

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

Tézisfüzet

Dr. Tunyogi-Csapó Miklós



Mozgásszervi Sebészeti Intézet

Ortopédiai Klinikai Tanszék

PTE-KK

**PÉCS
2011**

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

Tézisfüzet

Dr. Tunyogi-Csapó Miklós

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel DSc.
Programvezető: Prof. Dr. Illés Tamás DSc.
Témavezető: Prof. Dr. Glant T. Tibor DSc.
Dr. Vermes Csaba PhD.

Mozgásszervi Sebészeti Intézet

Ortopédiai Klinikai Tanszék

PTE-KK

**PÉCS
2011**

1. BEVEZETÉS

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

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

2. CÉLOK ÉS HIPOTÉZIS

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

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

Célunk eléréséhez a következő kísérleteket hajtottuk végre:

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

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

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

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

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1.1. Vegyületek és citokinek

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

3.1.2 Fibroblaszt izolálás és humán synovialis kultúrák

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

3.1.3 Statisztikai analízis

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

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

3.2.1. Egerek, immunizáció, egér fibroblaszt tenyészetek

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

3.2.2. A synovialis fibroblasztok citokin kezelése

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

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

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

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

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

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

3.3 A humán angiogenezis vizsgálatának módszerei (II. vizsgálat)

3.3.1. Explantációs tenyészetek és kondicionált médiumok

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

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

3.3.2. Specifikus protein termékek detektálása ELISA módszerrel

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

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

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

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

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

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

3.3.5. VEGF izoformák detektálása Western blot hibridizációval

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

4. EREDMÉNYEK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3 A humán synovialis fibroblasztok által termelt angiogén faktorok vizsgálata

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. MEGBESZÉLÉS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. ÚJ EREDMÉNYEK

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

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

Humán synovialis fibroblasztok által termelt angiogenikus faktorok(Study II)

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

7. BIBLIOGRÁFIA

Folyóiratban megjelent publikációk

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

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

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

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

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

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

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

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

összegzett impakt faktor: **43,02**

Publikált absztraktok

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Összegzett impakt faktor: **64.744**

További előadások és poszter prezentációk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

**Fibroblast-mediated pathologic bone resorption
in ex vivo and in vivo models**

Summary of Ph.D. thesis

Miklós Tunyogi-Csapó MD.



**Institute of Musculoskeletal Surgery
Department of Orthopedic Surgery
University of Pécs, Clinical Center**

**PÉCS
2011**

**Fibroblast-mediated pathologic bone resorption
in ex vivo and in vivo models**

Summary of Ph.D. thesis

Miklós Tunyogi-Csapó MD.

General President of Post Gradual Education: Sámuel Komoly, MD, PhD, DSci

Program Director: Tamás Illés, MD, PhD, Dsci

Mentors: Tibor T Glant, MD, PhD, DSci

Csaba Vermes, MD, PhD

Institute of Musculoskeletal Surgery

Department of Orthopedic Surgery

University of Pécs, Clinical Center

PÉCS

2011

ABBREVIATIONS

| | |
|---------|--|
| Ang-1 | Angiopoietin 1 |
| APC | Antigen presenting cell |
| cDNA | Complementary DNA |
| CD90 | cluster of differentiation 90 (fibroblast marker) |
| CM | Conditioned media |
| Cox | Cyclooxygenase |
| Ct | Threshold cycle |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FLS | Fibroblast like synoviocyte |
| GAPDH | Glyceraldehyde-6-phosphate-dehydrogenase |
| IFFb | Interfacial membrane fibroblast |
| IFM | Periprosthetic interfacial membrane |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| LIF | Leukemia inhibitory factor |
| MCP | Monocyte/macrophage chemoattractant protein |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| NSy | Normal synovium |
| OA | Osteoarthritis |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polimerase chain reaction |
| PG | Proteoglycan |
| PGIA | Proteoglycan-induced arthritis |
| qRT-PCR | Quantitative reverse transcriptse polymerase chain reaction |
| RA | Rheumatoid arthritis |
| RANK | Receptor activator of nuclear factor kappa B |
| RANKL | Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand |
| RANTES | Regulated upon activation normally T-cell expressed and secreted |
| RASy | Rheumatoid synovial tissue |
| RASFb | Rheumatoid synovial fibroblast |
| RPA | Rnase protection assay |
| SDS | Sodium duodecyl sulfate |
| SEM | Standard error of mean |
| SFs | Synovial fibroblasts |
| TGF | Transforming growth factor |
| Ti | Titanium |
| TIMP | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| Th-cell | T-helper cell |
| TJA | Total joint arthroplasty |
| THA | Total hip arthroplasty |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |

1. INTRODUCTION

Osteoclasts and osteoblasts dictate skeletal mass, structure, and strength via their respective roles in resorbing and forming bone. Bone remodeling is a spatially coordinated lifelong process whereby old bone is removed by osteoclasts and replaced by bone-forming osteoblasts. The refilling of resorption cavities is incomplete in many pathologic states, which leads to a loss of bone mass with each remodeling cycle. This resorption process could be generalized net loss (e.g: osteoporosis) or focal destruction (e.g.: RA joint destruction or periprosthetic osteolysis). Bone resorption is dependent on a cytokine known as RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), a TNF (tumor necrosis factor) family member that is essential for osteoclast formation, activity and survival in normal and pathologic states of bone remodeling. The catabolic effects of RANKL are prevented by OPG (osteoprotegerin), a TNF receptor family member that binds RANKL and thereby prevents activation of its single cognate receptor called RANK. Osteoclast activity is likely to depend, at least in part, on the relative balance of RANKL and OPG. Studies in numerous animal models of bone disease show that RANKL inhibition leads to marked suppression of bone resorption and increases in cortical and cancellous bone volume, density and strength. RANKL inhibitors also prevent focal bone loss that occurs in animal models of rheumatoid arthritis.

Pathologic bone resorption around endoprostheses is a major issue in orthopedic surgery due to the formation of an aggressive inflammatory granulomatous tissue, caused by particulate wear debris, that leads to the loosening of total joint arthroplasties. Rheumatoid arthritis also results focal bone erosions where the inflammatory process targets the articular cartilage, the bone at the joint margins, as well as periarticular and subchondral bone, and originated from the inflamed synovium. The characteristics of the inflamed tissue around the destructive bone resorbing zone shows several similarities between the two different pathologies. The dominant cell type at the sites of invasion into the adjacent bone is synovial fibroblast and in both tissues similar pro- and anti-inflammatory cytokines can be detected. During the inflammatory process the thickness of the synovial like tissue is increasing according to the influx and proliferation of inflammatory cells as well as the increased proliferation and survival of resident cells, although the terminal layer of the tissue matrix predominantly contains 10-15 cell layers of fibroblast like cells. The inflamed tissue also shows an increased neoangiogenesis, facilitating the influx of inflammatory cells. Overall the pathological processes of osteoclastogenesis, dysregulated bone formation, granulomatous tissue formation and neovascularization are simultaneous and overlapping events that cannot be separated. However T cells and other inflammatory cells are rarely seen at the site of bone resorption, either in RA, in corresponding animal models, or in periprosthetic osteolysis; rather fibroblast-like and macrophage-like cells with osteoclasts, and less frequently osteoblasts occupy the resorbed areas of bone. In this thesis we were focusing on the role of synovial fibroblasts in this mandatory process of pathologic bone resorption which leads to prosthesis loosening and rheumatoid joint destruction.

2. AIMS AND HYPOTHESIS

To gain more insight into the mechanisms of pathologic bone resorption and angiogenesis that takes place in arthritic joints and between the prosthesis/bone interface, and to understand how synovial fibroblasts in a cytokine-rich environment are involved in these processes, we aimed to prove the following hypotheses.

» *During subsequent joint destruction and prosthesis loosening synovial fibroblasts are actively contribute to bone resorption, and neovascularization by expressing a wide array of osteoclastogenic and angiogenic factors. These compounds play an important role in the detrimental processes of rheumatoid arthritis and periprosthetic osteolysis.*

To reach our goals, we performed the following experimental studies:

Study I. To determine whether proinflammatory cytokine treatment or the complete absence of select cytokines modulates the expression of major osteoclastogenic factors (RANKL and OPG) in synovial fibroblasts

- We performed in vitro and in vivo experiments using *human* and *mouse* synovial fibroblasts and different cytokine milieus. We compared in vitro expression of RANKL and OPG in normal versus RA and IFM synovial fibroblasts from human origin
- Then the same experiments were repeated using fibroblasts from normal and arthritic mouse knee joints.
- Finally, utilizing our extensive experience with a mouse model of arthritis (proteoglycan [PG]-induced arthritis; PGIA), we applied in vitro conditions in vivo, when the antiinflammatory and antiosteoclastogenic cytokines IFN γ and IL-4 and the osteoclastogenic cytokine IL-17 were absent, in naive and arthritic gene-deficient animals.

Study II. To examine the role of synovial fibroblasts and fibroblast derived-growth factors in periprosthetic angiogenesis

- The purpose of the second study was to determine whether synovial fibroblast plays a key role in angiogenesis within the periprosthetic tissues.
- We evaluated this by measuring major angiogenic factors produced by synovial fibroblasts (IFFb and RASF) in response to particulate wear debris and proinflammatory cytokines.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1.1. Chemicals and cytokines

All chemicals, unless otherwise indicated, were purchased from Sigma (St. Louis, MO) or Fisher Scientific (Chicago, IL). Human and mouse recombinant proteins for fibroblast treatments such as TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-17, and IL-4 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) or Sigma.

3.1.2 Fibroblast isolation, and human synovial cultures

Fibroblasts were isolated from both fresh tissues and 7-day-old explant cultures of synovial tissues to compare the yield and viability of fibroblasts from the corresponding tissue samples. Fibroblasts were isolated by pronase and collagenase digestions. Dissociated cells were washed with PBS and plated in \varnothing 10cm petri dishes in DMEM/10% FBS. Non-adherent cells were discarded the next morning by washing, and adhered cells (mostly fibroblasts) were cultured in DMEM/10% FBS. Confluent monolayer fibroblast cultures were passaged at least five times and then passaged at $\sim 0.7 \times 10^6$ cell density per \varnothing 10cm petri dish for experiments. The fibroblast phenotype of isolated cells was confirmed by flow cytometry using anti-CD90 (Thy-1) monoclonal antibody (mAb) and by immunohistochemistry in 8-well chamber slides (Nalgene) using fluorochrome-labeled mAb 5B5 to F-subunit of propyl-4-hydroxylase. Thus, these cells were considered to be synovial (normal, interfacial membrane or rheumatoid) fibroblasts (i.e., FLS).

3.1.3 Statistical analysis

Descriptive statistics were used to determine group means and standard error of the mean. The Pillai's trace criterion was used to detect multivariate significance. Subsequently, Mann Whitney U-test was performed to compare the results of experimental groups. The level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using computer-based statistical software (SPSS/PC+ v 15 SPSS Inc, Chicago, IL).

3.2. Methods for human and mouse osteoclastogenesis study (Study I)

3.2.1. Mice, immunization, and mouse synovial fibroblast cultures.

All animal protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Rush University Medical Center. Adult BALB/c mice were purchased from the National Cancer Institute. IL-4 $^{-/-}$ and IFN γ $^{-/-}$ mice on a BALB/c background were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), and IL-17 $^{-/-}$ mice, also on a BALB/c background, were provided by Dr. Y. Iwakura (University of Tokyo). For initiation of PGIA, wild-type and gene-deficient mice were injected 2-3 times intraperitoneally with 100 μ g of human cartilage PG (aggrecan) in dimethyldioctadecylammonium bromide adjuvant at 3-week intervals. Severe arthritis developed 7-10 days after the second PG injection in all IL-4 $^{-/-}$ mice and in many of the wild-type and IL-17 $^{-/-}$ BALB/c

mice. Nonarthritic wild-type and IL-17^{-/-} mice received a third injection, as did the IFN γ ^{-/-} mice, in which a relatively mild arthritis developed only after the third PG injection. Arthritis ultimately developed in all wild-type and gene-deficient mice, and the degree of inflammation was assessed visually. The knee joints of age-matched naive and PG-immunized wild-type and gene-deficient mice were used for synovial fibroblast isolation, as previously described for human cultures. Fibroblasts were used for experiments after 4-5 passages, when the cultures showed >98% synovial fibroblast phenotype, as described for human FLS. For histologic assessment, the hind paws were fixed in formalin, decalcified, and embedded in paraffin.

3.2.2. Treatment of synovial fibroblasts with cytokines.

Confluent cultures of fibroblasts were subjected to serum deprivation in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.5% fetal bovine serum, for 24 hours. This medium was replaced with fresh medium containing the appropriate cytokine concentration (determined in preliminary experiments for both human and mouse naive and arthritic fibroblast cultures). The in vitro responses of human and mouse FLS to cytokines were pretested using TNF α (1.25-10 ng/ml), IL-1 β (0.2-5 ng/ml), IL-4 (2-10 ng/ml), IFN γ (1-15 ng/ml), and IL-17 (25-100 ng/ml) in dose-response and time-curve experiments. In the final experiments (which are described in this report), 5 ng/ml of TNF α , 1 ng/ml of IL-1 β , and 25 ng/ml IL-17 were used alone or in combination with 5 ng/ml of IL-4 or 5 ng/ml of IFN γ .

3.2.3. RNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis, and real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Total RNA was extracted from human and mouse synovial fibroblasts with TRIzol reagent, following the manufacturer's protocol. The RNA was quantified with a RiboGreen Quantitation Kit, and the quality of RNA was determined by formamide agarose gel electrophoresis. Real-time quantitative PCR analyses of RANKL, OPG, and GAPDH were performed on fibroblast-derived reverse-transcribed RNA using the TaqMan Gene Expression Assay. Serial dilutions ranging from 1:1 to 1:8 of cDNA were amplified using GeneAmp Fast PCR Master Mix. The housekeeping gene GAPDH was used as a reference in each sample.

3.2.4. RANKL, OPG protein, and cytokine enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

Conditioned media of human and mouse fibroblast cultures and of mouse sera and paw extracts were analyzed for soluble RANKL (sRANKL), OPG, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-4, and IFN γ using DuoSet ELISA Development kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. After several commercially available ELISA kits were tested for specificity and sensitivity, human sRANKL ELISA kits were purchased from BioVision. The RANKL, OPG, and cytokine concentrations (ng) in

conditioned media were normalized to 1 million fibroblasts, and ng/ml in serum, or ng/mg protein in mouse paw extracts. We also determined the complex form of sRANKL/OPG using cross-capture ELISA systems. For example, if anti-OPG capture antibody was coated, the OPG-RANKL complex, i.e., OPG-bound sRANKL, was detected with anti-RANKL detection antibody and vice versa. Overall, although only 8-10% of OPG was in complex, approximately half the amount of sRANKL was bound to OPG.

3.3. Methods for human angiogenesis study (Study II.)

3.3.1. Explant cultures and conditioned media (CM)

Tissue samples in sterile containers of DMEM and 150 µg/ml gentamicin were transported from the operating room to the laboratory within 5-20 min after removal. Samples were minced (2-4 mm³ in volume) in serum-free DMEM, washed, and representative tissue samples were distributed for explant cultures, RNA and fibroblast isolation, and histologic examination. Approximately 0.5g wet synovial or interface membrane tissue was cultured in 2.5 ml DMEM containing 5% endotoxin-free fetal bovine serum, antibiotic/antimycotic solution, which was supplemented with 50 µg/ml gentamicin. Tissue samples were distributed in 12-well plates, and 90% of the medium was replaced daily for a total of seven days. Media which were harvested every 24 hours were centrifuged at 2500g for 10 min, and aliquots were reserved for cytokine assays, and stored at -20°C until the explant culture system was completed. DMEM containing 5% FBS without tissue samples (medium control) was also incubated for 24 hours at 37°C, harvested, centrifuged, and stored in the same manner as all other conditioned media. Eventually the same patient population, tissues, explant and fibroblast cultures and were used as described in details for RANKL/OPG expression and in vitro osteoclastogenic studies.

3.3.2. Detection of specific protein products by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

All CM were harvested from explant cultures of synovial tissues and IFMs, and treated and untreated fibroblasts for 6 to 96 hr, were analyzed by ELISA. CM were harvested, centrifuged, and aliquots stored at -70°C. TNF-α, IL-1β, MCP-1, IL-6, IL-8, TGFβ1 and VEGF were determined by using capture ELISAs from R&D Systems.

3.3.3. Fibroblast isolation, culture conditions, treatments and selection of CM

Fibroblasts were isolated from synovial tissues of normal joints and IFMs as described. Medium from fibroblast cultures was changed twice a week and passaged at ~0.7x10⁶ cell density per 10-cm Petri-dish for experiments. Fibroblast cultures only after 6-7 passages were used for in vitro experiments. Fibroblasts were pretreated with various compounds, and the inhibitory concentrations were determined in preliminary experiments. Actinomycin D (2 µg/ml) was used to block transcriptional events, cyclohexamide (10 µg/ml) to inhibit protein translation and synthesis, brefeldin A (1 µg/ml) to

inhibit the transport of freshly synthesized proteins from the endoplasmic reticulum to Golgi complex, monensin (2 µg/ml) to block the release of newly synthesized proteins from Golgi, and cytochalasin D (0.5 µg/ml) to destabilize the cytoskeleton, thus inhibiting phagocytosis. Fibroblasts were pretreated with these compounds for 6 hr in control media (DMEM with 10% FBS), and then replaced fresh DMEM or CM-IFM with or without Ti particles, also containing the original concentration of the inhibitor.

3.3.4. RNA isolation and RNase protection assay (RPA)

Fresh tissue samples (~0.2-0.4 g), and those cultured for 7 days were homogenized with a polytron homogenizer on ice. RNA was extracted with TRIzol as described. TRIzol was also used to isolate total RNA from cultured fibroblasts before and after treatments. RPA was performed on 8 µg of RNA using the Riboquant Multiprobe RNase Protection Assay System according to the manufacturer's directions. After preselecting which commercially available cytokine, chemokine, and growth factor templates can be used, a total of five additional custom-made RPA templates were purchased from BD Pharmingen/Bioscience. The custom-made template #65120 was designated to determine a set of angiogenic factors such as RANTES, IP-10, COX-1, COX-2, bFGF, FGF-R, IL-8, Angioproten-1, VEGF and c-myc. Template #65238 represented probes for IL-12, GM-CSF-R α , aFGF, IL-6R α , M-CSF, IL-6, LIF, TIMP-1 and TIMP-2. The #65184 template was designed to quantify the expression levels of human TNF- α , IL-1RI, IL-4, MMP-1, IFN- γ .

3.3.5. Detection of VEGF isoforms by Western blot hybridization

To detect soluble isoforms of VEGF, the most potent angiogenic factor produced by Ti- and/or CM-IFM-treated fibroblasts, the harvested tissue culture media were loaded on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (PAGE) under reducing conditions. To detect non-secreted, and/or membrane-bound VEGF, treated and untreated cells were lysed in an ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, and 1% NP-40) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 unit/ml aprotinin), phosphatase inhibitors (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na-pyrophosphate, 50 mM KF, and 1 mM Na₃VO₄), and 0.1% NaN₃ for 1 h at 4°C. Cell lysates were cleared by centrifugation and 15 µg of protein per lane was separated by 10% SDS-PAGE in reducing conditions. Proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes, membranes were blocked with 1% fat-free milk, stained with mAb or rabbit polyclonal antibody to VEGF. Recombinant human VEGF was used as a positive control, and enhanced chemiluminescence to detect immune reactions.

4. RESULTS

4.1. Examination of RANKL and OPG expression and regulation by human synovial fibroblasts (Study I.)

4.1.1. RANKL and OPG expression by normal and rheumatoid human synovial fibroblasts in response to proinflammatory cytokines

Several studies have demonstrated that human synovial fibroblasts express RANKL on the cell surface and secrete both RANKL and OPG into medium in response to the proinflammatory cytokines TNF α , IL-1 β , and IL-17. We first conducted a systemic determination of dose-dependent and time-dependent RANKL and OPG expression using 2 independent normal human synovial fibroblast populations and 3 rheumatoid synovial fibroblast populations. The expression of RANKL and OPG genes was quantified by real-time quantitative PCR, and protein concentrations were determined by ELISA in the cultured media of the same cultures. In dose-response experiments, the TNF α effect reached a plateau at a concentration of 5 ng/ml, and the IL-1 β effect reached a plateau at a concentration of 1 ng/ml. These cytokine concentrations were then used in time-course experiments. Concentrations of other cytokines were tested in the same manner, and, as described in materials and methods, 5 ng/ml of IL-4, 5 ng/ml of IFN γ , and 25 ng/ml of IL-17 were used in all subsequent experiments employing human synovial fibroblasts. Fibroblasts from RA synovium consistently expressed more RANKL and OPG than fibroblasts from normal synovium in response to the same dose of either TNF α or IL-1 β . By 72 hours, the expression of RANKL and OPG was at least 2-4-fold higher in RA synovial fibroblasts than in normal synovial fibroblasts in the same experimental condition, but the sRANKL:OPG ratios were the same in untreated and cytokine-treated cells.

4.1.2. Suppression of RANKL and OPG expression by IL-4 and IFN γ in cytokine-activated normal and RA synovial fibroblasts

Th1 (IFN γ), Th2 (IL-4), and Th17 (IL-17) T cell-produced cytokines are critical mediators of bone metabolism in inflamed synovium. Although IFN γ and IL-4 are considered to be antiosteoclastogenic, IL-17 promotes osteoclast differentiation and activation. Both IL-4 and IFN γ significantly suppressed TNF α - and IL-1 β -induced sRANKL levels. Thus, both cytokines might indeed exert antiosteoclastogenic effects via the suppression of TNF α - and IL-1 β -induced RANKL expression by fibroblasts. IL-4 alone induced OPG secretion, and this effect was synergistic to the TNF α and IL-1 β effects. IFN γ alone did not affect OPG expression but significantly suppressed the OPG levels in both TNF α - and IL-1 β -stimulated human fibroblast cultures.

In conclusion, Th2-type IL-4 exhibited a strong antiosteoclastogenic effect on both types of synovial fibroblasts by suppressing TNF α - and IL-1 β -induced sRANKL while simultaneously increasing OPG secretion, whereas IFN γ antagonized TNF α - and IL-1 β -induced OPG secretion. Although combined

treatment with TNF α plus IL-4 or IL-1 β plus IL-4 significantly reduced the RANKL: OPG ratios (a critical factor for osteoclastogenesis), the sRANKL:OPG ratios remained the same after treatment with TNF α plus IFN γ or IL-1 β plus IFN γ . IL-17 alone induced both sRANKL and OPG expression, but both factors were significantly lower in IL-17-stimulated cultures than in those treated with either TNF α or IL-1 β , and only additive effects could be detected with combination treatments. Although the secreted amounts of sRANKL and OPG (normalized to 1 million cells) were consistently significantly higher in RA FLS cultures, the sRANKL:OPG ratios in RA and normal FLS cultures were comparable when the same cytokine concentrations were used.

4.2 Examination of RANKL and OPG expression and regulation by mouse synovial fibroblasts (Study I.)

4.2.1. RANKL and OPG expression by wild-type mouse synovial fibroblasts from normal and arthritic joints

To test whether proinflammatory cytokine-controlled RANKL and OPG regulation is similar in human and murine systems, we used mouse synovial fibroblasts (also after 4-5 passages) isolated from normal (naive) and arthritic (PGIA) knee joints of wild-type and gene-deficient (IFN γ ^{-/-} and IL-4^{-/-}) BALB/c mice. As shown for human cells, mouse synovial fibroblasts from arthritic joints expressed approximately twice as much sRANKL and 3-4 times as much OPG in response to either TNF α , IL-1 β , or IL-17 than fibroblasts from normal mouse knee joints. In contrast to human synovial fibroblasts, mouse synovial fibroblasts secreted significantly more sRANKL ($P < 0.001$) and less OPG ($P < 0.05$) in response to IL-1 β treatment compared with TNF α treatment. Thus, IL-1 β seems to be a more osteoclastogenic cytokine than TNF α in the mouse system. Among the cytokines tested, IL-17 alone had a minor effect on RANKL and OPG expression in both naive and arthritic wild-type BALB/c fibroblasts, but no additive effects on RANKL or OPG secretion were detected with combination treatments (TNF α plus IL-17 or IL-1 β plus IL-17). Therefore, IL-17 appeared to have no additive effect on sRANKL or OPG expression in arthritic wild-type animals, indicating a limited role of IL-17 on RANKL/OPG balance in pathologic conditions.

4.2.2. Cytokine-mediated RANKL and OPG expression in synovial fibroblasts from gene-deficient mice

The overall trend of sRANKL and OPG expression in synovial fibroblasts isolated from naive and arthritic knee joints of gene-deficient animals was the same as that described for wild-type (BALB/c) fibroblasts. Exogenous IL-4 and IFN γ were able to completely counteract the gene deficiency, significantly ($P < 0.001$) suppressing both TNF α - and IL-1 β -induced sRANKL secretion, especially in fibroblast cultures derived from arthritic mouse joints. Compared with IFN γ , IL-4 had a more potent

effect in increasing OPG levels in both TNF α - and IL-1 β -stimulated fibroblast cultures. The major difference was that fibroblasts from gene-deficient mice (either IL-4^{-/-} or IFN γ ^{-/-}) produced 2-4 times more RANKL and 3-5 times less OPG than those from wild-type naive or arthritic mice in the same experimental conditions. Clearly, the sRANKL:OPG ratios were dramatically increased, as much as 1-2 orders of magnitude, in IL-4- or IFN γ gene-deficient mice. IL-17 had a synergistic effect on sRANKL expression, when used in combination with either TNF α or IL-1 β , and suppressed or completely blocked OPG secretion by gene-deficient fibroblasts.

4.2.3. RANKL and OPG regulation in wild-type and gene-deficient arthritic mice

The highly coordinated expression of sRANKL and OPG, as reflected by a constant RANKL:OPG ratio in both normal and arthritic synovial fibroblast cultures (either treated or untreated) was completely abrogated in gene-deficient synovial fibroblasts, especially in those exposed to treatment with a combination of proinflammatory cytokines, indicating additional regulatory mechanisms that may exist in vivo. Because RA and its corresponding animal models are all considered to be autoimmune diseases in which the Th1/Th2-type cytokine balance is skewed toward Th1 dominance, wild-type as well as IL-4^{-/-}, IL-17^{-/-}, and IFN γ ^{-/-} mice were immunized with cartilage PG for arthritis induction.

Neither cytokines nor sRANKL were detected in sera from naive mice, and IFN γ , IL-4, and IL-17 were absent in sera obtained from corresponding gene-deficient mice. Levels of all measured serum cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IFN γ , and IL-17) were high in wild-type mice with PGIA but were decreased (by >50%) in IL-4^{-/-} mice, and all cytokine levels were very low, or not detectable, in PG-immunized IFN γ ^{-/-} mice. The serum level of IL-17 was barely detectable in arthritic wild-type mice. Serum levels of sRANKL (both "free" and in complex with OPG) were particularly high in IL-4^{-/-} mice and exceeded the serum sRANKL levels measured in wild-type arthritic or IL-17^{-/-} BALB/c mice. In contrast to sRANKL, serum OPG levels were slightly, almost uniformly, elevated in wild-type and all gene-deficient mice with arthritis as compared with naive mice. OPG levels in arthritic wild-type BALB/c mice were comparable with those in nonimmunized IL-4^{-/-} mice, whereas OPG concentrations were lower in IFN γ ^{-/-} naive and arthritic mice when compared with those in wild-type mice. In sum, although serum levels of RANKL were high in all PG-immunized mice, and sufficient amounts of OPG were present, only limited amounts of sRANKL were "neutralized" with OPG, except in IL-4^{-/-} mice. This phenomenon was clearly seen in paw extracts, where the RANKL:OPG ratio was the highest in IL-4^{-/-} mice. A more severe arthritis developed in IL-4^{-/-} BALB/c mice, with a significantly earlier onset accompanied by massive bone erosions. A milder form of arthritis developed in IFN γ ^{-/-} mice, even after the third PG injection, compared with the severity of PGIA in IL-17-deficient BALB/c mice.

4.3 Examination of angiogenic factors expressed by human synovial fibroblasts (Study II.)

4.3.1. Steady-state mRNA levels in IFM and synovial tissues and selection of “angiogenic” factors

In the first set of experiments, synovial tissue samples from normal and rheumatoid joints were analyzed and their gene expression levels and corresponding cytokine/chemokine secretions were compared to those measured in periprosthetic (IFM) soft tissues. For this purpose, we used commercially available Riboquant Multiprobe RPA templates. After the pre-screening of upregulated genes on different RPA templates, three custom-made templates were designed to measure altered gene expressions in both fresh and explant culture tissues, and then in fibroblast cultures. In addition to TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, VEGF and MCP-1, also measured in an earlier study, four more compounds were quantified in both normal synovial tissues and synovial samples from rheumatoid joints or IFM tissues.

4.3.2. Fibroblasts produce angiogenic factors in response to Ti particles, cytokines, chemokines and growth factors

We have shown that fibroblasts phagocytosed particles either in vivo or in vitro, and responded to Ti, inflammatory cytokines, and CM-IFM stimulation. The response was measured at both transcriptional and translational levels. Therefore, we were interested in (i) how the Ti- and/or CM-induced gene expressions correlate, (ii) what is the level, and time frame, of Ti- and CM-induced gene expressions, and (iii) which genes coding for the most relevant angiogenic factors and/or bone resorbing agents are significantly affected by either Ti or CM stimulation. Among the genes differentially expressed in CM-IFM-treated versus untreated cultures, MCP-1 and IL-6, IL-8, b-FGF, a-FGF, TGF β 1, VEGF, Cox-1 and Cox-2 expressions were the most prominent, and were even higher in the combination of CM-IFM plus Ti treatments. In general, the co-treatment had an additive effect upon VEGF, b-FGF and TGF β gene expression, which was synergistic for IL-8 and Cox-2. Ti alone had no effect on Cox-1 expression in fibroblasts, whereas the CM-IFM induced significant Cox-1 gene expression after 48-hr stimulation. In contrast, both Ti and CM-IFM had an initial, however significant suppressive effect upon Cox-2 gene expression, which then turned to be especially high by 72 hr.

4.3.3. Transcriptional regulation of “angiogenic” factors in fibroblasts in response to stimulation with Ti and/or CM-IFM

As mentioned above, all fibroblasts (from normal or rheumatoid synovial tissue, or from IFM) responded similarly to single (Ti or CM-IFM) or combination treatments. To understand the mechanisms of how and at what level fibroblast activation is affected by either particles, CM, or combination treatments, we used inhibitors to block transcriptional (actinomycin D) or translational (cycloheximide) events, or inhibit intracellular protein transport or phagocytosis via cytoskeleton disorganization. Whenever the IL-6 and VEGF was not secreted (e.g., brefeldin A or monensin-

treatments, data not shown), a negative feed-back pathway suppressed the IL-6- and VEGF-specific mRNA expression as well ($p < 0.01$). Other cytokines, chemokines or growth factors exhibited diverse profiles, whereas most of them were regulated at transcriptional, and only marginally at translational levels. The block of intracellular protein transport or secretion did not affect the transcriptional events. Only the TGF β expression was significantly upregulated in monensin-treated fibroblast cultures, when the TGF β secretion to culture medium was inhibited.

4.3.4. Transcriptional regulation of VEGF in fibroblasts in response to stimulation with Ti and/or CM-IFM

In a more extended experiment, the expression and secretion of VEGF including the three isoforms were studied using IFM fibroblasts. As expected, the gene expression level of VEGF was time dependent, and CM-IFM with or without Ti particles had the highest response. Most of the VEGF protein expressed in response to CM-IFM was the 55kDa (189 amino acid-long) isoform, but it could be retrieved only in cell lysates, i.e., it was cell surface-, most likely heparan sulphate-bound.

5. DISCUSSION

5.1. Synovial fibroblasts producing osteoclastogenic factors by a cytokine controlled manner (Study I.)

In this study, we have shown that synovial fibroblasts of either human or mouse origin are substantial sources of sRANKL and OPG, and that the production of these mediators is regulated by various cytokines such as TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-4, and IFN γ . Importantly, proinflammatory cytokine effects were found to be highly comparable in synovial fibroblasts of different origin. Proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , and IL-17) consistently increased RANKL mRNA and protein expression in both human and mouse synovial fibroblasts, eventually producing the same levels as those measured in human primary osteoblast and mouse spleen T cell cultures. However, this cytokine-induced sRANKL expression correlated closely with elevated OPG expression. These findings suggest that RANKL production is mostly cytokine regulated and not cell-specific, although different cell types respond differently to cytokine stimulation. In contrast to the large number of factors that are involved in osteoclastogenesis, the bone-protective or bone-resorptive antagonist repertoire of various cytokines and growth factors is limited. In this study, we tested IL-4 and IFN γ to confirm their ability to inhibit osteoclastogenesis and to gain an understanding of how these cytokines affect RANKL/OPG production both in vitro by cytokine-stimulated human synovial fibroblasts and in gene-deficient mice during the progression of inflammatory joint destruction.

Previous studies have shown that IL-4 selectively inhibits TNF signaling, acting directly on both osteoclast precursor cells and mature osteoclasts, and reversibly inhibits osteoclastogenesis through the

inhibition of NF- κ B and JNK activation in a STAT-6-dependent manner. IL-4 inhibits RANKL expression by synovial fibroblasts and simultaneously increases OPG secretion. A dramatic shift in the RANKL:OPG ratio can directly affect the differentiation of osteoclast progenitor cells and also inhibits the expression of T cell surface-associated molecules. In this study, we observed that IL-4, alone or in combination with other proinflammatory cytokines, suppressed RANKL production and simultaneously increased OPG expression by fibroblasts. To further confirm this novel observation, we used gene-deficient mouse synovial fibroblasts and observed that RANKL gene expression was highly up-regulated in the absence of IL-4, while OPG production was reduced. Thus, the overall RANKL:OPG ratio became significantly elevated as compared with that in wild-type cells. This elevation was also demonstrated in inflamed joint (paw) extracts from wild-type versus gene-deficient mice with PGIA. This may well explain why we observed unusually aggressive bone resorption in IL-4-deficient mice, supporting the hypothesis that IL-4 is one of the most potent antiosteoclastogenic factors involved in local bone resorption.

Although IFN γ also suppressed proinflammatory cytokine-induced RANKL gene and protein expression, this Th1-type cytokine did not affect, or may even have reduced, OPG secretion in the presence of proinflammatory cytokines. These results, at both the gene and protein levels, were consistent in several independent experiments using normal and RA human synovial fibroblast cultures and IFN γ ^{-/-} mice with PGIA. Therefore, these findings, at least in *in vitro* conditions, appear to contradict the concept that IFN γ has a strong antiosteoclastogenic effect. Although different proinflammatory cytokines seemingly demonstrate strong osteoclastogenic effects via the up-regulation of RANKL, these effects are counteracted by elevated expression of OPG, and most of the released sRANKL is in complex with OPG. However, the osteoclastogenesis-promoting effects of TNF α and IL-1 β and the similar, but slightly less prominent, effect of IL-17 are highly regulated by the antiinflammatory cytokine IL-4, more extensively than by IFN γ or any other cytokines tested to date.

In conclusion, it appears that synovial fibroblasts are highly activated cells in the inflamed synovium, and that their cytokine-rich milieu raises the possibility of robust RANKL/OPG production *in vivo*. The expression of RANKL and OPG is highly regulated by proinflammatory and antiinflammatory cytokines, indicating that synovial fibroblasts may play a substantial role in the initiation and maintenance of bone resorption in inflamed joints.

5.2. Synovial fibroblast plays an important role in angiogenesis and neovascularization (Study II.)

In the first experimental setup of this part of our second study, we have collected synovial tissues from normal, rheumatoid and osteoarthritic joints, and pseudo-(interfacial) membranes of osteolytic lesions to measure the gene expression profiles in fresh tissues and explant cultures, inflammatory cytokines and growth factors in culture media (CM), and the fibroblast responses to various cytokines, chemokines and growth factors detected in CM of explant cultures. Eventually, the periprosthetic microenvironment is very similar to the rheumatoid synovium “supplemented” with an even more drastic local environmental factor: the periprosthetic space is continuously launched with newly generated, non-degradable particulate wear debris. We have shown the overexpression of several angiogenic and osteoclastogenic factors by human IFM fibroblasts (VEGF, MCP-1, M-CSF, IL-8, Cox-1, Cox-2, a-FGF, b-FGF, LIF-1, RANKL and OPG) in response to particulate wear debris and/or cytokine (CM-IFM) stimulation. Cells of this periprosthetic soft tissue, including fibroblasts, are under strong activation pressure due to the continuously generated particulate wear debris, which maintains a chronic state of inflammation. Fibroblasts are actively involved in this detrimental process in that (i) they are continuously stimulated by both prosthetic wear debris and cytokines/growth factors produced by activated macrophages, osteoblasts, and fibroblast (self)-secreted products, (ii) they suppress osteoblast functions, and (iii) they directly or indirectly contribute to osteoclast activation.

While fibroblasts produce large amounts of VEGF in response to various stimuli, they do not respond to VEGF stimulation due to the lack of VEGF receptors Flt-1 and KDR/Flk-1. Exogenous TNF- α significantly upregulated IL-1 β , IL-6, M-CSF, MCP-1 and RANKL, and VEGF.

Taken together, macrophage and fibroblast activations are “natural” processes in the IFM, and the effect of fibroblast activation upon angiogenesis and osteoclastogenesis may be as potent and critical as macrophage activation. In addition, activated fibroblasts produce large amounts of bone-resorbing metalloproteinases accompanied by reduced secretion of tissue-specific metalloproteinase inhibitor, which together with a fibroblast-induced suppression of osteoblast function, suggests a significant role for fibroblasts and fibroblast-derived factors in the development of periprosthetic osteolysis.

6. NOVEL FINDINGS:

» Expression of osteoclastogenic factors by human and mouse synovial fibroblasts (Study I.)

- In our first experimental study we demonstrated that synovial fibroblasts of either human or mouse origin are substantial sources of sRANKL and OPG
- The expression of sRANKL and OPG by synovial fibroblasts is highly regulated by proinflammatory and antiinflammatory cytokines
- sRANKL production is mostly cytokine regulated and not cell-specific
- The expression of sRANKL is closely correlated with elevated OPG expression
- We observed that IL-4, alone or in combination with other proinflammatory cytokines, suppressed RANKL production and simultaneously increased OPG expression by fibroblasts. To further confirm this novel observation, we used gene-deficient mouse synovial fibroblasts and observed that RANKL gene expression was highly up-regulated in the absence of IL-4, while OPG production was reduced. Thus, the overall RANKL:OPG ratio became significantly elevated as compared with that in wild-type cells. This elevation was also demonstrated in inflamed joint (paw) extracts from wild-type versus gene-deficient mice with PGIA. This may well explain why we observed unusually aggressive bone resorption in IL-4-deficient mice, supporting the hypothesis that IL-4 is one of the most potent antiosteoclastogenic factors involved in local bone resorption.
- We contradicted the concept that IFN- γ has a strong antiosteoclastogenic effect because IFN- γ also suppressed proinflammatory cytokine-induced RANKL gene and protein expression, but this Th1-type cytokine did not affect, or may even have reduced, OPG secretion in the presence of proinflammatory cytokines.

» Expression of angiogenic factors by human synovial fibroblasts (Study II.)

- In our second experimental study we have shown the overexpression of several angiogenic and osteoclastogenic factors by human IFM fibroblasts (VEGF, MCP-1, M-CSF, IL-8, Cox-1, Cox-2, a-FGF, b-FGF, LIF-1, RANKL and OPG) in response to particulate wear debris and/or cytokine (CM-IFM) stimulation
- Cells of the IFM or rheumatoid synovium produced significantly more bioreactive compounds *in vitro* than those obtained from normal synovial tissues.
- Reciprocally, while fibroblasts produce large amounts of VEGF in response to various stimuli, they do not respond to VEGF stimulation due to the lack of VEGF receptors Flt-1 and KDR/Flk-1
- We found that MCP-1 was as good a marker of fibroblast activation as IL-6, and both secreted compounds (MCP-1 and IL-6) have an effect on osteoclast activation, although this effect is indirect.
- Fibroblasts, via their TNFRp55, might be involved in both RANKL-dependent osteoclastogenesis,⁴¹ and via their TNF α , IL-1 and growth factor receptors in the neovascularization of the IFM.
- Therefore, many of the angiogenic and osteoclastogenic factors detected in the IFM might derive from activated fibroblasts. These fibroblasts and macrophages are present and adjacent to osteoclasts, and because activated fibroblasts secrete RANKL, VEGF and M-CSF, it may well be that the fibroblast is a key cell-type moderating simultaneously both angiogenesis and osteoclastogenesis in the periprosthetic space.

7. BIBLIOGRAPHY

Articles published in periodicals

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

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

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

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

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

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

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

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

Σ Impact Factor: **43,02**

Peer-reviewed, Published Abstracts

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Σ Impact Factor: **64.744**

Additional podium and poster presentations:

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

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

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

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

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *Degeneratív szegmentális instabilitások kezelése intézetünkben*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2010, Pécs, Hungary

Illés T, **Tunyogi-Csapó M**, Bogyó Cs, Somoskeőy Sz; *A scoliotikus gerinc 3D megjelenítése és jellemzése "csigolyavektorok" használatával: előzetes klinikai tanulmány*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2010, Pécs, Hungary

Tunyogi-Csapó M, Somoskeőy Sz, Bogyó Cs, Illés T; *A spinopelvicus egyensúly szerepe a spondylolisthesis kialakulásában*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2010, Pécs, Hungary

Bogyó Cs, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz, Illés T; *Early onset scoliosis és kezelési eredményei*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2010, Pécs, Hungary

Bogyó Cs, **Tunyogi-Csapó M**, Somoskeőy Sz, Illés T; *A congenitalis gerinc deformitások kezelésével szerzett tapasztalataink*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2010, Pécs, Hungary

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

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

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

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

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

Tunyogi-Csapó M, Koreny T, Vermes Cs, Patczai B, Vámhidy L, Nyárády J, Glant TT; *A synovialis fibroblast mint a patológiás csontreszorpció potenciális regulátora*, Annual Meeting of the Hungarian Orthopaedic Association, 2007, Nyíregyháza

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

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

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express the deepest appreciation to **Professor Tibor T. Glant**, my mentor, who has introduced me to real academic work and continually conveyed a spirit of adventure in regard to research. This thesis would not have been possible without his guidance and kind support.

I am also very grateful to **Professor Tamás Illés** who has introduced me to the field of orthopedics and spinal surgery. Without his persistent encouragement, support and helpful advices I would not have been able to accomplish what I have achieved.

I would like to thank **Dr. László Várhidy**, who had been my chief and mentor in trauma surgery during my residency, for his constant support and encouragement.

Here I would like to express my appreciation to **Professors József Nárády** and **Árpád Bellyei** for their support and guidance during the beginning of my carrier.

I also would like express my sincere gratitude to my friend **Dr. Tamás Bárdos** for providing me the great opportunity of being able to spend almost 3 years in Chicago and also for his unfaltering, friendly support. Many thanks are also due to **Dr. Csaba Vermes** and **Dr. László G. Nót** for their friendly support and valuable discussions.

I am also thankful to all my **colleagues from Departments of Orthopedics and Traumatology, Institute of Musculoskeletal Surgery** and to the members of **Dr Tibor T. Glant`s Lab**, especially to **Professor Katalin Mikecz, Dr. Tamás Koreny, Mariann Radács, Dr. Zoltán Szabó, Dr. Anikó Végvári, Katalin Kis-Tóth** for their endless support and helpful advices.

Especially, I express my most sincere thank and eternal gratitude to my family, particularly my parents and my wife, for their love, sacrifice and encouraging support.