

## Szpik kostny – funkcje fizjologiczne i udział w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów

*Bone marrow – physiological functions and its contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis*

Weronika Kurowska, Ewa Kuca-Warnawin, Włodzimierz Maśliński

Zakład Patofizjologii i Immunologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. biol. Włodzimierz Maśliński, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

**Słowa kluczowe:** szpik kostny, reumatoidalne zapalenie stawów, immunopatogeneza.

**Key words:** bone marrow, rheumatoid arthritis, immunopathogenesis.

### Streszczenie

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują, że szpik kostny funkcjonuje nie tylko jako narząd krwiotwórczy, lecz również jako wtórny narząd limfatyczny, w którym może być zainicjowana odpowiedź immunologiczna. Dane eksperymentalne i obserwacje kliniczne wskazują, że szpik kostny uczestniczy w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów, ponieważ jest miejscem akumulacji aktywowanych limfocytów i wytwarzania czynników prozapalnych. W artykule opisano w zarysie rolę szpiku kostnego w prawidłowej (fizjologicznej) odpowiedzi immunologicznej. Przedstawiono również wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, które potwierdzają udział szpiku kostnego w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów.

### Summary

It was recently shown that bone marrow functions not only as a primary lymphoid organ responsible for hematopoiesis, but also as a secondary lymphoid organ, where inflammatory response can be initiated. In addition, accumulating reports have indicated that bone marrow participates in the development of rheumatoid arthritis as a site of activated lymphocytes homing and proinflammatory cytokines overproduction. In the present paper, the role of bone marrow in normal (physiological) immune response is briefly described. Moreover, the results of experimental and clinical investigations that confirm the contribution of bone marrow to the pathogenesis of rheumatoid arthritis are reviewed.

## Fizjologiczne funkcje szpiku kostnego

### Krwiotworzenie

U dorosłego człowieka szpik kostny stanowi główne miejsce hematopoezy (szpik kostny czerwony), w którym powstają erytrocyty, granulocyty, monocyty, płytki krwi, limfocyty B oraz prekursorzy limfocytów T i komórek tucznych. Szpik kostny jest także źródłem komórek prekursorowych śródbłonna, fibroblastów, osteoblastów i chondrocytów. Po zakończeniu procesu dojrzewania w szpiku kostnym komórki emigrują do krążenia poprzez

rozbudowany system naczyń krwionośnych typu zatokowego. Wraz z wiekiem czynność krwiotwórcza szpiku kostnego ulega u ludzi zmniejszeniu, gdyż komórki krwiotwórcze są stopniowo zastępowane tkanką tłuszczową (szpik kostny żółty). U człowieka w wieku 20 lat szpik czerwony jest zachowany jedynie w jamach szpikowych kości szkieletu osiowego (czaszka, żebra, kręgosłup, mostek, miednica) oraz nasadach kości długich.

Zrąb szpiku kostnego jest zbudowany z tkanki łącznej właściwej luźnej, tworzonej przez macierz zewnątrzkomórkową (proteoglikany, włókna kolagenowe, siatecz-

---

### Adres do korespondencji:

prof. dr hab. biol. Włodzimierz Maśliński, Zakład Patofizjologii i Immunologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel./faks +48 22 844 25 40, e-mail: zpatiir@warman.com.pl

**Praca wpłynęła:** 15.07.2010 r.

kowe, sprężyste) oraz komórki zrębowe: siateczkowe, fibroblastopodobne, macierzyste, osteoblasty oraz adipocyty. Miąższ szpiku kostnego stanowią wytwarzane w nim komórki, będące na różnych etapach dojrzewania. Komórki zrębowe szpiku kostnego tworzą nisze tkankowe i wydzielają czynniki regulujące wzrost, różnicowanie i migrację hematopoetycznych komórek prekursorowych. W przypadku limfocytów B czynniki wydzielane przez komórki zrębowe szpiku kostnego (np. interleukina 7 – IL-7) są też niezbędne do tego, aby mogła nastąpić rekombinacja genów kodujących przeciwciała, co w konsekwencji przyczynia się do różnorodności klonów limfocytów B. Należy ponadto nadmienić, że komórki zrębowe szpiku kostnego mają właściwości immunoregulacyjne wobec komórek układu odpornościowego uczestniczących w inicjacji odpowiedzi zapalnej. Wykazano, że *in vitro* indukują one anergię lub apoptozę, jak również modulują wytwarzanie cytokin, wpływają na proliferację oraz różnicowanie limfocytów T i B, komórek NK lub komórek dendrytycznych [1].

### Rozwój i podtrzymanie pamięci immunologicznej

W szpiku kostnym zachodzi intensywne wymiana komórek, które migrują do i z krążenia. Szpik opuszczają dojrzewające tutaj komórki, które z krążącą krwią przemieszczają się do węzłów limfatycznych i tkanek obwodowych, natomiast z krążenia do szpiku mogą powracać starzejące się (preapoptotyczne) neutrofile i komórki dendrytyczne. Wśród komórek cyrkulujących do i ze szpiku kostnego są także hematopoetyczne komórki macierzyste oraz dojrzałe naiwne limfocyty T i B. Wyniki ostatnich badań wykazały, że szpik kostny jest tkanką istotną dla rozwoju i podtrzymania pamięci immunologicznej. Gromadzą się w nim limfocyty pamięci T CD8+ i efektorowe limfocyty T CD4+ [2, 3]. Tropizm do szpiku kostnego wykazują także limfocyty pamięci B [4] oraz plazmoblasty [5]. Plazmoblasty, po zasiedleniu szpiku kostnego, różnicują się w długo żyjące komórki plazmatyczne, które przez długi czas życia osobniczego, w sposób niezależny od stymulacji antygenem, mogą wytwarzać przeciwciała. Warto nadmienić, że szpik kostny dorosłego człowieka jest głównym źródłem przeciwciał obecnych w krążeniu. Wykazano, że komórki zrębowe szpiku kostnego, wydzielając homeostatyczne cytokiny (CXCL12, IL-7, IL-15), tworzą unikatowe mikrośrodowisko podtrzymujące proliferację, różnicowanie oraz przeżycie komórek pamięci immunologicznej [6]. Liczba dostępnych nisz, definiowanych przez komórki zrębowe szpiku kostnego, decyduje o liczbie przeżywających komórek pamięci, co ostatecznie wpływa na nasilenie odpowiedzi immunologicznej [6].

### Inicjacja odpowiedzi immunologicznej

Wraz z krwią do szpiku kostnego mogą docierać antygeny pochodzące np. z mikroorganizmów (lub żywe mikroorganizmy) albo komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że komórki szpiku kostnego wykazują reaktywność na antygeny mikroorganizmów lub ich syntetyczne analogi. Aktywacja wczesnych prekursorów komórek hematopoetycznych lub limfocytów T CD4+ może np. preferencyjnie stymulować mielopoiezę i równocześnie hamować limfopoiezę u myszy [7, 8]. Preferencyjne dojrzewanie komórek mieloidalnych może być korzystne w rozwoju wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na infekcje. Jednak wnikać do szpiku kostnego antygeny mikroorganizmów mogą zaburzać negatywną selekcję limfocytów B i tolerancję na własne antygeny [9]. Co więcej, wykazano, że dojrzałe naiwne limfocyty B, znajdujące się w pobliżu naczyń krwionośnych, mogą być aktywowane w szpiku (w sposób niezależny od limfocytów T), przez bakterię *Salmonella typhimurium* napywającą z krwią obwodową [10]. Krążące we krwi antygeny mogą być też „wychwytywane” lub transportowane do szpiku kostnego przez rezydujące tutaj [11] lub migrujące z tkanek obwodowych [12] komórki dendrytyczne. Następnie komórki dendrytyczne prezentują antygeny obecnym w szpiku kostnym limfocytom T. Prowadzi to do aktywacji limfocytów T CD4+ i CD8+ oraz wytworzenia funkcjonalnych limfocytów T efektorowych i pamięci [11, 12]. Co ciekawe, prezentacja antygeny w szpiku kostnym jest bardziej efektywna niż w śledzionie czy węzłach limfatycznych, ponieważ skutkuje szybszą aktywacją i intensywniejszą proliferacją limfocytów T [11]. Stwierdzono, że kooperacja komórek dendrytycznych i cytotoksycznych limfocytów T szpiku kostnego daje bardzo dobre wyniki w zwalczaniu komórek nowotworowych zlokalizowanych w tkankach obwodowych. W porównaniu z węzłami limfatycznymi szpik kostny zapewnia systemową, protekcyjną i długotrwałą odpowiedź cytotoksyczną na krążące antygeny nowotworu [11]. Dlatego też reaktywowane *in vitro* antygenami nowotworowymi autologiczne limfocyty T oraz komórki dendrytyczne pobrane ze szpiku kostnego znalazły zastosowanie w próbach klinicznych eksperymentalnej immunoterapii nowotworów [13].

Szpik kostny może być też rezerwuarem antygenów fagocytowanych przez monocyty, które następnie transportują je do obwodowych narządów limfatycznych. W obwodowych narządach limfatycznych migrujące ze szpiku kostnego monocyty mogą prezentować zgromadzone wewnątrzkomórkowo, przetworzone antygeny i indukować proliferację limfocytów T [14]. W wyniku rozprzestrzeniania się antygenów ze szpiku kostnego może więc zostać zaindukowana odpowiedź zapalna w tkan-

kach obwodowych. Następuje to np. wtedy, gdy zainfekowane *Listeria monocytogenes* szpikowe komórki mieloidalne ułatwiają bakterii pokonanie bariery krwi-mózg, powodując zapalenie opon mózgowych i mózgu u myszy [15].

Wyniki powyższych badań wskazują zatem, że szpik kostny uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej nie tylko jako źródło komórek układu odpornościowego (centralny narząd limfatyczny), ale również jako wtórny narząd limfatyczny, gdzie może zostać zainicjowana i podtrzymywana odpowiedź immunologiczna [11, 12, 16] (ryc. 1).

### Szpik kostny w zwierzęcych modelach reumatoidalnego zapalenia stawów

Wyniki badań przewlekłego, destrukcyjnego zapalenia stawów przypominającego RZS, które przeprowadzono z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, wskazują na rolę szpiku kostnego w patogenezie tego schorzenia. Z jednej strony wykazano, że u zdrowych myszy zapalenie stawów można wywołać poprzez przeszczep komórek szpiku kostnego pobranych od myszy z indukowanym podaniem antygenem zapaleniem stawów (*antigen-induced arthritis* – AIA) [17]. Z drugiej strony u myszy SKG/Jcl ze spontanicznie rozwijającym się zapaleniem stawów oraz u myszy z kolagenowym zapaleniem stawów (*collagen induced arthritis* – CIA), profilaktyczna i terapeutyczna transplantacja alogenicznego szpiku kostnego zmniejszała zachorowalność i łagodziła objawy chorobowe (przekrwienia i obrzęku stawów, destrukcji chrząstki i kości stawowych). Towarzyszyło temu także normalizacja parametrów immunologicznych (odsetka limfocytów T CD4+ wykazujących ekspresję

się liganda receptora aktywującego NF- $\kappa$ B (*receptor-activator of NF- $\kappa$ B ligand* – RANKL), odsetka limfocytów T regulatorowych, stężenia cytokin prozapalnych w surowicy) [18, 19].

Efekty uzyskane w wyniku przeszczepu szpiku kostnego mogą wiązać się z faktem, że w przebiegu eksperymentalnie wywołanego zapalenia stawów szpik kostny jest tkanką objętą zapaleniem. W szpiku kostnym u myszy z nadprodukcją ludzkiego czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor* – TNF) (rozwijających spontanicznie zapalenie stawów) zaobserwowano tworzenie się nacieków komórek zapalnych (głównie aktywowanych limfocytów B), które tworzyły agregaty w kości podchrzęstnej (*subchondral bone*) graniczącej ze szpikiem kostnym i błoną maziową. Obecność tych infiltratów korelowała pozytywnie z nasileniem objawów chorobowych u tych zwierząt. Zablockowanie aktywności biologicznej prozapalnej cytokiny – TNF – skutkowało zahamowaniem formowania się oraz zmniejszeniem rozmiarów agregatów tkanki zapalnej w szpiku kostnym tych myszy. Towarzyszyło temu zahamowanie zapalenia błony maziowej i destrukcji kości [20]. W naciekach komórkowych błony maziowej czy pochewkach ścięgniętych u myszy z zapaleniem stawów indukowanym podaniem glikozaminoglikanów chrząstki stwierdzano natomiast obecność dużej liczby autoreaktywnych limfocytów T CD4+. Okazało się, że u tych myszy szpik kostny stanowi preferencyjne miejsce akumulacji patogennych limfocytów T CD4+ [21].

Wykazano także, że szpik kostny promuje destrukcję kości. Komórki szpiku kostnego u szczurów z podścielkowym zapaleniem stawów wykazują zwiększoną zdolność do spontanicznego różnicowania się w aktywne osteoklasty, a ten proces jest nasilany przez czynniki osteoklastogene obecne w nadsączkach szpikowych [22].



Ryc. 1. Rola szpiku kostnego w odpowiedzi immunologicznej.

Fig. 1. Role of the bone marrow in immunological response.

W wielu modelach doświadczalnych RZS zapalenie związane jest z obecnością autoprzeciwciał w surowicy zwierząt. Utrzymaniu puli autoreaktywnych przeciwciał mogą sprzyjać: poliklonalna aktywacja autoreaktywnych limfocytów B przez antygeny mikroorganizmów bądź zaburzenia mechanizmów zapewniających tolerancję na własne antygeny, w tym mechanizmów centralnych – operujących w szpiku kostnym. Dlatego też istotna może być obserwacja, że szpikowe niedojrzałe lub przejściowe limfocyty B mogą być aktywowane przez lipopolisacharyd ścian bakterii lub syntetyczne analogi bakteryjnego DNA – niemetylowane oligodeoksynukleotydy zawierające motywy CpG (CpG-ODN – *CpG-oligodeoxynucleotides*), które są specyficznymi i efektywnymi ligandami receptora Toll-podobnego 9 (*Toll-like receptor 9* – TLR9) *in vivo* i *in vitro* [9]. Aktywacja za pomocą tych egzogennych cząsteczek zaburza proces negatywnej selekcji i rekombinacji genów immunoglobulinowych w tych komórkach, co prowadzi do wytwarzania auto-przeciwciał u myszy, wskazując na rolę szpiku kostnego i czynników infekcyjnych w indukcji immunizacji [9].

Za udziałem czynników infekcyjnych w rozwoju zapalenia stawów przemawia także fakt, że do wywołania choroby w wielu modelach eksperymentalnych (np. we wspomnianych wcześniej CIA lub AIA) oprócz artrogeennego antygeny stosuje się adiuwanty zawierające antygeny mikroorganizmów, np. kompletny adiuwant Freund, w którego skład wchodzi zabite prątki *Mycobacterium tuberculosis*. Co ciekawe, w eksperymentalnym poadiuwantowym zapaleniu stawów u szczurów szczepu Lewis, antygen mikroorganizmu chorobotwórczego (DNA *Mycobacterium tuberculosis*) akumuluje się przede wszystkim w szpiku kostnym, a także w śledzionie i węzłach chłonnych, ale nie w tkankach stawu. Co więcej, ta preferencyjna tkankowa lokalizacja bakteryjnego DNA poprzedzała objawy zapalenia ze strony stawów [23]. Zaobserwowano, że u zwierząt w tej przedobjawowej fazie choroby powiększają się kanały kostne łączące szpik z błoną maziową. Wykazano, że przez te kanały migrują ze szpiku kostnego do błony maziowej mezenchymalne komórki macierzyste [24], które mogą przyczyniać się do rozrostu błony maziowej (stymulując proliferację komórek błony maziowej bądź różnicując się w synowocyty). Oba te zjawiska (powiększanie się kanałów oraz infiltracja naciekami błony maziowej) są zależne od obecności TNF. Co ciekawe, podobne zmiany w tkankach stawu obserwowano u myszy, którym wstrzyknięto sam adiuwant, bez artrogeennego antygeny [24]. Autorzy postulują, że w CIA występowanie przedobjawowej fazy (indukcji) choroby przygotowuje staw na rozwój odpowiedzi immunologicznej. Faza indukcji choroby jest niezależna od antygeny (przebiega na skutek uruchomienia mechanizmów odpowiedzi nieswoistej

organizmu), a w jej rozwoju istotną rolę mogą odgrywać komórki bezpośrednio migrujące do błony maziowej ze szpiku kostnego [24]. Sugeruje to istnienie w szpiku kostnym czynników stymulujących komórki do migracji i wywołania zjawisk patologicznych, charakterystycznych dla RZS (np. zapalenie błony maziowej). Wśród tych patogennych czynników może być, wspomniane wyżej, bakteryjne DNA rozpoznawane przez komórki szpiku kostnego za pomocą np. TLR9.

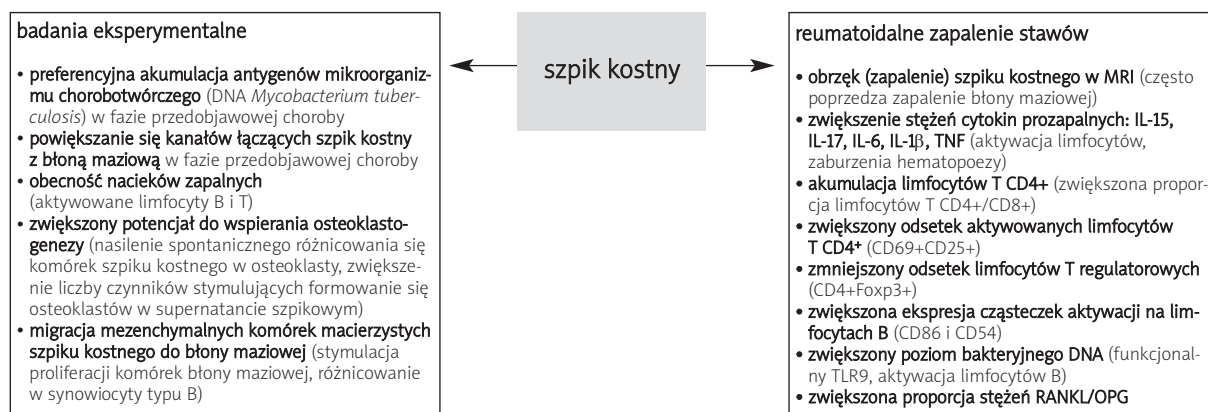
Co ciekawe, własne DNA, którego źródłem są komórki szpiku kostnego, również może wywoływać u myszy przewlekłe zapalenie wielostawowe przypominające RZS. Stwierdzono, że nieefektywna degradacja własnego chromosomowego DNA, pochodzącego z komórek prekursorowych erytrocytów, prowadzi do aktywacji szpikowych makrofagów, które zwiększają wytwarzanie TNF odpowiadającego za rozwój choroby [25].

Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych choroby wskazują zatem, że szpik kostny może być miejscem akumulacji komórek odpowiedzi zapalnej lub różnicowania się komórek bezpośrednio zaangażowanych w destrukcję kości. Jest również źródłem czynników, które stymulują osteoklastogenezę lub mogą indukować zapalenie (DNA bakteryjne i własne). Ponadto komórki ze szpiku kostnego mogą uczestniczyć w indukcji patologicznych zjawisk zachodzących w błonie maziowej (ryc. 2, lewy panel).

## Szpik kostny u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

### Zaburzenia związane z komórkami macierzystymi

U chorych na RZS stwierdza się liczne anomalie związane z funkcjonowaniem szpiku kostnego. Dotyczą one m.in. zaburzeń erytropoezy, trombopoezy i mielopoezy. W wyniku nieprawidłowej hematopoezy zmienia się liczebność komórek prekursorowych w szpiku kostnym u chorych na RZS, np. zmniejsza się liczba komórek prekursorowych linii erytrocytarnej bądź zwiększa liczba trombocytów i komórek prekursorowych linii mieloidalnej. Zjawiska te są związane m.in. ze zmianą właściwości komórek prekursorowych, np. zmniejszoną ekspresją cząsteczek adhezyjnych VLA-4 i VLA-5 na erytroblastach, co może zaburzać ich dojrzewanie poprzez ograniczenie interakcji z komórkami zrębowymi szpiku kostnego [26] czy zwiększonym potencjałem prekursorowych komórek linii mieloidalnej do różnicowania się w dojrzałe monocyty (CD14+HLA-DR+) [27]. Powyższe obserwacje sugerowały istnienie zaburzeń czynnościowych komórek macierzystych szpiku kostnego u chorych na RZS. Potwierdziły to dalsze badania, w których wykazano zwiększoną podatność na apoptozę hematopoetycznych



**Ryc. 2.** Obserwacje wskazujące na rolę szpiku kostnego w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów.  
**Fig. 2.** Observations indicating that bone marrow play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

komórek macierzystych oraz ich zmniejszoną zdolność różnicowania się w prekursorzy erytrocytów [28]. Komórki macierzyste szpiku kostnego u chorych na RZS charakteryzuje przy tym zwiększona reaktywność na TNF- $\alpha$ , w wyniku czego wykazują one zwiększoną zdolność do różnicowania się w synowioocyty fibroblastyczne typu B i wytwarzania metaloproteazy 1 [29]. Potwierdzenie udziału komórek macierzystych w rozwoju patologicznych procesów zachodzących w RZS uzyskano w wyniku pomysłnych prób transplantacji komórek szpiku kostnego. Alogeniczna lub autologiczna transplantacja komórek szpiku kostnego u chorych na RZS jest stosowana w przypadku choroby odpornej na leczenie tradycyjnymi lekami modyfikującymi przebieg choroby i lekami biologicznymi. Może ona powodować remisję choroby (trwającą nawet 21 lat) lub zwiększać podatność chorego na ww. terapię [30].

### Obrzęk szpiku kostnego

Już od prawie 30 lat pojawiają się doniesienia o zmianach w obrazie histologicznym szpiku kostnego w RZS. Utrudniony dostęp do kości podchrzęstnej stawu, dotychczasowy brak metod przyżyciowej obserwacji tej tkanki oraz koncentracja uwagi badaczy na patologicznych zjawiskach zachodzących w błonie maziowej opóźniły jednak kompleksową ocenę zaburzeń w szpiku kostnym. Dopiero rozwój nowych technik obrazowania tkanek, takich jak rezonans magnetyczny (*magnetic resonance imaging* – MRI), rejestrujący zmiany sygnału emisji rezonansowej pochodzące z atomów wodoru cząsteczek wody zawartej w tkankach, pozwolił na badanie procesów komórkowych zachodzących w szpiku kostnym. Dzięki MRI możliwe stało się rozróżnienie tkanek cechujących się różną licznością komórek (a konkretnie cząsteczek wody zawartej w komórkach), nawet tak

trudnych do obrazowania, jak szpik kostny czerwony i szpik kostny żółty. Badanie MRI jest przy tym jedyną techniką pozwalającą na równoczesną ocenę wszystkich istotnych struktur stawu, tj. błony maziowej, chrząstki, kości, więzadeł, ścięgien, pochewek ścięgniowych oraz ilości płynu stawowego. Wprowadzenie MRI do diagnostyki oraz monitorowania skuteczności leczenia RZS zaowocowało nieoczekiwanymi odkryciami. Okazało się, że rozwój patologicznych procesów w RZS, takich jak zapalenie błony maziowej oraz destrukcja chrząstki i kości, poprzedzany jest często „obrzękiem” szpiku kostnego (*bone marrow edema* – BME), który odzwierciedla obecność nacieków komórkowych. Już we wczesnej fazie nieodróżnionego zapalenia stawów występowanie BME w badaniu MRI rąk wraz z obecnością przeciwciał anty-CCP w surowicy prognozuje szybki (w ciągu roku) rozwój RZS ze 100-procentowym prawdopodobieństwem [31]. Szacuje się, że BME występuje u 68–75% chorych we wczesnej fazie RZS i ma dużą wartość predykcyjną dla destrukcji kości [32]. Stwierdzono również, że obecność BME koreluje z nasileniem procesów zapalnych, destrukcji kości i objawów klinicznych RZS. Może też stanowić czulszy niż monitorowanie zapalenia błony maziowej w badaniu MRI wskaźnik odpowiedzi na terapię [33]. Co ciekawe, przemijające BME zaobserwowano także u ludzi po urazach stawów, a także u chorych na entezopatie, martwicę kości, polimialgię reumatyczną, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, tłuszczowe zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy i pierwotny zespół Sjögrena oraz chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS). „Obrzęk” szpiku kostnego występuje także sporadycznie u ludzi zdrowych, co może być związane z przeciążeniem stawów u tych osób. Jednakże częstość występowania BME w różnych jednostkach chorobowych może być różna. Wykazano np. częstsze występowanie BME u chorych we wczesnej fazie RZS

w porównaniu z chorymi na polimialgię reumatyczną [34], tłuszczycowe zapalenie stawów [35], toczeń rumieniowaty układowy, a także z chorymi z pierwotnym zespołem Sjögrena [36]. Bardzo istotne jest, że w przypadku poszczególnych chorób stawów obraz histologiczny, jak również geneza BME, mogą być odmienne. W przypadku RZS BME ma charakter rozproszony i obrazuje zmiany w mikroarchitekturze szpiku kostnego powstałe w wyniku zastąpienia tkanki tłuszczowej tkanką zapalną (limfocytami B i T, komórkami plazmatycznymi, makrofagami), tworzącą agregaty podobne do grudek limfatycznych węzłów chłonnych lub śledziony, oraz neowaskularyzacji. U chorych na ChZS obserwuje się natomiast zmiany hemisferyczne (cysty), które tworzą się w wyniku zastąpienia tłuszczu tkanką nekrotyczną i zwłókniałą. Powyższe zjawiska u chorych na ChZS są inicjowane na skutek utraty właściwości amortyzacyjnych chrząstki stawowej, co prowadzi do przeciążeń i w konsekwencji do mikrozłamań beleczek kostnych kości podchrzęstnej. To z kolei uruchamia procesy regeneracyjne wyrażone rozwojem naczyń krwionośnych, włóknieniem szpiku kostnego, przebudową beleczek kostnych i zwiększeniem gęstości kości. Sugeruje się, że wystąpienie wymienionych powyżej zmian u chorych na ChZS ma charakter pourazowy. Wykazano, że u chorych na ChZS, tak jak i u chorych na RZS, wystąpienie BME jest związane z bólem i progresją destrukcji stawów. Przyczyny bólu indukowanego poprzez BME u chorych na ChZS są jednak inne niż u chorych na RZS, u których wydaje się on indukowany nie w wyniku reakcji zapalnej, lecz głównie poprzez bezpośrednią stymulację unerwionej okostnej.

### Nacieki zapalne w szpiku kostnym

Badania z zastosowaniem cytometrii przepływową pozwoliły na dokładną analizę populacji komórek akumulujących się w szpiku kostnym u chorych na RZS. W porównaniu z analogiczną tkanką pobraną od zdrowych dawców lub chorych na ChZS, w szpiku kostnym chorych na RZS stwierdzono: 1) zwiększoną liczbę komórek jednojądrowych, 2) różnice w rzeczywistej liczbie limfocytów T i B [37, 38], 3) zmniejszony odsetek limfocytów T regulatorowych (CD4+Foxp3+) [39], 4) zmienione proporcje subpopulacji limfocytów T CD4+/CD8+ na korzyść komórek CD4+ [40, 41], 5) zwiększony odsetek aktywowanych limfocytów T, zarówno CD4+, jak i CD8+ (CD69+ i CD25+) [41], 6) zwiększoną ekspresję markerów aktywacji (CD86 i CD54) na limfocytach B [42].

Nagromadzenie aktywowanych limfocytów w szpiku kostnym może być istotne dla rozwoju lub podtrzymania odpowiedzi zapalnej *in situ*. Na ich znaczenie (konkretnie szpikowych aktywowanych limfocytów B) wskazują

wyniki leczenia chorych na RZS z zastosowaniem litycznych przeciwciał przeciwko cząsteczce CD20 (rituksymabu, Mabthera). Zaobserwowano, że większy stopień eliminacji aktywowanych limfocytów B w szpiku kostnym koreluje pozytywnie z odpowiedzią kliniczną chorych na terapię [43].

### Aktywne osteoklasty w szpiku kostnym

Oprócz agregatów komórek układu odpornościowego, w błonie maziowej (czyli od „wewnętrznej” strony stawu), jak również w kości podchrzęstnej, która graniczy ze szpikiem kostnym (od „zewewnętrznej” strony stawu), wykazano także obecność aktywnych i tworzących się *de novo* osteoklastów [44, 45]. Stwierdzono przy tym, że liczebność osteoklastów degradujących kość od strony szpiku kostnego koreluje pozytywnie z liczbą nacieków zapalnych w szpiku kostnym i jest tylko nieznacznie mniejsza niż liczba osteoklastów od strony hipertroficznej błony maziowej [44]. Podobnie jak u szczurów z poadiuwantowym zapaleniem stawów, także u chorych na RZS mikrośrodowisko szpiku kostnego może sprzyjać różnicowaniu się i aktywacji osteoklastów. W porównaniu z chorymi na ChZS, w szpiku kostnym chorych na RZS stwierdza się zwiększone stężenia rozpuszczalnej formy RANKL – cytokiny stymulującej różnicowanie i aktywację osteoklastów, przy równoczesnym małym stężeniu osteoprotegeryny (*osteoprotegerin* – OPG), która neutralizuje RANKL, będąc jego naturalnym receptorem [46]. Powyższe obserwacje sugerują, że procesy destrukcyjne kości w reumatoidalnym stawie mogą być spowodowane współdziałaniem czynników obecnych w mikrośrodowisku szpiku kostnego, które stymulują różnicowanie i aktywację osteoklastów.

### Rozwój odpowiedzi immunologicznej w szpiku kostnym

#### Rola cytokin prozapalnych

Migracji komórek i ich aktywacji w szpiku kostnym u chorych na RZS sprzyjać mogą większe stężenia cytokin prozapalnych (IL-15, IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF) niż w szpiku kostnym chorych na ChZS [41] lub zdrowych dawców [28]. Źródłem cytokin mogą być zarówno szpikowe aktywowane limfocyty T [41] i B [42], jak i komórki zrębowe szpiku kostnego [47]. U chorych na RZS cytokiny prozapalne mogą powodować wtórne cytopenie [48, 49] oraz aktywować i modulować funkcje limfocytów szpiku kostnego. Stwierdzono, że IL-15 wywiera silniejszy wpływ na proliferację limfocytów T CD4+ oraz wytwarzanie IL-17 przez komórki jednojądrowe ze szpiku chorych na RZS w porównaniu z analogicznymi populacjami komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego od chorych

na ChZS [41]. Interleukina 15 uczestniczy również w różnicowaniu/dojrzywaniu limfocytów T regulatorowych [39] oraz w aktywacji i różnicowaniu limfocytów B ze szpiku kostnego pobranych od chorych na RZS [50]. Komórki zrębowe szpiku kostnego, oprócz wytwarzania cytokin i czynników wzrostu, mogą także oddziaływać na limfocyty poprzez bezpośredni kontakt. Ich stymulujący wpływ stwierdzono zwłaszcza wobec odpowiedzi humoralnej. Wykazano, że tzw. mezenchymalne komórki opiekuńcze (*nurse-like cells*) oraz monocyty ze szpiku kostnego chorych na RZS zwiększają przeżywalność limfocytów B i długo żyjących komórek plazmatycznych oraz nasilają wytwarzanie przeciwciał, w tym czynnika reumatoidalnego [27, 47]. U chorych na RZS długo żyjące komórki plazmatyczne w szpiku kostnym mogą przez długi czas życia osobniczego uwalniać autoprzeciwciała, co z kolei koreluje z natężeniem objawów chorobowych i nawrotami choroby oraz opornością na terapię.

### Rola czynników infekcyjnych

W porównaniu z osobami zdrowymi, szpik kostny chorych na RZS zawiera zwiększony odsetek polireaktywnych naiwnych limfocytów B, zdolnych do wytwarzania autoprzeciwciał (czynnika reumatoidalnego, przeciwciał wykrywających jednoniciowe lub dwuniciowe DNA czy cykliczne cytrulinowane peptydy). Tak samo jak u myszy [9], wskazuje to na zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za zachowanie przez limfocyty B centralnej tolerancji na własne antygeny, ponieważ także ludzkie przejściowe limfocyty B migrujące ze szpiku kostnego mogą być aktywowane *in vitro* przez analogi bakteryjnego DNA – CpG-ODN, zanim zakończą proces dojrzewania w obwodowych narządach limfatycznych [51]. Co więcej, komórki mezenchymalne mikrośrodowiska szpiku kostnego człowieka wykazują zdolność do preferencyjnego wspierania proliferacji, różnicowania i wytwarzania przeciwciał przez tak aktywowane limfocyty B (przejściowe i pamięci) [52]. Wyniki badań próbek szpiku kostnego uzyskanego od chorych na RZS wskazują, że już od wczesnych etapów dojrzewania w szpiku limfocyty B wykazują ekspresję funkcjonalnego TLR9, a pod wpływem ligandów TLR9 komórki te ulegają aktywacji, proliferują i wytwarzają cytokiny (IL-6, TNF) [42]. Ponadto szpik kostny chorych na RZS zawiera zwiększone ilości bakteryjnego DNA – naturalnego liganda TLR9, w porównaniu ze szpikiem kostnym chorych na ChZS [42]. Współwystępowanie aktywnego biologicznie TLR9 w limfocytach B oraz naturalnego liganda TLR9 w szpiku kostnym pobranym od chorych na RZS sugeruje, że bakteryjny DNA może aktywować limfocyty B *in situ*, przyczyniając się do zwiększonej prezentacji antygenów, proliferacji i wytwa-

rzania autoprzeciwciał. Przemawiają również za udziałem czynników infekcyjnych w patogenezie RZS. Warto tu nadmienić, że tropizm do szpiku kostnego wykazują także wirusy, którym przypisuje się udział w patogenezie tej choroby (np. EBV, HTLV-1 [53]). Źródłem antygenów pochodzących z mikroorganizmów może być też flora komensalna organizmu. Takie antygeny mogą trafić do tkanek drogą krążenia po przełamaniu bariery ściany jelita, np. na skutek terapii niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, jak również za pośrednictwem fagocytujących makrofagów i komórek dendrytycznych lub w kompleksach immunologicznych. Wiadomo jednak, że DNA człowieka może stać się immunogenne, poprzez związanie się z białkami (autoprzeciwciałem, peptydem przeciwbakteryjnym LL37, białkiem HGMB1 lub HSP90), których ekspresja jest wzmożona w RZS. Takie kompleksy mogą aktywować limfocyty B oraz komórki dendrytyczne w sposób zależny od TLR9. Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz fakt, że ludzkie komórki szpiku kostnego są głównym źródłem wolnego krążącego DNA [54], nie można wykluczyć możliwości, że także własne DNA, szczególnie o niskim poziomie metylacji, jaki obserwuje się u chorych na RZS [55], może stanowić endogeny ligand TLR9.

### Charakter zmian w szpiku kostnym – pierwotny czy wtórny?

Patologiczne zmiany w szpiku kostnym u chorych na RZS, które zwróciły uwagę badaczy i klinicystów stosunkowo niedawno, stały się przedmiotem dyskusji dotyczącej ich pierwotnej lub wtórnej, w stosunku do zapalenia błony maziowej, genezy. Przeprowadzono analizę histologiczną kości podchrzęstnej stawu chorych na RZS, z której wynikało, że to rozrastająca się błona maziowa może spowodować destrukcję warstwy korowej kości i wnikać do szpiku kostnego, gdzie stymuluje tworzenie się agregatów komórek jednojądrowych [56]. W badaniach tych wykorzystano jednak materiał biologiczny pobrany podczas endoprotezoplastyki, a zatem od chorych będących już w zaawansowanej fazie RZS [56]. Wyklucza to zatem, jak zaznaczają sami autorzy, wnioskowanie w kwestii pierwotnego lub wtórnego pochodzenia zmian w mikroarchitekturze oraz procesów zapalnych i destrukcyjnych zachodzących w szpiku kostnym w RZS. Poza tym stwierdzona przez innych badaczy obecność nacieków zapalnych także w głębokich rejonach szpiku kostnego, odległych od obszarów zajmowanych przez hipertroficzną błonę maziową, wskazuje na niezależny od błony maziowej rozwój reakcji zapalnej w szpiku kostnym [44]. Innymi przesłankami potwierdzającymi tę hipotezę są obserwacje przebiegu choroby dokonane po interwencjach chirurgicznych: 1) terapeu-

tyczne usunięcie hipertroficjnej błony maziowej nie zapobiega dalszej destrukcji i deformacji stawu; 2) zapalenie błony maziowej stopniowo wygasa w zaawansowanym stadium choroby, gdy chrząstka i powierzchnie stawowe kości uległy już poważnej destrukcji lub zostały usunięte podczas operacji wstawienia endoprotezy bez naruszenia hipertroficjnej błony maziowej [45]. Odpowiedź immunologiczna w szpiku kostnym chorych na RZS może więc rozwijać się niezależnie od zapalenia błony maziowej. Co więcej, może także poprzedzać zapalenie błony maziowej, jak wykazało obrazowanie tkanek stawu za pomocą badania MRI.

W dodatku, pewne zjawiska prozapalne zachodzące w błonie maziowej u chorych na RZS mogą być zainicjowane przez komórki napływające ze szpiku kostnego. Świadczą o tym wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych choroby, a uzupełniają je obserwacje dokonane u chorych na RZS. Stwierdzono bowiem, że w błonie maziowej chorych na RZS gromadzą się komórki o fenotypie komórek mezenchymalnych szpiku kostnego (tj. wykazujące ekspresję receptorów dla białek morfogenetycznych kości oraz ekspresję embrjonalnych czynników wzrostu z rodziny *Wingless* – *wnt* – i *Frizzled*). U osób zdrowych takich komórek nie stwierdza się w błonie maziowej, a u chorych na ChZS są one wykrywane sporadycznie [57]. Komórki te wykazują duży potencjał proliferacyjny *in vitro* i agresywny charakter *in vivo*, gdyż występują one głównie w miejscach inwazji błony maziowej w głąb chrząstki stawowej. Ponadto ekspresja embrjonalnych czynników wzrostu (*wnt5a*) może warunkować ich prozapalne właściwości wyrażone m.in. przez wytwarzanie IL-15 [57]. Komórki ze szpiku kostnego mogą docierać do błony maziowej bezpośrednio, przez kanały łączące szpik kostny z błoną maziową lub wraz z krwią obwodową, migrując poprzez ścianę naczyń krwionośnych błony maziowej. Stwierdzono, że zwiększone stężenie TNF u chorych na RZS stwarza warunki umożliwiające migrację szpikowych prekursorów osteoklastów z krwią obwodową do błony maziowej, gdzie następuje ich różnicowanie w osteoklasty [58]. Także komórki plazmatyczne obecne w błonie maziowej chorych na RZS mogą pochodzić ze szpiku kostnego [59].

Opierając się na przytoczonych powyżej wynikach badań histopatologicznych i obrazowania przestrzennego, wysunięto hipotezę o kluczowej roli szpiku kostnego w indukcji i podtrzymaniu procesu zapalnego oraz destrukcji tkanek stawu w RZS. Rozważa się w niej udział szpiku kostnego w etiopatogenezie RZS, jako głównego źródła potencjalnie patologicznych komórek migrujących do błony maziowej lub sprawujących swoje funkcje efektorowe od strony kości podchrzęstnej stawu (tzw. *bone marrow-centered disease model for RA*, model

reumatoidalnego zapalenia stawów z centralną rolą szpiku kostnego) [60] (ryc. 2, prawy panel).

## Podsumowanie

Szpik kostny, badany dotychczas w kontekście hematologicznym jako główne miejsce krwiotworzenia u dorosłego człowieka, budzi coraz większe zainteresowanie immunologów z uwagi na to, że pełni on również funkcje wtórnego narządu limfatycznego. W aspekcie immunologicznym istotne znaczenie ma intensywna wymiana komórek oraz antygenów zachodząca pomiędzy szpikiem kostnym a krwią obwodową. Dzięki niej, oprócz hematopoezy, w szpiku kostnym zachodzą także inne procesy fizjologiczne, takie jak np. końcowy etap różnicowania limfocytów T CD4+ w komórki pamięci immunologicznej czy eliminacja starzejących się neutrofilów. Ponadto w szpiku, tak jak i we wtórnych narządach limfatycznych, może być inicjowana efektywna odpowiedź immunologiczna. Wyniki ostatnich badań wskazują na udział szpiku kostnego w patogenezie RZS. Jest on bowiem źródłem aktywowanych komórek i czynników prozapalnych, które powodują zarówno nieprawidłowości w procesie hematopoezy, jak i uczestniczą w inicjacji i/lub podtrzymywaniu przewlekłego zapalenia. W praktyce klinicznej obserwacje te potwierdzają zasadność stosowania MRI w celu monitorowania obrzęku szpiku kostnego jako czynnika rokowniczego rozwoju RZS, progresji zmian destrukcyjnych stawów oraz markera skuteczności terapii. Także nowe strategie terapeutyczne RZS powinny uwzględnić szpik kostny, będący jedną z istotnych lokalizacji aktywowanych komórek.

## Piśmiennictwo

1. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-3506.
2. Mazo IB, Honczarenko M, Leung H, et al. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 2005; 22: 259-270.
3. Tokoyoda K, Zehentmeier S, Hegazy AN, et al. Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 2009; 30: 721-730.
4. Paramithiotis E, Cooper MD. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 208-212.
5. Hauser AE, Debes GF, Arce S, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 2002; 169: 1277-1282.
6. Tokoyoda K, Hauser AE, Nakayama T, Radbruch A. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 193-200.
7. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 2006; 24: 801-812.



8. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, et al. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood* 2005; 105: 1484-1491.
9. Edry E, Azulay-Debby H, Melamed D. TOLL-like receptor ligands stimulate aberrant class switch recombination in early B cell precursors. *Int Immunol* 2008; 20: 1575-1585.
10. Cariappa A, Chase C, Liu H, et al. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* 2007; 109: 2339-2345.
11. Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, et al. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* 2003; 9: 1151-1157.
12. Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo IB, et al. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1029-1037.
13. Schirmacher V, Feuerer M, Fournier P, et al. T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity. *Trends Mol Med* 2003; 9: 526-534.
14. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med* 2006; 203: 583-597.
15. Join-Lambert OF, Ezine S, Le Monnier A, et al. Listeria monocytogenes-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol* 2005; 7: 167-180.
16. Tripp RA, Topham DJ, Watson SR, et al. Bone marrow can function as a lymphoid organ during a primary immune response under conditions of disrupted lymphocyte trafficking. *J Immunol* 1997; 158: 3716-3720.
17. Kobayashi H, Ohshima S, Nishioka K, et al. Antigen induced arthritis (AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: evidence that interleukin 6 is essential for induction of AIA. *J Rheumatol* 2002; 29: 1176-1182.
18. Kushida T, Ueda Y, Umeda M, et al. Allogeneic intra-bone marrow transplantation prevents rheumatoid arthritis in SKG/Jcl mice. *J Autoimmun* 2009; 32: 216-222.
19. Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1175-1186.
20. Görtz B, Hayer S, Redlich K, et al. Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 990-998.
21. Wang JY, Roehrl MH. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14362-14367.
22. Suzuki Y, Tanihara M, Ichikawa Y, et al. Periarticular osteopenia in adjuvant induced arthritis: role of interleukin-1 in decreased osteogenic and increased resorptive potential of bone marrow cells. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 484-490.
23. Ronaghy A, Prakken BJ, Takabayashi K, et al. Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol* 2002; 168: 51-56.
24. Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, et al. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 507-513.
25. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 2006; 443: 998-1002.
26. Jaworski J, Maśliński W, Pazdur J, et al. Decreased expression of integrins by hematopoietic cells in patients with rheumatoid arthritis and anemia: relationship with bone marrow cytokine levels. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18: 17-21.
27. Hirohata S, Yanagida T, Koda M, et al. Selective induction of IgM rheumatoid factors by CD14+ monocyte-lineage cells generated from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 384-388.
28. Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C, et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood* 2002; 99: 1610-1619.
29. Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, et al. Induction of fibroblast-like cells from CD34(+) progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 413-421.
30. Lowenthal RM, Francis H, Gill DS. Twenty-year remission of rheumatoid arthritis in 2 patients after allogeneic bone marrow transplant. *J Rheumatol* 2006; 33: 812-813.
31. Tamai M, Kawakami A, Uetani M, et al. A prediction rule for disease outcome in patients with undifferentiated arthritis using magnetic resonance imaging of the wrists and finger joints and serologic autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 772-778.
32. McQueen FM, Benton N, Perry D, et al. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1814-1827.
33. Hodgson R, Grainger A, O'Connor P, et al. Dynamic contrast enhanced MRI of bone marrow oedema in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 270-272.
34. Marzo-Ortega H, Rhodes LA, Tan AL, et al. Evidence for a different anatomic basis for joint disease localization in polymyalgia rheumatica in comparison with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3496-3501.
35. Marzo-Ortega H, Tanner SF, Rhodes LA, et al. Magnetic resonance imaging in the assessment of metacarpophalangeal joint disease in early psoriatic and rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2009; 38: 79-83.
36. Boutry N, Hachulla E, Flipo RM, et al. MR imaging findings in hands in early rheumatoid arthritis: comparison with those in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren syndrome. *Radiology* 2005; 236: 593-600.
37. Tomita T, Kashiwagi N, Shimaoka Y, et al. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1608-1614.
38. Warnawin E, Burakowski T, Jung L, et al. Rheumatoid arthritis bone marrow microenvironment preferentially promotes expansion of T-cell subsets. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (suppl. III): 140.
39. Chorąży-Massalska M, Radzikowska A, Warnawin E, et al. IL-15 trigger differentiation/maturation of Foxp3+ T cells from bone marrow in indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) dependent manner. *Ann Rheum Dis* 2010; 69 (Suppl. II): A69.
40. Doita M, Maeda S, Kawai K, et al. Analysis of lymphocyte subsets of bone marrow in patients with rheumatoid arthritis by

- two colour immunofluorescence and flow cytometry. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 168-171.
41. Warnawin E, Radzikowska A, Burakowski T, et al. Elevated levels of IL-15 in rheumatoid arthritis bone marrow contribute to T-cell activation and IL-17 overproduction. *Ann Rheum Dis* 2009; 68 (suppl. I): A20.
  42. Rudnicka W, Burakowski T, Warnawin E, et al. Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 2009; 39: 1211-1220.
  43. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R131.
  44. Bugatti S, Caporali R, Manzo A, et al. Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3448-3459.
  45. Fujii K, Tsuji M, Tajima M. Rheumatoid arthritis: a synovial disease? *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 727-730.
  46. Radzikowska A, Burakowski T, Małydk P, et al. Soluble and cell-surface expressed rankl and osteoprotegerin in bone marrow from rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 (Suppl II): 297.
  47. Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, et al. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 606-618.
  48. Ertenli I, Kiraz S, Oztürk MA, et al. Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2003; 23: 49-60.
  49. Nikolaisen C, Figenschau Y, Nossent JC. Anemia in early rheumatoid arthritis is associated with interleukin 6-mediated bone marrow suppression, but has no effect on disease course or mortality. *J Rheumatol* 2008; 35: 380-386.
  50. Rudnicka W, Warnawin E, Zanova E, et al. CpG agonistic oligodeoxynucleotides and interleukin-15 trigger activation, proliferation and differentiation of rheumatoid arthritis bone marrow-derived B lymphocytes in vitro. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 (Suppl. II): 138.
  51. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 2008; 180: 800-808.
  52. Traggiai E, Volpi S, Schena F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells* 2008; 26: 562-569.
  53. Hoyer BF, Mumtaz IM, Yoshida T, et al. How to cope with pathogenic long-lived plasma cells in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2008; 67 (Suppl III): iii87-89.
  53. Berthelot JM, Bataille R, Maugars Y, Prost A. Rheumatoid arthritis as a bone marrow disorder. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26: 505-514.
  54. Lui YN, Chick KW, Chiu RW, et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002; 48: 421-427.
  55. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, et al. Evidence for impaired T cell methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1665-1673.
  56. Jimenez-Boj E, Nöbauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, et al. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1118-1124.
  57. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, et al. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2791-2796.
  58. Schwarz EM, Looney RJ, Drissi MH, et al. Autoimmunity and bone. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 275-283.
  59. Dong W, Li X, Liu H, Zhu P. Infiltrations of plasma cells in synovium are highly associated with synovial fluid levels of APRIL in inflamed peripheral joints of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2009; 29: 801-806.
  60. McQueen FM, Ostendorf B. What is MRI bone oedema in rheumatoid arthritis and why does it matter? *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 222.