



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της
Pseudomonas A1 στην οστεόλυση»



ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΠΙΔΑ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Σιβροπούλου Αφροδίτη (Επίκουρη καθηγήτρια τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Σιβροπούλου Αφροδίτη (Επίκουρη καθηγήτρια τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ)

Αρσενάκης Μηνάς (Καθηγητής τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ)

Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτα (Καθηγήτρια τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ)



*Στους γονείς μου Παύλο και Μαρία
και στα αδέρφια μου Γιάννη, Χρίστο, Μελέτη, Μάρθα...*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΟΣΤΑ.....	8
ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	94

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας του τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2009 – Νοέμβριος 2010.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Σιβροπούλου Αφροδίτη, επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε, για την υπομονή και τη διάθεσή της να μου λύσει όσο το δυνατό περισσότερες απορίες, για τη σωστή καθοδήγησή της και τις πολύτιμες επισημάνσεις της, τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Αρσενάκη Μηνά, καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ και την κ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτα, καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Γιάγκου Μηνά, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ για τη συμβολή του στην διεξαγωγή ενός μέρους των πειραμάτων.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Παρασκευόπουλο Κωνσταντίνο, καθηγητή του τμήματος Φυσικής του ΑΠΘ για την άριστη συνεργασία που είχαμε με το εργαστήριο του τομέα Φυσικής στερεάς κατάστασης. Ευχαριστώ επίσης θερμά την λέκτορα οδοντίατρο Κοντονασάκη Ελέανα, την διδάκτορα γεωλόγο Παπαδοπούλου Λαμπρινή, τον λέκτορα γεωλόγο Καντηράνη Νικόλαο και την υποψήφια διδάκτορα φυσικό Γουδούρη Μέντη για την άριστη συνεργασία και την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχαν.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα βιολόγο Σαμαλίδου Μαρία από το εργαστήριο γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας της αιματολογικής κλινικής και ΜΜΜΟ του Γ.Ν.Θ «Γεώργιος Παπανικολάου» για την απαραίτητη συμβολή της στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Ευχαριστίες νιώθω την ανάγκη, να αποδώσω σε όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Γενικής Μικροβιολογίας, για το φιλικότατο εργασιακό περιβάλλον που επικρατούσε αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα βιολόγο Κατσικάρη Αθανασία για την πολύπλευρη βοήθεια και στήριξη που μου

παρείχε και την συνάδελφο μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αρβανίτη Ελένη για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη στήριξη και την υπομονή που επέδειξε όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προηγουμένως δείξαμε ότι ένα βακτήριο που απομονώθηκε από ένα διάλυμα που προσομοιάζει τα υγρά του σώματος διαλυτοποιεί ανθρακικό ασβέστιο, προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αναστολή σχηματισμού υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια δοκιμίων βιοϋάλου και προκαλεί 50% μείωση του βάρους των δοκιμίων συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του βακτηρίου αυτού σε μολύνσεις σκληρών ιστών. Φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη σύγκριση της ακολουθίας του 16S rRNA γονιδίου έδειξε ότι αυτό το βακτήριο είναι ένα άγνωστο είδος *Pseudomonas*. Η *Pseudomonas* sp. μπορεί να μολύνει πρόδρομους οστεοβλάστες. Στην συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή δράση των λιποπολυσακχαριτών (LPS), που απομονώθηκαν από την *Pseudomonas* sp., στην οστεοκλαστογένεση χρησιμοποιώντας κύτταρα μυελού των οστών ποντικών. Οι LPS δεν επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μυελού των οστών, κατά τη διάρκεια 7 ημερών έκθεσης, όπως διαπιστώθηκε με την μέθοδο MTS, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 έως 50 µg/ml) LPS. Έκθεση των κυττάρων του μυελού των οστών σε LPS για 7 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οστεοκλαστών με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση ήταν ειδική για την *Pseudomonas* sp., αφού παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερο ποσοστό σχηματισμού οστεοκλαστών όταν χρησιμοποιήθηκαν LPS του βακτηρίου *E. coli*. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν δείγματα βιοϋάλου, στα οποία ο σχηματισμός στρώματος υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά τους εξακριβώθηκε με αναλύσεις XRD και FTIR. Ο σχηματισμός οστεοκλαστών διαμεσολαβούμενος από LPS της *Pseudomonas* επάνω στα δείγματα βιοϋάλου, των οποίων η επιφάνεια έχει καλυφθεί με στρώμα υδροξυαπατίτη, έδειξε ότι οι οστεοκλάστες, σε αντίθεση με το μάρτυρα, είχαν προσκολληθεί στον υδροξυαπατίτη και τον είχαν εγκολπώσει, όπως παρατηρήθηκε από φωτογραφίες SEM και ανάλυση EDS. Οι προερχόμενοι από LPS της *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες σχημάτισαν δακτυλίους ακτίνης στην επιφάνεια επαφής τους με τον υδροξυαπατίτη, χαρακτηριστικό των ενεργών οστεοκλαστών. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε υψηλότερη συγκέντρωση φωσφόρου στο υπερκείμενο των δοκιμίων βιοϋάλου συγκριτικά με το μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι οι οστεοκλάστες που σχηματίστηκαν είχαν την ικανότητα απορρόφησης υδροξυαπατίτη. Οι κυτοκίνες TNF- α , IL-6, IL-10 και IL-12 βρέθηκε ότι απελευθερώνονται από τα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών κατά τη διαδικασία σχηματισμού οστεοκλαστών που μεσολαβείται από LPS της *Pseudomonas* sp.

ABSTRACT

Previously we reported the isolation of a bacterium from a solution simulating body fluid which was able to solubilize tricalcium phosphate, to cause dose-dependent inhibition of the formation of hydroxyapatite layer on the surface of bioglass specimens and to cause 50% reduction of specimen's weight comparatively to control. The purpose of the present study was to investigate the possible implication of this bacterium in hard tissue infections. Phylogenetic analysis by using 16S rRNA gene sequence comparison showed that this bacterium is a *Pseudomonas* unknown species. *Pseudomonas* sp. was able to infect osteoblast like cells. Next we examined the possible effect of isolated lipopolysaccharides (LPS) from *Pseudomonas* sp on osteoclastogenesis using mouse bone marrow cells. LPS did not affect bone marrow cell proliferation during 7 days of exposure, as it was confirmed by MTS assay using different concentrations of LPS (1 to 50 µg/ml). Exposure of bone marrow cells to LPS for 7 days caused osteoclasts formation in concentration dependent manner. This effect was specific for *Pseudomonas* sp., since considerable lower percentage of osteoclasts formation was observed when LPS from *E. coli* were used. Next, bioglass coated specimens were prepared in which the formation of hydroxyapatite layer on their surface was confirmed by XRD and FTIR analysis. *Pseudomonas* LPS-mediated osteoclast formation on hydroxyapatite-coated bioglass specimens showed that osteoclasts, in contrast to the control, were attached on hydroxyapatite and then they enclosed it, as it was observed by SEM photographs and determined by EDS analysis on the enclosed particles. Further, higher content of phosphorus was detected in the supernatant medium of bioglass specimens comparatively with control, indicating that osteoclasts were capable of hydroxyapatite resorption. The cytokines TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 were found to be released by osteoclast precursors undergoing *Pseudomonas* sp. LPS-mediated osteoclast formation.

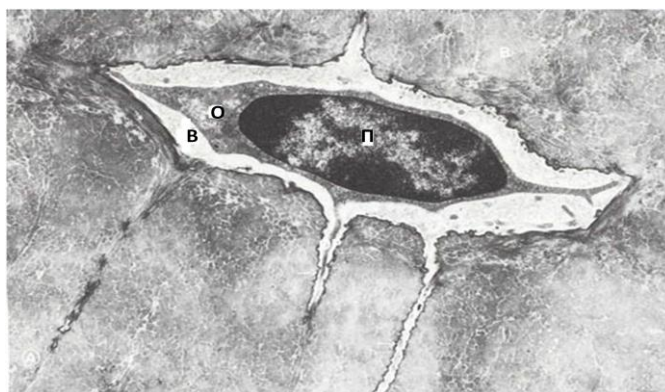
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

❖ ΟΣΤΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Τα οστά είναι ένας ζωτικός και δυναμικός συνδετικός ιστός και είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να επιτελούν τις παρακάτω 4 βασικές λειτουργίες: α) αποτελούν δεξαμενή ιόντων, κυρίως του ασβεστίου, του μαγνησίου, του νατρίου και του φωσφόρου, με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης, που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ζωής, β) εξασφαλίζουν τη στήριξη του σώματος, γ) επιτρέπουν την κινητικότητα του ατόμου παρέχοντας μοχλούς, αρθρώσεις και σημεία πρόσφυσης των μυών και δ) προστατεύουν το αιμοποιητικό σύστημα και τα όργανα στο κρανίο, την πύελο και τον θώρακα (Guyton, 1998).

Ο οστίτης ιστός αποτελεί το κύριο συστατικό του σκελετού και αποτελείται από μεσοκυττάριο ασβεστοποιημένο υλικό, που ονομάζεται θεμέλια ουσία του οστού και τέσσερις τύπους κυττάρων: τα οστεοκύτταρα τα οποία βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες (βοθρία) της θεμέλιας ουσίας (Εικόνα 1), τα επενδυτικά κύτταρα που καλύπτουν τη θεμέλια ουσία, τους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν τα οργανικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας και τους οστεοκλάστες οι οποίοι είναι πολυπύρρηνα γιγαντιαία κύτταρα που συμμετέχουν στην απορρόφηση και την ανακατασκευή των οστών.



Εικόνα 1: Τομή οστίτη ιστού που δείχνει ένα οστεοκύτταρο (Ο) με τις κυτταροπλασματικές του αποφυάδες, περιβαλλόμενο από τη θεμέλια ουσία. Η υπερмикροσκοπική δομή του κυτταρικού πυρήνα και του κυτταροπλάσματος είναι συμβατή με χαμηλό επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης. Β: Βοθρίο, Π: Πυρήνας (Junqueira and Carneiro, 2004).

Επειδή οι μεταβολίτες δεν μπορούν να διαχυθούν διαμέσου της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας του οστού, οι ανταλλαγές μεταξύ των οστεοκυττάρων και των αιμοφόρων τριχοειδών βασίζονται στην επικοινωνία μέσω των οστικών σωληναρίων, τα οποία είναι λεπτά κυλινδρικά διαστήματα που διατρύπουν τη θεμέλια ουσία. Όλα τα οστά επενδύονται τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική τους επιφάνεια από στιβάδες ιστού που περιέχει οστεοπαραγωγά κύτταρα, το ενδόστεο και το περίοστεο αντίστοιχα (Εικόνα 5) (Junqueira and Carneiro, 2004).

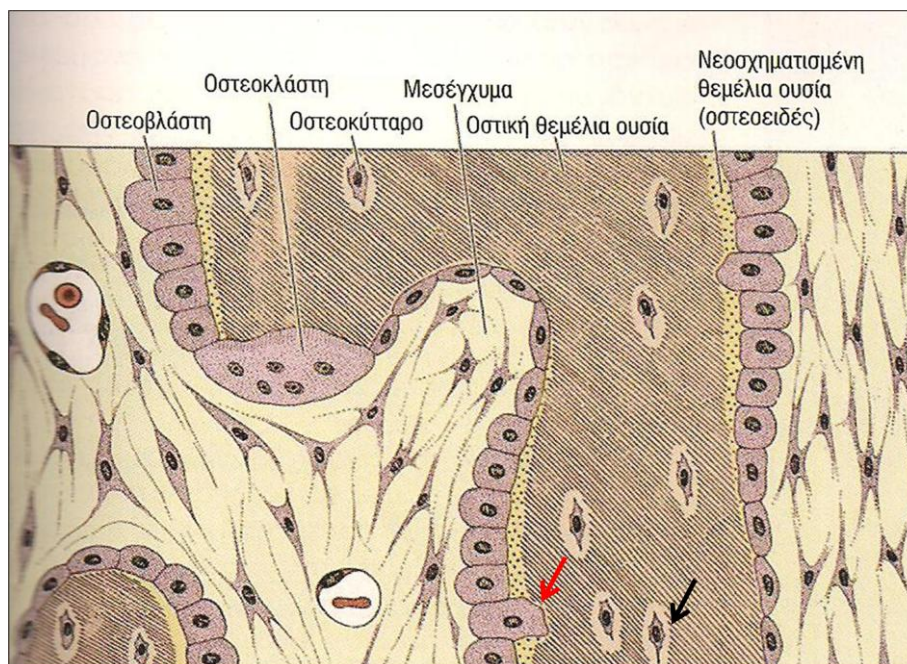
ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ (osteoblasts)

Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση των οργανικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας των οστών (κολλαγόνο τύπου I, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες). Η εναπόθεση των ανόργανων συστατικών των οστών (αποτιτάνωση) εξαρτάται από την παρουσία ζωντανών οστεοβλαστών. Οι οστεοβλάστες εντοπίζονται αποκλειστικά στις επιφάνειες του οστίτη ιστού, ο ένας δίπλα στον άλλον, με τρόπο που θυμίζει μονόστιβο επιθήλιο (Εικόνα 2). Όταν ασχολούνται ενεργώς με τη σύνθεση της θεμέλιας ουσίας, οι οστεοβλάστες έχουν κυβοειδές προς κυλινδρικό σχήμα και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Όταν υποχωρεί η συνθετική τους δραστηριότητα, οι οστεοβλάστες επιπεδώνονται και το κυτταρόπλασμά τους γίνεται λιγότερο βασεόφιλο.

Μερικοί οστεοβλάστες περιβάλλονται βαθμιαία από νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία και γίνονται οστεοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας διαμορφώνεται ένας χώρος που λέγεται κοιλότητα (βοθρίο). Οι κοιλότητες καταλαμβάνονται από τα οστεοκύτταρα και τις αποφυάδες τους, μαζί με ένα μικρό ποσό εξωκυττάριας, μη ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας.

Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της θεμέλιας ουσίας, οι οστεοβλάστες έχουν την υπερμικροσκοπική δομή κυττάρων που συνθέτουν ενεργά πρωτεΐνες προς έκκριση. Οι οστεοβλάστες είναι κύτταρα που εμφανίζουν πολικότητα. Τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας εκκρίνονται στην κυτταρική επιφάνεια που είναι σε επαφή με την παλαιότερη θεμέλια ουσία, δημιουργώντας ένα νέο στρώμα (αλλά όχι ακόμα αποτιτανωμένης) θεμέλιας ουσίας, που λέγεται οστεοειδές, μεταξύ της στιβάδας των οστεοβλαστών και του προσχηματισμένου οστού (Εικόνα 2). Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται αποθετική οστική αύξηση, συμπληρώνεται με την επακόλουθη εναπόθεση αλάτων ασβεστίου μέσα στη νεοσχηματισθείσα θεμέλια ουσία.



Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση των γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης. Οι οστεοβλάστες συνθέτουν κολλαγόνο, το οποίο σχηματίζει ένα στρώμα θεμέλιας ουσίας που εγκλωβίζει τα κύτταρα. Καθώς συμβαίνει αυτό, οι οστεοβλάστες διαφοροποιούνται βαθμιαία και γίνονται οστεοκύτταρα (μαύρο βέλος). Το κατώτερο μέρος της παράστασης (κόκκινο βέλος) δείχνει έναν οστεοβλάστη ενώ εγκλωβίζεται μέσα σε νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία του οστού (Junqueira and Carneiro, 2004).

ΟΣΤΕΟΚΥΤΤΑΡΑ (osteocytes)

Τα οστεοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από τους οστεοβλάστες, εντοπίζονται μέσα σε κοιλότητες (βοθρία) που βρίσκονται μέσα στη θεμέλια ουσία. Μόνο ένα οστεοκύτταρο βρίσκεται μέσα σε κάθε κοιλότητα. Οι κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων βρίσκονται μέσα σε λεπτά κυλινδρικά σωληνάκια της θεμέλιας ουσίας. Οι αποφυάδες γειτονικών κυττάρων έρχονται σε επαφή μέσω συνάψεων, διαμέσου των οποίων είναι δυνατή η ροή μορίων από κύτταρο σε κύτταρο. Κάποια ανταλλαγή μορίων μεταξύ οστεοκυττάρων και αιμοφόρων αγγείων συμβαίνει επίσης διαμέσου του μικρού ποσού της εξωκυττάριας ουσίας που εντοπίζεται μεταξύ των οστεοκυττάρων (και των αποφυάδων τους) και της θεμέλιας ουσίας του οστού. Αυτή η ανταλλαγή μπορεί να εξασφαλίσει θρεπτικές ουσίες για μια αλυσίδα 15 περίπου κυττάρων.

Συγκρινόμενα με τους οστεοβλάστες, τα επιπεδωμένα, αμυγδαλοειδούς σχήματος οστεοκύτταρα έχουν ένα σημαντικά ελαττωμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή

Golgi καθώς και πυκνότερη πυρηνική χρωματίνη. Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της θεμέλιας ουσίας του οστού (Junqueira and Carneiro, 2004).

Τα οστεοκύτταρα είναι μακράν τα πιο άφθονα κύτταρα του οστού. Παλαιότερα θεωρούνταν ότι λειτουργούν ως αισθητήρες στις αλλαγές πίεσης και τις βλάβες, αλλά έχουν προταθεί νέες προσεγγίσεις, λόγω της ανακάλυψης μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με την οστεοπόρωση. Παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη της sclerostin, το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *SOST*. Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται ειδικά στο οστό από τα οστεοκύτταρα και αποτελεί ισχυρό αναστολέα του οστικού σχηματισμού. Έτσι, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για το ρόλο των οστεοκυττάρων στο σχηματισμό και την ανακατασκευή του οστού (Martin et al., 2008).

ΕΠΕΝΔΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (lining cells)

Οι οστικές επιφάνειες κατά τη φάση ηρεμίας καλύπτονται από ένα στρώμα πάχους 1-2 μm μη-αποτιτανωμένης θεμέλιας ουσίας στην επιφάνεια της οποίας ανιχνεύεται μία στοιβάδα επίπεδων και επιμηκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται επενδυτικά κύτταρα και προέρχονται από οστεοβλάστες που έχουν επιτελέσει την οστεοσυνθετική τους λειτουργία. Ο ρόλος των επενδυτικών κυττάρων είναι να προφυλάσσουν τη θεμέλια ουσία από τη δράση των οστεοκλαστών, οι οποίοι δεν έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν μη-αποτιτανωμένες οστικές επιφάνειες. Πιθανολογείται ότι τα επενδυτικά κύτταρα δέχονται σήματα από τα οστεοκύτταρα για να προσανατολίσουν χημειοτακτικά τις πρόδρομες μορφές οστεοκλαστών προς συγκεκριμένες θέσεις του οστού κατά την έναρξη της οστικής ανακατασκευής (Manolagas, 2000).

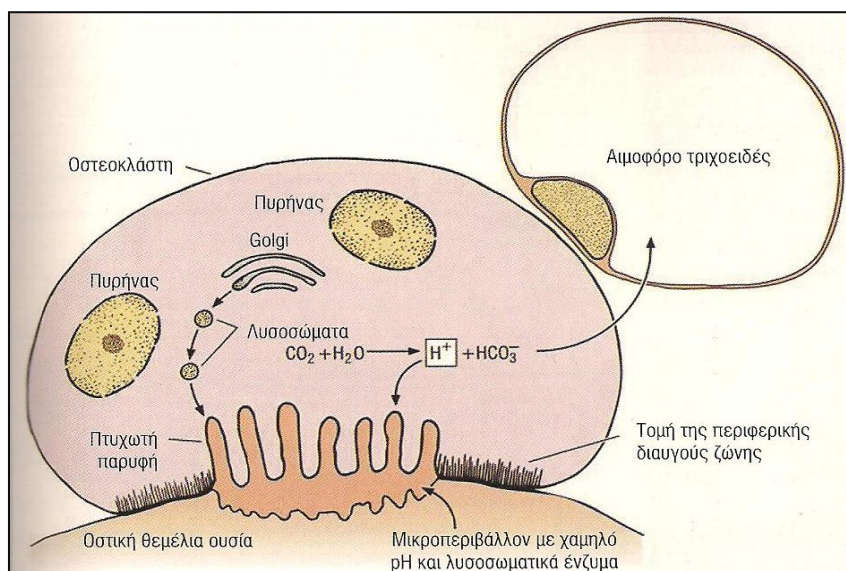
ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ (osteoclasts)

Οι οστεοκλάστες είναι πολύ μεγάλα, διακλαδιζόμενα και κινητικά κύτταρα. Είναι πολυπύρρηνα κύτταρα και μπορεί να περιέχουν από 5 έως 50 (ή και περισσότερους) πυρήνες. Σε περιοχές του οστού που υπόκεινται σε απορρόφηση, οι οστεοκλάστες εντοπίζονται μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα της θεμέλιας ουσίας, που δημιουργούνται με τη διαβρωτική δράση ενζύμων και είναι γνωστά ως βοθρία του Howship. Οι οστεοκλάστες προέρχονται από την ένωση κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών.

Στους ενεργούς οστεοκλάστες, η κυτταρική επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με τη θεμέλια ουσία του οστού είναι αναδιπλωμένη σε ανώμαλες, συχνά υποδιαιρούμενες προεκβολές, που σχηματίζουν μια πτυχωτή παρυφή. Γύρω από την πτυχωτή παρυφή

υπάρχει μια κυτταροπλασματική ζώνη, η διαυγής ζώνη, η οποία στερείται οργανιδίων, είναι όμως πλούσια σε νημάτια ακτίνης. Αυτή η ζώνη είναι η θέση προσκόλλησης του οστεοκλάστη στη θεμέλια ουσία του οστού και δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η απορρόφηση του οστού (Εικόνα 3).

Ο οστεοκλάστης εκκρίνει κολλαγενάση και άλλα ένζυμα και αντλεί πρωτόνια μέσα σε ένα υποκυτταρικό θύλακα (το μικροπεριβάλλον που αναφέρθηκε παραπάνω). Με τον τρόπο αυτό προωθεί την εντοπισμένη πέψη του κολλαγόνου και τη διάλυση των κρυσταλλικών αλάτων ασβεστίου. Η δραστηριότητα των οστεοκλαστών ελέγχεται από κυτοκίνες (μικρές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που δρουν ως τοπικοί μεταβιβαστές) και ορμόνες. Οι οστεοκλάστες διαθέτουν υποδοχείς για καλσιτονίνη, μια ορμόνη του θυρεοειδούς, όχι όμως για την παραθορμόνη. Ωστόσο, οι οστεοβλάστες έχουν υποδοχείς για την παραθορμόνη. Όταν διεγείρονται από την ορμόνη αυτή παράγουν μια κυτοκίνη που ονομάζεται παράγοντας διέγερσης των οστεοκλαστών.



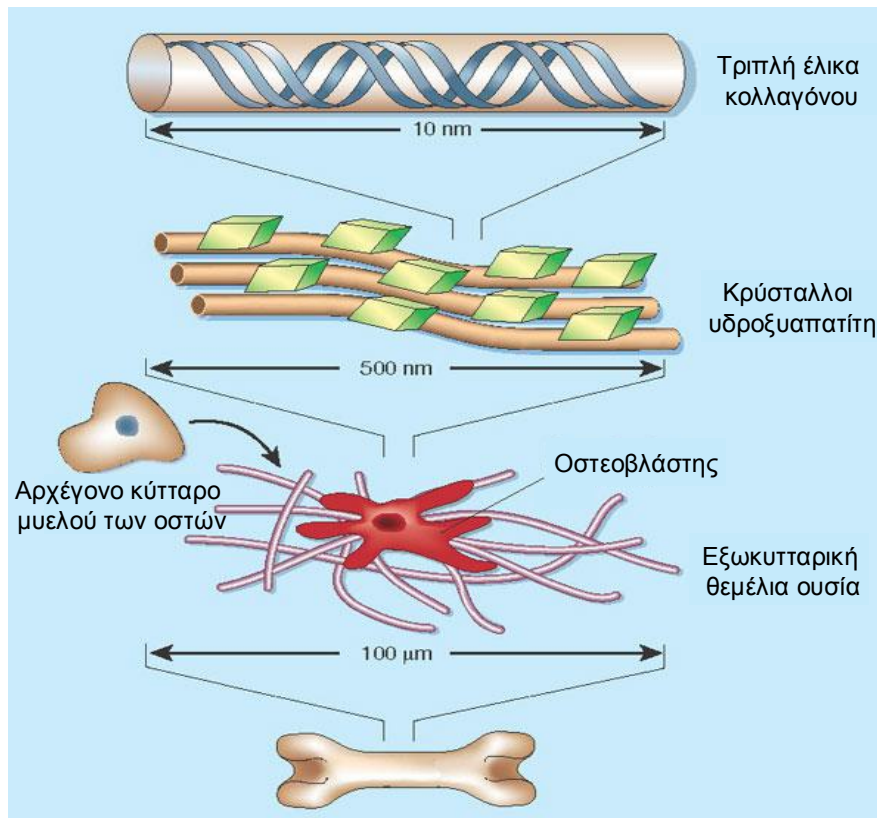
Εικόνα 3: Απορρόφηση του οστού. Λυσοσωμικά ένζυμα, συσκευασμένα στη συσκευή Golgi, και παραγόμενα ιόντα υδρογόνου, απελευθερώνονται μέσα στο περιορισμένο μικροπεριβάλλον που δημιουργείται από τη σύνδεση μεταξύ της θεμέλιας ουσίας του οστού και της περιφερικής διαυγούς ζώνης του οστεοκλάστη. Το όξινο περιβάλλον αυτού του περιορισμένου χώρου διευκολύνει τη διάλυση του φωσφορικού ασβεστίου των οστών, ενώ το άριστο pH που δημιουργείται βοηθάει τη δράση των λυσοσωμικών υδρολασών. Η θεμέλια ουσία του οστού απομακρύνεται με τον τρόπο αυτό και τα προϊόντα της απορρόφησης του οστού προσλαμβάνονται από το κυτταρόπλασμα των οστεοκλαστών, υφίστανται περαιτέρω πέψη και μεταφέρονται στη συνέχεια σε αιμοφόρα τριχοειδή (Junqueira and Carneiro, 2004).

ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ

Οι ανόργανες ύλες αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% του ξηρού βάρους της θεμέλιας ουσίας του οστού. Ιδιαίτερα άφθονα είναι το ασβέστιο και ο φώσφορος, ενώ βρίσκονται επίσης διττανθρακικά και κιτρικά ιόντα, μαγνήσιο, κάλιο και νάτριο. Μελέτες με διάθλαση ακτίνων Χ έχουν δείξει ότι το ασβέστιο και ο φώσφορος σχηματίζουν κρυστάλλους υδροξυαπατίτη με σύνθεση $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Υπάρχουν επίσης σημαντικές ποσότητες άμορφου (μη κρυσταλλικού) φωσφορικού ασβεστίου. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη του οστού φαίνονται σαν πλάκες διατεταγμένες κατά μήκος των κολλαγόνων ινιδίων και περιβάλλονται από θεμέλια ουσία. Τα επιφανειακά ιόντα του υδροξυαπατίτη είναι ενυδατωμένα και γύρω από τον κρύσταλλο σχηματίζεται ένα στρώμα νερού και ιόντων. Αυτό το υδάτινο στρώμα διευκολύνει την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του κρυστάλλου και των υγρών του σώματος (Εικόνα 4).

Η οργανική ύλη της θεμέλιας ουσίας του οστού αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και θεμέλια ουσία, η οποία περιέχει συσσωματώματα πρωτεογλυκανών και αρκετές ειδικές δομικές γλυκοπρωτεΐνες. Οι οστικές γλυκοπρωτεΐνες μπορεί να είναι υπεύθυνες για την προώθηση της ασβεστοποίησης της θεμέλιας ουσίας του οστού. Άλλοι ιστοί που περιέχουν κολλαγόνο τύπου I δεν ασβεστοποιούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες και αυτοί οι ιστοί δεν περιέχουν αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες (π.χ. αλκαλική φωσφατάση).

Ο συνδυασμός των ανόργανων ουσιών με τις κολλαγόνες ίνες είναι υπεύθυνος για τη σκληρότητα και την αντίσταση του οστίτη ιστού. Μετά την αφαλάτωσή του, το οστό διατηρεί το σχήμα του, γίνεται όμως εύκαμπτο, όπως ο χόνδρος. Η αφαίρεση του οργανικού μέρους της θεμέλιας ουσίας, που είναι κυρίως κολλαγόνο, αφήνει επίσης το οστό με το αρχικό του σχήμα, καθιστώντας το όμως εύθραυστο.



Εικόνα 4: Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου δρα ως μήτρα για την κρυσταλλοποίηση του υδροξυαπατίτη (Taton, 2001).

ΠΕΡΙΟΣΤΕΟ ΚΑΙ ΕΝΔΟΣΤΕΟ

Οι εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες των οστών καλύπτονται από στιβάδες κυττάρων που παράγουν οστό και συνδετικό ιστό και ονομάζονται περίοστεο και ενδόστεο αντίστοιχα (Εικόνα 5).

Το περίοστεο αποτελείται από μια εξωτερική στιβάδα κολλαγόνων ινών και ινοβλαστών. Δεσμίδες κολλαγόνων ινών του περίοστεου, ονομαζόμενες ίνες του Sharpey, διαπερνούν τη θεμέλια ουσία του οστού και προσδένουν το περίοστεο με το οστό. Η εσωτερική στιβάδα του περίοστεου αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και ονομάζονται οστεοπρογονικά κύτταρα. Αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται με μίτωση και να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και στην επιδιόρθωση των οστών.

Το ενδόστεο επενδύει όλες τις εσωτερικές κοιλότητες μέσα στα οστά και αποτελείται από μια μόνο στιβάδα πεπλατυσμένων οστεοπρογονικών κυττάρων και ένα πολύ μικρό ποσό συνδετικού ιστού. Επομένως, το ενδόστεο είναι σημαντικά λεπτότερο από το περίοστεο.

Οι κυριότερες λειτουργίες του περιόστεου και του ενδόστεου είναι η διατροφή του οστίτη ιστού και η εξασφάλιση συνεχούς παροχής νέων οστεοβλαστών για την επιδιόρθωση ή αύξηση του οστού.



Εικόνα 5: Ανατομική του μακρέως οστού [1].

ΤΥΠΟΙ ΟΣΤΩΝ

Τα οστά στον άνθρωπο διακρίνονται: α) στα μακρά αυλοειδή οστά, με κύριο εκπρόσωπο τα μακρά οστά των άκρων, β) στα βραχέα οστά, όπως είναι οι σπόνδυλοι και γ) στα πλαταία οστά, όπως είναι τα οστά του κρανίου (Παπαδημητρίου, 2001).

Η μακροσκοπική παρατήρηση του οστού σε εγκάρσια διατομή δείχνει συμπαγείς περιοχές χωρίς κοιλότητες, που αντιστοιχούν στο συμπαγές οστό και περιοχές με πολυάριθμες επικοινωνούσες κοιλότητες, που αντιστοιχούν στο σπογγώδες οστό.

Στα μακρά οστά, τα σφαιροειδώς διογκωμένα άκρα, αποκαλούμενα επιφύσεις, αποτελούνται από σπογγώδες οστό, που καλύπτεται από μια λεπτή στιβάδα συμπαγούς οστού. Το ενδιάμεσο, κυλινδρικό μέρος, η διάφυση, αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από συμπαγές οστό, εκτός από μια μικρή ποσότητα σπογγώδους οστού στην εσωτερική της επιφάνεια, γύρω από την κοιλότητα του μυελού των οστών. Τα βραχέα οστά έχουν συνήθως ένα κεντρικό τμήμα από σπογγώδες οστό που περιβάλλεται πλήρως από συμπαγές οστό. Τα συμπαγή οστά που σχηματίζουν το κρανίο έχουν δύο στιβάδες

συμπαγούς οστού που ονομάζονται πλάκες και χωρίζονται από μια στιβάδα σπογγώδους οστού που αποκαλείται διπλόη.

Η μικροσκοπική εξέταση του οστού δείχνει δύο παραλλαγές: το πρωτογενές, ανώριμο ή δικτυωτό οστό και το δευτερογενές, ώριμο ή πεταλιώδες οστό. Το πρωτογενές οστό είναι ο πρώτος οστίτης ιστός που εμφανίζεται κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, κατά την αποκατάσταση καταγμάτων και σε άλλες επιδιορθωτικές διεργασίες. Χαρακτηρίζεται από την τυχαία διάταξη λεπτών κολλαγόνων ινών, σε αντίθεση με την οργανωμένη πεταλιώδη διάταξη του κολλαγόνου στο δευτερογενές οστό.

Η αύξηση των οστών κατά πάχος γίνεται με την οστεογόνο δράση του περιοστέου, ενώ η κατά μήκος αύξηση των μακρών οστών γίνεται με τους συζευκτικούς χόνδρους, που βρίσκονται μεταξύ διαφύσεως και επιφύσεως.

ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΩΝ ΟΣΤΩΝ

Οι επιφύσεις των μακρών οστών αιματώνονται από αγγεία που προέρχονται από τις προσκείμενες αρθρώσεις. Η μετάφυση αιματώνεται από αγγεία που προέρχονται από την διάφυση. Τα αγγεία αυτά σταματούν στον συζευκτικό χόνδρο. Στην διάφυση η φλοιώδης μοίρα του οστού αιματώνεται από μικρά πολλαπλά αγγεία που εισέρχονται από το περίοστεο στα σωληνάρια Volkmann και στην συνέχεια στα σωληνάρια Harvers. Αποκόλληση επομένως του περιοστέου συνεπάγεται οστική νέκρωση. Ο μυελός των οστών που βρίσκεται στον αυλό του οστού αιματώνεται από την αρτηρία που εισέρχεται περίπου από το μέσον της διαφύσεως.

ΟΣΤΙΚΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Ο οστικός σχηματισμός είναι αποτέλεσμα μιας σειράς γεγονότων που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση τους σε πρόδρομους οστεοβλάστες (osteoprogenitor, pre- osteoblast), την ωρίμανση των οστεοβλαστών, τον σχηματισμό της θεμέλιας ουσίας και τέλος την αποτιάνωση της θεμέλιας ουσίας (Martin et al., 2008).

ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν σε στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow stromal cells), χονδροκύτταρα (chondrocytes), μυϊκά κύτταρα (muscle cells) και λιποκύτταρα (adipocytes) υπό την επίδραση τοπικών αυξητικών παραγόντων, ορμονικών ρυθμιστών και μεταγραφικών παραγόντων (Aubin et al., 2006).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο πρώιμος καθορισμός των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων προς συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο οφείλεται στην έκφραση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Η έκφραση του παράγοντα Cbfa1 ή Runx2 είναι καθοριστική για την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και την οστική παραγωγή. Ο μεταγραφικός παράγοντας Cbfa1 προσδένεται στην OSE2 αλληλουχία των υποκινητών διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων της $\alpha 1$ αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου I, της οστικής σιαλοπρωτεΐνης, της οστεοποντίνης, του TGF- β και της οστεοκαλσίνης επάγοντας τους μηχανισμούς έκφρασής τους στο οστό (Ducy et al., 1997). Η αναζήτηση μεταγραφικών παραγόντων εκτός του Runx2 οδήγησε στην αναγνώριση ενός καινούριου παράγοντα, του osteonix (Osx), ο οποίος εκφράζεται ειδικά από τους οστεοβλάστες. Ο Osx είναι σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, λειτουργεί καθοδικά του Runx2 και πιθανότατα δρα συνεργατικά με αυτόν (Nakashima et al., 2002).

Πληθώρα αυξητικών παραγόντων κατέχουν σημαντική θέση στη ρύθμιση της οστεοβλαστογένεσης, όπως ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor- β , TGF- β), ο οποίος έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την έκφραση του Cbfa1 σε καλλιέργειες οστεοβλαστικών κυττάρων, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) που φαίνεται να συμμετέχει κυρίως στην πορεία διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, ο ινσουλινο-αυξητικός παράγοντας (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) που επάγει την οστεοβλαστογένεση μέσω της ενεργοποίησης της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα osteonix και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (Bone Morphogenetic Proteins BMPs), οι οποίες επάγουν *in vitro* την έκφραση του Cbfa1 (Ducy et al., 2000).

Κατά την πορεία διαφοροποίησης των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων προς ώριμους οστεοβλάστες, μια αλληλουχία γεγονότων οδηγεί στην έκφραση ειδικών πρωτεϊνών, χαρακτηριστικών του οστεοβλαστικού φαινοτύπου. Ως πρώιμος δείκτης των οστεοπρογονικών κυττάρων έχει αναφερθεί η οστική αλκαλική φωσφατάση (bone alkaline phosphatase, bALP), την έκφραση της οποίας ακολουθεί το κολλαγόνο τύπου I και οι

πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Αυξανόμενη έκφραση της οστεοκαλσίνης και της οστικής σιαλοπρωτεΐνης παρατηρείται με την έναρξη της εναπόθεσης μετάλλων στο οστεοειδές από τους ώριμους οστεοβλάστες (Aubin and Liu, 1996).

Ο ρυθμός της οστικής παραγωγής καθορίζεται από την ενεργότητα των ώριμων οστεοβλαστών και από τον αριθμό των πρόδρομων οστεοβλαστικών κυττάρων που αρχίζουν να διαφοροποιούνται από το μυελό των οστών κατά τη διάρκεια της φάσης της οστικής παραγωγής (Parfitt, 1991).

Η οστική παραγωγή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τον καθορισμό της πορείας διαφοροποίησης (commitment) των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων προς τη κυτταρική σειρά των οστεοπρογονικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών των οστεοβλαστών και την προοδευτική διαφοροποίησή τους σε ώριμους λειτουργικούς οστεοβλάστες.

ΟΣΤΕΟΣΥΝΘΕΣΗ

Το οστό είναι δυνατόν να σχηματισθεί με δύο τρόπους: με άμεση εφάλατωση της θεμέλιας ουσίας που εκκρίνεται από τις οστεοβλάστες (ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση) ή με εναπόθεση οστικής θεμέλιας ουσίας σε προϋπάρχουσα θεμέλια ουσία χόνδρου (ενδοχόνδρια οστεοποίηση).

Και στις δύο διεργασίες, ο πρωτοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός είναι πρωτογενής ή δικτυωτός. Το πρωτογενές οστό είναι προσωρινό και γρήγορα αντικαθίσταται από το οριστικό, πεταλιώδες ή δευτερογενές οστό. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οστών, περιοχές του πρωτογενούς οστού, περιοχές απορρόφησης και περιοχές του δευτερογενούς οστού εμφανίζονται η μια δίπλα στην άλλη. Αυτός ο συνδυασμός σύνθεσης και απομάκρυνσης του οστού (ανακατασκευής) συμβαίνει όχι μόνο στα αναπτυσσόμενα οστά, αλλά και σ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ενήλικα, αν και ο ρυθμός της ανακατασκευής στους ενήλικες εμφανίζει σημαντική επιβράδυνση.

ΕΝΔΟΜΕΜΒΡΑΝΩΔΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ

Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση, πηγή σχηματισμού των περισσότερων από τα πλατέα οστά, έχει αυτό το όνομα επειδή λαμβάνει χώρα μέσα σε συμπυκνώσεις μεσεγχυματικού ιστού. Το μετωπιαίο και τα βρεγματικά οστά του κρανίου, καθώς και μέρη του ινιακού και των κροταφικών οστών και η άνω και κάτω γνάθος, σχηματίζονται με ενδομεμβρανώδη

οστεοποίηση. Η διεργασία αυτή συμβάλλει επίσης στην αύξηση των βραχέων οστών και στην πάχυνση των μακρών οστών.

Στη στιβάδα συμπίκνωσης του μεσεγγύματος, το σημείο έναρξης της οστεοποίησης ονομάζεται πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης, η διεργασία αρχίζει όταν ομάδες κυττάρων διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες παράγουν θεμέλια ουσία του οστού και ακολουθεί η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου, με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό μερικών οστεοβλαστών, οι οποίοι μετατρέπονται τότε σε οστεοκύτταρα. Αυτές οι νησίδες αναπτυσσόμενου οστού σχηματίζουν τοιχώματα που ορίζουν επιμήκεις κοιλότητες, οι οποίες περιέχουν τριχοειδή αγγεία, κύτταρα του μυελού των οστών και αδιαφοροποίητα κύτταρα. Αρκετές τέτοιες ομάδες αναπτύσσονται σχεδόν συγχρόνως στο κέντρο οστεοποίησης, με αποτέλεσμα η ένωση των τοιχωμάτων να δίνει στο οστό μια σπογγώδη υφή. Ο συνδετικός ιστός που παραμένει μεταξύ των οστέινων τοιχωμάτων διαπερνάται από τα αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, τα αδιαφοροποίητα μεσεγγυματικά κύτταρα δίνουν γένεση σε κύτταρα του μυελού των οστών.

Τα κέντρα οστεοποίησης ενός οστού αναπτύσσονται ακτινοειδώς και τελικά ενώνονται μεταξύ τους, αντικαθιστώντας τον αρχικό συνδετικό ιστό. Στα πλατέα οστά του κρανίου, υπάρχει αξιοσημείωτη επικράτηση του σχηματισμού οστού έναντι της απορρόφησης οστού τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική επιφάνεια. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν δύο στιβάδες συμπαγούς οστού (έσω και έξω πλάκες) ενώ η κεντρική μοίρα (διπλή) διατηρεί τη σπογγώδη υφή της.

Το τμήμα της στιβάδας του συνδετικού ιστού που δεν οστεοποιείται δίνει γένεση στο ενδόστεο και το περίστεο του ενδομεμβρανώδους οστού.

ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα τμήμα υαλοειδούς χόνδρου, του οποίου το σχήμα μοιάζει κατά προσέγγιση με το σχήμα του οστού που πρέπει να σχηματισθεί. Αυτός ο τύπος οστεοποίησης είναι κυρίως υπεύθυνος για το σχηματισμό των βραχέων και των μακρών οστών.

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση ενός μακρού οστού περιλαμβάνει την εξής αλληλουχία γεγονότων. Αρχικά, ο πρώτος οστίτης ιστός εμφανίζεται ως ένας κοίλος οστικός κύλινδρος που περιβάλλει τη μεσαία περιοχή του χόνδρινου προπλάσματος. Αυτή η δομή, το οστικό περιλαίμιο, παράγεται με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση μέσα στο τοπικό περιχόνδριο. Στο επόμενο βήμα, ο τοπικός χόνδρος υφίσταται μια εκφυλιστική διεργασία

προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με μεγέθυνση των κυττάρων (υπερτροφία) και αποτιτάνωση της θεμέλιας ουσίας, γεγονός που οδηγεί σε μια τρισδιάστατη δομή που σχηματίζεται από τα υπολείμματα της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας του χόνδρου. Αυτή η διεργασία αρχίζει στην κεντρική περιοχή του χόνδρινου προπλάσματος (διάφυση), όπου τα αιμοφόρα αγγεία διαπερνούν το οστικό περιλαίμιο, που έχει προηγουμένως διατρυπηθεί από τους οστεοκλάστες, φέρνοντας οστεοπρογονικά κύτταρα στην περιοχή αυτή.

Εν συνεχεία, οι οστεοβλάστες προσκολλώνται στην ασβεστοποιημένη θεμέλια ουσία του χόνδρου και παράγουν συνεχείς στιβάδες πρωτογενούς οστού που περιβάλλουν τα υπολείμματα της χόνδρινης θεμέλιας ουσίας. Στο στάδιο αυτό ο ασβεστοποιημένος χόνδρος εμφανίζεται βασεόφιλος και το πρωτογενές οστό ηωσινόφιλο. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται το πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης. Ακολούθως, εμφανίζονται τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης στις βολβώδεις διογκώσεις, που βρίσκονται στα άκρα του χόνδρινου προπλάσματος (επιφύσεις). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ανακατασκευής τους, το πρωτογενές και τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης δημιουργούν κοιλότητες που βαθμιαία πληρούνται από το μυελό των οστών (Junqueira and Carneiro, 2004).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Είναι γνωστό ότι η ασβεστοποίηση αρχίζει με την εναπόθεση αλάτων ασβεστίου πάνω σε κολλαγόνα ινίδια, μια διεργασία που προκαλείται από τις πρωτεογλυκάνες και τις γλυκοπρωτεΐνες που προσδένουν ασβέστιο με υψηλή συγγένεια. Η εναπόθεση των αλάτων ασβεστίου επιταχύνεται λόγω της ικανότητας των οστεοβλαστών να συγκεντρώνουν αυτά τα άλατα μέσα σε ενδοκυτταροπλασματικά κυστίδια και να απελευθερώνουν αυτά τα κυστίδια, όταν χρειάζεται, στον εξωκυττάριο χώρο (κυστίδια θεμέλιας ουσίας).

Η ασβεστοποίηση υποβοηθείται από την αλκαλική φωσφατάση, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες και βρίσκεται στις θέσεις οστεοποίησης (Junqueira and Carneiro, 2004). Η οστεοκαλσίνη είναι πιθανότατα η πιο άφθονη, ειδική για τους οστεοβλάστες, μη κολλαγονική πρωτεΐνη. Προσδένεται στον υδροξυαπατίτη μέσω μίας περιοχής πλούσιας σε γ-καρβοξυγλουταμινικό οξύ και η σύνθεση και συσώρευση της στα οστά σχετίζεται με την εναπόθεση αλάτων (van de Lest and Vaandrager, 2007). Η οστεοκαλσίνη είναι όψιμος δείκτης ασβεστοποίησης στην οστεοβλαστογένεση και είναι παρούσα στα τελικά στάδια του σχηματισμού οστών (Rajamannan et al., 2003).

ΟΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Η οστική απορρόφηση είναι μια διαδικασία που καταλύεται από τους οστεοκλάστες. Για το σχηματισμό ώριμων οστεοκλαστών (οστεοκλαστογένεση) απαιτείται ο πολλαπλασιασμός και η σύντηξη των προγονικών τους κυττάρων σε μια πορεία διαφοροποίησης όπου συμμετέχουν μόρια που παράγονται στους οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα.

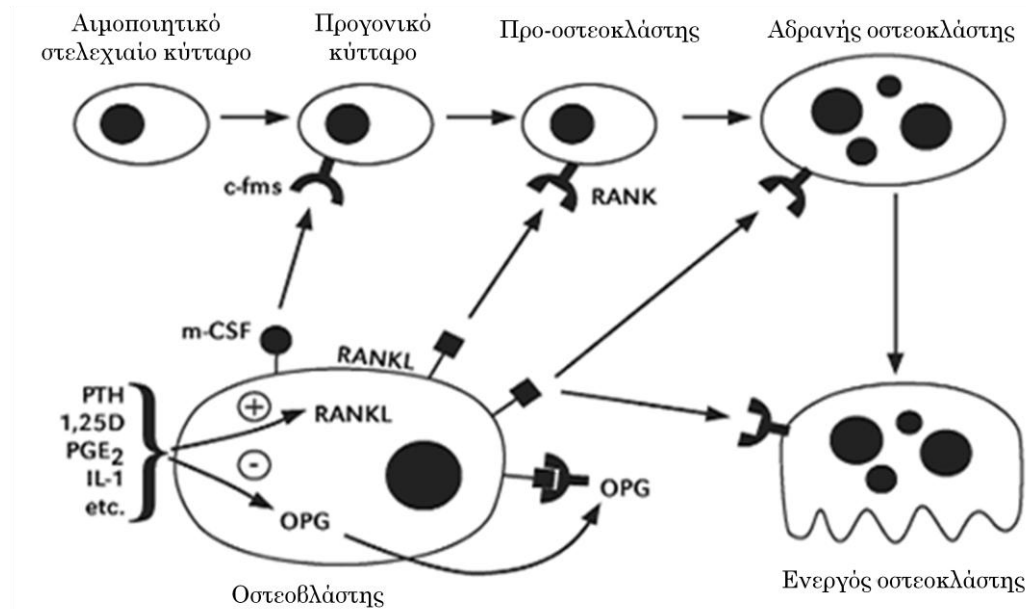
ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από πρόδρομες μορφές κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα συγκαταλέγονται στην οικογένεια των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των πολυπύρηνων μακροφάγων με τα οποία μοιράζονται κοινά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, όπως την υψηλή έκφραση λυσοσωματικών ενζύμων και την ικανότητα φαγοκυττάρωσης (Sakiyama et al., 2001).

Η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών απαιτεί την στενή επαφή των αδιαφοροποίητων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών με τους οστεοβλάστες ή με τα κύτταρα του στρώματος του οστού. Ορμονικοί παράγοντες και κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τους οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα ρυθμίζουν την παραγωγή των οστεοκλαστών (Duong and Rodan, 2001).

Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες PU.1, FOS, NF-κB και MI καθώς και η κυτοκίνη M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Gunther and Schinke, 2000). Δύο πολύ σημαντικά μόρια που ρυθμίζουν την οστεοκλαστογένεση είναι οι κυτοκίνες RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor NFκB- Ligand) και OPG (Osteoprotegerin), οι οποίες μαζί με την κυτοκίνη M-CSF δρουν στις πρόδρομες μορφές των οστεοκλαστών επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους (Teitelbaum, 2000).

Σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο, ο προσδέτης του RANK (RANKL) συνδέεται με τον υποδοχέα RANK που εκφράζεται στους προγόνους των οστεοκλαστών. Μετά την πρόσδεση, ο RANKL επάγει ενδοκυτταρικά σήματα που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, τη λειτουργία και την επιβίωση των οστεοκλαστών. Εναλλακτικά, ο διαλυτός υποδοχέας οστεοπροτεγερίνη (OPG), μπορεί να δεσμεύσει τον προσδέτη του RANK και να αναστείλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Schoppert et al., 2004) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Διαφοροποίηση οστεοκλαστών μέσω αλληλεπίδρασης με τους οστεοβλάστες. Ορμόνες και τοπικοί παράγοντες όπως PTH (parathyroid hormone), 1,25D (1,25 dihydroxyvitamin D), PGE₂ (prostaglandin E2) και IL-1 (interleukin-1) δρουν στους οστεοβλάστες αυξάνοντας την παραγωγή του RANKL και μειώνοντας την παραγωγή της OPG. M-CSF (macrophage colony stimulating factor), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), OPG (osteoprotegerin) [2].

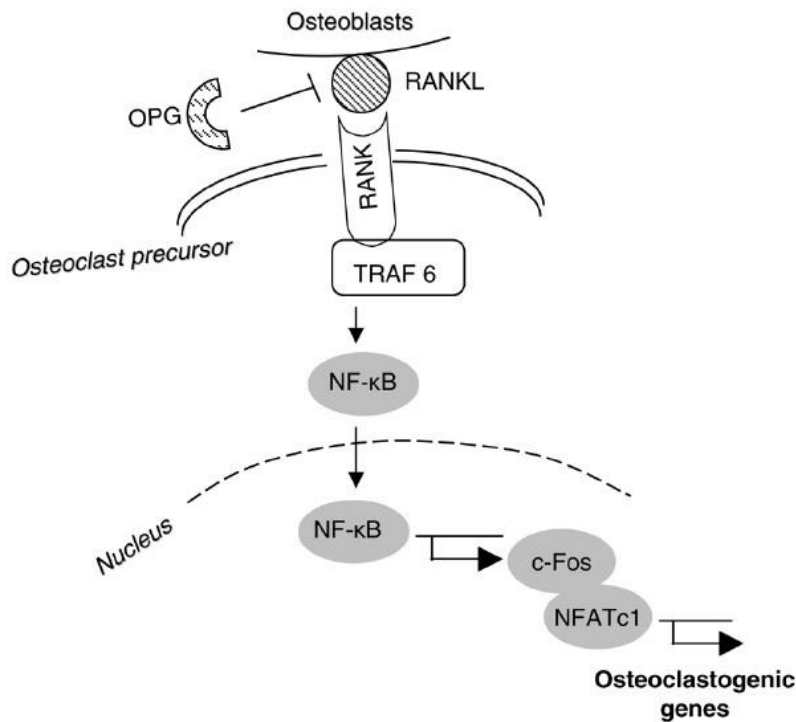
Το σύμπλεγμα osteoprotegerin (OPG)/Receptor Activator of NF-κB (RANK)/RANK Ligand (RANKL) ήταν από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις στη βιολογία των οστών κατά την περασμένη δεκαετία (Boyce and Xing, 2007). Ο RANKL εκφράζεται στην οστεοβλαστική σειρά και δρα προσδεδεμένος στον αντίστοιχο υποδοχέα RANK ο οποίος εκφράζεται στους οστεοκλάστες. Η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί όλες τις πτυχές της λειτουργίας των οστεοκλαστών. Όμως, η OPG που εκκρίνεται από την οστεοβλαστική σειρά μπορεί να δεσμεύσει τον RANKL και να εμποδίσει την πρόσδεσή του στον RANK.

Η OPG συντίθεται αρχικά ως ένα πεπτίδιο 401 αμινοξέων από το οποίο διαχωρίζεται ένα προπεπτίδιο 21 αμινοξέων καταλήγοντας σε μια ώριμη πρωτεΐνη 380 αμινοξέων (Khosla, 2001). Η παραγωγή της OPG αυξάνεται από τους παράγοντες VD3, IL-1α, TNF-α, IL-6, IL-11, IL-17, ασβέστιο, οιστρογόνα, TGF-β και BMP-2 ενώ μειώνεται από την PTH (σε συνεχή και όχι διαλείπουσα χορήγηση), γλυκοκορτικοειδή, προσταγλανδίνη E2, IGF-1 ή ανοσοκατασταλτικά (Khosla, 2001; Collin-Osdoby, 2004).

Ο RANKL είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 316 αμινοξέων που εκφράζεται ισχυρά στα T λεμφοκύτταρα και τους οστεοβλάστες (Collin-Osdoby, 2004). Είναι επίσης γνωστός ως TRANCE (TNF – related activation induced cytokine), OPGL (OPG ligand) και ODF (osteoclast

differentiation factor) (Tanaka et al., 2005). Ο RANKL υπάρχει σε δυο βιολογικά ενεργές διαλυτές μορφές, εκκρινόμενος από Τ λεμφοκύτταρα είτε αποχωριζόμενος πρωτεολυτικά από τις κυτταρικές επιφάνειες (Collin-Osdoby, 2004). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η μεμβρανική μορφή του RANKL είναι περισσότερο δραστική από τη διαλυτή μορφή στη διέγερση της οστεοκλαστογένεσης (Ziolkowska et al., 2002). Ο RANKL προσδέεται ως ομοτριμερές στον RANK στην επιφάνεια των μονοκυττάρων/μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων, οστεοκλαστών ώστε να παραχθούν πολλαπλά ενδοκυττάρια σήματα τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, λειτουργία και επιβίωση (Collin-Osdoby, 2004).

Ο RANK είναι μέλος της οικογένειας TNFR (tumor necrosis factor receptor) και εκφράζεται σε ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των οστεοκλαστών και των πρόδρομων μορφών τους. Στερείται ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας αλλά συνδέεται με ενδοκυττάριους σηματοδοτικούς καταρράκτες μέσω διαφόρων παραγόντων – πρωτεϊνών σχετιζομένων με τον TNFR (TNF Receptor - Associated Factors, TRAF). Η ενεργοποίηση του RANK οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα που εξαρτάται από τους παράγοντες c-Fos και NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells 1) (Horne et al., 2005) (Εικόνα 7). Ο RANK εκφράζεται ως διαμεμβρανικό ετεροτριμερές στην επιφάνεια των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων των οστεοκλαστών, των ώριμων οστεοκλαστών, των χονδροκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων των μαστικών αδένων (Jimi and Ghosh, 2005). Δεν έχει αναγνωρισθεί διαλυτή μορφή RANK (Theoleyre et al., 2004).

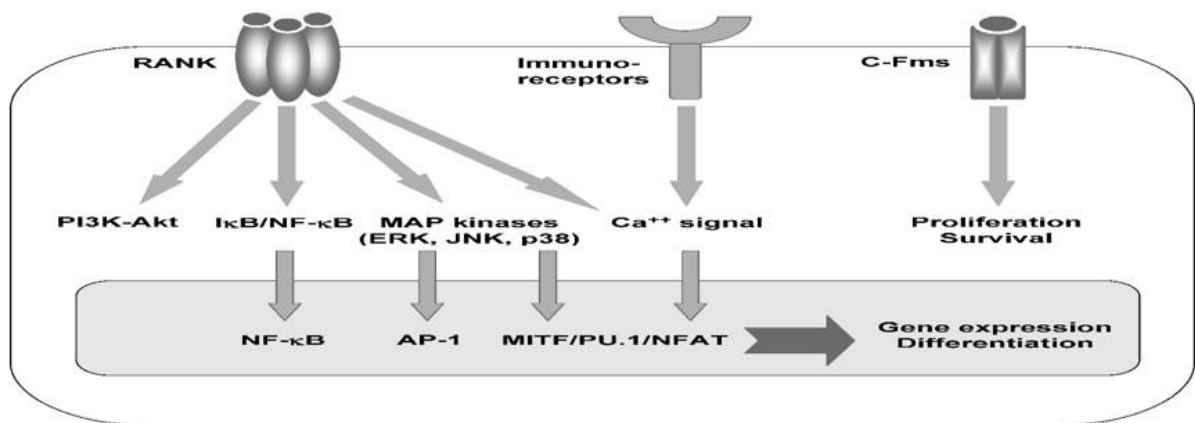


Εικόνα 7: Τα βασικά στοιχεία της σηματοδοτικής οδού κατά τη φυσιολογική οστεοκλαστογένεση. Μετά την ενεργοποίηση του RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) από την πρόσδεση του RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), ο RANK συνδέεται με ενδοκυττάρια σηματοδοτικούς καταρράκτες μέσω του παράγοντα TRAF (TNF Receptor - Associated Factor). Η ενεργοποίηση του RANK οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα που εξαρτάται από τους παράγοντες NF-κB, c-Fos και NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells 1) (Horne et al., 2005). Η OPG (osteoprotegerin) δρα ως διαλυτός υποδοχέας του RANKL, παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή του με τον RANK.

Η έκφραση του RANKL αυξάνεται στους οστεοβλάστες και τα κύτταρα του στρώματος από μια ποικιλία σημάτων όπως 1,25 διυδροξυβιταμίνη D, PTH, γλυκοκορτικοειδή, προσταγλανδίνη E2, IL-1a, TNF-a, IL-6, IL-11, IL-17, ασβέστιο ή ανοσοκατασταλτικά (κυκλοσπορίνη A) ενώ η έκφραση του μειώνεται από τον TGF-β (Collin-Osdoby, 2004).

Τα γονίδια που επάγονται από τον RANKL περιλαμβάνουν: α) δείκτες οστεοκλαστών, όπως TRAP (Tartrate - Resistant Acid Phosphatase), καθεψίνη K, υποδοχέα καλσιτονίνης β) μεταγραφικούς παράγοντες σημαντικούς για γονίδια οστεοκλαστών, όπως NF-κB, c-Fos, NFATc1 γ) κυτοκίνες IL-1 και TNF και δ) τη β-χημειοκίνη RANTES (Xing L et al., 2005). Η πρόσδεση του RANKL στον RANK ενεργοποιεί διάφορες ενδοκυττάρια οδούς που καταλήγουν στους NFATc1, NF-κB και MAP κινάσες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Jimi and Ghosh, 2005).

Ο RANKL εκφράζεται από τη σειρά οστεοβλαστικών κυττάρων και από τα Τ-λεμφοκύτταρα και δρα με πρόσδεση στον φυσιολογικό υποδοχέα RANK, ο οποίος εκφράζεται στους οστεοκλάστες. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα διεγείρει όλες τις πτυχές της λειτουργίας των οστεοκλαστών όπως διαφοροποίηση, ωρίμανση, σύντηξη, επιβίωση και δράση (Schorpet et al., 2004). Μετά την πρόσδεση του RANKL, ο RANK ενεργοποιεί έξι κύριες σηματοδοτικές οδούς: NFATc1, IκB/NF-κB, Akt/PKB, JNK, ERK και p38 (Εικόνα 8) οι οποίες έχουν διακριτούς ρόλους στη διαφοροποίηση, λειτουργία και επιβίωση των οστεοκλαστών (Feng, 2005).



Εικόνα 8: Σχηματικό μοντέλο των μονοπατιών οστεοκλαστογένεσης. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα για τον M-CSF, c-Fms, προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των προγονικών των οστεοκλαστών. Η διέγερση του RANK σηματοδοτεί κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κB, του άξονα PIK-Akt, καθώς επίσης και τριών μονοπατιών MAP κινάσων, ERK, JNK και p38. Το μονοπάτι σηματοδότησης της Akt είναι κρίσιμο για την επιβίωση των προγονικών και την ωρίμανση των οστεοκλαστών, ενώ η ενεργοποίηση του NF-κB και του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 είναι σημαντικά βήματα για τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Η φωσφορυλίωση του ITAM που διεγείρεται από ανοσοϋποδοχείς οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδότησης του ασβεστίου, ένα γεγονός που επίσης επάγεται από την ενεργοποίηση του RANK, το οποίο είναι κρίσιμο για την επαγωγή του NFAT. Ο NFAT μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται από τις MAP κινάσες, τον MITF και τον PU.1 και έτσι να οδηγεί σε έκφραση γονιδίων και ευνοϊκή οστεοκλαστογένεση (Wei et al., 2008).

Οι πρωτεΐνες NFAT είναι συνήθως φωσφορυλιωμένες και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των εν ηρεμία κυττάρων. Κατόπιν αποφωσφορυλίωσης από την καλσινευρίνη, οι πρωτεΐνες αυτές μετατοπίζονται στον πυρήνα και καθίστανται μεταγραφικά ενεργές. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του NFATc1 στους οστεοκλάστες διαμεσολαβείται από τη σηματοδοτική οδό RANKL/TRAF6/Fos. Στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, ο NFATc1 συνεργάζεται με τις πρωτεΐνες Fos και Jun

για την επαγωγή συγκεκριμένων γονιδίων για τους οστεοκλάστες όπως TRAP, υποδοχέα καλσιτονίνης και καθεψίνης K. Ο NFATc1 αποτελεί σημαντικό γονίδιο – στόχο του fos κατά την οστεοκλαστογένεση (Wagner and Eferl, 2005).

Από την άλλη πλευρά, η OPG εκφράζεται σε ποικιλία ιστών και δρα ως διαλυτός υποδοχέας αδρανοποίησης του RANKL. Επιπρόσθετα, η OPG αντιπροσωπεύει έναν υποδοχέα για τον κυτταροτοξικό TRAIL (TNF-Related Apoptosis - Inducing Ligand), ο οποίος αποτελεί δυνητικό ενεργοποιητή της απόπτωσης μετά από πρόσδεση στην «περιοχή θανάτου» (death domain) των αντίστοιχων υποδοχέων (Schoppet et al., 2004). Λόγω της ικανότητας πρόσδεσης του TRAIL με την OPG, ο παράγοντας αυτός μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη οστεοκλαστογένεση.

ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΟΣΤΟΥ

Η οστική απορρόφηση από τους ώριμους οστεοκλάστες πραγματοποιείται στη μικροκυκλοπότητα που σχηματίζεται μεταξύ της πτυχωτής παρυφής του οστεοκλάστη και της οστικής επιφάνειας η οποία ονομάζεται βοθρίο του Howship. Η προσκόλληση των οστεοκλαστών στις οστικές επιφάνειες επιτελείται από ιντεγκρίνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, συμπεριλαμβανομένων της οστεοποντίνης και της οστικής σιαλοπρωτεΐνης μέσω ειδικών δομών που καλούνται «ποδοσώματα». Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς αποτελούμενοι από α - και β -υπομονάδες οι οποίες αναγνωρίζουν μεγάλο πλήθος κυτταρικών και εξωκυτταρικών προσδεμάτων. Οι εξωκυττάρια πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες μέσω μιας τριπεπτιδικής αλληλουχίας (αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ) (Hynes, 1992). Κατά την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, τα ποδοσώματα συγκεντρώνονται στην κυτταρική περιφέρεια σχηματίζοντας μια μεγάλη κυκλική δομή, το δακτύλιο ακτίνης. Η ενεργότητα των οστεοκλαστών απαιτεί το σχηματισμό του δακτυλίου ακτίνης και η διάσπασή του αναστέλλει την οστική απορρόφηση. Η $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη αποτελεί την κύρια ιντεγκρίνη των οστεοκλαστών, η οποία κατέχει καθοριστικό ρόλο στα γεγονότα προσκόλλησης και στην απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών. Αναστολή της δράσης της $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη μέσω αντισωμάτων που παρεμποδίζουν την επαφή της με τη θεμέλια ουσία του οστού, προκαλεί αναστολή της απορροφητικής δράσης των οστεοκλαστών (Razzouk et al., 2002).

Με σκοπό να απορροφηθεί η αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία, οι οστεοκλάστες παράγουν ιόντα υδρογόνου ώστε να διαλυτοποιηθούν τα μεταλλικά στοιχεία και πρωτεολυτικά ένζυμα για να αποικοδομηθεί η οργανική ουσία του οστού. Η οξίνιση της αποτιτανωμένης

θεμέλιας ουσίας εξαρτάται από τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II, η απουσία της οποίας οδηγεί σε οστεοπέτρωση λόγω πλήρους αναστολής της οστικής απορρόφησης. Η αποικοδόμηση του κολλαγόνου σε χαμηλό pH επιτελείται από τις καθεψίνες (cathepsins), εξειδικευμένα ένζυμα που παράγονται από τους οστεοκλάστες και απελευθερώνονται στο βοθρίο του Howship. Οι οστεοκλάστες παράγουν επίσης μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (MMP-1 και MMP-9), ο ρόλος των οποίων στην οστική απορρόφηση δεν έχει αποσαφηνιστεί καθώς είναι ανενεργές στο χαμηλό pH που υπάρχει στο βοθρίο. Έχει διαπιστωθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας είναι απαραίτητες για τη μετανάστευση των οστεοκλαστών κατά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής.

ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ –

ΣΥΖΕΥΞΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Ο οσίτης ιστός χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη δυνατότητα συνεχούς ανακατασκευής σε όλη τη διάρκεια της ζωής λόγω της συνεχούς απόκρισης του σε φυσικά φορτία και τάσεις που δέχεται το σκελετικό σύστημα και σε μεταβολές του μικροπεριβάλλοντός του. Η δομική ακεραιότητα των οστών διατηρείται μέσω μιας δυναμικής διαδικασίας που είναι γνωστή ως οστική ανακατασκευή (bone remodelling). Η οστική ανακατασκευή είναι το αποτέλεσμα δύο αντίρροπων λειτουργικών διαδικασιών, της οστικής παραγωγής που επιτελείται από τους οστεοβλάστες και της οστικής απορρόφησης που επιτελείται από τους οστεοκλάστες. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οστικής παραγωγής και οστικής απορρόφησης οδηγεί στην εμφάνιση μεταβολικών νοσημάτων των οστών, όπως η οστεοπόρωση (Looker et al., 2000). Η οστική ανακατασκευή ρυθμίζεται από αυξητικούς και ορμονικούς παράγοντες, καθώς και από μηχανικές και ηλεκτρικές δυνάμεις που ασκούνται στον σκελετό (Watts, 1999).

Σε μικροσκοπικό επίπεδο η οστική ανακατασκευή λαμβάνει χώρα σε μικρές περιοχές της σπογγώδους και φλοιώδους (συμπαγούς) επιφάνειας του οστού, γνωστές ως βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (Bone Multicellular Units, BMU). Η οστική απορρόφηση προηγείται πάντα της οστικής παραγωγής και στο νεανικό σκελετό το ποσό του οστού που απορροφάται είναι σχεδόν ίσο με το ποσό του οστού που σχηματίζεται εκ νέου. Για το λόγο αυτό η οστική ανακατασκευή υπό φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται ισορροπημένη διαδικασία στο χώρο και στο χρόνο. Η οστική ανακατασκευή παρουσιάζει θετικό ισοζύγιο οστικής μάζας μέχρι την τρίτη δεκαετία της ζωής στον άνθρωπο και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα με μικρές διακυμάνσεις μέχρι την ηλικία των 50 ετών. Σε μεγαλύτερες ηλικίες η

οστική απορρόφηση κυριαρχεί και η οστική μάζα αρχίζει να ελαττώνεται. Ο μέσος χρόνος ζωής κάθε ανακατασκευαστικής μονάδας στον άνθρωπο είναι 2 ως 8 μήνες, με το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα να καταλαμβάνεται από τη διαδικασία της οστικής παραγωγής. Έχουν υπολογιστεί 35 εκατομμύρια ανακατασκευαστικές μονάδες στον ανθρώπινο σκελετό, όπου 3 ως 4 εκατομμύρια ενεργοποιούνται κάθε χρόνο, με αποτέλεσμα ολόκληρος ο σκελετός να ανανεώνεται κάθε 10 χρόνια (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006).

ΣΤΑΔΙΑ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ

Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής διενεργείται σε έξι φάσεις: α) τη φάση ηρεμίας, β) τη φάση ενεργοποίησης, γ) τη φάση οστικής απορρόφησης, δ) τη φάση κυτταρικής αναστροφής, ε) τη φάση οστικής παραγωγής και στ) τη φάση επιμετάλλωσης του οστεοειδούς (Εικόνα 9).

A) Φάση ηρεμίας (Quiescent phase): αποτελεί τη φάση όπου η μεταβολική μονάδα του οστού (Bone Multicellular Unit, BMU) είναι ανενεργή και ταυτίζεται με τη μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού (Bone Structural Unit, BSU).

B) Φάση ενεργοποίησης (Activation phase): οι πρόδρομοι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες και διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοκλάστες, οι οποίοι τελικά συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της μεταβολικής μονάδας.

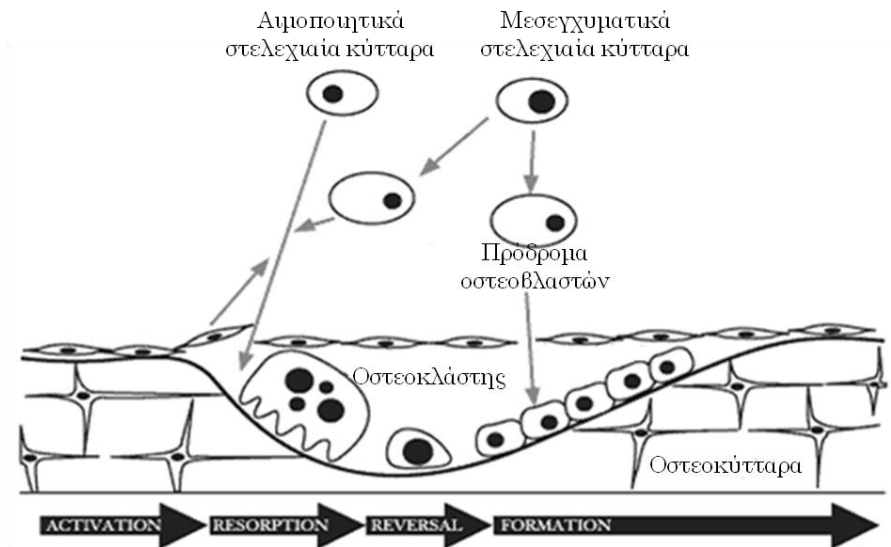
Γ) Φάση οστικής απορρόφησης (Resorption phase): οι επιστρατευμένοι οστεοκλάστες αποικοδομούν προοδευτικά την αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία αδειάζοντας έτσι το περιεχόμενο της μεταβολικής μονάδας. Η απορρόφηση ολοκληρώνεται από τα μακροφάγα του μυελού που απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες της θεμέλιας ουσίας. Στο σπογγώδες οστό η φάση της οστικής απορρόφησης διαρκεί 10 ημέρες ενώ στο φλοιώδες 6-10 εβδομάδες.

Δ) Φάση κυτταρικής αναστροφής (Reversal phase): οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από το πυθμένα της μεταβολικής μονάδας μέσω κάποιου άγνωστου μηχανισμού, και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες.

Ε) Φάση οστικής παραγωγής (Formation phase): οι προ-οστεοβλάστες προσελκύονται χημειοτακτικά από τους αυξητικούς παράγοντες που έχουν απελευθερωθεί στη θεμέλια ουσία και διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν και

εναποθέτουν προοδευτικά οστεοειδές. Το νεοσυντιθέμενο οστό είναι ισόποσο εκείνου που απορροφήθηκε στις προηγούμενες φάσεις. Η φάση οστικής παραγωγής διαρκεί 3 μήνες.

ΣΤ) Φάση επιμετάλλωσης οστεοειδούς (Mineralization phase): η μεταβολική μονάδα του οστού αδρανοποιείται, επιστρώνεται ξανά από επενδυτικά κύτταρα και λειτουργεί σαν μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού. Η φάση της επιμετάλλωσης ξεκινά 30 ημέρες μετά την απόθεση του οστεοειδούς και σταματά την 90η ημέρα για το σπογγώδες οστό και την 130η ημέρα για το φλοιώδες οστό. Ακολουθεί η φάση ηρεμίας και η διαδικασία ολοκληρώνεται.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της οστικής ανακατασκευής (Rauch and Glorieux, 2004).

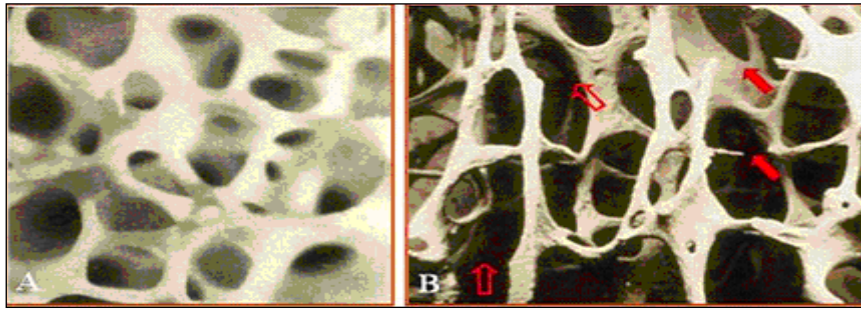
❖ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΓΕΝΙΚΑ

Οι παθήσεις των οστών κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με την αιτιολογία. Μπορούν να διακριθούν σε μηχανικές βλάβες (κάταγμα), μεταβολικές παθήσεις (οστεομαλακία, οστεοπόρωση), γενετικές ανωμαλίες (ατελής οστεογένεση, οστεοπέτρωση), όγκους (οστεοσάρκωμα, οστεοχόνδρωμα) και μολύνσεις (οστεομυελίτιδα, σπονδυλοδισκίτιδα). Υπάρχουν όμως και ασθένειες που μπορεί να οφείλονται σε ένα συνδυασμό αιτιών, όπως για παράδειγμα η νόσος του Paget που οφείλεται σε γενετική ανωμαλία ή σε μόλυνση από ιό.

Η συχνότερη πάθηση των οστών είναι η οστεοπόρωση. Χαρακτηρίζεται, πρώτον, από χαμηλή οστική μάζα και δεύτερον, από διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών (Εικόνα 10) με αποτέλεσμα τη μείωση της αντοχής τους και τον αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Η πιο συχνή μορφή οστεοπόρωσης είναι η μετεμμηνοπαυσιακή. Εμφανίζεται σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και σχετίζεται με τη μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων, που φυσιολογικά παρατηρείται σε αυτή την ηλικία των γυναικών.

Η λεγόμενη οστεοπόρωση των ηλικιωμένων εμφανίζεται σε γυναίκες και άνδρες ηλικίας 70 ετών και πάνω. Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση αναπτύσσεται σε ασθενείς με ορισμένες παθήσεις, όπως είναι π.χ. ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο υπογοναδισμός, ο υπερθυρεοειδισμός και το σύνδρομο δυσαπορρόφησης. Επίσης, δευτεροπαθής οστεοπόρωση μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς που παίρνουν για μακρό χρονικό διάστημα ορισμένα φάρμακα, όπως είναι τα γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόνη), η θυρεοειδική ορμόνη σε δόση μεγαλύτερη από ότι χρειάζεται για την αντιμετώπιση του υποθυρεοειδισμού, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα ή η ηπαρίνη.



Εικόνα 10: Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία. Α. Φυσιολογικό οστό. Β. Οστεοπορωτικό οστό. Σε σύγκριση με το φυσιολογικό οστό πολλές κάθετες και οριζόντιες οστικές δοκίδες είναι λεπτότερες και γι' αυτό η οστική πυκνότητα είναι χαμηλή στην οστεοπόρωση. Επιπλέον, η αρχιτεκτονική των οστικών δοκίδων είναι διαταραγμένη. Αρκετές δοκίδες λείπουν (ανοιχτά βέλη) και άλλες είναι σπασμένες (συμπαγή βέλη) [3].

Δύο είναι οι παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της οστεοπόρωσης: το χαμηλό επίπεδο της *κορυφαίας οστικής μάζας* που αποκτά ένα άτομο στην ηλικία των 25 περίπου ετών και η αυξημένη *οστική απώλεια* που μπορεί να συμβεί μετά την ηλικία των 45-50 ετών.

Η αιτιολογία της ασθένειας περιλαμβάνει ποικίλους παράγοντες, όπως: γενετικούς, γυναικείο φύλο, ηλικία άνω των 50 ετών, εμμηνόπαυση/υστερεκτομή και συνεχής λήψη γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας παίζει το χαμηλό σωματικό βάρος, η φτωχή διατροφή σε ασβέστιο ή βιταμίνη D, η έλλειψη άσκησης, το κάπνισμα και η υπερβολική κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών.

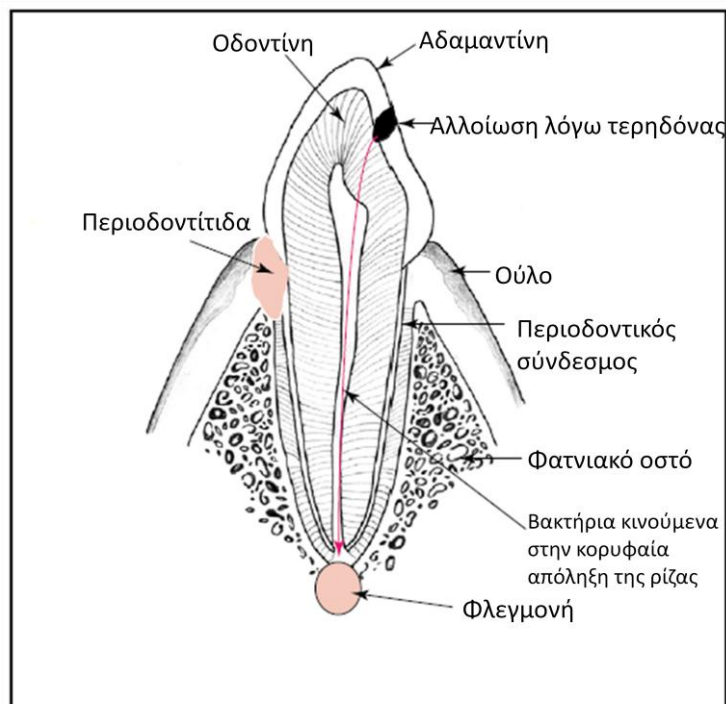
ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Ο σκελετός, το μεγαλύτερο σύστημα οργάνων του σώματος, αποτελεί έναν σημαντικό στόχο βακτηριακών μολύνσεων. Πολλά βακτήρια μπορούν να μολύνουν τα οστά, αλλά υπάρχει ένας μικρός αριθμός μικροοργανισμών που παρουσιάζει αυξημένη προτίμηση για το σκελετό (Πίνακας 1). Μάλιστα, οι πιο κοινές χρόνιες βακτηριακές ασθένειες του ανθρώπου είναι αυτές που αφορούν το σκελετό. Αποτέλεσμα τέτοιων μολύνσεων είναι η απώλεια οστού (οστεόλυση).

Πίνακας 1: Βακτηριακές ασθένειες που προσβάλλουν το σκελετό (Henderson and Nair, 2003).

<u>Ασθένεια</u>	<u>Υπεύθυνος οργανισμός</u>
Τερηδόνα	<i>Streptococcus mutans, Lactobacillus casei, Actinomyces spp</i>
Περιοδοντίτιδα	Ποικίλα στοματικά Gram αρνητικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των <i>Actinobacillus ctinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia</i>
Οστεομυελίτιδα	Κυρίως <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>S. epidermidis</i> . Μικρότερη συχνότητα τα <i>Mycobacterium tuberculosis</i> και <i>Salmonella spp</i>
Σηπτική (βακτηριακή) αρθρίτιδα	Κυρίως <i>S. aureus</i> και <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Νόσος του Lyme (μπορρελίωση)	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Νόσος του Pott	<i>M. tuberculosis</i>
Συφιλιδική οστεΐτιδα	<i>Treponema pallidum</i>
Λέπρα	<i>M. leprae</i>
Μόλυνση ορθοπεδικών εμφυτευμάτων	Κυρίως σταφυλόκοκκοι
Ατροφική ρινίτιδα	<i>Pasteurella multocida</i>

Ένα παράδειγμα αποτελεί η τερηδόνα, μια από τις πιο κοινές ασθένειες παγκοσμίως (US Public Health Service, 2000) που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πολυμικροβιακή μόλυνση του οδοντικού πολφού και γένεση περιοδοντικής μόλυνσης με επακόλουθη καταστροφή του φατνιακού οστού. Μια σχετική ασθένεια, η περιοδοντίτιδα, προκαλείται από κάποιους μικροοργανισμούς της στοματικής κοιλότητας οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή του φατνιακού οστού της γνάθου και του περιοδοντικού συνδέσμου, που ενώνει τα δόντια με το φατνιακό οστό (Εικόνα 11). Ο αξονικός σκελετός (κρανίο, σπόνδυλοι, πλευρά) και ο περιφερικός σκελετός (ώμοι, πύελος, άνω και κάτω άκρα) αποτελούν στόχους μόλυνσης διαφόρων βακτηρίων, ιδιαιτέρως των σταφυλοκόκκων, οι οποίοι αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την οστεΐτιδα, την οστεομυελίτιδα και τις ασθένειες των αρθρώσεων (Schierholz and Beuth, 2001).



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα ενός δοντιού και των περιβαλλόμενων περιοδοντικών ιστών. Οι αλλοιώσεις λόγω της τερηδόνας επιτρέπουν την είσοδο των βακτηρίων, τα οποία εισβάλλουν διαμέσου του οστού και του οδοντικού πολφού και φτάνουν ως την κορυφαία απόληξη της ρίζας. Στην περιοχή αυτή μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή και καταστροφή του περιβαλλόμενου οστού. Το άλλο σημείο που μπορεί να αποτελεί στόχο μόλυνσης είναι ανάμεσα στο ούλο και το δόντι. Προκαλείται από την υπερβολική ανάπτυξη των βακτηρίων και την απώλεια της σύνδεσης του ούλου με το δόντι. Στην περιοχή αυτή τα βακτήρια προκαλούν απορρόφηση του φατνιακού οστού, χωρίς ωστόσο να βρίσκονται σε επαφή με το οστό. Αυτή η ασθένεια είναι γνωστή ως περιοδοντίτιδα (Henderson and Nair, 2003).

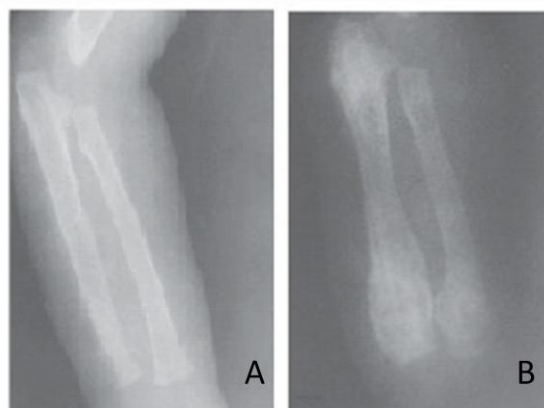
Ένα κυρίαρχο πρόβλημα αποτελούν επίσης οι μολύνσεις των σκελετικών εμφυτευμάτων, όπως για παράδειγμα η τεχνητή γοφική άρθρωση. Ο αριθμός των αρθρικών αποκαταστάσεων που πραγματοποιούνται ετησίως είναι τεράστιος. Οι μολύνσεις των οστών είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά (Ciampolini and Harding, 2000) και το πρόβλημα επιδεινώνεται με την ολοένα και αυξανόμενη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των οργανισμών που μολύνουν το σκελετό. Άλλα βακτήρια που σχετίζονται με ανθρώπινες σκελετικές μολύνσεις είναι το *Mycobacterium tuberculosis*, *M. Leprae* και το *Treponema pallidum*. Εκτός από τους ανθρώπους, τα ζώα επίσης υποφέρουν από σκελετικές μολύνσεις. Ένα παράδειγμα που ενέχει οικονομικό ενδιαφέρον αποτελεί η ατροφική ρινίτιδα που αφορά τα κατοικίδια ζώα, όπως τους χοίρους και είναι αποτέλεσμα της μόλυνσης από την *Pasteurella multocida* (Hunt et al., 2000).

Μια από τις πιο συχνές μολύνσεις των οστών είναι η οστεομυελίτιδα (Εικόνα 12). Είναι η φλεγμονώδης κατάσταση των οστών η οποία προσβάλλει το μυελό των οστών, τα φλοιώδη πέταλα, το περίοστεο και τα αγγεία των οστών. Οφείλεται κυρίως στον *S. aureus*. Η φλεγμονή αναπτύσσεται μέσα στο μυελό των οστών, επεκτείνεται στη σπογγώδη ουσία και στη συνέχεια με τα αγγεία προσβάλλει και το περίοστεο. Κατά την επέκταση της φλεγμονής το οστό αντιδραστικά παχιάνει και συμπυκνώνεται στην περιφέρεια, με σκοπό την περιχαράκωση της βλάβης, η οποία νεκρώνει το τμήμα του οστού που έχει προσβάλλει. Το νεκρωμένο αυτό μέρος του οστού ονομάζεται απόλυμα, επειδή σπάνια απορροφάται ενώ εάν δεν αφαιρεθεί χειρουργικά, σχηματίζει συχνά συρίγγια.

Η οστεομυελίτιδα χαρακτηρίζεται ανάλογα με το είδος και την έκταση της φλεγμονής σε οξεία, υποξεία και χρόνια. Συχνές επιπλοκές της οστεομυελίτιδας είναι τα παθολογικά κατάγματα, οι παραμορφώσεις των οστών ενώ σε νεαρά άτομα η ανάπτυξη των οστών είναι ανώμαλη.

Η οστεομυελίτιδα μπορεί να συμβεί:

- ✓ Μετά από τραυματισμό (ανοικτό κάταγμα και επιμόλυνση από μικρόβια του περιβάλλοντος).
- ✓ Μετά από έμπαρση ξένου σώματος (πχ μολυσμένο καρφί).
- ✓ Μετά από ορθοπαιδικό χειρουργείο (επιμόλυνση συνήθως από σταφυλόκοκκο που επικάθεται στα μεταλλικά υλικά).
- ✓ Μετά από λοίμωξη σε άλλο σημείο του οργανισμού (πχ ουρολοίμωξη, πνευμονία, οδοντικό απόστημα) και διασπορά στο οστό μέσω του αίματος.
- ✓ Σε διαβητικά έλκη (επιμόλυνση σε συνδυασμό με την μειωμένη άμυνα του οργανισμού).
- ✓ Σε βρέφη και παιδιά όπου πιο συχνά πρόκειται για διασπορά μέσω του αίματος.



Εικόνα 12: Ακτινογραφία φυσιολογικού οστού (A) και οστού με οστεομυελίτιδα (B). Στην περίπτωση της οστεομυελίτιδας, είναι εμφανής η απώλεια οστού (οστεόλυση).

Η οξεία οστεομυελίτιδα είναι η πιο συχνή μικροβιακή φλεγμονή του οστού, που οδηγεί στο σχηματισμό πύου και νεκρωμάτων. Προσβάλλει συνήθως τους άντρες (αναλογία 3:1) μέχρι την ηλικία των 20 ετών και σπανιότερα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται στις ηλικίες 18-24 μηνών. Στο 70% των περιπτώσεων η πάθηση εντοπίζεται στο μηριαίο οστό ή στην κνήμη, ενώ σπανιότερα εντοπίζεται σε άλλα οστά.

Pseudomonas και μολύνσεις οστού

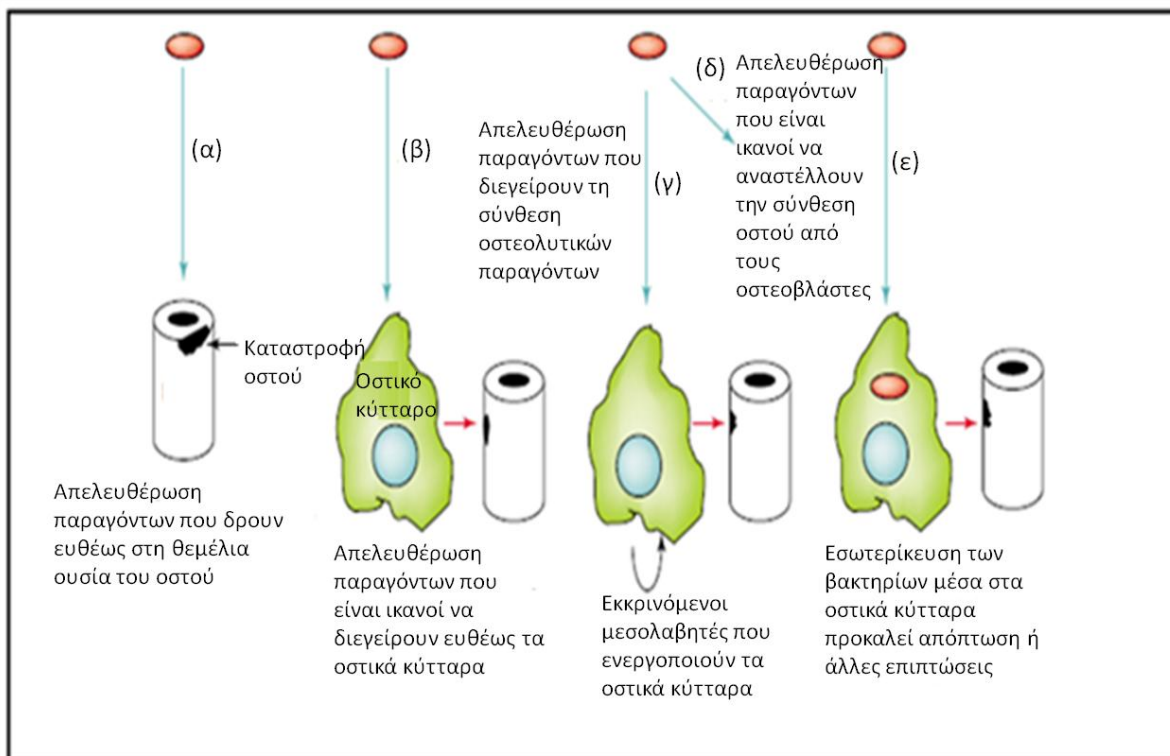
Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι και είδη του γένους *Pseudomonas* εμπλέκονται σε ασθένειες των οστών και των αρθρώσεων. Έχουν απομονωθεί βακτήρια αυτού του γένους σε περιπτώσεις ασθενειών όπως η οστεοχονδρίτιδα (Jacobs et al., 1982), η οστεομυελίτιδα (Sabir et al., 2007), η λοιμώδης αρθρίτιδα (Kaw et al., 2004), η σπονδυλοδισκίτιδα (Chi et al., 2005; Falagas et al., 2006) στις οποίες συχνά παρατηρείται αλλοίωση των σκληρών ιστών.

Με τα παραπάνω, γίνεται κατανοητή η σημαντικότητα των σκελετικών μολύνσεων και φυσικά είναι επιτακτική η εύρεση τρόπων αντιμετώπισής τους. Η εύρεση θεραπείας όμως προϋποθέτει τη γνώση των μηχανισμών με τους οποίους οι μικροοργανισμοί μολύνουν τα οστά. Έτσι, σημαντικό κομμάτι της έρευνας για τις σκελετικές μολύνσεις αφορά τη διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών μόλυνσης.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΜΟΛΥΝΣΗ ΟΣΤΟΥ

Έχει προταθεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον 5 μηχανισμοί και τα βακτήρια μπορεί να χρησιμοποιούν έναν από αυτούς ή και όλους για την πρόκληση σκελετικής βλάβης (Εικόνα 13). Η ικανότητα χρησιμοποίησης διαφορετικών μηχανισμών εξαρτάται από τη φύση της μόλυνσης και από το πόσο στενή είναι η επαφή μεταξύ του οστού και του μολυσματικού βακτηρίου. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την ευθεία καταστροφή της ανόργανης θεμέλιας ουσίας του οστού από τα βακτήρια, που συμβαίνει στην περίπτωση της τερηδόνας. Το παραγόμενο οξύ από τα βακτήρια που προσκολλώνται στα δόντια, όπως ο *Streptococcus mutans*, διαλυτοποιεί την ασβεστοποιημένη θεμέλια ουσία της αδαμαντίνης και της οδοντίνης. Ο δεύτερος και τρίτος πιθανός μηχανισμός είναι η άμεση και έμμεση ενεργοποίηση της οστεοκλαστικής απορρόφησης του οστού από τα βακτήρια ή τα συστατικά τους. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της άμεσης ενεργοποίησης των οστεοβλαστών ή των οστεοκλαστών από παράγοντες των βακτηρίων που εκφράζονται στην επιφάνειά τους ή που εξάγονται από αυτά. Εναλλακτικά, αυτοί οι παράγοντες μπορεί να

ενεργοποιούν την παραγωγή κυτοκινών υπεύθυνων για οστεόλυση, ή μπορεί να είναι ανοσογόνοι και να ενεργοποιούν τα ευαισθητοποιημένα CD4 λεμφοκύτταρα να εκφράσουν και να εκκρίνουν τον RANKL. Ο τέταρτος υποτιθέμενος μηχανισμός είναι η άμεση ή έμμεση αναστολή του σχηματισμού του οστού από τους οστεοβλάστες. Ο πέμπτος και τελευταίος μηχανισμός βασίζεται στην ανακάλυψη ότι αρκετά βακτήρια που εμπλέκονται στην καταστροφή του οστού εισβάλλουν στους οστεοβλάστες, με αποτέλεσμα την αλλαγή της κυτταρικής λειτουργίας, την απόπτωση των οστικών κυττάρων και τη δυσλειτουργία της κανονικής οστικής ανακατασκευής.



Εικόνα 13: Προτεινόμενοι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή του οστού. (α) Η θεμέλια ουσία του οστού καταστρέφεται ευθέως από παράγοντες που απελευθερώνονται από τα βακτήρια. Πιθανώς το μόνο παράδειγμα αυτού του μηχανισμού είναι η τερηδόνα, στην οποία τα βακτήρια προσκολλώνται στα δόντια και προκαλούν καταστροφή τους μέσω της απελευθέρωσης οξέως. (β) Βακτηριακοί παράγοντες επιδρούν άμεσα με τα οστικά κύτταρα προκαλώντας διέγερση των κυττάρων αυτών και οστική απορρόφηση. (γ) Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να προκαλούν την απελευθέρωση ενεργοποιητικών διαμεσολαβητών από τα οστικά κύτταρα (δ) Τα βακτήρια μπορούν επίσης να αναστείλουν τον οστικό σχηματισμό. Αυτό μπορεί να συμβεί ευθέως από τα βακτήρια ή τα παράγωγά τους ή από την ενεργοποίηση των κυττάρων ξενιστών και την απελευθέρωση ανασταλτικών παραγόντων. (ε) Εισβολή των βακτηρίων στα οστικά κύτταρα. Αυτό έχει δείχθει ότι συμβαίνει στους οστεοβλάστες. Τα κύτταρα μπορεί να εισέλθουν σε μονοπάτι απόπτωσης με τις επακόλουθες επιπτώσεις στη διαδικασία ανακατασκευής του οστού (Henderson and Nair, 2003).

ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ Ή ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ

Αρχικές προσπάθειες για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα βακτήρια μπορούν να οδηγήσουν στην οστική απορρόφηση επικεντρώνονται σε γνωστούς μολυσματικούς παράγοντες, συγκεκριμένα λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πεπτιδογλυκάνες. Έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός βακτηριακών συστατικών που είναι ικανά για επαγωγή οστικής απορρόφησης (Πίνακας 2). Τέτοια συστατικά αφορούν μια ποικιλία μορίων όπως: LPS (λιποπολυσακχαρίτες), λιποπεπτίδια, μοριακές νταντάδες, πορίνες, CpG ολιγονουκλεοτίδια και η τοξίνη του *Pasteurella multocida* (PMT). Ένας από τους πιο ικανούς παράγοντες του ξενιστή για την επαγωγή οστικής απορρόφησης *in vitro* είναι η κυτοκίνη, ιντερλευκίνη 1 (IL-1), που είναι δραστική σε συγκεντρώσεις picomolar. Κάποιοι βακτηριακοί οστεολυτικοί αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένου του λιποπεπτιδίου μοριακού μεγέθους 2 kDa από το *Mycoplasma fermentans* (MALP-2, macrophage activating lipopeptide) (Piec et al., 1999), των LPS του *E. coli* (Reddi et al., 1995) και της PMT (*Pasteurella multocida* toxin) (Felix et al., 1992) έχουν παρόμοιες δραστικότητες και έχουν μελετηθεί οι μηχανισμοί που περιλαμβάνουν αυτούς τους παράγοντες.

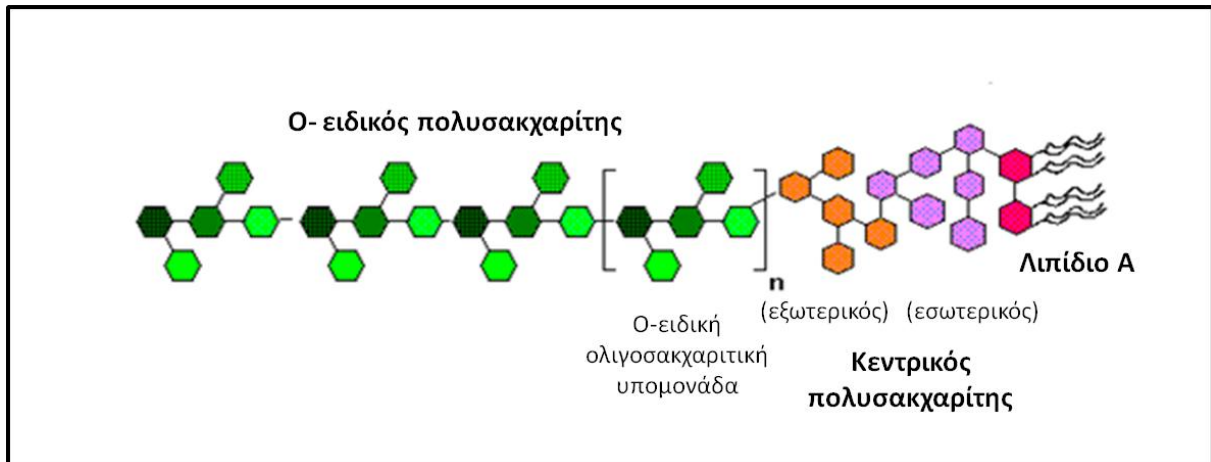
Πίνακας 2: Βακτηριακά μόρια με οστεολυτική δράση

Οστεολυτικό μόριο	Ασθένεια
Lipopolysaccharide (LPS)	periodontitis , bacterial arthritis , periapical infections , osteitis , osteomyelitis
Lipooligosaccharide	periodontitis
Peptidoglycan/teichoic acid	bacterial arthritis , osteitis , osteomyelitis
Lipopeptide	bacterial arthritis
Capsular polysaccharide	periodontitis
Lipid A-associated proteins	periodontitis
Bacterial and human molecular chaperones	arthritis , periodontitis
Chaperonin 10	Pott's disease
OmpA (porins)	bacterial arthritis , periodontitis
<i>Pasteurella multocida</i> toxin (PMT)	atrophic rhinitis
Fimbrial protein	periodontitis
Mycobacterial CpG DNA	arthritis
Bacterial cell cycle-modulating toxins	periodontitis
Unidentified exported proteins	arthritis , osteitis , osteomyelitis , periapical infections , periodontitis

LPS - γενικά

Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) είναι μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων και συγκεκριμένα αποτελούν το εξωκυττάριο στοιχείο του κυτταρικού περιβλήματος. Οι LPS της *P. aeruginosa* περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1937 και αναλύθηκαν το 1958. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες για τους

λιποπολυσακχαρίτες των Gram αρνητικών βακτηρίων (Goldberg and Pier, 1996). Γενικά, οι LPS αποτελούνται από ένα κεντρικό πολυσακχαρίτη (core polysaccharide) που συνδέεται με ένα σύμπλοκο λιπίδιο (λιπίδιο A) και ειδικές πλευρικές αλυσίδες από επαναλαμβανόμενες μονάδες ολιγοσακχαριτών που καθορίζουν την ορολογική ειδικότητα του στελέχους. Τα 3 τμήματα αυτά των LPS συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Σχηματική δομή του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) Gram αρνητικών βακτηρίων. Φαίνονται οι δομές του λιπιδίου A, του κεντρικού πολυσακχαρίτη και οι O-πλευρικές αλυσίδες.

Ο κεντρικός πολυσακχαρίτης αποτελείται από τμήμα εξοζών, τμήμα επτοζών και το 2-κέτο-3-δεόξυ-οκτανικό οξύ (KDO). Οι μακριές πλευρικές αλυσίδες αποτελούνται από διάφορα σάκχαρα με διαφορετική κάθε φορά διάταξη. Οι πλευρικές αλυσίδες αποτελούν τον O-ειδικό πολυσακχαρίτη (σωματικό αντιγόνο O) και ονομάζονται O-ειδικές πλευρικές αλυσίδες. Τα στελέχη που φέρουν πλευρικές αλυσίδες εμφανίζουν αποικίες S (Smooth), ενώ τα στελέχη που έχουν χάσει τις πλευρικές αλυσίδες και φέρουν μόνο το κεντρικό πολυσακχαρίτη σχηματίζουν αποικίες R (Rough).

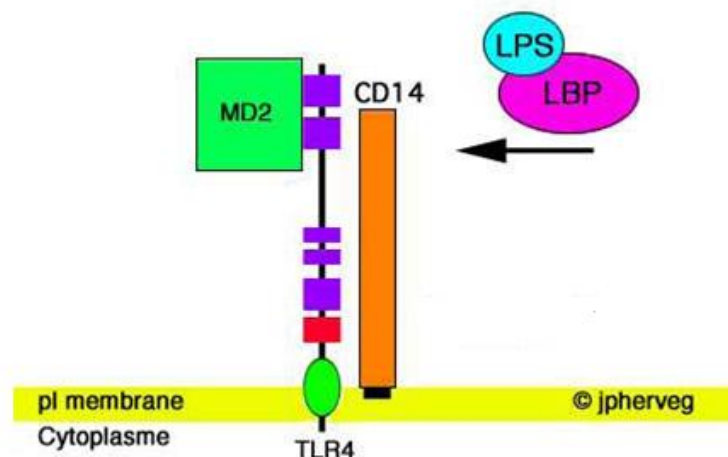
Το λιπίδιο A είναι το υδρόφοβο τμήμα του LPS και βρίσκεται μέσα στην εξωτερική μεμβράνη. Ο σκελετός του αποτελείται από 2 μόρια γλυκοζαμίνης συνδεδεμένα μεταξύ τους με β -1,6 γλυκοσιδικό δεσμό (Gmeimer et al., 1969). Δύο υδροξυλομάδες του δισακχαρίτη είναι εστερικά συνδεδεμένες με φωσφορικές ομάδες στις θέσεις 1, 4. Οι άλλες υδροξυλομάδες του δισακχαρίτη και οι αμινομάδες ενώνονται με 5-6 μακριές αλυσίδες 2 ή 3 υδρόξυ λιπαρών οξέων, μοναδικών στους LPS των Gram (-) βακτηρίων (Darveau and

Hancock, 1983). Ο τύπος και η θέση των λιπαρών οξέων ποικίλει μεταξύ των βακτηριακών ειδών (Hitchcock et al., 1986).

Οι LPS είναι το κύριο επιφανειακό αντιγόνο των Gram αρνητικών βακτηρίων (Rietschel et al., 1987). Αναστέλλουν τη δράση του συμπληρώματος, ασκούν μιτογόνο δράση στα Β-λεμφοκύτταρα, ενώ δεν φαίνεται να επιδρούν στα Τ-λεμφοκύτταρα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι δρουν στο σύστημα των Μονοκυρήνων-Μακροφάγων και προκαλούν την ενεργοποίηση τους καθώς και την παραγωγή πολλών χημειοτακτικών παραγόντων και/ή κυτταροκινών.

Έχει αναφερθεί ότι ο CD14 (Cluster of Differentiation 14- μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών-δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας) έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να δεσμεύεται στους LPS Gram αρνητικών βακτηρίων (Tobias et al., 1991; Gallay et al., 1993). Η αναγνώριση και δέσμευση του LPS στον CD14 έχει βρεθεί ότι επιτελείται από την LBP (LPS Binding Protein) (Pugin et al., 1994). Μάλιστα, φαίνεται ότι ο LPS η LBP και το CD14 σχηματίζουν τριμερές σύμπλοκο (Thomas et al., 2002) (Εικόνα 15).

Είναι γνωστό ότι το μόριο του CD14 δεν έχει ενδοκυττάριο τμήμα και ενώ είναι προφανής ο ρόλος του στην αναγνώριση των LPS (Dodronolskaia et al., 2002; Landmann et al., 2000), παρέμενε άγνωστος ο τρόπος συμμετοχής του στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος ενεργοποίησης. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα δόθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όπου και μελετήθηκαν εκτενώς οι Toll-υποδοχείς σε ανθρώπινα κύτταρα και χαρακτηρίστηκαν ως υποδοχείς που μεταβιβάζουν το σήμα ενδοκυτταρίως. Οι Toll υποδοχείς μαζί με άλλους υποδοχείς συμμετέχουν στην αναγνώριση μικροβιακών παραγόντων, όπως επίσης συνεργάζονται μεταξύ τους για τη μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης (Miyake et al., 2003).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση μοντέλου αναγνώρισης του LPS από τους υποδοχείς επιφανείας των μακροφάγων. Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών LBP με τον LPS και MD2 με τον TLR4 (Beutler, 2003).

Ο TLR4 θεωρείται ο κατεξοχήν υποδοχέας για τους LPS Gram αρνητικών βακτηρίων χωρίς να αποκλείεται ο ρόλος του στην αναγνώριση και άλλων μικροβιακών δομών αφού έχει διαπιστωθεί ότι αναγνωρίζει λιποτεichoϊκά οξέα Gram θετικών μικροβίων. Το μοντέλο του TLR4 με τον LPS είναι το πιο καλά μελετημένο μέχρι σήμερα (Εικόνα 15). Η συμμετοχή του TLR4 στην αναγνώριση του LPS αποδείχθηκε με διάφορες *in vivo* αλλά και *in vitro* πειραματικές προσεγγίσεις σε κύτταρα ανθρώπου και ποντικού. Διάφορες κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ελλειμματική ανταπόκριση σε LPS απέδειξαν ότι οφείλονταν σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του TLR4.

Για τον TLR4 έχει περιγραφεί ένα μοντέλο αναγνώρισης του LPS, στο οποίο ο TLR4 δεν φαίνεται να δρα από μόνος του. Συγκεκριμένα, ο LPS συνδέεται με μια πρωτεΐνη του ορού την LPS Binding Protein (LBP) και το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζεται από τον CD14 (Wright et al., 1989). Επειδή όμως ο CD14 στερείται ενδοκυττάριου τμήματος και αδυνατεί να μεταφέρει την πληροφορία του σήματος ενεργοποίησης μέσα στο κύτταρο, το κενό αυτό συμπληρώνει ουσιαστικά ο TLR4. Αναπόσπαστο κομμάτι αυτού του μοντέλου αναγνώρισης του LPS από τους CD14 και TLR4, είναι μία μικρή πρωτεΐνη, η MD-2, η οποία δεσμεύεται πάνω στον TLR4.

LPS - οστεολυτική δράση

Οι LPS αποτελούν αποδεδειγμένα οστεολυτικούς παράγοντες και επαγωγείς του σχηματισμού οστεοκλαστών (Nair et al., 1996; Henderson et al., 2003). Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα του μυελού των οστών ποντικού, δείχθηκε ότι οι LPS αλληλεπιδρούν με τα πρόδρομα των οστεοκλαστών και επάγουν τον TNF- α , ο οποίος δρα μέσω του 55 kDa TNF υποδοχέα και διεγείρει τον σχηματισμό των οστεοκλαστών (Abu-Amer et al., 1997). Αντίθετα, οι Suda et al., 2002 ανέφεραν ότι οι LPS επάγουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών ευθέως, χωρίς την απαίτηση ενδιάμεσων φλεγμονωδών, όπως η IL-1, ο TNF- α ή ο RANKL. Οι LPS, IL-1, RANKL χρησιμοποιούν τους αντίστοιχους επιφανειακούς υποδοχείς για σηματοδότηση, μέσω της κυτοπλασματικής προσαρμοστικής πρωτεΐνης, γνωστή ως TNFR-associated factor 6 (TRAF6), για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- κ B και ο AP-1, χρησιμοποιώντας MAP κινάσες.

Οι Zhuang et al. (2007), έδειξαν με *in vitro* πειράματα ότι οι LPS της *Pseudomonas aeruginosa* δεν μπορούν να διεγείρουν την οστεοκλαστογένεση σε προ-οστεοκλάστες (bone marrow monocytes), χωρίς κανένα άλλο ερέθισμα. Μόνο σε συν-καλλιέργειες

οστεοβλαστών με προ-οστεοκλάστες έγινε επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης και μάλιστα χρειάζονταν λειτουργικοί TLR4 υποδοχείς και στους οστεοβλάστες και στους προ-οστεοκλάστες. Σε *in vivo* πείραμα είδαν ότι οι LPS της *Pseudomonas aeruginosa* επάγουν ισχυρή οστεόλυση σε φυσιολογικά ποντίκια, αλλά όχι σε ποντίκια που τους λείπουν λειτουργικοί TLR4 υποδοχείς. Έτσι συμπέραναν ότι οι λιποπολυσακχαρίτες δρουν έμμεσα στους προ-οστεοκλάστες, μέσω των οστεοβλαστών και επάγουν οστεοκλαστογένεση και άρα οστική απορρόφηση. Σε συνέχεια αυτής της μελέτης, οι Nason et al. (2009a) έδειξαν ότι οι LPS της *Pseudomonas aeruginosa* μπορούν να διεγείρουν ευθέως τον σχηματισμό οστεοκλαστών από προ-οστεοκλάστες, μόνο όταν είχε προηγηθεί ένα έναυσμα με υπο-οστεοκλαστογόνες δόσεις RANKL "RANKL priming". Έδειξαν επίσης ότι κατά τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών υπάρχει υπερέκφραση κάποιων κυτοκινών (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, G-CSF, leptin) που φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης. Έτσι συμπέραναν ότι οι LPS μπορούν αυτόνομα να οδηγήσουν σε οστεοκλαστογένεση, με την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών που δρουν με αυτοκρινικό/παρακρινικό τρόπο και προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Η πιο πρόσφατη μελέτη των Nason et al., (2009b) δείχνει ότι για βέλτιστη οστεοκλαστογένεση απαιτούνται λειτουργικοί TLR4 αλλά και TLR2 υποδοχείς, όπως επίσης και MyD88 (myeloid differentiation factor 88).

Υπάρχουν και άλλες ενδείξεις ότι οι LPS ρυθμίζουν την δραστικότητα των οστεοβλαστών. Για παράδειγμα, οι LPS από το οδοντικό παθογόνο *P. gingivalis* μπορούν να αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων των οστεοβλαστών σε ώριμους οστεοβλάστες (Kadono et al., 1999). Όπως αναφέρθηκε, οι LPS ενεργοποιούν τα κύτταρα με την πρόσδεσή τους στον CD14. Διαδοχικά, ο CD14 αλληλεπιδρά με τον TLR4 για την εκκίνηση ενδοκυτταρικής σηματοδότησης με τη χρήση του TRAF6, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Έχει δειχθεί ότι οι LPS μπορούν να επάγουν την σύνθεση του RANKL σε καλλιεργούμενους οστεοβλάστες ποντικού. Η σύνθεση αυτή παρεμποδίζεται από αντισώματα του TLR4 και δεν συμβαίνει στους οστεοβλάστες που τους λείπει λειτουργικός TLR4 υποδοχέας (Kikuchi et al., 2001).

PMT

Η ατροφική ρινίτιδα είναι μια μη-θανατογόνος, αλλά οικονομικά σημαντική ασθένεια των χοίρων που προκαλείται από το *Pasteurella multocida*, στην οποία η ανάπτυξη του χόνδρου της ρινικής κοιλότητας είναι μειωμένη. Τα συμπτώματα της ασθένειας μπορούν να

αναπαραχθούν από την PMT, μια 146 kDa μιτογόνο τοξίνη (Lax and Grigoriadis, 2001). Η τοξίνη είναι ισχυρός ενεργοποιητής της οστικής απορρόφησης *in vitro* (Felix et al., 1992) και είναι ισχυρό μιτογόνο για τους αρχέγονους οστεοβλάστες, αλλά αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοβλάστες που είναι ικανοί για σχηματισμό οστού (Mullan and Lax, 1996). Η PMT δεν έχει άμεση επίδραση στους οστεοκλάστες και η δράση της αφορά την ενεργοποίηση των οστεοβλαστών να απελευθερώνουν παράγοντες που ενεργοποιούν τους οστεοκλάστες (Mullan and Lax, 1998).

ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Άλλοι επιφανειακοί παράγοντες ή εκκρινόμενα βακτηριακά συστατικά έχει αναφερθεί ότι διεγείρουν την οστική απορρόφηση και επάγουν τον σχηματισμό οστεοκλαστών, συμπεριλαμβανομένων της chaperonin 60 των Gram αρνητικών βακτηρίων (Kirby et al., 1995), μεμβρανικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) (Meghji et al., 1997) και μη καθορισμένων πρωτεϊνών του *S. aureus* και του *S. epidermidis* (Nair et al., 2000).

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΕΙΣΒΟΛΗ ΣΤΑ ΟΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Μια άλλη εκδοχή στην προσέγγιση των μηχανισμών οστικής μόλυνσης αποτελεί η εσωτερίκευση των βακτηρίων από τα οστικά κύτταρα, η επακόλουθη διαταραχή της λειτουργίας τους και τελικά η είσοδός τους σε αποπτωτικό μονοπάτι. Η πρώτη περίπτωση εσωτερίκευσης των βακτηρίων από τους οστεοβλάστες, περιγράφηκε από τους Hudson et al. (1995). Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι αρκετά βακτήρια που προκαλούν οστεομυελίτιδα ή/και οστεΐτιδα εσωτερικεύονται από τα οστικά κύτταρα. Παραδείγματα τέτοιων βακτηρίων αποτελούν ο *S. aureus* (Hudson et al., 1995), ο *S. epidermidis*, η *Salmonella enterica* (Alexander et al., 2001) και το *Mycobacterium bovis* (Hotokezaka et al., 1998). Μπορεί να υποθεθεί ότι η εσωτερίκευση αυτή προσφέρει στα βακτήρια προστασία από το ανοσοβιολογικό σύστημα του ξενιστή και την αντιβιοτική θεραπεία. Η εσωτερίκευση του *S. aureus* από τα οστικά κύτταρα έχει παρακινήσει περισσότερο το ενδιαφέρον και έχει δείχθει ότι η διαδικασία αυτή διαμεσολαβείται από υποδοχείς. Ο *S. aureus* εκφράζει πρωτεΐνες (fibronectin-binding FnBPA και FnBPB), που προσδέονται στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή $\alpha 5\beta 1$ μέσω μιας γέφυρας φμπρονεκτίνης (Ahmed et al., 2001). Η πρόσδεση του *S. aureus* στην επιφάνεια των οστικών κυττάρων και η επακόλουθη εσωτερίκευση προκαλεί την επαγωγή του TRAIL, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την

ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και τέλος την απόπτωση (Alexander et al., 2003). Η επαγωγή της απόπτωσης στα οστικά κύτταρα λόγω της εσωτερίκευσης του *St. aureus* μπορεί να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, την οστική απώλεια που παρατηρείται στις μολύνσεις του οστού απ' αυτόν τον μικροοργανισμό. Πιθανότατα όμως δεν συμβαίνει μόνο αυτό, αφού τα μολυσμένα, με *S. aureus*, οστικά κύτταρα δεν εκκρίνουν μόνο οστεολυτικές κυτοκίνες (Bost et al., 1999), αλλά εκκρίνουν και TRAIL ο οποίος μπορεί να αυξήσει την οστεοκλαστογένεση λόγω της πρόσδεσής του με την OPG (Alexander et al., 2003). Έτσι, η καταστροφή του οστού που προκαλείται από τον *S. aureus* μπορεί να προέρχεται από ένα συνδυασμό μειωμένου οστικού σχηματισμού, λόγω της απόπτωσης των οστεοβλαστών, και αυξημένης οστικής απορρόφησης λόγω του αυξημένου σχηματισμού οστεοκλαστών.

ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενη μελέτη δείξαμε ότι ένα βακτήριο του γένους *Pseudomonas* που απομονώθηκε από ένα διάλυμα που προσομοιάζει τα υγρά του σώματος διαλυτοποιεί ανθρακικό ασβέστιο, προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αναστολή σχηματισμού υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια δοκιμίων βιοϋάλου και προκαλεί 50% μείωση του βάρους των δοκιμίων συγκριτικά με τον μάρτυρα (Paradourouli et al., 2009). Ο υδροξυαπατίτης είναι το κύριο ανόργανο συστατικό των οστών και αποδιατάσσεται στην παρουσία του βακτηρίου αυτού, αφού παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της μάζας του δοκιμίου συγκριτικά με το μάρτυρα. Συνεπώς ενδέχεται το βακτήριο αυτό να εμπλέκεται σε μολύνσεις σκληρών ιστών. Η διερεύνηση της υπόθεσης αυτής αποτελεί το στόχο της παρούσας μελέτης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

❖ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Το βακτήριο που απομονώθηκε από το SBF (Kokubo et al., 1990) μετά από 10 διαδοχικές αραιώσεις, καλλιεργήθηκε στο θρεπτικό μέσο Brain Heart Infusion.

Brain Heart Infusion Broth

Yeast extracts	5 g
Meat extracts	12,5 g
Peptone	10 g
Sodium chloride	5 g
Disodium hydrogen phosphate	2,5 g
Dextrose	2 g

Τελικό pH=7,4 +/- 0,2

Εναιωρούνται 37g του θρεπτικού σε 1 L ddH₂O και θερμαίνονται, ούτως ώστε να διαλυθούν τα συστατικά. Έπειτα αποστειρώνονται στους 121°C για 20 λεπτά. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού Brain Heart Infusion Agar, προστίθεται στα συστατικά του Brain Heart Infusion Broth 15 g/L Agar.

❖ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Με βάση τα μορφολογικά, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου μετά από μια σειρά ελέγχων (Παπαδοπούλου 2008), το βακτήριο ταυτοποιήθηκε ως *Pseudomonas* – στέλεχος A1. Για να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση και σε επίπεδο είδους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του 16S rRNA (Bottger, 1989; Garrity and Holt, 2001).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Αρχικά, έγινε απομόνωση του ολικού DNA από το βακτήριο.

- ✓ Φυγοκέντρηση 20 ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου (προς το τέλος της αυξητικής φάσης) (3.500 rpm για 5 λεπτά).
- ✓ Επανεώρηση σε 1 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH:8).
- ✓ Προσθήκη 10 mg λυσοζύμης και απαλή ανακίνηση.
- ✓ Επώαση στους 37°C για 5 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη 240 μl 0,5 M EDTA (pH:8) και 26 μl πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml σε ddH₂O).
- ✓ Ανάδευση.
- ✓ Επώαση στους 37°C για 5 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη 140 μl 10% SDS και ανάδευση.
- ✓ Επώαση στους 37°C για 2 ώρες.
- ✓ Προσθήκη 2,8 ml αιθανόλης.
- ✓ Συλλογή του DNA με μια λυγισμένη πιπέττα Pasteur.
- ✓ Επανεώρηση σε 500 μl TE και επώαση στους 65°C για 10 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη 500 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο (ισοσταθμισμένο με TE).
- ✓ Αφαίρεση 400 μl από την υδατική φάση και προσθήκη 144 μl 7,5 M ammonium acetate και 1 ml αιθανόλης.
- ✓ Ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 5 λεπτά.
- ✓ Πλύση του ιζήματος με 70% αιθανόλη.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 5 λεπτά και στέγνωμα.
- ✓ Επανεώρηση σε 500 μl TE που περιέχει 100 μg/ml RNase A.
- ✓ Έλεγχος του τελικού προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα πολυνουκλεοτίδια διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδίων βασίζεται στο αρνητικό τους φορτίο (όξινος χαρακτήρας λόγω φωσφορικών ομάδων), το οποίο τα κατευθύνει προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κινητικότητα του κάθε τμήματος DNA είναι συνάρτηση του λογαρίθμου του μεγέθους του. Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που τελικά θα προκύψει επιτρέπει την εκτίμηση του μεγέθους κάθε ζώνης, έπειτα από σύγκριση με τις ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση πολυνουκλεοτιδίων γνωστού μεγέθους (DNA markers).

Το διάλυμα για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης περιέχει σκόνη αγαρόζης (μπορεί να κυμανθεί από 0,8% έως 1,2%, ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση τμήματος) διαλυμένη στο ρυθμιστικό διάλυμα Loehings buffer. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης πληρώνεται επίσης με Loehings buffer και σε αυτήν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 85 Volts, για περίπου 45 λεπτά.

Loehings buffer (10x buffer για 1 L)

Tris- base	43,75 g
NaH₂PO₄ · H₂O	41,5 g
Na₂ EDTA	3,35 g

Έτσι, έγινε ηλεκτροφόρηση του τελικού προϊόντος της απομόνωσης σε 0,8% πηκτή αγαρόζης. Για την παρατήρηση των δειγμάτων, η πηκτή με την λήξη της ηλεκτροφόρησης τοποθετείται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) για 20 λεπτά και παρατηρείται σε πηγή υπεριώδους φωτός (302 nm).

PCR

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction). Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης μίας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA *in vitro*. Εντός ολίγων ωρών, πάνω από 10^6 αντίγραφα της ακολουθίας μπορούν να συντεθούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών εκκινητών (primers) και της DNA πολυμεράσης. Οι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές

θέσεις των δύο αλυσίδων στα άκρα του υπό ενίσχυση τμήματος. Η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους (Σκούρας, 1997):

- Θερμικής μετουσίωσης - αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (Denaturation)
- Υβριδισμού των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες (Annealing)
- Επιμήκυνσης - σύνθεσης συμπληρωματικών ακολουθιών (Extension)

Τα ειδικά αντιδραστήρια και ρυθμιστικά που χρησιμοποιούνται είναι: dNTPs, template DNA, forward primer, reverse primer, buffer (του ενζύμου), injection water, *Taq* polymerase. Ανάλογα με το είδος του εκμαγείου και τις ιδιότητες των εκκινητών, διαφοροποιούνται ποσοτικά και ποιοτικά.

Για την ενίσχυση του 16S rRNA, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 8F και 1541R. Η επιλογή των συγκεκριμένων εκκινητών έγινε διότι είναι παγκόσμιοι (universal) εκκινητές για το γονίδιο αυτό και λόγω του υβριδισμού τους στις θέσεις 8 και 1541 του γονιδίου είναι ικανοί να το καλύψουν ολόκληρο.

8F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

1541R: AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA

Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται το μίγμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε, οι ποσότητες κάθε συστατικού στο μίγμα, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης.

Μίγμα αντίδρασης	Ποσότητες (25μl τελικός όγκος)
5X buffer (New England BioLabs)	5 μl
dNTP's (10 mM)	0,75 μl
Primer 8F (25 μM)	0,4 μl
Primer 1541R (25 μM)	0,4 μl
<i>Taq</i> polymerase (New England BioLabs)	1 μl
Template DNA (1/9 αραίωση)	1 μl
Injection water	16,45 μl

Συνθήκες αντίδρασης

36 κύκλοι	{	94°C για 2 λεπτά
		94°C για 30 δευτερόλεπτα
		58°C για 1 λεπτό
		79°C για 50 δευτερόλεπτα
		79°C για 7 λεπτά

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Μετά την ενίσχυση του 16S rRNA, ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με το NucleoSpin Extract II (Macherey - Nagel).

- ✓ Ανάμιξη ενός όγκου προϊόντος PCR με δύο όγκους NT buffer (binding buffer).
- ✓ Φόρτωμα του δείγματος στη στήλη του κιτ που τοποθετείται επάνω σε σωλήνα.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.
- ✓ Απομάκρυνση του υγρού που διαπέρασε τη μεμβράνη και συσσωρεύτηκε στο σωλήνα.
- ✓ Προσθήκη 700 μl NT3 buffer (wash buffer) στη στήλη.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.
- ✓ Απομάκρυνση του υγρού που διαπέρασε τη μεμβράνη και συσσωρεύτηκε στο σωλήνα.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 2 λεπτά.
- ✓ Προαιρετική επώαση της στήλης για 2-5 λεπτά στους 70°C (για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης πριν την έκλυση).
- ✓ Προσεκτική αφαίρεση της στήλης από το σωλήνα και τοποθέτησή της σε καινούριο σωλήνα τύπου eppendorf.
- ✓ Προσθήκη 50 μl NE buffer (elution buffer) και επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.

Για τον έλεγχο της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του τελικού προϊόντος, έγινε ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αгарόζης και φωτομέτρηση στα 260 και 280 nm (Sambrook et al., 1989). Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA υπολογίζεται με τη βοήθεια των τύπων:

Συγκέντρωση DNA = $OD_{260} \times 50 \times$ συντελεστής αραιώσης.

Καθαρότητα: OD_{260} / OD_{280} . Ιδανικές τιμές καθαρότητας είναι 1,8-2.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Έπειτα, ακολούθησε η αποστολή του DNA για αλληλούχιση (MACROGEN). Η ακολουθία που προέκυψε από την αλληλούχιση συγκρίθηκε, με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Εικόνα 1), με ήδη υπάρχουσες ταυτοποιημένες ακολουθίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων.

The screenshot shows the NCBI BLAST web interface. The main section is "Enter Query Sequence". It contains a text area with a DNA sequence starting with ">seq" and a "Clear" button. Below the text area is a "Query subrange" section with "From" and "To" input fields. There is also an "Or, upload file" section with a button labeled "Αναζήτηση...". The "Job Title" section has a text input with "seq" and a placeholder "Enter a descriptive title for your BLAST search". A checkbox "Align two or more sequences" is present. The "Choose Search Set" section includes a "Database" dropdown set to "Nucleotide collection (nr/nt)", an "Organism" field with a placeholder "Enter organism name or id--completions will be suggested", and an "Exclude" checkbox. There is also an "Entrez Query" field with a placeholder "Enter an Entrez query to limit search".

Εικόνα 1: Εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.

Η ταυτοποίηση είδους ολοκληρώνεται με την επιλογή της πιο κοντινής, γνωστής ακολουθίας που προκύπτει με την εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.

❖ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ

Για την απομόνωση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) από τη βακτηριακή μεμβράνη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Eidhin και Mouton (Eidhin and Mouton, 1993).

- ✓ Φυγοκέντρηση βακτηριακής καλλιέργειας ($OD \approx 0,7$) στα 6.000 rpm για 5 λεπτά.
- ✓ Πλύση του ιζήματος με 1/10 του όγκου του με το fibrial wash buffer (20 mM Tris-HCl pH:7,4, 0,15 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$).
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 4.000 rpm για 10 λεπτά.
- ✓ Λυοφίλιση.
- ✓ Στα 25 mg λυοφιλισμένου προϊόντος, προσθήκη 1 ml ddH₂O.
- ✓ Βράσιμο του δείγματος για 15 λεπτά με ανάδευση (vortex) ανά 5 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 5 λεπτά και λήψη του υπερκειμένου.
- ✓ Προσθήκη, στο υπερκείμενο, πρωτεΐνάσης K (συγκέντρωση 1 mg ανά 50 μl dH₂O).
- ✓ Επώαση στους 60°C για 1 ώρα.
- ✓ Βράσιμο για 5 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 5 λεπτά.
- ✓ Διαπίδυση του υπερκειμένου σε dH₂O overnight.
- ✓ Λυοφίλιση του υπερκειμένου.
- ✓ Ζύγισμα του προϊόντος της λυοφίλισης και προσθήκη ddH₂O για τη δημιουργία διαλύματος LPS γνωστής συγκέντρωσης.

❖ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ – ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Για τον έλεγχο της απομόνωσης των λιποπολυσακχαριτών με την μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Eidhin and Mouton, 1993). Στη συνέχεια, έγινε χρώση της πηκτής με διάλυμα νιτρικού αργύρου (Tsai and Frasch, 1981) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη λιποπολυσακχαριτών στο

τελικό προϊόν, καθώς και χρώση με coomassie blue για να εξακριβωθεί η καθαρότητα του προϊόντος ως προς την παρουσία πρωτεΐνης.

SDS – PAGE

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ή SDS - PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μοριακή τεχνική διαχωρισμού των πρωτεϊνών και των λιποπολυσακχαριτών ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα διαμέσου των πόρων της πηκτής, η διάμετρος των οποίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο διάλυμα. Αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός των μορίων αυτών με βάση το μοριακό τους βάρος. Για την SDS – PAGE χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini-PROTEAN® Tetra Cell της BIO RAD.

Η πηκτή της ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές: την πηκτή επιστοίβαξης (stacking) και την πηκτή διαχωρισμού (separating).

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού για 15% πηκτή πολυακρυλαμίδης (separating gel)

30% ακρυλαμίδη	2,53 ml
4x separating buffer	1,25 ml
ddH₂O	0,715 ml
10% APS (Ammonium persulfate)	27,5 μl
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)	5 μl

Διάλυμα διαχωρισμού (separating buffer)

- ✓ Διάλυση 91 gr Tris Base σε 300 ml ddH₂O.
- ✓ Ρύθμιση του pH στο 8,8 με προσθήκη 1 M HCl.
- ✓ Προσθήκη 20 ml 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).
- ✓ Ρύθμιση του όγκου στα 500 ml με ddH₂O
- ✓ Διήθηση με χαρτί Whatman και διατήρηση στους 4 °C.

Διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel)

30% ακρυλαμίδη	0,4125 ml
Stacking buffer	0,625 ml
ddH₂O	1,7625 ml
10% APS (Ammonium persulfate)	17,5 μl
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)	5 μl

Διάλυμα επιστοίβαξης (stacking buffer)

- ✓ Διάλυση 6.05 gr Tris Base σε 40 ml ddH₂O.
- ✓ Ρύθμιση του pH στο 6.8 με 1 M HCl.
- ✓ Προσθήκη 4 ml 10% SDS.
- ✓ Ρύθμιση του όγκου στα 100 ml με ddH₂O.
- ✓ Διήθηση με χαρτί Whatman και διατήρηση στους 4°C.

Οι λιποπολυσακχαρίτες (10 μl/δείγμα από συγκέντρωση 1 mg/ml) τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις της πηκτής επιστοίβαξης εναιωρημένες σε διάλυμα εκχύλισης (10 μl/δείγμα). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer) και σε αυτήν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 100 Volts, για περίπου 70 λεπτά.

Διάλυμα εκχύλισης 2x (disruption Buffer)

Glycerol	10 ml
10% SDS	20 ml
Bromophenol blue	1,25 mg
4x stacking buffer	12,5 ml
β-mercaptoethanol	2,5 ml

Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (SDS running buffer)

Tris base	3 gr
10% SDS	10 ml
Glycine	14,4 gr

Ρύθμιση του pH στο 8,3 και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι το 1 L.

Λόγω της πρόσδεσης του SDS στα μόρια, αυτά αποκτούν αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινούνται λόγω διαφοράς τάσης εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου προς την κάθοδο του κυκλώματος. Κατά τη δίοδο τους μέσα από την πηκτή επιστοιβάξης συμπυκνώνονται και στην συνέχεια κινούμενα κατά μήκος της πηκτής διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους.

SILVER STAINING

- ✓ Η πηκτή τοποθετείται ολονύκτια σε διάλυμα μονιμοποίησης (40% αιθανόλη, 5% οξικό οξύ) με ελαφριά ανάδευση (η ανάδευση ισχύει για όλα τα βήματα).
- ✓ Αλλαγή, την επόμενη μέρα, με καινούριο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα.
- ✓ Οξείδωση των λιποπολυσακχαριτών με διάλυμα περιοδικού οξέως (0,26 g μεταπεριοδικό νάτριο σε 50 ml διαλύματος μονιμοποίησης) για 15 λεπτά.
- ✓ 4 πλύσεις με dH₂O, από 15 λεπτά η καθεμία.
- ✓ Προσθήκη του διαλύματος χρώσης (2 ml υδροξείδιο του αμμωνίου, 1,4 ml 2 N NaOH, 145 ml dH₂O και 5 ml 20% νιτρικό άργυρο σταγόνα σταγόνα, μέχρι το διάλυμα να πάρει ελαφρά πορτοκαλί χρώμα) για 10 λεπτά.
- ✓ 3 πλύσεις με dH₂O, από 15 λεπτά η καθεμία.
- ✓ Μεταφορά της πηκτής σε καινούριο δοχείο και προσθήκη προθερμασμένου (στους 37°C) διαλύματος ανάπτυξης (10 mg κιτρικό οξύ, 0,1 ml 30% φορμαλδεΰδη, 200 ml ddH₂O).
- ✓ Αναμονή ως την εμφάνιση των ζωνών στην πηκτή και σταμάτημα της αντίδρασης με 0,35% οξικό οξύ για 1 ώρα.
- ✓ Αποθήκευση της πηκτής σε dH₂O.

ΧΡΩΣΗ ΜΕ COOMASIE BLUE

Η πηκτή βάφεται overnight με το διάλυμα χρώσης, το οποίο στην συνέχεια απομακρύνεται με δύο διαδοχικές πλύσεις της 1 ώρας με διάλυμα αποχρωματισμού I και II, αντίστοιχα.

Διάλυμα χρώσης της πηκτής 1x (staining Buffer)

Coomasie blue	1 gr
Methanol	400 ml
Acetic acid	100 ml
ddH₂O	500 ml

Διάλυμα αποχρωματισμού I (destaining buffer I)

Methanol	400 ml
Acetic acid	100 ml
ddH₂O	500 ml

Διάλυμα αποχρωματισμού II (destaining buffer II)

Methanol	50 ml
Acetic acid	70 ml
ddH₂O	880 ml

❖ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που αφορούν στην επίδραση των λιποπολυσακχαριτών στην διαφοροποίηση των κυττάρων μυελού των οστών σε οστεοκλάστες, καθώς και στον έλεγχο της ενεργότητας των οστεοκλαστών που σχηματίζονται γινόταν συλλογή κυττάρων από την κνήμη και το μηριαίο οστό ποντικού και υπολογισμός του αριθμού τους.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Από την κνήμη και το μηριαίο οστό ποντικού, ο οποίος είχε προηγουμένως θυσιαστεί με έκθεσή του σε αιθέρα, λαμβάνονται, με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης λαβίδας και σύριγγας, τα κύτταρα του μυελού των οστών σε τριβλίο των 60 mm το οποίο ήδη περιέχει 5 ml EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium- SIGMA). Αφού διαλυθούν με σύριγγα τα συσσωματώματα των κυττάρων, το περιεχόμενο του τριβλίου διηθείται με φίλτρο των 70 μm και μεταφέρεται σε κωνικό φιαλίδιο των 15 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναιώρηση του ιζήματος (περιέχει τα κύτταρα) σε 1 ml EMEM με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf αναμειγνύονται 100 μl χρωστικής TURKS, 80 μl EMEM και 20 μl του εναιωρήματος των κυττάρων (δηλαδή 1:10 αραίωση) και μετράται ο αριθμός των κυττάρων ανά ml στην πλάκα Neubauer βάσει του τύπου: αριθμός κυττάρων στα 4 μεγάλα τετράγωνα της πλάκας Neubauer /4 x αραίωση x 10⁴. Έπειτα, υπολογίζονται τα μl του εναιωρήματος των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν.

❖ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ LPS (MTS/PMS)

Για να ελεγχθεί αν οι LPS της *Pseudomonas* sp. παρουσιάζουν τοξικότητα και παρεμποδίζουν την βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTS/PMS. Είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που μετράει την δραστικότητα των ενζύμων που μετατρέπουν το MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) στο χρωμογόνο προϊόν formazan, το οποίο δίνει ένα μωβ χρώμα. Κυριότερη εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί ο έλεγχος της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας διαφόρων παραγόντων, αφού αυτοί μπορεί να διεγείρουν ή να παρεμποδίζουν την κυτταρική βιωσιμότητα και πολλαπλασιασμό. Το MTS, παρουσία του PMS (phenazine methosulfate), παράγει ένα χρωμογόνο προϊόν (formazan) που παρουσιάζει μέγιστο οπτικής απορρόφησης στα 490 nm σε PBS (Cory et al., 1991).

Έτσι, κύτταρα από μυελό των οστών θηλυκού ποντικού C57 DOB 20 εβδομάδων επώαστηκαν σε 96-well plate με θρεπτικό μέσο EMEM με 10% FBS και 1%

πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη έως ότου να δημιουργήσουν πλήρες ταπήτιο. Το θρεπτικό περιείχε επιπρόσθετα 0 (control), 1, 10 ή 50 $\mu\text{l/ml}$ LPS της *Pseudomonas*. Ακολούθησε:

✓ Πλύση των κυττάρων με PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L KH_2PO_4 , pH:7,4) και επώαση σε θρεπτικό που περιέχει διάλυμα MTS/PMS (στα 100 μl θρεπτικό προστίθενται 20 μl MTS/PMS) για 2 ώρες στους 37°C και 5% CO_2 .

Για το διάλυμα MTS/PMS:

- 42 mg σκόνης MTS διαλύονται σε 20 ml DPBS.
 - Καλή ανάδευση και ρύθμιση του pH στο 6-6,5.
 - Προσθήκη 1 ml PMS.
 - Αποστείρωση με φιλτράρισμα.
- ✓ Λήψη του θρεπτικού και φυγοκέντρωση στα 5.000 rpm για 5 λεπτά.
- ✓ Προαιρετική ανάδευση στα 220 rpm για 10 λεπτά.
- ✓ Φωτομέτρηση του υπερκειμένου στα 490 nm.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε και στην 7^η μέρα της επώασης. Ελέγχθηκαν από 3 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση.

❖ ΕΚΘΕΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ LPS ΤΗΣ *Pseudomonas* sp. ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

Για να διαπιστωθεί εάν οι λιποπολυσακχαρίτες της *Pseudomonas* sp. μπορούν να οδηγήσουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών σε οστεοκλάστες (Nason et al., 2009a), έγινε συλλογή κυττάρων από μυελό των οστών ποντικού και έκθεσή τους σε διάφορες συγκεντρώσεις λιποπολυσακχαριτών της *Pseudomonas* sp.

ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Μετά τη λήψη των κυττάρων από το μυελό των οστών αρσενικού ποντικού C57 DOB 13 εβδομάδων ακολούθησε επώαση τους σε θρεπτικό μέσο EMEM με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη που περιείχε επιπρόσθετα 0 (control), 1, 10 ή 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS της *Pseudomonas* sp. Η επώαση έγινε σε 48-well plate (3×10^6 κύτταρα/οπή) στους 37°C και 5% CO_2 . Κάθε 2 ημέρες γινόταν πλύση με PBS και αλλαγή του θρεπτικού με καινούριο, που

περιείχε και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις LPS. Η επώαση των κυττάρων ολοκληρώθηκε στις 7 ημέρες, οπότε και έγιναν έλεγχοι για τη διαπίστωση διαφοροποίησης ή όχι των κυττάρων του μυελού σε οστεοκλάστες.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ

Μετά την ολοκλήρωση της έκθεσης των κυττάρων του μυελού στους λιποπολυσακχαρίτες της *Pseudomonas* sp. έγινε μικροσκοπική παρατήρηση του παρασκευάσματος για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πολυπύρηνων κυττάρων. Έπειτα, ακολούθησε χρώση των κυττάρων για την ανίχνευση της πρωτεΐνης TRACP με τη βοήθεια του TRACP & ALP double-stain Kit (TAKARA). Με τη χρώση αυτή βάφονται οι οστεοκλάστες με κόκκινο χρώμα.

- ✓ Αφαίρεση θρεπτικού.
- ✓ 1 πλύση με PBS.
- ✓ Προσθήκη 125 μl από το fixing solution και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη 1 ml H₂O στο fixing solution και έπειτα αφαίρεση όλου το διαλύματος.
- ✓ Πλύση με 1 ml H₂O.
- ✓ Προσθήκη 125 μl από το staining solution (αποτελείται από την προσθήκη 1/10 όγκου του tartrate στο substrate solution) και επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
- ✓ Αφαίρεση του staining solution και 3 φορές πλύση με ddH₂O για τη λήξη της αντίδρασης.
- ✓ Προσθήκη 1 σταγόνας DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole): στερεωτικό μέσο που δίνει τη δυνατότητα για χρώση και παρατήρηση των πυρήνων.
- ✓ Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο και σε μικροσκόπιο φθορισμού. Λήψη φωτογραφιών. Καταμέτρηση κυττάρων.

Τρία δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συγκέντρωση και το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Ως οστεοκλάστες, μετρήθηκαν τα κόκκινα κύτταρα που είχαν αριθμό πυρήνων μεγαλύτερο ή ίσο του 3 (Nason et al., 2009a). Η μέτρηση των πυρήνων έγινε με τη βοήθεια των εικόνων που λήφθηκαν στο UV όπου διακρίνονται οι πυρήνες, αφού χρωματίσουν με το DAPI.

Για να διαπιστωθεί εάν η πιθανή επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων μυελού των οστών από τους λιποπολυσακχαρίτες της *Pseudomonas* sp. είναι ειδική για το συγκεκριμένο βακτήριο, έγινε επανάληψη της επώασης με την παρουσία και των λιποπολυσακχαριτών της *Escherichia coli*.

ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Κύτταρα μυελού των οστών αρσενικού ποντικού C57 DOB 13 εβδομάδων επώαστηκαν σε 48-well plate (3 X 10⁶ κύτταρα/οπή) με θρεπτικό μέσο EMEM με 10% FBS και 1‰ πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη που περιείχε επιπρόσθετα 10 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. ή του βακτηρίου *Escherichia coli*. Κάθε 2 ημέρες γινόταν πλύση με PBS και αλλαγή του θρεπτικού με καινούριο, που περιείχε και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις LPS. Η επώαση των κυττάρων ολοκληρώθηκε στις 7 ημέρες, οπότε και έγιναν έλεγχοι για να διαπιστωθεί η διαφοροποίηση ή όχι των κυττάρων του μυελού σε οστεοκλάστες.

Ελέγχθηκαν από 3 δείγματα για κάθε LPS.

❖ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ (IL-6, IL-10, IL-12 ΚΑΙ TNF-α) ΑΠΟ ΤΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΤΩΝ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ LPS ΤΗΣ *Pseudomonas* sp.

Για να ελεγχθεί αν παράγονται κυτοκίνες σχετικές με την οστεοκλαστογένεση από τα πρόδρομα κύτταρα που σχηματίζονται κατά την έκθεση σε LPS της *Pseudomonas* (Nason et al., 2009a), εφαρμόσθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού. Ο ανοσοφθορισμός, όπως και κάθε ανοσοτεχνική, βασίζεται στη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και συνδέονται ειδικά στην υπό μελέτη πρωτεΐνη και επιτρέπουν τον εντοπισμό της, παράγοντας κατάλληλο σήμα, που στην προκειμένη περίπτωση είναι η εκπομπή φθορισμού.

Έτσι, κύτταρα από μυελό των οστών αρσενικού ποντικού C57 DOB 16 εβδομάδων επώαστηκαν σε 12-well plate (8 X 10⁶ κύτταρα/οπή) επάνω σε καλυπτρίδες σε θρεπτικό μέσο EMEM με 10% FBS και 1‰ πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη που περιείχε επιπρόσθετα 0 (control) ή 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas*. Μετά από 4 ημέρες επώαση, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα επεξεργάστηκαν για την ανίχνευση, με αντισώματα, των κυτοκινών IL-6, IL-10, IL-12 και TNF-α.

- ✓ Μεταφορά των καλυπτρίδων σε 4% φορμαλδεΐδη (σε PBS) για 1 ώρα για τη μονιμοποίηση των κυττάρων.
- ✓ Αφαίρεση της φορμαλδεΐδης και προσθήκη 1% Triton-X 100 για 30 λεπτά. Πλύση με PBS.
- ✓ Επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα στους 37°C για 2 ώρες. Πλύση με PBS.
- ✓ Επώαση των κυττάρων με αντι-αντισώματα επισημασμένα με FITC στους 37°C για 45 λεπτά. Πλύση με PBS.
- ✓ Τοποθέτηση της καλυπτρίδας με την πλευρά των κυττάρων προς τα κάτω σε μια αντικειμενοφόρο, επάνω σε μια σταγόνα DAPI.
- ✓ Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Αντισώματα	Συγκεντρώσεις
anti- IL-6	1:250
anti- IL-10	1:1000
anti- IL-12	1:250
anti- TNF-a	1:100
anti- goat IgG FITC	1:400
anti- rat IgG FITC (μόνο για το anti- TNF-a)	1:50

❖ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ

Για να ελεγχθεί αν τα κύτταρα από μυελό των οστών ποντικού που επώάζονται με τους LPS της *Pseudomonas* sp. διαφοροποιούνται σε ενεργούς οστεοκλάστες, πραγματοποιήθηκε επώασή τους επάνω σε επιφάνεια υδροξυαπατίτη (Monchau et al., 2002; Spence et al., 2008). Ο υδροξυαπατίτης σχηματίζεται όταν δοκίμια βιοϋάλου (bioglass) εμβαπτίζονται σε SBF (Simulated Body Fluid) και επώάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 4 ημέρες (Chen et al., 2006).

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΙΩΝ (ΒΙΟΪΑΛΟΥ) BIOGLASS

Υψηλής καθαρότητας οξειδία: $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, σε % (κ.β.) αναλογίες 45 SiO_2 , 24,5 CaO , 24,5 Na_2O , 6,0 P_2O_5 , ζυγίστηκαν, αναμίχθηκαν και εισήχθησαν σε κάψα πλατίνας όπου θερμάνθηκαν για 4 ώρες στους 1450°C , προκειμένου να προκύψει ένα ομογενές τήγμα χωρίς έγκλειστα αέρα. Στη συνέχεια το τήγμα υφίσταται διαδικασία ταχείας ψύξεως με γρήγορη έκχυση σε απεσταγμένο νερό, προκειμένου να διατηρηθεί η άμορφη φάση. Ακολούθως, με διήθηση, λαμβάνεται η βιοενεργή ύαλος του συγκεκριμένου συστήματος. Η βιοενεργή ύαλος μετά τη διήθηση κονιορτοποιείται και με τη χρήση κατάλληλων ηθμών προκύπτει υπό μορφή κόνεως με συγκεκριμένο εύρος μεγέθους κόκκων, συγκεκριμένα 20 – 40 μm . Μια ποσότητα 0,05 mg πιέζεται σε πρέσα κενού, μέχρι 2 τόνους, για να παραχθεί ένα δισκίο με διάμετρο 5 mm και πάχος 1,25 mm (Gen-Fu and Xue-Ping, 2005).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ SBF

1L ddH₂O (όταν η θερμοκρασία του γίνει 37°C) χωρίζεται ισόποσα σε δύο ογκομετρικές φιάλες. Στην μια προστίθενται τα άλατα με τη σειρά για να μην δημιουργηθεί ίζημα και το χωνί ξεπλένεται κάθε φορά για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του άλατος και στη συνέχεια το διάλυμα ανακινείται καλά. Αφού θερμανθεί ξανά το διάλυμα στους 37°C , μετράται το pH, το οποίο δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 7,3.

SBF (Simulated Body Fluid)

NaCl	8,036 g
NaHCO₃	0,352 g
KCl	0,225 g
K₂HPO₄ * 3H₂O	0,230 g
MgCl₂ * 6H₂O	0,311 g
HCl 37%	3 ml
CaCl₂	0,293 g
Na₂SO₄	0,072 g
(CH₂OH)₃CNH₂ (TRIS)	6,063 g

Μόλις ρυθμιστεί το pH μεταφέρονται και οι δύο φιάλες στο ψυγείο και όταν το διάλυμα φτάσει τους 20°C προστίθεται στο SBF ddH₂O μέχρι να φτάσει σε όγκο ίσο με 1L.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΙΩΝ BIOGLASS

Για να διαπιστωθεί ο σχηματισμός υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια των δοκιμίων bioglass μετά από εμβάπτισή τους στο SBF και επώαση στους 37°C, έγιναν δύο έλεγχοι: φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR spectroscopy) και περίθλαση ακτίνων X (XRD).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (FTIR SPECTROSCOPY)

Η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR) αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους μελέτης και ταυτοποίησης της ανάπτυξης στρώματος HAρ σε βιοενεργά υλικά. Ένας σημαντικός λόγος είναι ότι το φάσμα IR του υδροξυαπατίτη είναι αρκετά μελετημένο και παρουσιάζει χαρακτηριστικές κορυφές σε μία ευρεία περιοχή του μεσαίου υπερύθρου (MIR, 400-5000cm⁻¹). Στην φασματοσκοπία υπερύθρου, η προσπίπτουσα υπέρυθρη ακτινοβολία απορροφάται μερικώς από το υλικό στο οποίο προσπίπτει ενώ ένα μέρος της υπόλοιπης το διαπερνά και το άλλο ανακλάται. Το παραγόμενο φάσμα απορρόφησης δείχνει σε ποιες συχνότητες υπάρχει απορρόφηση της ακτινοβολίας από το υλικό, δηλαδή σε ποιες συχνότητες ταλαντώνονται τα άτομα των μορίων του.

Όλα τα δείγματα ήταν υπό τη μορφή δισκίων και για αυτό λήφθηκαν φάσματα ανακλαστικότητας (Specular Reflectance). Σε αυτήν την τεχνική, μετράται η ανακλώμενη από την επιφάνεια του δοκιμίου ακτινοβολία και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως Reflectance. Ο οπτικός χαρακτηρισμός όλων των δειγμάτων έγινε μέσω του FTIR φασματοσκοπίου, μοντέλου IFS 113ν της Bruker. Το όργανο αυτό έχει φασματικό εύρος από τα 20000 έως τα 15 cm⁻¹, λειτουργεί υπό κενό με ανάλυση $\geq 0,03$ cm⁻¹. Το όργανο λειτουργεί υπό κενό για την αποφυγή παρεμβολών από την υγρασία ή το CO₂ του αέρα. Συγκεκριμένα, στα υπό μελέτη δείγματα έγιναν μετρήσεις ανακλαστικότητας στην περιοχή του μεσαίου υπερύθρου από 400 μέχρι 5000 cm⁻¹ και ως αναφορά χρησιμοποιήθηκε καθρέφτης αλουμινίου.

ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ (XRD)

Οι μετρήσεις περίθλασης ακτίνων-Χ συνίστανται στην πρόσπτωση δέσμης ακτίνων-Χ επάνω σε κατάλληλα προετοιμασμένο δείγμα και μέτρηση των γωνιών στις οποίες ένα συγκεκριμένο, χαρακτηριστικό μήκος κύματος ακτίνων-Χ, λ , περιθλάται. Κάθε υλικό, άμορφο ή κρυσταλλικό, είτε σε καθαρή χημική κατάσταση είτε σαν μείγμα χημικών ενώσεων, παράγει με περίθλαση ακτίνων-Χ ένα διάγραμμα, που ονομάζεται διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-Χ ή ακτινογράφημα (X-rays Diffraction Pattern-XRDP). Το ακτινογράφημα αυτό χαρακτηρίζει μονοσήμαντα το υλικό επειδή η μορφή του καθορίζεται από ένα ικανό αριθμό παραμέτρων. Οι γωνίες 2θ των ανακλάσεων καθορίζονται από το σχήμα και το μέγεθος της κυψελίδας, δηλ. το κρυσταλλικό σύστημα και τις σταθερές της κυψελίδας, ενώ οι εντάσεις τους από τη σκεδαστική ικανότητα των ατόμων και τη θέση τους στην κυψελίδα. Κατά συνέπεια, δεν μπορούν δύο διαφορετικά υλικά να έχουν ταυτόσημα ακτινογραφήματα.

Για τον προσδιορισμό των φάσεων που σχηματίζονται στην επιφάνεια των βιοϋάλων μετά την εμφύτευσή τους σε c-SBF, τα δείγματα μελετούνται με ένα περιθλασίμετρο Philips, χρησιμοποιώντας τη ακτινοβολία του Cu, η οποία διαχωρίζεται με φίλτρα Ni. Οι XRD μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με μέγεθος βήματος: $0.05^\circ 2\theta$, γωνία έναρξης: 5° , γωνία λήξης 75° και ταχύτητα σάρωσης $0.01^\circ 2\theta/\text{sec}$.

ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΟΚΙΜΙΑ BIOGLASS ΜΕ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ

Κύτταρα από μυελό των οστών θηλυκού ποντικού C57 DOB 20 εβδομάδων επώαστηκαν σε 48-well plate (3×10^6 κύτταρα/οπή) επάνω σε δοκίμια bioglass που έχουν αναπτύξει στρώμα υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά τους. Ο υδροξυαπατίτης σχηματίστηκε αφού τα δοκίμια bioglass εμφυτεύθηκαν σε SBF και παρέμειναν στους 37°C για 4 ή 15 ημέρες (Chen et al., 2006). Η επώαση των κυττάρων έγινε με την προσθήκη θρεπτικού μέσου EMEM με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη που είχε επιπρόσθετα 0 (control) ή 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS της *Pseudomonas*. Κάθε 2 ημέρες γινόταν αλλαγή του θρεπτικού. Στην ομάδα των bioglass που παρέμειναν για 4 ημέρες στο SBF, λήφθηκαν δοκίμια στο χρόνο 0 και 10 ημέρες από την έναρξη της επώασης με τα κύτταρα και έγινε η προετοιμασία τους για παρατήρηση στο SEM (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης). Στην ομάδα των bioglass που επώαστηκαν για

15 ημέρες στο SBF, τα δοκίμια λήφθηκαν 10 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης με ακολούθησε λύση των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί στα δοκίμια. Η διαδικασία της λύσης είναι: 2 πλύσεις με disruption buffer (χωρίς bromophenol blue) και 5 πλύσεις με dH₂O. Μετά το στέγνωμα των δοκιμίων για 2 ώρες στους 60°C, έγινε η προετοιμασία τους για παρατήρηση στο SEM. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δοκίμια που υπέστησαν παρόμοια διαδικασία, χωρίς να έχουν κύτταρα.

Ελέγχθηκαν 3 δοκίμια για κάθε περίπτωση.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΙΩΝ BIOGLASS ΓΙΑ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΣΤΟ SEM, ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ SEM ΚΑΙ EDS.

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των δοκιμίων, ακολουθεί προετοιμασία για παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM-scanning electron microscope). Αρχικά, τα κύτταρα μονιμοποιούνται πάνω στα δοκίμια με εμβάπτιση των δοκιμίων για 30 λεπτά σε διάλυμα φορμαλδεΐδης (4% σε PBS). Ακολουθεί αφυδάτωση των δοκιμίων με διαδοχική εμβάπτισή τους σε 6 διαλύματα αιθανόλης σε dH₂O (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%), για 10 λεπτά στο κάθε διάλυμα. Στη συνέχεια ακολουθεί η αποξήρανση των δειγμάτων με διαδοχική εμβάπτισή τους σε 3 διαλύματα HMDS σε απόλυτη αιθανόλη (1^ο: 2 μέρη 100% αιθανόλη και ένα μέρος HMDS, 2^ο: 2 μέρη HMDS και ένα μέρος 100% αιθανόλη και 3^ο: 3 μέρη HMDS) (Degasne et al., 1999). Τα δείγματα για να αναλυθούν πρέπει να έχουν τέλεια αγωγιμότητα και γι' αυτό γίνεται εξάχνωση σε κενό ενός αγώγιμου υλικού -που στην περίπτωσή αυτή είναι άνθρακας- από μία διάταξη βολταϊκού τόξου. Το πάχος της επικάλυψης με άνθρακα δεν ξεπερνά τα 200 Å ώστε να εξασφαλίζεται η ιδανική αγωγιμότητα χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία του οργάνου. Η επανθράκωση έγινε με JEOL-4X εξαχνωτή κενού.

Τέλος, έγινε παρατήρηση των δειγμάτων στο SEM και λήφθηκαν φωτογραφίες από διάφορες μεγεθύνσεις (X500 – X2000). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και αναλύσεις EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) για να ελεγχθεί η ποιοτική και ποσοτική σύσταση της επιφάνειας του δοκιμίου. Για την ανάλυση EDS, επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν 3 επιφανειακές περιοχές 100 μm X100 μm σε κάθε δοκίμιο.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΡΘΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΕΠΩΑΣΤΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΟΚΙΜΙΑ BIOGLASS

Για να εξακριβωθεί εάν οι σχηματιζόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες είναι ενεργοί και μπορούν να διαλυτοποιήσουν τον υδροξυαπατίτη ελέγχθηκε εάν απελευθερώνουν ορθοφωσφορικά ιόντα στο υπερκείμενο μέσο της καλλιέργειάς τους (Monchau et al., 2002). Κύτταρα μυελού των οστών ποντικού με 50 µg/ml LPS *Pseudomonas* sp. ή όχι (control-απουσία κυττάρων) επώαστηκαν επάνω σε δοκίμια bioglass, που είχαν προηγουμένως παραμείνει για 15 ημέρες στο SBF και ανά δύο ημέρες γινόταν συλλογή του υπερκειμένου της καλλιέργειας από bioglass που είχαν κύτταρα στην επιφάνειά τους ή όχι (control). Μετά από 10 ημέρες επώαση, μετρήθηκε συνολικά η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων που απελευθερώθηκαν από κάθε δείγμα. Ο προσδιορισμός του φωσφόρου έγινε χρωματομετρικά με τη μέθοδο του μπλε του μολυβδαινικού νατρίου (Monds et al., 2006). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχή ότι σε ένα όξινο διάλυμα νατρίου, στο οποίο περιέχονται ορθοφωσφορικά ιόντα, σχηματίζονται σύμπλοκες ενώσεις οι οποίες, όταν αναχθούν, αποκτούν ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από την συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων και κατ' επέκταση από τη συγκέντρωση του φωσφόρου.

- ✓ Σε 500 µl δείγματος προστίθενται 500 µl διαλύματος 0,5% (w/v) μολυβδαινικό νάτριο και 2% (w/v) ασκορβικό οξύ.
- ✓ Επώαση για 20 λεπτά στους 50°C.
- ✓ Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Φωτομέτρηση στα 820 nm.

Ελέγχθηκαν 3 δείγματα control και 3 με οστεοκλάστες.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΑΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟΥΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ LPS ΤΗΣ *Pseudomonas* sp.

Άλλος ένας έλεγχος ενεργότητας αφορά στο σχηματισμό δακτυλίου ακτίνης που εμφανίζουν οι ενεργοί οστεοκλάστες (Monchau et al., 2002; Spence et al., 2008). Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού σε bioglass με 3×10^6 κύτταρα μυελού των οστών C57 DOB ποντικού 20 εβδομάδων, που επώαστηκαν με 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. για 1 (control) ή 10 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για ακτίνη

MAB 1501 MSY Actin (Chemicon International) και το αντι-αντίσωμα Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) σε αραιώσεις 1/40. Η παρατήρηση έγινε σε Συνεστιακό Μικροσκόπιο Σάρωσης (confocal).

❖ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΟΣΤΕΟBLAST-LIKE ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ *Pseudomonas* sp.

Για να ελεγχθεί αν η *Pseudomonas* sp. μπορεί να μολύνει osteoblast-like κύτταρα, αρχικά σχηματίστηκαν και ελέγχθηκαν τα osteoblast-like κύτταρα και ακολούθως έγινε μέτρηση του αριθμού των αποικιών βακτηρίων που εισήλθαν σε αυτά (Ellington et al., 2003).

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΣΤΕΟBLAST-LIKE ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη δημιουργία osteoblast-like κυττάρων, επώαστηκαν κύτταρα μυελού των οστών αρσενικού ποντικού C57 DOB 16 εβδομάδων σε 12-well plate (8×10^6 κύτταρα/οπή) επάνω σε καλυπτρίδες και σε 48-well plate (3×10^6 κύτταρα/οπή) με osteogenic differentiation medium (DM) (Piek et al., 2010). Το DM περιέχει: DMEM με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 10^{-7} Dexamethasone (DEX), 0,2 mM ascorbate, 10 mM β -glycerophosphate και 10^{-8} M 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 ημέρες, οπότε και έγινε έλεγχος σχηματισμού osteoblast-like κυττάρων με χρώση για αλκαλική φωσφατάση (TRACP & ALP double-stain Kit, TAKARA).

ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Η μέθοδος χρώσης για αλκαλική φωσφατάση είναι ίδια με την χρώση για TRACP, μόνο που το staining solution αποτελείται από το δισκίο που υπάρχει στο kit διαλυμένο σε 10 ml ddH₂O.

ΜΟΛΥΝΣΗ ΟΣΤΕΟBLAST-LIKE ΚΥΤΤΑΡΩΝ

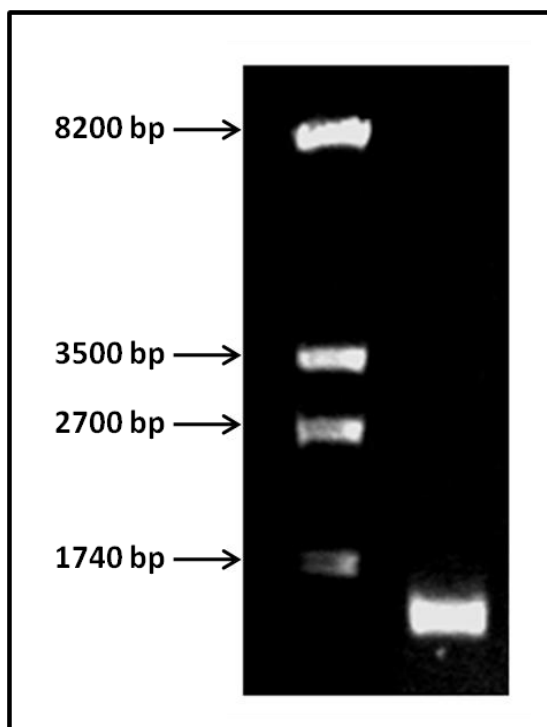
Για τη μόλυνση osteoblast-like κυττάρων, επώαστηκαν κύτταρα μυελού των οστών αρσενικού ποντικού C57 DOB 16 εβδομάδων σε 48-well plate (3×10^6 κύτταρα/οπή) με osteogenic differentiation medium (DM). Μετά από 10 ημέρες επώαση, ακολούθησε το πρωτόκολλο μόλυνσης. Χρησιμοποιήθηκαν 2 οπές, η μια για λήψη των κυττάρων στη 1 ώρα μετά την προσκόλληση και η άλλη στις 5 ώρες.

- ✓ Πλύση των οπών με PBS.
- ✓ Μόλυνση των κυττάρων με DMEM που περιέχει 20 CFU/κύτταρο *Pseudomonas* sp.
- ✓ Μετά από 1 και 5 ώρες, 3 φορές ξέπλυμα των οπών με θρεπτικό που περιέχει 10 µg/ml τετρακυκλίνη.
- ✓ Επανεώρηση των κυττάρων (μετά από 1 και 5 ώρες) σε διάλυμα που περιέχει 1 mM NaHCO₃, 0,2 mM MgCl₂ και 0,25 M sucrose.
- ✓ Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά.
- ✓ Μικροσκοπικός έλεγχος (τα κύτταρα πρέπει να αρχίσουν να διογκώνονται και να σπάνε).
- ✓ Μηχανικό σήκωμα των κυττάρων με απόξυση από την οπή.
- ✓ Αραίωση του εναιωρήματος των κυττάρων με BHIB (αραιώσεις 10⁰-10⁻³) και επίστρωση των αραιώσεων σε BHIA.
- ✓ Επώαση των τριβλίων στους 37°C για 24 ώρες.
- ✓ Καταμέτρηση αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

❖ ΤΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΩΣ *Pseudomonas* sp.

Για να ταυτοποιηθεί το υπό μελέτη βακτήριο σε επίπεδο είδους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του 16S rRNA (Bottger, 1989; Garrity and Holt, 2001). Για τον λόγο αυτό ενισχύθηκαν με PCR 1475 bp του 16S rRNA του βακτηρίου αυτού (Εικόνα 1) και στη συνέχεια το τμήμα αυτό αλληλουχίστηκε.



Εικόνα 1: Το προϊόν της PCR του 16S rRNA τμήματος (1475 bp) που ενισχύθηκε με τη χρήση των εκκινητών 8F και 1541R.

Παρακάτω παρατίθεται το αποτέλεσμα της αλληλούχησης (MACROGEN):

```
NNNNGNNNTGTCATCTGTGTAGAACTGACCTGATAGGAATTTGTTGCTGGATTTACCGCACCGACGGGTGAGTAATG
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAG
GGGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACG
ATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTTAAAGCACTTTA
AGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTAAGCGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTCGTTAAGT
TGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGGTGGTGGAA
TTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACAC
TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GGTTCCTTGAGAACTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAA
TGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAG
```

GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGT
 GCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAG
 TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTCGATGAGTTTGATCCTGGCTCACGGGTAT
 CTGGGTCTGTATATCGGCGTAGAANACGACNNNNNN

Με την εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST στην παραπάνω ακολουθία (Εικόνα 2), διαπιστώθηκε ότι το υψηλότερο σκορ εμφανίζουν οι ακόλουθες καταχωρήσεις: *Pseudomonas mendocina* strain zyj1-4 και *Pseudomonas* sp. SWS3-camc.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU311211.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain zyj1-4 16S ribosomal RNA gene, parti	2462	2462	93%	0.0	99%
EF151237.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SWS3-camc 16S ribosomal RNA gene, partial seque	2462	2462	93%	0.0	99%
GQ157104.1	Uncultured bacterium clone 16slp101-1e03.w2k 16S ribosomal RNA ge	2460	2460	91%	0.0	99%
EF550159.1	<i>Pseudomonas</i> sp. GW9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	91%	0.0	99%
DQ178223.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain PC7 16S ribosomal RNA gene, complet	2460	2460	91%	0.0	99%
DQ178222.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain PC6 16S ribosomal RNA gene, complet	2460	2460	91%	0.0	99%
EU305599.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone 5-D 16S ribosomal RNA gene, part	2457	2457	93%	0.0	98%
EU082832.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain D11 16S ribosomal RNA gene, partial se	2457	2457	93%	0.0	98%
AF181570.1	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>pseudoalcaligenes</i> 16S ribosomal RNA gene, partial s	2457	2457	93%	0.0	98%
AB109888.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	2457	2457	93%	0.0	98%
GQ417218.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone F1Sjun.55 16S ribosomal RNA gen	2455	2455	91%	0.0	99%
DQ842018.3	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>lubricantis</i> strain RS1 16S ribosomal	2455	2455	91%	0.0	99%
DQ192044.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 101-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	91%	0.0	99%
DQ192041.1	<i>Pseudomonas</i> sp. I91-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	91%	0.0	99%
DQ178226.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain PC19 16S ribosomal RNA gene, comple	2455	2455	91%	0.0	99%
NR_024734.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain AL15-21 16S ribosomal RNA, partial sei	2455	2455	91%	0.0	99%
HQ105011.1	<i>Pseudomonas</i> sp. BC043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2453	2453	93%	0.0	98%
DQ412061.1	<i>Pseudomonas</i> sp. LOB-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2453	2453	91%	0.0	99%
GQ416522.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone F7may2.83 16S ribosomal RNA ger	2451	2451	93%	0.0	98%
EU821343.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	91%	0.0	99%
EU395787.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain JY4 16S ribosomal RNA gene, partial s	2451	2451	93%	0.0	98%
EU305595.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone 4-D 16S ribosomal RNA gene, part	2451	2451	93%	0.0	98%

Εικόνα 2: Αποτέλεσμα της εφαρμογής του αλγορίθμου BLAST στην αλληλουχημένη ακολουθία του 16S rRNA.

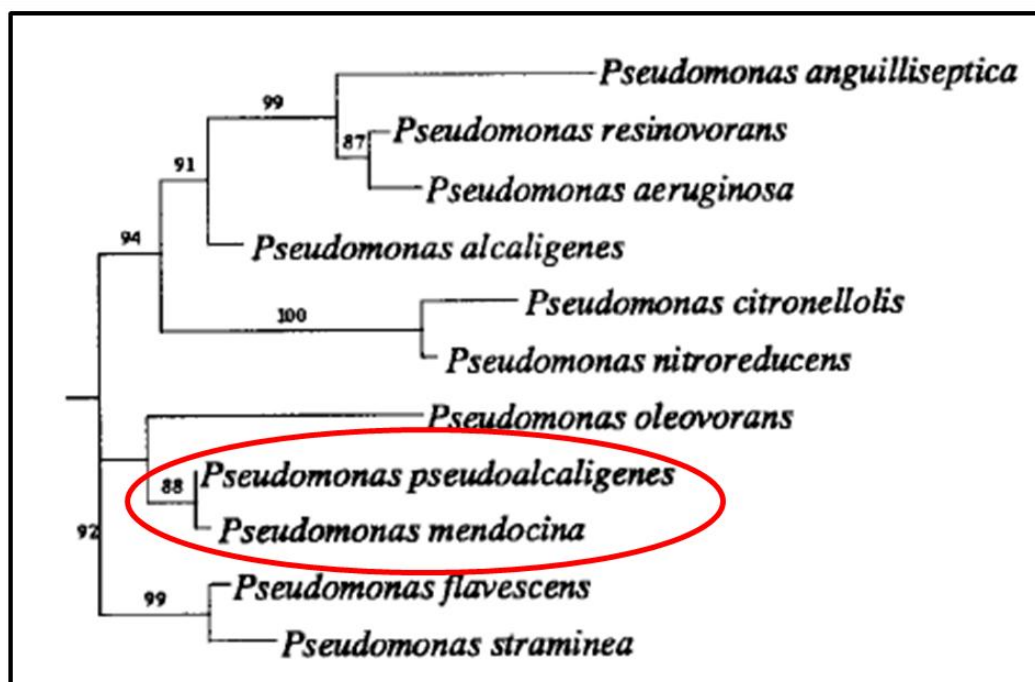
Εφ' όσον οι δυο αυτές ακολουθίες ομοιάζουν με την υπό μελέτη ακολουθία σε ποσοστό μεγαλύτερο από άλλες, ελέγχθηκαν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ειδών που ανήκουν τα δύο αυτά στελέχη και συγκρίθηκαν με αυτά του υπό μελέτη βακτηρίου. Το πρώτο στέλεχος ανήκει στο είδος *Pseudomonas mendocina* ενώ το δεύτερο στο είδος *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Eaton and Sandusky, 2008). Για να διαπιστωθεί εάν όντως το υπό μελέτη βακτήριο ανήκει σε κάποιο από αυτά τα δύο είδη ή αν είναι μη-ταυτοποιημένη *Pseudomonas* sp, συγκρίθηκαν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της *Pseudomonas mendocina* και της *Pseudomonas pseudoalcaligenes* με αυτά του υπό μελέτη βακτηρίου (Bergey's manual). Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι διαφορές που παρουσιάζουν τα

είδη στους συγκεκριμένους βιοχημικούς ελέγχους και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το υπό μελέτη βακτήριο δεν ανήκει ούτε στο είδος *Pseudomonas mendocina* ούτε στο είδος *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

Πίνακας 1 : Βιοχημικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη βακτηρίου που το διαφοροποιούν από τα είδη *P. mendocina* και *P. pseudoalcaligenes*.

	<i>P. mendocina</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	Υπό μελέτη βακτήριο
Υδρόλυση αμύλου	-	-	+
Υδρόλυση λεκιθίνης	-	-	+
Υδρόλυση L- ιστιδίνης	+	+	-
Καταβολισμός D- γλυκόζης	+	-	+

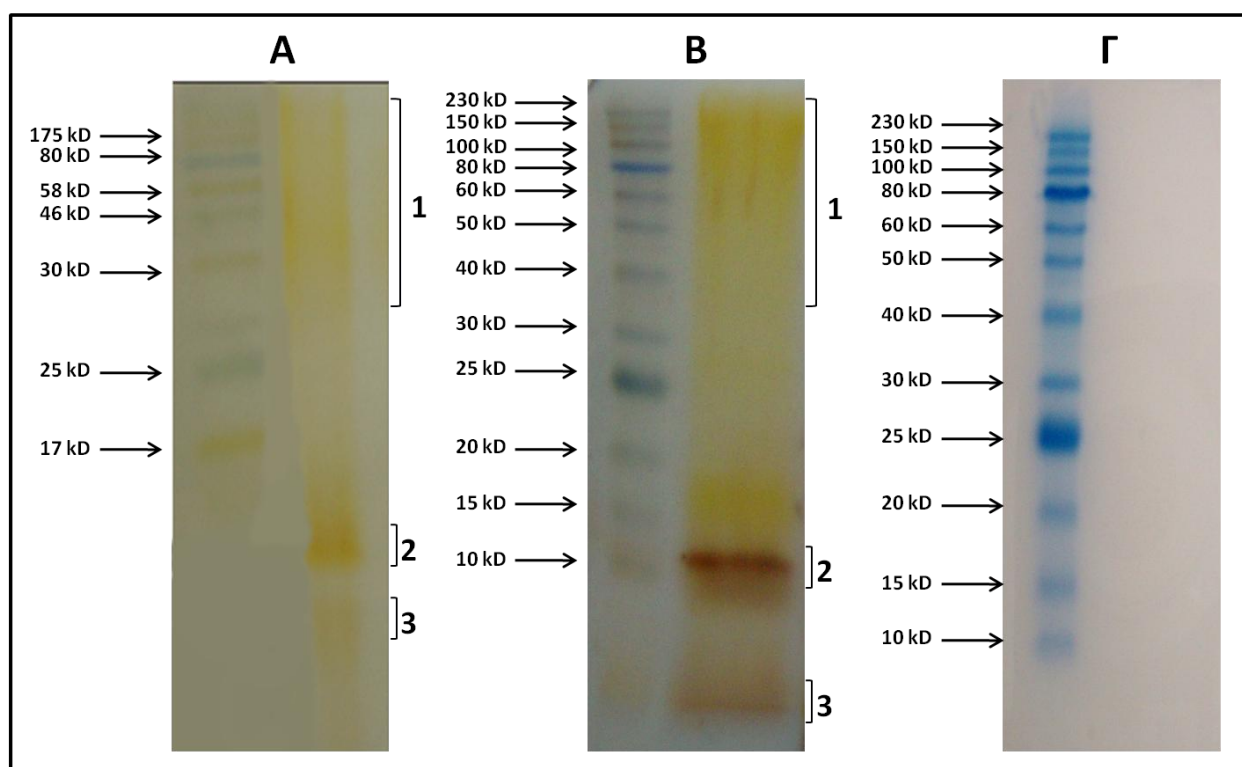
Έτσι, η φυλογενετική ανάλυση που έγινε με σύγκριση της ακολουθίας του 16S rRNA του βακτηρίου έδειξε ότι είναι ένα άγνωστο είδος *Pseudomonas*, το οποίο όμως είναι στενά συγγενικό με την *Pseudomonas mendocina* και την *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο του γένους *Pseudomonas* που προκύπτει από τις ομοιότητες της ακολουθίας του 16S rRNA. Οι τιμές bootstrap (από 80% και πάνω) εμφανίζονται στους κλάδους. Ως ρίζα του δέντρου χρησιμοποιείται ο μικροοργανισμός *E. coli* (V00348) (Anzai et al., 2000).

❖ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ ΤΗΣ *Pseudomonas* sp.

A) Η απομόνωση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) από τη βακτηριακή μεμβράνη της *Pseudomonas* sp. έγινε με τη μέθοδο των Eidhin και Mouton (Eidhin and Mouton, 1993). Οι LPS αναλύθηκαν σε 15% SDS-PAGE και στη συνέχεια χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο (Tsai and Frasch, 1981). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε έτοιμο παρασκεύασμα λιποπολυσακχαριτών του βακτηρίου *E. coli*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4 και δείχνουν τα ακόλουθα:

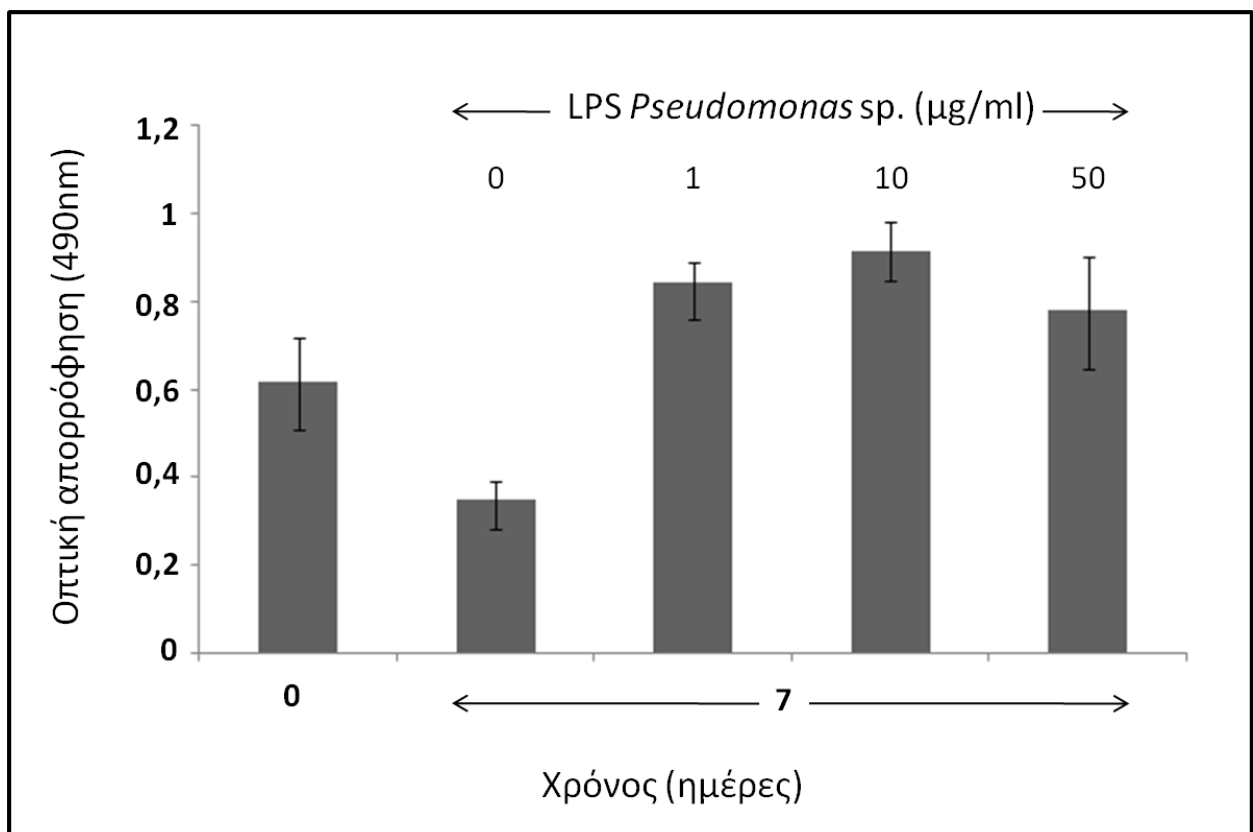


Εικόνα 4: Το πρότυπο λιποπολυσακχαριτών του *E. coli* (A) και της *Pseudomonas* sp. (B) σε 15% SDS-PAGE μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. (Γ) Χρώση των πηκτών (A και B) με coomassie blue.

Οι λιποπολυσακχαρίτες της *Pseudomonas* sp. (B) όπως και του *E. coli* (A) αποτελούνται από τρία διακριτά τμήματα (1-3). Το τμήμα 3, του οποίου το μέγεθος είναι μικρότερο από 10 kD αντιστοιχεί στο λιπίδιο A. Το τμήμα 2, του οποίου το μέγεθος είναι 10 kD αντιστοιχεί κυρίως στον κεντρικό πολυσακχαρίτη. Το ανώτερο τμήμα 3 αντιστοιχεί στο σύνολο του λιποπολυσακχαρίτη όπου, εάν ο O- ειδικός πολυσακχαρίτης αποτελείται από όμοιες, επαναλαμβανόμενες O- ειδικές ολιγοσακχαριτικές υπομονάδες (ομοπολυμερές) εμφανίζεται στην πηκτή με τη μορφή συμμ (όπως και στα A και B). Εάν οι

επαναλαμβανόμενες ολιγοσακχαριτικές υπομονάδες είναι διαφορετικές (ετεροπολυμερές), στην πηκτή εμφανίζονται πολλαπλές ζώνες (Sidhu et al., 2008). Συνεπώς, ο O- ειδικός πολυσακχαρίτης της *Pseudomonas* sp., είναι ομοπολυμερές. Μετά από χρώση των πηκτών Α και Β με coomasie blue (Εικόνα 4Γ), αποδεικνύεται η καθαρότητα του παρασκευάσματος των λιποπολυσακχαριτών ως προς πιθανή πρωτεϊνική επιμόλυνση.

Β) Στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν οι LPS της *Pseudomonas* sp. παρουσιάζουν τοξικότητα σε κύτταρα μυελού των οστών ποντικού (ΚΜΟ). Για τον έλεγχο τοξικότητας ΚΜΟ ποντικού εκτέθηκαν ή όχι (control, 0) για 7 ημέρες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις LPS της *Pseudomonas* sp. και στη συνέχεια αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών με τη μέθοδο MTS/PMS (Cory et al., 1991). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5 η έκθεση ΚΜΟ σε LPS της *Pseudomonas* sp. δεν οδήγησε σε τοξικότητα, αλλά αντίθετα οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των βιώσιμων κυττάρων (πάνω από 50%) συγκριτικά με το μάρτυρα.

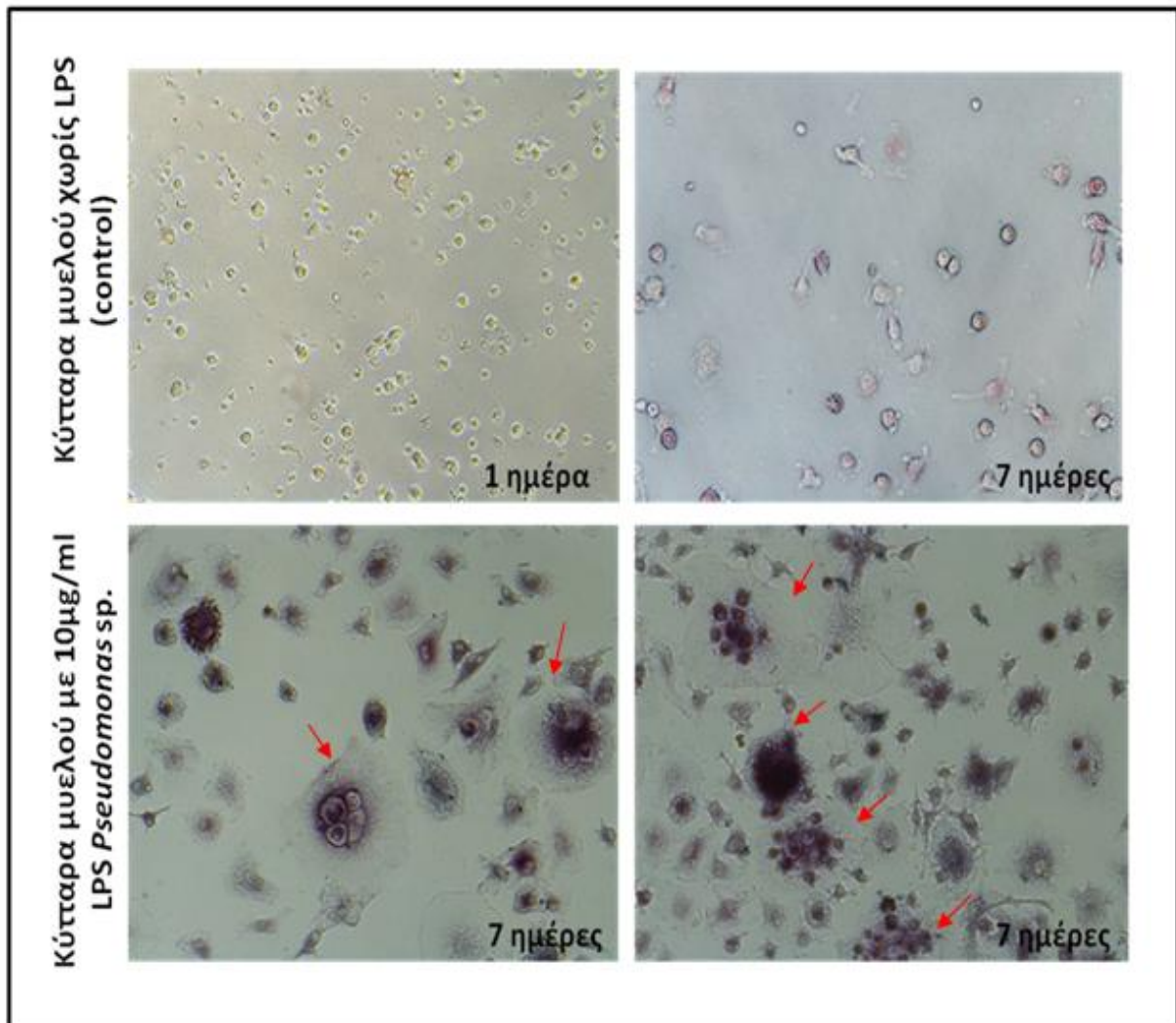


Εικόνα 5: Οι LPS της *Pseudomonas* sp. δεν είναι τοξικοί για τα κύτταρα μυελού των οστών ποντικού. Για τον έλεγχο τοξικότητας, κύτταρα μυελού των οστών ποντικού εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 1, 10 ή 50 µg/ml) LPS της *Pseudomonas* sp. και η βιωσιμότητα των κυττάρων μετρήθηκε με τη μέθοδο MTS/PMS στο χρόνο 0 και 7 ημέρες.

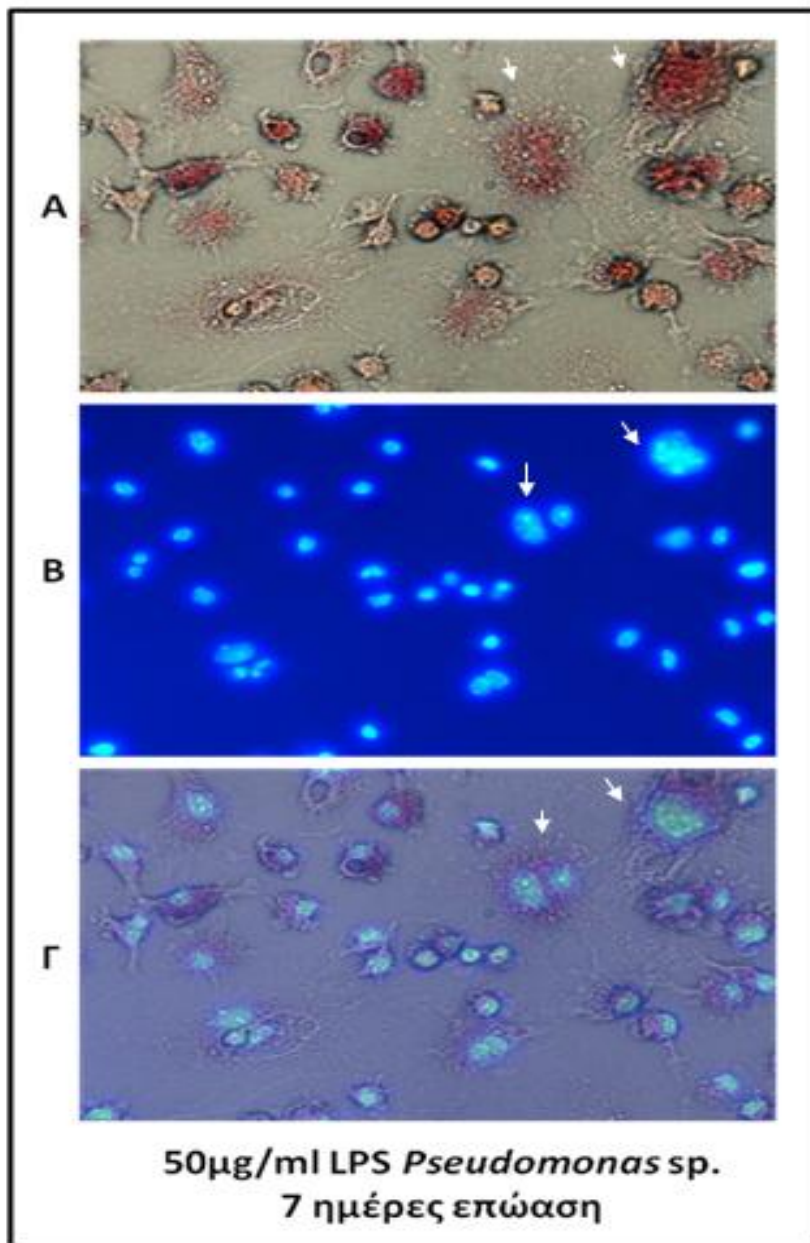
❖ ΟΙ LPS ΤΗΣ *Pseudomonas* sp. ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΕ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΔΟΣΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΤΡΟΠΟ

Πρόσφατα οι Zhuang et al. (2007), έδειξαν ότι οι LPS της *Pseudomonas aeruginosa* δεν μπορούν να διεγείρουν την οστεοκλαστογένεση σε προ-οστεοκλάστες (bone marrow monocytes). Στην συνέχεια οι Nason et al., (2009a), έδειξαν ότι οι LPS της *P. aeruginosa* μπορούν να διεγείρουν τον σχηματισμό οστεοκλαστών από προ-οστεοκλάστες, μόνον εάν έχει προηγηθεί επώαση των προ-οστεοκλαστών με υπο-οστεοκλαστογόνες δόσεις RANKL και M-CSF και στην συνέχεια προστεθούν οι LPS της *P. aeruginosa*.

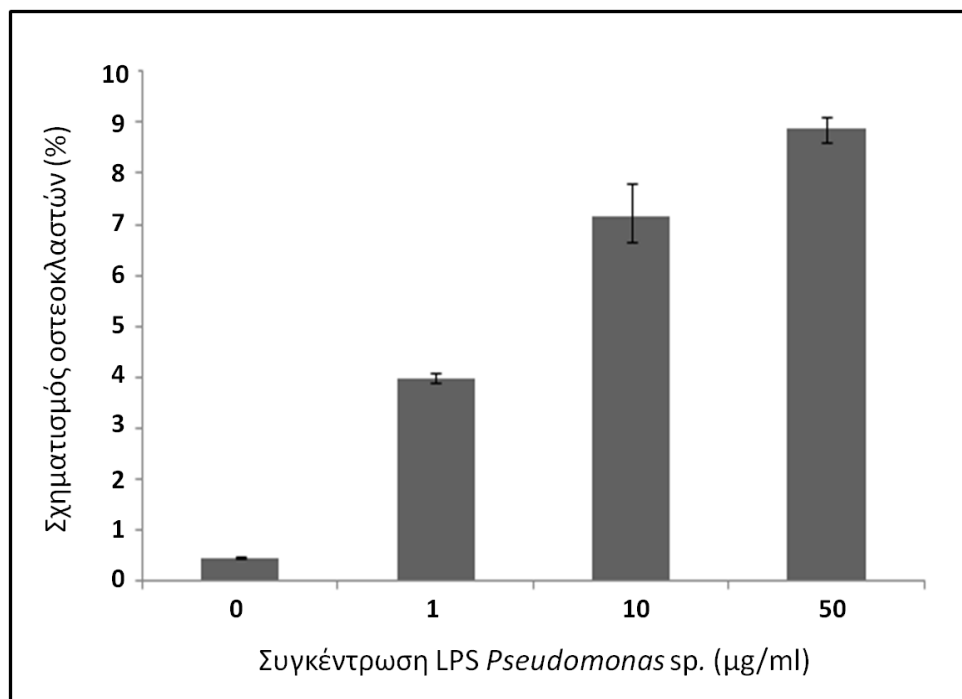
Για να διαπιστωθεί εάν οι LPS της *Pseudomonas* sp. μπορούν να οδηγήσουν σε οστεοκλαστογένεση, χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική πειραματική προσέγγιση από τις προαναφερθείσες, με στόχο να προσομοιάζει ως ένα βαθμό με τις *in vivo* συνθήκες, στην περίπτωση μόλυνσης με το βακτήριο αυτό. Έτσι, ΚΜΟ ποντικών εκτέθηκαν ή όχι (μάρτυρας) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 1, 10 και 50 $\mu\text{g/ml}$) LPS της *Pseudomonas* sp. και στη συνέχεια ελέγχθηκε ο σχηματισμός οστεοκλαστών και μετρήθηκε το ποσοστό (%) των οστεοκλαστών που σχηματίστηκαν σε κάθε περίπτωση συγκριτικά με το μάρτυρα. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό οστεοκλαστογένεσης συμβαίνει στο χρονικό όριο των 7 ημερών και έτσι το χρονικό αυτό όριο έκθεσης στους LPS (7 ημέρες) διατηρήθηκε στα επόμενα πειράματα. Μετά το τέλος της επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και εφαρμόστηκε ειδική χρώση για την ανίχνευση της TRAcP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase), που είναι ο κύριος δείκτης των οστεοκλαστών και ταυτόχρονα έγινε χρώση των πυρήνων με DAPI. Ως οστεοκλάστες, χαρακτηρίστηκαν μεγάλα πολυπύρρηνα (≥ 3 πυρήνες) κύτταρα που παράλληλα παράγουν TRAcP, όπως προηγουμένως έχει αναφερθεί (Nason et al., 2009a; Zhuang et al., 2007). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 6A, 6B και 6Γ και δείχνουν τα ακόλουθα: (α) έκθεση των ΚΜΟ στους LPS της *Pseudomonas* sp. οδηγεί στο σχηματισμό οστεοκλαστών, αφού παρατηρούνται γιγαντιαία πολυπύρρηνα κύτταρα, θετικά ως προς την TRAcP (Εικόνες 6A, 6B). Στο μάρτυρα (απουσία LPS της *Pseudomonas* sp.) ανιχνεύθηκαν οστεοκλάστες, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό (0.3%) και σε μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με αυτούς που παρατηρήθηκαν στην παρουσία των LPS. (β) Οι LPS της *Pseudomonas* sp. προκαλούν δοσοεξαρτώμενη επαγωγή των οστεοκλαστών (Εικόνα 6Γ). Έτσι, 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS της *Pseudomonas* sp., οδηγούν το 9% των ΚΜΟ να διαφοροποιηθούν σε οστεοκλάστες.



Εικόνα 6Α: Έκθεση κυττάρων μυελού των οστών (ΚΜΟ) ποντικού σε LPS της *Pseudomonas* sp. οδηγούν σε οστεοκλαστογένεση. ΚΜΟ εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 10 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. ή όχι (μάρτυρας) και μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε χρώση για τον δείκτη των οστεοκλαστών TRAcP (τα θετικά ως προς TRAcP κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα). Τα βέλη δείχνουν οστεοκλάστες (μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα και θετικά ως προς TRAcP).

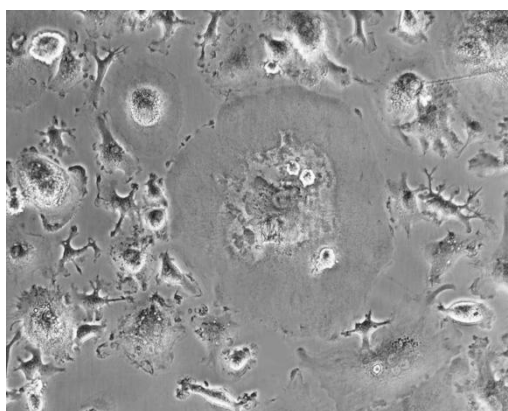


Εικόνα 6B: Έκθεση κυττάρων μυελού των οστών (ΚΜΟ) ποντικού σε LPS της *Pseudomonas* sp. οδηγούν σε οστεοκλαστογένεση. ΚΜΟ εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. και μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε χρώση για τον δείκτη των οστεοκλαστών TRAcP (τα θετικά ως προς TRAcP κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα) (A), ή χρώση πυρήνων με DAPI (B). (Γ): ταυτόχρονη απεικόνιση των εικόνων (A) και (B). Τα βέλη δείχνουν οστεοκλάστες.



Εικόνα 6Γ : Έκθεση κυττάρων μυελού των οστών (ΚΜΟ) ποντικού σε LPS της *Pseudomonas* sp. οδηγεί στο σχηματισμό οστεοκλαστών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. ΚΜΟ εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 0 (μάρτυρας), 1, 10 ή 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. και μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε χρώση για TRAcP και για πυρήνες (DAPI). Η μέτρηση των οστεοκλαστών έγινε με την ταυτόχρονη απεικόνιση φωτογραφιών κυττάρων τα οποία είχαν χρωματιστεί για για TRAcP ή για πυρήνες (DAPI), με την χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop. Σε κάθε περίπτωση φωτογραφήθηκαν 10 τυχαία οπτικά πεδία ανά τρυβλίο και χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία για κάθε συγκέντρωση LPS. Οι τιμές που αναφέρονται είναι ο μέσος όρος 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

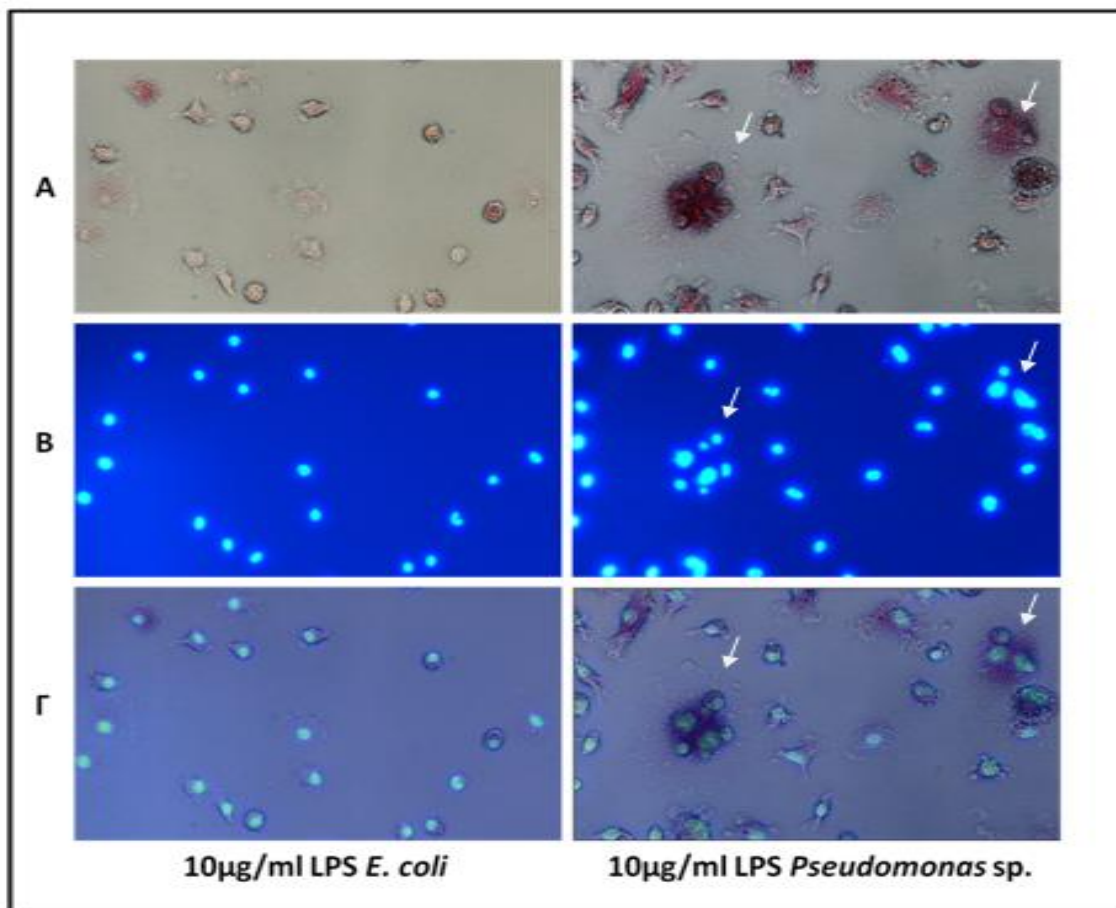
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, εκτεταμένη έκθεση ΚΜΟ στους LPS της *Pseudomonas* sp. οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των οστεοκλαστών.



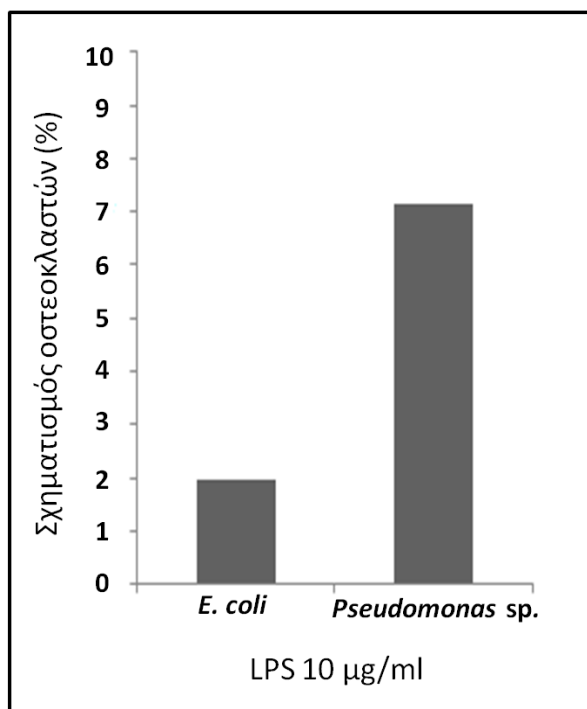
Εικόνα 7: Οστεοκλάστης που σχηματίστηκε μετά από έκθεση κυττάρων μυελού των οστών ποντικού σε 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. για 22 ημέρες. Μεγέθυνση 40X.

❖ Η ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ LPS ΤΟΥ *E. coli*

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το ερώτημα εάν οι LPS άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων οδηγούν στη διαφοροποίηση των ΚΜΟ σε οστεοκλάστες. Για να διερευνηθεί το ερώτημα αυτό ΚΜΟ ποντικών εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 10 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. ή σε LPS του Gram αρνητικού βακτηρίου *Escherichia coli* και στη συνέχεια εκτιμήθηκε το ποσοστό των σχηματιζόμενων οστεοκλαστών. Τα αποτελέσματα (Εικόνες 6Δ και 6Ε) δείχνουν ότι οι LPS του βακτηρίου *E. coli* προκαλούν τον σχηματισμό οστεοκλαστών σε ποσοστό μεγαλύτερο του μάρτυρα, αλλά πολύ μικρότερο (3.5 φορές λιγότερο) από αυτόν που επάγεται από τους LPS της *Pseudomonas* sp. Συνεπώς φαίνεται ότι οι LPS των Gram αρνητικών βακτηρίων έχουν την ικανότητα να επάγουν οστεοκλαστογένεση, η οποία εξαρτάται από την ιδιαίτερη σύσταση του κάθε LPS, τόσο σε επίπεδο σακχάρων όσο και σε επίπεδο λιπαρών οξέων.



Εικόνα 6Δ: Κύτταρα μυελού των οστών ποντικού (ΚΜΟ) εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 10 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. ή του *E. coli* και μετά έγινε χρώση είτε για TRAcP (Α) ή για πυρήνες με DAPI (Β). (Γ): ταυτόχρονη απεικόνιση των φωτογραφιών (Α) και (Β) με τη βοήθεια του προγράμματος Adobe Photoshop για την καταμέτρηση των οστεοκλαστών. Τα βέλη δείχνουν οστεοκλάστες (μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα θετικά ως προς TRAcP).

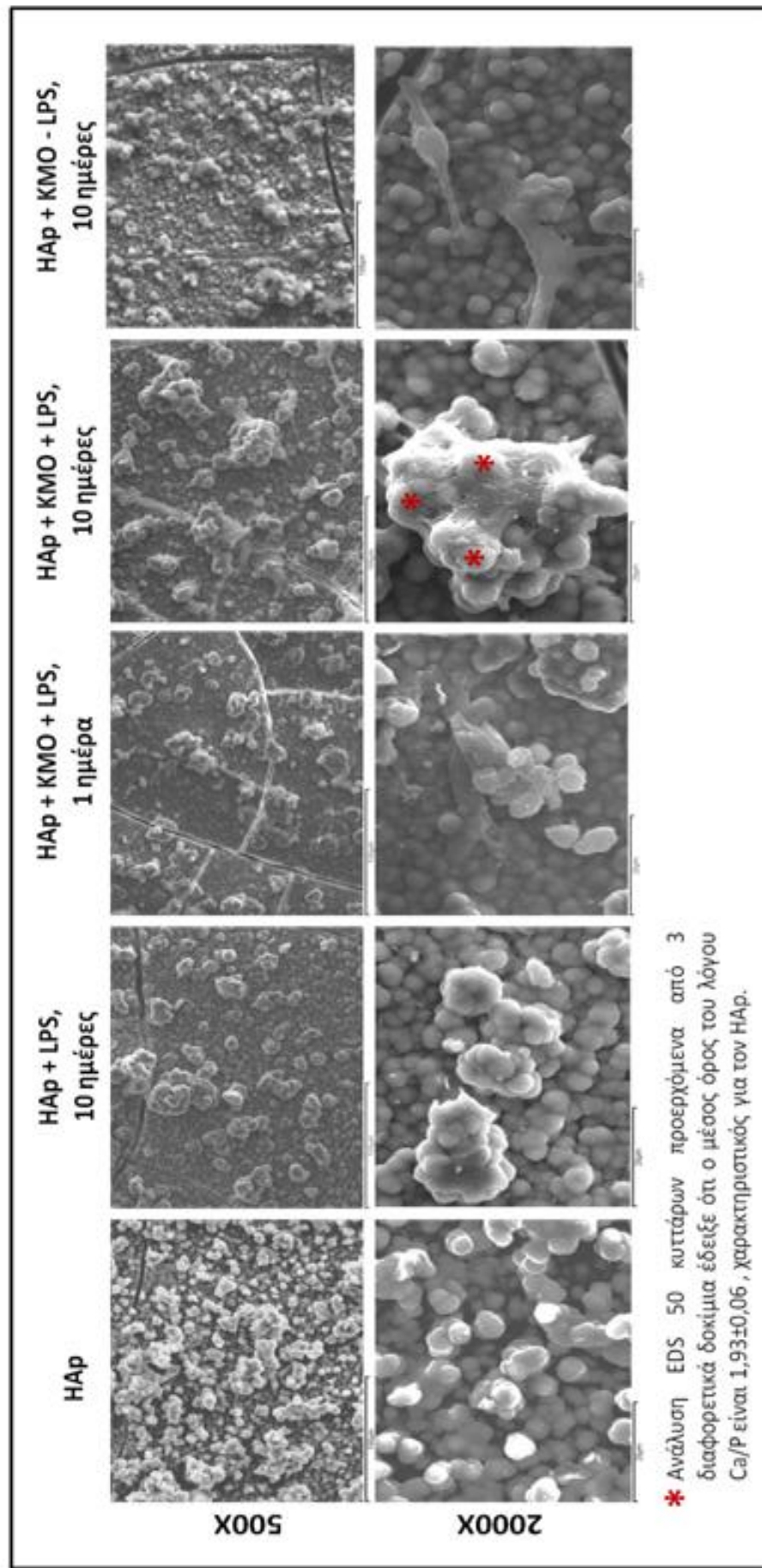


Εικόνα 6Ε: Ποσοστό (%) σχηματισμού οστεοκλαστών από κύτταρα μυελού των οστών ποντικού τα οποία εκτέθηκαν για 7 ημέρες σε 10 µg/ml LPS της *Pseudomonas sp.* ή του *E. coli*. Σε κάθε περίπτωση φωτογραφήθηκαν 10 τυχαία οπτικά πεδία ανά τρυβλίο και χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία για κάθε συγκέντρωση LPS. Οι τιμές που αναφέρονται είναι ο μέσος όρος 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

❖ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ ΑΠΟ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ LPS ΤΗΣ *Pseudomonas sp.*

Το κύριο χαρακτηριστικό των οστεοκλαστών είναι η οστική απορρόφηση (Nason et al., 2009; Monchau et al., 2002; Spence et al., 2008). Για να ελεγχθεί εάν οι επαγόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas sp.* οστεοκλάστες έχουν την ικανότητα οστικής απορρόφησης, δημιουργήθηκε ένα *in vitro* σύστημα προσομοίωσης του υδροξυαπατίτη (HAp), ο οποίος αποτελεί το ανόργανο τμήμα του οστού. Το σύστημα αυτό αποτελείται από δοκίμια βιοϋάλου (bioglass), στην επιφάνεια των οποίων σχηματίστηκε στρώμα υδροξυαπατίτη μετά από εμβάπτισή τους σε c-SBF (Simulated Body Fluid) για 4 ημέρες στους 37°C (Chen et al., 2006). Στην συνέχεια, τα δοκίμια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί εάν οι παραγόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas sp.* οστεοκλάστες προσκολλώνται στον υδροξυαπατίτη (HAp), που είναι το πρώτο βήμα για την απορρόφηση του HAp. Για αυτόν

τον λόγο ΚΜΟ ποντικού επώαστηκαν στην παρουσία ή όχι LPS της *Pseudomonas* sp. για 1 ή 10 ημέρες και στην συνέχεια ελήφθησαν φωτογραφίες SEM από κάθε περίπτωση. Επίσης έγινε EDS ανάλυση σε 30 σημεία από κάθε δοκίμιο για να διαπιστωθεί η παρουσία ΗΑρ στην επιφάνεια των δοκιμίων. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 8 και Πίνακας 2) δείχνουν τα ακόλουθα: (α) πάνω στην επιφάνεια των δοκιμίων αναφοράς σχηματίστηκαν σφαιρίδια ΗΑρ (Εικόνα 8, ΗΑρ). Η παρουσία του ΗΑρ προσδιορίστηκε με ανάλυση EDS (Πίνακας 2) και δείχνει ότι ο λόγος Ca/P είναι 1.78 ± 0.09 . Μια ασβεστοφωσφορική ένωση χαρακτηρίζεται ως ΗΑρ όταν ο λόγος Ca/P κυμαίνεται από 1.2 μέχρι 2.5, με άριστη την τιμή 1.67, ενώ όταν ο λόγος Ca/P αποκλίνει από τις προαναφερθείσες τιμές τότε πρόκειται για κάποια άλλη ασβεστοφωσφορική ένωση και όχι για ΗΑρ (Mossaad 2010). Συνεπώς, οι μικρές διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στον λόγο Ca/P (Πίνακας 2) μεταξύ των δοκιμίων που υπέστησαν διαφορετικές επεξεργασίες κυμαίνονται στα φυσιολογικά όρια και πιστοποιούν ότι σε όλα τα δοκίμια σχηματίστηκε ΗΑρ, με την αναμενόμενη κρυσταλλική δομή (σφαιρίδια ΗΑρ). (β) Όταν τα δοκίμια επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με LPS της *Pseudomonas* sp. (μάρτυρας), δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην μορφολογία ή τη σύσταση του ΗΑρ (Εικόνα 8, Πίνακας 2), συγκριτικά με τα δοκίμια αναφοράς. (γ) Από την πρώτη ημέρα της επώασης παρατηρήθηκε ότι τα ΚΜΟ προσκολλήθηκαν στον ΗΑρ. Επώαση των ΚΜΟ στην παρουσία των LPS της *Pseudomonas* sp. οδήγησε στον σχηματισμό γιγαντιαίων κυττάρων τα οποία εγκολπώνουν μεγάλο αριθμό σφαιριδίων ΗΑρ (Εικόνα 8, στήλη 4). Τα σφαιρίδια αυτά είναι πράγματι ΗΑρ γιατί ανάλυση EDS, 50 κυττάρων που προέρχονται από 3 δοκίμια έδειξε ότι η μέση τιμή του λόγου Ca/P των εγκολπωμένων σφαιριδίων είναι 1.93 ± 0.06 . Ακόμη είναι χαρακτηριστικό ότι τα κύτταρα αυτά δημιουργούν κυτταρικές προεκβολές κατευθυνόμενες σε νέα σφαιρίδια ΗΑρ. (δ) Αντίθετα, εγκόλπωση ΗΑρ δεν παρατηρήθηκε όταν ΚΜΟ επώαστηκαν στην απουσία των LPS της *Pseudomonas* sp. Συνεπώς οι παραγόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες εγκολπώνουν ΗΑρ, και ενδεχομένως έχουν την ικανότητα απορρόφησης Ca και P.



Εικόνα 8: Φωτογραφίες από SEM δοκιμών bioglass. Δοκίμια-μάρτυρες στα οποία σχηματίστηκε στρώμα υδροξυαπατίτη (HAp) στην επιφάνειά τους. Τα δοκίμια επωάστηκαν για 1 ή 10 ημέρες με κύτταρα μυελού των οστών ποντικού (KMO) με 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS *Pseudomonas* sp. (HAp+KMO+LPS) ή όχι (HAp+KMO-LPS) ή μόνο με LPS (HAp+LPS). Μεγέθυνσεις 500X και 2000X.

Πίνακας 2: Ανάλυση EDS της επιφανειακής σύστασης των δοκιμίων ως προς τα ανόργανα στοιχεία Ca και P.

	Ca	P	Ca/P
HAρ 4 ημέρες στο c-SBF¹	33,83±1,12	18,97±0,36	1,78±0,09
HAρ + KMO + LPS, 1 ημέρα επώαση²	18,9±1,9	13,4±0,61	1,8±0,1
HAρ + KMO + LPS, 10 ημέρες επώαση³	36,67±1,4	18,99±0,35	1,93±0,06
HAρ + KMO - LPS, 10 ημέρες επώαση⁴	37,64±1,24	20,33±0,38	1,85±0,03

¹ Δοκίμια βιοϋάλου εμβαπτίστηκαν για 4 ημέρες στο c-SBF.

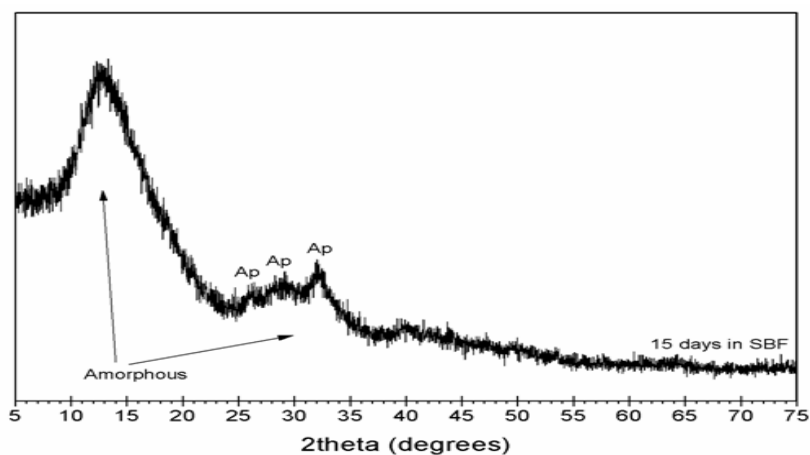
² Δοκίμια βιοϋάλου εμβαπτίστηκαν για 4 ημέρες στο c-SBF και αφού προστέθηκαν KMO και 50 μg/ml LPS- *Pseudomonas* sp. επώαστηκαν για 1 ημέρα.

³ Δοκίμια βιοϋάλου εμβαπτίστηκαν για 4 ημέρες στο c-SBF και αφού προστέθηκαν KMO και 50 μg/ml LPS- *Pseudomonas* sp. επώαστηκαν για 10 ημέρες.

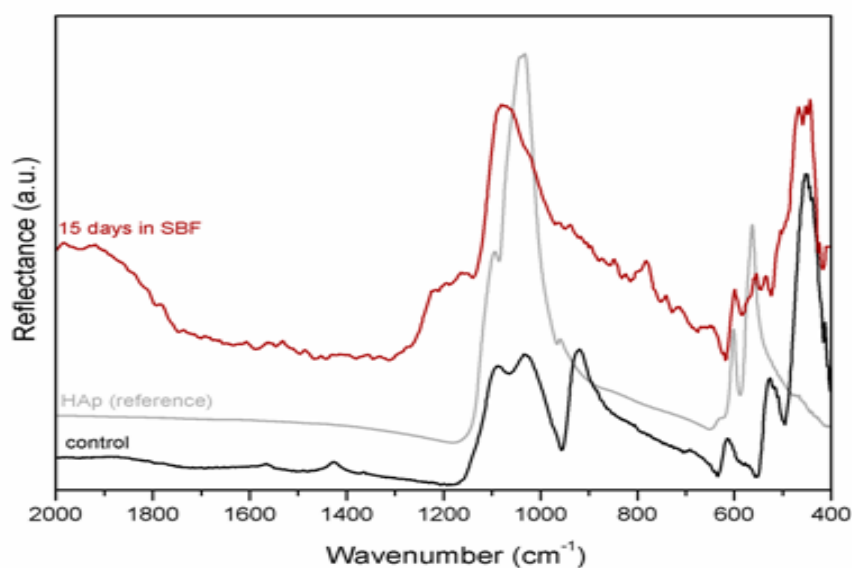
⁴ Δοκίμια βιοϋάλου εμβαπτίστηκαν για 4 ημέρες στο c-SBF και αφού προστέθηκαν KMO επώαστηκαν για 10 ημέρες.

Για να διερευνηθεί η πιθανότητα αυτή, κατασκευάστηκαν δοκίμια βιοϋάλου (bioglass) τα οποία εμβαπτίστηκαν σε c-SBF (Simulated Body Fluid) για 15 ημέρες στους 37°C (Chen et al., 2006) με στόχο να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια τους με στρώμα HAρ, έτσι ώστε να γίνει ορατή η πιθανή απορρόφηση του HAρ από τους οστεοκλάστες. Ο σχηματισμός HAρ στην επιφάνεια των δοκιμίων ελέγχθηκε με περίθλαση ακτίνων X (XRD) και με φασματοφωτομετρία υπερύθρου (FTIR). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 9 και 10 δημιουργήθηκε στρώμα υδροξυαπατίτη που κάλυψε την επιφάνεια των δοκιμίων. Τα δοκίμια αυτά επώαστηκαν είτε μόνο με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με LPS της *Pseudomonas* sp. (μάρτυρας) ή επώαστηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο με την παρουσία των KMO. Μετά το τέλος της επώασης, όλα τα δοκίμια (μάρτυρες και δοκίμια ελέγχου) υπέστησαν κατεργασία για την απομάκρυνση των κυττάρων από την επιφάνεια των δοκιμίων και στην συνέχεια ελήφθησαν φωτογραφίες SEM. Παράλληλα συλλέχθηκε (ανά 2 ημέρες) το υπερκείμενο των καλλιέργειών αυτών (μάρτυρας και δοκίμιο ελέγχου) για να μετρηθεί και να συγκριθεί η ποσότητα φωσφόρου σε αυτά. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 11 και 12) δείχνουν τα ακόλουθα: (α) παρατηρήθηκε χαρακτηριστική απορρόφηση του HAρ μετά την απομάκρυνση των κυττάρων από τα δοκίμια (Εικόνα 11Γ), όπως και πολλαπλές οπές στον HAρ (Εικόνα 11Δ), οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν στον μάρτυρα. Ακόμη, EDS

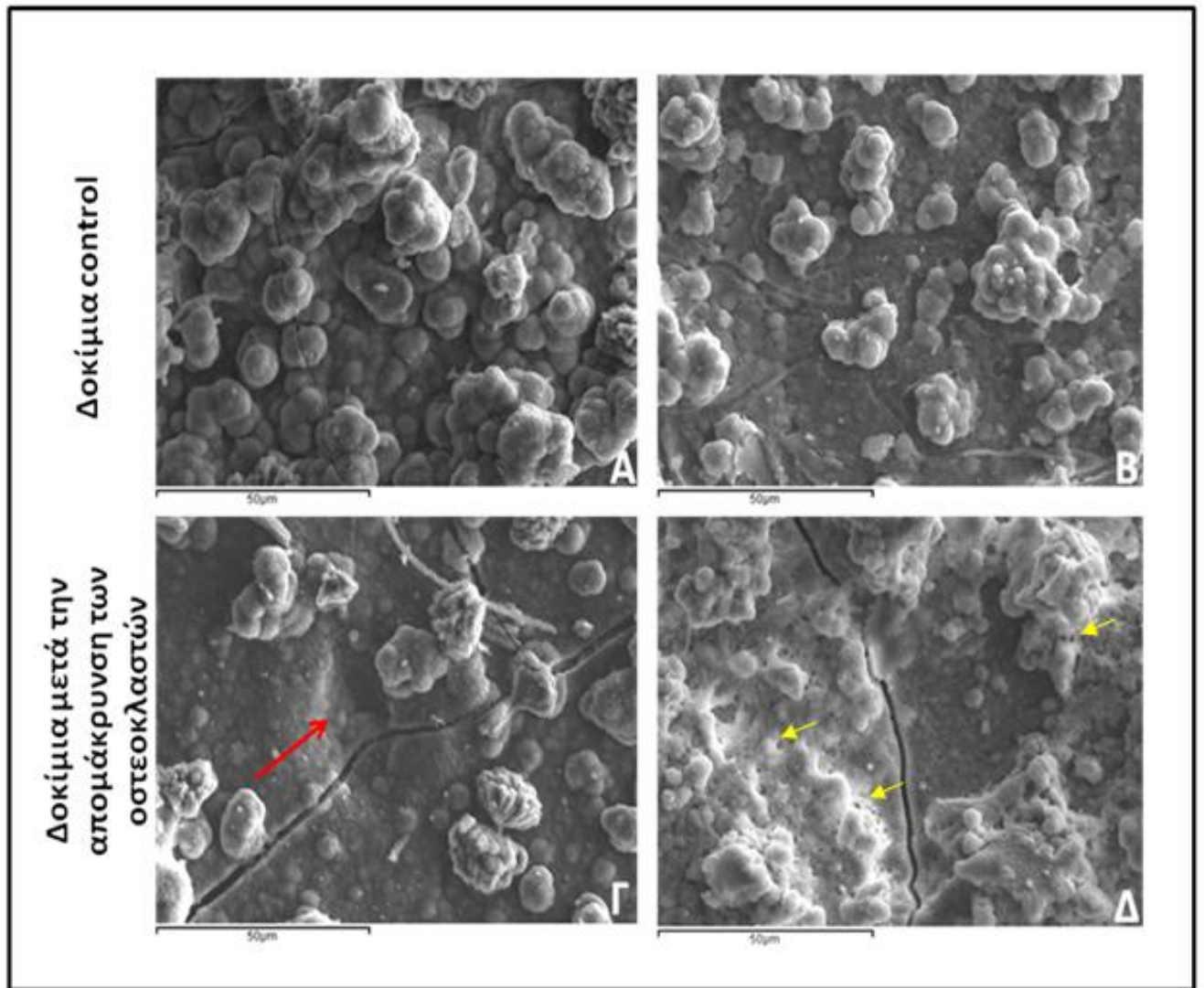
ανάλυση από 80 τυχαία σημεία που προήλθαν από 3 δοκίμια μετά την απομάκρυνση των κυττάρων έδειξε ότι στο 30% των σημείων που αναλύθηκαν ο λόγος Ca/P απείχε κατά πολύ από τις επιτρεπτές τιμές του ΗΑρ. Έτσι, στο 16.25% από αυτά ο λόγος Ca/P κυμαινόταν από 2.51 μέχρι 4, στο 5% κυμαινόταν από 4.1 μέχρι 15 και στο 7.5% δεν ανιχνεύθηκε φώσφορος (Εικόνα 12). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ένα μέρος της επιφάνειας των δοκιμίων αυτών έχει υποστεί σοβαρές αλλοιώσεις στον ΗΑρ, οι οποίες οφείλονται στους οστεοκλάστες, δεδομένου ότι ο λόγος Ca/P στον μάρτυρα είχε φυσιολογικές τιμές (1.63 ± 0.14). (β) Επίσης, διαπιστώθηκε διπλάσια ποσότητα φωσφόρου στο υπερκείμενο των καλλιεργείων ΚΜΟ στην παρουσία των LPS της *Pseudomonas* sp., συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 13) και ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Monchau et al., 2002). Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι οι παραγόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες έχουν την ικανότητα απορρόφησης ΗΑρ.



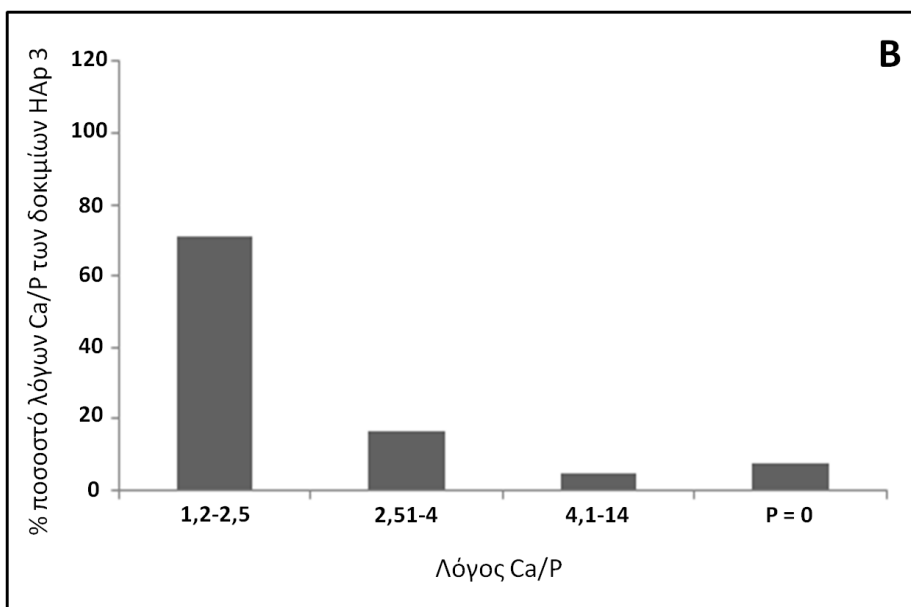
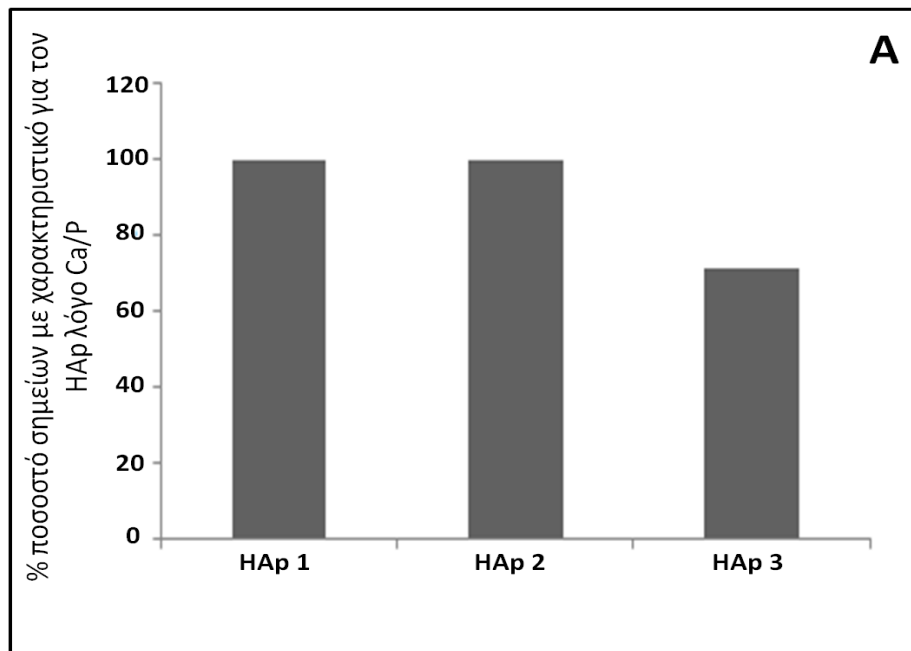
Εικόνα 9: XRD ακτινογράφημα σε δοκίμια βιοϋάλου που επώαστηκαν για 15 ημέρες σε SBF.



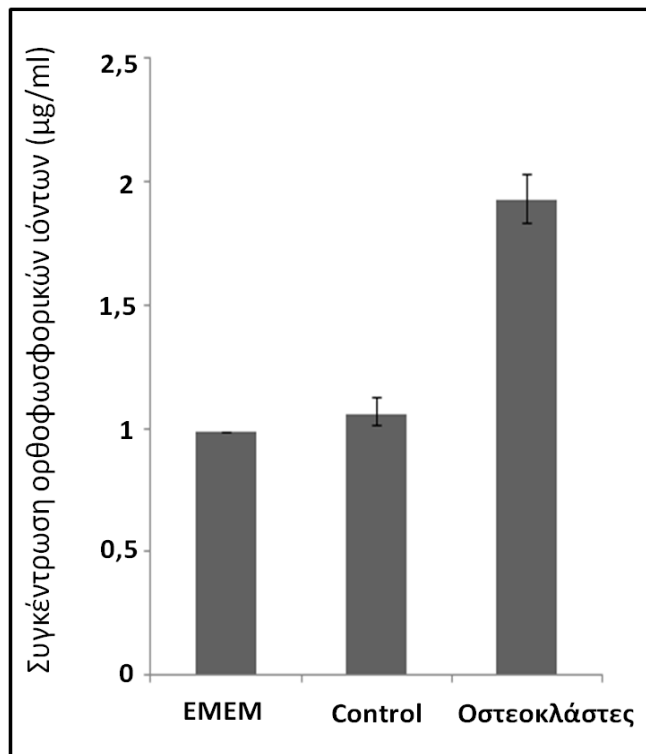
Εικόνα 10: FTIR φάσματα δοκιμίων βιοϋάλου που επώαστηκαν για 15 ημέρες σε SBF.



Εικόνα 11: Φωτογραφίες από SEM δοκιμίων βιοϋάλου. Τα δοκίμια παρέμειναν για 15 ημέρες στο c-SBF και σχηματίστηκε πλήρες στρώμα υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά τους (A). Δοκίμια επώσθησαν με κύτταρα μυελού των οστών ποντικού και 50 μg/ml LPS *Pseudomonas* sp. (Γ, Δ) ή μόνον με LPS *Pseudomonas* sp. (B) και στο τέλος της επώασης τα δοκίμια (B, Γ και Δ) υπέστησαν επεξεργασία για την απομάκρυνση των κυττάρων. Το κόκκινο βέλος δείχνει το αποτύπωμα ενός οστεοκλάστη, και τα κίτρινα βέλη δείχνουν οπές στη επιφάνεια του ΗΑρ που σχηματίστηκαν εξ' αιτίας της απορροφητικής δράσης των οστεοκλαστών. Μεγέθυνση 1000X.

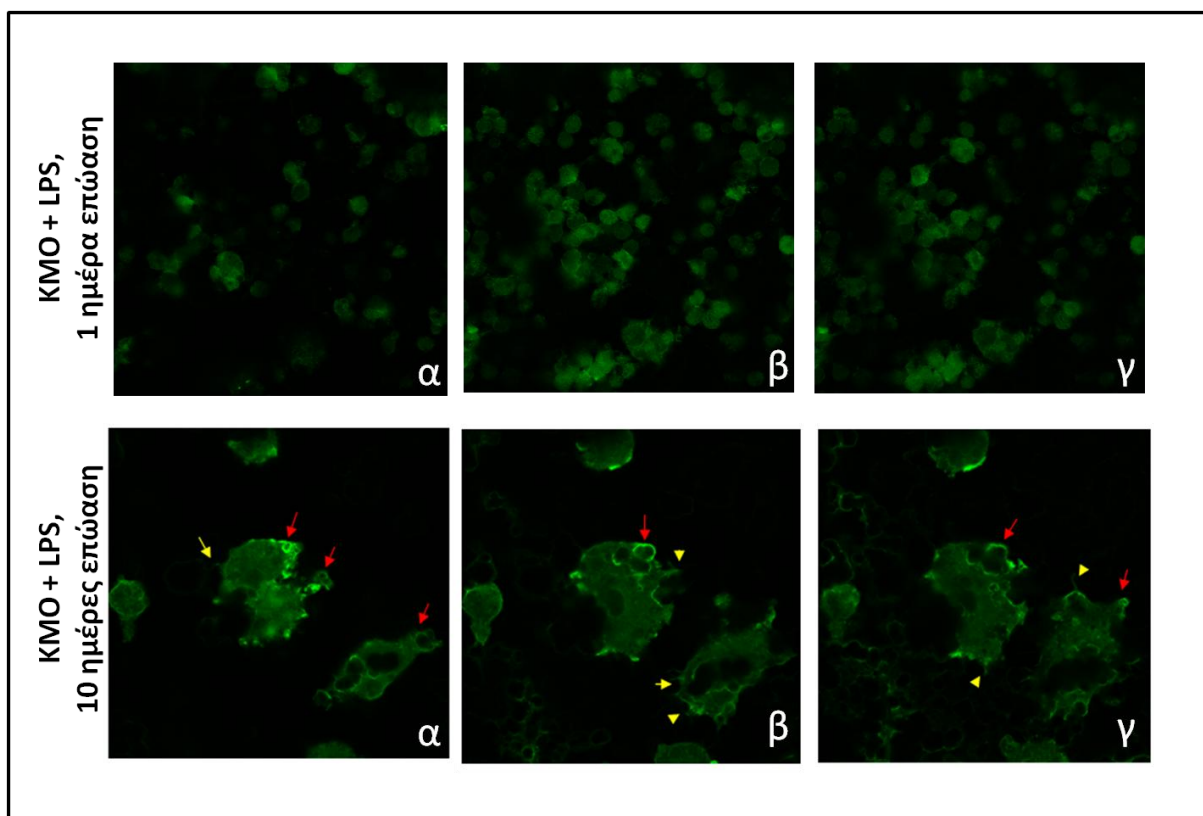


Εικόνα 12: Α) Σύγκριση της επιφανειακής σύστασης δοκιμίων ως προς το λόγο Ca/P. Η ανάλυση της επιφανειακής σύστασης έγινε με EDS σε 80 τυχαία σημεία που προήλθαν από 3 δοκίμια από κάθε περίπτωση. ΗΑρ 1: δοκίμια αναφοράς, ΗΑρ 2: δοκίμια που επώαστηκαν για 10 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με LPS *Pseudomonas* sp., ΗΑρ 3: δοκίμια που επώαστηκαν για 10 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με LPS *Pseudomonas* sp και ΚΜΟ. Τα ΗΑρ 2 και ΗΑρ 3, υπέστησαν την ίδια κατεργασία για την απομάκρυνση των κυττάρων από την επιφάνεια του ΗΑρ. Ο χαρακτηριστικός για τον ΗΑρ λόγος Ca/P κυμαίνεται από 1.2 μέχρι 2.5. Β: Ομαδοποίηση των τιμών του λόγου Ca/P των δοκιμίων ΗΑρ 3.



Εικόνα 13: Συγκέντρωση ορθοφωσφορικών ιόντων σε καλλιέργειες κυττάρων μυελού των οστών (ΚΜΟ). ΚΜΟ εκτέθηκαν σε 50 μg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. (οστεοκλάστες) ή όχι (control) για 10 ημέρες και συλλέχθηκε (κάθε 2 ημέρες) το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο. Στο τέλος της επώασης μετρήθηκε συνολικά η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων που απελευθερώθηκαν από κάθε δείγμα. Επίσης μετρήθηκε η συγκέντρωση ορθοφωσφορικών ιόντων στο θρεπτικό μέσο (EMEM με 10% FCS).

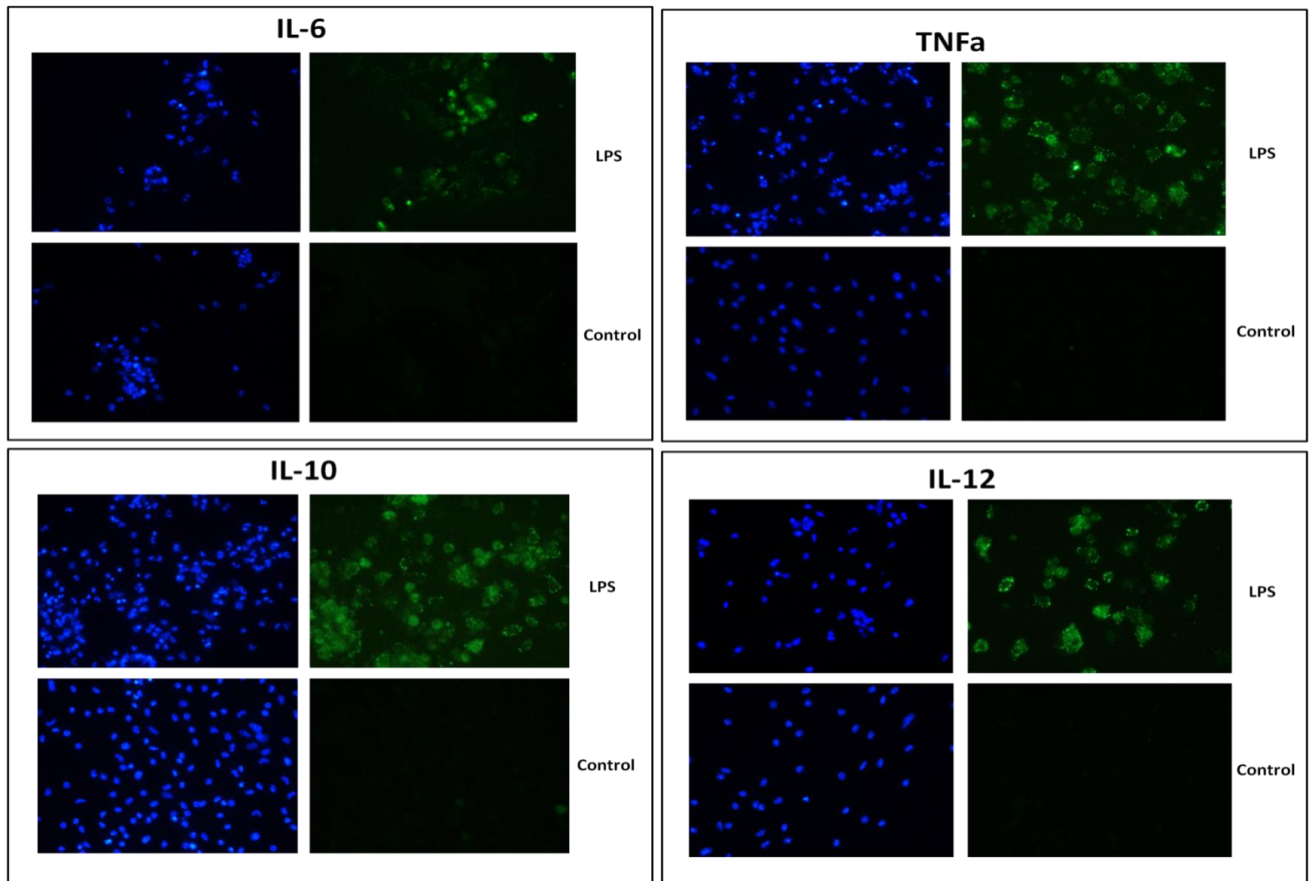
Έχει αναφερθεί, ότι οι περιοχές στις οποίες γίνεται οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες, περιβάλλονται από ένα χαρακτηριστικό δακτύλιο ακτίνης (Monchau et al., 2002; Spence et al., 2008). Έτσι, ΚΜΟ προστέθηκαν σε δοκίμια και εκτέθηκαν στους LPS της *Pseudomonas* sp., για 1 ή 10 ημέρες και στην συνέχεια έγινε ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του χαρακτηριστικού δακτυλίου ακτίνης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, οι παραγόμενοι από τους LPS της *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες σχηματίζουν πολλαπλούς δακτυλίους ακτίνης που βρίσκονται σε διαφορετικά επίπεδα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν δακτύλιοι ακτίνης την πρώτη ημέρα επώασης.



Εικόνα 14: Δοκίμια βιοϋάλου επώαστηκαν με ΚΜΟ και με 50 µg/ml LPS *Pseudomonas* sp. για 1 (control) ή 10 (οστεοκλάστες) ημέρες. Οι δακτύλιοι ακτίνης ανιχνεύθηκαν με μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης με λέιζερ (confocal) σε διαφορετικά επίπεδα (α, β ή γ) των δοκιμίων. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν δακτυλίους ακτίνης και τα κίτρινα δείχνουν κυτταρικές προεκβολές.

❖ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ ΠΡΟ- ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

Επειδή έχει διαπιστωθεί ο σημαντικός ρόλος των κυτοκινών στην οστεοκλαστογένεση (Nason et al., 2009a) ελέγχθηκε εάν απελευθερώνονται κυτοκίνες από τους προ-οστεοκλάστες. Έτσι, ΚΜΟ εκτέθηκαν για 4 ημέρες σε 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. και μετά την απομάκρυνση των LPS εκτιμήθηκε με ανοσοφθορισμό η απελευθέρωση των κυτοκινών TNF-α, IL-6, IL-10 και IL-12 από τους προ-οστεοκλάστες. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 15) έδειξαν ότι όλες οι κυτοκίνες που ελέγχθηκαν εκκρίνονται από τους προ-οστεοκλάστες.

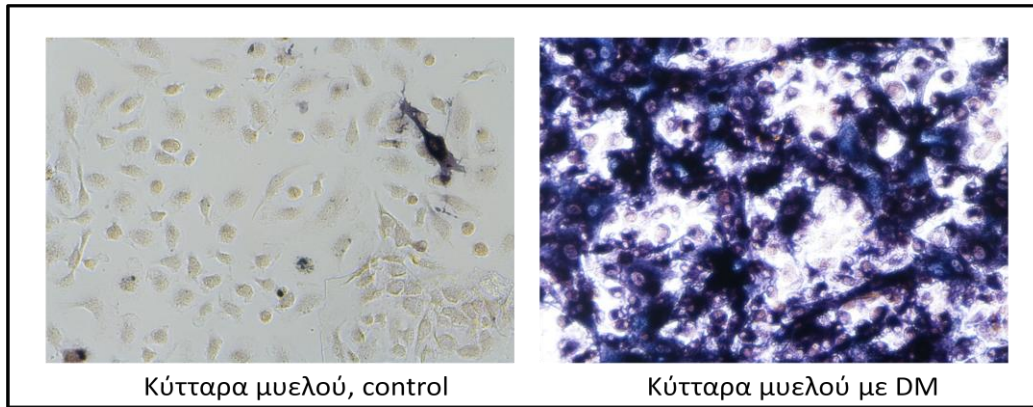


Εικόνα 15: Απελευθέρωση κυτοκινών από προ-οστεοκλάστες. Κυττάρων μυελού των οστών (ΚΜΟ) ποντικού εκτέθηκαν για 4 ημέρες σε 50 µg/ml LPS της *Pseudomonas* sp. ή όχι (control) και στην συνέχεια διαπιστώθηκε η απελευθέρωση των κυτοκινών TNF-α, IL-6, IL-12 και IL-10 με ανοσοφθορισμό.

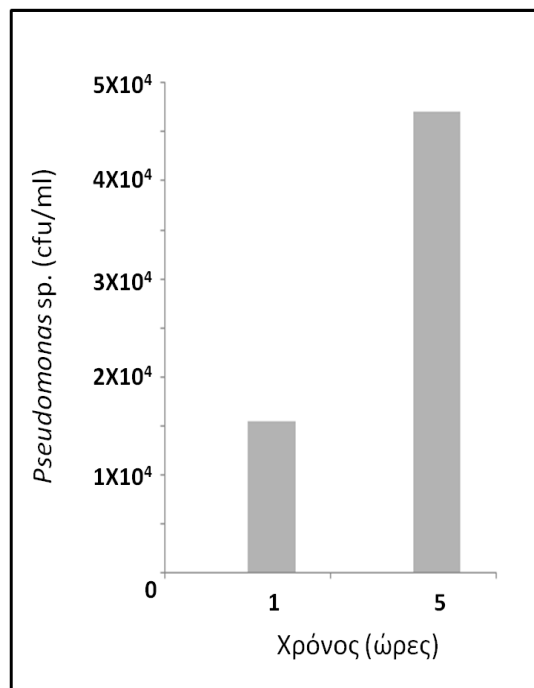
❖ Η *Pseudomonas* sp. ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΜΟΛΥΝΕΙ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥΣ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ

Μια άλλη εκδοχή στην προσέγγιση των μηχανισμών οστικής μόλυνσης αποτελεί η διείσδυση και ενδοκυτταρική διαβίωση των βακτηρίων σε οστικά κύτταρα, η οποία οδηγεί στην διαταραχή της λειτουργίας τους και τελικά σε αποπτωτικούς μηχανισμούς (Alexander et al., 2001). Για αυτόν τον λόγο ελέγχθηκε εάν η *Pseudomonas* sp. μπορεί να μολύνει προ-οστεοβλάστες. Για τη δημιουργία πρόδρομων οστεοβλαστών χρησιμοποιήθηκε το osteogenic differentiation medium (DM) σε καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών ποντικού (Piek et al., 2010). Για να διαπιστωθεί η διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού σε προ-οστεοβλάστες (osteoblast-like κύτταρα) έγινε χρώση για αλκαλική φωσφατάση, η οποία είναι ο κύριος δείκτης προ-οστεοβλαστών (Aubin and Liu, 1996). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16, το μεγαλύτερο ποσοστό των ΚΜΟ εκφράζουν την αλκαλική φωσφατάση. Μετά

ελέγχθηκε εάν οι προ-οστεοβλάστες μολύνονται από την *Pseudomonas* sp. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 ο αριθμός των μολυσματικών μονάδων του βακτηρίου αυτού ανά ml (CFU/ml) που βρίσκονται ενδοκυτταρικά στους προ-οστεοκλάστες αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς η *Pseudomonas* sp. μολύνει τους προ-οστεοβλάστες.



Εικόνα 16: Κύτταρα μυελού των οστών ποντικού επώαστηκαν με osteogenic differentiation medium (DM) ή όχι (control) για 10 ημέρες και ακολούθησε χρώση για ανίχνευση αλκαλικής φωσφατάσης.



Εικόνα 17: Προ-οστεοβλάστες μολύνθηκαν με 20 CFU/κύτταρο με *Pseudomonas* sp. και μετά από 30 λεπτά επώασης απομακρύνθηκαν τα βακτήρια και τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS. Στην συνέχεια προστέθηκε νέο θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10 μg/ml τετρακυκλίνη για να θανατωθούν τα βακτηρια που δεν είχαν προσκολληθεί. Την πρώτη και πέμπτη ώρα μετά την μόλυνση τα κύτταρα λύθηκαν και υπολογίστηκε ο αριθμός των ενδοκυτταρικών μολυσματικών μονάδων (CFU/ml) του βακτηρίου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

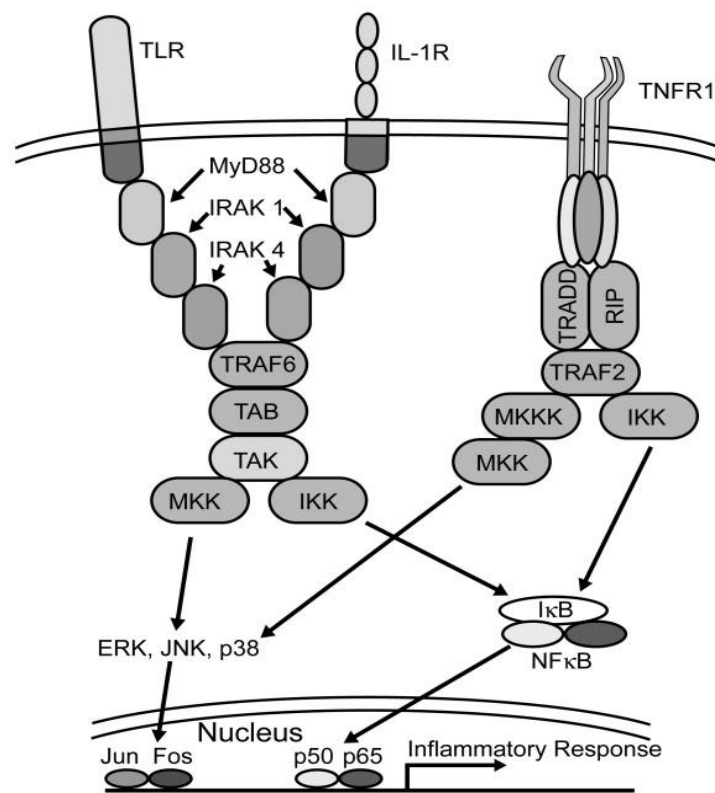
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) της *Pseudomonas* sp. μπορούν να οδηγήσουν στη διαφοροποίηση κυττάρων μυελού τον οστών ποντικού σε οστεοκλάστες και μάλιστα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι LPS- *Pseudomonas* sp. επαγόμενοι οστεοκλάστες εμφανίζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οστεοκλαστικού φαινοτύπου (μεγάλο μέγεθος, πολυάριθμοι πυρήνες) και είναι θετικοί ως προς τον ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη οστεοκλαστών TRAcP. Ο τρόπος με τον οποίον μπορεί να γίνει αυτή η διαφοροποίηση μέσω των LPS δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Μια ομάδα ερευνητών υποστηρίζει ότι οι LPS επάγουν την οστεοκλαστογένεση με έμμεσο τρόπο, μέσω διέγερσης των οστεοβλαστών οι οποίοι στη συνέχεια απελευθερώνουν οστεοκλαστογόνους παράγοντες. Έτσι, οι Zhuang et al. (2007) σε *in vitro* μελέτη έδειξαν ότι οι LPS δεν μπορούν να επάγουν ευθέως την διαφοροποίηση προ-οστεοκλαστών σε οστεοκλάστες. Μόνο η παρουσία οστεοβλαστών, και άρα M-CSF και RANKL, οδήγησε σε οστεοκλαστογένεση. Από πειράματα συν-καλλιέργειας προ-οστεοκλαστών με οστεοβλάστες στους οποίους είχαν απενεργοποιηθεί οι TLR4, διαπιστώθηκε ότι οι LPS δρουν πρωταρχικά στους οστεοβλάστες και έτσι επάγουν οστεοκλαστογένεση, ωστόσο για τη βέλτιστη επαγωγή απαιτούνταν λειτουργικοί TLR4 και στους προ-οστεοκλάστες (Zhuang et al., 2007). Αυτά τα ευρήματα συναινούν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι οι LPS μπορούν να διεγείρουν την έκφραση του RANKL στους οστεοβλάστες και τα κύτταρα του περιοδοντικού ιστού (Wada et al., 2004) μέσω της παραγωγής φλεγμονοδών κυτοκινών IL-1 και TNF- α . Επίσης έχει αναφερθεί ότι οι LPS μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση της προσταγλανδίνης E2, μέσω TLR4 υποδοχέων στους οστεοβλάστες, η οποία καταστέλλει την έκφραση της OPG και άρα έμμεσα επάγει την οστεοκλαστογένεση. Πιο πρόσφατες *in vivo* μελέτες στις οποίες απενεργοποιήθηκαν οι υποδοχείς TLR4 και TLR2, έδειξαν ότι για επιτυχή οστεοκλαστογένεση μέσω LPS απαιτούνται λειτουργικοί TLR4 και TLR2 υποδοχείς, καθώς και μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) (Nason et al., 2009b).

Ωστόσο κάποιες άλλες μελέτες έρχονται σε αντίθεση με την έμμεση επαγωγή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών μέσω των οστεοβλαστών. Έτσι, οι Suda et al. (2002) και Jiang et al. (2002) πρότειναν την άμεση επίδραση των LPS στα προγονικά των οστεοκλαστών. Οι διαφορές στα αποτελέσματα αυτών των μελετών φαίνεται ότι προκύπτουν από διαφορές στην πειραματική μεθοδολογία. Στο πρωτόκολλο που

χρησιμοποιήθηκε από τους Suda et al. (2002) οι προ-οστεοκλάστες είχαν εκτεθεί σε σημαντικά ποσά ενδογενούς RANKL, αφού τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία διυδροξυβιταμίνης D3 που υποστηρίζει την επιβίωση των προ-οστεοβλαστών (osteoblast-like κυττάρων) και συνεπώς παράγεται RANKL. Επίσης, πάνω από 70% των κυττάρων ήταν ήδη θετικά ως προς την TRAcP τη στιγμή που προστέθηκαν οι LPS, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα προγονικά κύτταρα είχαν ήδη μπει στην οστεοκλαστική σειρά. Οι Jiang et al. (2002) απ' την άλλη χρησιμοποίησαν σπληνοκύτταρα αντί για προ-οστεοκλάστες και ολόκληρα θανατωμένα βακτήρια αντί για καθαρούς LPS, διαφορές που πιθανότατα επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Έτσι, φαίνεται ότι η άμεση επίδραση των LPS στους προ-οστεοκλάστες εξαρτάται από το επίπεδο διαφοροποίησής τους και το συμπέρασμα αυτό φαίνεται πιο ξεκάθαρα από την μελέτη των Nason et al. (2009a). Οι ερευνητές αυτοί χρησιμοποίησαν LPS της *Pseudomonas aeruginosa* και διαπίστωσαν ότι οι προ-οστεοκλάστες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους οστεοκλάστες μετά από έκθεσή τους σε υπο-οστεοκλαστογόνες δόσεις RANKL (10 ng/ml) "RANKL priming".

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι κυτοκίνες TNF- α , IL-6, IL-10 και IL-12 απελευθερώνονται από τα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών κατά τη διαδικασία σχηματισμού οστεοκλαστών που μεσολαβείται από LPS της *Pseudomonas* sp. Στη μελέτη των Nason et al. (2009a) αναφέρεται ότι επάγονται κυτοκίνες από τους προ-οστεοκλάστες και φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη διέγερση της οστεοκλαστογένεσης. Από αυτές, ο TNF- α , η IL-1 και η IL-6 είναι οστεοκλαστογόνες (Azuma et al., 2000; Zhang et al., 2001; Zou et al., 2002; Kudo et al., 2003). Μάλιστα, όταν απενεργοποιήθηκε η έκκριση της IL-6 ή των υποδοχέων TNFR1, TNFR2 και IL-1R1 στους προ-οστεοκλάστες, παρατηρήθηκε ισχυρή αναστολή στο σχηματισμό οστεοκλαστών που επαγόταν από τους LPS της *Pseudomonas aeruginosa*. Συνεπώς, η συμμετοχή των κυτοκινών είναι πολύ σημαντική στην επαγόμενη από LPS οστεοκλαστογένεση και μάλιστα προτάθηκε ότι οι LPS διεγείρουν τους προ-οστεοκλάστες να απελευθερώσουν TNF- α , IL-1 και IL-6 οι οποίες στη συνέχεια προάγουν την οστεοκλαστογένεση με αυτοκρινικό/παρακρινικό τρόπο. Βέβαια, στην πορεία της διαφοροποίησης από LPS μπορεί να παράγονται και άλλες κυτοκίνες που κατέχουν αντι-οστεοκλαστογόνες ιδιότητες όπως η IL-10, η IL-12 και η λεπτίνη (Nason et al., 2009a). Έτσι, είναι πιθανό ότι διαφοροποίηση οστεοκλαστών σε απόκριση στο ερέθισμα των LPS συμβαίνει όταν το ολικό ισοζύγιο των κυτοκινών που απελευθερώνονται από αυτό το ερέθισμα ευνοεί την οστεοκλαστογένεση. Παραγωγή των κυτοκινών IL-1 και TNF- α έχει ανιχνευθεί στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου και στους οστεοβλάστες.

Συμπερασματικά, οι LPS μπορούν να διεγείρουν την οστεοκλαστογένεση με τους ακόλουθους τρόπους: α) άμεση αλληλεπίδραση των LPS με τους TLR4 των προ-οστεοκλαστών οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και τελικά στην διαφοροποίηση και β) αλληλεπίδραση των LPS με τους TLR4 των υποστηρικτικών κυττάρων (οστεοβλάστες, στρωματικά κύτταρα του μυελού, λεμφοκύτταρα) οδηγεί με έμμεσο τρόπο (παραγωγή RANKL, προσταγλανδίνης E2, IL-1 από τα υποστηρικτικά κύτταρα) επίσης στην διαφοροποίηση. Ο ακριβής μηχανισμός όμως δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχει επικάλυψη στα μονοπάτια σηματοδότησης του RANK, του υποδοχέα της IL-1, του υποδοχέα του TNF-α και του TLR, τα οποία μοιράζονται κοινά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια όπως είναι ο TRAF6 και ο NF-κB (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων του LPS (TLR), της IL-1 (IL-1R) και του TNF-α (TNFR1). (Wu et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη, για τον έλεγχο της οστεοκλαστογένεσης από LPS της *Pseudomonas* sp., χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από τον μυελό των οστών (ΚΜΟ) ποντικού, που αποτελούνται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων (στρωματικά, προ-οστεοβλάστες, προ-οστεοκλάστες) και συνεπώς παράγεται ενδογενώς RANKL σε χαμηλές ποσότητες. Είναι πιθανό, η παρατηρούμενη διαφοροποίηση των ΚΜΟ σε οστεοκλάστες να προέρχεται με τους ακόλουθους τρόπους: (α) από διέγερση είτε των υποστηρικτικών

κυττάρων του μυελού (στρωματικά, προ-οστεοβλάστες, οστεοβλάστες), που σε απόκριση στους LPS αυξάνουν την έκφραση RANKL και μειώνουν την έκκριση OPG (Suda et al., 2004) και συνεπώς οδηγούν σε οστεοκλαστογένεση, και (β) με άμεση δράση στους προ-οστεοκλάστες, οι οποίοι όπως έχει δειχθεί παράγουν τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF-α και IL-6 (παρούσα μελέτη; Nason et al., 2009a) και οδηγούνται στη διαφοροποίηση.

Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οστεοκλαστικού φαινοτύπου, ελέγχθηκε στη παρούσα μελέτη εάν οι επαγόμενοι οστεοκλάστες από τους LPS- *Pseudomonas* sp. εμφανίζουν και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του ενεργού οστεοκλάστη. Οι οστεοκλάστες, όπως έχει προαναφερθεί είναι μεγάλα, πολυπύρρηνα κύτταρα που καταλύουν την απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας του οστού. Ένας από τους πιο συνηθισμένους ελέγχους ενεργότητας των οστεοκλαστών αποτελεί η επώασή τους με το υπόστρωμα όπου δρουν, συνήθως υδροξυαπατίτη ή οδοντίνη (Nason et al., 2009a; Monchau et al., 2002; Spence et al., 2008). Έτσι, στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκε ένα *in vitro* σύστημα που έχει σαν βάση δοκίμια βιοϋάλου (bioglass) τα οποία όταν εμβαπτίζονται σε SBF και επωάζονται στους 37°C για τον κατάλληλο χρόνο, δημιουργούν στην επιφάνειά τους ένα στρώμα υδροξυαπατίτη. Η επαφή των LPS- *Pseudomonas* sp. επαγόμενων οστεοκλαστών με τον *in vitro* σχηματισμένο υδροξυαπατίτη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι οστεοκλάστες αυτοί μπορούν να απορροφήσουν τον υδροξυαπατίτη, αφού σε φωτογραφίες SEM φαίνονται τεράστια κύτταρα που εγκολπώνουν υδροξυαπατίτη και επιπλέον σχηματίζουν σε αυτόν πολυάριθμες σπές, αποτέλεσμα της απορροφητικής τους δράσης.

Επιπρόσθετα ελέγχθηκε η ενεργότητα του οστεοκλάστη με τη μέτρηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο υπερκείμενο καλλιέργειας των LPS- *Pseudomonas* sp. επαγόμενων οστεοκλαστών στον υδροξυαπατίτη. Ένας ενεργός οστεοκλάστης έχει την ικανότητα να διαλυτοποιεί τον υδροξυαπατίτη και έτσι να απελευθερώνονται ιόντα Ca και P στο μικροπεριβάλλον όπου γίνεται η απορρόφηση. Τα ιόντα αυτά έχει δειχθεί ότι προσλαμβάνονται από τον οστεοκλάστη. Ο ανόργανος φώσφορος μετατοπίζεται από τους Na- εξαρτώμενους μεταφορείς Npt2 και PiT-1, που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη του οστεοκλάστη. Τα ιόντα ασβεστίου που απελευθερώνονται από τον υδροξυαπατίτη απομακρύνονται από την περιοχή απορρόφησης μέσα σε διακυτταρικά κυστίδια, μαζί με υπολείμματα κολλαγόνου και άλλων οργανικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας του οστού. Στην διακυτταρική μεταφορά και ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου συμμετέχουν επιθηλιακά κανάλια Ca^{2+} (TRPV5), που εντοπίζονται στην πτυχωτή μεμβράνη του οστεοκλάστη, Ca-ATPases, που

εντοπίζονται στην βασηοπλευρική μεμβράνη και ενδοκυτταρικοί ιονοανταλλάκτες $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Riihonen, 2010). Όταν η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου υπερβεί τα φυσιολογικά επίπεδα, τότε τα ιόντα εξέρχονται από τον οστεοκλάστη στην κυκλοφορία. Έτσι, η αύξηση των ελεύθερων ιόντων φωσφόρου που παρατηρήθηκε στο υπερκείμενο μέσο καλλιέργειας των LPS- *Pseudomonas* sp. επαγόμενων οστεοκλαστών υποδηλώνει την ικανότητα του οστεοκλάστη για απορρόφηση.

Τέλος, ελέγχθηκε ο σχηματισμός του χαρακτηριστικού δακτυλίου ακτίνης που σχηματίζουν οι ενεργοί οστεοκλάστες κατά την επαφή τους με το υπόστρωμα. Όταν ενεργοποιούνται οι ιντεγκρίνες, κατά την επαφή του οστεοκλάστη με το υπόστρωμα που θα απορροφηθεί, τα ποδοσώματα συγκεντρώνονται στην κυτταρική περιφέρεια σχηματίζοντας το δακτύλιο ακτίνης. Η ενεργότητα των οστεοκλαστών απαιτεί το σχηματισμό του δακτυλίου ακτίνης και η διάσπασή του αναστέλλει την οστική απορρόφηση. Στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκαν με ανοσοφθορισμού δακτύλιοι ακτίνης στους LPS- *Pseudomonas* sp. επαγόμενους οστεοκλάστες κατά την επώασή τους σε υπόστρωμα υδροξυαπατίτη. Η εμφάνιση παραπάνω από ενός δακτυλίων ακτίνης εξηγείται από το γεγονός ότι ο υδροξυαπατίτης που σχηματίστηκε με την προαναφερθείσα μέθοδο δεν ήταν επίπεδος και άρα ο οστεοκλάστης πιθανότατα σχημάτισε παραπάνω από μια περιοχές απορρόφησης.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι οστεοκλάστες που επάγονται από τους LPS της *Pseudomonas* sp. δεν έχουν μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, αλλά είναι και ενεργοί οστεοκλάστες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ❖ Το βακτήριο που απομονώθηκε από SBF ταυτοποιήθηκε ως *Pseudomonas* sp.
- ❖ Οι LPS της *Pseudomonas* sp. δεν είναι τοξικοί για τα κύτταρα μυελού των οστών και μπορούν να επάγουν τη διαφοροποίησή τους σε οστεοκλάστες με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
- ❖ Η διαφοροποίηση αυτή δεν παρατηρείται με τους LPS της *Escherichia coli*.
- ❖ Οι προερχόμενοι από LPS – *Pseudomonas* sp. οστεοκλάστες είναι ενεργοί, αφού:
 - εγκολπώνουν υδροξυαπατίτη και οδηγούν στην απορρόφησή του
 - απελευθερώνουν ιόντα φωσφόρου
 - σχηματίζουν δακτυλίους ακτίνης
- ❖ Οι κυτοκίνες TNF-α, IL-6, IL-10 και IL-12 απελευθερώνονται από τους προ-οστεοκλάστες.
- ❖ Η *Pseudomonas* sp. μπορεί να μολύνει πρόδρομους οστεοβλάστες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Abu-Amer Y., Ross F.P., Edwards J., Teitelbaum S.L. 1997. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis mediated by tumor necrosis factor via its p55 receptor. *The journal of clinical investigation*. 100:1557–1565.
- ❖ Ahmed S., Meghji S., Williams R.G., Henderson B., Brock J.H., Nair S.P. 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infection and immunity*. 69:2872–2877.
- ❖ Alexander E.H., Bento J.L., Hughes F.M. Jr, Marriott I., Hudcon M.C., Bost K.L. 2001. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Dublin induce tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts. *Infection and immunity*. 69:1581–1586.
- ❖ Alexander E.H., Rivera F.A., Marriott I., Anguita J., Bost K.L., Hudcon M.C. 2003. *Staphylococcus aureus*-induced tumor necrosis factor – related apoptosis – inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. *BMC Microbiology*. 2:3–5.
- ❖ Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:1563-1589.
- ❖ Aubin J.E. and Liu F. 1996. The osteoblast lineage. In: principles of bone biology. Academic Press, New York, pp: 51-68.
- ❖ Aubin J.E., Lian I.B., Stein G.S. 2006. Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In: Favus, M.J. (Ed.), Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, pp. 20–29.
- ❖ Azuma Y., Kaji K., Katogi R., Takeshita S., Kudo A. 2000. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *The journal of biological chemistry*. 275:4858-4864.
- ❖ Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume 2. The proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria.
- ❖ Beutler B. 2003. Not "Molecular Patterns" but Molecules. *Immunity*. 19:155-156.
- ❖ Bost K.L., Ramp W.K., Nicholson N.C., Bento J.L., Marriott I., Hudson M.C. 1999. *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin- 12 production. *The journal of infectious diseases*. 180:1912–1920.
- ❖ Bottger E.C. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters*. 65:171–176.
- ❖ Boyce B.F and Xing L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy*. 9:S1.
- ❖ Chen Q.Z., Rezwani K., Armitage D., Nazhat S.N., Boccaccini A.R. 2006. The surface functionalization of 45S5 Bioglass-based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 17:979–987.

- ❖ Chi C.Y., Lai C.H., Fung C.P., Wang J.H. 2005. *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis: a case report and literature review. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 37:950-953.
- ❖ Ciampolini J. and Harding K.G. 2000. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgraduate medical journal*. 76:479–483.
- ❖ Collin-Osdoby P. 2004. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circulation research*. 95:1046-1057.
- ❖ Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*. 3:207–212.
- ❖ Darveau R.P. and Hancock R.E. 1983. Procedure for isolation of bacterial LPS from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*. 155:831-838.
- ❖ Datta H.K. and Horrocks B.R. 2003. Mechanisms of calcium disposal from osteoclastic resorption hemivacuole. *The journal of endocrinology*. 176:1-5.
- ❖ Degasne I., Basle M.F., Demais V., Huré G., Lesourd M., Grolleau B., Mercier L., Chappard D. 1999. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcified tissue international*. 64:499–507.
- ❖ Dodrovolskaia M.A. and Vogel S.N. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection*. 4:903-914.
- ❖ Ducy P., Schinke T., Karsenty G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 289:1501-1504.
- ❖ Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G. 1997. Osf2/Cbfa-1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89:747-754.
- ❖ Duong L.T. and Rodan G.A. 2001. Regulation of osteoclast formation and function. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*. 2:95-104.
- ❖ Eaton R.W and Sandusky P. 2008. Biotransformations of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 75:583-588.
- ❖ Eidhin D.N. and Mouton C. 1993. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Porphyromonas* and *Prevotella*. *FEMS Microbiology Letters*. 110:133-138.
- ❖ Ellington J.K., Harris L., Webb M., Smith B., Smith T., Tan K., Hudson M. 2003. Intracellular *Staphylococcus aureus*- A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *The Journal of bone and joint surgery*. 85:918-921.
- ❖ Falagas M.E., Bliziotis I.A., Mavrogenis A.F., Papagelopoulos P.J. 2006. Spondylodiscitis after facet joint steroid injection: a case report and review of the literature. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 38:295-299.
- ❖ Felix R., Fleisch H., Frandsen P.L. 1992. Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption *in vitro*. *Infection and immunity*. 60:4984–4988.
- ❖ Feng X. 2005. RANKing intracellular signaling in osteoclasts. *IUBMB life*. 57:389-395.
- ❖ Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera Gracia M.A., del-Canto-Pingarron M., Blanco-Jerez L. 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medical oral, patología oral y cirugía bucal*. 11:151-157.

- ❖ Gally P., Jongeneel C.V., Barras C., Burnier M., Baumgartner J.D., Glauser M.P., Heumann D. 1993. Short time exposure to LPS is sufficient to activate human monocytes. *Journal of immunology*. 150:5086-5093.
- ❖ Garrity G.M. and Holt J.G. 2001. The road map to the manual, In: G. M. Garrity (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, pp.119–166.
- ❖ Gen-Fu W. and Xue-Ping X. 2005. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. *Water research*. 39:4623-4632.
- ❖ Gmeimer J., Luderitz O., Westphal O. 1969. Biochemical studies on lipopolysaccharide of Salmonella R mutants. 6. Investigation on the structure of the lipid A component. *European journal of biochemistry/FEBS*. 7:370-379.
- ❖ Goldberg J.B. and Pier G.B. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* LPS and pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 4:490-494.
- ❖ Gunther T. and Schinke T. 2000. Mouse genetics have uncovered new paradigms in bone biology. *Trends in endocrinology and metabolism*. 11:189-193.
- ❖ Guyton A.C. 1998. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 5th edition. Litsas medical editions, Athens.
- ❖ Harrison T.R. 2005. Harrison's principles of internal medicine. 16th edition. Parisianou medical editions, Athens.
- ❖ Henderson B. and Nair S.P. 2003. Hard labour: bacterial infection of the skeleton. *Trends in microbiology*. 11:570-577.
- ❖ Henderson B., Nair S.P., Ward J.M., Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual review of microbiology*. 57:29–55.
- ❖ Hitchcock P.J., Leive L., Makela P.H., Rietschel E.T., Strifflmatter W., Morison D.C. 1986. Lipopolysaccharide nomenclature: past, present and future. *Journal of bacteriology*. 166:699-705.
- ❖ Horne W.C., Sanjay A., Bruzzaniti A., Baron R. 2005. The role (s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function. *Immunological reviews*. 208:106-125.
- ❖ Horwood N.J., Elliott J., Martin T.J., Gillespie M.T. 2001. IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation *in vitro*. *Journal of immunology*. 166:4915-4921.
- ❖ Hotokezaka H., Kitamura A., Matsumoto S., Hanazawa S., Amano S., Yamada T. 1998. Internalisation of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin into osteoblast-like MC3T3-E1 cells and bone resorptive responses of the cells against the infection. *Scandinavian journal of immunology*. 47:453–458.
- ❖ Hudson M.C., Ramp W.K., Nicholson N.C., Williams A.S., Nousiainen M.T. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microbial pathogenesis*. 19:409–419.
- ❖ Hunt M.L., Adler B., Townsend K.M. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Veterinary microbiology*. 72:3–25.
- ❖ Hynes R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.

- ❖ Ito M., Haito S., Furumoto M., Uehata Y., Sakurai A., Segawa H., Tatsumi S., Kuwahata M., Miyamoto K. 2007. Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells. *American journal of physiology. Cell physiology.* 292:526-534.
- ❖ Ito M., Matsuka N., Izuka M., Haito S., Sakai Y., Nakamura R., Segawa H., Kuwahata M., Yamamoto H., Pike W.J., Miyamoto K. 2005. Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells. *American journal of physiology. Cell physiology.* 288:921-931.
- ❖ Jacobs R.F., Adelman L., Sack C.M., Wilson C.B. 1982. Management of *Pseudomonas* Osteochondritis Complicating Puncture Wounds of the Foot. *Pediatrics.* 69:432-435.
- ❖ Jimi E. and Ghosh S. 2005. Role of nuclear factor-(kappa) B in the immune system and bone. *Immunological reviews.* 208:80-87.
- ❖ Junqueira L.C. and Carneiro J. 2004. Basic histology I. 5th edition. Paschalidis medical editions, Athens.
- ❖ Kadono H., Kido J., Kataoka M., Yamauchi N., Nagata T. 1999. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity.* 67:2841–2846.
- ❖ Kaw D. and Yoon Y. 2004. *Pseudomonas sternoclavicular* pyarthrosis. *Southern medical journal.* 97:705-706.
- ❖ Khosla S. 2001. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 142:5050-5055.
- ❖ Kikuchi T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Mitani A., Tanaka S., Matsuoka M., Yamamoto G., Hishikawa T., Noguchi T., Yoshikai Y. 2001. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll like receptors. *Journal of immunology.* 166:3574–3579.
- ❖ Kirby A.C., Meghji S., Nair S.P., White P., Reddi K., Nishihara T., Nakashima K., Willis A.C., Sim R., Wilson M. 1995. The potent bone resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *The journal of clinical investigation.* 96:1185–1194.
- ❖ Kokubo T., Ito S., Huang Z.T., Hayashi T., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T. 1990. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of biomedical materials research.* 24:331-343.
- ❖ Kudo O., Sabokbar A., Pocock A., Itonaga I., Fujikawa Y., Athanasou N.A. 2003. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 32:1-7.
- ❖ Landmann R., Muller B., Zimmerli W. 2000. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes and Infection.* 2:295-304.
- ❖ Lax A.J. and Grigoriadis A.E. 2001. *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. *International journal of medical microbiology.* 291:261–268.
- ❖ Looker A.C., Bauer D.C., Chesnut C.H 3rd, Gundber C.M., Hochberg M.C., Klee G., Kleerekoper M., Watts N.B., Bell N.H. 2000. Clinical use of biochemical markers of bone remodelling: current status and future directions. *Osteoporosis international.* 11:467-480.

- ❖ Manolagas S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 21:115-137.
- ❖ Martin T.J., Sims N.A., Ng K.W. 2008. Regulatory pathways revealing new approaches to the development of anabolic drugs for osteoporosis. *Osteoporosis international*. 19:1125–1138.
- ❖ Meghji S., Henderson B., Nair S.P., Tufano M.A. 1997. Bacterial porins stimulate bone resorption. *Infection and immunity*. 65:1313–1316.
- ❖ Miyake K. 2003. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD2: unique roles from MD2. *International Immunopharmacology*. 3:119-128.
- ❖ Monchau F., Lefevre A., Descamps M., Belquin-myrdycz A., Laffargue P., Hildebrand HF. 2002. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, b-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomolecular Engineering*. 19:143-152.
- ❖ Monds R.D., Newell P.D., Schwartzman J.A., O'Toole G.A. 2006. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Applied and environmental microbiology*. 72:1910-1924.
- ❖ Mossaad C., Starr M., Patil S., Riman R.E. 2010. Thermodynamic modeling of hydroxyapatite crystallization with biomimetic precursor design considerations. *Chemistry of materials*. 22:36-46.
- ❖ Mullan P.B. and Lax A.J 1998. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcified tissue international*. 63:340–345.
- ❖ Mullan P.B. and Lax A.J. 1996. *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. *Infection and immunity*. 64:959–965.
- ❖ Nair S.P., Meghji S., Wilson M., Reddi K., White P., Henderson B. 1996. Bacterially-induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity*. 64:2371–2380.
- ❖ Nair S.P., Williams R.J., Henderson B. 2000. Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. *Rheumatology (Oxford, England)*. 39:821–834.
- ❖ Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108:17–29.
- ❖ Nason R., Jung J.Y., Chole R.A. 2009a. Lipopolysaccharide- induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: A mechanism for osteolysis in chronic otitis. *Journal of the association for research in otolaryngology*. 10:151-160.
- ❖ Nason R., Lee D.H., Jung J.Y., Chole R.A. 2009b. Radiographic and micro-computed tomographic imaging of lipopolysaccharide-mediated bone resorption. *Annals of otology, rhinology and laryngology*. 118:391-396.
- ❖ Owens J.M., Gallagher A.C., Chambers T.J. 1996. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *Journal of immunology*. 157:936-940.
- ❖ Papadopoulou E., Papadopoulou L., Paraskevopoulos K. M., Koidis P., Sivropoulou A. 2009. *Pseudomonas* A1 influences the formation of hydroxyapatite and degrades bioglass. *Materials science and engineering: B*. 165:239-242.

- ❖ Parfitt A.M. 1991. Bone Forming Cells in Clinical Conditions. Bone, the osteoblast and osteocyte. The Telford press, London.
- ❖ Piek E., Sleumer L.S., van Someren E.P., Heuver E.L., de Haan J.R., de Grijs I., Gilissen C., Hendriks J.M., van Ravestein-van Os R.I., Bauerschmidt S., Dechering K.J., van Zoelen E.J. 2010. Osteo-transcriptomics of human mesenchymal stem cells: Accelerated gene expression and osteoblast differentiation induced by vitamin D reveals c-MYC as an enhancer of BMP2-induced osteogenesis. *Bone*. 46:613-627.
- ❖ Pugin J., Heumann I.D., Tomasz A., Kravchenko W., Akamatsu Y., Nishijima M., Glauser M.P., Tobias P.S., Ulevitch R.J. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. 1:509-516.
- ❖ Rajamannan N.M., Subramaniam M., Rickard D., Stock S.R., Donovan J., Springett M., Orszulak T., Fullerton D.A., Tajik A.J., Bonow R.O., Spelsberg T. 2003. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 107:2181-2184.
- ❖ Rauch F. and Glorieux F.H. 2004. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 363:1377-1385.
- ❖ Razzouk S., Brunn J.C., Qin C., Tye C.E., Goldberg H.A., Butler W.T. 2002. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation are required for *in vitro* bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*. 30:40-47.
- ❖ Reddi K., Meghji S., Wilson M., Henderson B. 1995. Comparison of the osteolytic activity of surface associated proteins of bacteria implicated in periodontal disease. *Oral diseases*. 1:26–31.
- ❖ Rietschel E.T., Brede L., Brandenburg K., Flad H.D., de Jong-Leuveninck J., Kawahara K., Lindner B., Loppnow H., Luderitz T., Schade U. et al. 1987. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Reviews of infectious diseases*. 9:S5:527-36.
- ❖ Sabir N., Rafi S., Hashmi I., Farooqi B.J. 2007. Lumbar osteomyelitis with *Pseudomonas*. *The journal of the Pakistan medical association*. 57:517-518.
- ❖ Sakiyama H., Masuda R., Inoue N., Yamamoto K., Kuriwa K., Nakagawa K., Yoshida K. 2001. Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. *Journal of bone and mineral metabolism*. 19:220-227.
- ❖ Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition . Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- ❖ Schierholz J.M. and Beuth J. 2001. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *The journal of hospital infection*. 49:87–93.
- ❖ Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke F.E., Katz N., Barth P.J., Maisch B., Preissner K.T., Hofbauer L.C. 2004. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 89:4104-4112.
- ❖ Sidhu V.K., Vorhölter F.J., Niehaus K., Niehaus S.A. 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *BMC Microbiology*. 8:87.
- ❖ Spence G., Patel N., Brooks R., Bonfield W., Rushton N. 2008. Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: The effect of carbonate substitution. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 92:1292–1300.

- ❖ Suda K., Udagawa N., Sato N., Takami M., Itoh K., Woo J.T., Takahashi N., Nagai K. 2004. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide- induced osteoclast formation. *The journal of immunology*. 172:2504-2510.
- ❖ Suda K., Woo J.T., Takami M., Sexton P.M., Nagai K. 2002. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1 and RANKL. *Journal of cellular physiology*. 190:101–108.
- ❖ Tanaka S., Nakamura K., Takahashi N., Suda T. 2005. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunological reviews*. 208:30-49.
- ❖ Taton A. 2001. Nanotechnology: Boning up on biology. *Nature*. 412:491-492.
- ❖ Teitelbaum S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289:1504-1508.
- ❖ Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S.K., Fortun Y., Redini F., Heymann D. 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 15:457-475.
- ❖ Thomas C.J., Kapoor M., Sharma S., Bausinger H., Zyilan U., Lipsker D., Hanau D., Surolia A. 2002. Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Letters*. 531:184-188.
- ❖ Tobias P.S., Soldau K., Gegner J.A., Mintz D., Ulevitch R.J. 1991. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with s-CD14. *The journal of biological chemistry*. 270:10482-10488.
- ❖ Tsai C.M. and Frasch C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 119:115-119.
- ❖ US Public Health Service (2000). Oral Health in America. A Report of the Surgeon General.
- ❖ van de Lest C.H.A. and Vaandrager A.B. 2007. Mechanism of cell-mediated mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 18:434-443.
- ❖ Wada N., Maeda H., Yoshimine Y., Akamine A. 2004. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin- 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 35:629-635.
- ❖ Wagner E.F. and Eferl R. 2005. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunological reviews*. 208:126-140.
- ❖ Watts N.B. 1999. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clinical chemistry*. 45: 1359–1368.
- ❖ Wei S. and Siegal G.P. 2008. Mechanisms modulating inflammatory osteolysis: A review with insights into therapeutic targets. *Pathology, research and practice*. 204:695–706.
- ❖ Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. 1989. CD14, a receptor for complexes of LPS and LPS-binding protein. *Science*. 249:1431-1433.
- ❖ Wu Q., Lu Z., Verghese M.W., Randell S.H. 2005. Airway epithelial cell tolerance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory research*. 6:26.
- ❖ Xing L., Schwarz E.M., Boyce B.F. 2005. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunological reviews*. 208:19-29.

- ❖ Zhang Y.H., Heulsmann A., Tondravi M.M., Mukherjee A., Abu-Amer Y. 2001. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *The journal of biological chemistry*. 276:563-568.
- ❖ Ziolkowska M., Kurowska M., Radzikowska A., Luszczkiewicz G., Wiland P., Dziewczopolski W., Filipowicz-Sosnowska A., Pazdur J., Szechinski J., Kowalczewski J., Rell-Bakalarska J., Maslinski W. 2002. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis and rheumatism*. 46:1744-1753.
- ❖ Zou W., Hakim I., Tschöep K., Endres S., Bar-Shavit Z. 2001. Tumor necrosis factor- alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *Journal of cellular biochemistry*. 83:70-83.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Παπαδημητρίου Κ.Σ. 2001. Ειδική παθολογική ανατομική (Συστηματική παθολογία). Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 2001.
- ❖ Παπαδοπούλου Ε. 2008. Προπτυχιακή διπλωματική εργασία: Η παρουσία της *Pseudomonas A1* σε βιοϋαλο μειώνει τόσο το σχηματισμό υδροξυαπατίτη (HAp) όσο και τη μάζα της. Θεσσαλονίκη 2008.
- ❖ Σκούρας Ζ. 1997. Ειδικά θέματα γενετικής- Γενετική μηχανική. Υπηρεσία δημοσιευμάτων Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη 1997.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- ❖ [1]: http://www.elire.gr/info_det.php?di=21
- ❖ [2]: <http://www.surgeongeneral.gov/library/bonehealth>
- ❖ [3]: http://en.wikipedia.org/wiki/Long_bone