



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΚΑΘ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ RANKL ΣΕ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΝΙΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2015



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΘ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ Ε.ΚΕ.ΒΕ «ΑΛ. ΦΛΕΜΙΓΚ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ: ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΝΤΟΥΝΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ RANKL ΣΕ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΝΙΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

*“ Πάντα Πάντα Περνάς την Φωτιά ...
για να φτάσεις την Λάμψη....”*

Οδυσσέας Ελύτης

“Άξιον Εστί”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΥΤΣΙΑΙΕΡΗΣ

Επιβλέπων Καθηγητής, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠ. ΚΑΘ. ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠ. ΚΑΘ. ΚΛΕΙΩ ΜΑΥΡΑΓΑΝΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΛΙΑΣ

Καθηγητής, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΝ. ΚΑΘ. ΕΛΕΝΗ ΚΟΤΣΙΦΑΚΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠ. ΚΑΘ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΑΡΜΑΚΟΛΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠ. ΚΑΘ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΦΙΛΙΠΠΟΥ

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», στο εργαστήριο της Επ. Καθηγήτριας Ελένης Ντούνη του Ινστιτούτου Ανοσολογίας σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, η οποία υπήρξε η κύρια επιβλέπουσα του ερευνητικού έργου από την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη της έρευνας και την ολοκλήρωσή της. Τα εργαστηριακά αναλώσιμα/αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης χρηματοδοτήθηκαν αποκλειστικά από προγράμματα του εργαστηρίου της κ. Ντούνη (Κοινωνοφελές Ίδρυμα Ιωάννη Σ. Λάτση, Πρόγραμμα «TheRAlead» στα πλαίσια της δράσης εθνικής εμβέλειας “Συνεργασία” Πράξη II, που συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση- Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης ΕΤΠΑ-και από εθνικούς πόρους).

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή με τίτλο «Μελέτη του παθογενετικού ρόλου της κυτταροκίνης RANKL σε διαγονιδιακά ζωικά πρότυπα» υποβλήθηκε στο Πλαίσιο της κατηγορίας Πράξης 11.74.11.01 « Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» και έτυχε υποτροφίας από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα 2007-2013 του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων σε συνεργασία με την Ευρωπαϊκή Ένωση, Ηράκλειτος II, μέσω της Ειδικής Υπηρεσίας Διαχείρισης του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Αλεξάνδρα
Επώνυμο : Νίτη
Ημερομηνία γέννησης : 7 Νοεμβρίου 1979
Τόπος γέννησης : Αμαρούσιον Αττικής
Διεύθυνση : Μουσών 6, Πειραιάς 185 33, Ελλάδα
Εθνικότητα : Ελληνική
Οικογενειακή κατάσταση : Άγαμη
Email : niti@fleming.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2008-2015 **Διδακτορικό Δίπλωμα** Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Ε.ΚΕ.Β.Ε «Αλ. Φλέμιγκ», Ινστιτούτο Ανοσολογίας.

2007- 2010 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στο ΜΠΣ** «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή. Βαθμός Διπλώματος «Άριστα» 9.60/10

1999- 2007 **Πτυχίο Βιολογίας**, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Μπάρι Ιταλίας, Σχολή Φυσικών, Μαθηματικών & Φυσιολογικών Επιστημών, (Βαθμός πτυχίου 8.02/10)

1997 1^ο Γενικό Λύκειο Χαλκίδας, Απολυτήριο με γενικό βαθμό «Άριστα» 18,9/11

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 10.2008-10.2015** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριο της Δρ. Ε. Ντούνη, Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ε.ΚΕ.Β.Ε «Αλ. Φλέμιγκ». Επιβλέπων καθηγητής: Μιχάλης Κουτσιλιέρης MD, Ph.D Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική σχολή, Θέμα «Μέλετη του παθογενετικού ρόλου της κυτταροκίνης RANKL σε διαγονιδιακά ζωικά πρότυπα»
- 10.2007-6.2010** Εκπόνηση μεταπτυχιακής εργασίας στο εργαστήριο της Δρ Ντούνη με θέμα «Μελέτη του RANKL σε διαγονιδιακούς ποντικούς. Δημιουργία ενός νέου προτύπου οστεοπόρωσης;». Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική σχολή, Εργαστήριο Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος. Επιβλέπων: Καθηγητής Γ. Λυρίτης MD, PhD.
- 3.2006-7.2007** 16-μηνη πτυχιακή εργασία με θέμα «Μελέτη του ασβεστοποιημένου αρθρικού χόνδρου σε ένα μοντέλο οστεοαρθρίτιδας πειραματικώς εισαχθείσης». Βαθμός πτυχιακής εργασίας 10/11 «Άριστα». Πανεπιστήμιο Μπάρι Ιταλίας, Σχολή Φυσικών, Μαθηματικών & Φυσιογνωστικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Ινστιτούτο Ιστολογίας & Ανατομίας, Επιβλέπων: Καθηγήτρια A. Favia Ph.D, Dr. M. S. Di Comite.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ.Φλέμιγκ»: απομόνωση πλασμιδιακού DNA, γονοτύπηση διαγονιδιακών σειρών, Pyrosequencing, απομόνωση DNA και RNA από ιστούς, PCR, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, Southern Blot, DNA Slot Blot analysis, αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης RT-PCR, Northern Blot, Western Blot (Immunoblotting), Elisa, Elisa Luminex, κυτταρομετρία ροής (FACS), Real Time PCR, in vitro osteoclastogenesis, δοκιμή Bradford-Lowry, χειρισμός διαγονιδιακών ποντικών, αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις, χορήγηση αναστολέων του RANKL (Διφωσφονικά-Αλενδρονάτη, Denosumab)

Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος-Master thesis:
DEXA (οστική πυκνομετρία), Μέτρηση Οστικών Βιοχημικών δεικτών: (sRANKL, OPG, Bone TRAP, TRACP-5b, ALP, micro-CT (μικρο-υπολογιστική τομογραφία)

Ινστιτούτο Ανθρώπινης Ανατομίας και Ιστολογίας, Πανεπιστήμιο Μπάρι Ιταλίας-
Diploma thesis: Ιστολογία, Κυτταρικές καλλιέργειες, Ηλεκτρονική Μικροσκοπία, Βιοψία, Τομές, Μονιμοποίηση Ιστών, Χρώσεις, Στατιστική ανάλυση

ΤΟΜΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Μοριακή Βιοϊατρική /Μοριακή Γενετική/Ανοσολογία/Βιολογία Οστών

Φυσιολογία και παθολογία θηλαστικών

Μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί στην παθογένεια των ασθενειών

Διαγονιδιακά (transgenic) βιολογικά συστήματα

Δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών σε διαγονιδιακά μοντέλα ανθρώπινων ασθενειών

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ/ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ/ ΒΡΑΒΕΙΑ

2011-2013 Υποτροφία από το Επιχειρησιακό πρόγραμμα «Εκπαίδευση και δια Βίου Μάθηση – Ηράκλειτος II» για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής με θέμα «Μελέτη του παθογενετικού ρόλου της κυτταροκίνης RANKL σε διαγονιδιακά ζωικά πρότυπα» στο Ε.Κ.Ε.ΒΕ «Αλ. Φλέμιγκ».

2010 Βραβείο για την παρουσίαση ερευνητικών αποτελεσμάτων στα πλαίσια του 24th International Mammalian Genome Conference, 17-21 Οκτώβριος 2010, Κρήτη, Ελλάδα

2009-2012 Υπότροφος διδακτορική φοιτήτρια του Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ». Επιλογή έπειτα από προφορική συνέντευξη στους ερευνητές του Κέντρου. Πρώτη θέση ανάμεσα σε 15 υποψηφίους.

2007-2008 Υποτροφία β' εξαμήνου Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

1991-1997 12 βραβεία και επαίνους από το Υπουργείο Παιδείας καθ' όλη τη διάρκεια της Μέσης εκπαίδευσης

ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλική: άριστη γνώση, CELTA (University of Southampton, UK) MSU–CELP (DEREE), First Certificate in English, University of Cambridge GB, Grade B, TOEFEL, GRADE 540/600,

Ιταλική: άπταιστα – Βασικό πτυχίο Βιολογίας στην Ιταλική γλώσσα, Επάρκεια Γλώσσας

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

E.C.D.L. –European Computer Driving License

- Microsoft Office
- Internet usage
- Programming language : BASIC

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis: diagnosis and treatment”, Prof. G. Lyritis MD, Ph.D (2009).
- “Metabolic bone diseases-Ortopedic pathology”, “Atticon Hospital”, Prof.G.Lyritis MD, Ph.D. (2010)
- International Course on Laboratory Animal Science, B.S.R.C. “Alexander Fleming”, 4-15 October 2010, Vari, Greece

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- International Osteoporosis Foundation EL.I.O.S “Osteoporosis” 21-22 February 2015, Athens, Greece.
- Lymphoproliferative Disorders Working Committee Meeting, Summer Oncology Meeting 13-14 June 2014, Eretria, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis” 8-9 February 2014, Athens, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis” 23-24 February 2013, Athens, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis: a pandemic disease with extensive health care and social demands”, NIMITS Hospital, 27-28 October 2012 Athens, Greece.
- 4th International Conference on Osteoimmunology. Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 17-22 June 2012, Corfu, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis” 10-12 February 2012, Athens, Greece.
- 3rd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society & the International Bone and Mineral Society, 7-11 May 2011 Athens, Greece
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis” 11-13 February 2011, Athens, Greece
- 24th International Mammalian Genome Conference, 17-21 October 2010, Crete, Greece.
- 3rd International Conference on Osteoimmunology, 20-25 June 2010, Santorini, Greece
- 18th EEMMO Congress, 14-16 May 2010, Athens, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis” February 5-7 2010 Athens, Greece
- 2nd MUGEN Conference, 8-10 October 2009, Athens, Greece
- 36th European Symposium on Calcified Tissues 23-27 May 2009, Vienna Austria
- 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference June 28 2008, Athens, Greece.
- “Intra-articular perfusions’ influence in Embiomechanics and Biology of synovial cartilage”, L.R.M.S, Medicine School, Ortopedic and Rheumatology Department, May 24 2008.
- Hellenic Society for Biological Sciences “Biology and Society”, February 29 2008, Chalkis, Greece.
- Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS “Osteoporosis: a pandemic disease with extensive health care and social demands”, February 8-10, 2008, Athens, Greece.
- 4th Scientific Conference of Biotechnology, February 2-3, 2008, Athens, Greece.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Niti A*, Rinotas V*, Dacquin R, Bonnet N, Stolina M, Han CY, Kostenuik P, Jurdic P, Ferrari S, Douni E. 2013, "Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice", *J Bone Miner Res*, Vol. 29, No 5, May 2014, pp 1158-1169

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Niti A*, Rinotas V, Douni E (2009). A novel humanized RANKL transgenic mouse model of osteoporosis". *36th European Symposium on Calcified Tissues*, Vienna, Austria, 23-27 May 2009. (* presenting author)
2. Niti A*, Rinotas V, Douni E (2009). A novel genetic model of osteoporosis in transgenic mice expressing human RANKL. *2nd MUGEN Conference*, 8-10 October, Athens. (* presenting author)
3. Niti A*, Rinotas V, Douni E (2010). Generation and analysis of a novel genetic model of osteoporosis: Human RANKL-expressing transgenic mice. *3rd International Conference on Osteoimmunology*, 20-25 June, Santorini, Greece (* presenting author).
4. Niti A*, Dacquin R, Rinotas V, Jurdic P, Douni E (2010). A novel genetic model of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice. *24th International Mammalian Genome Conference*, 17-21 October 2010, Crete, Greece. (* presenting author). Poster prize in Genetics.
5. Niti A*, Rinotas V, Douni E (2011). The creation and analysis of a new genetic model of osteoporosis in transgenic mice overexpressing the RANKL cytokine. *Latsis Foundation Scientific Projects 2010*, 5 May 2011, Athens, Greece. (* presenting author).
6. Niti A*, Dacquin R, Bonnet N, Rinotas V, Ferrari S, Jurdic P, Douni E (2011). Novel genetic models of osteoporosis by overexpressing human RANKL in transgenic mice. *3rd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society &*

the International Bone and Mineral Society, 7-11 May 2011 Athens, Greece.
(* presenting author).

7. Niti A*, Dacquin R, Bonnet N, Rinotas V, Ferrari S, Jurdic P, Douni E (2012). Modeling osteoporosis in transgenic mice overexpressing human RANKL. *4th International Conference on Osteoimmunology. Interactions of the Immune and Skeletal Systems*, 17-22 June, Corfu, Greece. (* presenting author).
8. Niti A*, Dacquin R, Bonnet N, Rinotas V, Ferrari S, Jurdic P, Douni E (2012). Studying human RANKL in transgenic animal models. *Hellenic Osteoporosis Society EL.I.OS "Osteoporosis: a pandemic disease with extensive health care and social demands"*, NIMITS Hospital, 27-28 October 2012 Athens, Greece. (* presenting author).
9. Niti A* (2014). Ειδικά θέματα στην διδασκαλία των Μεταβολικών Νοσημάτων των Οστών. Εργαστήριο Έρευνας παθήσεων μυοσκελετικού συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης». Νοσοκομείο Κ.Α.Τ., 27 Νοεμβρίου 2014 Αθήνα, Ελλάδα. (*κύρια ομιλήτρια).

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἐγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνων δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. Παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς και τις Θεές επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

*Στους γονείς μου
Κωνσταντίνο & Σοφία*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand) μέλος της υπερικογένειας του TNF (Tumor Necrosis Factor), αποτελεί το μόριο κλειδί στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς επάγει την διαφοροποίηση, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών. Η αυξημένη παραγωγή RANKL έχει συνδεθεί με αυξημένη οστική απώλεια σε ασθένειες όπως είναι η οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το πολλαπλούν μυέλωμα, οι οστικές μεταστάσεις και οι περιοδοντικές ασθένειες. Οι μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι το Denosumab, ένα αντι-huRANKL μονοκλωνικό αντίσωμα, αναστέλλει αποτελεσματικά την οστική απώλεια και τα κατάγματα σε οστεοπορωτικούς ασθενείς. Ωστόσο, με τα μέχρι στιγμής δεδομένα, δεν υπάρχει ένα ζωικό πρότυπο υπερέκφρασης του RANKL του ανθρώπου (huRANKL) για την άμεση δοκιμή νέων αναστολέων του σε προκλινικό επίπεδο.

Χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής, στο εργαστήριο της Καθ. Ε. Ντούνη (Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών), δημιουργήθηκαν πρόσφατα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το RANKL γονίδιο του ανθρώπου (TghuRANKL) ώστε να αναπαραχθούν και να μελετηθούν οι παθολογίες που επάγονται από την υπερέκφραση του RANKL. Για να επιτευχθεί ένα σωστό πρότυπο έκφρασης του huRANKL στο ποντίκι, ως διαγονίδιο χρησιμοποιήθηκε ένα γενωμικό τμήμα μεγέθους 200kb που περιείχε ολόκληρο το RANKL γονίδιο του ανθρώπου.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν τα νέα γενετικά μοντέλα οστεοπόρωσης που προέκυψαν από την υπερέκφραση του RANKL. Τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια εμφάνισαν, ανεξαρτήτου φύλου πρώιμη εγκατεστημένη οστική απώλεια ενώ τα επίπεδα έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου συσχετίστηκαν με την σοβαρότητα του φαινοτύπου. Η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 με χαμηλή έκφραση του huRANKL διαγονιδίου εμφάνισε ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο με οστική απώλεια στο σπογγώδες οστόν και μειωμένη οστική αντοχή. Στη διαγονιδιακή σειρά Tg5519 με υψηλή έκφραση του huRANKL διαγονιδίου, παρατηρήθηκε σοβαρή οστική απώλεια στο σπογγώδες, προοδευτική καταστροφή της αυξητικής πλάκας, αυξημένη οστεοκλαστογένεση, αυξημένη οστική ανακατασκευή και έντονα πορώδης δομή στη φλοιώδη μοίρα

του οστού, συνοδευόμενη από μειωμένη οστική αντοχή. Ο πιο σοβαρός οστεοπορωτικός φαινότυπος εμφανίστηκε στην διαγονιδιακή σειρά Tg5520 που είχε την υψηλότερη έκφραση του huRANKL διαγονιδίου και χαρακτηρίζεται από σοβαρή οστική απώλεια στο σπογγώδες, πορώδη δομή στο φλοιώδες οστού, εκτεταμένη ασβεστοποίηση μαλακών ιστών και κατάγματα. Τα TghuRANKL όταν διασταυρώθηκαν με τα οστεοπετρωτικά ποντίκια που φέρουν στο γονιδίωμα τους μια σημειακή μετάλλαξη με αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας του RANKL, ανέστειλαν τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο. Τέλος, η χορήγηση αλενδρονάτης στην σειρά Tg5516 με τον ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο ανέστειλε πλήρως την οστική απώλεια .

Τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια αποτελούν ένα μοναδικό γενετικό πρότυπο οστικής απώλειας και ιδανικό εργαλείο για την μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην οστική απορρόφηση καθώς και για την αξιολόγηση νέων φαρμακευτικών ουσιών και πιθανών αναστολέων της δράσης του RANKL σε προκλινικό επίπεδο, στοχεύοντας ασθένειες με οστική απώλεια όπως είναι η οστεοπόρωση.

ABSTRACT

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) plays a key role in osteoclast-induced bone resorption across a range of degenerative bone diseases, and its specific inhibition has been recently approved as a treatment for women with postmenopausal osteoporosis at high or increased risk of fracture. In the present study, we generated transgenic mice (TghuRANKL) carrying the human RANKL (huRANKL) genomic region and achieved a physiologically relevant pattern of RANKL overexpression in order to establish novel genetic models for assessing skeletal pathologies associated with excessive RANKL and for testing clinical therapeutic candidates that inhibit human RANKL. TghuRANKL mice of both sexes developed early onset bone loss, and the levels of huRANKL expression were correlated with bone resorption and disease severity. Low copy Tg5516 mice expressing huRANKL at low levels displayed a mild osteoporotic phenotype as shown by trabecular bone loss. Notably, overexpression of huRANKL, in the medium copy Tg5519 line, resulted in severe early-onset osteoporosis characterized by lack of trabecular bone, disruption of the growth plate, increased osteoclastogenesis, bone marrow adiposity, increased bone remodeling and severe cortical bone porosity accompanied by decreased bone strength. An even more severe skeletal phenotype developed in the high copy Tg5520 founder with extensive soft tissue calcification. Notably, the osteoporotic phenotype of mutant mice expressing an inactive form of the endogenous RANKL protein was rescued upon crossing these mice with TghuRANKL mice, showing that the transgenic human RANKL protein is fully active in the mouse. Alendronate at the dose of 1mg/Kg was administered subcutaneously in the low-copy Tg5516 mice once a week. Our results confirmed that alendronate fully restored the osteoporotic trabecular structure in Tg5516 mice that exhibits a mild phenotype. These novel huRANKL transgenic models of osteoporosis represent an important advance for understanding the pathogenesis and treatment of high-turnover bone diseases and other disease states caused by excessive RANKL.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	17
ABSTRACT.....	19
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	20
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	25
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	29
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	30
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	32
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	34
1.1 Φυσιολογία του οστίτη ιστού.....	34
1.1.1 Δομή των οστών.....	34
1.1.2 Φυσιολογία της θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού.....	36
1.1.3 Φυσιολογία οστεοβλαστών	36
1.1.4 Διαφοροποίηση οστεοβλαστών	37
1.1.5 Διαδικασία οστικής παραγωγής.....	39
1.1.6 Φυσιολογία οστεοκυττάρων.....	40
1.1.7 Φυσιολογία επενδυματικών κυττάρων	41
1.1.8 Φυσιολογία οστεοκλαστών.....	42
1.1.9 Διαδικασία της οστικής απορρόφησης	43
1.1.10 Οστική ανακατασκευή.....	44
1.1.11 Στάδια οστικής ανακατασκευής.....	45
1.1.12 Παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή	47
1.2 Νέα βιολογικά μόρια σχετιζόμενα με τον οστικό μεταβολισμό.....	50
1.2.1 RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand).....	50
1.2.2 Δομή της κυτταροκίνης RANKL.....	51
1.2.3 Εντόπιση της κυτταροκίνης RANKL.....	53
1.2.4 Ρύθμιση της κυτταροκίνης RANKL.....	53

1.2.5 Μεταλλάξεις του RANKL σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα.....	55
1.3 RANK (Receptor Activator of NF-κB).....	56
1.3.1 Δομή του υποδοχέα RANK.....	56
1.3.2 Εντόπιση του υποδοχέα RANK.....	56
1.3.3 Μεταλλάξεις στον RANK σε ασθενείς και σε ζωικά πρότυπα.....	57
1.4 OPG.....	58
1.4.1 Δομή της OPG.....	58
1.4.2 Εντόπιση της OPG.....	58
1.4.3 Ρύθμιση της έκφρασης της OPG.....	59
1.4.4 Μεταλλάξεις της OPG σε ασθενείς και σε ζωικά πρότυπα.....	59
1.4.5 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό.....	60
1.5 Βιολογικές δράσεις του RANKL.....	62
1.5.1 Μηχανισμός οστεοκλαστογένεσης.....	62
1.5.2 RANKL και Οστεοανοσολογία.....	63
1.6 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του RANKL.....	65
1.7 RANKL και Ρευματοειδής αρθρίτιδα.....	66
1.8 RANKL και Οστεοπόρωση.....	68
1.8.1 Ορισμός Οστεοπόρωσης.....	68
1.8.2 Παθολογία Οστεοπόρωσης.....	69
1.8.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στην Οστεοπόρωση.....	71
1.8.4 Διφωσφονικά και Οστεοπόρωση.....	72
1.8.5 Νεότερες θεραπείες για την Οστεοπόρωση.....	73
1.8.6 Ζωικά Πρότυπα για την μελέτη της Οστεοπόρωσης.....	74
ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	75
ΕΙΔΙΚΟ	
ΜΕΡΟΣ.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	77
2.1 Διαγονιδιακά ποντίκια.....	77
2.1.1 Στελέχη διαγονιδιακών ποντικών.....	77
2.1.2 Χειρισμός πειραματόζων.....	78
2.2 Δημιουργία και αναγνώριση διαγονιδιακών ποντικών.....	78

2.2.1 Απομόνωση DNA από ουρές ποντικών.....	79
2.2.2 Ανάλυση γενωμικού DNA με μεταφορά τύπου Southern.....	80
2.2.2.1 Παρασκευή [32 P] ραδιενεργών DNA ανιχνευτών με την μέθοδο της τυχαίας έναρξης.....	81
2.2.2.2 Αντίδραση σήμανσης.....	82
2.2.2.3 Απομόνωση 32P-σημασμένων DNA ανιχνευτών με χρωματογραφία στήλης Sephadex G-50.....	82
2.2.2.4 Υβριδοποίηση συνθετικών μεμβρανών.....	83
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	84
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR.....	85
2.4 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA).....	85
2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA με την μέθοδο της ουρίας/χλωριούχου λιθίου.....	86
2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτικός έλεγχος του RNA που απομονώθηκε.....	86
2.4.3 Παραγωγή μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) από αγγελιοφόρο RNA (mRNA) με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης	88
2.5 Ιστοπαθολογική ανάλυση.....	91
2.5.1 Παρασκευή ιστολογικών τομών.....	91
2.5.2 Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης.....	92
2.5.3 Χρώση με TRAP (ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση).....	93
2.5.4 Χρώση με καλσεΐνη.....	94
2.6 Μέτρηση δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό του αίματος.....	96
2.6.1 Αρχή λειτουργίας της ανοσοενζυμικής δοκιμής Luminex.....	96
2.6.1 Εξοπλισμός και αντιδραστήρια	99
2.6.2 Γενικές Οδηγίες.....	99
2.6.3 Απομόνωση ορού αίματος.....	100
2.6.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων για την ανοσοδοκιμή.....	101
2.6.5 Πειραματική διαδικασία.....	103
2.7 Ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με την χρήση μικρουπολογιστικής Τομογραφίας (micro-CT).....	105
2.8 Μέτρηση δεικτών οστικής απορρόφησης στον ορό του αίματος.....	107
2.8.1 Αρχή λειτουργίας της ανοσοενζυμικής δοκιμής.....	108
2.8.2 Εξοπλισμός αντιδραστήρια.....	109
2.8.3 Απομόνωση ορού αίματος.....	109

2.8.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων.....	110
2.8.5 Πειραματική διαδικασία.....	110
2.9 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής.....	112
2.10 Προσδιορισμός αιματολογικών παραγόντων.....	114
2.11 Χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών που αναστέλλουν την δράση του RANKL και την οστική απορρόφηση.....	115
2.12 Στατιστική ανάλυση.....	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	118
3.1 Δημιουργία TghuRANKL διαγονιδιακών ποντίκων.....	118
3.2 Ταυτοποίηση του huRANKL διαγονιδίου με την τεχνική του υβριδισμού στυπώματος κατά Southern	119
3.3 Ανίχνευση του huRANKL διαγονιδίου με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR.....	121
3.4 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL.....	122
3.4.1 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους ιδρυτές των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών.....	123
3.4.2 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους TghuRANKL διαγονιδιακούς απογόνους.....	124
3.4.3 Ανίχνευση της huRANKL πρωτεΐνης.....	126
3.5 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5516.....	127
3.5.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5516.....	127
3.5.2 Ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με χρήση micro-CT.....	128
3.5.3 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών.....	129
3.5.4 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών και αιματολογικών παραμέτρων στον ορό και το αίμα των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών.....	131
3.6 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5519.....	133
3.6.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5519.....	133
3.6.2 Ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με χρήση micro-CT.....	137
3.6.3 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών.....	138
3.6.4 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών και αιματολογικών παραμέτρων στον ορό και το αίμα των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών.....	139

3.7 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5520.....	142
3.7.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5520.....	142
3.8 Γενετική διάσωση της RANKL-επαγώμενης οστεοπέτρωσης από την παρουσία του διαγονιδίου huRANKL.....	145
3.9 Προκλινικές δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών στα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια.....	149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	152
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	159

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Ανατομία μακρών οστών (Bianco,1992) ^[1]	35
Εικόνα 1.2 Πορεία διαφοροποίησης των μεσενχυματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες, (Harada, 2003) ^[7]	37
Εικόνα 1.3 Πρωτεϊνικοί δείκτες που εκφράζονται κατά την πορεία διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και χονδροκυττάρων στην διάρκεια της σκελετογένεσης (τροποποιημένο από Dusc P., 2002) ^[2]	38
Εικόνα 1.4 Δομή του οστεοκλάστη και ενδοκυτταρικός μηχανισμός της οστικής απορρόφησης (τροποποιημένο από Current Medicine Group).....	42
Εικόνα 1.5 Οι φάσεις της οστικής ανακατασκευής και τα κύτταρα του οστικού μεταβολισμού που συμμετέχουν σε κάθε φάση. (Raggat, 2010) ^[3]	46
Εικόνα 1.6 Απεικόνιση του γονιδίου RANKL στο χρωμόσωμα 13 (Ensembl genome browser).....	51
Εικόνα 1.7 Τρισδιάστατη δομή του RANKL (RCSB PROTEIN Data Bank).....	52
Εικόνα 1.8 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό (Min 2000) ^[4]	60
Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των οστεκλαστών από τα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς (τροποποιημένο από Walsh, Kim, Kadono, Lorenzo et al, 2006) ^[5]	62
Εικόνα 1.10 Μηχανισμός οστεοκλαστογένεσης (Boyle 2003) ^[6]	63
Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ανοσοποιητικού και σκελετικού συστήματος (τροποποιημένο από Kim 2006) ^[7]	64
Εικόνα 1.12 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του RANKL/RANK/OPG (τροποποιημένο από Wada) ^[8]	66
Εικόνα 1.13 Αλλαγές στην αρχιτεκτονική του οσίτη ιστού σε οστεοπορωτικά οστά (www.mediaclook.com).....	68

Εικόνα 1.14 Στην οστεοπόρωση υπερτερεί η οστική αποδόμηση λόγω αύξησης της δημιουργίας και δράσης των οστεοκλαστών από ποικίλους παράγοντες όπως η πτώση των οιστρογόνων στις εμμηνόπαυσιακές γυναίκες (τροποποιημένο από www.Medscape.com , 2010).....	70
Εικόνα 1.15 Διαφορές στην δομή και αρχιτεκτονική μεταξύ φυσιολογικού και οστεοπορωτικού οστού.....	71
Εικόνα 1.16 Μηχανισμός δράσης του Denosumab (τροποποιημένο από Rodman, 2004) ^[9]	74
Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων στην μεταφορά γενωμικού DNA κατά Southern (τροποποιημένο από www.nptel.ac.in).....	81
Εικόνα 2.2 Διάταξη μακρών οστών και σπονδυλικής μοίρας στην κασέτα ιστολογίας.....	95
Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση των μικροσφαιριδίων (beads) (τροποποιημένο από www.viracorbit.com).	97
Εικόνα 2.4 Βήμα 1: Beads ενισχυμένα με capture Ab προστίθενται στο διάλυμα και δεσμεύουν τον στόχο. Βήμα 2: βιοτινυλιωμένα αντισώματα ανίχνευσης προστίθενται και δημιουργούν sandwich αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος.....	97
Εικόνα 2.5 Βήμα 3: προστίθεται μόριο Streptavidin (SA) ενωμένο με φυκοερυθρίνη (PE) και η αβιδίνη κολλάει με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα. Βήμα 4: Τα beads «διαβάζονται» από το μηχάνημα Luminex.....	98
Εικόνα 2.6 Συσκευή Luminex που επιτρέπει την εκτέλεση πολυπλεκτικών πρωτόκολλων (www.luminex.corp).....	98
Εικόνα 2.7 Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης	102
Εικόνα 3.1 Το γενωμικό τμήμα 200 kb του human RANKL γονιδίου με τις κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές του.....	119
Εικόνα 3.2.Αυτοραδιογραφία μετά από υβριδοποίηση Southern blot γενωμικού DNA.	12
Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA και αυτοραδιογραφία μετά από μεταφορά κατά Southern.....	121

Εικόνα 3.4. Ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών με PCR.....	122
Εικόνα 3.5. Ανάλυση της έκφρασης του γονίδιου RANKL του ανθρώπου σε μεταγραφικό επίπεδο στον σπλήνα και στα μακρά οστά των TghuRANKL ιδρυτών.....	124
Εικόνα 3.6 Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου σε σχέση με το αντίστοιχο του ενδογενούς RANKL (muRANKL) σε διάφορους ιστούς.....	125
Εικόνα 3.7 Ανίχνευση της huRANKL πρωτεΐνης στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών.....	126
Εικόνα 3.8 Πρόοδος της οστικής απώλειας στο σπογγώδες οστό των Tg5516 ποντικών.....	127
Εικόνα 3.9 Ποσοτική εκτίμηση με micro CT της οστικής απώλειας στο σπογγώδες οστό του μηριαίου των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών.....	129
Εικόνα 3.10 Μέτρηση TRACP-5b στον ορό των ποντικών της σειράς Tg5516.....	130
Εικόνα 3.11: Μέτρηση αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό των ποντικών της σειράς Tg5516	130
Εικόνα 3.12 Οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό των Tg5519 ποντικών.	133
Εικόνα 3.13 Καταστροφή της συνέχειας της αυξητικής πλάκας του μηριαίου οστού στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 3 μηνών.	134
Εικόνα 3.14 Πορώδης δομή στο φλοιώδες του μηριαίου οστού των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών.	135
Εικόνα 3.15. Πρόοδος της οστικής απώλειας στο φλοιώδες οστό των Tg5519 ποντικών.	136

Εικόνα 3.16 Σχηματισμός νέου οστού στο φλοιώδες των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών.....	136
Εικόνα 3.17 Η ανάλυση με micro-CT αναδεικνύει την χαρακτηριστική δομή του σπογγώδους σε άγριου τύπου (WT) ποντίκια και την καταστροφή του στην διαγονιδιακή σειρά Tg5519.....	137
Εικόνα 3.18 Αύξηση του δείκτη οστικής απώλειας TRACP-5b στον ορό των Tg5519 ποντικών.....	138
Εικόνα 3.19 Αύξηση του δείκτη οστικής παραγωγής αλκαλική φωσφατάση (ALP) στον ορό των Tg5519 ποντικών.....	139
Εικόνα 3.20 Ιστολογική ανάλυση στο μηριαίο της διαγονιδιακής σειράς Tg5520.....	143
Εικόνα 3.21 Παρουσία πολυάριθμων οστεοκλαστών στο εσωτερικό του φλοιώδους του μηριαίου, πορώδης δομή και αυξημένη λιπογένεση στον μυελό των οστών του Tg5520 ιδρυτή σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια.....	144
Εικόνα 3.22 Έκτοπη ασβεστοποίηση σε σειριακές τομές της καρδιάς και της γλώσσας από τον «ιδρυτή» της σειράς Tg5520.....	145
Εικόνα 3.23 Διάσωση της φυσιολογικής ανάπτυξης στα RANKL ^{ties/ties} ποντίκια με την έκφραση του huRANKL στα Tg5516 ποντίκια.....	146
Εικόνα 3.24 Διάσωση της φυσιολογικής ανάπτυξης στα RANKL ^{ties/ties} ποντίκια με την έκφραση του huRANKL στα Tg5519 ποντίκια.....	146
Εικόνα 3.25 Αναστολή οστεοπετρωτικού φαινοτύπου με την μερική έκφυση δοντιών στα Tg5516/RANKL ^{ties/ties} την πλήρη έκφυση δοντιών στα Tg5519/RANKL ^{ties/ties} ποντίκια.....	147
Εικόνα 3.26 Διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου.....	148
Εικόνα 3.27 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη /ηωσίνη ποντικών άγριου τύπου (WT) και της διαγονιδιακής σειράς Tg5516 στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ή αλενδρονάτη (ALN).....	151

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Συστηματικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή (τροποποιημένο από Lawrence G.Raisz, 1999) ⁽³⁵⁾	48
Πίνακας 1.2 Τοπικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή (τροποποιημένο από Canalis, 1988, Lorenzo, 2008) ^{(36) (37)}	48
Πίνακας 1.3 Ρυθμιστές της έκφρασης των OPG, RANKL, RANK (↑) αυξημένη έκφραση, (↓) μειωμένη έκφραση, (-) αμετάβλητη έκφραση, (τροποποιημένο από Wasj, Choi, 2003) ⁽⁵⁴⁾	54
Πίνακας 3.1 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5516.....	131
Πίνακας 3.2 Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5516.....	132
Πίνακας 3.3 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519.....	140
Πίνακας 3.4 Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519.....	141

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ALN: αλενδρονάτη

ALP: αλκαλική φωσφατάση

ALT: αμινοτρανσφεράση της αλανίνης

ARO: αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση

AST: ασπαρτική αμινοτρανσφεράση

bALP: οστική αλκαλική φωσφατάση

BDH: ουδέτερη φορμαλίνη

Biglycan: μπιγλυκάνη

BMPs: μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού

BMU: βασικές πολυκυτταρικές μονάδες

Bone sialoprotein: οστική σιαλοπρωτεΐνη

BSU: μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού

Decorin: ντεκορίνη

ENU: αιθυλ-νιτροζουρία

FI: ένταση φθορισμού

Fibroblast Growth Factor-2: αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών

FGF-2: αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2

IGF-I: αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης I

IGF-II: αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης II

IFN-γ: ιντερφερόνη γ

IL-1: ιντερλευκίνη-1

IL-1β: ιντερλευκίνη-1β

IL-4: ιντερλευκίνη-4

IL-6: ιντερλευκίνη-6

IL-11: ιντερλευκίνη-11

IL-13: ιντερλευκίνη-13

IL-18: ιντερλευκίνη-18

MCSF-1: παράγοντας διέγερσης αποικιών 1

MHCI: μείζωνο σύστημα ιστοσυμβατότητας τάξης I

Micro-CT: μικρο-υπολογιστική τομογραφία
muRANKL: υποδοχέας του ενδογενούς γονιδίου RANKL
OCIF: οστεοκλαστογένεση
ODF: παράγοντας διαφοροποίησης οστεοκλαστών
OPG: οστεοπροτεγερίνη
OPGL: υποδοχέας της οστεοπροτεγερίνης
Osteoblasts: οστεοβλάστες
Osteocalcin: οστεοκαλσίνη
Osteonectin: οστεονεκτίνη
Osteopontin: οστεοποντίνη
PDGF: αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων
PGE2: προσταγλαδίνη E2
PTH: παραθορμόνη
RT-PCR: αντιστροφή μεταγράψαση
QCT: υπολογιστική τομογραφία
RANK: ο υποδοχέας του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ
RANKL: ο προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ
SA-PE: στρεπταβιδίνη-φυκοερυθρίνη
SGOT-AST: ασπαρτική τρανσαμινάση
SGPT-ALT: τρανσαμινάση της αλανίνης
Transforming Growth Factor-β: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
TGF-β: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
TGF-β1: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β1
TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων
TNF-α: παράγοντας νέκρωσης όγκων α
TRAP: ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική έρευνα πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», στο εργαστήριο της Επ. Καθηγήτριας Ελένης Ντούνη του Ινστιτούτου Ανοσολογίας σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια της εκπόνησης διδακτορικής διατριβής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με Επιβλέπων τον Καθηγητή κ. Μ. Κουτσιλιέρη (Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ).

Η ολοκλήρωση μιας εργασίας είναι αποτέλεσμα συνολικής προσπάθειας και ίσως εκεί βρίσκεται το νόημα της πραγματοποίησής της. Χωρίς τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τις συμβουλές των καθηγητών και συναδέλφων μου θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί και να αποκτήσει τόσο την μορφή όσο και την ποιότητα που έχει τώρα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, αλλά κυρίως τον Καθηγητή κ. Μ. Κουτσιλιέρη (ΕΚΠΑ) και την Επ. Καθηγήτρια και υπεύθυνη της έρευνας κ. Ε. Ντούνη (Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμιγκ», Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο) για την άμεση επίβλεψη και πολύτιμη καθοδήγηση κατά την διάρκεια της έρευνας και τις σημαντικές υποδείξεις τους σε όλα τα στάδια της καθώς και στην τελική διαμόρφωση του κειμένου.

Ιδιαιτέρως ευχαριστώ τον συνάδελφό μου Δρ. Ε. Ρηνώτα για την υπομονή του και την μεταφορά της πολύτιμης εμπειρίας του και μέρους των πραγματικά ανεξάντλητων γνώσεων που διαθέτει.

Ευχαριστώ ειλικρινά όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Επ. Καθ. κ. Ε. Ντούνη και κυρίως τον συνάδελφό μου Δρ. Φ. Ιωακειμίδη για τις πολύτιμες συμβουλές στην διάρκεια των πειραμάτων.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω μια ομάδα ανθρώπων του στενού φιλικού περιβάλλοντός μου που αποτέλεσαν για εμένα την δεύτερη μου οικογένεια, για την συνεχή στήριξη από την αρχή μέχρι το τέλος με όλα τα εμπόδια και τις δυσκολίες που μπορεί να προέκυψαν στην πορεία αυτού του έργου. Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική συμπαράσταση καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

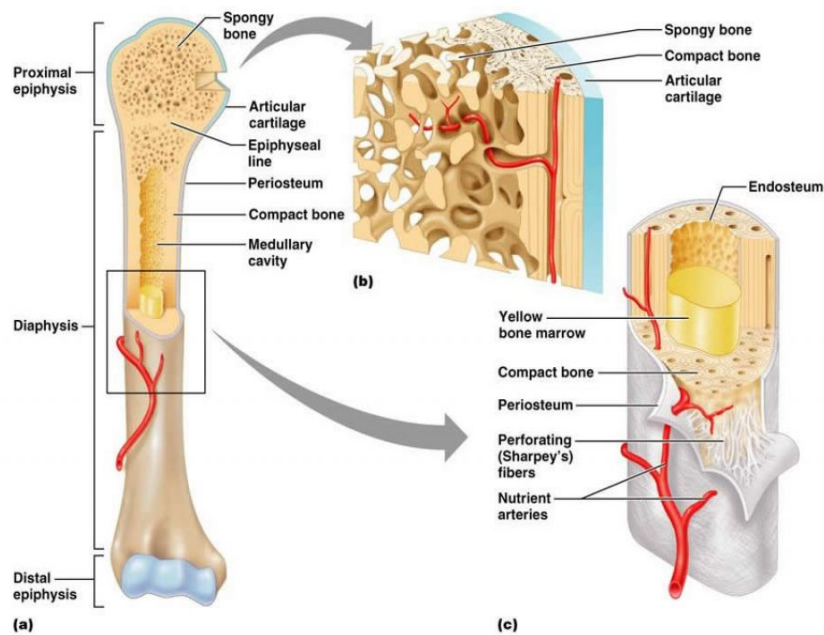
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσιολογία του οστίτη ιστού

1.1.1 Δομή των οστών

Το σκελετικό σύστημα παρουσιάζει έντονη μεταβολική δραστηριότητα και πολλαπλές λειτουργίες. Η κυριότερη λειτουργία του σε συνεργασία με τα άλλα στοιχεία του μυοσκελετικού συστήματος (αρθρώσεις, μύες, σύνδεσμοι) αφορά την κίνηση και στήριξη του σώματος. Εξασφαλίζει την προστασία των ζωτικών οργάνων με την δημιουργία οστέινων κοιλοτήτων και συμβάλλει στην ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου, μαγνησίου και φωσφόρου. Στην πράξη αποτελεί μια τεράστια αποθήκη ασβεστίου απελευθερώνοντας ιονισμένο ασβέστιο στον εξωκυττάριο χώρο κάθε φορά που παρατηρείται έλλειψη του στον οργανισμό. Τέλος, αποτελεί την έδρα της αιμοποίησης.

Ο σκελετός, όργανο υψηλής ειδίκευσης και δυναμικής, αποτελείται από κύτταρα με εξειδικευμένη δράση, επιμεταλλωμένες και μη-επιμεταλλωμένες επιφάνειες συνδετικού ιστού και από κενούς χώρους μεταξύ των οποίων εντοπίζεται η κοιλότητα του μυελού των οστών, οι κοιλότητες των αγγείων και τα οστικά βοθρία. Τα οστά δεν είναι ούτε μορφολογικά ούτε μηχανικά ομοιογενή, αλλά η ανομοιογένειά τους όχι μόνο δεν εμποδίζει την λειτουργική τους προσαρμογή, αλλά αντίθετα συνεισφέρει σ' αυτή. Η προσαρμογή στην μηχανική λειτουργία αφορά στο σχήμα, στην αξονική μορφή, στην κατανομή του υλικού κατά το μήκος και στην εσωτερική τους δομή. Μακροσκοπικά τα οστά αποτελούνται στις δύο άκρες από τις επιφύσεις στο εσωτερικό των οποίων εντοπίζονται περιοχές με διαπλεκόμενες κοιλότητες που αποτελούν τη σπογγώδη μοίρα του οστού (Εικ.1.1), και κεντρικά από τη διάφυση, περιοχή χωρίς κοιλότητες που αποτελεί τη συμπαγή (φλοιώδη) μοίρα του οστού^[1].



Εικόνα 1.1 Ανατομία μακρών οστών (Bianco,1992)^[1]

Τόσο το φλοιώδες όσο και το σπογγώδες οστόύν αποτελούν δύο συστατικά δομικά και λειτουργικά διαφορετικά. Η πορωτικότητα του φλοιώδους είναι μεταξύ 5-30% και του σπογγώδους 30-90%, ενώ και η μηχανική τους συμπεριφορά διαφέρει σημαντικά. Και τα δύο είναι δυνατόν να θεωρηθούν από μηχανικής άποψης ως το ίδιο υλικό με ποικίλη πυκνότητα, αν και η πυκνότητα δεν αποτελεί το μόνο καθοριστικό στοιχείο. Το σπογγώδες οστόύν παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα συνθετικά πωρώδη υλικά. Η ανάμειξη και των δύο ειδών οστίτη ιστού, προκειμένου να σχηματίσουν τα οστά, αυξάνει δυσανάλογα την αντοχή των οστών σε σχέση με αυτή που θα παρουσίαζαν εάν αποτελούνταν μόνο από ένα είδος ιστού. Παράδειγμα αυτής της ισορροπίας είναι οι σπόνδυλοι, όπου τόσο το φλοιώδες κέλυφος όσο και το εκτεταμένο δίκτυο του σπογγώδους οστού συμμετέχουν στην αύξηση της μηχανικής αντοχής. Το σπογγώδες οστόύν παρουσιάζει μικρότερη αντοχή από το φλοιώδες, έχει όμως την δυνατότητα πολύ μεγαλύτερης παραμόρφωσης και ελαστικότητας ^[10].

Το ώριμο οστό αποτελείται σε ποσοστό 25% από οργανική ουσία, συμπεριλαμβανομένων των διαφόρων τύπων οστικών κυττάρων (2-5%), κατά 5% από νερό και κατά 70% από ανόργανα μέταλλα, κυρίως μόρια υδροξυαπατίτη ($[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$). Η σύνδεση του υδροξυαπατίτη με τις ίνες κολλαγόνου είναι υπεύθυνη για την χαρακτηριστική σκληρότητα και αντίσταση του οστού. Το νεο-

σχηματιζόμενο οστό πριν την διαδικασία της προσθήκης ανόργανων αλάτων, δηλαδή τη διαδικασία της επιμετάλλωσης της θεμέλιας ουσίας, αποτελείται σε ποσοστό 94% από ίνες κολλαγόνου και ονομάζεται οστεοειδές. Διάφορες πρωτεΐνες μοναδικές στο οστό, όπως η οστεοκαλσίνη, παγιδεύονται στην θεμέλια ουσία και ρυθμίζουν τη διαδικασία της επιμετάλλωσης ή μεταβιβάζουν λειτουργικά σήματα μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών ^[1].

1.1.2 Φυσιολογία της θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού

Η οργανική θεμέλια ουσία του οστίτη ιστού αποτελεί ένα καλά οργανωμένο δίκτυο πρωτεϊνών. Η κύρια συστατική ύλη είναι το κολλαγόνο τύπου I, ενώ οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας καταλαμβάνουν το 10% της συνολικής πρωτεϊνικής σύστασης. Μία πληθώρα πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας έχουν ανιχνευθεί, μεταξύ των οποίων κυριότερες είναι η οστεοκαλσίνη (osteocalcin), η οστεοποντίνη (osteopontin), η οστεονεκτίνη (osteonectin), η οστική σιαλοπρωτεΐνη (bone sialoprotein), η ντεκορίνη (decorin) και η μπιγλυκάνη (biglycan) ^{[11],[12]}. Η οστεοκαλσίνη και η οστική σιαλοπρωτεΐνη κατά αποκλειστικότητα είναι ειδικές του οστίτη ιστού, ενώ οι υπόλοιπες ανιχνεύονται και σε μη ασβεστοποιημένους ιστούς ^[13].

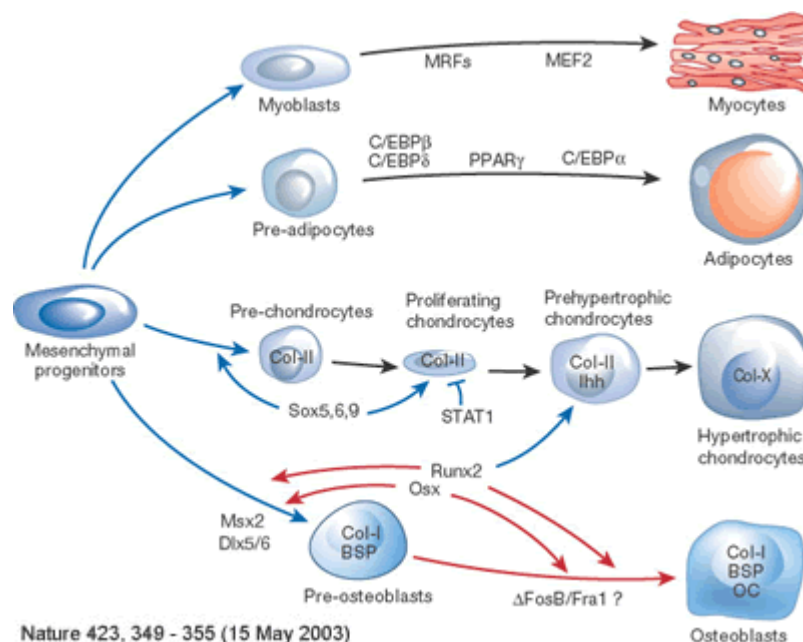
1.1.3 Φυσιολογία οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες (osteoblasts) είναι τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα του οστίτη ιστού, υπεύθυνα για τον σχηματισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη ρύθμιση της απόθεσης των ανόργανων συστατικών. Μορφολογικά, έχουν κυβοειδές σχήμα και εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες μαζί με τις πρόδρομες μορφές τους, σχηματίζοντας μια συνεχή κυτταρική στοιβάδα. Μια πληθώρα κυτταρικών υποδοχέων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν ανιχνευθεί στην κυτταρική μεμβράνη των οστεοβλαστών με σκοπό την επικοινωνία με τα υπόλοιπα κύτταρα του οστίτη ιστού και την θεμέλια ουσία καθώς και την απόκριση σε μεταβολικά και μηχανικά ερεθίσματα ^[14]. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν άφθονη πυροφωσφορική υδρολάση και αλκαλική φωσφατάση, καθώς επίσης, υποδοχείς για την παραθορμόνη, τα οιστρογόνα και την 1.25 διυδροξυβιταμίνη D₃.

Ο χρόνος ζωής των οστεοβλαστών στον άνθρωπο κυμαίνεται στις 8 εβδομάδες όπου σε αυτό το χρονικό διάστημα εναποθέτουν 1.5-15 μm οστεοειδούς την ημέρα. Μετά την ωρίμανση τους ορισμένοι οστεοβλάστες παγιδεύονται στην θεμέλια ουσία, μεταβάλλουν το φαινότυπο και διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα.

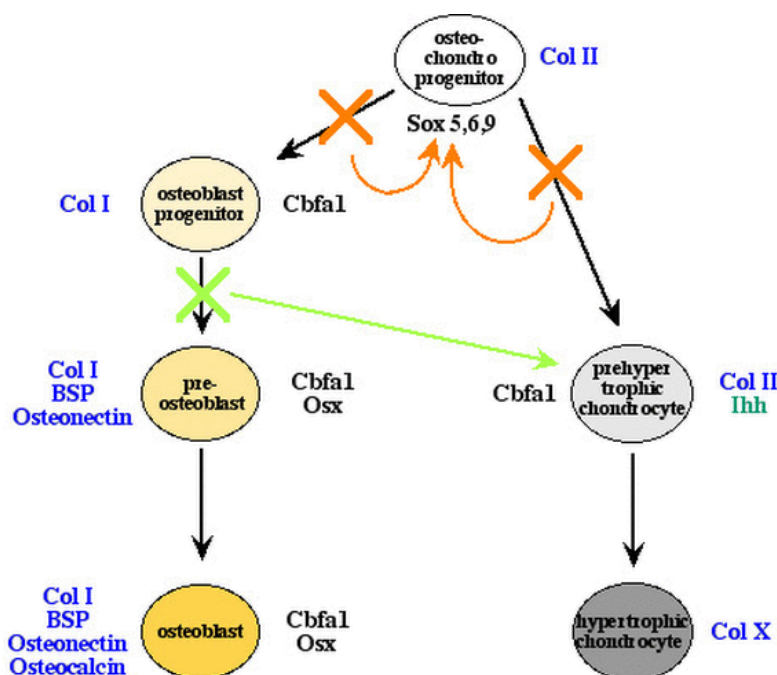
1.1.4 Διαφοροποίηση οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πολυδύναμα αδιαφοροποίητα μεσενχυματικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα, οστικά κύτταρα, μυϊκά κύτταρα ή λιποκύτταρα μετά από την επίδραση τοπικών ή ορμονικών παραγόντων (Εικ.1.2). Παρόλο που στο στρώμα του μυελού των οστών δεν έχουν ανιχνευθεί πρόδρομα αδιαφοροποίητα κύτταρα, *in vitro* και *in vivo* πειράματα δείχνουν την ύπαρξη ενός κοινού προγονικού κυττάρου μεταξύ των λιποκυττάρων και των οστεοβλαστών [15], [16].



Εικόνα 1.2 Πορεία διαφοροποίησης των μεσενχυματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες, (Harada, 2003) [7].

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο πρώιμος καθορισμός των πρόδρομων μεσενχυματικών 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 α1 αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου I, της οστικής σιαλοπρωτεΐνης, της οστεοποντίνης, του TGF-β και της οστεοκαλσίνης επάγοντας τους μηχανισμούς έκφρασής τους στο οστόν [17].



Εικόνα 1.3 Πρωτεϊνικοί δείκτες που εκφράζονται κατά την πορεία διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και χονδροκυττάρων στην διάρκεια της σκελετογένεσης (τροποποιημένο από Ducy P., 2002) [2].

Πληθώρα αυξητικών παραγόντων κατέχουν σημαντική θέση στην ρύθμιση της οστεοβλαστογένεσης (Εικ.1.3), όπως ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor-β, TGF-β), ο οποίος αναστέλλει την έκφραση του Cbfa1 σε καλλιέργειες οστεοβλαστικών κυττάρων, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2), ο οποίος συμμετέχει κυρίως στην πορεία διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), οι οποίες επάγουν in vitro την έκφραση του Cbfa1.

Κατά την πορεία διαφοροποίησης των πρόδρομων μεσενχυματικών κυττάρων προς τους ώριμους οστεοβλάστες, η ενεργοποίηση κυτταρικών μονοπατιών οδηγεί στην έκφραση ειδικών πρωτεϊνών χαρακτηριστικών της οστεοβλαστικής έκφρασης. 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 δίνει το έναυσμα για την έναρξη της εναπόθεσης μετάλλων στο οστεοειδές από τους ώριμους οστεοβλάστες ^[18].

1.1.5 Διαδικασία οστικής παραγωγής

Η οστική παραγωγή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τον καθορισμό της πορείας διαφοροποίησης (commitment) των πρόδρομων μεσενχυματικών κυττάρων προς την κυτταρική σειρά των οστεοπρογονικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών των οστεοβλαστών και την προοδευτική διαφοροποίηση τους σε ώριμους λειτουργικούς οστεοβλάστες. 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 τον μυελό των οστών κατά την διάρκεια της φάσης της οστικής παραγωγής ^[19].

Μέσω της οστικής παραγωγής δίνεται η δυνατότητα παραγωγής οστού, κυρίως κατά την φάση της σκελετικής ανάπτυξης, καθώς και σε έκτακτες ανάγκες όπως κατά την πύρωση των καταγμάτων. Επομένως, το οστόν έχει σημαντική ικανότητα προσαρμογής στις βιολογικές και μηχανικές μεταβολές που υφίσταται και μοναδική ικανότητα αποκατάστασης στην αρχική του μορφή (μετά από κάταγμα), ξεχωρίζοντας με αυτό τον τρόπο από τους άλλους ιστούς.

Οι ώριμοι οστεοβλάστες παράγουν και εναποθέτουν κολλαγόνο και μη κολλαγονικές πρωτεΐνες ^[20]. Από τους 13 τύπους κολλαγόνου οι οστεοβλάστες παράγουν τον τύπο I, που είναι ο μόνος που μπορεί να υποστεί μετάλλωση. Το παραγόμενο κολλαγόνο χρειάζεται ένα χρονικό διάστημα 5-10 ημερών για να ωριμάσει. Η δυσεξήγητη αυτή φάση ωρίμανσης του κολλαγόνου τύπου I έχει μεγάλη πρακτική σημασία, καθώς διευκολύνει τους οστεοβλάστες να μην

εγκλωβισθούν μέσα στο παραγόμενο από αυτούς οστό πριν ολοκληρωθεί το οστεοπαραγωγικό έργο.

Κατά την διάρκεια επιμετάλλωσης του κολλαγόνου τύπου I, μερικοί από αυτούς εγκλωβίζονται στην θεμέλια ουσία και μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα, ενώ στην φάση ηρεμίας μετατρέπονται σε αποπλατυσμένα επενδυματικά κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι οστεοβλάστες μπορούν να παράγουν και καθεψίνη K^[21], μια κυστεΐνοπρωτεΐνάση που εκκρίνουν οι οστεοκλάστες με κολλαγονολυτική δράση. Η οστεοβλαστική παραγωγή καθεψίνης K πιθανόν συμβάλλει στην αποδόμηση κατεστραμμένων ινιδίων ή στην ανακύκλωση ελαττωματικού κολλαγόνου τύπου I.

1.1.6 Φυσιολογία οστεοκυττάρων

Τα οστεοκύτταρα (osteocytes) η πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων του οστίτη ιστού, αποτελούν προϊόντα διαφοροποίησης των ώριμων οστεοβλαστών και βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες ή κυψελίδες (lacunae) των πεταλίων του οστού, έχοντας εγκλωβιστεί εκεί κατά την διάρκεια επιμετάλλωσης της θεμέλιας ουσίας του οστού.

Παρουσιάζουν αστεροειδή δομή με δενδριτικές προσεκβολές του πρωτοπλάσματός τους, επικοινωνώντας με τον τρόπο αυτό με τα παρακείμενα οστεοκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα των οστικών επιφανειών μέσα από σωληνίσκους (canaliculi)^[22].

Το εκτεταμένο αυτό δίκτυο επικοινωνίας είναι υπεύθυνο για την μεταβίβαση σημάτων για τις φορτίσεις που υφίστανται τα οστά, καθώς και την ενεργοποίηση της οστικής ανακατασκευής. Τα οστεοκύτταρα έχουν την ικανότητα μηχανοϋποδοχέων και μπορούν να αντιλαμβάνονται μηχανικές φορτίσεις, να ενεργοποιούνται από τις πιέσεις του υγρού των μικροσωληνίσκων και να τις μεταφράζουν σε βιοχημικά σήματα^[23]. Έτσι, με τον εγκλεισμό τους στην θεμέλια ουσία σταματούν να πολλαπλασιάζονται και μέσω των χασματοσυνδέσεων σχηματίζουν δίκτυα επικοινωνίας με τους οστεοβλάστες, μεταβιβάζοντας σε αυτούς τα σήματα από τα μηχανικά φορτία που ασκούνται στην επιφάνεια του οστού^[24].

Έχει αποδειχθεί ότι τα οστεοκύτταρα, όπως και οι οστεοβλάστες, μπορούν να συνθέτουν θεμέλια ουσία, η οποία προοδευτικά μεταλλώνεται, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα οστεοκύτταρα συμμετέχουν στην οστική ανακατασκευή. Όταν εγκλωβιστούν στην επιμεταλλωμένη θεμέλια ουσία, εκκρίνουν την πρωτεΐνη σκληροσίνη, η οποία αναστέλλει την περαιτέρω παραγωγή οστού από τους οστεοβλάστες [25], [26].

Επιπλέον, τα οστεοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου. Στον συνολικό οστεοκυτταρικό χώρο των κυψελίδων και των σωληνίσκων περιέχονται 1.5 λίτρο εξωκυττάρου υγρού και 5-20 γραμμάρια ανταλλάξιμου ιονισμένου ασβεστίου, γεγονός που ενισχύει την άποψη συμμετοχής των οστεοκυττάρων στην ομοιοστασία του ασβεστίου. Για τον λόγο αυτό δεν θεωρούνται απλά «παροπλισμένοι» οστεοβλάστες, αλλά μάχιμα οστικά κύτταρα.

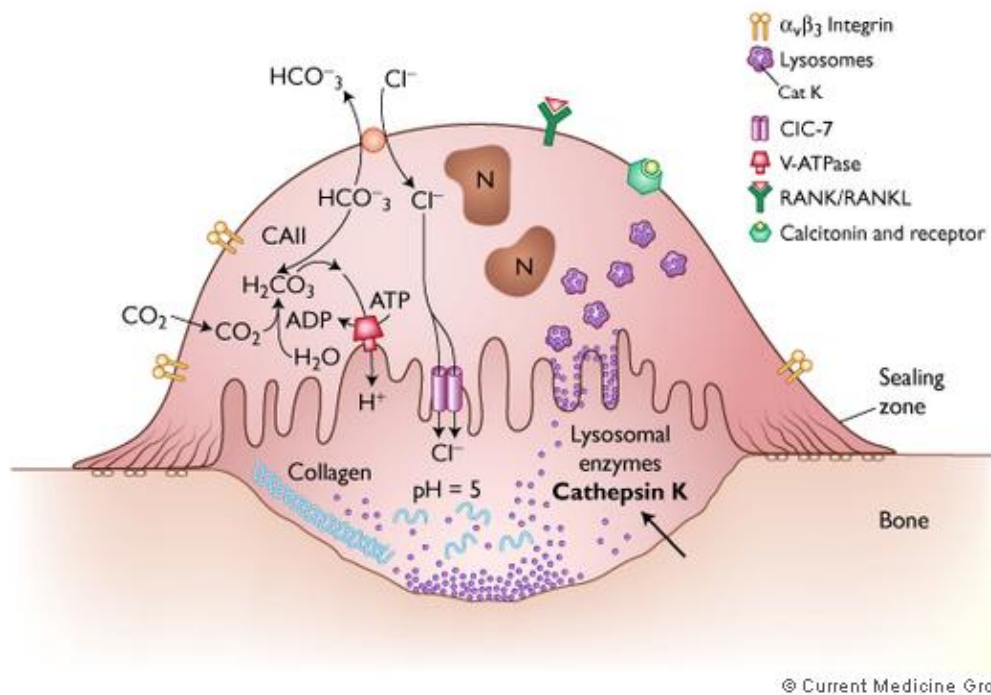
Τα οστεοκύτταρα μπορούν να υποστούν κυτταρικό θάνατο *in situ* με απόπτωση. Τα νεκρά κύτταρα είτε απομακρύνονται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, αφήνοντας άδειες κυψελίδες, είτε αφαιρούνται από τους οστεοκλάστες κατά την οστική απορρόφηση, πριν τον θάνατό τους.

1.1.7 Φυσιολογία επενδυματικών κυττάρων

Οι οστικές επιφάνειες κατά την φάση ηρεμίας καλύπτονται από ένα στρώμα πάχους 1-2 μm μη επιμεταλλωμένης θεμέλιας ουσίας στην επιφάνεια της οποίας ανιχνεύεται μία στοιβάδα επίπεδων και επιμηκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται επενδυματικά και προέρχονται από οστεοβλάστες που έχουν επιτελέσει και ολοκληρώσει την οστεοπαραγωγική τους λειτουργία. Ο ρόλος των επενδυματικών κυττάρων είναι να προφυλάσσουν την θεμέλια ουσία από την δράση των οστεοκλαστών, οι οποίοι δεν έχουν την ικανότητα να αποικοδομήσουν μη επιμεταλλωμένες οστικές επιφάνειες. Πιθανολογείται ότι τα επενδυματικά 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 [27].

1.1.8 Φυσιολογία οστεοκλαστών

Οι οστεοκλάστες (osteoclasts) είναι κύτταρα υψηλής εξειδίκευσης [28], εντοπισμένα στις ενδοοστικές επιφάνειες του οστού, υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση. Πρόκειται για μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα (10-20 πυρήνες/οστεοκλάστη) με μικρή συχνότητα εμφάνισης (2-3 οστεοκλάστες/mm³). Οι οστεοκλάστες παρουσιάζουν κυτταρική πόλωση, δηλαδή μπορούν να απορροφούν οστούς μόνο από την κροσσωτή τους επιφάνεια. Η «πτυχωτή» αυτή παρυφή αποτελεί την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του οστεοκλάστη που βρίσκεται σε στενή επαφή με την προς απορρόφηση οστική επιφάνεια (Εικ.1.4).



Εικόνα 1.4 Δομή του οστεοκλάστη και ενδοκυτταρικός μηχανισμός της οστικής απορρόφησης.

Η κροσσωτή αυτή επιφάνεια αποτελεί μία σύνθετη κατασκευή από επιμήκεις αναδιπλούμενες προσεκβολές του κυτταροπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης, μέσα από την οποία διέρχονται οστεολυτικά ένζυμα και οξέα. Γύρω από την κροσσωτή επιφάνεια βρίσκεται η διαφανής ζώνη (clear zone), της οποίας το κυτταρόπλασμα αποτελείται από πολυάριθμα νημάτια ακτίνης. Τα νημάτια ακτίνης δίνουν την δυνατότητα στον οστεοκλάστη να προσκολλάται με την διάφανη ζώνη στο οστούς, δημιουργώντας έτσι ένα στεγανό περίβλημα (sealing

zone), μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η οστική απορρόφηση ^[29]. Η κοιλότητα που δημιουργείται από την απορρόφηση του οστού ονομάζεται κοιλότητα του Howship ή βοθρίο απορρόφησης.

Η παρουσία τους κοντά στις οστικές επιφάνειες ή στα βοθρία του Howship διευκολύνει την ανίχνευσή τους. Η παρουσία όμως ενεργοποιημένων μακροφάγων κοντά στις οστικές επιφάνειες κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις των οστών δυσχεραίνει την αναγνώριση τους. Ειδικοί φαινοτυπικοί κυτταρικοί δείκτες όπως ο υποδοχέας της βιτρονεκτίνης ή η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (tartrate resistant acid phosphatase - TRAP), χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ώριμων οστεοκλαστών ^[30]. Η χρήση του υποδοχέα της καλσιτονίνης ο οποίος εκφράζεται αποκλειστικά στην επιφάνεια των πρόδρομων αλλά και των ώριμων οστεοκλαστών αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση στο διαχωρισμό των δύο κυτταρικών πληθυσμών ^[31].

1.1.9 Διαδικασία της οστικής απορρόφησης

Οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες προσκολλώνται με την βοήθεια των ιντεγκρινών ^[32] στην οστική επιφάνεια δημιουργώντας ένα στεγανό χώρο μεταξύ κυττάρου και οστού. Οι ιντεγκρίνες 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 ^[32]. Κατά την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, τα «ποδοσώματα» συγκεντρώνονται στην κυτταρική περιφέρεια σχηματίζοντας μια μεγάλη κυκλική δομή, το δακτύλιο ακτίνης. Η ενεργότητα των οστεοκλαστών απαιτεί τον σχηματισμό του δακτυλίου ακτίνης και η διάσπασή του αναστέλλει την οστική απορρόφηση. Η $\alpha\beta_3$ ιντεγκρίνη που είναι ο υποδοχέας της βιτρονεκτίνης, αποτελεί την κύρια ιντεγκρίνη των οστεοκλαστών, η οποία κατέχει καθοριστικό ρόλο στα γεγονότα προσκόλλησης και στην απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών. Αναστολή της δράσης της μέσω αντισωμάτων που παρεμποδίζουν την επαφή της με την θεμέλια ουσία του οστού, προκαλεί αναστολή της απορροφητικής δράσης των οστεοκλαστών ^[33].

Από την κροσσωτή επιφάνεια του οστεοκλάστη εκκρίνονται πρωτεϊνολυτικά ένζυμα, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδρογόνο (Εικ.1.4). Οι υδρολάσες και οι κυστεοπρωτεϊνάσες με κυριότερη την καθεψίνη Κ, πέπτουν το πρωτεϊνικό τμήμα της θεμέλιας ουσίας σε ένα περιβάλλον με χαμηλό pH και οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη διαλύονται με την δράση των εκκρινόμενων οξέων ^[34].

Επιπλέον, ελεύθερες ρίζες, κυρίως οξυγόνου βοηθούν στην πέψη του κολλαγόνου. Από την διάλυση του υδροξυαπατίτη απελευθερώνονται ιόντα ασβεστίου που απορροφώνται από τον οστεοκλάστη. Η ανταλλαγή των ιόντων ασβεστίου επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός ειδικού υποδοχέα του ασβεστίου. Όταν ο οστεοκλάστης κορεσθεί από ιόντα ασβεστίου αποκολλάται και απομακρύνεται από το οστόν. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι οστεοκλάστες διατηρούν την ικανότητά τους να κινούνται μακριά από το σημείο της οστικής απορρόφησης και να απορροφούν οστόν σε άλλο σημείο αφού πρώτα αποβάλλουν στον εξωκυττάριο χώρο το ασβέστιο που απορρόφησαν.

Κατά την λειτουργία τους οι οστεοκλάστες βρίσκονται υπό την συνεχή επίδραση της καλσιτονίνης και πιθανόν της αμυλίνης. Η μεμβράνη τους έχει υποδοχείς για την καλσιτονίνη ενώ βρέθηκε ότι έχουν πυρηνικούς υποδοχείς και για τα οιστρογόνα ^[35]. Η οστεοκλαστική δραστηριότητα ελέγχεται τοπικά από ορισμένους παράγοντες που προέρχονται από το οστόν και το ενδοθήλιο. Σπουδαιότεροι από αυτούς είναι οι προσταγλανδίνες, το οξείδιο του αζώτου και το πεπτιδίο ενδοθηλίνη. Οι δύο τελευταίες ουσίες έχουν έντονη ανασταλτική δράση στην οστεοκλαστική λειτουργία ^[36].

1.1.10 Οστική ανακατασκευή

Ο οστίτης ιστός χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη δυνατότητα συνεχούς ανακατασκευής σε όλη τη διάρκεια της ζωής λόγω της συνεχούς απόκρισής 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 Turnover). Μέσω αυτής επιτυγχάνεται η ανανέωση του σκελετού, η επιδιόρθωση των μικροφθορών των μικρομονάδων του, η σταθερότητα των τιμών του

ιονισμένου ασβεστίου του εξωκυττάριου χώρου και η προσαρμογή της ποσότητας του οστού στις εκάστοτε μηχανικές ανάγκες του σκελετού.

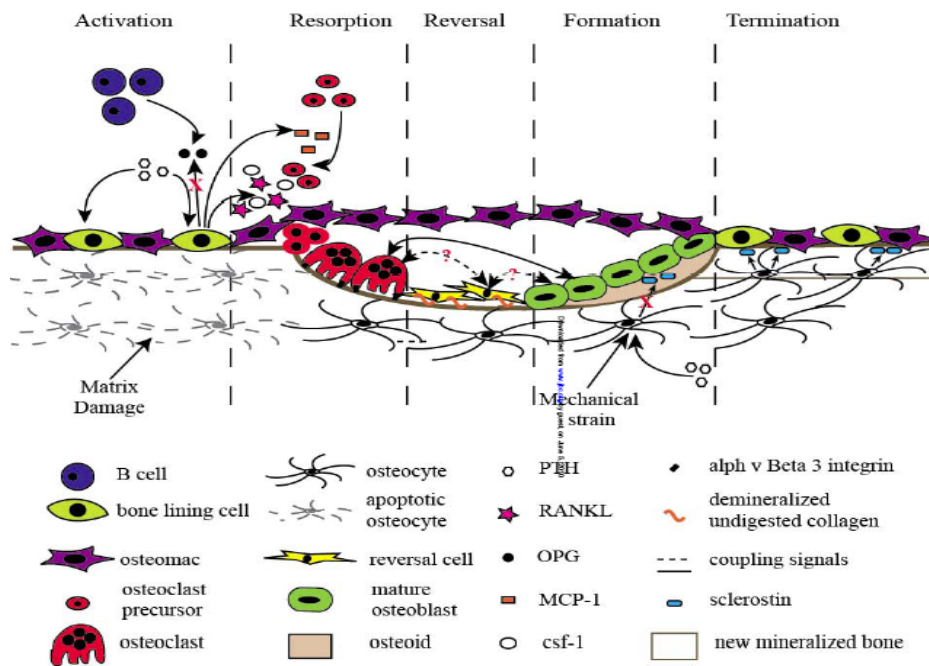
Η οστική ανακατασκευή είναι το αποτέλεσμα δύο αντίρροπων λειτουργικών διαδικασιών, της οστικής παραγωγής που επιτελείται από τους οστεοβλάστες και της οστικής απορρόφησης που επιτελείται από τους οστεοκλάστες. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι δύο διαδικασίες βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους, εξασφαλίζοντας την σκελετική ακεραιότητα. Η συνεργασία αυτή μεταξύ οστεοκλαστών-οστεοβλαστών ονομάζεται φαινόμενο σύζευξης (coupling) και αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της σωστής οστικής ανακατασκευής. Η διατάραξη, αντίθετα, αυτής της ισορροπίας ονομάζεται αποσύζευξη και αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης μεταβολικού νοσήματος όπως είναι η οστεοπόρωση^[37] που χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απώλεια.

Σε μικροσκοπικό επίπεδο η οστική ανακατασκευή λαμβάνει χώρα σε μικρές περιοχές της σπογγώδους και φλοιώδους 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^[38].

1.1.11 Στάδια οστικής ανακατασκευής

Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής διενεργείται σε έξι φάσεις (Εικ.1.5) 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) την φάση επιμετάλλωσης [3], [39], [40].



Εικόνα 1.5 Οι φάσεις της οστικής ανακατασκευής και τα κύτταρα του οστικού μεταβολισμού που συμμετέχουν σε κάθε φάση. (Ragat, 2010) [3]

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). Η ελεύθερη επιφάνειά της επιστρώνεται από άφθονα αποπλατυσμένα επενδυματικά κύτταρα τα οποία σε αυτή την φάση είναι ανενεργά.

B) Φάση ενεργοποίησης (Activation phase): ενεργοποιείται η οστική επιφάνεια μέσω απομάκρυνσης των επενδυματικών κυττάρων και πέψης της μεμβράνης του ενδόστευου από τη δράση της πρωτεάσης κολλαγενάσης. Παράλληλα οι πρόδρομοι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, συντήκονται σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα τους ώριμους οστεοκλάστες, οι οποίοι τελικά συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του

οστού. Η φάση της ενεργοποίησης διαρκεί τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό 5-7 ημέρες.

Γ) Φάση οστικής απορρόφησης (Resorption phase): οι επιστρατευμένοι οστεοκλάστες προσκολλούνται στην οστική επιφάνεια και με την δράση οστεολυτικών οξέων και πρωτεϊνών ξεκινούν προοδευτικά την οστική αποικοδόμηση. 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 κοιλότητας που δημιουργείται κατά την οστική απορρόφηση (βοθρίο του Howship) μόλις κορεσθούν από ιόντα ασβεστίου ή πεθαίνουν με απόπτωση και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες. Στην φάση αυτή μονοπύρνα κύτταρα αδιευκρίνιστης ακόμα προέλευσης, απομακρύνουν τα υπολείμματα κολλαγόνου και προετοιμάζουν την οστική επιφάνεια για την επόμενη φάση της οστικής παραγωγής.

Ε) Φάση οστικής παραγωγής (Formation phase): οι προ-οστεοβλάστες προσελκύονται χημειοτακτικά από τους αυξητικούς παράγοντες (TGF-β, IGF-I, IGF-II, BMPs) που έχουν απελευθερωθεί στη θεμέλια ουσία και διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν και εναποθέτουν προοδευτικά θεμέλια ουσία (κυρίως κολλαγόνου τύπου I, που είναι ο μόνος τύπος κολλαγόνου που μπορεί να υποστεί μετάλλωση) που δεν έχει επιμεταλλωθεί ακόμα (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 επενδυματικά κύτταρα και λειτουργεί σαν μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού. Η φάση της επιμετάλλωσης, όπου ενσωματώνεται υδροξυαπατίτης στο οστεοειδές, 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.

1.1.12 Παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή

Πληθώρα γενετικών, συστηματικών (Πιν.1.1) και τοπικών (Πιν.1.2) παραγόντων εμπλέκονται στην ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής. Οι τοπικοί οστικοί μηχανισμοί ενεργούν κυρίως με την μεσολάβηση των αυξητικών παραγόντων και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ουσιών που δρουν στο κύτταρο το οποίο τις εκκρίνει. Η έκκριση τους μπορεί να προκαλέσει τόσο θετικό όσο και αρνητικό ισοζύγιο οστού *in vivo* και *in vitro*.

Συστηματικοί παράγοντες	Οστική απορρόφηση	Οστική παραγωγή
<ul style="list-style-type: none">• Παραθορμόνη (PTH)	αύξηση	αύξηση
<ul style="list-style-type: none">• 1,25 (OH)₂ Βιταμίνη D	αύξηση	αύξηση
<ul style="list-style-type: none">• Καλσιτονίνη	μείωση	—
<ul style="list-style-type: none">• Θυρεοειδικές ορμόνες	αύξηση	αύξηση
<ul style="list-style-type: none">• Οιστρογόνα	μείωση	μείωση
<ul style="list-style-type: none">• Αυξητική ορμόνη	αύξηση	αύξηση
<ul style="list-style-type: none">• Κορτικοστεροειδή	αύξηση	μείωση

Πίνακας 1.1 Συστηματικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή (τροποποιημένο από Lawrence G. Raisz , 1999) ^[41].

Οστική Παραγωγή	Οστική Απορρόφηση
<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β (μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β) ↑ • BMPs (οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες) ↑ • IGF-I, IGF-II (ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες) ↑ • OPG/RANKL/RANK ↓ • PDGF (αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων) ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> • IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, ↑ • IL-18 ↓ • TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων) ↑ • MCSF-1 (παράγοντας διέγερσης αποικιών) ↑ • IFN-γ (ιντερφερόνη γ) ↓ • RANKL/OPG/RANK ↑

Πίνακας 1.2 Τοπικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή (τροποποιημένο από Canalis, 1988, Lorenzo, 2008) ^{[42],[43]}

Όπως έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, τον σημαντικότερο ρόλο στην ρύθμιση της οστικής απορρόφησης *in vitro* και *in vivo* τον διαδραματίζουν κυτταροκίνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων, TNF (Tumor Necrosis Factor): η κυτταροκίνη RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand), ο υποδοχέας του, RANK και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα, η οστεοπροτεγερίνη (OPG). Η κυτταροκίνη RANKL αποτελεί μόριο «κλειδί» στην οστική απορρόφηση καθώς διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην δημιουργία, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του RANKL, προκαλούν οστεοπέτρωση, μια κληρονομική ασθένεια με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα στην οποία δεν επιτυγχάνεται οστική απορρόφηση λόγω απουσίας οστεοκλαστών. Αντίθετα, η επαγωγή του RANKL οδηγεί σε αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και κατά συνέπεια σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται από σοβαρή οστική απώλεια όπως είναι η οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η περιοδοντίτιδα, το πολλαπλούν μύελωμα και οι οστικές μεταστάσεις.

1.2 Νέα βιολογικά μόρια σχετιζόμενα με τον οστικό μεταβολισμό

Την τελευταία δεκαετία το ερευνητικό πεδίο μελέτης της βιολογίας του οστίτη ιστού εμπλουτίστηκε με μια πληθώρα νέων μορίων που παράγονται από τα οστικά κύτταρα και ρυθμίζουν τις διαδικασίες της οστεοκλαστογένεσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης του σκελετού.

Η θεωρία ότι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της οστικής απορρόφησης απαιτεί την διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων της οστεοβλαστικής και οστεοκλαστικής σειράς είχε τεθεί πολλά χρόνια πριν την ανακάλυψη του υπεύθυνου μοριακού μηχανισμού.

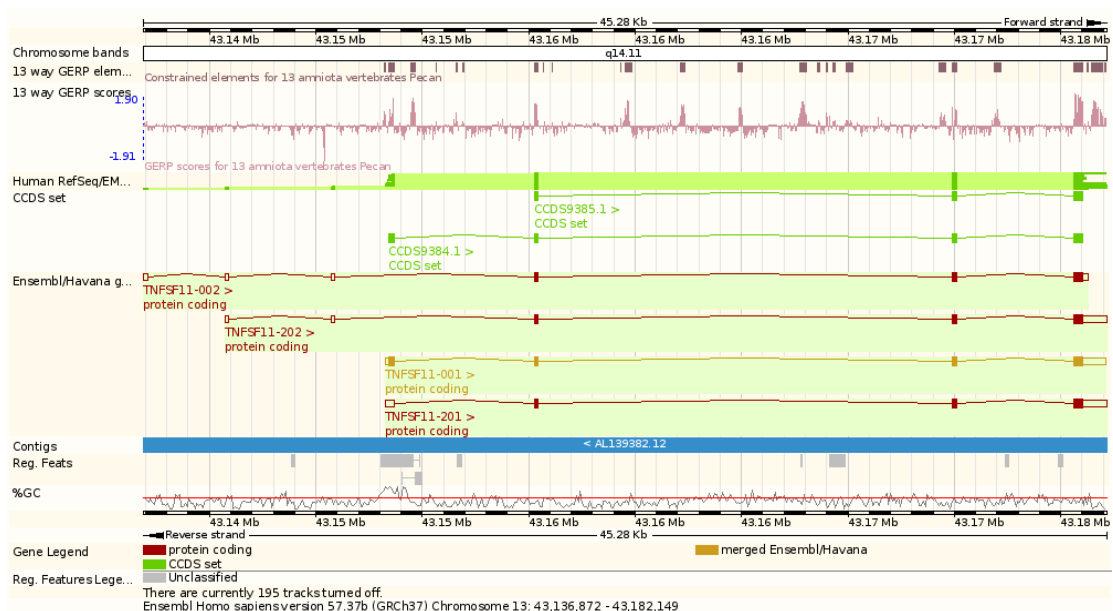
Η ανακάλυψη του συστήματος RANKL/RANK/OPG ως υπεύθυνο για την δημιουργία των οστεοκλαστών και την έναρξη της οστικής απορρόφησης, τόσο στην οστεοπόρωση όσο και σε άλλα μεταβολικά νοσήματα που χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική απώλεια, φώτισε τους μοριακούς μηχανισμούς που κυριαρχούν στον οστικό μεταβολισμό.

1.2.1 RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand)

Το 1997 ανακαλύφθηκε η υπεύθυνη κυτταροκίνη για τη ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης, ο προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor Activator of Nuclear factor κB-Ligand, RANKL). Σε αυτόν αποδόθηκαν ποικίλα ονόματα από τις τέσσερις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες καθεμία από τις οποίες ακολούθησε διαφορετική προσέγγιση για τον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης. Τον συναντάμε ως ODF (Osteoclast differentiation factor) ^[44], TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) ^[45] σύμφωνα με την ονοματολογία της ανοσολογίας, ως OPGL (osteoprotegerin-ligand) ^[46] και ως TNFSF11 ^[47] καθώς αποτελεί το ενδέκατο μέλος της υπέρ-οικογένειας του TNF.

1.2.2 Δομή της κυτταροκίνης RANKL

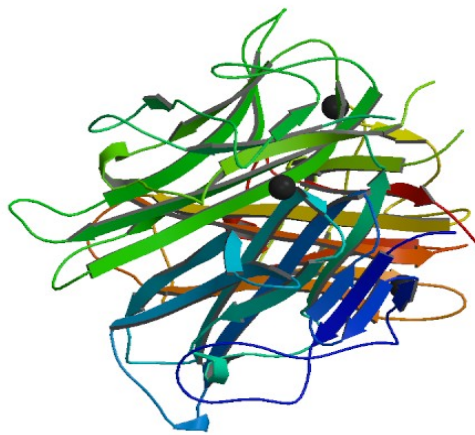
Η κυτταροκίνη RANKL αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας του TNF. Στον άνθρωπο το γονίδιο του RANKL εδράζεται στο χρωμόσωμα 13 (Εικ.1.6), κωδικοποιώντας τρεις ισομορφές [48], τον RANKL1 και RANKL2 που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και τον RANKL3 που είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη [48]. Η διαλυτή μορφή είναι αποτέλεσμα «εναλλακτικού ματίσματος» ή πρωτεολυτικής διάσπασης της διαμεμβρανικής μορφής [49]. Οι δύο ισομορφές RANKL2 και RANKL3 υπολείπονται του αμινοτελικού άκρου, ενώ τα καρβοξυτελικά άκρα της εξωκυτταρικής περιοχής και των τριών ισομορφών είναι πανομοιότυπα [50].



Εικόνα 1.6 Απεικόνιση του γονιδίου RANKL στο χρωμόσωμα 13 (Ensembl genome browser).

Ο RANKL είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II [51] (ομοτρίμερες), όπου το καρβοξυτελικό του άκρο βρίσκεται εξωκυτταρικά. Το διαμεμβρανικό τμήμα στις τύπου II πρωτεΐνες, είναι ένα πεπτιδίο οδηγητής, από το οποίο λείπει η ακολουθία που αναγνωρίζει η πεπτιδάση, ώστε να το αποκόψει. Ο RANKL συντίθεται ως μια γλυκοπρωτεΐνη με μεγάλη ομοιότητα μεταξύ ανθρώπου και ποντικού, έχοντας 317 και 316 αμινοξέα αντίστοιχα. Το μοριακό βάρος της διαμεμβρανικής μορφής είναι 45 kDa ενώ της διαλυτής 31 kDa [49]. Εκφράζεται ευρέως στους προ-οστεοβλάστες / κύτταρα του στρώματος όπως και στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα [8]. Όλα τα μέλη της υπέρ-οικογένειας του TNF μοιράζονται μία κοινή χαρακτηριστική δομή [52], [53] στην εξωκυτταρική τους

περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον αυθόρμητο σχηματισμό τριμερών (Εικ.1.7). Πρόκειται για ένα υψηλά συντηρημένο τμήμα της εξωκυτταρικής περιοχής των μελών του TNF που έχουν μοριακό βάρος μεταξύ 60-80 kDa, το οποίο παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση για την αναδίπλωση και οργάνωση των πρωτεϊνικών τους αλυσίδων σε τριμερή ^[53]. Κάθε μονομερές αποτελείται από δομή β-sandwich, που δημιουργείται από δύο επίπεδες αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες ^[54]. Η σύνδεση του RANKL στον υποδοχέα του τον RANK έχει σαν αποτέλεσμα τον τριμερισμό του ^[54] και την ενεργοποίηση του κυτταρικού μονοπατιού υπεύθυνο για την έναρξη της οστεοκλαστογένεσης.



Εικόνα 1.7 Τρισδιάστατη δομή του RANKL(RCSB PROTEIN Data Bank)

Ο RANKL του ανθρώπου παρουσιάζει μεγάλη αναλογία με κάποια μέλη της υπερικογένειας του TNF, όπως με τον TRAIL (TNF- related apoptosis – inducing ligand) (ομολογία 30%) και με τον FasL (Fas ligand) (ομολογία 20%) ^[47], ενώ με την πρωτεΐνη του ποντικού παρουσιάζει ομολογία 87%.

1.2.3 Εντόπιση της κυτταροκίνης RANKL

Σε επίπεδο πρωτεΐνης ο RANKL ανιχνεύεται στην σπογγώδη μοίρα των οστών, στο μυελό των οστών, στην περιοχή του επιφυσιικού δίσκου, στο περίοστεο, στην καρδιά, στο συκώτι, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στο σπλήνα, στο θύμο αδένα και στους λεμφαδένες ^[55].

Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα εκφράζουν τον RANKL κατά την διάρκεια εγκυμοσύνης η παρουσία του οποίου απαιτείται για την υπερπλασία αυτών κατά την περίοδο του θηλασμού ^[56] για την παραγωγή γάλακτος.

Ο RANKL βρέθηκε ότι εκφράζεται επίσης, σε κύτταρα του αρθρικού υμένα και ενεργοποιημένα Τα λεμφοκύτταρα στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα συμμετέχοντας εν μέρει στην οστική καταστροφή ^[57].

Τέλος, εκφράζεται σε κάποια κακοήγη καρκινικά κύτταρα και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στις οστικές μεταστάσεις ^[58].

1.2.4 Ρύθμιση της κυτταροκίνης RANKL

Η έκφραση του RANKL από τα κύτταρα του στρώματος και τους οστεοβλάστες ρυθμίζεται από πληθώρα κυτταροκινών και ορμονικών παραγόντων (Πιν. 1.3). Μόρια που επάγουν οστεοκλαστογένεση, όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-11(IL-11), ο TNF-α καθώς η παραθορμόνη (PTH) και η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3, αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του RANKL, ενώ οι κυτταροκίνες που αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση όπως η ιντερλευκίνη-13 (IL-13), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο TGF-β1 καταστέλλουν την έκφραση του RANKL ^[59].

	OPG	RANKL	RANK
Vitamin D ₃	↑	↑	-
PTH	↓	↑	
Οιστρογόνα	↑	-	
IL-1	↑	↑	
IL-6	↑	↑	↓
IL-11	↑	↑	
IL17		↑	
IL-4		↑	↑
CD40L	↑		↑
TNF	↑	↑	
BMP-2	↑		
TGFβ	↑	↓	
Γλυκοκορτικοειδή	↓	↑	
Προσταγλανδίνες	↓	↑	
Ασβέστιο Ca	↑	↑	
IGF-I	↓		
Κυκλοσπορίνες	↓	↑	

Πίνακας 1.3. Ρυθμιστές της έκφρασης των OPG, RANKL, RANK : (↑) αυξημένη έκφραση, (↓) μειωμένη έκφραση), (-) αμετάβλητη έκφραση, (τροποποιημένο από Walsh, Choi, 2003) ^[59] .

1.2.5 Μεταλλάξεις του RANKL σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα

Στην εξωκυτταρική περιοχή του RANKL ανιχνεύτηκαν πρόσφατα μεταλλάξεις σε παιδιά με αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση (ARO) [60], [61], [62] και παντελή έλλειψη οστεοκλαστών. Η οστεοπέτρωση είναι ένα τυπικό σκληρυντικό νόσημα των οστών. Η παθογένεια όλων των τύπων οστεοπέτρωσης έγκειται στην ελαττωματική δραστηριότητα ή στην έλλειψη των οστεοκλαστών με κύριο χαρακτηριστικό την αδυναμία απορρόφησης της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας.

Για τους συγκεκριμένους ασθενείς δεν έχει επιτευχθεί ακόμα θεραπεία μιας και η μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι ανεπιτυχής, αφού η βλάβη δεν εντοπίζεται σε κύτταρα του μυελού των οστών αλλά σε κύτταρα του στρώματος δηλαδή στους οστεοβλάστες που δεν παράγουν λειτουργικό RANKL οπότε δεν μπορούν να επάγουν οστεοκλαστογένεση.

Η αδρανοποίηση του γονιδίου του RANKL [60], [63] σε knockout ποντίκια προκαλεί σοβαρή οστεοπέτρωση. Τα οστεοπετρωτικά ποντίκια χαρακτηρίζονται από αποτυχημένη έκφυση δοντιών, καθυστερημένη ανάπτυξη, υποπλασία θύμου και απώλεια των περιφερικών λεμφαδένων. Ιστοπαθολογικές αναλύσεις των μακρών οστών στα μεταλλαγμένα ποντίκια ανέδειξαν την ύπαρξη σοβαρής οστεοπέτρωσης λόγω απουσίας οστεοκλαστών.

Με επαγωγή τυχαίων σημειακών μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του ποντικού χρησιμοποιώντας το μεταλλαξογόνο παράγοντα αιθυλ-νιτροζουρία (ENU) [64], [65], [66] η ερευνητική ομάδα της Δρ. Ντούνη στο Τμήμα Ανοσολογίας στο Ε.Κ.Ε.Β.Ε «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» δημιούργησε πρόσφατα ένα νέο πρότυπο αυτοσωμικής υπολειπόμενης οστεοπέτρωσης [67]. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η απουσία ώριμων οστεοκλαστών οφείλεται στην ανικανότητα των οστεοβλαστών να υποστηρίξουν την οστεοκλαστογένεση και όχι σε έμφυτη αδυναμία διαφοροποίησης των πρόδρομων οστεοκλαστών. Με γενετική ανάλυση εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο RANKL, που προκαλεί αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην εξωκυτταρική περιοχή του. Είναι το πρώτο ζωικό πρότυπο που φέρει μία σημειακή μετάλλαξη οδηγώντας σε απώλεια λειτουργίας του RANKL. Το οστεοπετρωτικό αυτό πρότυπο μοιάζει με την αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση (ARO) τόσο γενετικά όσο και φαινοτυπικά, αποτελώντας έτσι ένα άριστο εργαλείο για την κατανόηση των

παθογενετικών μηχανισμών στην οστεοπέτρωση και την εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Και στις δύο περιπτώσεις η πρωτεΐνη RANKL παράγεται αλλά είναι ανενεργή.

1.3 RANK (Receptor Activator of NF-κB)

Ο υποδοχέας RANK (TRANCE-R; ODAR; TNFRSF11A) κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1997 από μια cDNA βιβλιοθήκη ανθρωπίνων δενδριτικών κυττάρων^[47].

1.3.1 Δομή του υποδοχέα RANK

Ο υποδοχέας RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κB) είναι ο κυτταρικός υποδοχέας του RANKL. Ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των TNF υποδοχέων και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, όπου έχει το καρβοξυτελικό της άκρο στο κυτταρόπλασμα και περιέχει ένα πεπτιδίο οδηγητή. Στον άνθρωπο και στο ποντίκι αποτελείται από 625 and 616 αμινοξέα αντίστοιχα, αποτελούμενος από μια αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή 184 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική περιοχή 21 αμινοξέων και μια μεγάλη κυτταροπλασματική απόληξη 383 αμινοξέων. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα ο RANK υποδοχέας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q22.1^{[47], [59]}.

1.3.2 Εντόπιση του υποδοχέα RANK

Η έκφραση του RANK ρυθμίζεται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του οστού. Συγκεκριμένα, ο TGF-β επάγει την έκφραση του γονιδίου RANK ενώ η IL-4 αναστέλλει την έκφραση του, γεγονός που συμφωνεί με τη δράση των δύο παραγόντων στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών^[68]. Σε κυτταρικό επίπεδο ο υποδοχέας RANK εκφράζεται στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών και στα δενδριτικά κύτταρα^[47]. Η πρωτεϊνική του έκφραση ανιχνεύτηκε επίσης, στα κύτταρα του μαστικού αδένου^[56] και σε κάποιες σειρές καρκινικών κυττάρων που εμπλέκονται σε κακοήθειες όπως ο καρκίνος του μαστού^[7] και του προστάτη^[69] καθώς και σε κυτταρικές σειρές μελανώματος σε ποντίκια^[58]. Η σύνδεσή του με τον RANKL προκαλεί τον τριμερισμό του δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της οστεοκλαστογένεσης και την δημιουργία ώριμων και λειτουργικών οστεοκλαστών.

1.3.3 Μεταλλάξεις στον RANK σε ασθενείς και σε ζωικά πρότυπα

Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον RANK οδηγούν σε ένα σπάνιο αυτοσωμικό επικρατές νόσημα που παρουσιάζει κοινά στοιχεία με την νόσο Paget, την λεγόμενη Familial expansile osteolysis (FEO) [70].

Μελετώντας την νόσο ανιχνεύθηκε διπλασιασμός μιας περιοχής 18 kb στο γονίδιο TNFRSF11A που κωδικοποιεί για τον RANK. Χαρακτηριστικά της νόσου είναι η καταστροφή των δοντιών, η προοδευτική εξάπλωση της οστεόλυσης με γενικευμένο πόνο, παραμορφωτικά κατάγματα και αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής που οφείλεται σε συνεχή ενεργοποίηση του RANK [71].

Τέλος, η αδρανοποίηση του γονιδίου του RANK σε knockout ποντίκια οδηγεί σε σοβαρή οστεοπέτρωση. Τα οστεοπετρωτικά ποντίκια χαρακτηρίζονται από έλλειψη περιφερικών λεμφαδένων, ελαττωματική ωρίμανση των Β και Τ λεμφοκυττάρων, ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα ποντίκια στα οποία έχει γίνει αδρανοποίηση του γονιδίου του RANKL, με την μόνη διαφορά ότι παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη του θύμου αδένος [72], [73].

1.4 OPG

Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι το πρώτο από τα τρία μόρια RANKL/RANK/OPG που ανακαλύφθηκε ταυτόχρονα από δύο ερευνητικές ομάδες φέρνοντας στο φως την ικανότητα της να εμποδίζει την ανάπτυξη και ενεργότητα των οστεοκλαστών τόσο *in vivo* [74] όσο και *in vitro* [75].

Ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων ασκώντας ρυθμιστικό ρόλο στην οστική μάζα μέσω αναστολής της διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των οστεοκλαστών. Με βάση τις πολλαπλές λειτουργίες που επιτελεί αποδόθηκαν στην οστεοπροτεγερίνη ποικίλα ονόματα με κυριότερο αυτό του παράγοντα που εμποδίζει την οστεοκλαστογένεση OCIF (osteoclastogenesis inhibitor factor) [75], TNFRSF11B [74], TR1 [76] και FDCR-1 (follicular dendritic cell-derived receptor-1) [77].

1.4.1 Δομή της OPG

Η OPG πρωτεΐνη αποτελείται από 401 αμινοξέα, τα οποία με μια σηματοδοτική πεπτιδάση αποκόπτονται σε μία μορφή 380 αμινοξέων με μοριακό βάρος 44kDa, μια N-γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 55kDa και ένα εκκρινόμενο ομοδιμερές μοριακού βάρους 110kDa.

Η οστεοπροτεγερίνη δεν περιέχει διαμεμβρανική περιοχή στο μόριο της με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ως διαλυτή πρωτεΐνη. Ο διμερισμός είναι ασυνήθιστο φαινόμενο μεταξύ των μελών της υπέρ-οικογένειας του TNF που οργανώνονται σε τριμερή. Η πρωτεϊνική αλυσίδα της OPG αποτελείται στο αμινοτελικό της άκρο από τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δράση της οστεοπροτεγερίνης να αναστέλλει την παραγωγή των οστεοκλαστών. Συγκεκριμένα, το αμινοτελικό άκρο της OPG παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομολογία με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και περιέχει το «λειτουργικό» τμήμα στο οποίο συνδέεται ο RANKL μπλοκάροντας την έναρξη της οστεοκλαστογένεσης [74]. Επιπλέον, περιέχει στο καρβοξυτελικό της άκρο δύο περιοχές ομόλογες των αλληλουχιών νέκρωσης καθώς και μία θέση δέσμευσης της ηπαρίνης [78]. Η οστεοπροτεγερίνη παρουσιάζει τέλος, χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με τον TRAIL (TNF- related apoptosis –inducing ligand). *In vitro* μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, απέδειξαν ότι η σύνδεση αυτή της OPG εμποδίζει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων επαγόμενη από τον TRAIL [79].

1.4.2 Εντόπιση της OPG

Σε κυτταρικό επίπεδο η οστεοπροτεγερίνη εκκρίνεται κυρίως από τους προ-οστεοβλάστες/ κύτταρα του στρώματος, ενώ έχει βρεθεί ότι τα Β λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για το 64% της συνολικής παραγωγής της οστεοπροτεγερίνης από τον μυελό των οστών [77]. Επίσης, βρέθηκε ότι εκκρίνεται τόσο από τα δενδριτικά κύτταρα όσο και από τα θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα [77] στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής, στους ινοβλάστες, στα δενδριτικά κύτταρα και στις λεμφικές κυτταρικές σειρές. Σε *in vivo* μελέτες έχει αναφερθεί εντοπισμός της οστεοπροτεγερίνης σε κύτταρα οστεοβλαστικής

προέλευσης, αλλά ο εντοπισμός της στη θεμέλια ουσία του οστού είναι υπό αμφισβήτηση ^[80] .

Το mRNA της οστεοπροτεγερίνης ανιχνεύεται στα οστά, στον αρθρικό χόνδρο, στην αορτή, στο δέρμα, στους πνεύμονες, στην καρδιά, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο καθώς επίσης σε όργανα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος δείχνοντας ποικίλες πιθανές δράσεις ^{[74], [76], [81], [82], [83]} .

1.4.3 Ρύθμιση της έκφρασης της OPG

Η έκφραση του mRNA της οστεοπροτεγερίνης ρυθμίζεται κατασταλτικά από διεγερτικούς παράγοντες της οστεοκλαστογένεσης, όπως η 1,25-(OH)₂ D₃, η προσταγλαδίνη E₂ (PGE₂), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η παραθυροειδής ορμόνη (PTH). Αντιθέτως τα οιστρογόνα, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF-β₁) και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη (Bone morphogenetic protein-2) αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της οστεοπροτεγερίνης στα κύτταρα των οστεοβλαστών. Συνεπώς η οστεοπροτεγερίνη λειτουργεί ως φυσιολογικός ρυθμιστής της οστικής απορρόφησης κατά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής ^[80] .

1.4.4 Μεταλλάξεις της OPG σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα

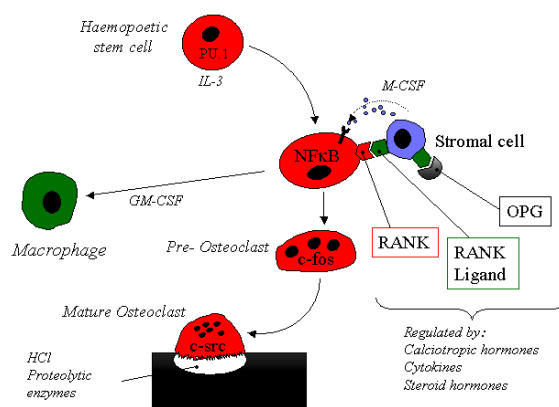
Διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση OPG παρουσιάζουν σοβαρή οστεοπύρωση και μειωμένο δείκτη οστικής εναλλαγής σχετιζόμενη με μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών στη σπογγώδη μοίρα της μετάφυσης των οστών ^[74] .

Αντίθετα, ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο της οστεοπροτεγερίνης (OPG^{-/-}) παρουσιάζουν βαριά οστεοπόρωση με διάχυτα κατάγματα λόγω αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας και αυξημένης επιβίωσης των οστεοκλαστών, γενική μείωση της ολικής οστικής πυκνότητας, σκελετικές παραμορφώσεις ενώ είναι χαρακτηριστική η ασβεστοποίηση της αορτής και των νεφρικών αρτηριών ^{[84], [4]} ένας φαινότυπος που θυμίζει την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση στον άνθρωπο.

Ο Whyte και οι συνεργάτες του το 2002, ανακάλυψαν μεταλλάξεις σε ανθρώπους που αφορούν το γονίδιο TNFRSF11B που κωδικοποιεί για την οστεοπροτεγερίνη (OPG). Πρόκειται για μία ομόζυγη απαλειφή και των δύο αλληλόμορφων, εντοπισμένη στο χρωμόσωμα 8, με συνέπεια την εμφάνιση σοβαρής υποφωσφαταιμίας. Η νόσος γνωστή ως Νεανική Νόσος του Paget προσβάλλει κυρίως παιδιά με κύρια χαρακτηριστικά τον γενικευμένο πόνο, αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής, παραμορφωτικά κατάγματα, απώλεια δοντιών και αυξημένη θνησιμότητα [70].

1.4.5 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό

Είναι ο φυσικός ανταγωνιστικός υποδοχέας του RANKL καθώς αναστέλλει την δράση του εμποδίζοντας την ανάπτυξη των οστεοκλαστών και την ενεργοποίησή τους. Όπως φαίνεται και από το όνομα της ασκεί με τον τρόπο αυτό προστατευτική δράση στα οστά. Η οστεοπροτεγερίνη λειτουργεί ως εκκρινόμενος αναστολέας του RANK σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω πρόσδεσης της στον παράγοντα RANKL, αναστέλλοντας συναγωνιστικά την αλληλεπίδραση του συστήματος RANKL/RANK (Εικ.1.8) στους οστεοκλάστες και στις πρόδρομες μορφές τους [84].

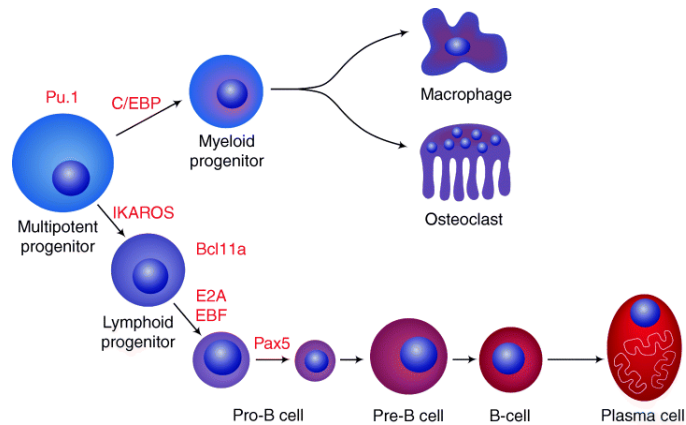


Εικόνα 2.8 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό (Min 2000) [4]

Η *in vivo* χορήγηση OPG έχει προκαλέσει αύξηση της οστικής πυκνότητας και του οστικού όγκου σχετιζόμενη με μείωση του αριθμού των ενεργών οστεοκλαστών^[68]. Η προσθήκη OPG σε κυτταρικές καλλιέργειες οστεοκλαστών αναστέλλει τη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών σε ώριμους πολυπύρηνους οστεοκλάστες^[68]. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η OPG προλαμβάνει αποτελεσματικά την οστεόλυση σε ένα πειραματικό πρότυπο κακοήθους υπερασβεστιαϊμίας^[80] και παράλληλα διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση της OPG σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει προκαλέσει ισχυρή αναστολή της οστικής απώλειας^[4]. Ωστόσο, δεν ενδείκνυται πλέον η χορήγηση της OPG σε ασθενείς για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών λόγω του σύντομου χρόνου ημίσειας ζωής της στην κυκλοφορία του αίματος^[85]. Επιπλέον, η συγγένεια σύνδεσης που παρουσιάζει με τον TRAIL καθιστά την OPG ως μια μη προτεινόμενη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης αφού μπορεί να εμπλέκεται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρεμποδίζει την δράση του TRAIL που αποτελεί σημαντική κυτταροκίνη για την επαγωγή απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα.

1.5 Βιολογικές δράσεις του RANKL

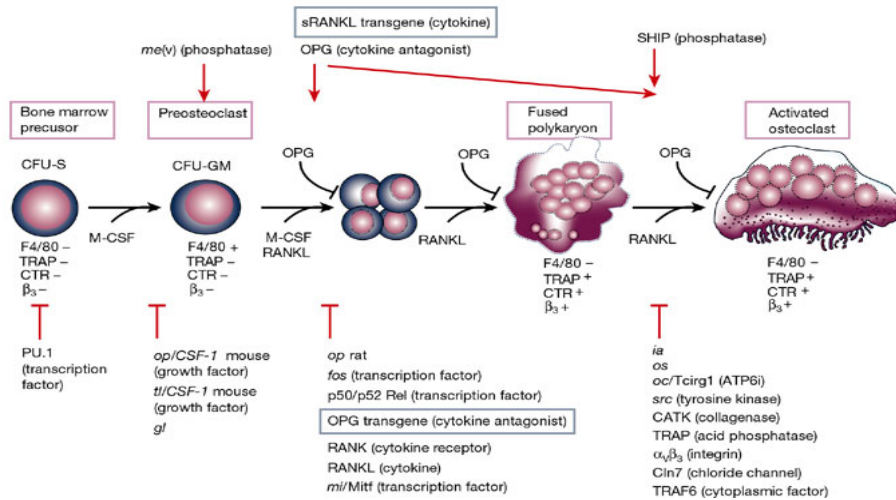
Ο RANKL αποτελεί το μόριο «κλειδί» στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς επάγει την διαφοροποίηση, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών (Εικ.1.9) δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της οστικής απορρόφησης [86],[87], [88], [89], [90].



Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των οστεκλαστών από τα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς. Η διαφοροποίησή τους έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων και οστεοκλαστών (τροποποιημένο από Walsh, Kim, Kadono, Lorenzo et al, 2006).^[5]

1.5.1 Μηχανισμός οστεοκλαστογένεσης

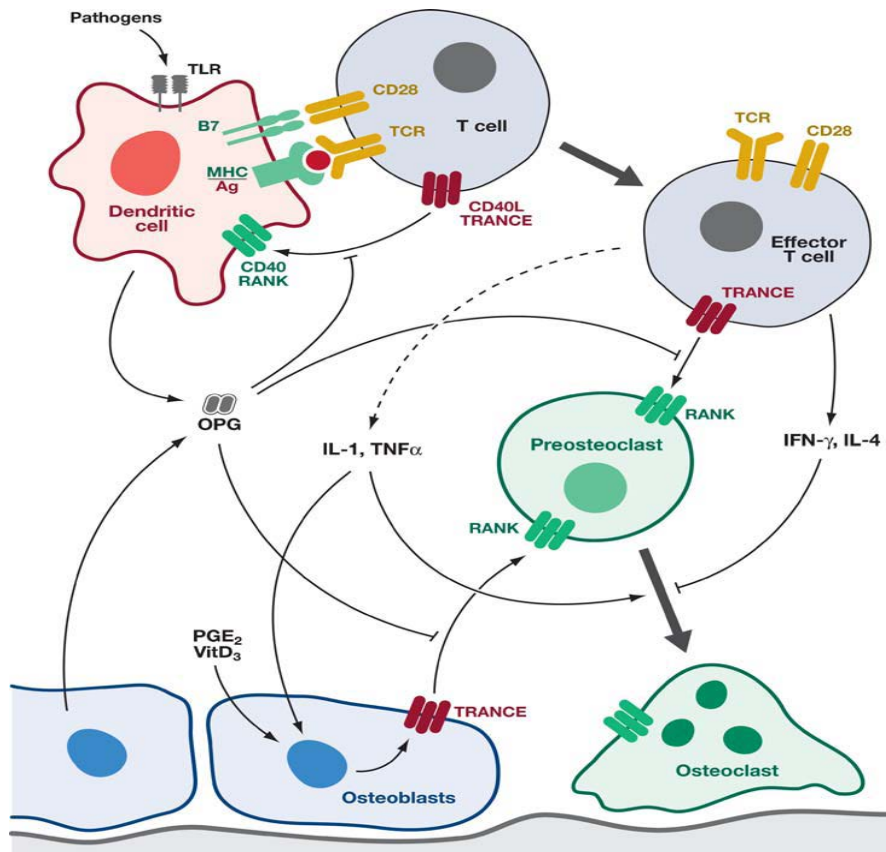
Υπό την παρουσία του παράγοντα M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), ο RANKL επάγει οστεοκλαστογένεση. Ο M-CSF ανιχνεύθηκε αρχικά σαν ένας από τους σημαντικότερους παράγοντας της οστεοκλαστογένεσης καθώς είναι υπεύθυνος για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των πρόδρομων οστεοκλαστών και των μακροφάγων. Επάγει την έκφραση του RANK στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών, καθιστώντας ικανή την πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα του [91].



Εικόνα 1.10 Μηχανισμός οστεοκλαστογένεσης (Boyle 2003) [6]

1.5.2 RANKL και Οστεονοσολογία

Πρόσφατες μελέτες σε κnockout ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο του RANKL, έδειξαν ότι ο RANKL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο πέραν του σκελετικού συστήματος και στο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελώντας την «γέφυρα» που συνδέει τα δύο συστήματα (Εικ.1.11) και εγκαθιδρύοντας έτσι, το διεπιστημονικό πεδίο έρευνας της Οστεοανοσολογίας [43], [5], [92], [93] .



Εικόνα 1.11 Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ανοσοποιητικού και σκελετικού συστήματος. Η αντιγόνοπαρουσίαση από τα δενδριτικά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα με την σειρά τους επάγουν την έκφραση του RANKL, ο οποίος εξασφαλίζει την περαιτέρω ενεργοποίηση και επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK καθώς επάγουν την έκφραση της OPG που είναι ο ανταγωνιστικός υποδοχέας του RANKL. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται κατά την διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης από τα Τ λεμφοκύτταρα, επάγουν την περαιτέρω έκφραση του RANKL από τους οστεοβλάστες που συνεργάζονται με τα Τ κύτταρα δίνοντας το έναυσμα για την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Η παράλληλη έκφραση OPG από τους οστεοβλάστες παρεμποδίζει την σύνδεση του RANKL στον υποδοχέα του τον RANK, ενώ η παραγωγή IL-4 και IFN- γ από τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα εμποδίζει την ενεργοποίηση του κυτταρικού μονοπατιού RANKL/RANK. (τροποποιημένο από Kim 2006) [7].

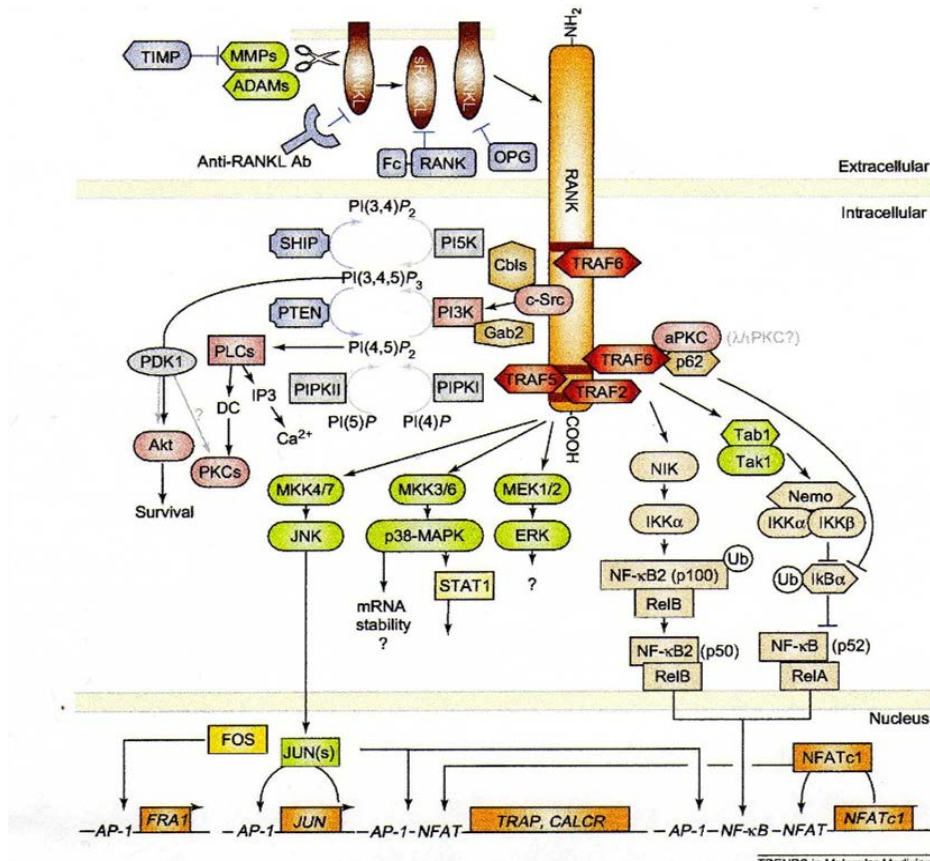
Ο RANKL είναι υπεύθυνος για την επιλογή των θυμοκυττάρων μέσω της ρύθμισης των επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν τον παράγοντα Aire στον μυελό του θύμου [94]. Επιπλέον, συμβάλλει στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των T και B λεμφοκυττάρων καθώς και στην οργανογένεση των λεμφαδένων όπως φαίνεται από τα RANKL knockout ποντίκια [94]. Ο RANKL που εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, ασκεί θετική δράση στην ενεργοποίηση και επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων, εμποδίζοντας την πρόωρη απόπτωσή τους [95]. Τέλος, δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων [96] ενώ, εκφραζόμενος από τα κερατινικά κύτταρα του δέρματος σε διαγονιδιακά ποντίκια, παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (regulatory T cells) ρυθμίζοντας την λειτουργία των κυττάρων του Langerhans και καταστέλλοντας αυτοάνοσες αντιδράσεις. Ασκεί ανοσοκατασταλτική δράση *in vivo* [97]. Η χορήγηση Fc-RANK σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον RANKL κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή keratin-14 (K14) παρεμποδίζει την ανοσοκατασταλτική δράση του ενισχύοντας αυτοάνοσες αντιδράσεις του δέρματος (inflammatory cutaneous contact hypersensitivity).

Τέλος, η χορήγηση του RANKL στις κοιλίες του εγκεφάλου τόσο σε ποντίκια όσο και σε αρουραίους έδειξε ότι ο RANKL εμπλέκεται στα μονοπάτια ρύθμισης του πυρετού από το Κ.Ν.Σ, ενώ βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος στις γυναίκες κατά την διάρκεια της ωορρηξίας [98].

1.6 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του RANKL

Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα του RANK προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TRAF6, που ανήκει στην οικογένεια TRAF (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor) (Εικ.1.12). Η TRAF6 προσδένεται σε μία από τις τρεις κυτταροπλασματικές περιοχές του RANK μέσω της σύνδεσης με το RANKL ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο τα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK κινασών (mitogen activated protein kinase): i) το μονοπάτι των JNK (c-Jun N-terminal kinases), ii) το μονοπάτι των ERK (extracellular signal regulated kinase) και p38 και iii) το μονοπάτι του NF-κB (Nuclear Factor-κB). Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB έχει σαν αποτέλεσμα την είσοδό του στον πυρήνα του κυττάρου αυξάνοντας την έκφραση τριών βασικών

μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων διακρίνονται οι c-Fos, ο JUN και ο NFATc1 που με την σειρά τους επάγουν την μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην οστεοκλαστογένεση [8], [99], [100].



Εικόνα 1.12 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του RANKL/RANK/OPG (τροποποιημένο από Wada) [8].

1.7 RANKL και Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια συστηματική φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από υπερπλασία του αρθρικού υμένα οδηγώντας σε προοδευτική καταστροφή της άρθρωσης ^[101]. Οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παράγουν πλήθος προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που εμπλέκονται στην καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και του οστού όπως είναι η IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 και ο TNF ^[102].

Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα όπως και οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής του RANKL που είναι υπεύθυνος για την αυξημένη οστική απορρόφηση στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η οστική καταστροφή που παρατηρείται στις αρθρώσεις αυτών των ασθενών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία ενός υποπληθυσμού των T λεμφοκυττάρων τον λεγόμενο Th17, που εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών φλεγμονωδών ασθενειών ^[103].

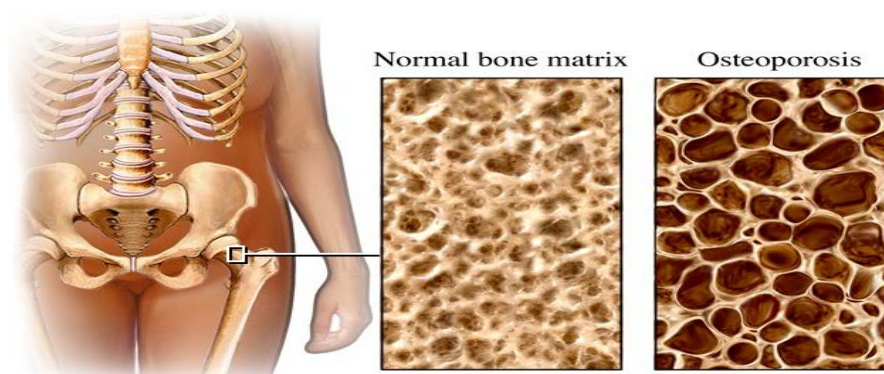
Τα Th17 λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς βρέθηκε ότι έχουν μεγαλύτερη έκφραση του RANKL σε σύγκριση με τις υποομάδες Th1 και Th2 των T λεμφοκυττάρων ^{[92], [104]}. Για το λόγο αυτό τα Th17 θεωρούνται σημαντικός θεραπευτικός στόχος για την παρεμπόδιση της οστικής καταστροφής στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

1.8 RANKL και Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση ως νόσος των οστών περιγράφηκε στις αρχές του 19ου αιώνα από έναν διακεκριμένο Άγγλο χειρουργό τον Sir Astley Cooper, ο οποίος επισήμανε ότι η λέπτυνση και η μαλακότητα που αποκτούν τα οστά με το πέρασ της ηλικίας ευνοούν την πρόκληση καταγμάτων. Το 1940, ο Αμερικανός ενδοκρινολόγος Fuller Albright περιέγραψε την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση και διατύπωσε την άποψη ότι είναι το αποτέλεσμα εξασθένησης της οστικής παραγωγής λόγω την έλλειψης οιστρογόνων ^[105] . ^[106] . Ως συνέπεια, προτάθηκε η θεωρία ότι υπάρχουν δύο τύποι οστεοπόρωσης, η σχετιζόμενη με την έλλειψη οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση (οστεοπόρωση τύπου I) και η σχετιζόμενη με την έλλειψη ασβεστίου και γήρανσης του σκελετού (οστεοπόρωση τύπου II).

1.8.1 Ορισμός Οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση είναι μια συστηματική πολυπαραγοντική νόσος που χαρακτηρίζεται από μειωμένη οστική πυκνότητα και αλλοίωση της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών οδηγώντας σε αυξημένη ευθραυστότητα και αυξάνοντας τον κίνδυνο πρόκλησης κατάγματος ^[107] . Είναι η πιο συχνή μεταβολική πάθηση των οστών και χαρακτηρίζεται από παράλληλη ελάττωση των αλάτων και της οργανικής θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού. Το αποτέλεσμα είναι η ελάττωση της ποσότητας του οστίτη ιστού χωρίς όμως να επηρεάζεται η κανονική του σύσταση (Εικ.1.13).



Εικόνα 1.13 Αλλαγές στην αρχιτεκτονική του οστίτη ιστού σε οστεοπορωτικά οστά (www.mediaclook.com)

Η οστεοπόρωση είναι ασυμπτωματική νόσος, χαρακτηρίζεται συχνά ως η «σιωπηλή» νόσος των οστών και προκαλεί κατάγματα (συνήθως συμπιεστικό κάταγμα των σπονδύλων ή κάταγμα του καρπού, του ισχίου, των πλευρών, της πυέλου ή του βραχιόνιου οστού) και παραμορφώσεις. Το οστεοπορωτικό κάταγμα μπορεί να προκαλείται από τραύμα (π.χ. πτώση) ή και αυτόματα, δηλαδή χωρίς την παρουσία τραύματος ^[108].

Μία στις δύο γυναίκες και ένας στους τέσσερις άντρες πάνω από την ηλικία των πενήντα ετών μπορεί να εμφανίσει οστεοπορωτικό κάταγμα ^[109]. Σύμφωνα με το Εθνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης και Νοσημάτων των Οστών των Ηνωμένων Πολιτειών (The National Osteoporosis Foundation of the United States) μπορεί να μην γνωρίζουμε ότι τα οστά μας έχουν γίνει οστεοπορωτικά μέχρι που μια ξαφνική πτώση μας οδηγήσει σε κάταγμα.

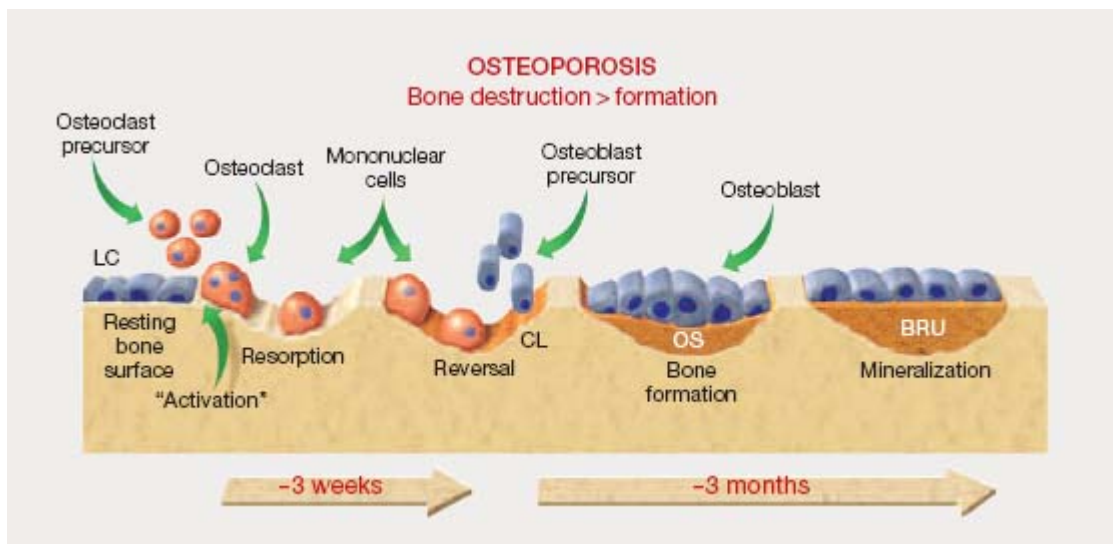
1.8.2 Παθολογία Οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση μπορεί να είναι ιδιοπαθής ή δευτεροπαθής. Η ιδιοπαθής εμφανίζεται σε σχετικά νεαρές γυναίκες στα πρώτα 15 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση. Προσβάλλει το σπογγώδες οστό και κυρίως τα σπονδυλικά σώματα και το περιφερειακό άκρο της κερκίδας. Αποτέλεσμα είναι τα σπονδυλικά κατάγματα της κερκίδας (κατάγματα Colles). Από τα σπονδυλικά κατάγματα προκαλείται έντονη ραχιαλγία και προοδευτική απώλεια αναστήματος που συνοδεύεται από κύφωση. Τα σπονδυλικά κατάγματα προκαλούν αναπηρικές καταστάσεις και δυσλειτουργία.

Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκαλείται όταν κάποιος από τους παράγοντες κινδύνου είναι κυρίαρχος και αποκλειστικός σχεδόν παράγων πρόκλησης της οστεοπόρωσης. Μπορεί, λοιπόν, να προκληθεί δευτερογενής οστεοπόρωση από υπερκοτιζονισμό ή εξωγενή χορήγηση κορτικοστεροειδών, από υπερπαραθυρεοειδισμό ή τοξική δράση της εξωγενώς χορηγούμενης θυροξίνης, από συστηματική ακινητοποίηση, από πρωτοπαθή αμηνόρροια, από ψυχογενή ανορεξία, από διαβήτη τύπου I και από αλκοολισμό.

Στην οστεοπόρωση τύπου I ο μηχανισμός που οδηγεί στην οστική απώλεια είναι η έλλειψη οιστρογόνων. Η έλλειψη οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση προκαλεί αυξημένη παραγωγή αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων όπως του

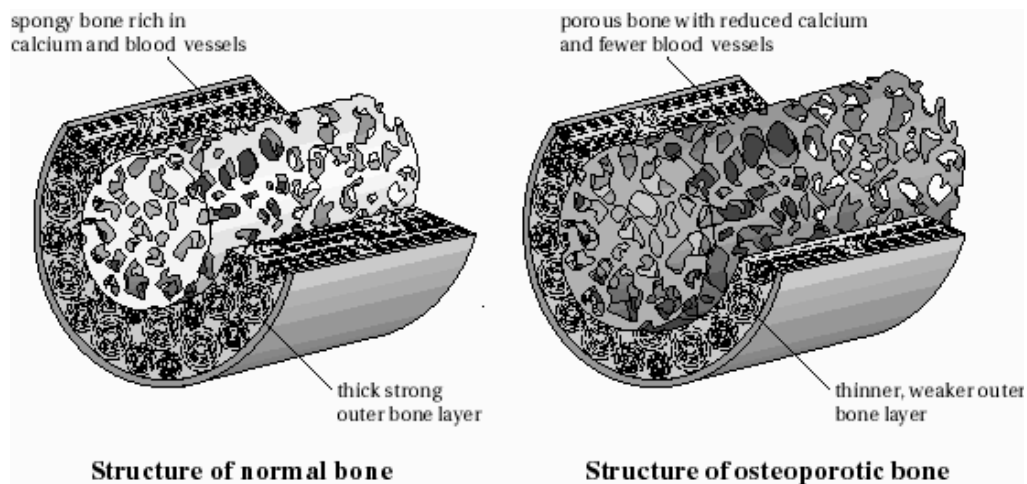
αποικιακού διεγερτικού παράγοντα των μακροφάγων (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), την τοπική παραγωγή προ-φλεγμοδών κυτταροκινών όπως είναι η IL-1, IL-6 καθώς και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF από τα κύτταρα του στρώματος και τα μονοκύτταρα επάγοντας την έκφραση του RANKL και μειώνοντας την έκφραση της OPG. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικής παραγωγής (αποσύζευξη), επάγοντας την οστική απορρόφηση και την πρόκληση μεταβολικού νοσήματος (Εικ. 1.14). Η αδρανοποίηση του γονίδιο της οστεοπροτεγερίνης (OPG) σε ποντίκια οδηγεί σε αυξημένη οστεοκλαστογένεση και γενικευμένη οστεοπενία [84].



Εικόνα 1.14 Στην οστεοπόρωση υπερτερεί η οστική αποδόμηση λόγω αύξησης της δημιουργίας και δράσης των οστεοκλαστών από ποικίλους παράγοντες όπως η πτώση των οιστρογόνων στις εμμηνόπαυσιακές γυναίκες (τροποποιημένο από www.Medscape.com, 2010).

Οι βιοψίες των οστών οστεοπορωτικών ασθενών έχουν δείξει ελάττωση του αριθμού των οστεοδοκίδων του σπογγώδους οστού, ενώ από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στην περιοχή του σπογγώδους δείχνουν λέπτυνση, διαχωρισμό και απώλεια της συνεκτικότητας των οστεοδοκίδων σε σχέση με το φυσιολογικό οστό (Εικ.1.15). Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης κατάγματος. Το 80% των οστεοπορωτικών καταγμάτων δεν είναι σπονδυλικά και αφορούν κυρίως τις περιοχές του φλοιού των οστών που με την πάροδο της ηλικίας αποκτούν πορώδη δομή. Τα

κατάγματα του φλοιού όπως είναι τα κατάγματα του ισχίου αποτελούν το διεθνές βαρόμετρο για την οστεοπόρωση και χαρακτηρίζονται ως η σοβαρότερη επιπλοκή της αφού έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής του οστεοπορωτικού ασθενή. Στατιστικά πάνω από το 50% των γυναικών θα εμφανίσει στην διάρκεια της ζωής, λόγω αυξημένης ευθραστότητας των οστών με την πάροδο της ηλικίας, κάταγμα ισχίου [110].



Εικόνα 1.15 Διαφορές στην δομή και αρχιτεκτονική μεταξύ φυσιολογικού και οστεοπορωτικού οστού.

1.8.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στην οστεοπόρωση

Πρωταρχικός σκοπός της θεραπευτικής παρέμβασης στην οστεοπόρωση είναι η μείωση της σχετιζόμενης με το πρώτο και όλα τα επόμενα κατάγματα, νοσηρότητας και θνησιμότητας. Οι ασθενείς με ιστορικό προηγούμενου κατάγματος στον περιφερικό σκελετό έχουν 2-8 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να υποστούν κι άλλο κάταγμα σε οποιαδήποτε περιοχή του σκελετού και μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν και να λάβουν φαρμακευτική αγωγή. Ασθενείς με μη διαγνωσμένο σπονδυλικό κάταγμα αντιμετωπίζουν τον ίδιο ή και μεγαλύτερο κίνδυνο να υποστούν κι άλλο κάταγμα, αλλά σε μικρό μόνο ποσοστό (33%) αναγνωρίζονται και λαμβάνουν αγωγή (από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων, 2011).

Όλα τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της οστεοπόρωσης επιδρούν στην οστική ανακατασκευή ^[111] . Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα αντικαταβολικά και τα αναβολικά. Τα αντικαταβολικά αυξάνουν την οστική αντοχή και μειώνουν τα κατάγματα, μειώνοντας τον αριθμό των οστικών πολυκυτταρικών μονάδων (BMUs). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της οστικής απορρόφησης και του βαθμού διάτρησης των οστικών δοκίδων καθώς και την μείωση του βαθμού διάτρησης του φλοιώδους οστού (cortical porosity). Μεταξύ των αντικαταβολικών φαρμάκων κυριότερα είναι τα οιστρογόνα και τα διφωσφωνικά.

Κατά την εμμηνόπαυση η ανεπάρκεια οιστρογόνων προκαλεί οστική απώλεια μέσω άμεσης επίδρασης στα οστικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής ανακατασκευής και μέσω της δράσης τους στο έντερο και τους νεφρούς, με αποτέλεσμα τη μείωση του εξωκυττάρου ασβεστίου. Παρά την ευεργετική επίδραση των οιστρογόνων στην αύξηση της οστικής πυκνότητας, σήμερα δεν ενδείκνυται η χορήγηση τους για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, παρά μόνο αν ο πρωτεύων στόχος είναι η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων εμμηνόπαυσης ^[112] .

1.8.4 Διφωσφωνικά και Οστεοπόρωση

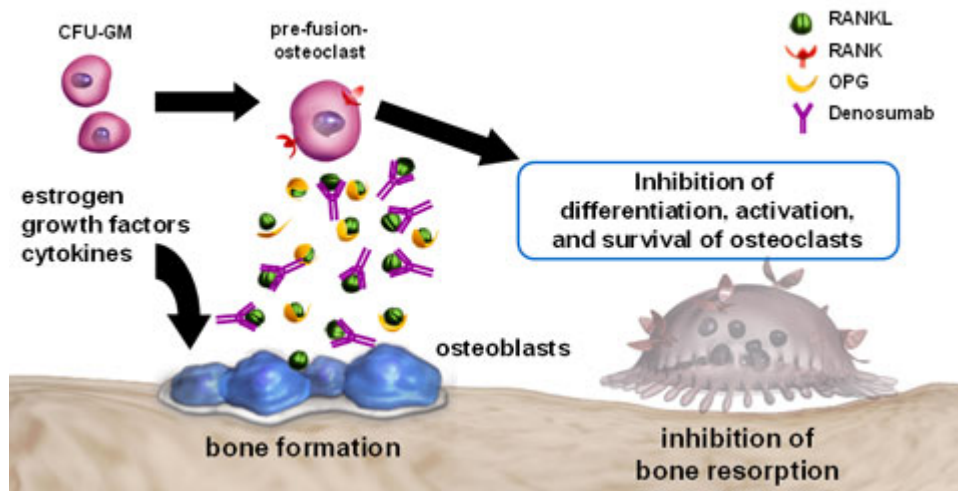
Τα διφωσφωνικά αποτελούν συνθετικά παράγωγα ανάλογα των πυροφωσφωρικών αλάτων. Τα πυροφωσφωρικά άλατα είναι αδύνατον να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά ή θεραπευτικά γιατί έχουν εξαιρετικά βραχύβια παρουσία στον οργανισμό, εξαιτίας της ταχύτατης ενζυματικής υδρολύσεως στην οποία υπόκεινται *in vivo* από τις πυροφωσφατάσες. Η αντικατάσταση του οξυγόνου του άνθρακα στο μόριο των πυροφωσφωρικών (αντικατάσταση της μοριακής δομής P-O-P με την P-C-P), οδήγησε στην σύνθεση των διφωσφωνικών, τα οποία είναι σταθερά και ανεκτικά στην ενζυματική διάσπαση ^[108] . Τα κυριότερα από αυτά που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της οστεοπόρωσης είναι η επιδρονάτη, η παμιδρονάτη, η αλενδρονάτη, η ριζενδρονάτη και το ζολενδρονικό οξύ.

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των διφωσφωνικών είναι η αύξηση της απόπτωσης των οστεοκλαστών, υπεύθυνοι για την οστική απορρόφηση. Τα διφωσφωνικά απορροφώνται στις επιφάνειες των οστών και συγκεκριμένα στις

ενεργές θέσεις οστικής ανακατασκευής όπου έρχονται σε επαφή με τους οστεοκλάστες. Οι οστεοκλάστες συρρέουν στην υπό ανακατασκευή περιοχή και απομονώνουν το υποκείμενο οστόν. Μετά την αγκίστρωση του οστεοκλάστη στο οστόν, τα διφωσφωνικά απελευθερώνονται στο τοπικό όξινο περιβάλλον που δημιουργείται με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των οστεοκλαστών, την μείωση της ικανότητας τους να προσκολλώνται στις οστικές επιφάνειες και την απόπτωσή τους. Τα διφωσφωνικά αποτελούν την θεραπεία πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, διότι αποδεδειγμένα μειώνουν τον κίνδυνο σπονδυλικών και μη σπονδυλικών καταγμάτων. Τα διφωσφωνικά φάρμακα μειώνουν σημαντικά την οστική απώλεια στους οστεοπορωτικούς ασθενείς εμποδίζοντας την επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών όχι όμως και τον σχηματισμό τους, προκαλώντας σημαντικές παρενέργειες ^[113].

1.8.5 Νεότερες θεραπείες για την οστεοπόρωση

Στις νεότερες θεραπείες για την οστεοπόρωση συγκαταλέγεται ένα νέο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG2) έναντι του RANKL, το Denosumab. Οι μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι αναστέλλει αποτελεσματικά την οστική απώλεια τόσο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση ^[114] όσο και σε άνδρες ασθενείς με καρκίνο του προστάτη υπό ορμονικό αποκλεισμό, οι οποίοι διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων, όπου και μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο σπονδυλικών καταγμάτων ^[115]. Το Denosumab έχει σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προσκολλάται με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα στον RANKL. Με τον τρόπο αυτό προλαμβάνει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του, του RANK στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών (Εικ. 1.16). Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του συστήματος RANKL/RANK αναστέλλει τον σχηματισμό, την λειτουργία και επιβίωση των οστεοκλαστών, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την οστική απορρόφηση και την πιθανότητα οστικού κατάγματος, τόσο στα συμπαγή όσο και στα σπογγώδη οστά. Η συνιστώμενη δόση είναι 60 mg χορηγούμενη ως εφάπαξ ένεση μία φορά στους έξι μήνες, ενώ δεν έχουν παρατηρηθεί μέχρι τώρα ανεπιθύμητες παρενέργειες.



Εικόνα 1.16 Μηχανισμός δράσης του Denosumab (τροποποιημένο από Rodman, 2004)^[9]

1.8.6 Ζωικά πρότυπα μελέτης της οστεοπόρωσης

Η χρήση πειραματικών ζωικών μοντέλων στην έρευνα της οστεοπόρωσης έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας νέων θεραπευτικών στόχων για την πρόληψη του κινδύνου κατάγματος και την διαφύλαξη της οστικής αντοχής.

Το πειραματικό μοντέλο της ωθηκεκτομής σε επίμυες έχει εφαρμοστεί ευρέως για την μελέτη της πρόληψης και της θεραπείας της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Η επιλογή των επίμυων ως πειραματικό μοντέλο μελέτης της οστεοπόρωσης οφείλεται στην ευκολία χειρισμού του πειραματικού υλικού, στην ταχεία έκβαση αποτελεσμάτων λόγω της σύντομης διάρκειας ζωής τους και στην ευκολία πρόσβασης στο σκελετικό τους σύστημα για την εφαρμογή επεμβατικών τεχνικών ^[116]. Επιπλέον, οι κύριοι βιολογικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την οστική εναπόθεση και απώλεια κατά την περίοδο της αύξησης, της ενήλικης ζωής αλλά και της γήρανσης, είναι παρόμοιοι στους ανθρώπους και στους επίμυες.

Οι μύες παρουσιάζουν οστικές αλλαγές λόγω γήρανσης στην ηλικία των 12 μηνών με μία φυσιολογική οστεοπενία να αναπτύσσεται καθώς γηράσκουν. Οι ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές παρατηρούνται και στο σπογγώδες και στο φλοιώδες οστόν, αποτελώντας ένα καλό πρότυπο μελέτης ^[117].

ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK αποτελεί νέο θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση ασθενειών που συνδέονται με αυξημένη οστική απώλεια όπως είναι η οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι περιοδοντικές ασθένειες, το πολλαπλούν μυέλωμα και οι οστικές μεταστάσεις. Με στόχο να μελετηθούν οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης του RANKL *in vivo* και να εφαρμοστούν νέες θεραπείες σε προκλινικό επίπεδο, δημιουργήσαμε τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν στο γονιδίωμα τους γενωμικό τμήμα 200-kb που περιέχει αποκλειστικά το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της έκφρασης του ανθρώπινου RANKL γονιδίου στις διαφορετικές γονιδιακές σειρές και η συσχέτισή της με την επαγόμενη οστική απώλεια με στόχο την καθιέρωση γενετικών μοντέλων επαγόμενης οστεοπόρωσης από την υπερέκφραση του huRANKL. Τα διαγονιδιακά αυτά ποντίκια αποτελούν ιδανικά εργαλεία για την μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην οστική απορρόφηση καθώς και τις προκλινικές δοκιμές νέων φαρμακευτικών ουσιών που στοχεύουν ασθένειες που χαρακτηρίζονται από έντονη οστική απώλεια όπως η οστεοπόρωση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Διαγονιδιακά ποντίκια

Τα διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργήθηκαν με μικροένεση DNA σε πυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων από την Μονάδα Διαγένεσης του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμιγκ», μια τεχνική που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική ομάδα του Gordon το 1980 ^[118]. Η τεχνική της μικροένεσης απαιτεί εξοπλισμό ειδικών μηχανημάτων και κυρίως επιδεξιότητα αλλά σε σχέση με άλλες τεχνικές παραμένει ο πιο άμεσος τρόπος για την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών. Το εξωγενές DNA εισάγεται με μικροένεση σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων τα οποία στην συνέχεια εμφυτεύονται στον ωαγωγό ψευδοεγκύων θηλυκών ποντικών.

2.1.1 Στελέχη διαγονιδιακών ποντικών

Για την δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια 4 κατηγοριών που ανήκουν στο είδος *Mus Musculus*. Η απομόνωση των γονιμοποιημένων ωαρίων πραγματοποιείται έπειτα από ζευγάρωμα θηλυκών ποντικών 3 εβδομάδων που βρίσκονται σε κατάσταση υπερωορρηξίας (F1 γενιάς των στελεχών CBA x C57Bl/6J) με αρσενικά ποντίκια (F1 γενιάς των στελεχών CBA x C57Bl/6J), ενώ η εμφύτευση των αυγών που έχουν ενεθεί με DNA εκτελείται σε ψευδοέγκυα θηλυκά ποντίκια (F1 γενιάς των στελεχών CBA x C57Bl/6J) τα οποία έχουν αποκτήσει ορμονικό κύκλο εγκύων έχοντας ζευγαρώσει με στείρους αρσενικούς (στελέχους NMRI). Έχει δειχθεί ότι η χρήση F1 αντί καθαρών σειρών προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την αποδοτικότητα των ποντικών σε γονιμοποιημένα ωάρια, την ανθεκτικότητα των ωαρίων, την αποδοχή των εμφυτευμένων ωαρίων από τα ψευδοέγκυα θηλυκά αλλά και την φροντίδα που δείχνουν οι θετές μητέρες στα νεογέννητα ^[119].

2.1.2 Χειρισμός πειραματόζων

Τόσα τα διαγονιδιακά ποντίκια TghuRANKL που φέρουν στο γονιδίωμα τους ολόκληρο το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου όσο και τα οστεοπετρωτικά ποντίκια RANKL^{tes/tes} που φέρουν στο γονιδίωμα τους μια σημειακή μετάλλαξη οδηγώντας σε απώλεια της λειτουργίας του RANKL [67], [120] δημιουργήθηκαν και διατηρούνται σε οργανωμένες εγκαταστάσεις στο Ε.ΚΕ.Β.Ε «Αλ. Φλέμιγκ», οι οποίες και ανταποκρίνονται στα διεθνή πρότυπα και στις σχετικές κοινοτικές οδηγίες ευζωίας των πειραματόζων. Στην μονάδα υπάρχουν ειδικοί χώροι εργασίας, με κατάλληλους και ειδικά διαμορφωμένους χώρους για την εκτροφή των ζώων, την ασφαλή χορήγηση των φαρμάκων καθώς και για την φύλαξη, την θανάτωση και την ανατομική τους μελέτη σύμφωνα πάντα με τις διατάξεις για την «Προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς» (Ν.2015/92) καθώς και τον Εσωτερικό Οργανισμό οργάνωσης και λειτουργίας της Κτηνιατρικής Διεύθυνσης της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Ανατ. Αττικής (229/95(400B)).

Επιπλέον, επιλέγονται πειραματικές διαδικασίες (Replacement) και ελαχιστοποιούνται οι ανάγκες σε αριθμό πειραματόζων (Reduction), ενώ λαμβάνονται μέτρα ώστε να ελαχιστοποιείται και τυχόν πόνος του ζώου (Refinement) [121]. Τέλος, λόγω των άσηπτων συνθηκών διαβίωσης τους και κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δεν υπάρχει κίνδυνος για την Δημόσια Υγεία και το Περιβάλλον.

2.2 Δημιουργία και αναγνώριση διαγονιδιακών ποντικών

Τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργήθηκαν με μικροένεση ενός γενωμικού τμήματος 200kb που περιέχει ολόκληρο το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου, το οποίο απομονώθηκε από ένα κλώνο BAC (Bacterial Artificial Chromosome) (RP11-86N24, ImaGenes GmbH, Germany) [122]. Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου γίνεται τυχαία σε μία ή περισσότερες θέσεις του γονιδιώματος του ζυγωτού. Επίσης, μπορεί να ενσωματωθεί ένα μόνο αντίγραφο ή περισσότερα που συνήθως είναι διευθετημένα στην σειρά με κοινό προσανατολισμό κεφαλής-ουράς (head to tail). Η επιλογή ενός ιστοειδικού υποκινητή εξασφαλίζει την δυνατότητα έκφρασης του διαγονιδίου επιλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα και

κατ' επέκταση σε ιστούς του διαγονιδιακού ζώου. Η έκφραση ενός διαγονιδίου επηρεάζεται αρκετά συχνά από την μεταγραφική κατάσταση της γειτονικής χρωματίνης με αποτέλεσμα είτε την εκτοπική έκφραση του διαγονιδίου δηλαδή την έκφραση και σε άλλους ιστούς είτε την αναστολή της έκφρασης του. Επιπλέον, η ύπαρξη ενός ισχυρού εκκινητή κοντά στην θέση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου κατευθύνει την έκφραση του σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τόπους.

Η ταυτοποίηση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν στο γονιδίωμα τους το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου πραγματοποιήθηκε με την κλασική μέθοδο υβριδοποίησης Southern blot και με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) σε γενωμικό DNA, απομονωμένο από τις ουρές των ποντικών.

2.2.1 Απομόνωση DNA από ουρές ποντικών

- Κόβεται περίπου 1 cm από ουρά ποντικού ηλικίας 10 ημερών σε erpendorf σωλήνα χωρητικότητας 1.5 ml που φέρει κλείσιμο ασφαλείας (safe-lock).
- Προστίθενται 0.4 ml διαλύματος (Tris 1M pH: 8.0, EDTA 0,5M, SDS 10%) και 3 ml διαλύματος πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) και αφήνονται για επώαση στους 55 ° C για 12-16 ώρες.
- Γίνεται σύντομη ανάδευση σε vortex.
- Προστίθενται 400 µl διαλύματος φαινόλης και αναδεύονται ισχυρά σε vortex για 10 λεπτά.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 12000rpm για 10 λεπτά.
- Χρησιμοποιώντας κομμένο ακρορύγχιο (tip) απομονώνονται 340 µl από την υδατική φάση αποφεύγοντας την μεσόφαση η οποία περιέχει πρωτεϊνικά κατάλοιπα.
- Η υδατική φάση προστίθεται σε 0,290 ml ισοπροπανόλης και αναποδογυρίζοντας το σωλήνα, το DNA καταβυθίζεται σε μορφή «σύννεφου».
- Το DNA τυλίγεται στην άκρη μιας πιπέτας Pasteur και ξεπλένεται από το αλάτι καθώς βυθίζεται σε 70% αιθανόλη και στη συνέχεια σε 100% αιθανόλη. Τέλος, αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για περίπου 20 λεπτά.

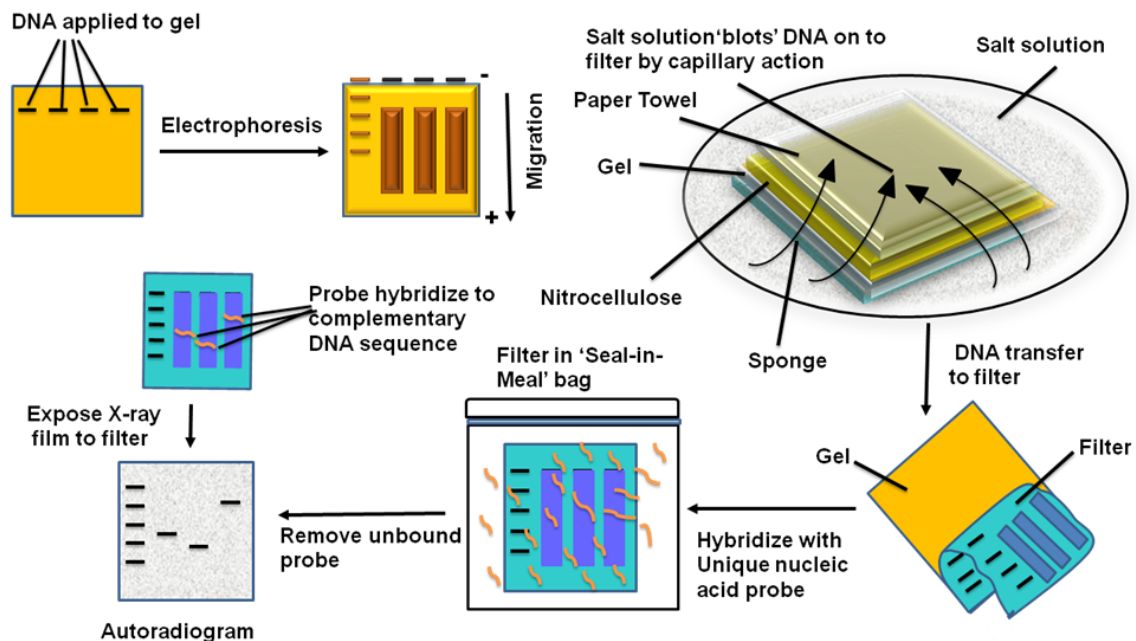
- Η άκρη της πιπέτας Pasteur τοποθετείται σε 300 μl ddH₂O για να διαλυθεί το DNA για περίπου 30 λεπτά και στο τέλος απομακρύνεται προσεκτικά.
- Το DNA φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.2 Ανάλυση γενωμικού DNA με μεταφορά τύπου Southern

Η μέθοδος αυτή συνίσταται για την ανίχνευση των διαγονιδιακών ποντικών που προέρχονται από τις θηλυκές στις οποίες έχει γίνει εμφύτευση των ζυγωτών ώστε να διαπιστωθεί η ακεραιότητα της διαγονιδιακής κατασκευής στα διαγονιδικά ποντίκια. Στηρίζεται στην μεταφορά του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης σε μεμβράνη υβριδοποίησης και στον υβριδισμό του με ραδιενεργούς DNA ανιχνευτές.

- Το γενωμικό DNA έχει υποστεί πέψη με το BamHI ένζυμο περιορισμού.
- Ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, σε διάλυμα 1XTBE που περιέχει 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται.
- Τοποθετείται σε διάλυμα 0,25N HCl για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί μερική υδρόλυση του DNA που περιέχεται στο πήκτωμα, διευκολύνοντας έτσι την μεταφορά του στην μεμβράνη υβριδισμού.
- Ξεπλένεται το πήκτωμα με αλκαλικό διάλυμα (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) για να απομακρυνθεί το οξύ και στην συνέχεια ανακινείται στο ίδιο διάλυμα για 30 λεπτά ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων του DNA σε μονόκλωνες.
- Η μεμβράνη που χρησιμοποιείται είναι συνθετική και φορτισμένη θετικά έτσι ώστε να συγκρατεί το αρνητικά φορτισμένο DNA. Η μεμβράνη αφού κοπεί και βραχεί με απεσταγμένο νερό, μεταφέρεται σε αλκαλικό διάλυμα (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) για 10 λεπτά τουλάχιστον.
- Ακολουθεί η μεταφορά του DNA από το πήκτωμα στην μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται με το αλκαλικό διάλυμα, το οποίο εξασφαλίζει και την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη (alkaline fixation) και έτσι δεν απαιτείται σταθεροποίηση του DNA στη μεμβράνη με κάποια άλλη επεξεργασία. Η

μεταφορά γίνεται overnight και στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται για 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα με ουδέτερο pH (0,5 M Tris pH : 7,5, 1,5 M NaCl). Στο τέλος, η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει για να χρησιμοποιηθεί για υβριδοποίηση.



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων στην μεταφορά γενωμικού DNA κατά Southern (τροποποιημένο από www.nptel.ac.in).

2.2.2.1 Παρασκευή [^{32}P] ραδιενεργών DNA ανιχνευτών με την μέθοδο της τυχαίας έναρξης

Η μέθοδος της τυχαίας έναρξης (random primed DNA labeling) χρησιμοποιείται για την σήμανση DNA ανιχνευτών με ^{32}P . Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή το DNA αφού αποδιαταχθεί με βρασμό υβριδοποιείται με ένα μείγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδίων και χρησιμοποιώντας την DNA πολυμεράση I (Klenow fragment) συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα, επιμηκύνοντας το 3' άκρο των υβριδοποιημένων εξανουκλεοτιδίων (random primers) παρουσία ενός ραδιοσημασμένου δεοξυνουκλεοτιδίου. Η Klenow πολυμεράση που χρησιμοποιείται δεν έχει την δράση της 3'-5' εξωνουκλεάσης και έτσι επιτυγχάνεται καλύτερη ενσωμάτωση και δημιουργία μεγαλύτερου μήκους ραδιενεργά σημασμένων αλυσίδων DNA.

2.2.2.2 Αντίδραση σήμανσης

Η αντίδραση σήμανσης ετοιμάζεται σε τελικό όγκο 10 µl ως εξής :

- Ανάμιξη 50-100 ng DNA με 0.2 ng τυχαία εξανουκλεοτίδια και βρασμός για 3 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί το DNA.
- Αφού το μίγμα φυγοκεντρηθεί και κρυώσει στον πάγο προστίθενται 2 µl από ρυθμιστικό διάλυμα 5x RPS (200 Mm KPO₄ pH: 7.5, 33 Mm MgCl₂, 5mM 2-μερκαπτοαιθανόλη , 2mg/ml BSA) και 0.5 µl από ένα μείγμα που περιέχει τα τρία μη σημασμένα δεοξυνουκλεοτίδια σε συγκέντρωση 2 mM για το καθένα.
- Στη συνέχεια προστίθεται 2 µl από το ³²P ραδιενεργό δεοξυνουκλεοτίδιο και 2U από την Klenow DNA πολυμεράση. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 12-14 ώρες ή για 30 λεπτά στους 37°C.

2.2.2.3 Απομόνωση ³²P-σημασμένων DNA ανιχνευτών με χρωματογραφία στήλης Sephadex G-50.

Για το διαχωρισμό των σημασμένων DNA μορίων από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια χρησιμοποιείται η μέθοδος της χρωματογραφίας σε στήλη Sephadex G-50 όπου τα DNA μόρια διαχωρίζονται βάση του μοριακού τους βάρους. Για την παρασκευή του υλικού της στήλης ζυγίζονται 1.5 gr Sephadex G-50 και προστίθενται περίπου 25 ml ddH₂O. Το υλικό ξεπλένεται 2-3 φορές με ddH₂O, αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης και αποθηκεύεται στους 4°C. Για την κατασκευή της στήλης χρωματογραφίας χρησιμοποιείται γυάλινη πιπέττα Pasteur της οποίας κλείνεται η έξοδος με αποστειρωμένο υαλοβάμβακα και προστίθεται Sephadex G-50 μέχρι 1-2 cm από την κορυφή της πιπέττας. Η στήλη εξισορροπείται κάνοντας πλύσεις 4-5 φορές με διάλυμα TES (1M Tris pH: 7.5, EDTA 0.5M, SDS 10%).

Για την απομόνωση του ραδιενεργού DNA ανιχνευτή προστίθεται στη στήλη το διάλυμα της αντίδρασης σήμανσης αραιωμένο σε 120 µl διαλύματος TES. Η στήλη πλένεται με το ίδιο διάλυμα παρακολουθώντας την έκλυση ραδιενέργειας με μετρητή Geiger-Mueller. Το μεγάλο μοριακού βάρους DNA περιέχεται στην πρώτη κορυφή (pick) από την οποία συλλέγονται 400 µl περίπου ενώ τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια ακολουθούν σε μια δεύτερη κορυφή.

2.2.2.4 Υβριδοποίηση συνθετικών μεμβρανών

Η υβριδοποίηση γίνεται σε ειδικούς γυάλινους σωλήνες σε κλίβανο υβριδισμού mini oven HYBALD όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Η μεμβράνη στην οποία έχει μεταφερθεί το DNA, τυλίγεται με μια ειδική δικτυωτή μεμβράνη (mesh) παρουσία του διαλύματος 2X SSPE, και τοποθετείται στο σωλήνα υβριδισμού.
- Προστίθενται 20 ml από το διάλυμα υβριδοποίησης (7% SDS, 10% PEG 8000, 1.5X SSPE), το οποίο έχει προθερμάνει στους 65 ° C και ξετυλίγεται η μεμβράνη περιστρέφοντας το σωλήνα.
- Ο σωλήνας τοποθετείται στον περιστρεφόμενο άξονα του κλιβάνου υβριδοποίησης που βρίσκεται ήδη στους 65 ° C.
- Προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού τελικής συγκέντρωσης 100 µg/ml, το οποίο έχει ήδη αποδιαταχθεί με βρασμό, έτσι ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης DNA που υπάρχουν στη μεμβράνη υβριδισμού και παραμένει για τουλάχιστον 1 ώρα στους 65° C να γίνει η προϋβριδοποίηση.
- Το ραδιενεργά σημασμένο DNA-ανιχνευτής αποδιατάσσεται με βρασμό για 5 λεπτά και προστίθεται μέσα στο σωλήνα υβριδισμού.
- Αφήνεται στους 65 ° C για 12-16 ώρες για να γίνει η υβριδοποίηση.
- Στην συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα υβριδοποίησης από το σωλήνα και ξεπλένεται με διάλυμα 3X SSC, 0.1% SDS το οποίο έχει προθερμάνει στους 65 ° C. Ακολουθούν πλύσεις για την απομάκρυνση του μη ειδικά προσδεμένου DNA από την μεμβράνη , στους 65 ° C για 30 λεπτά με τα εξής διαλύματα κατά σειρά : 3X SSC, 0.1% SDS
0.3X SSC, 0.1% SDS
0.1X SSC, 0.1% SDS
- Τέλος, αφαιρείται η μεμβράνη από το σωλήνα , στερεώνεται πάνω σε κάποιο παλιό χρησιμοποιημένο X-Ray φιλμ και καλύπτεται με διάφανη πλαστική μεμβράνη (Saran Wrap). Η έκθεση της μεμβράνης γίνεται σε X-Ray φιλμ αυτοραδιογραφίας ανάμεσα σε δύο ενισχυτικές οθόνες (intensifying screens).
- Ακολουθεί έκθεση στους -70° C για 20 ώρες περίπου και εμφάνιση του φιλμ.

Στα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια το τμήμα του DNA που φέρει ολόκληρο το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου υβριδοποιήθηκε είτε με ολόκληρο το διαγονίδιο είτε με το 5' άκρο του.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σύνθεση γίνεται με την δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq), παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων Mg^{+2} .

Κατά την διάρκεια μίας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με την θέρμανση του δείγματος στους $94^{\circ}C$ για 4 λεπτά. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες ($T_m = 50-65^{\circ}C$) και σύνθεση των αλυσίδων DNA με την Taq πολυμεράση στους $72^{\circ}C$. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων (συνήθως 30-35). Κατά την διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενισχύσεως δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας. Μία από τις παραλλαγές επιτρέπει την χρησιμοποίηση, ως αρχικής μήτρας για την αντίδραση ενισχύσεως μορίων RNA (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με την δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase).

Το πρωτόκολλο για την ταυτοποίηση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών είναι το ακόλουθο :

- Μήτρα DNA 1μl
- Εκκινητής 1(huRANKL): TCTTCAACTAATGGTGTACG (10 pmol/μl) 1μl
- Εκκινητής 2 (huRANKL): TCTACAAGGTCAAGAGCATG (10 pmol/μl) 1μl
- Εκκινητής 3 (muRANKL): AGGAGCTCCAGGTA ACTATG (3 pmol/μl) 0,3 μl
- Εκκινητής 4 (muRANKL): GGCAAGGTAGGGTTCAACTG (3 pmol/μl) 0,3 μl
- Μίγμα dNTP's (10mM) 1,5 μl

- 10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH: 9.0, 1% Triton-X) 2 μl
- Ιόντα Mg⁺² (25mM) 1,5 μl
- Taq DNA πολυμεράση 0,3 μl
- ddH₂O 11,1 μl
- **Τελικός όγκος 20 μl**

Για την ταυτοποίηση των huRANKL διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιείται μια συνδυαστική αντίδραση PCR όπου στο μίγμα υπάρχουν δύο ζευγάρια εκκινητών έτσι ώστε να εντοπίζεται και το ενδογενές και το εξωγενές RANKL. Αυτό μας επιτρέπει να επιβεβαιώσουμε ότι η αντίδραση έχει δουλέψει, το οποίο δεν θα ίσχυε αν υπήρχαν εκκινητές μόνο για το huRANKL. Στην περίπτωση αυτή έλλειψη ζώνης PCR θα σήμαινε ότι: α) το ποντίκι είναι φυσικού τύπου Wt, β) δεν δούλεψε η αντίδραση.

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA είναι:

- 1° αρχική αποδιάταξη: 94 °C για 4 min
- 2° αποδιάταξη : 94 °C για 30 sec
- 3° υβριδισμός εκκινητών 55 °C για 30 sec
- 4° επιμήκυνση 72 °C για 30 sec
- ακολουθούν 30 κύκλοι από το 2° στάδιο
- τελική επιμήκυνση 72 °C για 10 min
- επώαση 16° C για 30 sec

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Η παρουσία προϊόντος στην αντίδραση PCR ανιχνεύονται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% σε 1X TBE (323,4g Trizma base, 165g Boric acid, 27,9g EDTA, pH:8.3). Κατά την παρασκευή της αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται σε εκμαγείο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί οι ειδικές χτένες για το σχηματισμό πηγαδιών και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1X TBE. Από τα 20 μl του τελικού προϊόντος PCR χρησιμοποιούνται 10 μl, τα οποία ηλεκτροφορούνται

αφού πρώτα αναμιχθούν με 4 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading buffer) (Ficoll 400, ddH₂O, orange G). Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων, ταυτόχρονα με τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορείται ένας δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (λH/E DNA ladder). Τα αναμενόμενα προϊόντα έχουν συγκεκριμένα μοριακά βάρη, τα οποία είναι γνωστά με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το μοριακό βάρος του διαγονιδίου TghuRANKL ανιχνεύεται στις 574 kb. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (UV transilluminator) για την παρατήρηση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων.

2.4 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA)

Η έκφραση του εξωγενούς γονιδίου στα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια ελέγχθηκε με απομόνωση RNA και ανάλυση της μεταγραφικής ενεργότητας του διαγονιδίου σε PCR αφού πρώτα παράχθηκε cDNA με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR).

2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA με την μέθοδο της ουρίας/χλωριούχου λιθίου

Ολικό RNA απομονώνεται από τους διάφορους ιστούς, στην περίπτωση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών απομονώθηκε από το σπλήνα και τα μακρά οστά όσον αφορά τους «ιδρυτές» των διαγονιδιακών σειρών ενώ από τους απογόνους των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών απομονώθηκαν πληθώρα ιστών όπως ο θύμος αδένας, το ήπαρ, ο σπλήνας, τα μακρά οστά, ο εγκέφαλος, ο νεφρός και η καρδιά, με την μέθοδο της ουρίας/χλωριούχου λιθίου ως εξής :

- Αφαιρούνται οι ιστοί από το ποντίκι και αφού πλυθούν με 1X PBS, μπαίνουν σε σωλήνες erpendorf οι οποίοι εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο.
- Ο παγωμένος ιστός τοποθετείται σε σωλήνα universal των 30 ml που περιέχει 3 ml παγωμένου διαλύματος ουρίας/χλωριούχου λιθίου (3M LiCl, 6M Urea solution) και ομογενοποιείται σε ειδικό ομογενοποιητή κρατώντας τον σωλήνα σε πάγο.

- Στην συνέχεια ακολουθεί διάσπαση των μορίων του δείγματος με μεγάλο μοριακό βάρος (όπως DNA, πρωτεΐνες) με τη χρήση υπερήχων (συσκευή Ultrasonic homogenizer της εταιρείας Cole Palmer Instruments) για 30 δευτερόλεπτα σε πάγο.
- Τα δείγματα μετά τον υπέρηχο αφήνονται να αναθεωτούν στους 4° C για 12-16 ώρες.
- Το κάθε δείγμα μοιράζεται σε δύο σωλήνες errendorf και φυγοκεντρείται σε 13800 rpm για 15 λεπτά στους 4° C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται, αναδιαλύεται το ίζημα σε 1 ml διαλύματος ουρίας/χλωριούχου λιθίου και φυγοκεντρείται σε 13800 rpm στους 4° C για 15 λεπτά.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο, αναδιαλύεται το κάθε ίζημα σε 200 μl διαλύματος RNA-TES (10mM Tris, 1mM EDTA, 0,5% SDS pH:7.6) και ενώνονται τα επαναδιαλυμένα ιζήματα που αντιστοιχούν στο ίδιο δείγμα.
- Προστίθενται 400 μl φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στους 13800 rpm για 10 λεπτά.
- Από την υδατική φάση απομονώνονται 360 μl και γίνεται καθίζηση του RNA προσθέτοντας 1 ml 100% αιθανόλης και 40 μl διαλύματος 2 M οξικού νατρίου. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20° C για 2 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13800 rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
- Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, το ίζημα το οποίο τοποθετείται αμέσως σε πάγο ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13800 rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μl αποστειρωμένο ddH₂O όταν εξατμιστεί και η τελευταία σταγόνα αιθανόλης.

Για την απομόνωση του RNA συνίσταται η χρησιμοποίηση αποστειρωμένων υλικών και σκευών, όπως και η πραγματοποίηση των παραπάνω σταδίων σε πάγο ή στους 4°C.

2.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτικός έλεγχος του RNA που απομονώθηκε

Σε κάθε δείγμα RNA γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός φασματοφωτομετρικά, μετά από αραίωση με αποστειρωμένο ddH₂O (5 μl δείγματος σε 995 μl H₂O). Από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm προσδιορίζεται η συγκέντρωση (μg/ng) του RNA που έχει απομονωθεί, με τον τύπο: $C = OD \times 40 \times \text{αραίωση} / 1000$. Από το λόγο OD₂₆₀/OD₂₈₀ προσδιορίζεται η καθαρότητα του RNA από προσμίξεις πρωτεϊνών. Λόγος ≥ 1.8 υποδηλώνει δείγμα ικανοποιητικής καθαρότητας, ενώ δείγματα με λόγο < 1.2 πρέπει να υποβληθούν σε νέο καθαρισμό. Η ποιότητα του απομονωθέντος RNA ελέγχεται παράλληλα και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 2%) όπου πρέπει να διακρίνονται τουλάχιστον δύο ζώνες που αντιστοιχούν στα 18S και 28S ριβοσωμικού RNA.

2.4.3 Παραγωγή μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) από αγγελιαφόρο RNA (mRNA) με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης

A. Απομάκρυνση DNA

Τα δείγματα του RNA υπόκεινται σε επώαση με DNase με σκοπό να απομακρυνθούν υπολείμματα DNA .

- τα δείγματα του RNA διαλύονται σε 180 μl dH₂O
- προστίθενται 20 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος 10x RQ1 DNase (400mM Tris-HCl pH:8.0, 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂)
- προστίθενται 1.5 μl ενζύμου RQ1 DNase (Promega)
- τελικός όγκος 200 μl
- ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37° C για 20 λεπτά και μεταφορά σε πάγο.
- προστίθενται 100 μl dH₂O ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων RNA να φτάσει σε 300 μl.
- προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης 300μl, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13.800 rpm στους 4° C για 10 λεπτά.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο, στο οποίο προστίθενται 25 μl NaOAc 2M και 625 μl αιθανόλης 100% και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 ° C για 2 ώρες
- Φυγοκεντρώνονται τα δείγματα σε 13.800 rpm στους 4° C για 10 λεπτά.
- Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και το ίζημα το οποίο τοποθετείται αμέσως σε πάγο ξεπλένεται με 500 μl αιθανόλης 70% και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13800 rpm για 10 λεπτά στους 4° C.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50μl ddH₂O όταν εξατμιστεί και η τελευταία σταγόνα αιθανόλης.

Η ποσότητα και η ποιότητα των δειγμάτων RNA μετά την επώαση με την DNase ελέγχεται ξανά με φωτομέτρηση και στην συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης (συγκέντρωσης 2%).

B. Αντίδραση RT-PCR

Για τη δημιουργία cDNA ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- 2.5-5 μg RNA
- 1μl oligo (dT) (100mM Fermentas). Χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός τυχαίων και πολύ-dT εκκινήτων. Οι πρώτοι αναγνωρίζουν και προσδένονται σε πολλαπλές θέσεις κατά μήκος κάθε RNA, ενώ οι δεύτεροι προσδένονται στην πολύ-A αλληλουχία των mRNAs.
- Ανάλογα με το ποσό του RNA που χρησιμοποιείται, στο μείγμα προστίθεται dH₂O έως τελικού όγκου 8 μl. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή και υποβάλλονται σε αρχική θέρμανση στους 65°C επί 5 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται:
- Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 5x RT 4μl (250mM Tris-HCl pH: 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50 mM DTT)
- DTT(100mM) 2μl
- BSA (10x) 2μl
- dNTPs (2.5 mM) 2μl
- ακολουθεί προσθήκη 2 μl του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (200 u/μl) (SuperScriptTM II RNase Reverse Transcriptase, Promega)
- **Τελικός όγκος 20 μl**

Το διάλυμα επωάζεται στους 37° C επί 60 min και στους 4°C για 2 min λεπτά.

Γ. Μελέτη της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL με την μέθοδο RT-PCR

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται για κάθε δείγμα 1μl του προϊόντος της αντίδρασης παραγωγής cDNA. Μαζί με τα δείγματα της μελέτης χρησιμοποιούνται θετικά δείγματα ελέγχου, έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την β2-μικροσφαιρίνη (β2-microglobulin), καθώς και αρνητικά δείγματα ελέγχου.

Η β2-μικροσφαιρίνη αποτελεί βασικό στοιχείο του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I), που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους εκτός από τα ερυθροκύτταρα. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες γονιδιακής έκφρασης, ως γονίδιο αναφοράς καθώς παρουσιάζει σχεδόν σταθερή έκφραση στους περισσότερους ιστούς.

Το πρωτόκολλο για την μελέτη της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL είναι το ακόλουθο:

- cDNA 1μl
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR 2 μl (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH: 9.0, 1% Triton-X) 2 μl
- dNTPs (10mM) 1.5 μl
- MgCl₂ (25 mM) 1.2 μl
- Εκκινητής 1 TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA (5pmol/μl) 1μl
- Εκκινητής 2 CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC (5pmol/μl) 1μl
- Taq DNA πολυμεράση 0,3 μl
- ddH₂O 12 μl

Οι εκκινητές υβριδοποιούνται είτε στα όρια εξωνίου-εσωνίου είτε σε δύο διαφορετικά εξώνια. Στην πρώτη περίπτωση ένα τμήμα του πρώτου εκκινητή υβριδοποιείται στο 3' άκρο ενός εξωνίου και το υπόλοιπο στο 5' άκρο του επόμενου εξωνίου. Αυτό επιτρέπει την παραγωγή προϊόντος μόνο από cDNA και όχι από τη γονιδιωματική αλληλουχία. Στη δεύτερη περίπτωση, ο πρώτος εκκινητής υβριδοποιείται στο πρώτο εξώνιο και ο δεύτερος στο αμέσως επόμενο εξώνιο. Η ενίσχυση της αλληλουχίας του cDNA οδηγεί στην παραγωγή μικρότερου προϊόντος από ότι η ενίσχυση της γονιδιωματικής αλληλουχίας, η οποία θα περιέχει και το ενδιάμεσο εσώνιο.

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασιών που ακολουθείται για την ανίχνευση της έκφρασης του huRANKL είναι το ακόλουθο:

- αρχική αποδιάταξη : 95 °C για 3 min
- αποδιάταξη : 95 °C για 30 sec
- υβριδισμός εκκινητών : 58 °C για 30 sec
- επιμήκυνση : 72 °C για 1 min
- ακολουθούν 30 κύκλοι από το 2^ο στάδιο
- τελική επιμήκυνση : 72 °C για 15 min
- επώαση : 4 °C για 5 min

Μετά το τέλος της αντίδρασης στα δείγματα RNA γίνεται προσθήκη dH₂O έτσι ώστε τα δείγματα να είναι διαλυμένα σε τελικό όγκο 50 μl και φυλάσσονται στους -20 °C.

2.5 Ιστοπαθολογική ανάλυση

2.5.1 Παρασκευή ιστολογικών τομών

- Οι ιστοί αφαιρούνται από τα ποντίκια, ξεπλένονται σε διάλυμα 1X PBS και τοποθετούνται για 12-16 ώρες σε διάλυμα ουδέτερης φορμαλίνης (BDH).
- Οι μαλακοί ιστοί τοποθετούνται σε διάλυμα 1X PBS ενώ τα οστά τοποθετούνται σε διάλυμα που προκαλεί αποσβέστωση EDTA (EDTA 13%, 0,1M Na₃H₃(PO₄)₂ pH:7.6, 5M MgCl₂ με τελικό pH: 7.4) όπου και θα παραμείνουν για 21 ημέρες με μία αλλαγή στις πρώτες δέκα ημέρες.
- Η αφυδάτωση των ιστών γίνεται σε ιστοκινέττα (Leica) με διαδοχικές εμφαπτίσεις σε διαλύματα 50%, 70%, 85%, 96% (2 φορές) και 100% αιθανόλης (2 φορές), ξυλενίου (2 φορές) και παραφίνης (2 φορές) (Paraplast, BDH).
- Η έγκλειση των ιστών γίνεται σε παραφίνη θερμοκρασίας 60° C.
- Τα μπλοκ παραφίνης παραμένουν σε ψυχόμενη επιφάνεια μέχρι να στερεοποιηθούν.
- Οι ιστοί κόβονται σε μικροτόμο. Οι μαλακοί ιστοί σε πάχος περίπου 10 μm ενώ τα οστά σε πάχος περίπου 5 μm.

- Οι τομές απλώνονται για περίπου 2 λεπτά σε νερό θερμοκρασίας 40°C, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αφήνονται να στεγνώσουν για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C.
- Τέλος, οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη και εωσίνη για την παρατήρηση του πυρήνα/κυτταροπλάσματος στους μαλακούς ιστούς και την δομή του οστίτη ιστού στα οστά.

2.5.2 Χρώση αιματοξυλίνης –εωσίνης

- Οι τομές εμβαπτίζονται σε ξυλένιο για 2 λεπτά, (2 φορές) ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη .
- Επειδή οι χρωστικές αυτές είναι υδατοδιαλυτές οι ιστοί ενυδατώνονται σε διαδοχικές αραιώσεις 2 x 100%, 96%, 70%, 50% αιθανόλης και τελικά εμβαπτίζονται σε νερό.
- Οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό και 45 δεύτερα και ξεπλένονται με νερό για να φύγει η περίσσεια της αιματοξυλίνης .
- Στην συνέχεια οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα όξινης αιθανόλης για 1 δευτερόλεπτο και ξεπλένονται σε νερό.
- Ακολουθεί εμβάπτιση σε διάλυμα Scott (2g K₂H₂O₇ , 20g MgSO₄ 7H₂O/ 1 lt) για 3 λεπτά και ξέπλυμα με νερό.
- Οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα 1% εωσίνης για 2 λεπτά και 30 δεύτερα και ξεπλένονται με νερό.
- Ακολουθεί αφυδάτωση των τομών σε διαδοχικές αραιώσεις 50%, 70%, 96%, 2 x 100% αιθανόλης .
- Εμβάπτιση 2 φορές σε ξυλένιο και μονιμοποίηση των τομών με διάλυμα DPX (BDH).
- Αφού στεγνώσουν οι τομές είναι έτοιμες προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο και φωτογράφιση.

2.5.3 Χρώση με TRAP (ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση)

Πρόκειται για μία εξειδικευμένη χρώση που βάφει τους ώριμους οστεοκλάστες. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για να ετοιμαστεί η χρώση TRAP (KIT: Sigma-Aldrich Diagnostics No.387-A) περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 4,6 ml dH₂O τοποθετούνται σε ειδικά αποστειρωμένο κυλινδρικό δοχείο χωρητικότητας 15 ml τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο.
- Για να φτιαχτεί το «υπόστρωμα» ανακατεύονται 50ml από το Fast garnet GBC διάλυμα με 50ml διαλύματος NaNO₃. Το διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος για 2 λεπτά.
- Στο κυλινδρικό δοχείο που περιέχει τα 4,6 ml dH₂O προστίθενται 50 ml Naphthol AS-BI φωσφορικού οξέος, 150 ml διαλύματος Acetate και 100 ml διαλύματος Tartrate. Το τελικό διάλυμα ανακατεύεται και σε αυτό προστίθεται το «υπόστρωμα».
- Οι τομές πάχους 2-5 μm που προορίζονται για χρώση με TRAP εμβαπτίζονται σε ξυλένιο 2 φορές για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη.
- Ακολουθούν δύο διαδοχικές εμβαπτίσεις σε αιθανόλη 100 % και μία σε αιθανόλη 96 % και τέλος σε νερό.
- Οι τομές που βρίσκονται μέσα σε δοχείο με νερό για να μην στεγνώσουν τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο στο οποίο θα γίνει η χρώση.
- Με έναν «ειδικό» υδρόφοβο μαρκαδόρο σχεδιάζεται το περίγραμμα της τομής ώστε να μην υπερχυλίσει η χρώση και οι τομές τοποθετούνται ξανά σε νερό για να μην στεγνώσουν.
- 500 ml της χρώσης TRAP τοποθετούνται στην επιφάνεια κάθε τομής και με το ακρορύγχιο της πιπέτας απλώνεται η χρώση σε όλη την επιφάνεια για να μην στεγνώσει η τομή.
- Οι τομές τοποθετούνται σε κλίβανο θερμασμένο στους 37°C για 1 ώρα.
- Μετά από 1 ώρα οι τομές μονιμοποιούνται με γλυκερόλη (1 όγκος H₂O με 9 όγκους γλυκερόλης) και είναι έτοιμες για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

2.5.4 Χρώση με καλσεΐνη

Πρόκειται για μία εξειδικευμένη χρώση που βάφει περιοχές των οστών στις οποίες παρατηρείται έντονη οστική παραγωγή. Η καλσεΐνη γνωστή και με την ορολογία Fluorexon/Fluorescein είναι μια μικρού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτή ουσία και χρησιμοποιείται ως μόριο-πρότυπο σε πλήθος εφαρμογών τόσο στον τομέα της φαρμακευτικής όσο και της κλινικής έρευνας. Η χρησιμότητα της έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζει φθορισμό που αποσβένεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (100mM). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για να παρασκευαστεί η χρώση με καλσεΐνη (C-0875 Sigma Chemical Company, 0.5% διαλύματος καλσεΐνης περιέχουν 2% NaHCO₃ σε NaCl) περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

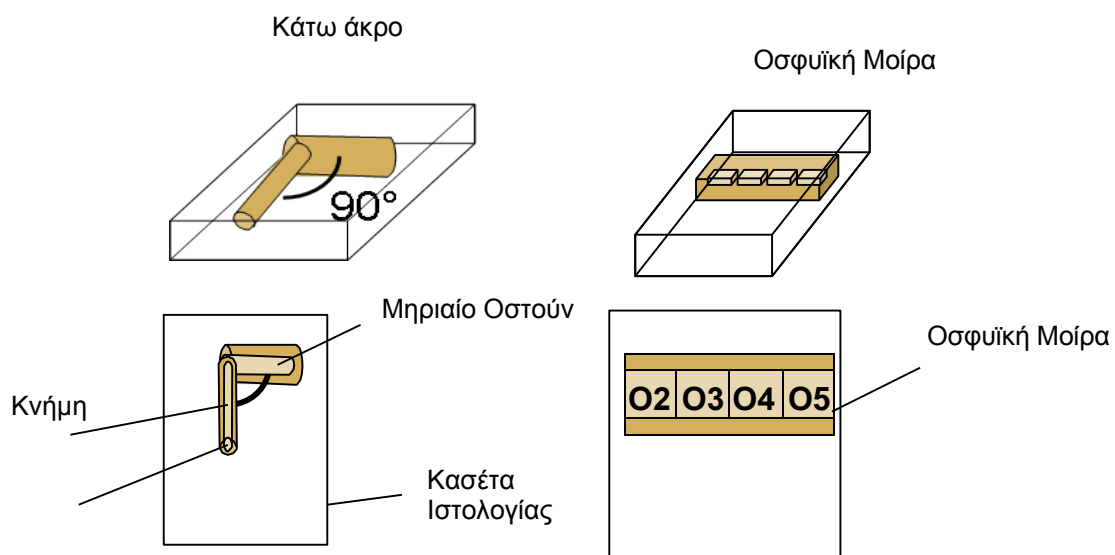
- Αρχικά ζυγίζονται 2 gr NaHCO₃ με συγκέντρωση 2%
- Από ένα αρχικό διάλυμα NaCl (stock) με συγκέντρωση 5M, 3 ml NaCl με τελική συγκέντρωση 0,15M προστίθενται σε ειδικά αποστειρωμένο κυλινδρικό δοχείο χωρητικότητας 100 ml που περιέχει ένα μικρό μαγνήτη.
- Στο διάλυμα αυτό προστίθενται τα 2 gr NaHCO₃, το οποίο φέρεται σε τελικό όγκο 100 ml με την προσθήκη ddH₂O και τοποθετείται σε αναδευτήρα μέχρι να διαλυθεί το NaHCO₃.
- Το τελικό διάλυμα NaHCO₃/NaCl αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- Στη συνέχεια ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος καλσεΐνης:
- 4 ml διαλύματος NaHCO₃/NaCl τοποθετούνται σε ειδικά αποστειρωμένο κυλινδρικό δοχείο χωρητικότητας 10 ml τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο.
- Ζυγίζονται 20 mg καλσεΐνης με την χρήση ζυγού ακριβείας και προστίθενται στο διάλυμα NaHCO₃/NaCl.
- Το διάλυμα ανακατεύεται με vortex και κατόπιν φιλτράρεται χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα φίλτρα διαμέτρου 22 μm.
- Το διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος στους 4 °C.

Για την εκτίμηση της οστικής παραγωγής στα μακρά οστά των διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν το γονίδιο RANKL του ανθρώπου πραγματοποιήθηκε χορήγηση καλσεΐνης σύμφωνα με τα πρωτόκολλα διπλής σήμανσης με την χρήση ουσιών φθορισμού ^[123]. Τόσο στα διαγονιδιακά ποντίκια όσο και στα φυσικού τύπου ποντίκια επιλέχθηκε να χορηγηθούν 100 μl

διαλύματος που αντιστοιχούν σε 5 mg/ml ανά Kg σωματικού βάρους. Η καλσεΐνης χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την ίδια ώρα κατά την διάρκεια της ημέρας. Επιλέχθηκε η διπλή χορήγηση με διαφορά 4 ημερών μεταξύ των δύο δόσεων, δηλαδή κατά την 6^η και 2^η από την ευθανασία των ζώων.

Με την ολοκλήρωση του πρωτόκολλου χορήγησης της καλσεΐνης:

- τα ζώα θυσιάζονται, αφαιρούνται οι ιστοί για να απελευθερωθούν τα μακρά οστά και η σπονδυλική στήλη.
- Ξεπλένονται σε 1 x PBS και τοποθετούνται σε κασέτες ιστολογίας έχοντας συγκεκριμένη διάταξη με βάση το ακόλουθο σχήμα (Εικ.2.2).
- Τα μακρά οστά τοποθετούνται έτσι ώστε να σχηματίζεται ορθή γωνία μεταξύ μηρού και κνήμης.
- Από την σπονδυλική στήλη επιλέγεται η οσφυϊκή μοίρα με τους Ο3, Ο4, Ο5 οσφυϊκούς σπονδύλους καθώς και μέρος της λαγόνιας ακρολοφίας.



Εικόνα 2.2 Διάταξη μακρών οστών και σπονδυλικής μοίρας στην κασέτα ιστολογίας.

- Οι ιστοί τοποθετούνται σε διάλυμα αιθανόλης 70% και φυλάσσονται στους 4 °C για 24 ώρες.
- Ακολουθεί αφυδάτωση των ιστών σε ιστοκινέττα με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα 70% (2 φορές για 90 λεπτά), 95% (2 φορές για 60 λεπτά), 100% (2 φορές για 60 λεπτά) αιθανόλης και τέλος, σε ακετόνη (1 φορά για 60 λεπτά).

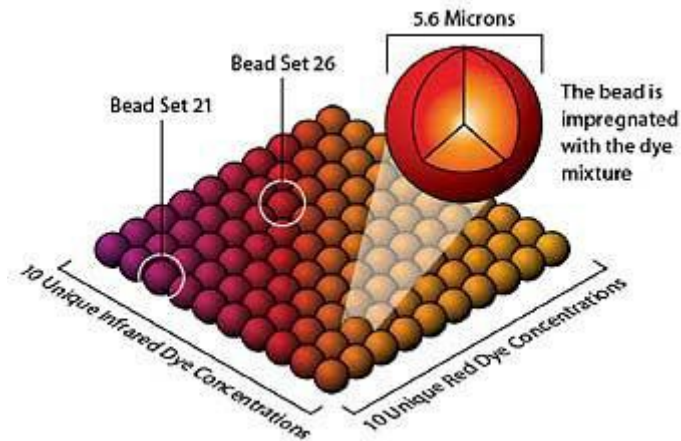
- Μετά την ολοκλήρωση της αφυδάτωσης γίνεται έγκλειση των ιστών σε μεθακρυλικό μεθυλεστέρα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα διπλής σήμανσης [123].
- Οι ιστοί κόβονται σε μικροτόμο. Το πάχος των τομών των μακρών οστών και της σπονδυλικής στήλης είναι περίπου 8 μm για κάθε δύο τομές.
- Η παρατήρηση των τομών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Δρ Pierre Jurdic με την χρήση μικροσκοπίου (μοντέλο DMLB; Leica) συνδεδεμένο με κάμερα (Sony) (μοντέλο 3CCD color video DXC-390).

2.6 Μέτρηση δεικτών οστικού μεταβολισμού στο ορό του αίματος

Τα επίπεδα του διαλυτού ανθρώπινου RANKL προσδιορίστηκαν στον ορό τόσο των διαγονιδιακών ποντικών όσο και στον ορό των ποντικών φυσικού τύπου με την δοκιμή Luminex χρησιμοποιώντας το human RANKL Single Plex Kit (Millipore) που αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαθέσιμη δοκιμή στην ανίχνευση της διαλυτής πρωτεΐνης RANKL του ανθρώπου με κατώτατο ανιχνεύσιμο όριο της δοκιμής στα 4,88 pg/ml.

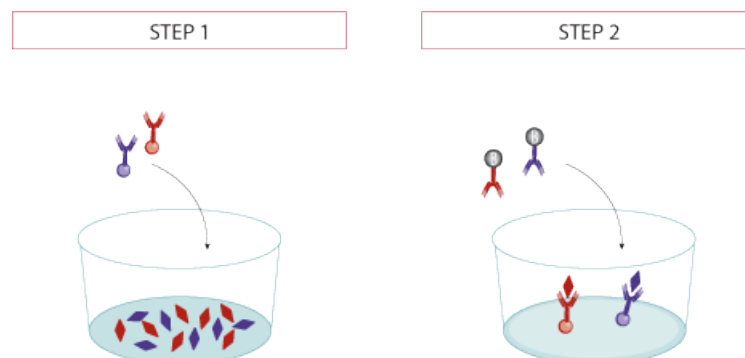
2.6.1 Αρχή λειτουργίας της ανοσοενζυμικής δοκιμής Luminex

Η δοκιμή στηρίζεται στην χρήση εσωτερικά χρωματισμένων μικροσφαιριδίων διαμέτρου 5,6 μm , τα οποία χρησιμοποιούνται ως επιφάνεια πρόσδεσης ενός ειδικού αντισώματος (capture antibody). Τα μικροσφαιρίδια είναι βαμμένα με δύο είδη φθορίζουσων χρωστικών ουσιών (ερυθρή και υπέρυθη) ώστε να παράγουν μια συγκεκριμένη φασματική διεύθυνση και σε διάφορες συγκεντρώσεις δημιουργώντας έτσι έως και 100 ξεχωριστές κατηγορίες (Εικ.2.3). Κάθε κατηγορία είναι συζευγμένη με ένα συγκεκριμένο στόχο ανάλυσης.



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση των μικροσφαιριδίων (beads) (τροποποιημένο από www.viracorbit.com).

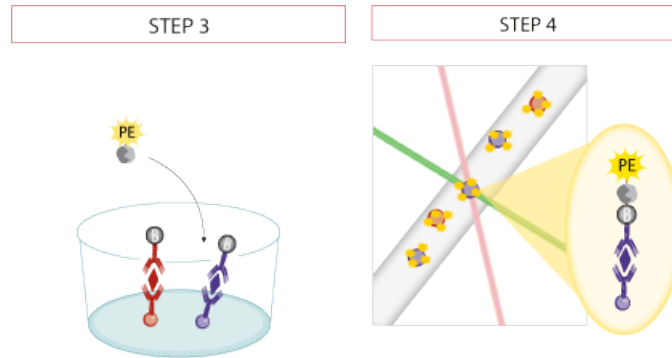
Στο διάλυμα που περιέχει μια συγκέντρωση του στόχου (π.χ. πρωτεΐνη), μέσα στο οποίο βρίσκονται τα μικροσφαιρίδια, προστίθενται στην συνέχεια τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα ειδικά για την ανίχνευση του αναλυτή ενδιαφέροντος. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα sandwich αντισώματος- αντιγόνου-αντισώματος (Εικ.2.4).



Εικόνα 2.4 Βήμα 1: Beads ενισχυμένα με capture Ab προστίθενται στο διάλυμα και δεσμεύουν τον στόχο. Βήμα 2: βιοτινυλιωμένα αντισώματα ανίχνευσης προστίθενται και δημιουργούν sandwich αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος.

Το διάλυμα στη συνέχεια επωάζεται με στρεπταβιδίνη-φυκοερυθρίνη (SA-PE). Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τον υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης (Εικ. 2.5). Η φυκοερυθρίνη είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται φυκοβιλιπρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από

κυανοβακτήρια και ευκαρυωτικά φύκη και εμφανίζουν εξαιρετικά φωτεινό φθορισμό και υψηλές αποδόσεις κβάντων. Τα μικροσφαιρίδια «διαβάζονται» από το μηχάνημα Luminex (Εικ. 2.6).



Εικόνα 2.5 Βήμα 3: προστίθεται μόριο Streptavidin (SA) ενωμένο με φυκοερυθρίνη (PE) και η αβιδίνη κολλάει με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα. Βήμα 4: Τα beads «διαβάζονται» από το μηχάνημα Luminex.



Εικόνα 2.6 Συσκευή Luminex που επιτρέπει την εκτέλεση πολυπλεκτικών πρωτόκολλων (www.luminex.corp)

2.6.1 Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Human RANKL Single Plex assay kit (Millipore/Linco, St. Charles, MO, USA)
- Πλάκα μικροτιλοδότησης (multiwell) με 96 μικροκοιλότητες που χρησιμοποιούνται ως μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Πιπέττες ακριβείας μονού αυλού με ακροστόμια χωρητικότητας από 5 μl έως 1000 μl
- Πολυκάναλη πιπέττα ακριβείας (πολλαπλού αυλού) με ακρορύγχια (tips) χωρητικότητας από 5 μl έως 200 μl.
- Πλαστικοί σωλήνες Eppendorf από πολυαιθυλένιο.
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex mixer)
- Περιστροφικός αναδευτήρας
- Αντλία κενού (Vacuum Filtration Unit)
- Συσκευή Luminex

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο Human RANKL Single-Plex assay kit φυλάσσονται στους 4° C. Τα πρότυπα διαλύματα καθώς και τα διαλύματα ελέγχου μετά την ανασύστασή τους φυλάσσονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες eppendorf στους -20 °C για ένα μήνα ή στους -80 °C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ενώ τα beads, τα αντισώματα και το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης – φυκοερυθρίνης (SA-PE) φυλάσσονται στους 4° C.

2.6.2 Γενικές οδηγίες

- Τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο kit είναι φωτοευαίσθητα γι' αυτό και σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας θα πρέπει να προστατεύονται από την έκθεση στο φως. Συνίσταται γι' αυτό να καλύπτονται τόσο τα αντιδραστήρια όσο και η μικροπλάκα με φύλλα αλουμινόχαρτου σε κάθε στάδιο της δοκιμής.
- Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν από την έναρξη της πειραματικής δοκιμής.

- Όλες οι πλύσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται αποκλειστικά με την χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος (Wash buffer) που εμπεριέχεται στο kit.
- Μετά τις πλύσεις και την εφαρμογή της αντλίας κενού η μικροπλάκα συνίσταται να στεγνώνεται προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί για την αποφυγή τυχόν διαρροής λόγω των τριχοειδών φαινομένων.
- Σε όλες τις διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων για τον υπολογισμό της καμπύλης ποσοτικοποίησης χρησιμοποιείται πάντα καινούργιο ακρορύγχιο (tip).
- Συνίσταται η ανάμειξη (vortex) όλων των αντιδραστηρίων πριν την χρήση τους είτε αυτών που παρασκευάστηκαν είτε αυτών που περιέχονται στο kit.

2.6.3 Απομόνωση ορού αίματος

Τα δείγματα του αίματος που ελήφθησαν με παρακέντηση της αορτής προέρχονται από ποντίκια που θυσιάστηκαν σε ηλικία 3 μηνών, ανεξαρτήτου φύλου, και ανήκουν τόσο στις διαγονιδιακές σειρές όσο και στα ποντίκια φυσικού τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται ολική αφάιμαξη του ζώου ενώ η ποσότητα αίματος που λαμβάνεται συνήθως αντιστοιχεί στο 8% (500 μl έως 700 μl) του σωματικού του βάρους. Το πρωτόκολλο λήψης ορού είναι το ακόλουθο:

- Τα δείγματα του αίματος μεταφέρονται σε σωλήνες eppendorf και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.
- Με ένα ακρορύγχιο (tip) διασπάται το πήγμα και τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για περίπου 30-45 λεπτά.
- Ο ορός διαχωρίζεται από το πήγμα αίματος με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (6.000 στροφές για 6 λεπτά και 12.000 στροφές για 12 λεπτά).
- Η ποσότητα του ορού που συλλέγεται τελικά αντιστοιχεί περίπου σε 300 μl.
- Κάθε δείγμα ορού διαιρείται σε επιμέρους δείγματα των 70 μl, τα οποία και φυλάσσονται στους -80 °C για την εκτέλεση των βιοχημικών αναλύσεων.

2.6.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων για την ανοσοδοκιμή

A. Ετοιμασία των μικροσφαιρών (beads) που αποτελούν την επιφάνεια προσκόλλησης των αντισωμάτων:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα (Bead Diluent) για την αραίωση των μικροσφαιρών (antibody-beads) αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί η διάσπασή τους με την χρήση υπερήχων για 30 δευτερόλεπτα και η ανάμειξη τους (vortex) για 1 λεπτό.
- Στη συνέχεια προστίθενται 150 μl μικροσφαιρών στα οποία είναι προσκολλημένο το RANKLαντίσωμα (RANKL-beads) σε 2.85 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Bead diluent) για την δημιουργία ενός διαλύματος με τελικό όγκο 3 ml.

B. Ετοιμασία των διαλυμάτων ελέγχου (Quality Controls):

- Γίνεται αραίωση των διαλυμάτων ελέγχου 1 και 2 προσθέτοντας 250 μl αποστειρωμένου ddH₂O.
- Τα διαλύματα αναμειγνύονται καλά τόσο χειροκίνητα όσο και με Vortex και αφήνονται να καθιζάνουν για 5-10 λεπτά.
- Στην συνέχεια μοιράζονται σε σωλήνες erpendorf έτοιμα για χρήση.

Γ. Ετοιμασία του διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer):

- Γίνεται επαναδιάλυση 30 ml διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer) με συγκέντρωση 10X σε 270 ml αποστειρωμένου ddH₂O. Η ποσότητα που περισσεύει φυλάσσεται στους -20 °C.

Δ. Αραίωση του διαλύματος Serum Matrix : το βήμα αυτό απαιτείται μόνο στην περίπτωση δειγμάτων ορού ή πλάσματος.

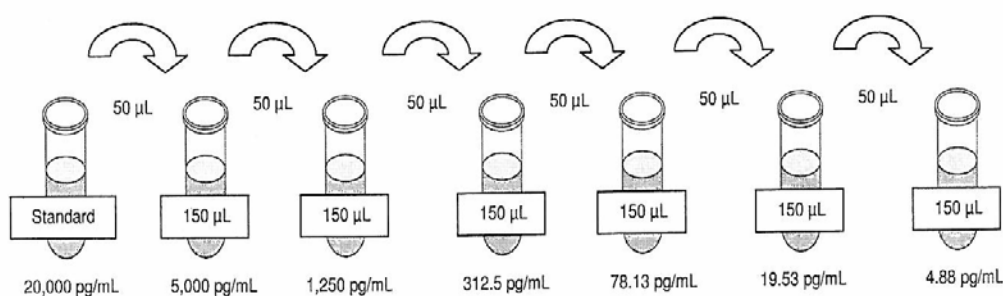
- Πριν την έναρξη της ανοσοδοκιμής, αναμειγνύονται 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O με 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Assay Buffer) στο φιαλίδιο που περιέχει την λυοφιλοποιημένη μήτρα ορού (lyophilized Serum Matrix). Ακολουθεί ανάμειξη του διαλύματος το οποίο και μοιράζεται σε σωλήνες erpendorf . Η ποσότητα που περισσεύει φυλάσσεται στο - 20 °C.

Ε. Ετοιμασία του πρότυπου διαλύματος Human RANKL:

- Η αραιώση του λυοφιλοποιημένου πρότυπου διαλύματος Human RANKL γίνεται με 250 μl αποστειρωμένου ddH₂O ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 20.000 pg/ml για την πρωτεΐνη RANKL. Το φιαλίδιο ανακινείται αρκετές φορές ώστε να αναμειχθεί καλά το διάλυμα, στη συνέχεια αφήνεται να ηρεμήσει για 5-10 λεπτά έτσι ώστε να έχει γίνει πλήρης επαναδιάλυση και μεταφέρεται σε σωλήνες errendorf έτοιμο για χρήση. Η ποσότητα που περισσεύει φυλάσσεται στους -20 °C.

Ζ. Ετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων (Working Standards) με διαδοχικές αραιώσεις για την δημιουργία της καμπύλης ποσοτικοποίησης:

- Χρησιμοποιούνται 6 σωλήνες errendorf στους οποίους αναγράφονται οι ακόλουθες συγκεντρώσεις 5 pg/ml, 1.250 pg/ml, 312.5 pg/ml, 78.13 pg/ml, 19.53 pg/ml και 4.88 pg/ml. Σε κάθε έναν σωλήνα errendorf προστίθενται 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Assay Buffer) και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις με την προσθήκη 50 μl διαλύματος ξεκινώντας από το πρότυπο διάλυμα Human RANKL (Standard) με συγκέντρωση 20.000 pg/ml σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα (Εικ.2.7). Το πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 0 pg/ml (Background) αποτελείται μόνο από Assay Buffer.



Εικόνα 2.7 Διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης .

2.6.5 Πειραματική διαδικασία

Για την ανοσοενζυμική δοκιμή Human RANKL Single-Plex με στόχο την ανίχνευση και προσδιορισμό της human RANKL πρωτεΐνης στον ορό του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν την χρήση τους στην πειραματική δοκιμή.
- Γίνεται σχεδιασμός της μικροπλάκας (96-wellplate) με την τοποθέτηση των πρότυπων διαλυμάτων (Standards), των διαλυμάτων ελέγχου (Controls 1 και 2) και των δειγμάτων ορού σε κάθετη απεικόνιση και εις διπλούν (duplicates).
- Κάθε κοιλότητα (well) της μικροπλάκας εμποτίζεται με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Assay Buffer). Η μικροπλάκα σφραγίζεται με το προστατευτικό κάλυμμα και τοποθετείται στο αναδευτήρα (Shaker) για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- Στην συνέχεια γίνεται απορρόφηση του Assay Buffer χρησιμοποιώντας την αντλία κενού και η μικροπλάκα στεγνώνεται για την ύπαρξη τυχόν διαρροής με απορροφητικά χαρτιά.
- Ακολουθεί η προσθήκη 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Assay Buffer) σε όλες τις κοιλότητες της μικροπλάκας. Στη συνέχεια προστίθενται 25 μl των πρότυπων διαλυμάτων (Standards) και ελέγχου (Controls 1 και 2) στις αντίστοιχες κοιλότητες καθώς και 25 μl από Assay Buffer στην κοιλότητα με την συγκέντρωση 0 pg/ml (Background) όπως και στις κοιλότητες στις οποίες θα προστεθούν τα δείγματα του ορού.
- Ακολουθεί η προσθήκη 25 μl από το διάλυμα Serum Matrix στις κοιλότητες των πρότυπων διαλυμάτων (Standards) και ελέγχου (Controls 1 και 2), καθώς και στην κοιλότητα με την συγκέντρωση 0 pg/ml (Background).
- Στην συνέχεια οι κοιλότητες των δειγμάτων εμποτίζονται με την προσθήκη 25 μl ορού από το κάθε δείγμα. Σημειώνεται ότι τα δείγματα των ορών έχουν αραιωθεί κατά 1:2 σε ρυθμιστικό διάλυμα (Assay Buffer).
- Τέλος, προστίθενται σε όλες τις κοιλότητες 25 μl διαλύματος που περιέχει τις μικροσφαίρες (beads) στις οποίες θα προσδεθεί ο αντιγονικός επίτοπος του human RANKL.

- Η μικροπλάκα σφραγίζεται με το προστατευτικό κάλυμμα και τοποθετείται για επώαση πάνω σε Shaker στους 4 °C, 16-20 ώρες συνολικά (overnight).
- Την επόμενη ημέρα η μικροπλάκα επαναφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και με την χρήση της αντλίας κενού γίνεται απορρόφηση του Assay Buffer. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 200 μl από Wash Buffer το οποίο αφαιρείται με χρήση της αντλίας κενού. Με απορροφητικό χαρτί στεγνώνεται η όποια περίσσεια από Wash Buffer.
- Μετά τις 3 διαδοχικές εκπλύσεις προστίθενται σε κάθε κοιλότητα της μικροπλάκας 50 μl από το αντίσωμα ανίχνευσης (Detection Antibody), το οποίο βρίσκεται ήδη σε θερμοκρασία δωματίου πριν την προσθήκη.
- Η μικροπλάκα σφραγίζεται με το προστατευτικό κάλυμμα, σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο και το μείγμα επωάζεται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Στην συνέχεια προστίθενται σε κάθε κοιλότητα της μικροπλάκας 50 μL στρεπταβιδίνης – φυκοερυθρίνης (SA-PE) , η μικροπλάκα σφραγίζεται και το μείγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Το μείγμα απομακρύνεται από κάθε κοιλότητα της μικροπλάκας με την χρήση της αντλίας κενού.
- Στην συνέχεια ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις με 200 μl από Wash Buffer το οποίο αφαιρείται με την χρήση της αντλίας κενού. Η οποιαδήποτε περίσσεια στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί.
- Ακολουθεί προσθήκη 100 μl από το υγρό περιβλήματος (Sheath Fluid) σε κάθε κοιλότητα της μικροπλάκας. Γίνεται έτσι επαναδιάλυση των μικροσφαιρών (beads) που δεσμεύουν την human RANKL πρωτεΐνη υπό ανάδευση σε Shaker για 5 λεπτά. Το υγρό περιβλήματος (Sheath Fluid) χρησιμοποιείται ως μέσο μεταφοράς, το οποίο μεταφέρει το δείγμα στο οπτικό στοιχείο των οργάνων που χρησιμοποιούν την τεχνολογία Luminex xMAP.
- Η μικροπλάκα τοποθετείται στο μηχάνημα της Luminex και μετά από 40-50 λεπτά εξάγονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την ανίχνευση της human RANKL πρωτεΐνης καθώς και η καμπύλη ποσοτικοποίησης. Η συσκευή υπολογίζει το FI (Fluorescence Intensity) δηλαδή την ένταση φθορισμού για κάθε μικροσφαιρίδιο που αναλύει και για κάθε κοιλότητα της μικροπλάκας που εξετάζει και δίνει ως αποτέλεσμα το MFI (Median

Fluorescence Intensity), δηλαδή την διάμεση τιμή της έντασης φθορισμού όλων των μικροσφαιριδίων. Από τα δεδομένα που προκύπτουν και τις τιμές των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης human RANKL σε pg/ml στα δείγματα του ορού προκύπτει η καμπύλη ποσοτικοποίησης.

2.7 Ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με την χρήση μικρο-υπολογιστικής τομογραφίας (micro-CT)

Τα οστά αποτελούνται από φλοιώδες και σπογγώδες οστόν, δύο συστατικά δομικά και λειτουργικά διαφορετικά. Το φλοιώδες οστόν αποτελεί το 80% του σκελετού και εντοπίζεται στο εξωτερικό περίβλημα των οστών, κυρίως στα άκρα. Το σπογγώδες οστόν βρίσκεται εντός των οστών ιδίως στις μεταφύσεις των μακρών οστών και στους σπονδύλους. Η χημική σύσταση του σπογγώδους και του φλοιώδους οστού δεν διαφέρει. Η διαφορά τους εντοπίζεται σε μικροσκοπικό επίπεδο, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η διαφορετική μηχανική τους συμπεριφορά. Η οστική ποσότητα και ποιότητα μπορούν να εκτιμηθούν με διάφορες μεθόδους μεταξύ των οποίων βρίσκεται η μικρο-υπολογιστική τομογραφία (micro computerized tomography, μ CT).

Πρόκειται για ένα αυτόματο σύστημα περιφερικής τομογραφίας με το οποίο γίνεται προσδιορισμός της οστικής πυκνότητας των περιφερικών άκρων. Η αρχή λειτουργίας του είναι όμοια με αυτή της υπολογιστικής τομογραφίας (QCT) και στηρίζεται στην εξασθένηση των ακτίνων-Χ από ένα αντικείμενο και στην καταγραφή μέσω της κατανομής απορρόφησης (absorption profile) ^[124]. Με την μαθηματική σύνθεση πολλών profiles από διαφορετικές γωνίες λήψης, υπολογίζεται και ανασύσταται μία εγκάρσια τομή του αντικειμένου. Κάθε σημείο της εικόνας (voxel) αντιστοιχεί σε μία τιμή συντελεστή εξασθένησης της ακτινοβολίας-Χ. με την κατάλληλη βαθμονόμηση του συστήματος με ομοιώματα συγκεκριμένης πυκνότητας σε υδροξυαπατίτη, οι τιμές των συντελεστών εξασθένησης μπορούν να μετατραπούν σε τιμές πυκνότητας οστού (mg/cm^3). Επομένως, ένα σύστημα μικρουπολογιστικής τομογραφίας είναι ένας μικρός φορητός αξονικός τομογράφος που διαχωρίζει και μετρά ανεξάρτητα το σπογγώδες από το φλοιώδες οστόν, προσδιορίζοντας ταυτόχρονα και τις γεωμετρικές παραμέτρους του οστού σε συγκεκριμένες τομές μακρών οστών.

Η αυτόματη τμηματική ανάλυση του σπογγώδους οστού είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της εικόνας στον περιφερικό σκελετό. Αξιολογούνται έτσι, διάφοροι παράγοντες της μικροαρχιτεκτονικής δομής του σπογγώδους όπως είναι ο αριθμός των οστικών δοκίδων (trabecular number), η πυκνότητα σύνδεσης τους (connectivity density) στην διαμόρφωση του πλέγματος, το πάχος τους, ο όγκος τους και ο βαθμός διαχωρισμού τους (trabecular separation) τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε οστεοπορωτικές συνθήκες που χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική απώλεια. Παράλληλα γίνεται ικανοποιητική μελέτη όσον αφορά και την τμηματική ανάλυση του φλοιώδους οστού. Η μέθοδος παρέχει τρισδιάστατες εικόνες υψηλής ευκρίνειας με δυνατότητα απεικόνισης ακόμη και μίας οστικής δοκίδας. Απαιτείται ελαφρά αναισθησία του ζώου, διάρκειας 5 λεπτών, προκειμένου να επιτευχθεί η καλή ακινητοποίηση του κατά την μέτρηση ή διαφορετικά γίνεται απευθείας μέτρηση των διαφόρων παραγόντων της μικροαρχιτεκτονικής των μακρών οστών που έχουν ληφθεί από ζώα κατόπιν ευθανασίας.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την ποσοτική εκτίμηση των διαφόρων παραγόντων της μικροαρχιτεκτονικής των μακρών οστών και κατά συνέπεια της οστικής απώλειας περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Τα ζώα θυσιάζονται και απομακρύνονται οι ιστοί από τα ποντίκια έτσι ώστε να είναι ευδιάκριτα τα μακρά οστά των κάτω άκρων (μηριαίο οστού και κνήμη), τα οποία και αφαιρούνται αμφότερα από την άρθρωση του ισχίου.
- Στην συνέχεια ξεπλένονται σε διάλυμα 1 X PBS, τοποθετούνται σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% και παραμένουν στους 4 °C για 12-16 ώρες (overnight).
- Την επόμενη ημέρα ξεπλένονται με διάλυμα αιθανόλης με συγκέντρωση 70% και φυλάσσονται στο διάλυμα της αιθανόλης στους 4 °C.

•

Οι διάφοροι παράγοντες της μικροαρχιτεκτονικής των μακρών οστών τόσο των διαγονιδιακών όσο και του φυσικού τύπου ποντικών μετρήθηκαν με την χρήση υψηλής ανάλυσης αυτόματου συστήματος μικρο-υπολογιστικής τομογραφίας (Skyscan 1076, Belgium), στο εργαστήριο του Δρ. Pierre Jurdic. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκαν το κλάσμα όγκου του σπογγώδους οστού σε %, ο αριθμός

των οστικών δοκίδων σε mm^{-1} , ο βαθμός διαχωρισμού τους σε mm^{-3} και η πυκνότητα σύνδεσης τους σε mm^{-3} .

2.8 Μέτρηση δεικτών οστικής απορρόφησης στον ορό του αίματος

Η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP) είναι ένας από τους βασικούς βιοχημικούς δείκτες οστικής απορρόφησης. Είναι μέλος της οικογένειας των όξινων φωσφατασών, μιας ξεχωριστής ομάδας ισοενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των φωσφορικών ριζών σε όξινο pH. Τα 4 ισοένζυμα προέρχονται από τα ερυθρά, τα λυσοσώματα, τον προστάτη και τα μακροφάγα. Τα ερυθροκυτταρικά ισοένζυμα και των μακροφάγων διαχωρίζονται από τα άλλα ισοένζυμα από την αναστολή της δράσης τους με τη προσθήκη άλατος τρυγικού οξέος.

Η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση είναι λυσοσωματική πρωτεΐνη και φυσιολογικά ανευρίσκεται στα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς όπως είναι οι οστεοκλάστες, τα κύτταρα του Kupffer και τα μακροκύτταρα [125].

Το ισοένζυμο της TRACP διαχωρίζεται σε δύο άλλα ισοένζυμα, την TRAP 5a και την TRACP 5b. Το εκχύλισμα οστεοκλαστικού TRACP είναι τύπου 5b. Η προέλευση του TRACP 5a δεν έχει εξακριβωθεί. Τα μόνα κύτταρα που περιέχουν TRACP 5a είναι τα μακροφάγα. Έτσι, η μέτρηση της TRACP 5b αντανακλά την δραστηριότητα των οστεοκλαστών, δηλαδή την οστική απορρόφηση.

Ο προσδιορισμός της TRACP 5b στον ορό αντανακλά πιστά τον ρυθμό της οστικής αποδόμησης την στιγμή της αιμοληψίας από την απευθείας δράση των οστεοκλαστών, σε αντίθεση με άλλους δείκτες οστικής απορρόφησης που αποτελούν προϊόντα αποδόμησης. Σημαντικό πλεονέκτημα στην μέτρηση της TRACP 5b είναι ότι δεν παρουσιάζει αθροιστικά φαινόμενα και δεν δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε περίπτωση νεφρικής και ηπατικής ανεπάρκειας. Λόγω του χαμηλού βαθμού μεταβλητότητας στην διάρκεια της ημέρας σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα επίπεδα της TRACP 5b δεν επηρεάζονται από συνθήκες νηστείας ή πρόσληψης τροφής, είναι δυνατή η συλλογή δειγμάτων αίματος και

κατ' επέκταση ορού σε οποιαδήποτε ώρα της ημέρας. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρηση της εκκρινόμενης TRACP 5b αντικατοπτρίζει τον αριθμό των οστεοκλαστών παρά την δράση τους ^[126].

2.8.1 Αρχή λειτουργίας της ανοσοενζυμικής δοκιμής

Η μέτρηση της TRACP 5b πραγματοποιείται με την τεχνική της ανοσοπροσοροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσης με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay, ELISA). Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα kit (Mouse TRAP Assay, Cat: SB-TR103, Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) το οποίο χρησιμοποιεί ένα πολυκλωνικό αντίσωμα παρασκευασμένο χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο mouse TRACP ως αντιγόνο. Στην ανοσοδοκιμή το αντίσωμα επωάζεται στις 96 κοιλότητες της μικροπλάκας του kit, στις οποίες έχει προσροφηθεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα anti-rabbit IgG. Τα δείγματα των δοκιμών, τα διαλύματα βαθμονόμησης και οι τα διαλύματα ελέγχου (μάρτυρες) επωάζονται στις αντίστοιχες κοιλότητες. Το αντίσωμα που πρέπει να καθοριστεί θα προσδεθεί στην στερεά φάση και η μη προσδεδεμένη πρωτεΐνη αφαιρείται με ξέπλυμα. Στην συνέχεια, αντι-ορός anti –Mouse TRAP προστίθεται σε κάθε κοιλότητα και το μη προσδεδεμένο σύζευγμα αφαιρείται με ξέπλυμα. Μετά από επώαση με διάλυμα υποστρώματος, η αντίδραση που ακολουθεί παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, συνήθως μία αλλαγή του χρώματος στο υπόστρωμα και σταματά με κάποιο όξινο ρυθμιστικό διάλυμα. το προϊόν της αντίδρασης διαβάζεται από το κατάλληλο μηχάνημα και παρέχει πληροφορίες κυρίως ποιοτικές αλλά και ποσοτικές για την παρουσία της ζητούμενης ουσίας στο δείγμα, στην συγκεκριμένη περίπτωση της TRACP 5b. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας και της δράσης της TRACP 5b.

2.8.2 Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Mouse TRAP Kit (Cat: SB-TR103, Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK)
- Πλάκα μικροτιλοδότησης (multiwell) με 96 μικροκοιλότητες που χρησιμοποιούνται ως μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες, στις οποίες έχει προσροφηθεί ένα πολυκλωνικό αντίσωμα anti-rabbit IgG.
- Κάλυμα πλάκας μικροτιλοδότησης
- Πιπέττες ακριβείας μονού αυλού με ακροστόμια χωρητικότητας από 5 μl έως 1000 μl
- Πολυκάναλη πιπέττα ακριβείας (πολλαπλού αυλού) με ακρορύγχια (tips) χωρητικότητας από 5 μl έως 200 μl.
- Πλαστικοί σωλήνες Eppendorf από πολυαιθυλένιο.
- Απορροφητικά χαρτιά
- Περιστροφικός αναδευτήρας
- Διάλυμα NaCl 0.9 %
- Αποστειρωμένο νερό για την αρραίωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων πλύσης, αραίωσης, υποστρώματος
- Πλαστικός υδροβολέας για αυτόματη ή χειροκίνητη έκπλυση των σειρών
- Συσκευή φωτομέτρησης μικροπλάκων ELISA (Microplate Manager 4.0 Bio-Rad Laboratories, Inc) στα 405 nm.

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο Mouse TRAP Assay kit φυλάσσονται στους 4° C.

2.8.3 Απομόνωση ορού αίματος

Τα δείγματα του αίματος που ελήφθησαν με παρακέντηση της αορτής προέρχονται από ποντίκια που θυσιάστηκαν σε ηλικία 3 μηνών, ανεξαρτήτου φύλου, και ανήκουν τόσο στις διαγονιδιακές σειρές όσο και στα ποντίκια φυσικού τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται ολική αφαίμαξη του ζώου ενώ η ποσότητα αίματος που λαμβάνεται συνήθως αντιστοιχεί στο 8% (500 μl έως 700 μl) του σωματικού του βάρους. Το πρωτόκολλο λήψης ορού από το αίμα των ζώων περιγράφεται παραπάνω. Κάθε δείγμα ορού διαιρείται σε επιμέρους δείγματα των 70 μl, τα οποία και φυλάσσονται στους -80 °C για την εκτέλεση των βιοχημικών αναλύσεων.

2.8.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Οι βαθμονομητές (Calibrators) σύνολο 8 και τα διαλύματα ελέγχου (μάρτυρες) παρέχονται στο kit λυοφιλοποιημένα. Η αραίωση τους γίνεται με 0.5 ml ddH₂O στις φιάλες στις οποίες βρίσκονται. Γίνεται ανάδευση χειροκίνητα και τα διαλύματα αφήνονται να ηρεμήσουν σε στέρεη επιφάνεια για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C). Εάν τα διαλύματα των βαθμονομητών και ελέγχου χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία φορές, τότε συνίσταται η φύλαξη τους στους -70 °C.
- Το anti – Mouse TRAP αντίσωμα αραιώνεται με 10.5 ml ddH₂O. Αφήνεται σε στέρεη επιφάνεια σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι και στη συνέχεια αναδεύεται ήπια μέχρι την πλήρη ανασύστασή του.
- Το διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution) ετοιμάζεται λίγο πριν την χρήση του στην ανοσοδοκιμή. Διαλύονται δύο ταμπλέτες υποστρώματος σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος για το υπόστρωμα (μία ταμπλέτα για την χρήση του μισού αριθμού κοιλοτήτων (well) της μικροπλάκας. Εάν το διάλυμα υποστρώματος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί περισσότερο από μια φορά συνίσταται η φύλαξή του στους -70 °C και η μη έκθεση του στο φως.
- Για την αραίωση του διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer) με συγκέντρωση 25X προστίθενται στο δοχείο που περιέχει τα συστατικά του 960 ml ddH₂O και ακολουθεί ήπια ανάμειξη του.

2.8.5 Πειραματική διαδικασία

Για την ανοσοενζυμική δοκιμή Mouse TRAP με στόχο την ανίχνευση και προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείκτη οστικής απορρόφησης TRACP 5b στον ορό του αίματος των διαγονιδιακών ποντικών, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα του ορού αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν την χρήση τους στην πειραματική δοκιμή για εξισορρόπηση.
- Γίνεται σχεδιασμός της μικροπλάκας (96-wellplate) με την τοποθέτηση των διαλυμάτων των βαθμονομητών (Calibrators), των διαλυμάτων ελέγχου

(Controls) και των δειγμάτων ορού σε κάθετη απεικόνιση και εις διπλούν (duplicates).

- Στις κοιλότητες της μικροπλάκας στις οποίες έχει προσροφηθεί ο ανιχνεύσιμος αντιγονικός επίτοπος του Mouse TRAP προστίθενται 100 μl αντισώματος anti-Mouse TRAP.
- Η μικροπλάκα σφραγίζεται με το προστατευτικό κάλυμα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου περίπου στους 20-24 ° C για 60 λεπτά, πάνω σε αναδευτήρα με ήπια ταχύτητα (950 rpm). Οι μικροπλάκες δεν πρέπει να εκτίθενται στο άμεσο ηλιακό φως γι' αυτό και κατά την διάρκεια της επώασης σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο.
- Στην συνέχεια ακολουθούν τέσσερις διαδοχικοί κύκλοι εκπλύσης των κοιλοτήτων της μικροπλάκας με την χρήση τουλάχιστον 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Wash Buffer). Η σχολαστική έκπλυση είναι πολύ σημαντική για την εκτέλεση της ανοσοδοκιμής. Όλες οι κοιλότητες πρέπει να γεμίζουν μέχρι το χείλος του βυθίσματος για κάθε κύκλο έκπλυσης. Συνίσταται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων μεταξύ των κύκλων με την χειροκίνητη χρήση πλαστικού υδροβολέα.
- Κατόπιν η μικροπλάκα χτυπιέται ανάποδα σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθεί το εναπομένον ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
- Στην συνέχεια προστίθενται 100 μl από κάθε διάλυμα βαθμονομητή και διάλυμα ελέγχου στις αντίστοιχες κοιλότητες της μικροπλάκας όπως αυτό έχει ορισθεί πριν την έναρξη της δοκιμής εις διπλούν (duplicates).
- Ακολουθεί η προσθήκη 75 μl NaCl 0.9% στις υπόλοιπες κοιλότητες της μικροπλάκας στις οποίες θα προστεθούν τα δείγματα του ορού συνοδευόμενη από την προσθήκη 25 μl δείγματος ορού εις διπλούν (duplicates). Γίνεται σχολαστική αλλά ήπια ανάμειξη των διαλυμάτων με την χρήση της πιπέτας ακριβείας έτσι ώστε να μην σχηματιστεί αφρός.
- Με την χρήση πολυκάναλης πιπέτας ακριβείας προστίθενται σε όλες τις κοιλότητες της μικροπλάκας 25 μL διαλύματος που περιέχει το αντιδραστήριο υπεύθυνο για την αποδέσμευση του TRACP 5b από τις προσδεμένες πρωτεΐνες (Releasing Reagent). Επαναλαμβάνεται σχολαστική αλλά ήπια ανάμειξη των διαλυμάτων στις κοιλότητες της μικροπλάκας.

- Η μικροπλάκα σφραγίζεται και τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-24 °C) για 60 λεπτά υπό ανάδευση με ήπια ταχύτητα (950 rpm).
- Μετά το τέλος της επώασης επαναλαμβάνονται 4 διαδοχικοί κύκλοι έκπλυσης με 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Wash Buffer). Η μικροπλάκα σκουπίζεται σε απορροφητικό χαρτί για την εξάλειψη τυχόν περίσσειας ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης.
- Ακολουθεί η προσθήκη 100 μl χρωμογόνου διαλύματος (Substrate Solution) το οποίο έχει παρασκευαστεί μόλις πριν την προσθήκη του, σε όλες τις κοιλότητες της μικροπλάκας με την χρήση πολυκάναλης πιπέτας ακριβείας.
- Η μικροπλάκα σφραγίζεται με το προστατευτικό κάλυμμα, σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο και επωάζεται για 2 ώρες στους 37 °C.
- Μετά την ολοκλήρωση της επώασης προστίθενται με την χρήση πολυκάναλης πιπέτας 25 μl διαλύματος NaOH 0.32 M (Stop Solution), το οποίο διακόπτει την ενζυμική αντίδραση. Στο στάδιο γίνεται επίσης σχολαστική μα ήπια ανάμειξη των διαλυμάτων σε όλες τις κοιλότητες της μικροπλάκας.
- Χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών που διαθέτει φίλτρο αναφοράς στα 405 nm, γίνεται η μέτρηση της οστικής πυκνότητας (OD) σε κάθε κοιλότητα της αντίδρασης εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του διαλύματος NaOH 0.32 M που διακόπτει την ενζυμική αντίδραση.
- Τα επίπεδα της TRACP 5b εκφράζονται σε pg/ml. Οι τιμές των πρότυπων διαλυμάτων ήταν 0, 0.45 U/L, 1.30 U.L, 3.1 U/L και 9.0 U/L.

2.9 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής

Η οστική απορρόφηση συνδέεται απόλυτα με τον σχηματισμό οστού, έτσι ώστε να μην υπάρχει καμία καθαρή απώλεια οστίτη ιστού κατά την διάρκεια της οστικής εναλλαγής. Μεταβολές στον ρυθμό της οστικής εναλλαγής αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για την εκτίμηση τόσο της οστικής παραγωγής όσο και της οστικής απορρόφησης. Στους κυριότερους δείκτες οστικής παραγωγής συγκαταλέγεται η αλκαλική φωσφατάση ενώ στους δείκτες οστικής απορρόφησης συγκαταλέγεται το ολικό ασβέστιο και το ιονισμένο ασβέστιο.

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες ή πλησίον αυτών στους περισσότερους ιστούς. Το ένζυμο καταλύει την αλκαλική υδρόλυση των μονοφωσφορικών εστερικών και βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο εντερικό επιθήλιο, στα νεφρικά σωληνάρια, στα οστά, στο ήπαρ και στον πλακούντα ^[127]. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία της αλκαλικής φωσφατάσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ο κύριος ρόλος της στη φυσιολογία του οστού φαίνεται να σχετίζεται με την μετάλλωση των οστών κατά την διάρκεια της οστικής παραγωγής. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα της οστικής αλκαλικής φωσφατάσης αυξάνονται στην κυκλοφορία κατά την διάρκεια περιόδων ενεργού οστικού σχηματισμού και αύξησης των οστών.

Το ολικό ασβέστιο αποτελεί σημαντικό δείκτη μέτρησης για την μελέτη της διακίνησης του στον οργανισμό. Ειδικότερα, η μέτρηση του ιονισμένου ασβεστίου αντανακλά καλύτερα τον οστικό μεταβολισμό και συμβάλλει στην διάκριση των φυσιολογικών συνθηκών οστικού μεταβολισμού από τις συνθήκες έντονης οστικής απορρόφησης σε παθολογικές καταστάσεις.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό τόσο των διαγονιδιακών όσο και των φυσικού τύπου ποντικών όπως είναι η αλκαλική φωσφατάση, το ολικό και ιονισμένο ασβέστιο καθώς και ο φώσφορος. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν γενικοί βιοχημικές δείκτες όπως είναι η γλυκόζη, ουρία, ολική χοληστερίνη, κρεατινίνη, αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) που αντανακλούν τα επίπεδα της ευρύτερης φυσιολογικής ή όχι λειτουργίας του οργανισμού των ζώων. Η ανάλυση των βιοχημικών δεικτών πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Microanalysis SA (Αθήνα, Ελλάδα) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την λήψη ορού περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Θυσιάζονται τα ζώα στα οποία θα γίνει προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών στον ορό του αίματος και τα δείγματα του αίματος λαμβάνονται με διάτρηση της καρδιάς (παρακέντηση της αορτής). Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται ολική αφαίμαξη του ζώου ενώ η ποσότητα αίματος που λαμβάνεται συνήθως αντιστοιχεί στο 8% (500 μl έως 700 μl) του σωματικού βάρους.
- Τα δείγματα του αίματος μεταφέρονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια μιας χρήσεως κατάλληλα για Γενική αίματος που περιέχουν αντιπηκτικό την

Ηπαρίνη Λιθίου (Lithium-Heparin), η οποία εμποδίζει τον σχηματισμό θρομβίνης και την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων ενισχύοντας την καθαρότητα του δείγματος.

- Γίνεται ήπια ανακίνηση χειροκίνητα των σωληναρίων και τα δείγματα αίματος μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf.
- Ανά 5 δείγματα γίνεται μόνο μία φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 6 λεπτά στις 12.000 στροφές ή για 10 λεπτά στις 3.000 στροφές. Ο ορός με τον τρόπο αυτό διαχωρίζεται από το πήγμα αίματος.
- Η ποσότητα του ορού που συλλέγεται σε νέο σωλήνα erpendorf τελικά, αντιστοιχεί περίπου σε 300 μl. Για την μεταφορά των ορών χρησιμοποιείται ακρορύγχιο του 1 ml , ενώ σημειώνονται τα δείγματα στα οποία μπορεί να υπάρξει αιμόλυση κατά την μεταφορά τους για την επανάληψη της δειγματοληψίας.
- Οι οροί φυλάσσονται στους 4 °C μέχρι την παράδοση για να γίνει η ανάλυση των βιοχημικών δεικτών.

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των βιοχημικών δεικτών χρησιμοποιήθηκε αυτόματος βιοχημικός αναλυτής πολλαπλών θέσεων (Architect c8000, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

2.10 Προσδιορισμός αιματολογικών παραγόντων

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από αιματολογικές εξετάσεις τόσο στα διαγονιδιακά ποντίκια όσο στα φυσικού τύπου ποντίκια με σκοπό τον προσδιορισμό και την ανάλυση διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών στο αίμα όπως είναι τα λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια καθώς και διαφόρων αιματολογικών παραμέτρων όπως είναι η μέση περιεκτικότητα ερυθροκυττάρου σε αιμοσφαιρίνη (MCH), η μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC), το εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW), ο αιμοπεταλιοκρίτης (PCT), ο μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV) και το εύρος κατανομής τους (PDW).η ανάλυση των αιματολογικών υποπληθυσμών και παραμέτρων πραγματοποιήθηκε επίσης σε συνεργασία με την Microanalysis SA (Αθήνα, Ελλάδα).

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το ακόλουθο:

- Τα ζώα θυσιάζονται και το αίμα λαμβάνεται με διάτρηση της καρδιάς (παρακέντηση της αορτής).
- 120 μl αίματος από κάθε ζώο μεταφέρονται σε σωληνάρια που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Το καλιούχο άλας του EDTA αποτελεί αντιπηκτικό επιλογής για την μελέτη των έμμορφων στοιχείων του αίματος. Δεν επηρεάζει τον αριθμό και την μορφολογία των κυττάρων και συνήθως δεν προκαλεί συσώρευση των αιμοπεταλίων. Η αντιπηκτική του δράση οφείλεται στην δέσμευση ιόντων Ca^{++} του πλάσματος, χωρίς τα οποία δεν είναι δυνατή η πήξη του αίματος.
- Γίνεται ήπια ανακίνηση των δειγμάτων για να μην πήξει το αίμα και τα δείγματα αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C).
- Στην συνέχεια τοποθετούνται στους 4 °C μέχρι την παράδοσής τους. Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε με την χρήση αυτόματου αιματολογικού αναλυτή (Model PCE 210N, ERMA INC. Tokyo, Japan).

2.11 Χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών που αναστέλλουν την δράση του RANKL και την οστική απορρόφηση

Τα διφωσφονικά αποτελούν την θεραπεία πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της οστικής απώλειας που παρατηρείται σε νοσήματα με αυξημένη οστεοκλαστική δράση όπως είναι η οστεοπόρωση, καθώς αποδεδειγμένα μειώνουν τον κίνδυνο σπονδυλικών και μη σπονδυλικών καταγμάτων.

Για την αναστολή της έντονης οστικής απώλειας που παρατηρήθηκε στα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον RANKL του ανθρώπου επιλέχθηκε η χορήγηση ενός αμινοδιφωσφονικού της αλενδρονάτης (ALN). Η αντιστεοκλαστικής της δράση αφορά τις μεταβολές στην λειτουργία, την διαφοροποίηση και την απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών με τελικό στόχο την απόπτωση τους. Με την χορήγηση αλενδρονάτης αυξάνεται η οστική πυκνότητα και αντοχή και κατά συνέπεια μειώνονται τα οστεοπορωτικά κατάγματα ^[128].

Η αλενδρονάτη που χορηγήθηκε (126855-100 MG Alendronate, Sodium Salt, Calbiochem, Merck, USA), είναι σε στερεή μορφή και διαλύεται σε ddH₂O σύμφωνα με το πρωτόκολλο που εμπεριέχεται στην συσκευασία της, έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 10 mg/ml.

- Σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf ο οποίος έχει ζυγιστεί πρώτα άδειος σε ζυγό ακριβείας, προστίθεται μια ποσότητα αλενδρονάτης. Επαναλαμβάνεται η ζύγιση και από την διαφορά προκύπτει η ποσότητα αλενδρονάτης.
- Με βάση την συγκέντρωση της στο τελικό διάλυμα υπολογίζεται ο όγκος ddH₂O στον οποίο θα αραιωθεί η αλενδρονάτη.
- Με την χρήση πιπέτας ακριβείας γίνεται σχολαστική αλλά ήπια ανάμειξη του διαλύματος αλενδρονάτης και στη συνέχεια μίξη με την χρήση Vortex ώστε να διαλυθούν πλήρως οι κρύσταλλοι της αλενδρονάτης.
- Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος αλενδρονάτης χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα φίλτρα Whatman με μέγεθος πόρων 0.2 μm και μέγιστη εξασκούμενη πίεση που μπορούν να δεχτούν 7 bar (Whatman FP 30/0.2, CA-5).
- Το διάλυμα αλενδρονάτης φυλάσσεται στους 4 °C.

Η δόση της αλενδρονάτης που επιλέχθηκε να χορηγηθεί είναι 1mg/Kg σωματικού βάρους, ενώ χρησιμοποιήθηκε 0.9% NaCl (φυσιολογικός ορός) στις ομάδες ελέγχου ως placebo. Τα ενέσιμα διαλύματα τόσο της αλενδρονάτης όσο και του φυσιολογικού ορού παρασκευάστηκαν με βάση το σωματικό βάρος των ζώων έτσι ώστε το κάθε ζώο να λαμβάνει κατά μέσο όρο 0.5 μg/g/10μl.

Για την χορήγηση της αλενδρονάτης στα ζώα χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες του 0.5 ml. Η ποσότητα της αλενδρονάτης υπολογίζεται με βάση το βάρος του κάθε ζώου. Η χορήγηση έγινε με υποδόρια ένεση μία φορά την εβδομάδα πάντα σε συγκεκριμένη πρωινή ώρα. Μετά την ολοκλήρωση του σχήματος χορήγησης της αλενδρονάτης, τα ζώα θυσιάστηκαν, έγινε απομόνωση των μακρών οστών και ακολούθησε ιστολογική ανάλυση της κεφαλής του μηριαίου οστού καθώς και της κνήμης.

2.12 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Student's t-test για συνεχείς μεταβλητές και σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ δύο ομάδων δεδομένων. Όλες οι τιμές εκφράστηκαν σε μέσους όρους σε συνάρτηση με την τυπική απόκλιση και το στατιστικό σφάλμα. Στατιστικά αποδεκτές θεωρήθηκαν τιμές του στατιστικού σφάλματος $p < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

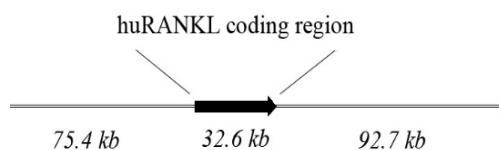
3.1. Δημιουργία TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών

Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν τον RANKL του ανθρώπου αποτέλεσε στόχο στην ερευνητική ομάδα της Δρ Ελένης Ντούνη για την κατανόηση της επαγόμενης παθολογίας και τη δημιουργία νέων μοντέλων οστεοπόρωσης με προκλινικό ενδιαφέρον.

Διαγονιδιακοί ονομάζονται οι οργανισμοί αυτοί στους οποίους έχει τροποποιηθεί το γενετικό τους υλικό με την εισαγωγή «ξένου» DNA. Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια μέσω των γαμετών στους απογόνους όπου όλα τα κύτταρα περιέχουν το ίδιο τροποποιημένο γενετικό υλικό. Τα πρώτα διαγονιδιακά ποντίκια δημοσιεύθηκαν το 1982, στα οποία είχε γίνει παρέμβαση στα γονίδια που καθορίζουν την ανάπτυξη. Σήμερα όλα σχεδόν τα διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργούνται με μικροένεση του «ξένου» DNA σε έναν από τους δύο προπυρήνες του γονιμοποιημένου ωαρίου, έναν προερχόμενο από το σπερματοζωάριο και έναν από το ωράριο, που με την σύντηξή τους θα προκύψει ο πυρήνας του εμβρύου στο στάδιο του ενός κυττάρου. Στην συνέχεια τα ζυγωτά μεταφέρονται στον ωαγωγό μιας θετής μητέρας όπου και αναπτύσσονται φυσιολογικά ενώ οι απόγονοι που γεννιούνται ελέγχονται για την παρουσία του διαγονιδίου.

Για να επιτύχουμε φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του RANKL γονιδίου του ανθρώπου (huRANKL) σε διαγονιδιακά ποντίκια (TghuRANKL), χρησιμοποιήθηκε ένα γενωμικό τμήμα 200kb που περιελάμβανε το huRANKL γονίδιο που απομονώθηκε από ένα κλώνο βακτηριακού τεχνητού χρωμοσώματος (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τόσο μεγάλες γονιδιωματικές κατασκευές ακολουθούν συνήθως ένα φυσιολογικό πρότυπο υπερέκφρασης του διαγονιδίου και η έκφραση είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου και ανεξάρτητη από φαινόμενα επίδραση θέσης ^[129]. Για την μικροένεση απομονώθηκε ένα γραμμικό τμήμα 200kb γενωμικής περιοχής ύστερα από πέψη

με NotI, η οποία περιέχει τις κωδικές περιοχές του huRANKL γονιδίου καθώς και όλες τις ρυθμιστικές περιοχές τόσο στην 5' όσο και στην 3' περιοχή (Εικ. 3.1).



Εικόνα 3.1 Το γενωμικό τμήμα 200 kb του human RANKL γονιδίου με τις κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές του.

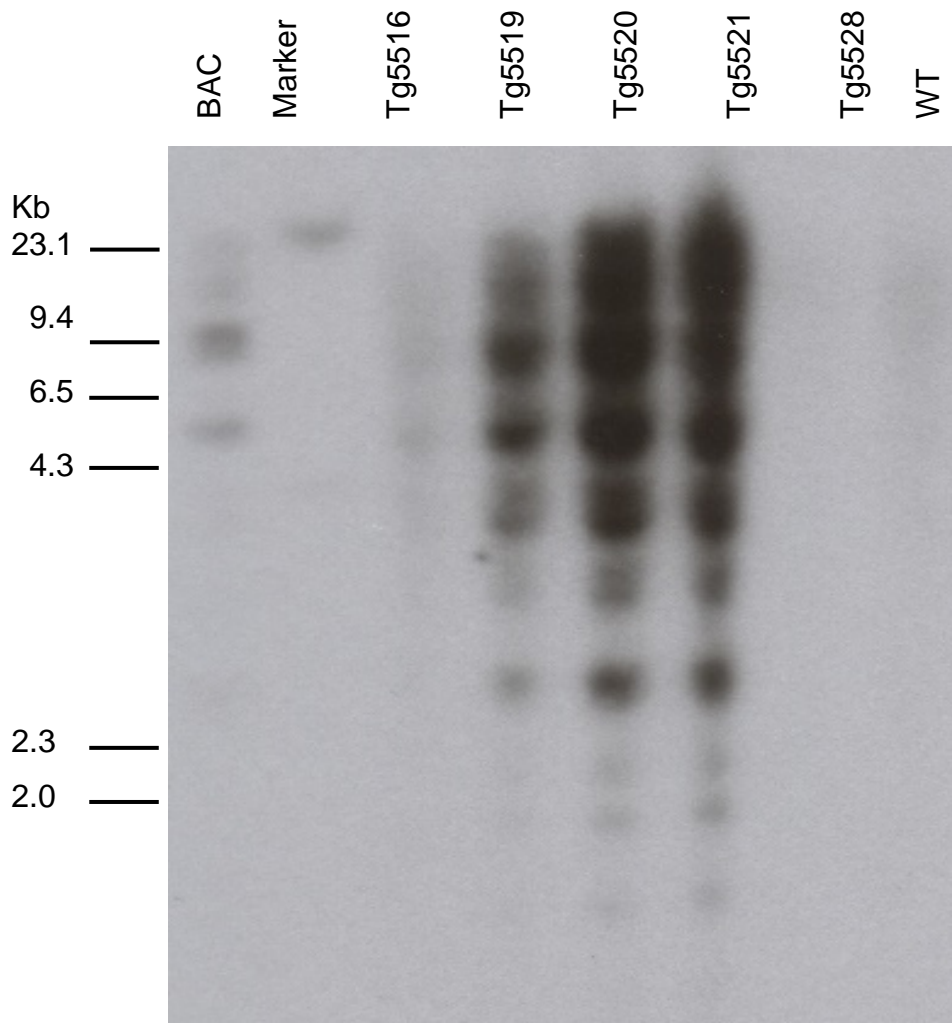
Τα Tg_{huRANKL} ποντίκια δημιουργήθηκαν με μικροένεση DNA σε πυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων, η απομόνωση των οποίων πραγματοποιήθηκε από ποντίκια με γενετικό υπόβαθρο C57BL/6J X CBA/J.

3.2. Ταυτοποίηση του huRANKL διαγονιδίου με την τεχνική του υβριδισμού στυλώματος κατά Southern (Southern blot)

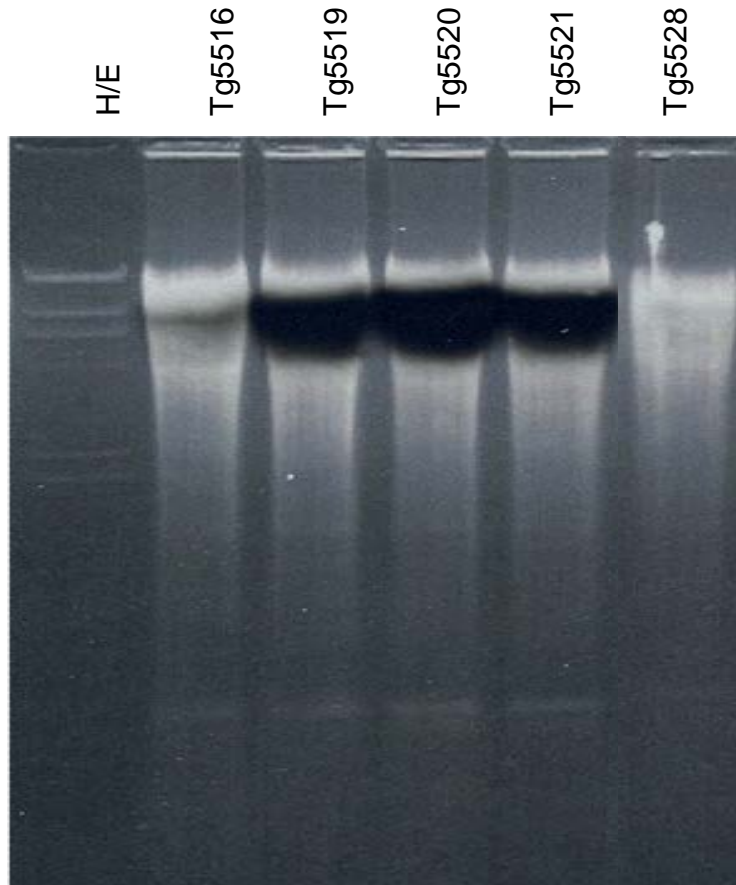
Η ταυτοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν στο γονιδίωμα τους το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο υβριδοποίησης Southern blot. Συνολικά γεννήθηκαν 21 ποντίκια τα οποία ελέγχθηκαν για την παρουσία του διαγονιδίου huRANKL. Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τις ουρές των ποντικών, κόπηκε με BamHI ένζυμο περιορισμού και υβριδοποιήθηκε είτε με ολόκληρο το διαγονίδιο όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2 είτε με τον 5' ιχνηθέτη του που αντιστοιχεί στην 5' περιοχή του 200 kb γενωμικού τμήματος που χρησιμοποιήθηκε για μικροένεση όπως προκύπτει από την εικόνα 3.3.

Ανιχνεύθηκαν έτσι, τέσσερις ανεξάρτητες σειρές Tg_{huRANKL} διαγονιδιακών ποντικών οι Tg5516, Tg5519, Tg5520 και Tg5521 (Εικ.3.2 & 3.3.) σε καθεμία από τις οποίες υπάρχει διαφορετική θέση ενσωμάτωσης του huRANKL διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ποντικού. Μελετώντας τις αυτοραδιογραφίες μετά την μεταφορά κατά Southern διαπιστώθηκε έντονο σήμα στις σειρές Tg5519, Tg5520, Tg5521 το οποίο υποδεικνύει μεγάλο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου (high copy) και μικρότερο σήμα στην σειρά Tg5516 που δηλώνει

μικρό αριθμό αντιγράφων (low copy). Κάθε ένα από τα πέντε διαγονιδιακά ποντίκια που ανιχνεύθηκαν αποτελεί τον «ιδρυτή» (founder) της κάθε σειράς που στην συνέχεια διασταυρώθηκε με άγριου τύπου C57BL/6J ποντίκια, τα οποία αποτελούν το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό στέλεχος για την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών. Η σειρά Tg5521 παρουσίασε μωσαϊκό χαρακτήρα για το διαγονίδιο και έδωσε μικρό αριθμό διαγονιδιακών απογόνων γι' αυτό και δεν μελετήθηκε περαιτέρω.



Εικόνα 3.2. Αυτοραδιογραφία μετά από υβριδοποίηση Southern blot γενωμικού DNA που απομονώθηκε από τις ουρές των huRANKL διαγονιδιακών ποντικών και των άγριου τύπου (Wt) ποντικών. Η υβριδοποίηση έγινε με ολόκληρο το γενωμικό τμήμα 200 kb που περιέχει αποκλειστικά ολόκληρο το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου και χρησιμοποιήθηκε για μικροένεση, ενώ αναγράφονται γνωστά μοριακά βάρη εκφρασμένα σε kb (kilobases).



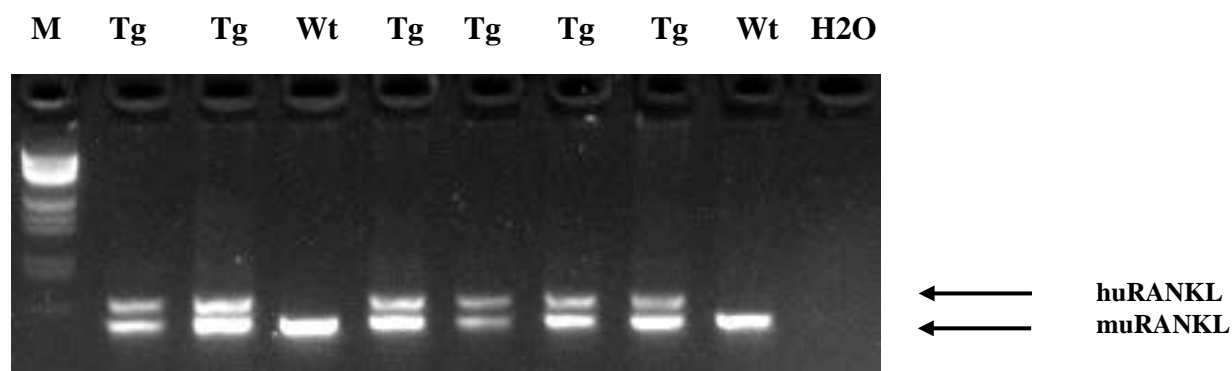
Εικόνα 3.3 Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA και αυτοραδιογραφία μετά από μεταφορά κατά Southern. Η υβριδοποίηση έγινε με 5' ιχνηθέτη του διαγονιδίου huRANKL.

3.3 Ανίχνευση του huRANKL διαγονιδίου στους απογόνους με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR

Οι απόγονοι που προήλθαν από κάθε διασταύρωση ελέγχθηκαν για την παρουσία του διαγονιδίου huRANKL με την μέθοδο απομόνωσης γενωμικού DNA από τις ουρές των ποντικών και την ταυτοποίηση του με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικ.3.4).

Για την ταυτοποίηση των huRANKL διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιείται μια συνδυαστική αντίδραση PCR όπου στο μίγμα υπάρχουν δύο ζευγάρια εκκινητών έτσι ώστε να εντοπίζεται και το ενδογενές γονίδιο (muRANKL) και το εξωγενές (huRANKL). Αυτό μας επιτρέπει να ελέγξουμε και να επιβεβαιώσουμε ότι η αντίδραση έχει δουλέψει. Για παράδειγμα αν το ποντίκι είναι διαγονιδιακό,

τότε εμφανίζονται δύο ζώνες PCR που αντιστοιχούν στο ενδογενές και στο εξωγενές γονίδιο, ενώ αν το ποντίκι είναι άγριου τύπου (WT) τότε εμφανίζεται μόνο η ζώνη που αντιστοιχεί στο ενδογενές γονίδιο.



Εικόνα 3.4. Ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών με PCR. Η αντίδραση PCR για την ταυτοποίηση των huRANKL διαγονιδιακών ποντικών συνδυάζει την ανίχνευση του ενδογενούς RANKL (muRANKL) μήκους 281 bp με εκείνη του RANKL του ανθρώπου (huRANKL) μήκους 399 bp, που έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των ποντικών. **Tg:** διαγονιδικά ποντίκια, **WT:** ποντίκια άγριου τύπου, **M:** δείκτης γνωστού μοριακού βάρους, **H2O:** αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA.

Ο «ιδρυτής» της σειράς Tg5520 δεν έδωσε απογόνους με αποτέλεσμα η σειρά να μην μελετηθεί περισσότερο πέραν του «ιδρυτή» της. Επίσης, η σειρά Tg5521 λόγω του μωσαϊκού χαρακτήρα του διαγονιδίου και του μικρού αριθμού απογόνων δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

3.4 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL

Το πρότυπο έκφρασης του ανθρώπινου RANKL μελετήθηκε σε διάφορους ιστούς των TghuRANKL διαγονιδιακών σειρών, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η ανάλυση αυτή επέτρεψε την κατάταξη των 4 διαγονιδιακών σειρών σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου RANKL και την σύγκριση μεταξύ του προτύπου έκφρασης του RANKL διαγονιδίου και του ενδογενή RANKL (muRANKL) σε διάφορους ιστούς.

3.4.1 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους «ιδρυτές» των TghuRANKL διαγονιδιακών σειρών

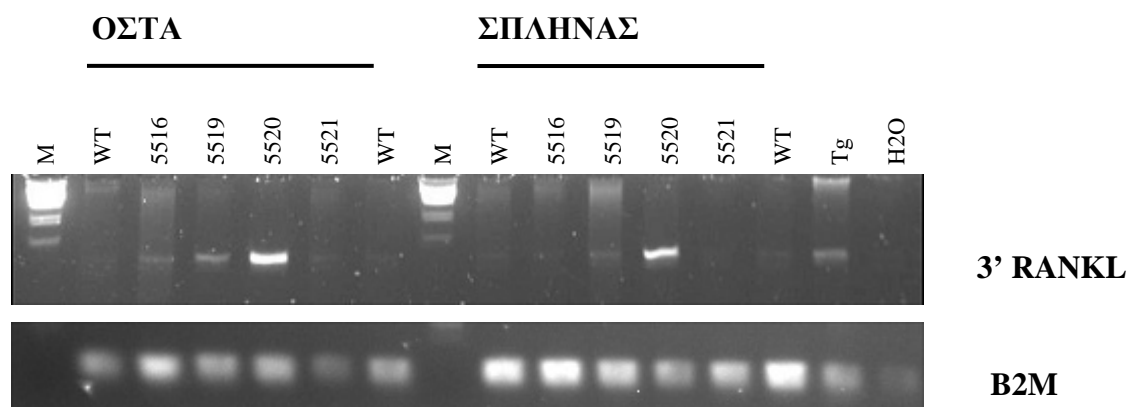
Καθεμία από τις ανεξάρτητες σειρές των διαγονιδιακών ποντικών TghuRANKL ελέγχθηκε για την έκφραση του διαγονιδίου σε διάφορους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, έγινε απομόνωση RNA από το σπλήνα και τα μακρά οστά και ακολούθησε η ανάλυση της μεταγραφικής ενεργότητας του διαγονιδίου με PCR αφού πρώτα παράχθηκε cDNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).

Για την ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου είναι απαραίτητη η χρήση ενός κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου, το οποίο πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις. Το γονίδιο αυτό θα πρέπει να παρουσιάζει σταθερή και συνεχή έκφραση σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα και στο δείγμα αναφοράς. Επιπλέον, καλό είναι το ενδογενές γονίδιο να παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά του γονιδίου-στόχου. Τα γονίδια τα οποία συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες (housekeeping genes) θεωρείται ότι εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (π.χ. β-ακτίνη, α-τουμπουλίνη, β-τουμπουλίνη), πρωτεΐνες-στοιχεία του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (π.χ. β-μικροσφαιρίνη), ένζυμα της γλυκολυτικής οδού (π.χ. GAPDH: αφυδρογονάση της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης) και ριβοσωμικό RNA (18S rRNA και 28S rRNA).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το ενδογενές γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης. Πρόκειται για βασικό στοιχείο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHCI), που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους εκτός από τα ερυθροκύτταρα. Η β2-μικροσφαιρίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες γονιδιακής έκφρασης, ως γονίδιο αναφοράς καθώς παρουσιάζει σχεδόν σταθερή έκφραση στους περισσότερους ιστούς.

Η ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο (Εικ.3.5) έδειξε υψηλή έκφραση του διαγονιδίου στην σειρά **Tg5520** ενώ ακολουθεί η σειρά **Tg5519** και η σειρά **Tg5516**. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε έκφραση στη σειρά Tg5521 οπότε δεν μελετήθηκε περαιτέρω. Επίσης, στον

σπλήνα παρατηρείται έκφραση κυρίως στον ιδρυτή Tg5520 που έχει μεγάλο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου.



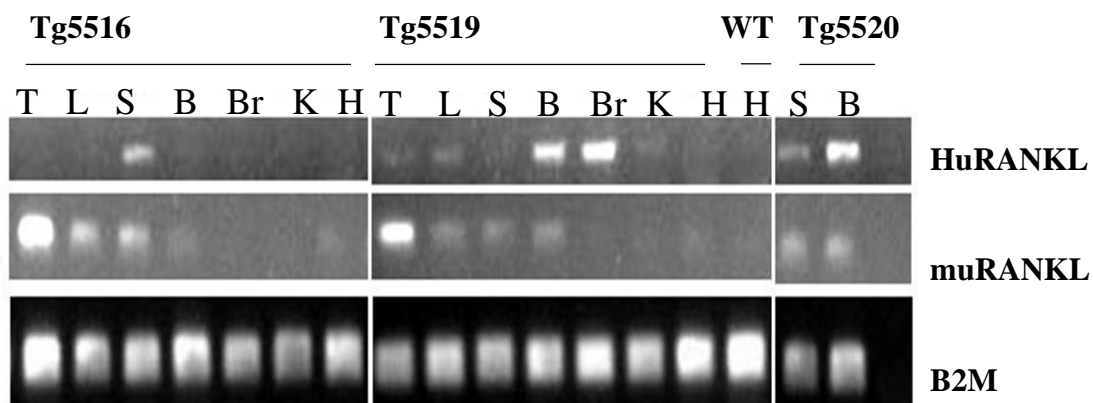
Εικόνα 3.5. Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου RANKL του ανθρώπου σε μεταγραφικό επίπεδο στον σπλήνα και στα μακρά οστά των TghuRANKL ιδρυτών. Σύγκριση της έκφρασης του huRANKL γονιδίου με το ενδογενές γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (B2M) σε σπλήνα και στα οστά. TghuRANKL ιδρυτών και άγριου τύπου ποντικών.

3.4.2 Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους TghuRANKL διαγονιδιακούς απογόνους

Οι διαγονιδιακοί απόγονοι της σειράς Tg5516 με τον μικρό αριθμό αντιγράφων και της σειράς Tg5519 με τον μεσαίο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου ελέγχθηκαν για την έκφραση του διαγονιδίου σε μια πληθώρα ιστών όπως ο θύμος αδένας, το ήπαρ, ο σπλήνας, τα μακρά οστά, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και η καρδιά με απομόνωση RNA και παραγωγή cDNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) (Εικ.3.6), ενώ πραγματοποιήθηκε και σύγκριση με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς RANKL (muRANKL) στους διάφορους ιστούς.

Η ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους διάφορους ιστούς επέτρεψε την ταξινόμηση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του. Συγκεκριμένα, η σειρά Tg5516 έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ η σειρά Tg5519 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης κυρίως σε οστά και εγκέφαλο. Ως σημείο σύγκρισης

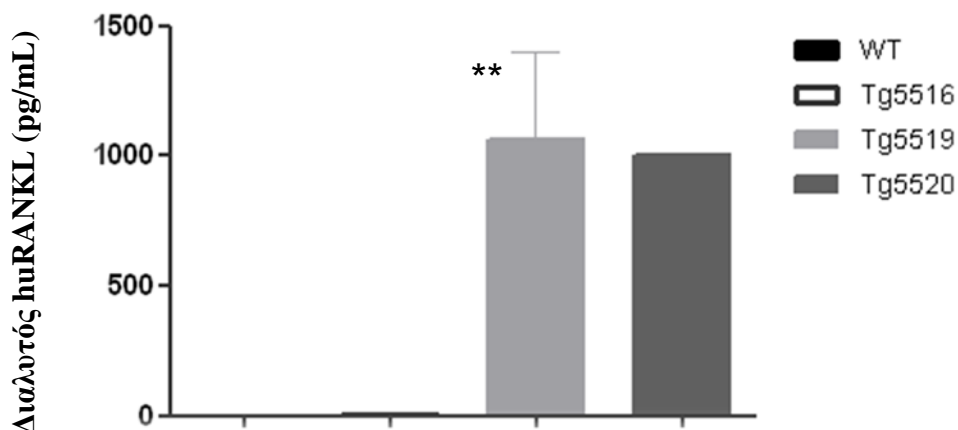
χρησιμοποιήθηκε η έκφραση σε σπλήνα και οστά του ιδρυτή Tg5520 που εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε σύγκριση του διαγονιδίου (huRANKL) με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς RANKL (muRANKL) στους διάφορους ιστούς των TghuRANKL διαγονιδιακών απογόνων των σειρών Tg5516, Tg5519 σε σχέση με τον ιδρυτή Tg5520. Επειδή η παρούσα τεχνική δεν προσφέρει ποσοτική εκτίμηση ακριβείας τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν από άλλα μέλη του εργαστηρίου χρησιμοποιώντας ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) όπου διαπιστώθηκε ότι υπάρχει παρόμοιο πρότυπο έκφρασης μεταξύ huRANKL και muRANKL ^[122] και επιβεβαιώθηκε ότι η Tg5519 διαγονιδιακή σειρά (high copy) εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου RANKL σε όλους τους προς εξέταση ιστούς-όργανα σε σχέση με την Tg5516 διαγονιδιακή σειρά (low copy).



Εικόνα 3.6 Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου σε σχέση με το αντίστοιχο του ενδογενούς RANKL (muRANKL) σε διάφορους ιστούς (T: θύμος, L: ήπαρ, S: σπλήνας, B: οστά, Br: εγκέφαλος, K: νεφρός, H: καρδιά) των διαγονιδιακών σειρών Tg5516, Tg5519 και Tg5520, WT: άγριου τύπου ποντίκια, B2M: ενδογενές γονίδιο β2-μικροσφαιρίνης.

3.4.3 Ανίχνευση της huRANKL πρωτεΐνης

Τα επίπεδα της διαλυτής RANKL πρωτεΐνης του ανθρώπου προσδιορίστηκαν στον ορό των διαγονιδιακών ή άγριου τύπου ποντικών με την μέθοδο Lumiplex χρησιμοποιώντας το human RANKL Single plex kit (Millipore) που αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαθέσιμη μέθοδο ανίχνευσης, η οποία δεν ανιχνεύει τον ενδογενή RANKL (muRANKL). Στην σειρά Tg5516 τα επίπεδα του διαλυτού ανθρώπινου RANKL στον ορό είναι χαμηλά ($6,26 \text{ pg/mL} \pm 0,84$, $n=7$), τιμή που βρίσκεται πολύ κοντά στο κατώτατο ανιχνεύσιμο όριο της δοκιμής ($4,88 \text{ pg/mL}$). Αντίθετα, στην σειρά Tg5519 τα επίπεδα του διαλυτού ανθρώπινου RANKL στον ορό είναι δραματικά αυξημένα (1065 pg/mL , $n=11$). Η συγκέντρωση του διαλυτού ανθρώπινου RANKL στον ιδρυτή της σειράς Tg5520 με επίσης υψηλή έκφραση, ανιχνεύθηκε στα 1003 pg/mL . Στον ορό, τέλος, των άγριου τύπου ποντικών οι τιμές για τον ανθρώπινο RANKL ήταν αρνητικές καθώς η δοκιμή δεν ανιχνεύει τον ενδογενή RANKL (muRANKL) (Εικ.3.7)



Εικόνα 3.7. Ανίχνευση της huRANKL πρωτεΐνης στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών στις σειρές Tg5516 ($n=7$), Tg5519 ($n=11$), και στον «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 ($n=1$), WT: άγριου τύπου ποντίκια (μη ανιχνεύσιμη, $n=11$). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SD. Η σύγκριση έγινε μεταξύ Tg5516 και Tg5519 (two-sample independent Student's t-test), ** $p < 0.005$.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της διαλυτής huRANKL πρωτεΐνης επιβεβαίωσαν την ταξινόμηση των TghuRANKL διαγονιδιακών σειρών σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασής της. Έτσι, η σειρά Tg5516 παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα

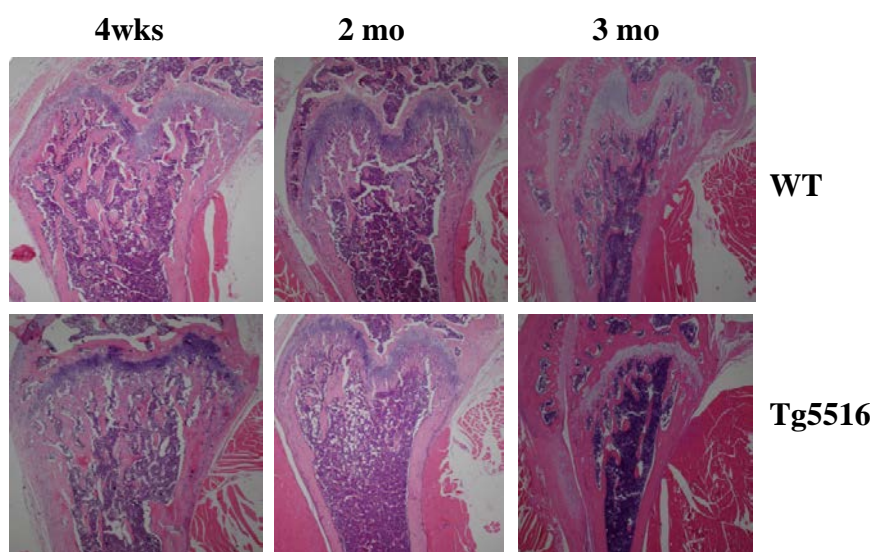
έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης, ακολουθεί η σειρά Tg5519 με πολύ αυξημένα επίπεδα έκφρασης και η σειρά Tg5520 με ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης.

3.5 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5516

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 φέρει μικρό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου huRANKL και παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου RANKL. Φαινοτυπικά, οι απόγονοι της διαγονιδιακής αυτής σειράς τόσο στην εμφάνιση όσο και στο σωματικό βάρος, δεν διαφέρουν από του άγριου τύπου ποντίκια ενώ είναι γόνιμα και μεταβιβάζουν το διαγονίδιο κανονικά στην επόμενη γενεά σε αναλογία 50% και στα δύο φύλα.

3.5.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5516

Η ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών στην περιοχή της μετάφυσης έδειξε αυξημένη οστική απώλεια στο σπογγώδες οστόν της κεφαλής του μηριαίου, η οποία είναι ήδη εγκατεστημένη στα διαγονιδιακά ποντίκια ηλικίας 2 μηνών η οποία γίνεται ακόμη πιο εμφανής σε ηλικία 3 μηνών (Εικ.3.8). Αντίθετα, στα άγριου τύπου ποντίκια της σειράς Tg5516 η αντίστοιχη περιοχή του σπογγώδους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ισχυρής συνεκτικότητας μεταξύ των οστικών δοκίδων, οι οποίες σχηματίζουν ένα καλά οργανωμένο και συμπαγές δίκτυο. Τα διαβρωτικά φαινόμενα δεν επεκτείνονται στην περιοχή του φλοιώδους οστού στο οποίο δεν παρατηρήθηκε καμιά αλλαγή στην δομή του.



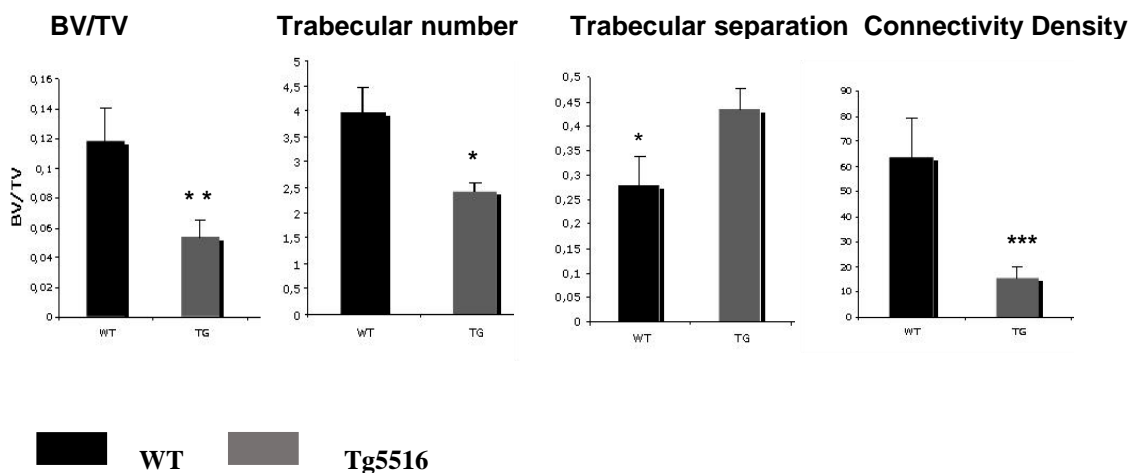
Εικόνα 3.8: Πρόοδος της οστικής απώλειας στο σπογγώδες οστό των Tg5516 ποντικών. Ιστολογική εκτίμηση της μορφολογίας της μετάφυσης της κεφαλής του μηριαίου σε διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5516 σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων, 2 μηνών και 3 μηνών αντίστοιχα. Χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης.

3.5.2 Ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με χρήση micro-CT

Η ποσοτική εκτίμηση που ακολούθησε με την χρήση microCT (μικρο-υπολογιστική τομογραφία) επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης στους απογόνους της σειράς Tg5516. Αφού απομονώθηκαν οστά στάλθηκαν στην ομάδα του συνεργάτη μας Dr Pierre Jurdic στη Λυών όπου έγινε ποσοτική ανάλυση της οστικής απώλειας με microCT. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες της αρχιτεκτονικής δομής του σπογγώδες οστού όπως ο όγκος του σπογγώδους (trabecular bone volume), ο αριθμός των οστικών δοκίδων (trabecular number), η πυκνότητα της σύνδεσης τους (connectivity density) στην διαμόρφωση του σπογγώδους πλέγματος και ο βαθμός διαχωρισμού τους (trabecular separation) σε αυξημένη οστική απορρόφηση τόσο στα Tg5516 διαγονιδιακά ποντίκια όσο και στα ποντίκια άγριου τύπου σε ηλικία 3 μηνών.

Η ποσοτική ανάλυση των παραγόντων της αρχιτεκτονικής δομής του σπογγώδους στους θηλυκούς απογόνους της σειράς Tg5516 ηλικίας 3 μηνών (Εικ. 3.9) ανέδειξε όχι μόνο την σταδιακή λέπτυνση, τον διαχωρισμό και την απώλεια των οστικών δοκίδων αλλά και την ολική διάτρηση του σπογγώδους οστού σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των οστικών δοκίδων μειώθηκε σε ποσοστό πάνω από 50% στους διαγονιδιακούς απογόνους της σειράς Tg5516 σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου ενώ ο βαθμός διαχωρισμού των οστικών δοκίδων ξεπέρασε το 180%.

Η ανάλυση του φλοιώδους οστού έδειξε ότι τα ποντίκια της διαγονιδιακής σειράς Tg5516 δεν διαφέρουν από τα άγριου τύπου ποντίκια ενώ κατά την ποσοτική εκτίμηση με micro-CT δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην δομή του και στα δύο φύλα της σειράς σε ηλικία 3 μηνών ^[122].

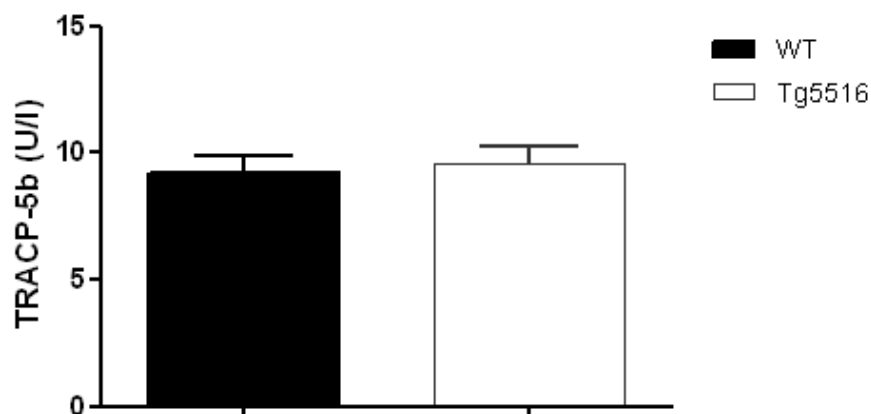


Εικόνα 3.9: Ποσοτική εκτίμηση με *microCT* της οστικής απώλειας στο σπογγώδες οστόν του μηριαίου των **Tg5516** διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια (n=6, θηλυκά). BV/TV (bone volume / total volume, %: κλάσμα όγκου σπογγώδους οστού), Tb.N (trabecular number per mm: αριθμός οστικών δοκίδων ανά mm), Tb.S (trabecular separation, mm: βαθμός διαχωρισμού των οστικών δοκίδων σε mm), Con.Dens. (connectivity density, mm³ : πυκνότητα σύνδεσης οστικών δοκίδων σε mm). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SE, **p*< 0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

3.5.3 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των **Tg5516** διαγονιδιακών ποντικών

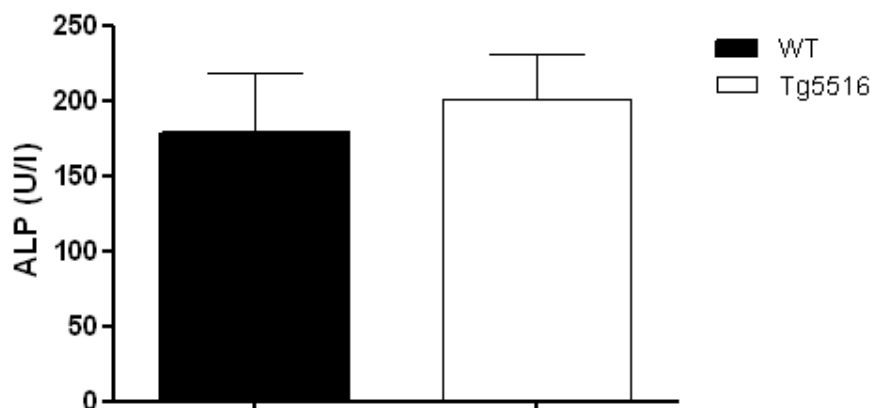
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής απώλειας στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών της σειράς **Tg5516** με τον ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του βιοχημικού δείκτη οστικής απώλειας TRACP-5b (tartrate-resistant acid phosphatase form 5b), καθώς και τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), δείκτη οστικής παραγωγής στον ορό ποντικών ηλικίας 3 μηνών.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του TRACP-5b, του κυριότερου βιοχημικού δείκτη οστικής απορρόφησης, στον ορό **Tg5516** διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τις τιμές του TRACP-5b στον ορό των ποντικών άγριου τύπου (Εικ. 3.10).



Εικόνα 3.10: Μέτρηση TRACP-5b στον ορό των ποντικών της σειράς Tg5516 (n=12) ηλικίας 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια WT (n=10). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SE, $p=0.6975$.

Η μέτρηση της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), που είναι δείκτης οστικής παραγωγής, στον ορό των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών, επίσης δεν έδειξε σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις τιμές της αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό των ποντικών άγριου τύπου (Εικ. 3.11).



Εικόνα 3.11: Μέτρηση αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό των ποντικών της σειράς Tg5516 (n=6) ηλικίας 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια WT (n=4). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SE, $p=0.662$.

3.5.4 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών και αιματολογικών παραμέτρων στον ορό και το αίμα των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών

Παράλληλα με τους δείκτες οστικής ανακατασκευής, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός μιας σειράς από βιοχημικούς δείκτες όπως γλυκόζη, κρεατινίνη, ασπαρτική τρανσαμινάση (SGOT-AST), τρανσαμινάση της αλανίνης (SGPT-ALT), ουρία, ολικές πρωτεΐνες, όξινη φωσφατάση, χοληστερίνη, φώσφορος, ολικό ασβέστιο ορού και ιονισμένο ασβέστιο (6 ποντίκια ανά ομάδα εκτός από την μέτρηση φωσφόρου και ασβεστίου όπου χρησιμοποιήθηκαν αν 12 ποντίκια ανά ομάδα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Βιοχημικοί Δείκτες	WT mice	Tg5516
Glucose (mg/dL)	301 ± 60,67	254,67 ± 35,046
Urea (mg/dL)	116,8 ± 10,3	112,67 ± 16,28
Cholesterol (mg/dL)	98,3 ± 15,2	83,33 ± 8,64
Creatinine (U/L)	0,403 ± 0,087	0,34 ± 0,11
AST (U/L)	251,67 ± 114,2	399,2 ± 259,86
ALT (U/L)	42,3 ± 10,54	70,4 ± 50,95
Ca total (mg/dL)	8,2 ± 0,18	8,78 ± 0,69
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	1,11 ± 0,02	1,13 ± 0,052
P (mg/dL)	7,4 ± 1,012	7,43 ± 1,27

Πίνακας 3.1 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5516. AST: Aspartate Aminotransferase (Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση), ALT: Alanine Aminotransferase (Αμινοτρανσφεράση Αλανίνης), P: Phosphorous (Φώσφορος), Ca: Calcium (Ασβέστιο ολικό), Ca⁺⁺: Ionized Calcium (Ιονισμένο ασβέστιο).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μια σειρά από αιματολογικές εξετάσεις με σκοπό να προσδιοριστούν οι διάφοροι κυτταρικοί υποπληθυσμοί όπως λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5516 καθώς και στα αγρίου τύπου ποντίκια ηλικίας 3 μηνών (6 ποντίκια ανά ομάδα). Συγκεκριμένα, η ανάλυση των Tg5516 διαγονιδιακών

ποντικών δεν έδειξε κάποια διαφορά σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια όσον αφορά τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στο αίμα όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.

Αιματολογικές παράμετροι	WT mice	Tg5516
WBCs ($10^3/\text{mm}^3$)	12,57 ± 3,092	11,40 ± 4,20
Lymphocytes (%)	29 ± 4,20	29,67 ± 5,85
Granulocytes (%)	65 ± 6,06	66,50 ± 6,32
RBCs ($10^6/\text{mm}^3$)	8,03 ± 0,316	7,98 ± 0,74
Hemoglobin (g/dl)	13,42 ± 0,45	13,46 ± 1,36
Hematocrit (%)	40,03 ± 1,165	39,58 ± 2,95
MCV (fl)	49,85 ± 1,39	49,65 ± 1,54
MCH (pg)	16,73 ± 0,59	16,83 ± 0,74
MCHC (g/dl)	33,50 ± 0,59	33,83 ± 11,13
RDW (%)	16,90 ± 0,65	16,53 ± 1,22
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	493 ± 85,95	442,33 ± 136,70
PCT (%)	0,40 ± 0,124	0,35 ± 0,10
MPV (μm^3)	7,98 ± 1,16	7,18 ± 0,84
PDW (μm^3)	8 ± 0,97	9,10 ± 3,60

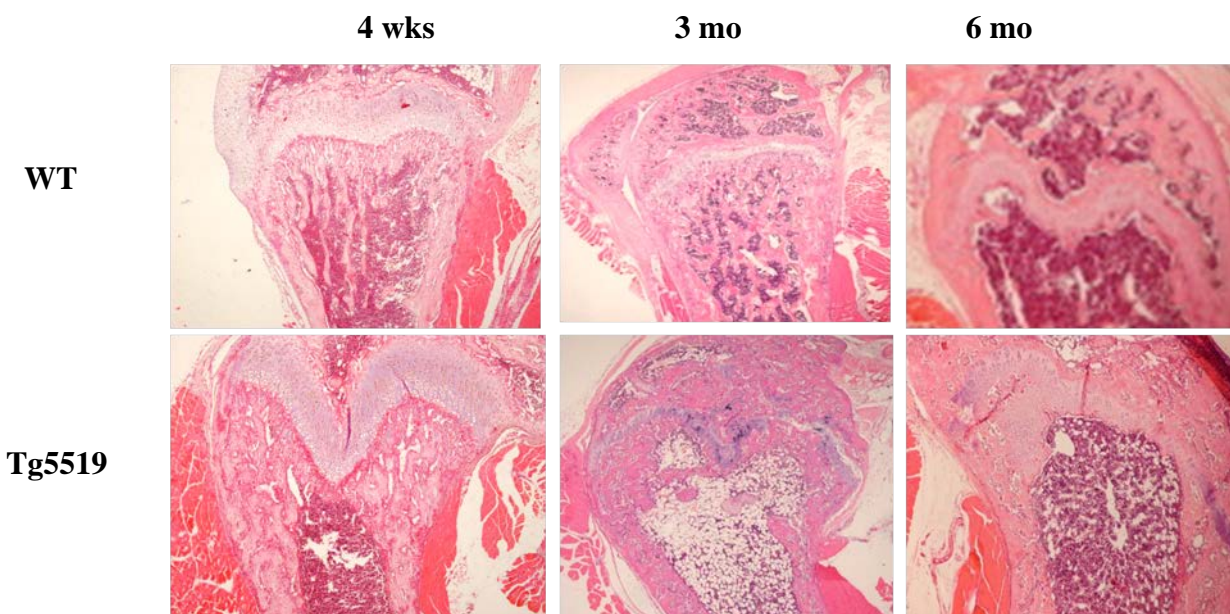
Πίνακας 3.2 Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5516. WBCs: White blood cells (Λευκά αιμοσφαίρια), RBCs: Red blood cells (Ερυθρά αιμοσφαίρια), MCV: Mean corpuscular volume (Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων), MCH: Mean hemoglobin volume (Μέση περιεκτικότητα ερυθροκυττάρου σε αιμοσφαιρίνη), MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration (Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης), RDW: Red cell distribution width (Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων), PCT: Platelet crit (Αιμοπεταλιοκρίτης), MPV: Mean platelet volume (Μέσος όγκος αιμοπεταλίων), PDW: Platelet distribution width (Εύρος κατανομής αιμοπεταλίων).

3.6 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5519

Η διαγονιδιακή σειρά Tg5519 φέρει μεγάλο αριθμό αντιγράφων του huRANKL διαγονιδίου και έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου RANKL. Κλινικά οι απόγονοι της διαγονιδιακής αυτής σειράς δεν διαφέρουν από τα άγριου τύπου ποντίκια.

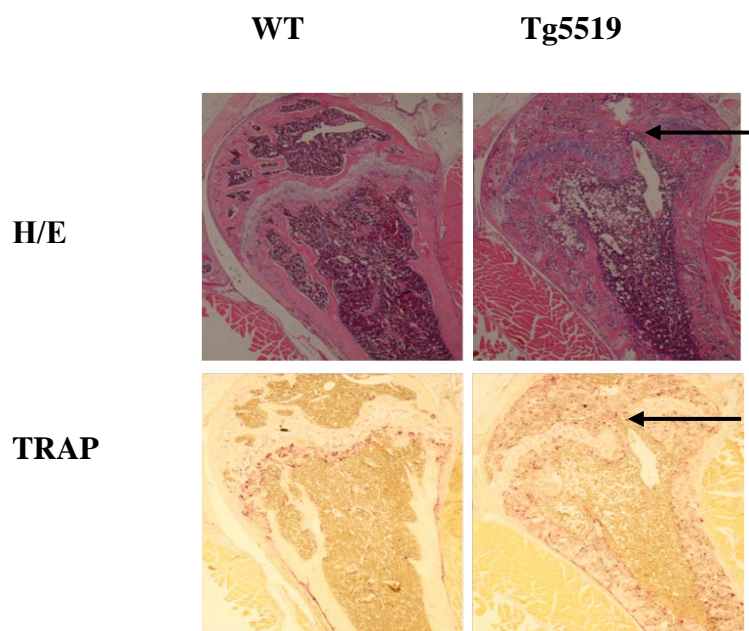
3.6.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5519

Η ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών έδειξε ότι η υπερέκφραση του huRANKL διαγονιδίου οδήγησε σε σοβαρή οστική απώλεια ήδη εγκατεστημένη από τον πρώτο μήνα ζωής σε ποντίκια και των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, οι μεταφύσεις τόσο του μηριαίου όσο και της κνήμης παρουσίασαν οστεοπορωτική δομή στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 4 εβδομάδων και 3 μηνών αντίστοιχα (Εικ. 3.12) σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Η έντονη οστική απώλεια σε συνδυασμό με την διάτρηση του σπογγώδους οστού είχε σαν αποτελέσματα την πλήρη εξάλειψη του στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς σε ηλικία 3 μηνών και κατά συνέπεια την αδυναμία ποσοτικής του εκτίμησης με την χρήση micro-CT.



Εικόνα 3.12 Οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό των Tg5519 ποντικών. Ιστολογική εκτίμηση της μορφολογίας της μετάφυσης του μηριαίου οστού διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519 σε σχέση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων, 3 μηνών και 6 μηνών αντίστοιχα. Χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης.

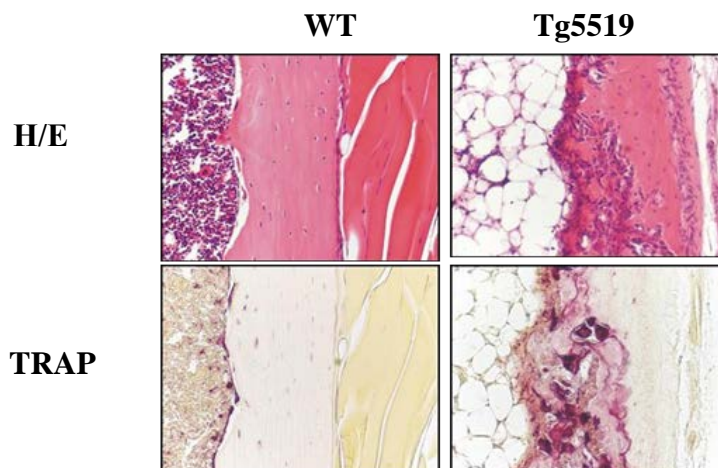
Εκτός από την έντονη οστική απώλεια στο σπογγώδες οστόν στην περιοχή της μετάφυσης του ισχίου των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών, παρατηρήθηκε καταστροφή της συνέχειας της αυξητικής πλάκας ήδη από την ηλικία των 3 μηνών (Εικ. 3.13) που σταδιακά επεκτείνεται καθώς η ηλικία προχωρά ^[122]. Παράλληλα, η χρώση με την ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), που βάφει αποκλειστικά τους οστεοκλάστες δείχνει έντονη οστεοκλαστογένεση στο μηριαίο οστών των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών (Εικόνα 3.13).



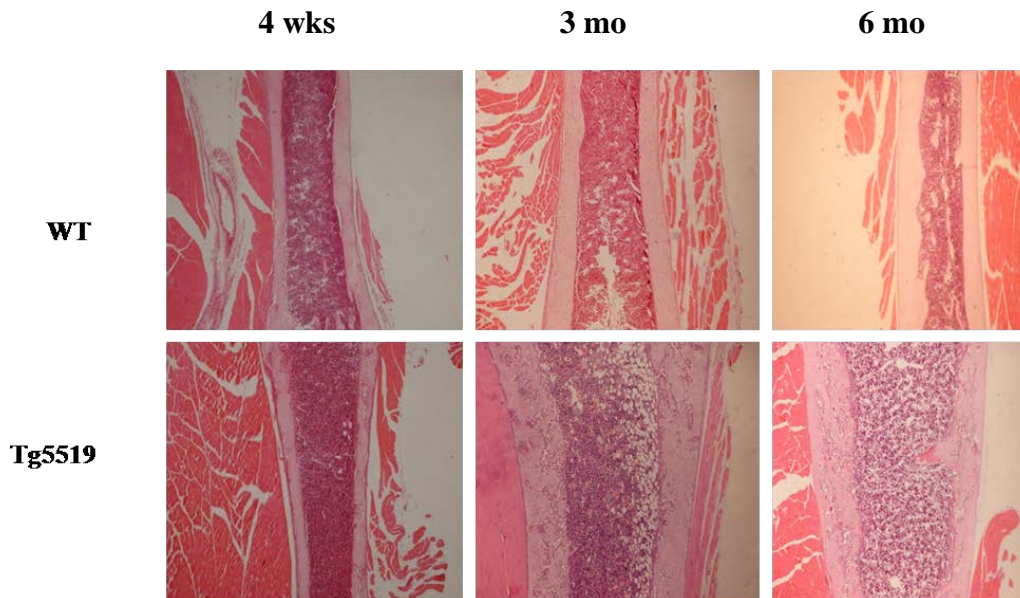
Εικόνα 3.13 Καταστροφή της συνέχειας της αυξητικής πλάκας του μηριαίου οστού στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 3 μηνών. Σειριακές τομές της μεταφυσιακής περιοχής του μηριαίου οστού στα Tg5519 διαγονιδιακά ποντίκια σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια. Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη και TRAP. Η λύση της αυξητικής πλάκας σημειώνεται με βέλη.

Η ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών ανέδειξε έντονη οστική απώλεια και στο φλοιώδες οστόν το οποίο έχει αποκτήσει πορώδη δομή (cortical porosity) στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 3 μηνών. Η έντονη οστική απώλεια στο φλοιώδες οστόν οφείλεται στην ύπαρξη πολυάριθμων και μεγάλων οστεοκλαστών όπως προκύπτει από την χρώση με την ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), που βάφει αποκλειστικά τους οστεοκλάστες. (Εικ.

3.14). Ενώ στην περιοχή της διάφυση στα άγριου τύπου ποντίκια οι οστεοκλάστες εντοπίζονται στην επιφάνεια του οστού, στα οστά των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών εντοπίζονται στο εσωτερικό του με την μορφή πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων. Η παρουσία μεγάλων και πολυάριθμων οστεοκλαστών εσωτερικά στο φλοιώδες υποδηλώνει έντονο ρυθμό οστικής ανακατασκευής με συνέπεια αυξημένη οστική απορρόφηση και διάβρωση που οδηγεί σταδιακά σε λύση της οστικής συνέχειας του φλοιώδους και εμφάνιση της πορώδους δομής (cortical porosity). Η σοβαρή οστική απώλεια που παρατηρήθηκε στο φλοιώδες οστού με την χαρακτηριστική πορώδη δομή στα μακρά οστά των διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519 εντάθηκε προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 3.15). Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η κυτταροβρίθεια των λιποκυττάρων στο μυελό των οστών των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών, που είναι εμφανής ήδη από την ηλικία των 3 μηνών.

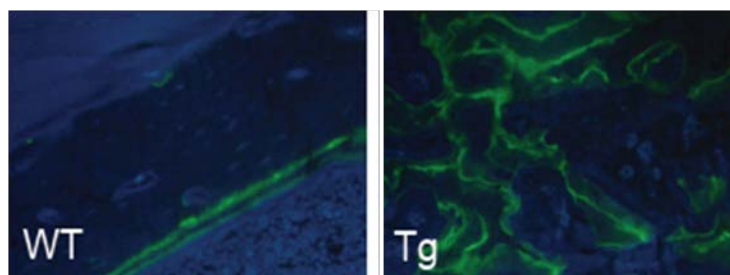


Εικόνα 3.14 Πορώδης δομή στο φλοιώδες του μηριαίου οστού των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών. Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη σειριακών τομών του φλοιώδους οστού αποκαλύπτει την πορώδη δομή του φλοιώδους (cortical porosity), ενώ η χρώση με TRAP αναδεικνύει την έντονη οστεοκλαστογενέση στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια.



Εικόνα 3.15. Πρόοδος της οστικής απώλειας στο φλοιώδες οστού των Tg5519 ποντικών. Ιστολογική ανάλυση της διάφυσης του μηριαίου οστού σε διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε σχέση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων, 3 μηνών και 6 μηνών αντίστοιχα. Παρατηρείται αυξημένη παρουσία λιποκυττάρων στο μυελό των οστών των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών ήδη από την ηλικία των 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης.

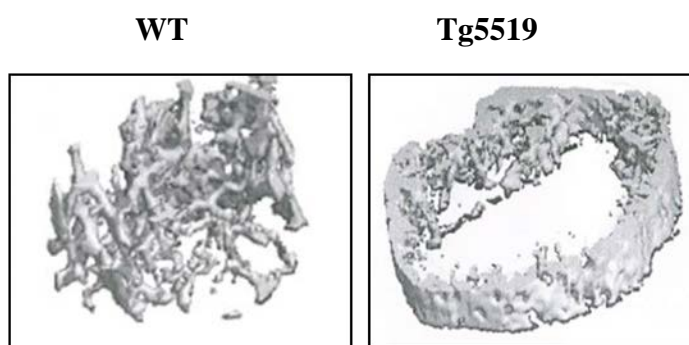
Τέλος, έπειτα από χορήγηση καλσεΐνης στα Tg5519 διαγονιδιακά ποντίκια παρατηρήθηκε ο σχηματισμός νέου οστού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.16, παρατηρείται έντονη σύνθεση νέου οστού στο εσωτερικό του φλοιώδους οστού της διάφυσης του μηριαίου οστού στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 ηλικίας 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια.



Εικόνα 3.16 Σχηματισμός νέου οστού στο φλοιώδες των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών. Αύξηση της ενσωμάτωσης της καλσεΐνης στο φλοιώδες οστό της διάφυσης του μηριαίου των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών ηλικίας 3 μηνών σε σύγκριση με τα άγριου τύπου WT ποντίκια.

3.6.2 Εκτίμηση της οστικής απώλειας με χρήση micro-CT

Η ποσοτική εκτίμηση που ακολούθησε με την χρήση micro-CT επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης στους απογόνους της σειράς Tg5519. Τα διαβρωτικά φαινόμενα δεν περιορίζονται σε σταδιακή λέπτυνση, διαχωρισμό και απώλεια συνεκτικότητας των οστικών δοκίδων αλλά σε ολική διάτρηση και πλήρη απώλεια του σπογγώδους οστού στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια (Εικ. 3.17). Λόγω της έντονης οστικής απώλειας στο σπογγώδες δεν ήταν εφικτό να γίνει ποσοτικοποίηση με micro-CT. Η επαγόμενη οστική παραγωγή φαίνεται ότι δεν μπορεί να επιδιορθώσει την οστική αυτή βλάβη αφού η επιφάνεια στην οποία θα έπρεπε να συντελείται έχει καταστραφεί.

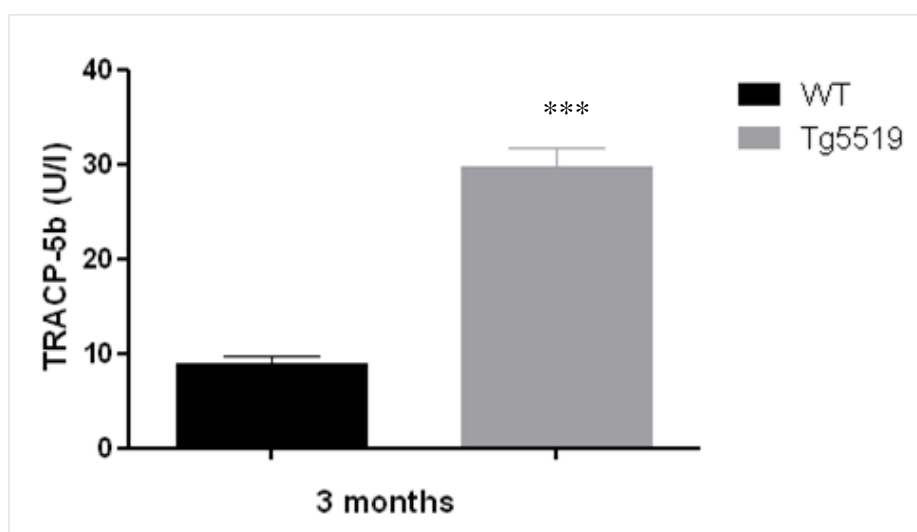


Εικόνα 3.17 Η ανάλυση με micro-CT αναδεικνύει την χαρακτηριστική δομή του σπογγώδους σε άγριου τύπου (WT) ποντίκια και την καταστροφή του στην διαγονιδιακή σειρά Tg5519.

3.6.3 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών

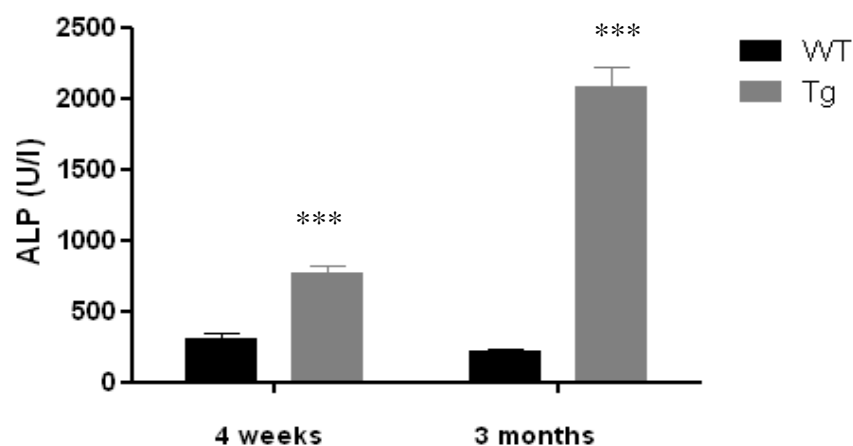
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519 με τον σοβαρό οστεοπορωτικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του βιοχημικού δείκτη οστικής απώλειας TRACP-5b (tartrate-resistant acid phosphatase form 5b), καθώς και τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), δείκτη οστικής παραγωγής, στον ορό των Tg5519 ποντικών ηλικίας 3 μηνών.

Η μέτρηση των βιοχημικών δεικτών οστικής ανακατασκευής στον ορό των απογόνων της διαγονιδιακής σειράς Tg5519 παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Συγκεκριμένα, η μέτρηση της συγκέντρωσης του TRACP-5b στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών έδειξε δραματική αύξηση των επιπέδων του αντανακλώντας την σοβαρή οστική απώλεια (Εικ. 3.18).



Εικόνα 3.18 Αύξηση του δείκτη οστικής απώλειας TRACP-5b στον ορό των Tg5519 ποντικών. Μέτρηση TRACP-5b στον ορό των Tg5519 ποντικών σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου (WT) ηλικίας 3 μηνών (n=12 ανά ομάδα). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SE, *** $p \leq 0.0001$.

Η μέτρηση των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών έδειξε επίσης, σημαντική αύξηση των επιπέδων της αντανακλώντας τον αυξημένο ρυθμό οστικής παραγωγής τόσο σε ηλικία 4 εβδομάδων με την πρώιμη εγκατάσταση της οστικής απώλειας όσο και σε ηλικία 3 μηνών (Εικ. 3.19).



Εικόνα 3.19 Αύξηση του δείκτη οστικής παραγωγής αλκαλική φωσφατάση (ALP) στον ορό των Tg5519 ποντικών. Μέτρηση των επιπέδων αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό των Tg5519 ποντικών σε ηλικία 4 εβδομάδων και 3 μηνών αντίστοιχα σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια (n=6 ανά ομάδα). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SE, *** $p \leq 0.0001$.

3.6.4 Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών και αιματολογικών παραμέτρων στον ορό και το αίμα των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών

Παράλληλα με τους δείκτες οστικής ανακατασκευής, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός μιας σειράς από βιοχημικούς δείκτες όπως γλυκόζη, κρεατινίνη, ασπαρτική τρανσαμινάση (SGOT-AST), τρανσαμινάση της αλανίνης (SGPT-ALT), ουρία, ολικές πρωτεΐνες, όξινη φωσφατάση, χοληστερίνη, φώσφορος, ολικό ασβέστιο ορού και ιονισμένο ασβέστιο (6 ποντίκια ανά ομάδα εκτός από την μέτρηση φωσφόρου και ασβεστίου όπου χρησιμοποιήθηκαν 12 ποντίκια ανά ομάδα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Πέρα από τον σοβαρό οστεοπορωτικό φαινότυπο τα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου όσον τους βιοχημικούς δείκτες.

Βιοχημικοί Δείκτες	WT mice	Tg5519
Glucose (mg/dL)	301 ± 60,67	302 ± 56,28
Urea (mg/dL)	116,8 ± 10,3	114 ± 11,93
Cholesterol (mg/dL)	98,3 ± 15,2	91,66 ± 23,57
Creatinine (U/L)	0,403 ± 0,087	0,39 ± 0,043
AST (U/L)	251,67 ± 114,2	241,5 ± 52,97
ALT (U/L)	42,3 ± 10,54	40,4 ± 17,3
Ca total (mg/dL)	8,2 ± 0,18	8,83 ± 0,32
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	1,11 ± 0,02	1,12 ± 0,04
P (mg/dL)	7,4 ± 1,012	7,48 ± 1,59

Πίνακας 3.3 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό των Tg α h α RANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519. AST: Aspartate Aminotransferase (Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση), ALT: Alanine Aminotransferase (Αμινοτρανσφεράση Αλανίνης), P: Phosphorous (Φώσφορος), Ca: Calcium (Ασβέστιο ολικό), Ca⁺⁺: Ionized Calcium (Ιονισμένο ασβέστιο).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μια σειρά από αιματολογικές εξετάσεις με σκοπό να προσδιοριστούν οι διάφοροι κυτταρικοί υποπληθυσμοί όπως λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 καθώς και στα αγρίου τύπου ποντίκια ηλικίας 3 μηνών (6 ποντίκια ανά ομάδα). Συγκεκριμένα, η ανάλυση των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών δεν έδειξε κάποια διαφορά σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια όσον αφορά τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στο αίμα όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4.

Αιματολογικές Παράμετροι	WT mice	Tg5519
WBCs ($10^3/\text{mm}^3$)	12,57 \pm 3,092	12,15 \pm 4,14
Lymphocytes (%)	29 \pm 4,20	29,67 \pm 7,60
Granulocytes (%)	65 \pm 6,06	65,5 \pm 9,42
RBCs ($10^6/\text{mm}^3$)	8,03 \pm 0,316	7,94 \pm 0,14
Hemoglobin (g/dl)	13,42 \pm 0,45	13,20 \pm 0,27
Hematocrit (%)	40,03 \pm 1,165	39,13 \pm 0,67
MCV (fl)	49,85 \pm 1,39	49,28 \pm 0,51
MCH (pg)	16,73 \pm 0,59	16,61 \pm 0,26
MCHC (g/dl)	33,50 \pm 0,59	33,73 \pm 0,31
RDW (%)	16,90 \pm 0,65	16,83 \pm 0,43
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	493 \pm 85,95	500,83 \pm 59,43
PCT (%)	0,40 \pm 0,124	0,367 \pm 0,09
MPV (μm^3)	7,98 \pm 1,16	7,28 \pm 1,24
PDW (μm^3)	8 \pm 0,97	7,93 \pm 0,50

Πίνακας 3.4 Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων στον ορό των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519. WBCs: White blood cells (Λευκά αιμοσφαίρια), RBCs: Red blood cells (Ερυθρά αιμοσφαίρια), MCV: Mean corpuscular volume (Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων), MCH: Mean hemoglobin volume (Μέση περιεκτικότητα ερυθροκυττάρου σε αιμοσφαιρίνη), MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration (Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης), RDW: Red cell distribution width (Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων), PCT: Platelet crit (Αιμοπεταλιοκρίτης), MPV: Mean platelet volume (Μέσος όγκος αιμοπεταλίων), PDW: Platelet distribution width (Εύρος κατανομής αιμοπεταλίων).

3.7 Φαινοτυπική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5520

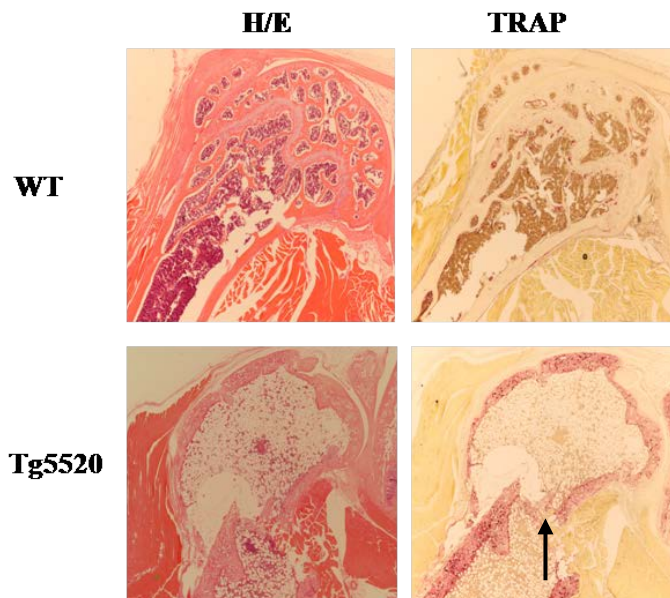
Ο «ιδρυτής» της σειράς Tg5520 με μεγάλο αριθμό αντιγράφων και την υψηλότερη έκφραση του διαγονιδίου εμφάνισε έναν σοβαρό οστεοπορωτικό σκελετικό φαινότυπο χαρακτηριζόμενο από έντονη κύφωση, περιορισμένη κινητικότητα και παραμόρφωση των κάτω άκρων. Λόγω της σοβαρότητας του φαινοτύπου η συγκεκριμένη σειρά δεν μπόρεσε να αναπαραχθεί και να δώσει απογόνους. Ο «ιδρυτής» της σειράς θυσιάστηκε οκτώ μήνες μετά την γέννηση του και η νεκροψία που ακολούθησε επιβεβαίωσε την παρουσία εκτεταμένου αιματώματος τόσο στα πίσω άκρα όσο και στα οστά του κρανίου. Χαρακτηριστική ήταν η ύπαρξη πολλαπλών αυτόματων καταγμάτων σε όλο τον σκελετό με εντυπωσιακότερα τα κατάγματα στις αμφότερες κεφαλές των ισχίων. Η εικόνα μιας άμορφης μάζας μαλακών μορίων και οστών επέβαλε την περαιτέρω ιστοπαθολογική ανάλυση.

3.7.1 Ιστοπαθολογική ανάλυση της διαγονιδιακής σειράς Tg5520

Η ιστοπαθολογική ανάλυση στην περιοχή της μετάφυσης των μακρών οστών ανέδειξε την παρουσία μεγάλου αριθμού οστεοκλαστών και εκτεταμένη οστική καταστροφή στην περιοχή της αυξητικής πλάκας, στο φλοιώδες και στο σπογγώδες οστό που οφείλεται σε αυξημένη οστική απορρόφηση λόγω της παρουσίας του μεγάλου αριθμού οστεοκλαστών. Για την παρατήρηση των τομών που πάρθηκαν από την περιοχή της μετάφυσης του μηριαίου των ποντικών πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη καθώς και χρώση με την ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), που βάφει αποκλειστικά τους οστεοκλάστες. Η μελέτη της αρχιτεκτονικής δομής της σπογγώδους περιοχής του μηριαίου στον «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 που υπερεκφράζει το γονίδιο huRANKL, αποκαλύπτει καταστροφή της αυξητικής πλάκας και απουσία του σπογγώδους οστού (Εικ. 3.20). Η εικόνα αυτή αντιπαραβάλλεται με την εικόνα της κεφαλής του μηριαίου στα άγριου τύπου ποντίκια όπου διακρίνεται η ύπαρξη ισχυρής συνεκτικότητας μεταξύ των οστικών δοκίδων του σπογγώδους, οι οποίες σχηματίζουν ένα καλά οργανωμένο και συμπαγές δίκτυο.

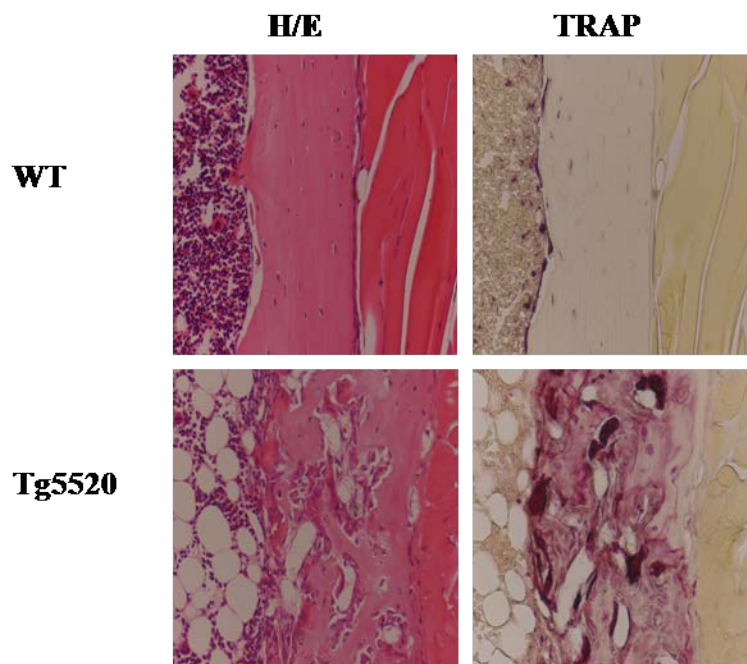
Η διάβρωση επεκτείνεται μέχρι το φλοιώδες οστό με συνέπεια την «λύση» της οστικής συνέχειας και την πρόκληση κατάγματος (Εικ. 3.20). Η διάτρηση του

φλοιώδους οστού έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της μηχανικής αντοχής σε διάφορες φορτίσεις και μπορεί να οδηγήσει σε κάταγμα, που είναι το κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα των οστεοπορωτικών οστών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.



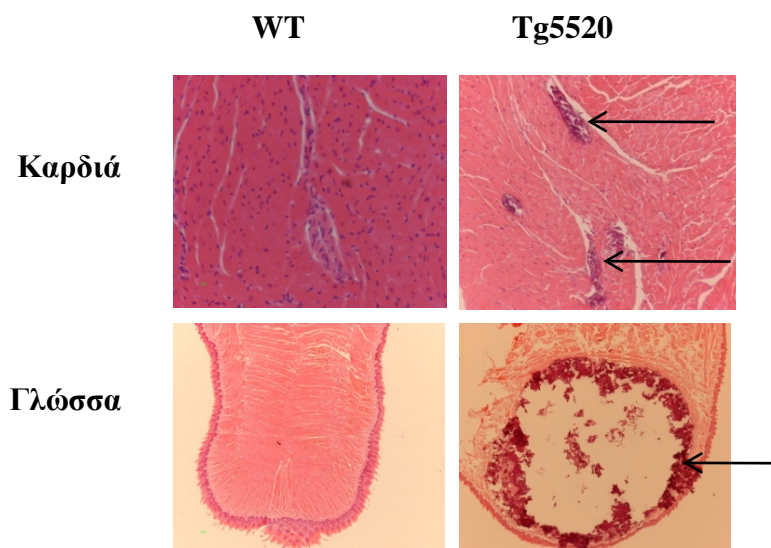
Εικόνα 3.20 Ιστολογική ανάλυση στο μηριαίο της διαγονιδιακής σειράς Tg5520. Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (H/E) και TRAP σε σειριακές τομές της μετάφυσης του μηριαίου (distal femur) του «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 και άγριου τύπου (WT) ποντικών ηλικίας 8 μηνών. Παρατηρείται καταστροφή της αυξητικής πλάκας, πλήρης απουσία σπογγώδους οστού ενώ είναι εντυπωσιακή η παρουσία κατάγματος (βέλος).

Η οστική απώλεια που παρατηρείται στο φλοιώδες οστόν του «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 με την υψηλότερη έκφραση του διαγονιδίου huRANKL οφείλεται στην ύπαρξη πολυάριθμων και μεγάλων οστεοκλαστών στο εσωτερικό του φλοιώδους όπως προκύπτει από την χρώση με TRAP (Εικ. 3.21). Συνεπώς, ο ιδρυτής Tg5520 εμφανίζει πορώδη δομή στο φλοιώδες και αύξηση της λιπογένεσης στον μυελό των οστών όπως στα Tg5519 ποντίκια.



Εικόνα 3.21 Παρουσία πολυάριθμων οστεοκλαστών στο εσωτερικό του φλοιώδους του μηριαίου, πορώδης δομή και αυξημένη λιπογένεση στον μυελό των οστών του Tg5520 ιδρυτή σε σύγκριση με τα άγριου τύπου (WT) ποντίκια. Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (H/E) και TRAP σε σειριακές τομές της διάφυσης του μηριαίου.

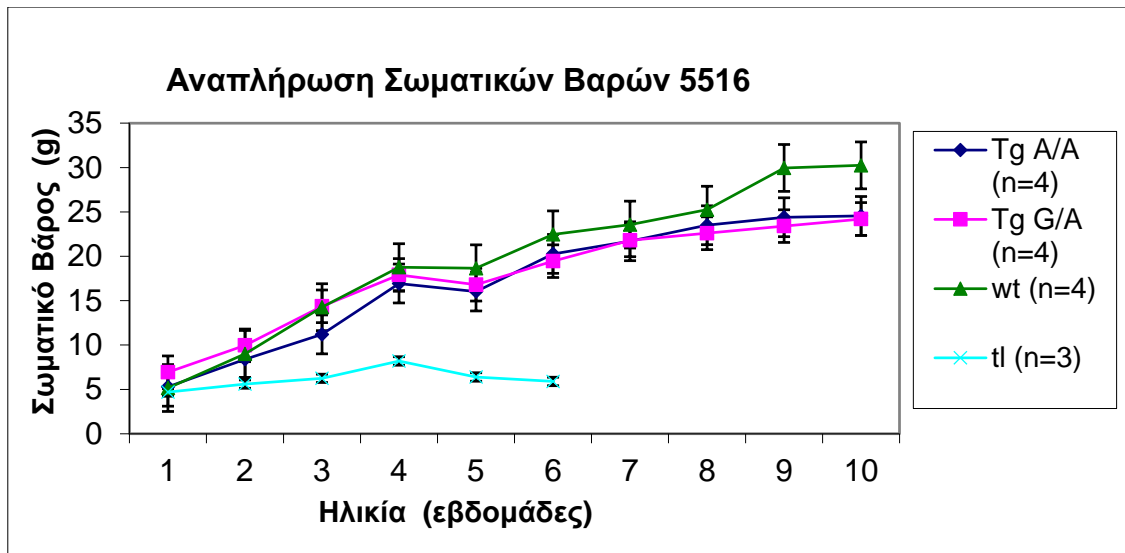
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκτοπη ασβεστοποίηση που παρατηρήθηκε στους μαλακούς ιστούς του «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Για την παρατήρηση των τομών που πάρθηκαν από τους μαλακούς ιστούς της καρδιάς και της γλώσσας τόσο από τον «ιδρυτή» της σειράς όσο και από ποντίκια άγριου τύπου, πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη (Εικ. 3.22). Η μικροσκοπική παρατήρηση ανέδειξε την ύπαρξη οζώδους ασβεστοποίησης στον συνδετικό ιστό της καρδιάς και διάχυτη ασβεστοποίηση περιμετρικά της γλώσσας στις τομές της σειράς Tg5520 ενώ φυσιολογική ήταν η δομή και η σύσταση των μαλακών ιστών στα άγριου τύπου ποντίκια. Η έκτοπη ασβεστοποίηση χαρακτηρίζεται από εναπόθεση αδιάλυτων αλάτων με την μορφή οζιδίων (υδροξυαπατίτου) στους ιστούς. Η έκτοπη ασβεστοποίηση μπορεί να οφείλεται είτε σε ιστική αλλοίωση είτε σε διαταραχή του μεταβολισμού του ασβεστίου και του φωσφόρου και την εναπόθεσή τους στους μαλακούς ιστούς λόγω αυξημένης οστικής ανακατασκευής.



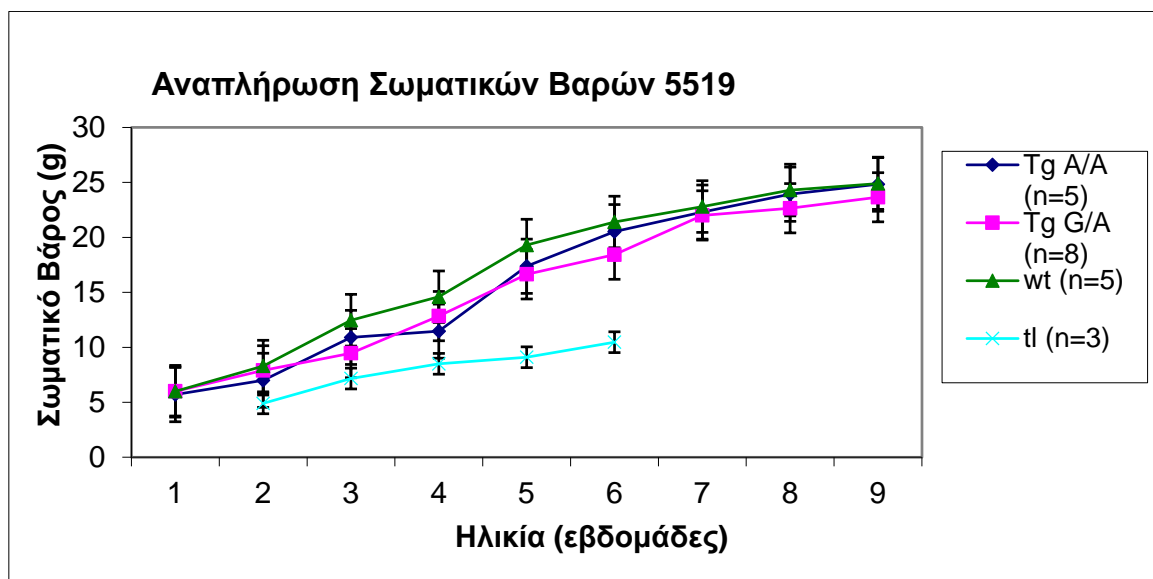
Εικόνα 3.22 Έκτοπη ασβεστοποίηση σε σειριακές τομές της καρδιάς και της γλώσσας από τον «ιδρυτή» της σειράς Tg5520 σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη.

3.8 Γενετική διάσωση της RANKL-επαγόμενης οστεοπέτρωσης από την παρουσία του διαγονιδίου huRANKL

Τα οστεοπετρωτικά ποντίκια $RANKL^{tles/tles}$ που δημιουργήθηκαν από την ομάδα της Δρ Ελένης Ντούνη, φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του RANKL που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης RANKL. Πιο συγκεκριμένα, τα οστεοπετρωτικά ποντίκια παρουσιάζουν υποπλασία του θύμου αδένα, αδυναμία έκφυσης δοντιών, καθυστερημένη σωματική ανάπτυξη και απώλεια περιφερικών λεμφαδένων. Τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το γονίδιο του ανθρώπινου RANKL σε πειράματα γενετικής διάσωσης, για να ελεγχθεί εάν είναι δυνατή η αναστολή της οστεοπέτρωσης παρουσία του ανθρώπινου RANKL διαγονιδίου. Τα οστεοπετρωτικά ποντίκια διασταυρώθηκαν τόσο με τους διαγονιδιακούς απογόνους της σειράς Tg5516 με την ηπιότερη έκφραση του RANKL όσο και με διαγονιδιακούς απογόνους της σειράς Tg5519 με την υψηλότερη έκφραση του διαγονιδίου. Όλοι οι απόγονοι που προήλθαν από αυτή την διασταύρωση παρουσίασαν αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου, δείχνοντας ότι η διαγονιδιακή πρωτεΐνη huRANKL είναι πλήρως λειτουργική στα ποντίκια. Παρουσία του huRANKL διαγονιδίου, τα $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια παρουσίασαν φυσιολογική ανάπτυξη και αύξηση του σωματικού τους βάρους (Εικ. 3.23 και Εικ. 3.24).

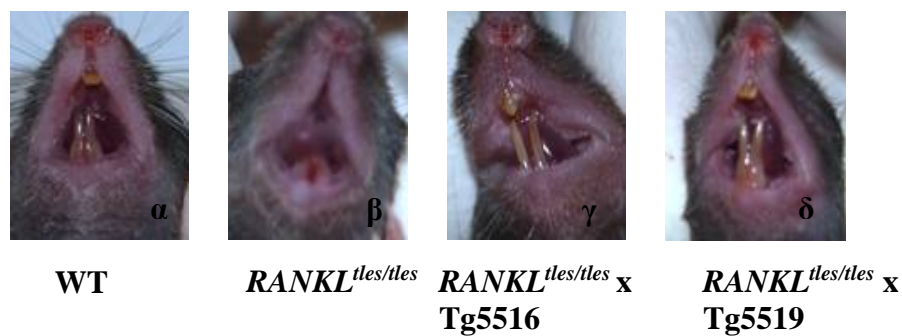


Εικόνα 3.23 Διάσωση της φυσιολογικής ανάπτυξης στα $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια με την έκφραση του huRANKL στα Tg5516 ποντίκια. Τα Tg5516/ $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια που προήλθαν από την διασταύρωση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικίων με τα $RANKL$ οστεοπετρωτικά ποντίκια (tl), παρουσίασαν αύξηση του σωματικού τους βάρους σε σύγκριση με τα οστεοπετρωτικά ποντίκια $RANKL^{tles/tles}$ δείχνοντας ότι το διαγονίδιο huRANKL αναστέλλει την οστεοπέτρηση, WT: άγριου τύπου ποντίκια (n, αριθμός ποντικών ανά ομάδα).



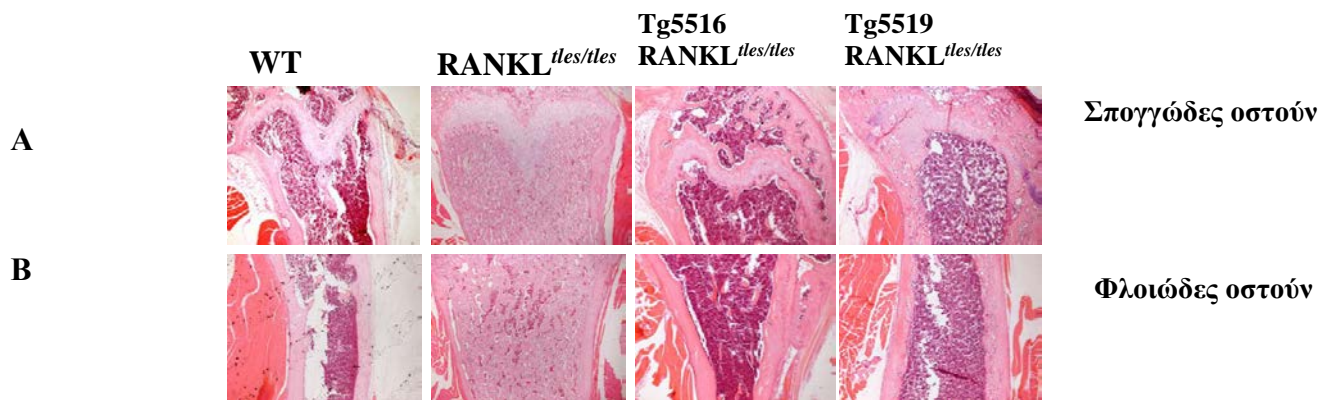
Εικόνα 3.24 Διάσωση της φυσιολογικής ανάπτυξης στα $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια με την έκφραση του huRANKL στα Tg5519 ποντίκια. Τα Tg5519/ $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια που προήλθαν από την διασταύρωση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικίων με τα $RANKL$ οστεοπετρωτικά ποντίκια (tl), παρουσίασαν αύξηση του σωματικού τους βάρους σε σύγκριση με τα οστεοπετρωτικά ποντίκια $RANKL^{tles/tles}$ δείχνοντας ότι το διαγονίδιο huRANKL αναστέλλει την οστεοπέτρηση, WT: άγριου τύπου ποντίκια (n, αριθμός ποντικών ανά ομάδα).

Επιπλέον, οι απόγονοι Tg5516/RANKL^{tes/tes} που προήλθαν από την διασταύρωση των RANKL^{tes/tes} με τους διαγονιδιακούς απογόνους της σειράς Tg5516 παρουσίασαν μερική έκφυση δοντιών (Εικ. 3.25) ενώ οι απόγονοι Tg5519/RANKL^{tes/tes} που προήλθαν από την διασταύρωση με τους διαγονιδιακούς απογόνους της σειράς Tg5519 παρουσίασαν πλήρη έκφυση δοντιών (Εικ. 3.26). Η μερική έκφυση των δοντιών που παρατηρήθηκε στους Tg5516/RANKL^{tes/tes} απογόνους δείχνει ότι η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 με το χαμηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου huRANKL δεν μπόρεσε να κάνει πλήρη αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου. Αντίθετα, η πλήρης έκφυση δοντιών στους απογόνους Tg5519/RANKL^{tes/tes} δείχνει ότι η σειρά Tg5519 με τον υψηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου huRANKL μπόρεσε πλήρως να αναστείλλει τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο.



Εικόνα 3.25 Αναστολή οστεοπετρωτικού φαινοτύπου με την μερική έκφυση δοντιών στα Tg5516/RANKL^{tes/tes} ή την πλήρη έκφυση δοντιών στα Tg5519/RANKL^{tes/tes} ποντίκια, WT: άγριου τύπου ποντίκια, RANKL^{tes/tes} : οστεοπετρωτικά ποντίκια.

Η αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου επιβεβαιώνεται, τέλος, και από την ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών των TgRANKL^{tes/tes} ποντικιών. Στα οστεοπετρωτικά ποντίκια παρατηρείται γενικευμένη οστεοσκλήρυνση, με την εικόνα του «οστού μέσα στο οστό». Η μυελική κοιλότητα διακρίνεται πολύ δύσκολα καθώς γεμίζει με νέο οστό, λόγω έλλειψης οστεοκλαστών ικανών να ξεκινήσουν την διαδικασία οστικής απορρόφησης. Στα ποντίκια που προήλθαν από την διασταύρωση των RANKL^{tes/tes} με τα διαγονιδιακά ποντίκια των σειρών Tg5516 και Tg5519 διακρίνεται καθαρά η μυελική κοιλότητα ενώ είναι ευδιάκριτες οι περιοχές που αντιστοιχούν στο σπογγώδες οστό (Εικ. 3.26A) με την χαρακτηριστική αρχιτεκτονική του και στο φλοιώδες (Εικ. 3.26B).



Εικόνα 3.26 Διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου με αποκατάσταση της κοιλότητας του μυελού των οστών ενώ είναι ευδιάκριτα το σπογγώδες (A) και φλοιώδες (B) οστόν. Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη των μακρών οστών των WT: άγριου τύπου ποντικών, RANKL^{tes/tes}, Tg5516/RANKL^{tes/tes} και Tg5519/RANKL^{tes/tes} ποντικών αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα και το πρότυπο έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου στις διάφορες διαγονιδιακές σειρές είναι ικανά να αναστείλλουν τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο των RANKL^{tes/tes} ποντικών. Η αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου αποδεικνύει και επιβεβαιώνει ότι το huRANKL διαγονίδιο είναι πλήρως ενεργό στα ποντίκια ενώ επάγεται πλήρης ενεργοποίηση του υποδοχέα του ενδογενούς γονιδίου RANKL (muRANKL).

3.9 Προκλινικές δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών στα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια

Για να εξετασθεί εάν τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια αποτελούν ιδανικά εργαλεία κατάλληλα για την αξιολόγηση νέων αναστολέων της οστικής απορρόφησης επιλέχθηκε η χορήγηση γνωστών φαρμάκων έναντι της οστεοπόρωσης όπως είναι τα διφωσφωνικά. Τα διφωσφωνικά θεωρούνται φάρμακα πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Τα νεότερης γενιάς διφωσφωνικά (αμινοδιφωσφωνικά) αναστέλλουν την αυξημένη αποδόμηση και απώλεια ασβεστίου από τα οστά που παρατηρείται σε ασθενείς με αυξημένη οστική απορρόφηση. Η αντιοστεοκλαστική δράση των διφωσφωνικών αφορά τις μεταβολές στην λειτουργία, την διαφοροποίηση και την απορροφητική ικανότητα των οστοκλαστών με τελικό τόχο την απόπτωση τους επιβραδύνοντας τον ρυθμό της οστικής ανακατασκευής. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι καταστέλλουν την οστική εναλλαγή (ρυθμός μεταβολισμού), αυξάνουν την οστική μάζα και αντοχή και μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων συμπεριλαμβανομένων και αυτών του ισχίου.

Στην συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η χορήγηση αλενδρονάτης τόσο στην διαγονιδιακή σειρά Tg5516 με τον χαμηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου huRANKL και τον ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο όσο και στην σειρά Tg5519 που φέρει μεγάλο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου και εμφανίζει σοβαρό οστεοπορωτικό φαινότυπο. Η αλενδρονάτη είναι ισχυρό αμινοδιφωσφωνικό με δυνατότητα σημαντικής αύξησης της οστικής μάζας σε ολόκληρο τον σκελετό και μείωσης του κινδύνου καταγμάτων ισχίου και σπονδυλικής στήλης. Η χορήγηση αλενδρονάτης βελτιώνει την αρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα ομοιόμορφη μετάλλωση. Η αλενδρονάτη στην δόση των 10mg/ημέρα χρησιμοποιείται για την θεραπεία ασθενών με ήδη εγκατεστημένη οστεοπόρωση.

Στην συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η χορήγηση αλενδρονάτης στην διαγονιδιακή σειρά Tg5516 που παρουσιάζει ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο. Τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε η αλενδρονάτη χωρίσθηκαν σε 4 ομάδες :

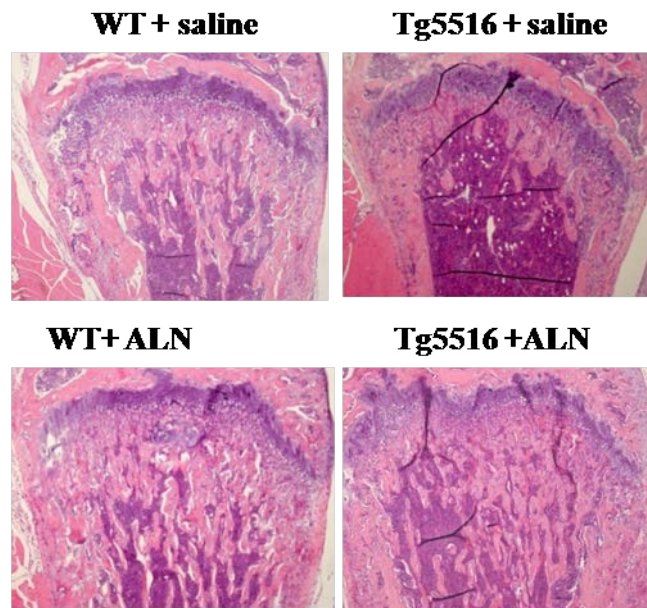
- α. Ζώα άγριου τύπου στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός
- β. Ζώα άγριου τύπου στα οποία χορηγήθηκε αλενδρονάτη 1mg/Kg σωματικού βάρους
- γ. Διαγονιδιακά ζώα στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός
- δ. Διαγονιδιακά ζώα στα οποία χορηγήθηκε αλενδρονάτη 1mg/Kg σωματικού βάρους

Οι δύο πρώτες ομάδες αποτέλεσαν τις ομάδες ελέγχου. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ποντίκια άγριου τύπου (5 με φυσιολογικό ορό, εκ των οποίων 3 θηλυκά και 2 αρσενικά και 5 με αλενδρονάτη, εκ των οποίων 3 θηλυκά και 2 αρσενικά) και 10 διαγονιδιακά ποντίκια (5 με φυσιολογικό ορό - 3 αρσενικά και 2 θηλυκά και 5 με αλενδρονάτη- 3 θηλυκά και 2 αρσενικά). Η χορήγηση του φαρμάκου σε όλα τα ποντίκια ξεκίνησε ταυτόχρονα σε ηλικία 3 εβδομάδων και ολοκληρώθηκε σε ηλικία 2 μηνών όπου και στις δύο διαγονιδιακές σειρές υπάρχει έντονη οστική απώλεια.

Η δόση της αλενδρονάτης που επιλέχθηκε να χορηγηθεί ήταν 1mg/Kg σωματικού βάρους ενώ χορηγήθηκε 0,9% NaCl (φυσιολογικός ορός) στις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου, που αποτέλεσε και το μέσο του ενέσιμου διαλύματος αλενδρονάτης. Η συγκεκριμένη δόση επιλέχθηκε γιατί έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε άλλα μοντέλα οστεοπόρωσης με ποντίκια ^[130] καθώς και γιατί είναι κοντά στην συνιστώμενη εβδομαδιαία χορήγηση σε οστεοπορωτικούς ασθενείς (περίπου 1 mg/Kg). Η χορήγηση της αλενδρονάτης έγινε με υποδόρια ένεση μία φορά την εβδομάδα. Τα ενέσιμα διαλύματα τόσο της αλενδρονάτης όσο και του φυσιολογικού ορού παρασκευάστηκαν με βάση το σωματικό βάρος των ζώων έτσι ώστε το κάθε ζώο κατά μέσο όρο να λαμβάνει 0,5μg/g/10μl. Μετά τη ολοκλήρωση του σχήματος χορήγησης τα ζώα θυσιάστηκαν, έγινε απομόνωση των μακρών οστών και ακολούθησε ιστολογική ανάλυση της κεφαλής του μηριαίου οστού καθώς και της κνήμης.

Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης για την σειρά Tg5516 με τον ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο, έδειξαν ότι η χορήγηση αλενδρονάτης αναστέλλει

την οστική απώλεια ενισχύοντας την μικροαρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού με οστικές δοκίδες (Εικόνα 3.27).



Εικόνα 3.27 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη /ηωσίνη ποντικών άγριου τύπου (WT) και της διαγονιδιακής σειράς Tg5516 στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ή αλενδρονάτη (ALN).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κυτταροκίνη RANKL αποτελεί τον σημαντικότερο διαμεσολαβητή στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς είναι υπεύθυνη για την διαφοροποίηση, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Η αναστολή της δράσης του RANKL θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την παρεμπόδιση της αυξημένης οστικής απώλειας που παρατηρείται σε ασθένειες του σκελετικού συστήματος όπως είναι η οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι οστικές μεταστάσεις.

Με σκοπό να μελετηθούν οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης του RANKL *in vivo* δημιουργήσαμε τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν στο γονιδίωμα τους γενωμικό τμήμα 200 Kb, το οποίο περιέχει ολόκληρο το γονίδιο του RANKL του ανθρώπου. Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι να μελετηθούν οι RANKL-επαγόμενες παθολογίες σε διαγονιδιακά πρότυπα με απώτερο σκοπό την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών υπερέκφρασης του RANKL και να εκτιμηθούν νέοι πιθανοί αναστολείς της δράσης του ανθρώπινου RANKL σε προκλινικό επίπεδο.

Το γονίδιο του RANKL είναι υψηλά συντηρημένο και συναντάται μόνο σε οργανισμούς που φέρουν οστεοκλάστες όπως είναι για παράδειγμα τα σπονδυλόζωα. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι η πρωτεΐνη RANKL του ανθρώπου παρουσιάζει 87% ομολογία με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ποντικού. Στα θηλαστικά η μεταγραφή του γονιδίου του RANKL ελέγχεται από πολλαπλούς εκκινητές, μερικοί από τους οποίους βρίσκονται σε απόσταση 70 kb από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Για να επιτύχουμε φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του RANKL γονιδίου του ανθρώπου (huRANKL) σε διαγονιδιακά ποντίκια (TghuRANKL), χρησιμοποιήθηκε ένα γενωμικό τμήμα 200kb που περιελάμβανε το huRANKL γονίδιο που απομονώθηκε από ένα κλώνο βακτηριακού τεχνητού χρωμοσώματος (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τόσο μεγάλες γονιδιωματικές κατασκευές ακολουθούν συνήθως ένα φυσιολογικό πρότυπο υπερέκφρασης του διαγονιδίου και η έκφραση είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου και ανεξάρτητη από φαινόμενα επίδραση θέσης. Για την μικροένεση απομονώθηκε

ένα γραμμικό τμήμα 200kb γενωμικής περιοχής η οποία περιείχε τις κωδικές περιοχές του huRANKL γονιδίου καθώς και πιθανές ρυθμιστικές περιοχές τόσο στην 5' όσο και στην 3' περιοχή. Τα TghuRANKL ποντίκια δημιουργήθηκαν με μικροένεση DNA σε πυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν 4 ανεξάρτητες σειρές TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών σε καθεμία από τις οποίες υπάρχει διαφορετική θέση ενσωμάτωσης του huRANKL διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ποντικού, όπως και διαφορετικός αριθμός αντιγράφων. Συγκεκριμένα, οι σειρές Tg5519, Tg5520 και Tg5521 παρουσίασαν μεγάλο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου huRANKL (high copy), ενώ η σειρά Tg5516 παρουσίασε μικρότερο αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου (low copy).

Ο αριθμός των αντιγράφων του διαγονιδίου σχετίζεται και με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε κάθε σειρά. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες ο RANKL σε επίπεδο πρωτεΐνης εκφράζεται ευρέως σε μια πληθώρα κυττάρων τόσο σκελετικών όσο και εξωσκελετικών ιστών ^[55]. Η ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε μεταγραφικό επίπεδο στους διάφορους ιστούς επέτρεψε την ταξινόμηση των TghuRANKL διαγονιδιακών ποντικών σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης του. Συγκεκριμένα, η σειρά Tg5516 έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ η σειρά Tg5519 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης κυρίως σε οστά και εγκέφαλο. Ως σημείο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε η έκφραση σε σπλήνα και οστά του ιδρυτή Tg5520 που εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε σύγκριση του διαγονιδίου (huRANKL) με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς RANKL (muRANKL) στους διάφορους ιστούς των TghuRANKL διαγονιδιακών απογόνων των σειρών Tg5516, Tg5519 σε σχέση με τον ιδρυτή Tg5520. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (huRANKL) στα οστά των διαγονιδιακών σειρών επιβεβαιώνουν πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια στα οποία αποδείχθηκε ότι τα οστεοκύτταρα αποτελούν μία από τις κυριότερες πηγές παραγωγής του RANKL, επάγοντας έτσι την οστεοκλαστογένεση καθώς και ταυτόχρονα την οστική ανακατασκευή ^[131]. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου και σε άλλους ιστούς όπως στον εγκέφαλο και στον σπλήνα κυρίως στην σειρά Tg5519 υποδηλώνουν πιθανή ανάμειξη του RANKL σε νέες επαγόμενες παθολογίες ^{[97], [98]}.

Τα TgHuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το huRANKL γονίδιο, παρουσίασαν έναν πρώιμα εγκατεστημένο οστεοπορωτικό φαινότυπο και στα δύο φύλα. Η σειρά Tg5516 με τον μικρό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου και τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρουσίασε αυξημένη οστική απώλεια στο σπογγώδες οστόν ήδη εγκατεστημένη από τον δεύτερο μήνα της ηλικίας. Αν και δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην δομή του φλοιώδες οστού εντούτοις αποκαλύφθηκε ότι τα μακρά οστά της σειράς είναι λιγότερο ανθεκτικά σε μηχανικές πιέσεις σε σύγκριση με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Η ποσοτική εκτίμηση της οστικής απώλειας με micro-CT επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα αυτά [122]. Αντίθετα, τα επίπεδα του διαλυτού RANKL στον ορό των διαγονιδιακών ποντικών της σειράς ήταν πολύ κοντά στο κατώτατο ανιχνεύσιμο όριο της πρωτεΐνης ενώ η ανάλυση όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες όπως και τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς στο αίμα δεν έδειξε κάποια διαφορά σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, επιβεβαιώνοντας τον ήπιο οστεοπορωτικό χαρακτήρα της σειράς Tg5516.

Η διαγονιδιακή σειρά Tg5519 με τον μεγάλο αριθμό αντιγράφων (high copy) του διαγονιδίου huRANKL και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης παρουσίασε έναν σοβαρό οστεοπορωτικό φαινότυπο. Η έντονη οστική απώλεια σε συνδυασμό με την διάτρηση του σπογγώδους οστού είχε σαν αποτελέσματα την πλήρη εξάλειψη του στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς και κατά συνέπεια την αδυναμία ποσοτικής του εκτίμησης με την χρήση micro-CT. Εκτός από την έντονη οστική απώλεια στο σπογγώδες οστόν, παρατηρήθηκε καταστροφή της συνέχειας της αυξητικής πλάκας η οποία επεκτείνεται με την πάροδο της ηλικίας. Η ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών ανέδειξε έντονη οστική απώλεια και στο φλοιώδες οστόν το οποίο έχει αποκτήσει πορώδη δομή (cortical porosity) στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519. Η έντονη οστική απώλεια στο φλοιώδες οστόν οφείλεται στην ύπαρξη πολυάριθμων και μεγάλων οστεοκλαστών όπως προκύπτει από την χρώση TRAP που βάφει αποκλειστικά τους οστεοκλάστες, γεγονός που αντανακλάται από την δραματική αύξηση των βιοχημικών δεικτών της οστικής απώλειας όπως του TRACP-5b. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από την ποσοτική ανάλυση με micro-CT [122] στο σπογγώδες και στο φλοιώδες οστόν.

Ενώ στην περιοχή της διάφυσης στα άγριου τύπου ποντίκια οι οστεοκλάστες εντοπίζονται στην επιφάνεια του οστού, στα οστά των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών εντοπίζονται στο εσωτερικό του με την μορφή πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων. Η παρουσία μεγάλων και πολυάριθμων οστεοκλαστών εσωτερικά στο φλοιώδες υποδηλώνει έντονο ρυθμό οστικής ανακατασκευής με συνέπεια αυξημένη οστική απορρόφηση και διάβρωση που οδηγεί σταδιακά σε λύση της οστικής συνέχειας του φλοιώδους και εμφάνιση της πορώδους δομής. Τα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519, παράλληλα παρουσίασαν έντονο ρυθμό οστικής ανακατασκευής και σύνθεση νέου οστού στο εσωτερικό του φλοιώδους όπως αποδεικνύεται και από την σημαντική αύξηση των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης του ορού και από την ενσωμάτωση της καλσεΐνης στο φλοιώδες.

Η χαρακτηριστική πορώδης δομή στο εσωτερικό του φλοιώδους οστού των διαγονιδιακών ποντικών της σειράς Tg5519 παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την πορώδη δομή των οστών των οστεοπορωτικών ασθενών ^[132] Στους οστεοπορωτικούς ασθενείς η μειωμένη οστική πυκνότητα και η αλλοίωση της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών λόγω αυξημένης οστικής απορρόφησης οδηγεί σε αυξημένη ευθραυστότητα ενώ αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης κατάγματος. Οι περισσότερες έρευνες για την ανεύρεση των αιτίων που προκαλούν τα οστεοπορωτικά κατάγματα κυρίως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εστιάζουν στην οστική απώλεια που παρατηρείται στο σπογγώδες οστό και στα κατάγματα των σπονδυλικών σωμάτων στα οποία το σπογγώδες οστό καταλαμβάνει μεγαλύτερη έκταση. Εντούτοις, το 80% των οστεοπορωτικών καταγμάτων δεν είναι σπονδυλικά και αφορούν κυρίως τις περιοχές του φλοιού των οστών ^[133], που με την πάροδο της ηλικίας αποκτούν πορώδη δομή. Τα κατάγματα του φλοιού όπως είναι τα κατάγματα του ισχίου αποτελούν το διεθνές βαρόμετρο για την οστεοπόρωση και χαρακτηρίζονται ως η σοβαρότερη επιπλοκή της νόσου αφού έχουν επίπτωση στην ποιότητα ζωής του οστεοπορωτικού ασθενή.

Για τον λόγο αυτό τα ποντίκια της διαγονιδιακής σειράς Tg5519 μπορούν να αποτελέσουν ένα μοναδικό ζωικό μοντέλο για την περαιτέρω μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην δημιουργία της πορώδους

δομής του φλοιώδους καθώς και για την εκτίμηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την θεραπεία της οστεοπόρωσης.

Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι και η κυτταροβρίθεια των λιποκυττάρων που παρατηρήθηκε στο μυελό των οστών των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών. Στους ανθρώπους αυξημένη εναπόθεση λιποκυττάρων στον μυελό των οστών συνδέεται με προοδευτική γήρανση και εγκατάσταση οστεοπόρωσης ^[134]. Η προοδευτική εναπόθεση λιπώδους ιστού στο εσωτερικό του μυελού των οστών που παρατηρήθηκε στα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 σε ηλικία 3 μηνών συνοδευόμενη από αυξημένη οστική ανακατασκευή, δεν προηγήθηκε της οστικής απορρόφησης αλλά ακολούθησε μετά την εγκατάσταση της ασθένειας.

Τα διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα OPG knockout ποντίκια, τα οποία παρουσιάζουν σοβαρή οστεοπόρωση^[84] Ιστολογικά, τα OPG knockout ποντίκια παρουσιάζουν οστεοπορωτικές περιοχές που εκτείνονται στις επιφύσεις και στις μεταφύσεις των σπονδυλικών σωμάτων, του ισχίου και της κνήμης. Είναι χαρακτηριστική η παντελής έλλειψη του σπογγώδους οστού τόσο στα σπονδυλικά σώματα όσο και στα μακρά οστά που παρατηρείται κατά τον 1-2 μήνα ζωής. Η διάτρηση του φλοιώδους οστού ξεκινά μετά τον πρώτο μήνα ενώ είναι έντονη η παρουσία στο φλοιό πολυάριθμων και μεγάλων οστεοκλαστών. Η έντονη οστική ανακατασκευή σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης αντικατοπτρίζουν την προσπάθεια σύζευξης των δύο διεργασιών στο εσωτερικό των οστικών μεταβολικών μονάδων. Στα OPG knockout ποντίκια, η ύπαρξη μεγάλου αριθμού αγγείων στο φλοιώδες επεκτείνεται μέχρι το εσωτερικό της οστικής επιφάνειας, ενώ είναι χαρακτηριστική η έκτοπη ασβεστοποίηση μεγάλων αγγείων όπως της αορτής και των νεφρικών αρτηριών και μαλακών ιστών ^[135]. Μελέτες έδειξαν ότι αναστολείς του RANKL όπως το Denosumab, εμποδίζουν την έκτοπη ασβεστοποίηση των αγγείων σε διάφορα ζωικά μοντέλα^[136]. [137] Ο «ιδρυτής» της σειράς Tg5520 με την υψηλότερη και σοβαρότερη έκφραση του διαγονιδίου huRANKL εκτός από τον έντονο οστεοπορωτικό φαινότυπο παρουσίασε εκτεταμένη έκτοπη ασβεστοποίηση σε σειρά μαλακών ιστών όπως στην καρδιά και στην γλώσσα, αποτελώντας την πρώτη ένδειξη ότι η συστημική υπερέκφραση του RANKL μπορεί να προκαλέσει ασβεστοποίηση ιστών.

Η διασταύρωση των οστεοπετρωτικών ποντικών που φέρουν στο γονιδίωμα τους μια σημειακή μετάλλαξη που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης RANKL, με τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το huRANKL διαγονίδιο, οδήγησε στην γενετική διάσωση της RANKL-επαγόμενης οστεοπέτρωσης. Τα Tg5516/RANKL^{tes/tes} ποντίκια που προήλθαν από την διασταύρωση των Tg5516 διαγονιδιακών ποντικών με τον μικρό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου με τα RANKL οστεοπετρωτικά ποντίκια (*tl*), παρουσίασαν μερική αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου σε σύγκριση με τα Tg5519/RANKL^{tes/tes} ποντίκια που προήλθαν από την διασταύρωση με τα Tg5519 διαγονιδιακά ποντίκια με τον υψηλό αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου, το οποίο και ανέστειλε πλήρως τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα και το πρότυπο έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου στις διάφορες διαγονιδιακές σειρές είναι ικανά να αναστείλουν τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο των RANKL^{tes/tes} ποντικών. Η αναστολή του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου αποδεικνύει και επιβεβαιώνει ότι το huRANKL διαγονίδιο είναι πλήρως ενεργό στα ποντίκια ενώ επάγεται πλήρης ενεργοποίηση του υποδοχέα του ενδογενούς γονιδίου RANKL (*muRANKL*).

Η ανάγκη να δημιουργηθεί ένα ζωικό πρότυπο το οποίο να ανταποκρίνεται πλήρως στην χορήγηση του Denosumab^[137], ενός αντι-RANKL μονοκλωνικού αντισώματος που αναστέλλει αποτελεσματικά την οστική απώλεια, οδήγησε στην δημιουργία των RANKL knock-in ποντικών^[138]. Στα συγκεκριμένα ποντίκια έχει αντικατασταθεί μια κωδική περιοχή του εξωνίου 5 του γονιδίου του RANKL στο ποντίκι με την αντίστοιχη του ανθρώπινου γονιδίου του RANKL. Στα ποντίκια αυτά παράγεται μία χιμαιρική πρωτεΐνη που το εξωκυτταρικό τμήμα προέρχεται από τον RANKL του ανθρώπου ενώ το διαμεμβρανικό και το κυτταροπλασματικό τμήμα από τον RANKL του ποντικού, και βρίσκεται κάτω από τον πλήρη έλεγχο του ενδογενούς γονιδίου του RANKL. Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά δεν εμφανίζουν παθολογία σε αντίθεση με τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια που παρουσιάζουν σοβαρή οστεοπόρωση.

Συγκρίνοντας τα huRANKL διαγονιδιακά ποντίκια με τα ήδη υπάρχοντα ζωικά πρότυπα είναι γεγονός ότι υπερτερούν καθώς εμφανίζουν οστική απώλεια στο σπογγώδες, και πορώδη δομή στο φλοιώδες, κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματα των οστών των ασθενών με οστεοπόρωση, ευρήματα που τα καθιστούν ικανά να

αποτελέσουν άριστο εργαλείο για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών σε ασθένειες με αυξημένη οστική απορρόφηση και την εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η προφυλακτική χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων έναντι της οστεοπόρωσης, όπως η αλενδρονάτη, ανέστειλε την οστική απώλεια ενισχύοντας την δομή του σπογγώδους με οστικές δοκίδες στην σειρά Tg5516 με τον ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο, αποδεικνύοντας ότι τα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια αποτελούν μοναδικά εργαλεία για την αξιολόγηση και χορήγηση ουσιών που αναστέλλουν την δράση των οστεοκλαστών και επομένως την οστική απώλεια σε προκλινικό επίπεδο. Αντίθετα, προφυλακτική και θεραπευτική δράση έδειξε η χορήγηση του Denosumab στα TghuRANKL διαγονιδιακά ποντίκια της σειράς Tg5519 είχε σαν αποτέλεσμα όχι μόνο προληπτικά να παρεμποδίσει την προοδευτική οστική απώλεια, αλλά και να αναστείλει πλήρως τον οστεοπορωτικό φαινότυπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bianco, P., *Structure and mineralization of bone*. Calcification in Biological Systems, In Bonucci E ed CRC Press: FL., (1992),: p. pp:243-268.
2. Ducky P., *And they were two progressing along the osteoblast differentiation pathway*. Nature, 2002.
3. Raggatt, L.J., and N.C. Partridge., *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. J Biol Chem., (2010),. **285**((23):): p. pp:467-480.
4. Min, H., S. Morony , I. Sarosi , C.R. Dunstan, C. Capparelli , S. Scully , G. Van, S. Kaufman , P. J. Kostenuik, D.L. Lacey , W.J. Boyle, and W.S. Simonet, , *Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis*. J Exp MED., (2000),. **192**((4):): p. pp:463-474.
5. Walsh MC, K.N., Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y., *Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism*. Ann Rev Immunol., (2006),. **24**:: p. pp:33-63.
6. Boyle, W.J., W.S. Simonet , and D.L. Lacey., *Osteoclast differentiation and activation*. Nature., (2003),. **423**((6937):): p. pp:337-342.
7. Kim, N.S., H.J. Kim , B.K. Koo , M.C. Kwon , Y.W. Kim , Y. Cho , Y. Yokota , J.M. Penninger , and Y.Y. Kong ,, *Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2*. Mol Cell Biol., (2006),. **26**((3):): p. pp:1002-1013.
8. Wada, T., T. Nakashima , N. Hiroshi , and J.M. Penninger., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med., (2006),. **12**((1):): p. pp:17-25.
9. Rodman, *Denosumab may interrupt the vicious cycle of bone metastasis*. N Engl J Med, 2004. **350**: p. 1655.
10. Cullinane DM., *Biomechanics of bone* Principles of Bone Biology, Academic Press, San Diego, 2002: p. pp.17-32.
11. Bianco, P., *Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non skeletal tissues*. J Histochem Cytochem (1990). **38**: p. pp: 1549-163.
12. Bianco P., *Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues*. Calcif Tissue Int (1991). **49**: p. pp: 421-426.
13. Derkx. P., *Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry*. Bone (1998). **72**(4): p. pp: 367-373.
14. Sommerfeldt. DW., a.R.C., *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton*. Eur Spine J, (2001). **10**: p. pp: S86-S95.
15. Pittenger. MF., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, (1999). **284**: p. pp: 143-147.
16. Harada, S., and Rodan, G., *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature (2003). **423**: p. pp: 349-355.
17. Ducky P., et al, *Osf2/Cbfa-1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, (1997). **89**: p. pp: 747-754.
18. Aubin, J., and Liu, F., *The osteoblast lineage. in principles of bone biology*. Academic Press New York, (1996): p. pp: 51-68.
19. Parfitt, A., *Bone Forming Cells in Clinical Conditions*. Bone, The Osteoblast and Osteocyte. The Telford Press, London, (1991).

20. JE., A., *Regulation of osteoblast formation and function.* . Rev Endocr Metab Disord 2001. **2**: p. pp: 81-94.
21. Mandelin J, H.M., Li TF., *Human osteoblasts produce cathepsin K.* Bone 2006. **38**,: p. pp: 769-777.
22. Bonewald L., *Osteocytes as multifunctional cells.* J Musculoskelet Neuronal Interact 2006. **6**: p. pp: 331-333.
23. DM., C., *The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception.* J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**: p. pp: 242-244.
24. Takayagi, Y., *Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes.* J Bone Miner Metab, (1999). **17**: p. pp: 57-60.
25. Parfitt, A., *Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling and bone fragility.* J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**: p. pp: 499-500.
26. Poole KE., L.N., Van Bezooijen RL, *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.* FASEB J, 2005. **19**: p. pp: 1842-1844.
27. Manolagas, S., *Birth and death of bone cells: classic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.* Endocrine Reviews, (2000). **21**((2)): p. pp: 115-137.
28. MM, C., *The new bone biology: pathologic, molecular and clinical correlates.* Am J Med Genet A, 2006. **140**,: p. pp: 2646-2706.
29. Luxenburg C., A.L., Geiger B., *The molecular dynamics of osteoclast adhesions.* Eur J Cell Biol 2006. **85**,: p. pp: 203-211.
30. Sakiyama H., *Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers.* J Bone Miner Metab, 2001. **19**: p. pp: 220-227.
31. Quin, J., Morfis, M., *Calcitonin receptor antibodies in the identifiactiaon of osteoclats.* Bone, (1999). **25**(No.1): p. pp: 1-8.
32. RO., H., *Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion.* Cell, 1992. **69**,: p. pp: 11-25.
33. Razzouk S., B.J., Qin C., Tye CE., Goldberg HA., Butler WT., *Osteopontin post-translational modifications, possibly phosphorylation are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion.* Bone, 2002. **30**, (No 1,): p. pp: 40-47.
34. SL., T., *Osteoclasts: what do they do and how do they do it?* Am J Pathol 2005: p. pp: 427-435.
35. Duong LT., R.G., *Regulation of osteoclast formation and function.* . Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders,, 2001. **2**,: p. pp: 95-104.
36. Xing L., B.B., *Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**, : p. pp: 709-720.
37. McCormick, R.K., *Osteoporosis:intergrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility.* Alter Med Rev., (2007),. **12**((2)): p. pp:113-45.
38. I., F.-T.-H.-G., *Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process.* Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006. **11**,: p. pp: 1571-157.
39. Baron, R., A. Vignery, and M. Horowitz,, *Lymphocytes, macrofages and the regulation of bone remodeling.* Bone Mineral Research, in Peck WA (ed).Elsevier, Amsterdam., (1984),: p. pp:175-243.
40. Karsenty G., W.E., *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development.* Dev Cell., 2002. **2**((4)): p. pp: 389-406.
41. Raisz, L.a.L.W., *Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling.* Clinical Chemistry. , (1999),. **45**:: p. pp:1353-1358.
42. Canalis, E., T. McCarthy, and M. Centrella,, *Growth Factors and the regulation of Bone Remodeling.* J Clin Invest., (1988),. **81**:: p. pp:277-281.

43. Lorenzo, J., M. Horowitz, and Y. Choi., *Osteoimmunology: Interactions of the bone and the immune system*. Endocrine Reviews., (2008),. **29**((4):): p. pp:403-440.
44. Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa , K. Yamaguchi , M. Kinosaki , S. Mochizuki , A. Tomoyasu, K. Yano , M. Goto , A. Murakami , E. Tsuda, T. Morinaga , K. Higashio , N. Udagawa , T. Nakahashi , and T. Suda., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci USA., (1998),. **95**((7):): p. pp:3597-602.
45. Wong, B.R., J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F.S. Bartlett, W.N. Frankel, S.Y. Lee, and Y. Choi , *TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells*. J Biol Chem., (1997),. **272**((40):): p. pp:25190-25194.
46. Lacey, D.L., E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott , A. Colombero , G. Elliott , S. Scully , H. Hsu, J. Sullivan , N. Hawkins, E. Davy , C. Capparelli , A. Eli , Y.X. Qian , S. Kaufman , I. Sarosi , V. Shalhoub , G. Senaldi , J. Guo , J. Delaney ,and W.J. Boyle, , *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell., (1998),. **93**((2):): p. pp:165-178.
47. Anderson, D.M., E. Maraskovsky , W.L. Billingsley , W.C. Dougall , M.E. Tometsko , E.R. Roux , M.C. Teepe , R.F. DuBose , D. Cosman , and L. Galibert., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature., (1997),. **390**((6656):): p. pp:175-179.
48. Ikeda, T., M. Kasai , M. Utsuyama, and K. Hirokawa, , *Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus*. Endocrinology., (2001),. **142**((4):): p. pp:1419-1426.
49. Blair, J.M., Y. Zheng, and C.R. Dunstan., *RANK ligand*. Int J Biochem Cell Biol., (2007),. **39**((6):): p. pp:1077-81.
50. Suzuki J., I.T., Kuroyama H., Seki S., Kasai M., Utsuyama M., Tatsumi M., Uematsu H., Hirokawa K., *RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**,; p. pp: 1021-1027.
51. Locksley R.M., K.N., Lenardo M.J., *The TNF nad TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell., 2001. **104**((4),): p. pp: 487-501.
52. Jones E.Y., S.D.I., Walker N.P., *Structure of tumor necrosis factor*. Nature., 1989. **338**((6212),): p. pp: 225-228.
53. Chan F.K., C.H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Lenardo M.J., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**((5475),): p. pp: 2328-2329.
54. Lam, J., C.A. Nelson , F.P. Ross , S.L.Teitelbaum , and D.H. Fremontm , *Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity*. J Clin Invest., (2001),. **108**((7):): p. pp:971-979.
55. Kartsogiannis, V., H. Zhou , N.J. Horwood , R.J. Thomas , D.K. Hards , J.M. Quinn , P. Niforas , K.W. Ng , T.J. Martin , and M.T. Gillespie., *Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues*. Bone., (1999),. **25**((5):): p. pp:525-534.
56. Fata, J.E., Y.Y. Kong , J. Li , T. Sasaki , J. Irie-Sasaki , R.A. Moorehead , R. Elliott , S. Scully , E.B. Voura , D.L. Lacey , W.J. Boyle , R. Khokha , and J.M. Penninger, , *The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development*. Cell., (2000),. **103**((1):): p. pp:41-50.
57. Schett, G., S. Hayer , J. Zwerina , K. Redlich , and J.S. Smolen, , *Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease*. Nat Clin Pract Rheumatol., (2005),. **1**((1):): p. pp:47-54.

58. Jones, D.H., T. Nakashima, O.H. Sanchez , I. Kozieradzki , S.V. Komarova , I. Sarosi, S. Morony , E. Rubin , R. Sarao , C.V. Hojilla , V. Komnenovic, Y.Y. Kong , M. Schreiber , S.J. Dixon , S.M. Sims , R. Khokha, T. Wada , and J.M. Penninger, , *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. Nature., (2006),. **440**((7084):): p. pp:692-696.
59. Walsh, M.C., and Y. Choi,, *Biology of the TRANCE axis*. Cytokine and Growth Factor Reviews., (2003),. **14**((3-4):): p. pp:251-263.
60. Odgren, P.R., N. Kim , C.A. MacKay , A. Mason-Savas , Y. Choi , and S.C. Marks,, *The role of RANKL (TRANCE/TNFSF11), a tumor necrosis factor family member, in skeletal development: effects of gene knockout and transgenic rescue*. Jr. Connect Tissue Res., (2003),. **44**(Suppl 1):): p. pp:264-71.
61. Sobacchi, C., A. Frattini , M.M. Guerrini , M. Abinun, A. Pangrazio, L. Susani , R. Bredius, G. Mancini , A. Cant , N. Bishop , P. Grabowski , A. Del Fattore , C. Messina , G. Errigo , F.P. Coxon , D.I. Scott, A. Teti , M.J. Rogers , P. Vezzoni , A. Villa , and M.H. Helfrich *Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL*. Nat Genet. , (2007),. **39**((8):): p. pp:960-2.
62. Lo Iacono N., P.A., Abinun M., *RANKL cytokine: from pioneer of the osteoimmunology era to cure for a rare disease*. Clin Dev Immunol., 2013: p. pp: 4127-4168.
63. Kong, Y.Y., H. Yoshida , I. Sarosi, H.L. Tan , E. Timms , C. Capparelli, S. Morony , A.J. Oliveira-dos-Santos , G. Van , A. Itie , W. Khoo , A. Wakeham , C.R. Dunstan , D.L. Lacey , T.W. Mak , W.J. Boyle , and J.M. Penninger, , *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature., (1999),. **397**((6717):): p. pp:315-23.
64. Beutler, B., X. Du , and Y. Xia,, *Precis on forward genetics in mice*. Nat Immunol., (2007),. **8**((7):): p. pp:659-64.
65. Hrabé de Angelis ., M.H., H. Flaswinkel , H. Fuchs , B. Rathkolb , D. Soewarto, S. Marschall , S. Heffner, W. Pargent, K. Wuensch , M. Jung , A. Reis , T. Richter , F. Alessandrini , T. Jakob, E. Fuchs, H.VKolb, E. Kremmer, K. Schaeble, B. Rollinski, A. Roscher, C. Peters, T. Meitinger, T. Strom, T. Steckler, F. Holsboer, T. Klopstock, F. Gekeler, C. Schindewolf , T. Jung, K. Avraham, H. Behrendt, J. Ring, A. Zimmer, K. Schughart, K. Pfeffer, E. Wolf, and R. Balling T., *Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis*. Nat Genet. , (2000),. **25**((4):): p. pp:444-7.
66. Acevedo-Arozena, A., S. Wells, P. Potter, M. Kelly, R.D. Cox, and S.D. Brown *ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function*. Annu Rev Genomics Hum Genet. , (2008),. **9**:: p. pp:49-69.
67. Douni, E., E. Makrinou, and G. Kollias,, *Identification of a novel loss-of-function missense mutation in the RANKL gene that causes osteopetrosis in mice*. Mo-OP35 35th ECTS. Calcified Tissue International., (2008),. **82 Suppl.1**.
68. Yun, T.J., M.D. Tallquist , A. Aicher , K.L. Rafferty , A.J. Marshall , J.J. Moon , M.E. Ewings , M. Mohaupt , S.W. Herring , and E.A. Clark,, *Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function*. The Journal of Immunology., (2001),. **166**:: p. pp:1482-1491.
69. Chen, G., K. Sircar , A. Aprikian , A. Potti , D. Goltzman , and S.A. Rabbani,, *Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation*. Cancer., (2006),. **107**((2):): p. pp:289-298.
70. Whyte, M., and S. Mumm,, *Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway*. J Musculoskel Neuron Interact., (2004),. **4**((3):): p. pp:254-267.
71. Huges, A.E., S.H. Ralston, J. Marken, C. Bell, H. MacPherson, R.G. Wallace, W. van Hul, M.P. Whyte, K. Nakatsuka, L. Hovy, and D.M. Anderson,, *Mutations in TNFRSF*

- 11A, affecting the signal peptide of RANK cause familial expansile osteolysis. Nat Genet., (2000),. 24(1):* p. pp:45-8.
72. Li J., S.I., Yan X.Q., Morony S., Capparelli C., Tan H.L., McCabe S., Elliot R., Scully S., Van G., Kaufman S., Juan S.C., Sun Y., Tarpley J., Martin L., Christensen K., McCabe J., Kostenuik P., Hsu H., Fletcher F., Dunstan C.R., Lacey D.L. and Boyle *RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97(4):* p. pp: 1566-1571.
 73. Khosla s., *The OPG/RANKL/RANK System. Endocrinology, 2001. 142 ((12),):* p. pp: 5050-5055.
 74. Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shiammoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davey , N. Bucay, L. Renshaw-Gregg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campell, and W.J. Boyle., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in regulation of bone density. Cell., (1997),. 89:* p. pp:309-319.
 75. Tsuda, E., M. Got, S. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morinaga, and K. Higashio., *Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun., (1997),. 234:* p. pp:137-142.
 76. Kwon, B.S., S. Wang, N. Udagawa, V. Haridas, Z.H. Lee, K.K. Kim, K.O. Oh, J. Greene, Y. Li, J. Su, R. Gentz, B.B. Aggarwal and J. Ni., *TR1, a new member of the tumor necrosis factor receceptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. FASEB J., (1998),. 12((10):):* p. pp:845-854.
 77. Yun, T.J., P.M. Chaudhary, G.L. Shu, J.K. Frazer, M.K. Ewings, S.M. Schwartz, V. Pascual, L.E. Hood, and E.A. Clark., *OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. J Immunol., (1998),. 161((11):):* p. pp:6113-21.
 78. Suda, T., Y. Ueno, K. Fujii, and T. Shinki., *Vitamin D and Bone. Journal of Cellular Biochemistry., (2003),. 88:* p. pp:259-263.
 79. Holen I., H.F.C.a.E.C.L., *Osteoprotegerin (OPG) is a Survival Factor for Human Prostate Cncer Cells. Cancer Res., 2002. 62((6),):* p. pp: 1619-1623.
 80. Nakamura, H., T. Tsuji, A. Hirata, and T. Yamamoto., *Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry., (2002),. 50((7):):* p. pp:945-953.
 81. Boyce, B.F., and L. Xing., *Biology of RANKL, RANK and osteoprotegerin. Arthritis Research and Therapy., (2007),. 9((Suppl 1):S1).*
 82. Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, S.I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, and K. Higashio., *Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology., (1998),. 139 ((3):):* p. pp:1329-37.
 83. Tan, K.B., J. Harrop, M. Reddy, P. Young, J. Terrett, J. Emery, G. Moore, and A. Truneh., *Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. Gene., (1997),. 204:* p. pp: 35-46.
 84. Bucay, N., I. Sarosi, C.R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley , C. Capparelli, S. Scully, H.L. Tan, W. Xu, D.L. Lacey, W.J. Boyle, and W.S. Simonet., *Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. , (1998),. 12((9):):* p. pp:1260-8.

85. Bekker, P.J., D. Holloway , A. Nakanishi , M. Arrighi, P.T. Leese, and C.R. Dunstan,, *The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women.* J Bone Miner Res., (2001),. **16**((2):): p. pp:348-60.
86. Kostenuik P.J., *Osteoprotegerin ana RANKL regulate bone resorption density, geometry and strength.* Curr Opin Pharmacol., 2005. **5**((6):): p. pp: 618-625.
87. Boyce, B.F., and L. Xing, , *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.* Arch Biochem Biophys. , (2008),. **473**((2):): p. pp:139-46.
88. Kim, N., Y. Kadono , M. Takami , J. Lee , S.H. Lee , F. Okada , J.H. Kim , T. Kobayashi , P.R. Odgren , H. Nakano , W.C. Yeh , S.K. Lee , J.A. Lorenzo , and Y. Choi,, *Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis.* J Exp MED., (2005),. **202**((5):): p. pp:589-95.
89. Odgren PR, K.N., MacKay CA, Mason-Savas A, Choi Y, Marks SC Jr., *The role of RANKL (TRANCE/TNFSF11), a tumor necrosis factor family member, in skeletal development: effects of gene knockout and transgenic rescue.* .Connect Tissue Res, (2003). **44 Suppl 1**: p. 264-71.
90. Fuller, K., B. Wong , S. Fox , Y. Choi , and T.J. Chambers,, *TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts.* J Exp Med., (1998),. **188**((5):): p. pp:997-1001.
91. Lagasse E., W.I.L., *Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice.* Cell, 1997. **89** p. pp: 1021-1031.
92. Takayanagi H., *Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems.* Nature., (2007),. **7**((4):): p. pp:292-304.
93. Rauner, M., W. Sipos , and P. Pietschmann, , *Osteoimmunology.* Int Arch Allergy Immunol., (2007),. **143**((1):): p. pp:31-48.
94. Kim, D., R.E. Mebius , J.D. MacMicking , S. Jung , T. Cupedo , Y. Castellanos, J. Rho , B.R. Wong , R. Josien, N. Kim , P.D. Rennert , and Y. Choi, , *Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE.* J Exp Med., (2000),. **192**((10):): p. pp:1467-1478.
95. Wong, B.R., R. Josien , S.Y. Lee , B. Sauter , H.L. Li , R.M. Steinman , and Y. Choi,, *TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor.* J Exp Med., (1997),. **186**((12):): p. pp:2075-80.
96. Breuil, V., H. Schmid-Antomarchi , A. Schmid-Alliana , R. Rezzonico , L. Euller-Ziegler , and B. Rossi,, *The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes.* FASEB J., (2003),. **17**((12):): p. pp:1751-3.
97. Loser, K., A. Mehling , S. Loeser , J. Apelt , A. Kuhn , S.Grabbe , T. Schwarz , J.M. Penninger , and S. Beissert, , *Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells.* Nat Med., (2006),. **12**((12):): p. pp:1372-9.
98. Hanada, R., A. Leibbrandt , T. Hanada , S. Kitaoka , T. Furuyashiki , H. Fujihara, J. Trichereau, M. Paolino , F. Qadri ,R. Plehm , S. Klaere , V. Komnenovic , H. Mimata , H. Yoshimatsu , N. Takahashi , A. von Haeseler , M. Bader , S.S. Kilic , Y. Ueta , C. Pifl , S. Narumiya , and J.M. Penninger, , *Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK.* Nature., (2009),. **462**((7272):): p. pp:505-509.
99. Tanaka, S., K. Nakamura , N. Takahasi , and T. Suda,, *Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system.* Immunological Reviews., (2005),. **208**: p. pp:30-49.
100. Yao, Z., L. Xing , and B.F. Boyce, , *NF-kappaB p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism.* J. Clin. Invest., (2009),. **119**((10):): p. pp:3024-3034.

101. Gravallesse E.M., *Bone destruction in arthritis*. Ann Rheum Dis., (2002),. **61 Suppl 2**:: p. pp: ii84-6.
102. Firestein G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature., (2003),. **423**((6937)::): p. pp: 356-61.
103. Sato, K., A. Suematsu , K. Okamoto , A. Yamaguchi , Y. Morishita , Y. Kadono , S. Tanaka , T. Kodama , S. Akira , Y. Iwakura , D.J. Cua , and H. Takayanagi,, *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. J Exp Med., (2006),. **203**((12)::): p. pp:2673-82.
104. Nakashima, T., and H. Takayanagi,, *The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system*. Arch Biochem Biophys. , (2008),. **473**((2)::): p. pp:166-171.
105. Albright, F., E. Bloomberg, and P.H. Smith,, *Postmenopausal osteoporosis*. Trans. Assoc. Am. Physicians., (1940),. **55**: p. pp:298-305.
106. Riggs, B.L., H.W. Wahner, E. Seeman, K.P. Offord, W.L. Dunn, R.B. Mazess, K.A. Johnson, and L.J. Melton,, *Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes*. J Clin Invest., (1982), . **70**((4)::): p. pp:716-23.
107. A.J., D., *Bone formation and resorption in postmenopausal osteoporosis*. Lancet, 1981. **2**((8245)::): p. pp: 536.
108. Λυρίτης, Π.Γ., *Μεταβολικά Νοσήματα των οστών*. Εκδόσεις Hylonome Editions. 4η έκδοση. Αθήνα., (2007),.
109. Gullberg B., J.O., Kanis J.A., *World-widw projections for hip fracture*. Osteoporos 1997. **7**, : p. pp: 407-413.
110. Roche JJ, W.R., Sahota O, Moran CG., *Effect of comorbidities and postoperative complications on mortality after hip fracture in elderly people: Prospective observational cohort study*. BMJ 2005,. **331**((7529)::): p. pp: 1374.
111. P.D., D., *Treatment of postmenopausal osteoporosis*. Lancet, 2002. **359**:: p. pp: 2018-2026.
112. Wells G., T.P., Shea B.,, *Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women*. Endocrine Rev, 2002. **23**((4)::): p. pp:529-539.
113. Russell R.G., W.N.B., Ebetino F.H., Rogers M.J., *Mechanisms of action of biphosphonates: similarities and differences and their potential influences of clinical efficacy*. Osteoporos Int, 2008. **19**, : p. pp: 733-759.
114. Cummings S.R., S.M.J., McClung M.R., Siris E.S., Eastell R., Reid I.R., Delmas P., Zoog H.B., Austin M., Wang A., Kutilek S., Adami S., Zanchetta J., Libanati C., Siddhanti S., Christiansen C., *FREEDOM Trial: Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis*. N Engl J Med, 2009. **361** ((8)::): p. pp:756-765.
115. Smith M.R., E.S.Y., Hernandez Toriz N.,, *Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**((8)::): p. pp: 745-755.
116. Bagi C., M.M., Weiss J., Miller SC., *Comparative morphometric changes in rat cortical bone following ovariectomy and/or immobilization*. Bone, 1983. **14**: p. pp: 877-883.
117. M., P., *Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**: p. pp:212-218.
118. Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa, and F.H. Ruddle,, *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A. , (1980),. **77**((12)::): p. pp:7380-4.
119. Douni, E., M. Alexiou , and G. Kollias,, *Genetic engineering in the mouse: tuning TNF/TNFR expression*. Methods Mol Med., (2004),. **98**:: p. pp:137-70.

120. Douni E, R.V., Makrinou E., *A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF*. Hum Mol Genet. , 2012. **21**((4),): p. pp: 784-798.
121. F., G., *Introduction to the 3Rs*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science., 2005. **44**((2),): p. pp: 58-59.
122. Rinotas V., N.A., Dacquin R., Bonnet N., Stolina M., Kostenuik P., Jurdic P., Ferrari S., Douni E., *Novel Genetic Models of Osteoporosis by Overexpression of Human RANKL in Transgenic Mice*. Journal of Bone and Mineral Research, 2014. **29**((5),): p. pp: 1158-1169.
123. Dacquin R., D.R.A., Laplace C., , *Amylin inhibits bone resorption while calcitonin receptor controls bone formation in vivo*. J Cell Biol., 2004. **164**((4),): p. pp: 509-514.
124. Kalender W.A., F.D., Louis O., *Reference values for trabecular and cortical vertebral bone density in single and dual-energy quantitative computed tomography*. Eur J Radiol, 1989. **9**: p. pp:75-80.
125. Halleen J.M., A.S.L., sUOMINEN h., *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2000. **15**: p. pp:1337-1345.
126. Alatalo S.L., I.K.K., Waguespack S.G., Econs M.J., Halleen J.M., *Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease*. Clin Chem 2004. **50**: p. pp: 883-890.
127. R., S., *Biochemical markers of bone turnover*. Clin Chim Acta., 2001. **313**,: p. pp: 95-105.
128. Bone H.G., H.D., Devogelaer J.P., , *Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women*. N Engl J Med, 2004. **350**((12),): p. pp: 1189-1199.
129. Van Keuren M.L., G.G.B., Filipiak W.E., Zeinder M.G. Saunders T.L., *Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes*. Transgenic Res., 2009. **18**((5),): p. pp: 769-785.
130. Ohishi M, C.R., Ominsky M, Asuncion F, Thomas C, Khatri R, Kostenuik P, Schipani E., *Osteoprotegerin abrogated cortical porosity and bone marrow fibrosis in a mouse model of constitutive activation of the PTH/PTHrP receptor*. Am J Pathol, 2009. **174**((6),): p. pp: 2160-2171.
131. O'Brien C.A., N.T., Takayanagi H., *Osteocyte control of osteoclastogenesis*. Bone, 2013. **54**((2),): p. pp: 258-263.
132. Cooper D.M., T.C.D., Clement J.G., A.L., Sensen C.W., Hallgrímsson B., *Age-dependent change in the ED structure of cortical porosity at the human femoral midshaft*. Bone, 2007. **40**((4),): p. pp: 957-965.
133. A.S., T., *Animal models of osteoporosis-Necessity and limitations*. European cells and materials., 2001. **1**: p. pp:66-81.
134. Rosen C.J., K.A., *Bone, fat and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis*. Am J Med. , 2009. **122**((5),): p. pp:409-414.
135. Baud'huin M., L.F., Duplomb L., Redini F., Heymann D., *RANKL,RANK,osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases*. Cell. Mol. Life Sci., 2007. **64**: p. pp:2334-2350.
136. Helas S., G.C., Schoppet M., , *Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice*. Am J Pathol, 2009. **175**((2),): p. pp:437-438.
137. Hamdy, N.A., *Denosumab: RANKL inhibition in the management of bone loss*. . Drugs Today (Barc). (2008),. **44**((1),): p. pp:7-21.
138. Kostenuik, P.J., H.Q. Nguyen, J. McCabe, K.S. Warmington, C. Kurahara, N. Sun, C. Chen, L. Li, R.C. Cattley, G. Van, S. Scully, R. Elliott, M. Grisanti, S. Morony, H.L.

Tan, F. Asuncion , X. Li , M.S. Ominsky , M. Stolina, D. Dwyer, W.C. Dougall, N. Hawkins, W.J. Boyle, W.S. Simonet, and J.K. Sullivan., *Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL.* J Bone Miner Res., (2009),. **24**((2):): p. pp:182-95.