

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΡΘΡΩΣΕΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΝΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

Π. Γιαννούτσου¹, Π. Καστανά², Α. Κασπίρης², Χ. Κοντογιάννης^{1,3}, Ε. Παπαδημητρίου², Μ. Όρκουλα^{1,*}

¹Εργαστήριο Ενόργανης Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

²Εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

³ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, Πάτρα, Ελλάδα

(*malbie@upatras.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Πλειοτροπίνη (PTN) είναι ένα εκκρινόμενο πεπτίδιο, το οποίο λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας και έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, χωρίς όμως να είναι γνωστός μέχρι σήμερα ο ρόλος του στην παθοφυσιολογία της ασθένειας. Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια χρόνια, εκφυλιστική ασθένεια που προσβάλλει τις αρθρώσεις (κυρίως γόνατο και ισχίο) και η βασική παθολογία της περιλαμβάνει λέπτυνση του αρθρικού χόνδρου και σκλήρυνση του υποχόνδρινου οστού. Στην παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία δόνησης Raman, μία μη καταστρεπτική τεχνική που παρέχει πληροφορίες για τη σύσταση του ακτινοβολούμενου δείγματος, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταβολών στη χημική σύσταση κεφαλών μηριαίου οστού και αρθρώσεων γόνατου, προερχόμενων από μύες που εξέφραζαν την PTN ("control", +/+) και μύες στους οποίους έχει γίνει ολική απαλοιφή του γονιδίου της PTN ("knock-out", -/-). Ακόμη χρησιμοποιήθηκε και η μικροτομογραφία ακτίνων Χ για τη δημιουργία τρισδιάστατων απεικονίσεων. Παρατηρήθηκε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αυξητικού παράγοντα και της οστεοαρθρίτιδας, διότι σε μεγάλες ηλικίες η έλλειψη PTN οδηγεί σε εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου και εκδήλωση της πάθησης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Πλειοτροπίνη (PTN) είναι ένα εκκρινόμενο, πλούσιο σε Λυσίνη πεπτίδιο το οποίο λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας. Παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική και την παθολογική αγγειογένεση, ενώ ίσως να επηρεάζει την οστική ανάπτυξη και ανακατασκευή. Έρευνες υποδεικνύουν πως πιθανώς εμπλέκεται και στην εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας, όμως η συσχέτιση της PTN με τη σκελετική ομοίωση και τις σκελετικές ασθένειες, είναι υπό διερεύνηση^[1,2].

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια εκφυλιστική ασθένεια των οστών που εμφανίζεται περίπου στο 25% του πληθυσμού, ηλικίας άνω των πενήντα χρόνων. Αποτελεί χρόνια ασθένεια και επηρεάζει αρνητικά τις αρθρώσεις, κυρίως του γόνατος και του ισχίου. Η βασική παθολογία της περιλαμβάνει υποβάθμιση του αρθρικού χόνδρου και μεταβολές του υποχόνδρινου οστού. Η κατάσταση των αρθρώσεων εκτιμάται συνήθως με κλινική εξέταση, μελέτες απεικόνισης και ιστοπαθολογικές αναλύσεις, χωρίς όμως κάποια από αυτές να προσφέρει πληροφορίες για τις πρώιμες αλλαγές^[3].

Ο χόνδρος είναι ένας εξαιρετικά ειδικευμένος ιστός που καλύπτει τις αρθρώσεις, με σκοπό την προστασία των οστών από βλάβες λόγω τριβής και μηχανικού φορτίου. Εξαιτίας της φυσιολογίας του (δεν διαθέτει αιμοφόρα αγγεία) έχει περιορισμένη δυνατότητα ανάπτυξης. Χαρακτηριστικές αλλοιώσεις που συμβαίνουν σε ένα οστεοαρθρικό οστό είναι η εξασθένηση του δικτύου των ινών κολλαγόνου, η λέπτυνση του χόνδρου και κατά συνέπεια η έκδυση του υποχόνδρινου οστού^[4,5].

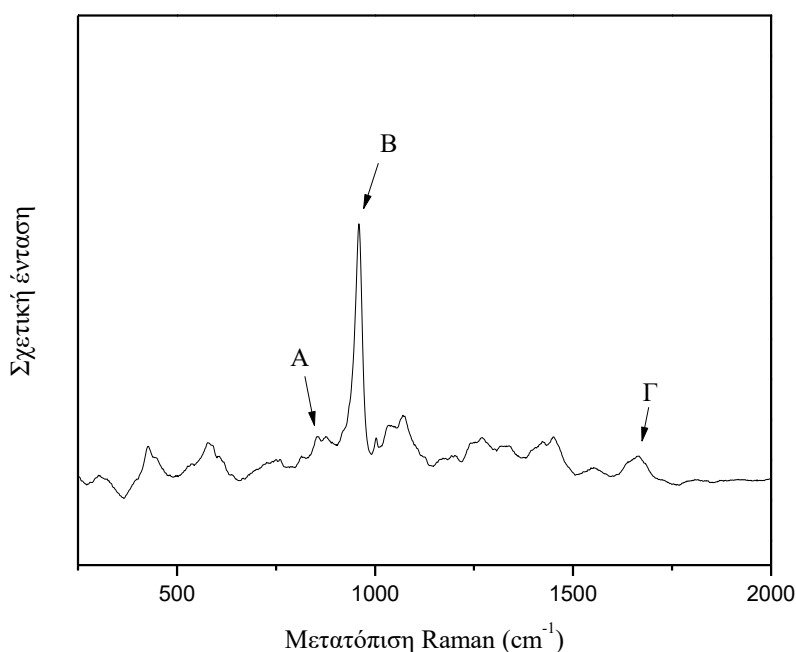
Η φασματοσκοπία δόνησης Raman είναι τεχνική που δίνει πληροφορίες για τη χημική σύσταση του υπό ανάλυση δείγματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση των οστών. Η μικροτομογραφία ακτίνων Χ αποτελεί τεχνική τρισδιάστατης απεικόνισης, και παρέχει πληροφορίες για τη δομική ακεραιότητα των οστών. Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η μελέτη της μεταβολής της σύστασης των αρθρώσεων πειραματοζώων με έλλειψη του αυξητικού παράγοντα PTN σε σύγκριση με αντίστοιχους μάρτυρες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί μύες, strain C57BL/6, ηλικίας ενάμιση μήνα και ενός χρόνου. Η κάθε ηλικιακή ομάδα περιλάμβανε μύες που εξέφραζαν την PTN (control, *Ptn*^{+/+}) και μύες στους οποίους έχει γίνει ολική απαλοιφή του γονιδίου της PTN knock-out, *Ptn*^{-/-}). Από κάθε μυ απομονώθηκε το δεξί πίσω άκρο, ο ιστός απομακρύνθηκε μηχανικά, τα δείγματα τυλίχθηκαν σε αποστειρωμένη γάζα εμποτισμένη με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline – PBS) και διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους. Φασματόμετρο Raman συζευγμένο με οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φασμάτων από την άρθρωση του ισχίου και του γονάτου.

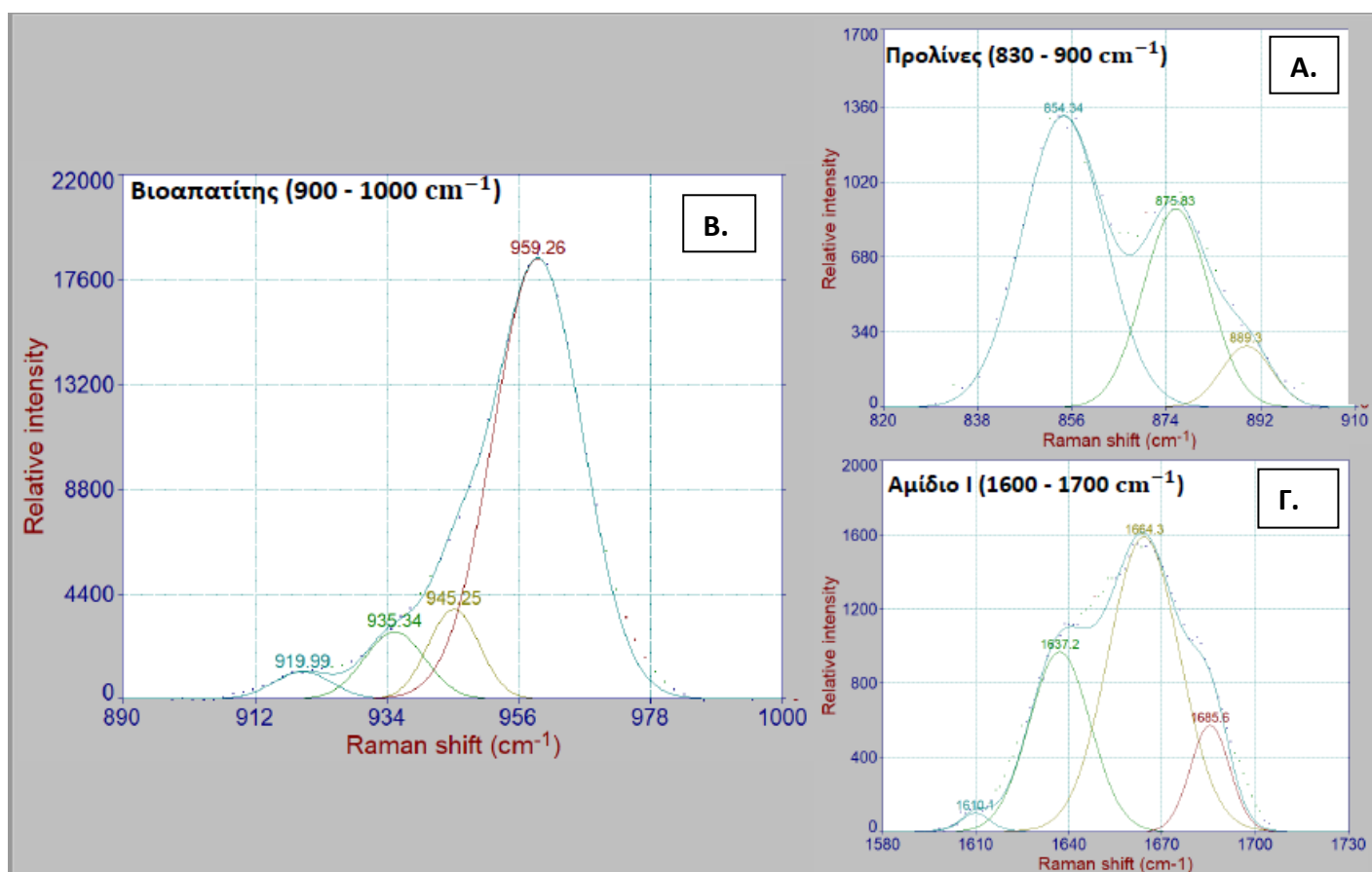
Μελετήθηκαν κορυφές του φάσματος Raman των οστών, όπως η κύρια κορυφή των φωσφορικών (PO_4^{3-}) του βιοαπατίτη στους 960 cm^{-1} , οι κορυφές στους 855 cm^{-1} , 875 cm^{-1} και 920 cm^{-1} (προλίνη και υδροξυπρολίνη του κολλαγόνου) και οι δύο κύριες κορυφές της ευρείας περιοχής του αμιδίου I του κολλαγόνου (1668 cm^{-1} , 1688 cm^{-1}). Η αποσυνέλιξη των κορυφών που επικαλύπτονταν κάτω από ευρύτερες μπάντες έγινε με υπολογιστικό πρόγραμμα (Peakfit© v4.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA). Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίστηκε η αναλογία βιοπατίτη προς κολλαγόνο (Mineral to Matrix Ratio – MMR) και μη-αναγώγιμων προς αναγώγιμους σταυροδεσμούς (Cross-Linking Ratio, CLR) που είναι ένας δείκτης ποιότητας του δικτύου του κολλαγόνου. Τέλος, επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων από τη φασματοσκοπία Raman έγινε με μικροτομογραφία Ακτίνων-Χ (micro-CT) στα ίδια δείγματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

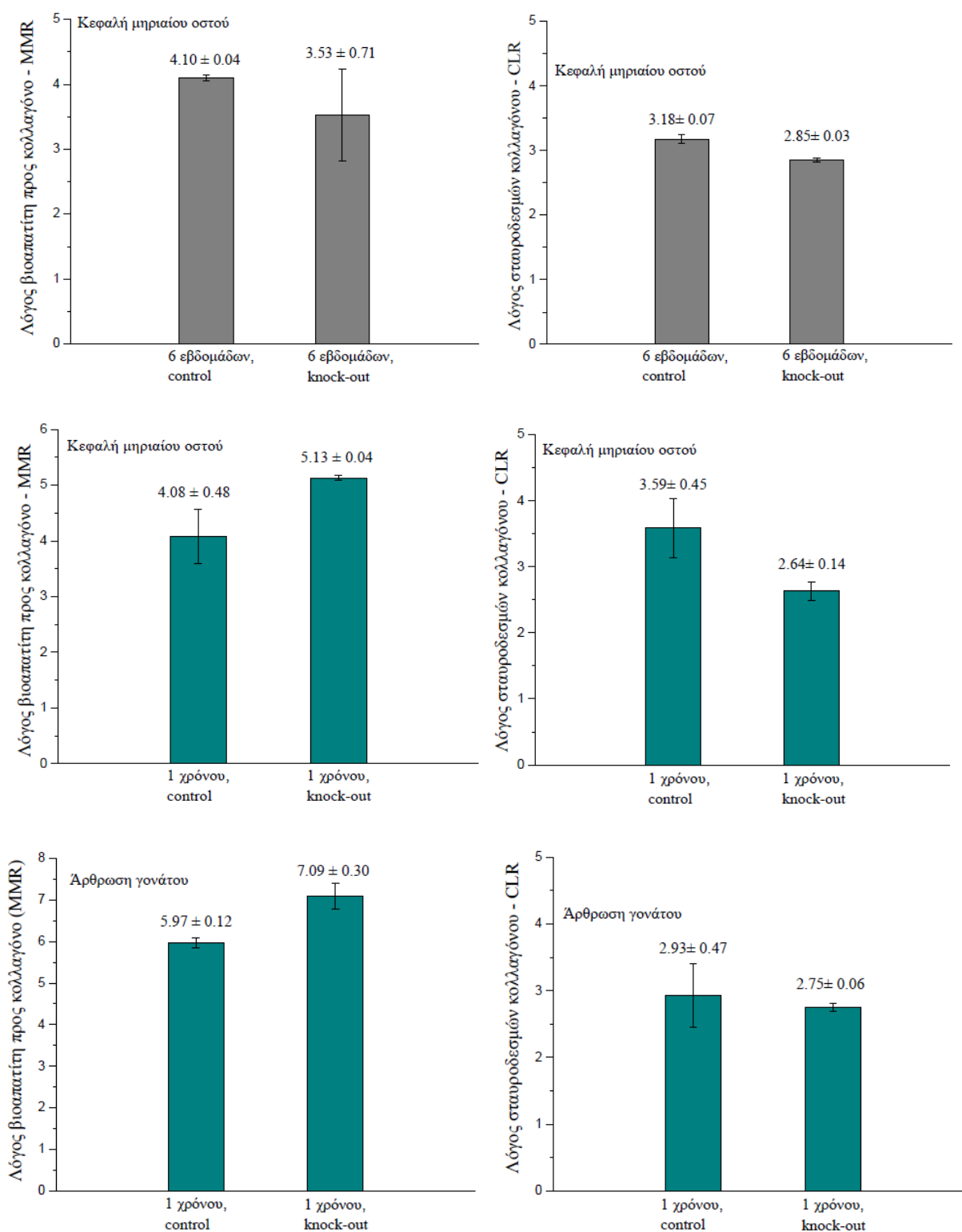


Σχήμα 1. Φάσμα *micro-Raman* υποχόνδριου οστού. Σημειωμένες είναι οι περιοχές προλίνης και υδροξυπρολίνης του κολλαγόνου (A), του βιοαπατίτη (B) και του αμιδίου I (Γ).

Ενδεικτικό φάσμα Raman υποχόνδρινου οστού που συλλέχθηκε από την κεφαλή του μηριαίου οστού παρατίθεται στο σχήμα 1. Επισημασμένες είναι οι περιοχές με τις χαρακτηριστικές κορυφές που αναλύθηκαν στην πορεία. Επειδή οι κορυφές αυτές παρουσιάζουν επικάλυψη, διεξήχθη αποσυνέλιξη (deconvolution) των ευρέων ζωνών σε κάθε περιοχή του φάσματος που προαναφέρθηκε (σχήμα 2). Ύστερα από μετρήσεις του ύψους των διαχωρισμένων πλέον κορυφών, υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα οι αναλογίες MMR [ύψος 960cm^{-1} /ύψος ($855\text{cm}^{-1} + 876\text{cm}^{-1} + 921\text{cm}^{-1}$)] και ο δείκτης ποιότητας του δικτύου του κολλαγόνου CLR [ύψος 1668cm^{-1} /ύψος 1688cm^{-1}]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.



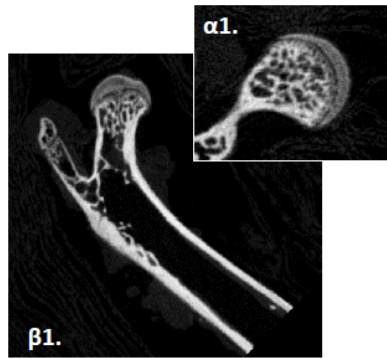
Σχήμα 2. Διαχωρισμός κορυφών στην περιοχή $830\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (A), στην περιοχή $900\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ του βιοπατίτη (B) και στην περιοχή $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ του αμιδίου I (Γ).



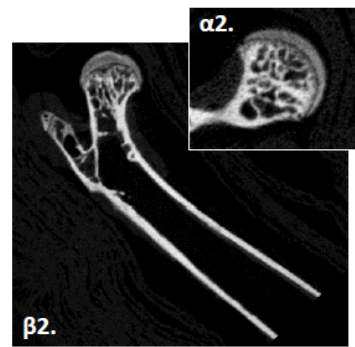
Σχήμα 3. Αναλογίες χαρακτηριστικών κορυφών των φασμάτων Raman των οστών για τις δύο ηλικιακές ομάδες δειγμάτων που μελετήθηκαν. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (N=2).

Παρατηρήθηκε ότι στα νεαρά (1.5 μήνα) *Ptn*^{-/-} πειραματόζωα, δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική μεταβολή του δείκτη MMR της κεφαλής μηριαίου οστού ή στο δείκτη ποιότητας του δικτύου κολλαγόνο, συγκριτικά με τα control δείγματα. Από τις εικόνες τους στο CT (σχήμα 4) είναι εμφανές ότι δεν υπάρχουν διαφορές στη φυσιολογία των αρθρώσεων, ενώ παράλληλα αποτυπώνεται η υγιής κατάσταση του χόνδρου που προστατεύει την άρθρωση, αλλά και το πυκνό δίκτυο που σχηματίζει το σπογγώδες (trabecular) υποχόνδρινο οστό.

Control group, 6 weeks



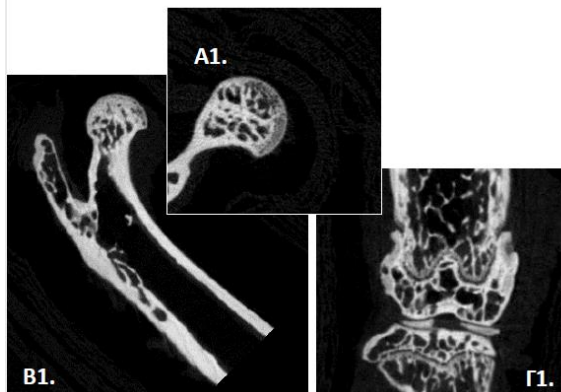
Knock-out group, 6 weeks



Σχήμα 4. Εικόνες που λήφθηκαν από *micro-CT* για πειραματόζωα ηλικίας έξι εβδομάδων. Τομή κεφαλής μηριαίου οστού από πειραματόζωο control (α1) και από πειραματόζωο knock-out (α2). Τομή μηριαίου οστού από πειραματόζωο control ηλικίας έξι εβδομάδων (β1) και από knock-out (β2).

Άξιο επισήμανσης είναι ότι από τα φάσματα Raman των αρθρώσεων control δειγμάτων προκύπτει MMR διάφορο του μηδενός, άρα το σήμα που λαμβάνεται προέρχεται από τον χόνδρο και το υποχόνδρινο οστό. Σε knock-out πειραματόζωα ηλικίας ενός χρόνου εντοπίζεται στατιστικώς σημαντική αύξηση του λόγου βιοαπατίτη προς κολλαγόνο στα φάσματα που πάρθηκαν από την κεφαλή του μηριαίου οστού και την άρθρωση του γονάτου σε σχέση με τα control δείγματα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το σήμα που λαμβάνεται προέρχεται περισσότερο από το υποχόνδρινο οστό της άρθρωσης, το οποίο μάλλον είναι εκτεθειμένο λόγω φθοράς του χόνδρου. Ακόμη, παρατηρείται μείωση του λόγου των σταυροδεσμών του κολλαγόνου, άρα πιθανώς υποβάθμιση της ποιότητάς του. Τα παραπάνω στοιχεία από τις αρθρώσεις των *Ptn^{-/-}* μυών παραπέμπουν σε αλλοιώσεις που προσομοιάζουν της οστεοαρθρίτιδας. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman επαληθεύονται και από τις εικόνες που λήφθηκαν από το *micro-CT* (σχήμα 5). Στα δείγματα από *Ptn^{+/+}* και *Ptn^{-/-}* μύες ηλικίας ενός χρόνου, οι εικόνες των κεφαλών μηριαίου οστού διαφέρουν σημαντικά. Στο control δείγμα (σχήμα 5-A1), ο χόνδρος που καλύπτει το ισχίο είναι εμφανής, ενώ στο αντίστοιχο knock-out δείγμα έχει αβεστοποιηθεί (σχήμα 5-A2). Στο knock-out, το υποχόνδρινο οστό είναι εκτεθειμένο και στο εσωτερικό του φαίνεται να υπάρχει λιγότερο σπογγώδες (trabecular) οστό συγκριτικά με το control. Η μείωση του σπογγώδους οστού είναι έκδηλη και στις εικόνες των αρθρώσεων του γονάτου (σχήμα 5-Γ1 και 5-Γ2), όπου το συμπαγές (cortical) οστό φαίνεται πιο λεπτό στην εικόνα του knock-out, ενώ χόνδρος δε διακρίνεται σε κανένα από τα δύο.

Control group, 1 year



Knock-out group, 1 year



Σχήμα 5. Εικόνες που λήφθηκαν από *micro-CT* για πειραματόζωα ηλικίας ενός χρόνου. Τομή κεφαλής μηριαίου οστού από πειραματόζωο control (A1) και από πειραματόζωο knock-out (A2). Τομή μηριαίου οστού από πειραματόζωο control (B1) και από πειραματόζωο knock-out (B2). Τομή άρθρωσης γονάτου από πειραματόζωο control (Γ1) και knock-out (Γ2).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία Raman για τη μελέτη αρθρώσεων μυών που εξέφραζαν την PTN και μυών στους οποίους είχε γίνει ολική απαλοιφή του γονιδίου, προκειμένου να ανιχνευθούν τυχόν μεταβολές στη χημική σύσταση των οστών. Σε knock-out πειραματόζωα ηλικίας ενός χρόνου, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του λόγου βιοαπατίτη προς κολλαγόνο της κεφαλής του μηριαίου οστού και της άρθρωσης του γονάτου σε σχέση με τα control δείγματα. Το στοιχείο αυτό παραπέμπει στο ότι το σήμα που λαμβάνεται προέρχεται περισσότερο από το υποχόνδρινο οστό της άρθρωσης, το οποίο είναι εκτεθειμένο μάλλον λόγω φθοράς του χόνδρου. Ακόμη, παρατηρείται μείωση του λόγου των σταυροδεσμών του κολλαγόνου, άρα πιθανώς υποβάθμιση της ποιότητάς του. Τα παραπάνω στοιχεία από τις κεφαλές των μηριαίων οστών των *Ptn*^{-/-} μυών παραπέμπουν σε αλλοιώσεις που προσομοιάζουν της οστεοαρθρίτιδας. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται και από τις εικόνες που λήφθηκαν από το micro-CT. Ο χόνδρος δε διακρίνεται στα δείγματα από *Ptn*^{-/-} μύες ηλικίας ενός χρόνου, ενώ είναι εμφανής στα αντίστοιχα δείγματα μυών *Ptn*^{+/+}. Όσον αφορά στα πειραματόζωα ηλικίας ενάμιση μήνα, παρουσιάζεται στατιστικώς μη σημαντική απόκλιση του λόγου βιοαπατίτη προς κολλαγόνο και του λόγου των σταυροδεσμών του κολλαγόνου στις κεφαλές των knock-out δειγμάτων. Επιπλέον δεν παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των εικόνων control και knock-out κεφαλών μηριαίου στο micro-CT.

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αυξητικού παράγοντα PTN και της υγείας των οστών. Συγκεκριμένα, στις μεγάλες ηλικίες η έλλειψη PTN οδηγεί σε εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου και εκδήλωση πάθησης που τα έως τώρα αποτελέσματα υποδεικνύουν ως οστεοαρθρίτιδα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μέρος του έργου συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Lamprou, A. Kaspiris, E. Panagiotopoulos, P.V. Giannoudis, E. Papadimitriou, The role of pleiotrophin in bone repair, *Injury*, 45 (2014) 1816-1823.
- [2] A. Kaspiris, C. Mikelis, M. Heroult, L. Khaldi, T.B. Grivas, I. Kouvaras, S. Dangas, E. Vasiliadis, F. Lioté, J. Courty, E. Papadimitriou, Expression of the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta in the serum, cartilage and subchondral bone of patients with osteoarthritis, *Joint Bone Spine*, 80 (2013) 407-413.
- [3] S. Glyn-Jones, A.J.R. Palmer, R. Agricola, A.J. Price, T.L. Vincent, H. Weinans, A.J. Carr, Osteoarthritis, *The Lancet*, 386 (2015) 376-387.
- [4] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function, *Sports Health*, 1 (2009) 461-468.
- [5] A.M. Bhosale, J.B. Richardson, Articular cartilage: structure, injuries and review of management, *British Medical Bulletin*, 87 (2008) 77-95.