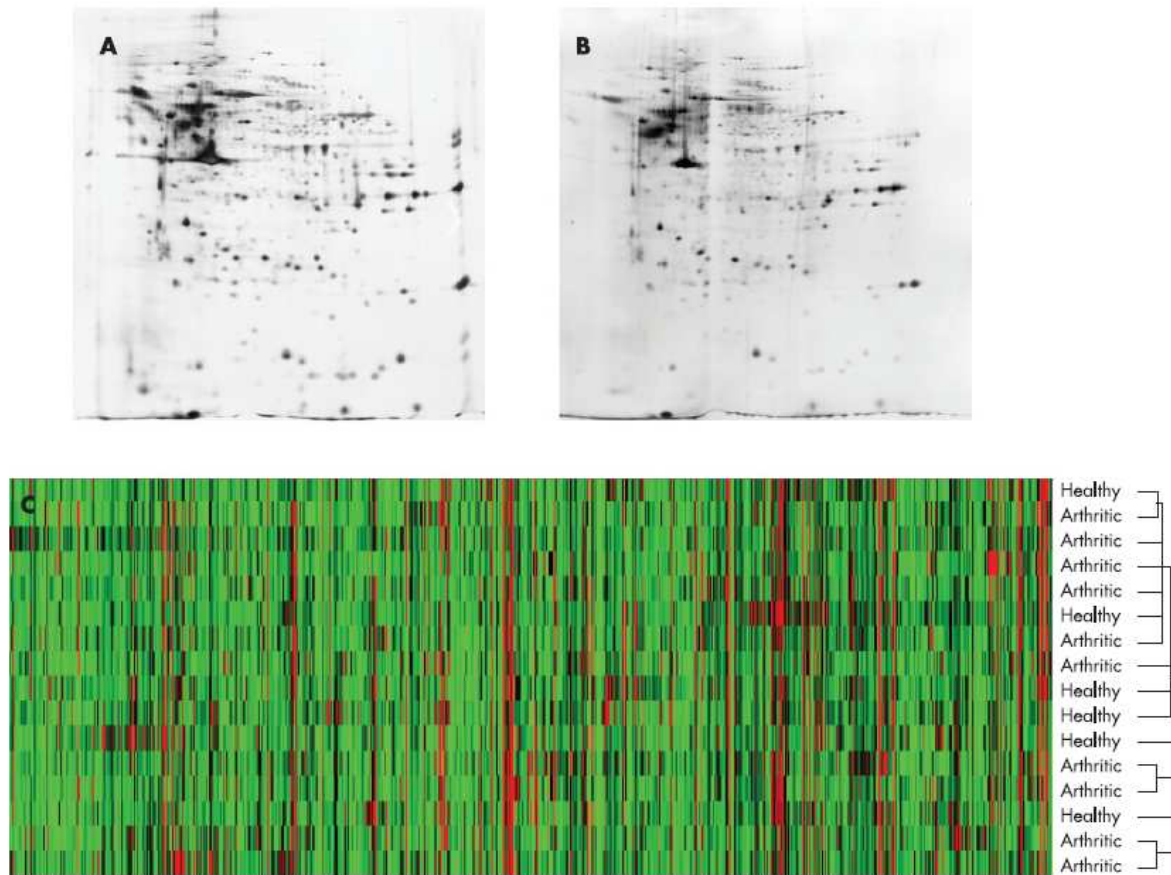


Figure 4 Proteomic analysis of mesenchymal stem cells (MSCs). Two-dimensional gel electrophoresis was performed using whole protein cell extracts from P2 MSC cultures of patients with rheumatoid arthritis (RA) ($n = 10$) (A) and healthy controls ($n = 6$) (B). After scanning, spot detection, quantification and normalisation, gels were compared using Hierarchical Clustering Software and Pearson test (C). No cluster could be detected using these proteomic profiles.

DISCUSSION

To explore the potential use of MSCs for cartilage and bone repair, we conducted the current study to evaluate the reserves, functional, molecular, proteomic characteristics, and differentiation potential of BM MSCs in patients with RA, a candidate disease characterised by destruction of articular structures. Characterisation of autologous MSCs in patients with RA is important since emerging data suggest that allogeneic MSCs may not be as "immune privileged" as previously considered.²⁹

We found that the frequency of MSCs within BMSCs did not differ between patients and controls. Our findings are in accordance with previously reported data on the frequency of MSCs in normal BM suggesting that patients with RA have normal BM MSC reserves.^{4,30} Furthermore, culture-expanded MSCs from patients with RA were morphologically and immunophenotypically indistinguishable from the controls.

Culture-expanded MSCs from our patients with RA displayed normal osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. Interestingly, reduced chondrogenic activity of BM MSCs has been reported for osteoarthritis patients and this defect has been associated with the disturbed homeostatic maintenance of the articular cartilage.³¹ Normal differentiation

potential of BM MSCs however, has been described in other autoimmune diseases such as in systemic sclerosis.³²

MSC expansion through passages, assessed by the population doubling time, was significantly reduced in patients with RA, suggesting defective proliferative capacity. This finding was further substantiated by the MTT assay. The defective proliferative potential was in accordance with the impaired clonogenic capacity of patient MSCs as demonstrated by the low CFU-F recovery timecourse. In addition, the impaired growth of MSCs in RA is not likely to be due to accelerated cell apoptosis, since apoptosis in culture was not found to be significantly different between patients and controls.

The majority of our patients had been treated with methotrexate and/or corticosteroids, anti-cytokine or disease-modifying anti-inflammatory agents. It has been reported that methotrexate does not affect the survival and functional characteristics of MSCs, while corticosteroids may damage their proliferative potential.³³ No available data on the effect of anti-cytokine and anti-inflammatory agents on MSCs are presently known. To exclude the possibility of drug-mediated damage, we have separately analysed MSC clonogenic/proliferative potential in untreated patients. Cellular growth and

Extended report

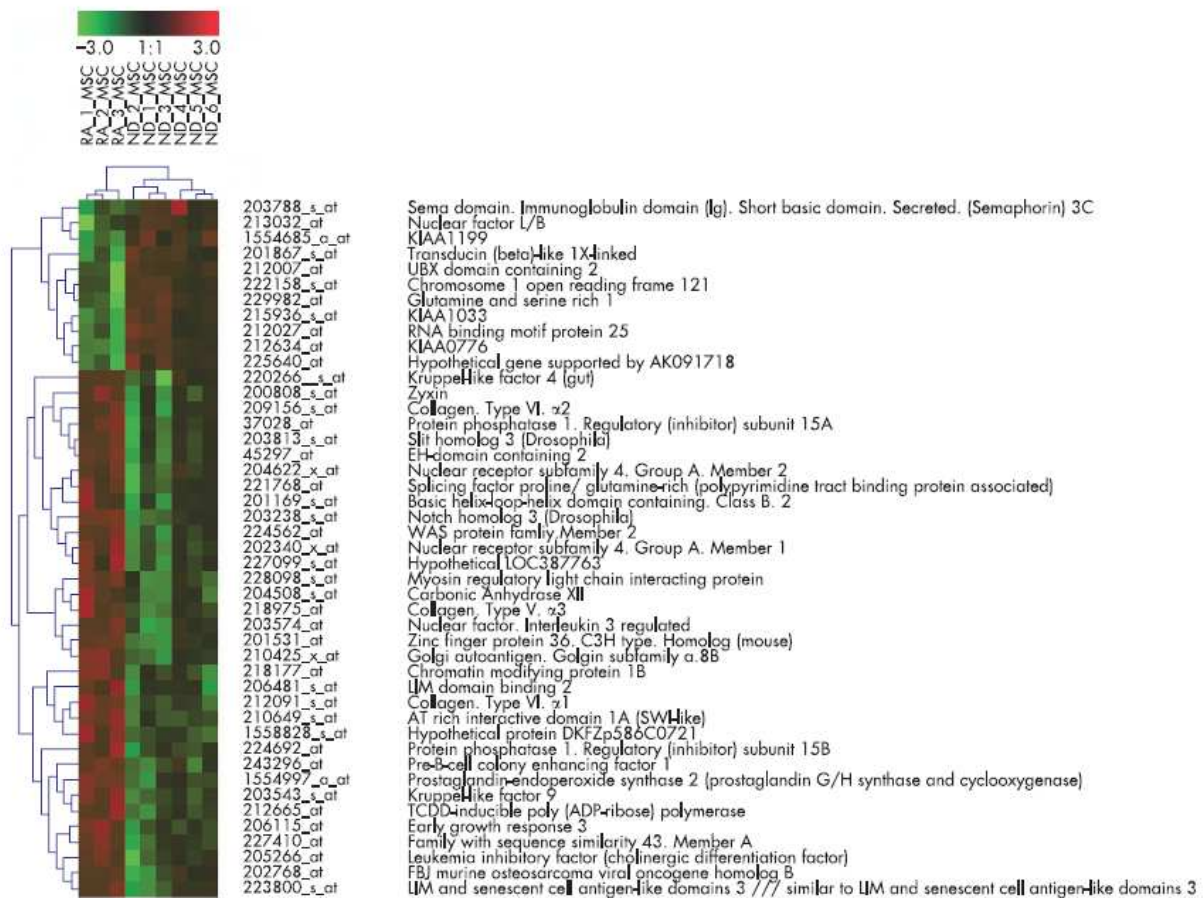


Figure 5 Gene expression profiling of mesenchymal stem cells (MSCs). RNA from P2 bone marrow (BM) MSCs from patients with rheumatoid arthritis (RA) (n = 3) and healthy controls (n = 6) was hybridised to the GeneChips and arrays were processed for signal calculation and pairwise chip comparison. Selection of genes differentially expressed in RA compared to non-differentiated (ND) bone marrow mononuclear cells (BMMCs) allowed us to distinguish RA MSCs from normal MSCs by hierarchical clustering.

CFU-F recovery were significantly lower even in this group of patients compared to controls, whereas no significant differences were documented between treated and untreated patients with RA. These findings suggest that treatment with antirheumatic agents is not the major factor affecting MSC growth in RA.

It has been suggested that BM derived MSCs with altered properties may repopulate the synovial membrane in RA, whereas abnormal expression of inflammatory cytokines has been reported for RA synovial fibroblasts.¹²⁻¹³ MSCs from our patients displayed normal cytokine expression in array profiling and ELISA. We have specifically focused on IL1 β and TNF α since these cytokines have been found overexpressed in synovial fluid and BM culture supernatants.^{14-16, 24-25} No differences were found between patients and controls in the inflammatory cytokine expression or the growth promoting cytokine levels, suggesting that the impaired growth potential found in patient MSCs is not due to altered cytokine expression.

It has been previously shown that aging may affect the proliferative potential of MSCs.²⁶ Since patients with RA and controls in our study were age-matched, an age-related defect in the clonogenic and proliferative capacity of patient MSCs is

unlikely. Patient MSCs, however, displayed age-inappropriate relative telomere loss. Since there is evidence suggesting that the replicative capacity of cells correlates with the initial cellular telomere length²⁷⁻²⁸ we may speculate that the defective growth potential of patient MSCs is due to inappropriate telomere loss. Although telomerase activity was not assessed in our study, we hypothesise that it is under the influence of the inflammatory BM milieu.¹⁴ MSCs in RA undergo accelerated proliferation resulting in premature replicative exhaustion as previously described for RA periarticular osteoblasts.²⁹ The recently described accelerated telomere shortening under the influence of chronic mild oxidative stress further corroborates this assumption.²⁴

In the search for direct molecular mechanisms by array profiling, differentially expressed genes were found to be involved especially in cell adhesion processes and matrix (collagen) synthesis. In particular, downregulation of cyclin-D was identified. Thus, a repressive influence on the transition from G1 to S-phase could provide a direct molecular explanation for the altered proliferative capacity of MSCs from patients with RA. This could be related to the increased local production of TGF- β in patients' BM microenvironment (data not shown)

that may result in increase of TGF- β signalling in MSCs and consecutive expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, as suggested from the "cell cycle" pathway from KEGG. Thus, MSCs from patients with RA may present in vitro with a phenotype of cells that are more adherent, produce more matrix and are less active in proliferation. However, functional data are needed to substantiate this hypothesis.

In conclusion, our data have shown that patients with RA display a normal number, molecular and proteomic profile and differentiation potential of BM MSCs, encouraging, therefore, the use of autologous MSCs for the repair of cartilage and bone damage associated with long-standing RA. The proliferative and clonogenic potential of patient BM MSCs, however, was reduced compared to normal MSCs, and this defect was associated with decreased cellular telomere length and altered expression of genes implicated in focal adhesion and cell cycle pathways. This altered MSC activity may potentially influence the preparation of the cells for therapeutic usage in RA. In summary, this is the first study characterising BM MSCs in patients with RA under defined culture conditions in the context of potential clinical use for the repair of tissue injury associated with RA.

Acknowledgements: The authors wish to thank Mrs Helen Koutala, Mrs Claudia Gemetzi and Mrs Athina Damianaki (University of Crete, Greece) for their valuable technical assistance.

Funding: This study was supported by the 6th European Union Framework Program (FP6, GENOSTEM #503161).

Competing interests: None declared.

Ethics approval: The Institutional ethics committee approved the study and informed consent according to the Helsinki Declaration was obtained from all subjects.

REFERENCES

- Owen M. Marrow stromal cells. *J Cell Sci Suppl* 1985;**10**:63–76.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;**19**:180–92.
- Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother* 1996;**5**:15–23.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143–7.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;**28**:875–84.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;**36**:568–84.
- Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004;**37**:97–110.
- Jorgensen C, Gardeldtze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2004;**15**:406–10.
- Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng* 2001;**72**:96–107.
- Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res* 2003;**21**:44–53.
- Nakagawa S, Toritsuka Y, Wakitani S, Denno K, Tomita T, Owaki H, et al. Bone marrow stromal cells contribute to synovial cell proliferation in rats with collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 1996;**23**:2098–103.
- Suzuki Y, Nishikaku F, Nakatuka M, Koga Y. Osteoclast-like cells in murine collagen induced arthritis. *J Rheumatol* 1998;**25**:1154–60.
- Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2791–6.
- Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C, Koutala H, Marsh JC, Boumpas DT, et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood* 2002;**99**:1610–19.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:315–24.
- Pincus T, Soikka T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;**17**:753–81.
- In't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der KC, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;**88**:845–52.
- Delorme B, Charbord P. Culture and characterisation of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: Hauser H, Fussenegger M, eds. *Methods in molecular medicine, 2nd edn: tissue engineering*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc, 2007.
- Gronthos S, Graves SE, Simmons PJ. Isolation, purification and in vitro manipulation of human bone marrow stromal precursor cells. In: Beresford JN, Owen ME, eds. *Marrow stromal cell culture*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998:26–42.
- Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Zini N, Noel D, Jorgensen C, et al. Chondrogenic differentiation of murine and human mesenchymal stromal cells in a hyaluronic acid scaffold: differences in gene expression and cell morphology. *J Biomed Mater Res A* 2006;**77**:497–506.
- Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996;**87**:2244–51.
- Rizzo S, Scopes J, Elebute MO, Papadaki HA, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Stem cell defect in aplastic anemia: reduced long term culture-initiating cells (LTC-IC) in CD34+ cells isolated from aplastic anemia patient bone marrow. *Hematol J* 2002;**3**:230–6.
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:e47.
- Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, Ladhoff J, Jayapalan J, Wei W, et al. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem* 2004;**279**:17826–33.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;**68**:850–8.
- Seo J, Bakay M, Chen YW, Hilmer S, Shnaiderman B, Hoffman EP. Interactively optimizing signal-to-noise ratios in expression profiling: project-specific algorithm selection and detection p-value weighting in Affymetrix microarrays. *Bioinformatics* 2004;**20**:2534–44.
- Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Kaneko M, Takano H, Hashimoto H, et al. Establishment and characterization of nurse-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;**42**:221–8.
- Yudoh K, Matsuno H, Osada R, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T. Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 2000;**43**:2178–88.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;**108**:2114–20.
- Caplan AL. The mesenger process. *Clin Plast Surg* 1994;**21**:429–35.
- Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:704–13.
- Larghero J, Farge D, Braccini A, Lecourt S, Scherberich A, Fois E, et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 2006;**67**:443–9.
- Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol* 2004;**127**:326–34.
- Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* 2002;**100**:474–82.
- Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Riccio M, Ferruzzi A, et al. Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1999;**26**:791–9.
- Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem* 2006;**97**:744–54.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;**345**:458–60.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;**225**:951–60.