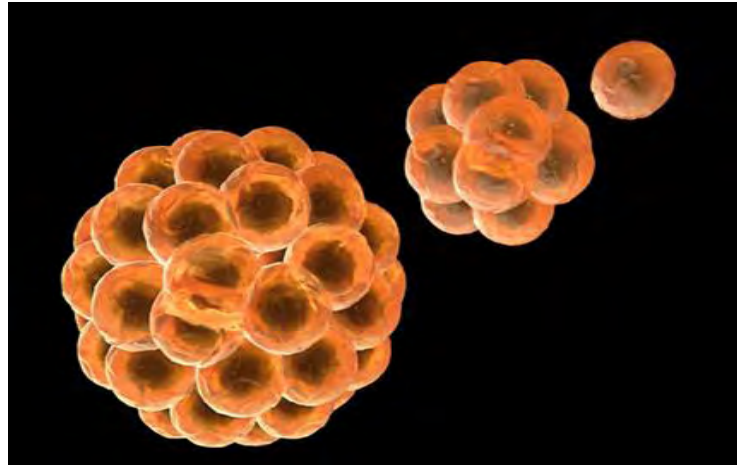




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
« ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: «Ο ρόλος των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) στην
ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου»**

**ΑΓΟΡΑΣΤΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗ
Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος**

**ΛΑΡΙΣΑ
Ιούνιος, 2014**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δήμας Κωνσταντίνος, Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Συνεπιβλέπουσα: Τζέτη Μαρία, Επ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Συνεπιβλέπουσα: Γκρέτση Βασιλική, Ερευνήτρια Γ' ΕΚΕΤΑ

Όταν μια παλαιότερη τεχνολογία δίνει τη θέση της σε μια καινούργια, η παλαιότερη επιστρέφει σαν τέχνη.

(Marshall McLuhan, 1911-1980, Καναδός επικοινωνιολόγος)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Γενετική του Ανθρώπου» κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014.

Ευχαριστίες.....

Θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ.Τζέτη Μαρία η οποία με τίμησε και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή καθώς και τις πολύτιμες υποδείξεις της για την ολοκλήρωσή της.

Θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Τσέζου Ασπασία για την συνεχή της υποστήριξη, την καθοδήγηση, την κατανόηση και την συμπαραστάσή της σε όλο το διάστημα των σπουδών καθώς και για τις υποδείξεις της στην παρούσα διπλωματική διατριβή.

Τέλος από τα βάθη της καρδιάς μου ευχαριστώ τον σύζυγο, τον γιο μου και τους γονείς μου για την κατανόηση, την υπομονή, την αγάπη και την στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια προσπάθειας ολοκλήρωσης του προγράμματος σπουδών.

στον μικρό μου Δημήτρη

Περιεχόμενα	Σελ.
Περίληψη	8
Abstract	11
Κεφάλαιο 1^ο –ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ	13
1.1. Φυσιολογία των αρθρώσεων	13
1.2. Τα είδη του αρθρικού χόνδρου	14
1.3. Βιοχημική σύσταση υαλοειδή αρθρικού χόνδρου	16
1.3.1. Χονδροκύτταρα	16
1.3.2. Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ)	17
1.4. Αρχιτεκτονική αρθρικού χόνδρου	21
1.5. Βιοχημικά μονοπάτια χονδρογένεσης	23
1.6. Αύξηση του αρθρικού χόνδρου	28
1.7. Μεταβολισμός χονδροκυττάρων	28
Κεφάλαιο 2^ο – ΒΛΑΒΕΣ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ	30
2.1. Αρθροπάθειες	30
2.2. Ταξινόμηση αρθροπαθειών	30
2.3. Επιδημιολογία- Κλινική Εικόνα & Προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου	32
2.4.. Διαγνωστικός έλεγχος	34
2.5. Θεραπευτικές προσεγγίσεις	35
2.5.1. Φαρμακολογική προσέγγιση	35
2.5.2.Χειρουργικές μέθοδοι	35
Κεφάλαιο 3^ο –ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	38
3.1 Αποκατάσταση (Repair)-Αναγέννηση (Regeneration)	38
3.2 Κυτταρική θεραπεία	40
3.2.1. Ορισμός Βλαστικών Κυττάρων	41
3.2.3. Τα είδη των βλαστικών κυττάρων	42
3.3. Ιδιότητες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	45
3.3.1 Πλαστικότητα & αυτό-ανανέωση	45
3.4. Καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων	46
3.5. Η σημασία του μικροπεριβάλλοντος (niches) των βλαστικών κυττάρων	47
3.6. Βιοϋλικά ανάπτυξης καλλιιεργειών	51
3.7. Βλαστικά κύτταρα για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου	53

A) Ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα	53
B) Εμβρυονικά Βλαστοκύτταρα	55
Γ) Επαγώμενα –πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (i-PSCs)	57
Γ.1. Κλινικές εφαρμογές των iPSCs	59
Γ.2. Δημιουργία iPSCs πρώτης γενιάς	61
Γ.3. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού	62
Γ.4 Προέλευση κυττάρων για τη δημιουργία των πολυδύναμων (iPSCs)	64
Γ.5 Φορείς επαναπρογραμματισμού	65
Γ.5.1. Ιικά συστήματα μεταφοράς (Viral delivery system)	66
Γ.5.1.α. Ογκορετροϊοί (Moloney Murine Leukemia Virus)	66
Γ.5.1.β. Λεντιοϊοί (Lentiviral vectors)	67
Γ.5.1.γ. Αδενοϊοί (Adenovirus) και Sendai ιοί	67
Γ.5.2. Μη ιικοί φορείς	68
Γ.5.2.α. Πλασμίδια	68
Γ.5.2.β. Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ως μεταγραφικοί παράγοντες	69
Γ.5.2.γ. microRNAs & πολυδυναμικότητα	69
Γ.5.2.δ. Μικρά χημικά μόρια	70
Γ.5.2.ε. Σηματοδοτικά μόρια που προάγουν την πολυδυναμικότητα	73
Γ.5.2.στ. Σηματοδοτικά μόρια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο ζωής και τον μεταβολισμό των iPSCs	75
Κεφάλαιο 4^ο :ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ	77
4.1. Μέθοδοι επαγόμενης χονδρογένεσης	77
4.2 Κατηγορίες ενήλικων iPSCs που χρησιμοποιούνται για επαναπρογραμματισμό & μέθοδοι επαγόμενης χονδρογένεσης	81
4.2α. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από ινοβλάστες δέρματος	82
4.2β. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με ΟΑ	85
4.2.γ. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από χονδροκύτταρα ασθενών με ΟΑ	86
4.2.δ. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από εμβρυϊκά νευρικά βλαστικά κύτταρα	88
4.2.ε. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από μεσεγχυματικά βλαστικά λιποκύτταρα	89

4.3. Ο ρόλος των iPSCs ως μοντέλων για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων στις αρθροπάθειες	90
4.4. Αξιολόγηση της χρήσης των iPSCs στην ανάπτυξη του χόνδρου της τραχείας	91
Επίλογος	92
Βιβλιογραφία	94

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε άρθρωση αποτελεί ένα ενιαίο ανατομικό και λειτουργικό σύνολο. Το σύνολο αυτό αποτελείται από τον αρθρικό θύλακο με τον υμένα, τον αρθρικό χόνδρο με το υποκείμενο οστόν, καθώς και το περιεχόμενο στην αρθρική κοιλότητα, αρθρικό υγρό. Οι εκφυλιστικές διαταραχές που αναπτύσσονται σε κάθε ένα επιμέρους τμήμα της άρθρωσης οδηγούν σε απώλεια ρύθμισης των ομοιοστατικών μηχανισμών που εξασφαλίζουν την δομική και λειτουργική ακεραιότητα καθενός ιστού ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό και περιγράφονται με τον όρο οστεοαρθρίτιδα. Η ΟΑ είναι μια σύνθετη πολυπαραγοντική νόσος και διάφοροι επιβαρυντικοί παράγοντες για την εκδήλωσή της εκτός από τη γενετική προδιάθεση που προκαλεί βιοχημικές αλλαγές στον ιστό, είναι για παράδειγμα κάποιος πιθανός τραυματισμός, η έντονη φόρτιση της άρθρωσης, το σωματικό βάρος και η ηλικία. Πιο ειδικά οι διαδικασίες μεταβολισμού και αυτό-ανανέωσης δεν παρατηρούνται στον αρθρικό χόνδρο καθώς ο ιστός στερείται αγγείωσης. Συνεπώς η απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εξασφαλίζουν την αρμονική αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων με την ΕΘΟ διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση με αποτέλεσμα τα τελευταία να οδηγούνται σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και σε σύνθεση "νέου" ιστού με ορατά σημάδια ίνωσης ή οστεοποίησης. Ο νέος ιστός σκληραίνει αποκτά ινώδη μορφή και στα τελευταία στάδια της νόσου διαβρώνεται και αποκαλύπτεται το υποχόνδριο οστό, το οποίο λόγω της αγγείωσης και της νεύρωσής του, προκαλεί το αίσθημα έντονου πόνου.

Καθώς η ΟΑ αποτελεί ένα κοινό νόσημα των ενηλίκων, μάλιστα μέχρι το 2020 αναμένεται να είναι η τέταρτη σε αριθμό αιτία ασθενών με αναπηρίες (Reginster et al., 2002, Woolf and Pfleger, 2003, Koelling et al., 2009) οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της επιβαρύνουν οικονομικά το σύστημα Υγείας των Δυτικών κοινωνιών. Η συντηρητική φαρμακευτική αγωγή εφαρμόζεται για βραχύχρονη ανακούφιση των συμπτωμάτων του πόνου στα αρχικά στάδια της νόσου (Lohmander and Roos, 2007). Εξαιτίας του υψηλού κόστους και της μικρής διάρκειας ζωής των πρόσθετων εμφυτευμάτων η ολική αντικατάσταση της άρθρωσης, χειρουργικά με προσθετική αρθροπλαστική, προτείνεται μόνο στα τελευταία στάδια της νόσου.

Είναι γνωστό ότι η φύση διαθέτει τις δικές της δυνάμεις για αυτοθεραπεία, αλλά όσο οι οργανισμοί γίνονται πολυπλοκότεροι τόσο η δυνατότητα αυτή εξασθενεί. Τη δυναμική

της φυσικής αναγέννησης στον οργανισμό δίνουν τα βλαστικά κύτταρα. Κύριο χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων είναι ότι αναπαράγονται διαρκώς, σχεδόν αενάως, με μιτωτικές διαιρέσεις (Pera et.al, 2000) και έχουν την ικανότητα να μετατραπούν δηλαδή να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε άλλο είδος κυττάρου στο σώμα ενός ενήλικου οργανισμού (π.χ. σε μυϊκό, ερειστικό, νευρικό κύτταρο). Εκμεταλλευόμενη αυτή τη δυνατότητα η κυτταρική θεραπεία σήμερα δηλαδή η θεραπεία με βλαστοκύτταρα, είναι μια ελπιδοφόρος θεραπευτική προσέγγιση, η οποία επιτρέπει να γίνονται χειρουργικά ή μη επεμβατικά π.χ με ενέσεις, εγχύσεις βλαστικών κυττάρων, προερχόμενων από τον ίδιο τον ασθενή (αυτόλογη μεταμόσχευση) ή έναν ιστοσυμβατό δότη (αλλογενής μεταμόσχευση), στο σημείο της βλάβης ενός οργάνου ή ιστού με σκοπό την ανάπλαση του κατεστραμμένου τμήματος.

Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε ενήλικα και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα έχουν απομονωθεί με επιτυχία από διάφορους ιστούς, όπως ο μυελός των οστών, από τον λιπώδη ιστό, τους μύες και το περιόστεο και διάφορα σηματοδοτικά μόρια μεταξύ αυτών μέλη της υπεροικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β παίζουν ουσιώδη ρόλο στη διαδικασία της χονδρογένεσης. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES) έχουν μελετηθεί για περισσότερο από μια δεκαετία. Ωστόσο η χρήση τους απαιτεί έμβρυα και εγείρει ηθικά ζητήματα στην κλινική πράξη (Gaspar-Maia et al., 2011). Σήμερα, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιολογία των σωματικών –μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων εξαιτίας της ικανότητάς τους κάτω από κατάλληλες συνθήκες να αυτοανανεώνονται καθώς επίσης και της πλαστικότητας την οποία εμφανίζουν. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν τα σωματικά βλαστικά κύτταρα ικανά να παράγουν προγόνους διαφόρων τύπων ώριμων κυττάρων οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της ομοιόστασης ιστών και οργάνων τόσο κατά τη φυσιολογική πορεία της ζωής τους όσο και σε περίπτωση βλάβης.

Η αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου είτε οφείλεται σε τραύμα είτε σε χρόνια νόσο όπως στην οστεοαρθρίτιδα αποτελεί ιατρική ανάγκη. Εκτός από τη χρήση των αυτόλογων χονδροκυττάρων, ή των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου σήμερα περιλαμβάνουν, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) τα οποία αναπτύσσονται παρουσία μορφογόνων και παραγόντων ανάπτυξης πάνω σε στερεά ή ρευστά με τη μορφή τζέλ ικριώματα και στη συνέχεια μεταμοσχεύονται στο σημείο της πάσχουσας άρθρωσης. Η εφαρμογή αυτής της μορφής κυτταρικής θεραπείας για την

αντιμετώπιση της ΟΑ και όχι μόνο, σε *in vitro* καλλιέργειες αλλά και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα φαίνεται να έχει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σήμερα, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) που παράγονται μετά από επαναπρογραμματισμό ενήλικων σωματικών διαφοροποιημένων κυττάρων, με τη βοήθεια διαφόρων παραγόντων μεταγραφής και η διαφοροποίησή τους προς αρθρικά χονδροκύτταρα αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Το αντικείμενο λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο ρόλος τους στην αποκατάσταση βλαβών του αρθρικού χόνδρου.

Abstract

Each joint is a single anatomical and functional whole. This set consists of the synovium with its membrane the articular cartilage along with the underlying bone, and the content in the articular cavity, the synovial fluid. Degenerative disorders that develop in each individual part of the joint leading to loss of regulation of homeostatic mechanisms that ensure the structural and functional integrity of each tissue separately and in combination are described by the term osteoarthritis (OA). OA is a complex multifactorial disease and various stressors for manifestation apart from genetic predisposition that causes biochemical changes in the tissue, are for example a possible injury, the strong loading of the joint, the body weight and age. The metabolic processes and self-renewal is not observed as the articular cartilage tissue is deprived of vascularization. Therefore deregulation of signaling pathways that ensure harmonious interaction of chondrocytes with extracellular matrix disrupt cellular homeostasis resulting in increased proliferation and synthesis of new " " tissue with visible signs of fibrosis or ossification of the latter. The new tissue hardens and becomes fibrous form in the latter stages of the disease and eroded subchondral bone is revealed, which because of vascularization and innervation, causes the feeling of intense pain.

As OA is a common disease of adults, even by the year 2020 is expected to be the fourth number cause of patients with disabilities (Reginster et al., 2002, Woolf and Pfleger, 2003, Koelling et al., 2009) and modern therapeutic approaches address the financial burden of the healthcare system in Western societies. The conservative medication is effective for short term relief of symptoms of pain in the early stages of the disease (Lohmander and Roos, 2007). Because of the high cost and short lifetime of additional implants by total joint replacement, surgical and prosthetic arthroplasty, is suggested only in the late stages of the disease.

It is known that nature has its own powers to heal itself, but when an organism becomes more complex this possibility of self-renewal is weakened. The dynamics of natural regeneration in the body is given by stem cells. The main characteristic of stem cells are the continuous reproduction, almost indefinitely, with mitotic division (Pera et.al, 2000) and the ability to convert and to differentiate into any cell type in the body of an adult organism (e.g., in muscle, antagonistic, nerve cell). Exploiting this feature stem cell therapy today is a promising therapeutic approach, which makes it possible to

surgically or non-invasively, e.g. by injections , to infuse stem cells from the patient (autologous transplant) or an histocompatible donor (allogeneic transplant) at the point of failure of an organ or tissue in order to regenerate the damaged section.

Stem cells are mainly divided into two categories;adult stem cells and embryonic stem cells. Adult stem cells have been successfully isolated from various tissues , such as bone marrow, from adipose tissue, muscles, periosteum and various signaling molecules between these members of the superfamily of transforming growth factor TGF- beta play an essential role in the process of chondrogenesis . Embryonic stem cells (ES) have been studied for more than a decade. However, their use requires embryos and raises ethical issues in clinical practice (Gaspar-Maia et al., 2011). Today, there is much interest in the biology of somatic - derived mesenchymal stem cells because of their ability , under appropriate conditions to renew themselves as well as the plasticity which exhibit . These properties make the somatic stem cells capable of producing various types of mature progenitors cells actively involved in maintaining the homeostasis of tissues and organs both in the normal course of their lives, and in case of failure.

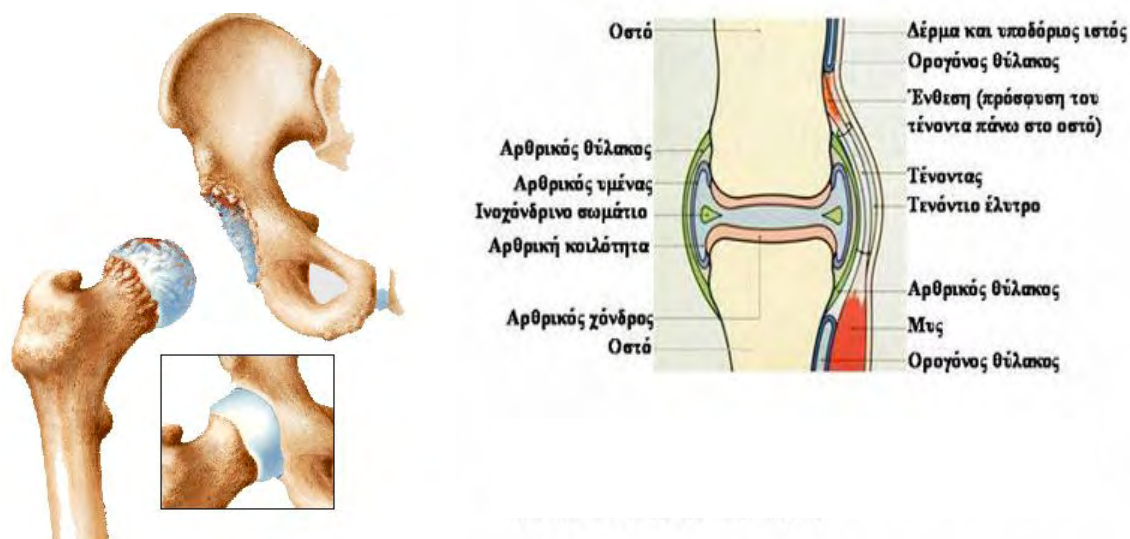
The regeneration of articular cartilage due to trauma or chronic disease such as osteoarthritis is a medical need . Apart from the use of autologous chondrocytes or mesenchymal stem cells , the current therapeutic approaches for the regeneration of articular cartilage currently include, the induced pluripotent stem cells (iPSCs) which grow in the presence of growth factors and morphogens on solid or fluid in the form of gels scaffolding and then transplanted at the afflicted joint. The application of this form of cell therapy for the treatment of OA and other diseases have shown encouraging results in in vitro cultures and in vivo. Today, the pluripotent stem cells (iPS) produced after reprogramming of differentiated adult somatic cells, with the help of various transcription factors and their redifferentiation to articular chondrocytes are the subject of intense research interest. The object of this thesis is the study of induced pluripotent (iPSCs) stem cells and their role in the restoration of articular cartilage lesions .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ

1.1 Φυσιολογία διαρθρώσεων

Κάθε άρθρωση αποτελεί το σημείο σύνδεσης μεταξύ δύο ή περισσότερων οστών με ύπαρξη ή όχι ελεύθερης κίνησης. Στις διαρθρώσεις, επιτρέπεται να γίνονται κινήσεις με μεγάλο εύρος. Τέτοιες για παράδειγμα είναι οι αρθρώσεις των άκρων (γόνατο, αγκώνας, ώμος), η κάτω γνάθος κλπ.

Όλες οι διαρθρώσεις του ανθρώπινου σώματος αποτελούνται από κύρια και επικουρικά μέρη (**Εικόνα 1**).



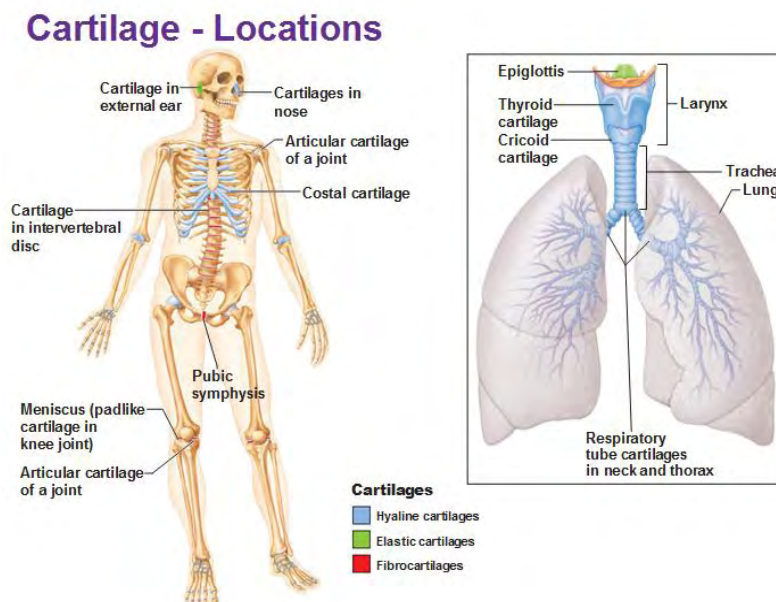
Εικόνα 1. Παράδειγμα διάρθρωσης ισχίου και σχηματική αναπαράσταση διάρθρωσης και περιαρθρικών μορίων (Πηγή από: http://www.elire.gr/info_det.php?di=17)

Τα κύρια μέρη των διαρθρώσεων είναι: α) οι αρθρικές επιφάνειες οι οποίες καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα χόνδρου είναι λείες και εφαρμόζουν η μία την άλλη, β) ο αρθρικός θύλακος που περιβάλλει κυκλικά τα άκρα των αρθρούμενων οστών κοντά στις αρθρικές τους επιφάνειες και περικλείει την αρθρική κοιλότητα μέσα στην οποία υπάρχει το αρθρικό υγρό το οποίο είναι άχρωμο, διαυγές και με κολλώδη υφή, γ) ο αρθρικός υμένας που περιβάλλει την περιφέρεια των αρθρικών επιφανειών και παράγει το αρθρικό υγρό, το οποίο βρίσκεται στην αρθρική κοιλότητα.

Σε κάποιες μάλιστα διαρθρώσεις (π.χ ισχίου και του γόνατος) μεταξύ του αρθρικού υμένα και του αρθρικού θύλακου ή του οστού παρεμβάλλεται ένα στρώμα λίπους (λιπώδες σώμα) και δ) η αρθρική κοιλότητα που είναι ο κλειστός χώρος που βρίσκεται ανάμεσα στις αρθρικές επιφάνειες και τον αρθρικό υμένα. Περιέχει ελάχιστη ποσότητα αρθρικού υγρού, το οποίο μειώνει τις τριβές και τις πιέσεις μεταξύ των οστών, εξασφαλίζοντας έτσι την καλή λειτουργία της άρθρωσης. Σε περιπτώσεις κακώσεων ή φλεγμονών μπορεί να συμβεί παθολογική αύξηση του αρθρικού υγρού (ύδραρθρος). **Στα επικουρικά μέρη** των διαρθρώσεων ανήκουν: α) οι σύνδεσμοι δηλαδή ταινίες από πυκνό συνδετικό ιστό που ενισχύουν τον αρθρικό θύλακο, συγκρατούν τα αρθρούμενα οστά και εξασφαλίζουν την τροχιά των κινήσεων περιορίζοντας την κίνηση της διάρθρωσης μέσα στα φυσιολογικά όρια, β) οι ορογόνοι θύλακοι που βρίσκονται κοντά στις διαρθρώσεις. Μερικές φορές επικοινωνούν με την αρθρική κοιλότητα ενώ άλλες φορές είναι ανεξάρτητοι και είναι γεμάτοι με υγρό εξασφαλίζοντας την μείωση της τριβής των μυών και των οστών και γ) οι αρθρικοί χόνδροι.

1.2 Τα είδη του αρθρικού χόνδρου

Ο χόνδρος είναι μια εξειδικευμένη μορφή συνδετικού ιστού που συναντάται σε διάφορες περιοχές στο ανθρώπινο σώμα (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση περιοχών στο ανθρώπινο σώμα με αρθρικό χόνδρο. Με τα διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται τα 3 είδη αρθρικού χόνδρου. (Πηγή από: [www.http://dancehealthier.com/2012/04/25/an-educational-look- /inside-the-body-cartilage/](http://dancehealthier.com/2012/04/25/an-educational-look- /inside-the-body-cartilage/) Marieb, Elaine, N., & Mitchell, Susan, J. Human Anatomy & Physiology Laboratory Manual: Ninth Edition. Pearson Education, Inc. 2011.

Η εξωκυττάρια ουσία του έχει στερεή σύσταση και προσφέρει στον ιστό την ελαστικότητα όταν υφίσταται μηχανικές πιέσεις. Γενικά ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας συμπαγής αλλά εύκαμπτος, αδιαφανής, λευκός, λείος, στιλπνός, με υγρή υφή στηρικτικός ιστός, ο οποίος καλύπτει τα οστά που έρχονται σε επαφή σε μία άρθρωση, επιτρέπει την ομαλή, με ελάχιστη τριβή, κίνηση των αρθρικών επιφανειών λειτουργώντας ως σύστημα λίπανσης απορροφώντας τους κραδασμούς και η βασική του λειτουργία είναι η ομοιόμορφη κατανομή των φορτίων και η μείωση των πιέσεων στο υποχόνδριο οστό. Κατά τη διάρκεια της φόρτισης παραμορφώνεται, και μετά την άρση αυτής λαμβάνει πάλι το αρχικό του σχήμα. Έχει λίγα χιλιοστά πάχος στις αρθρικές επιφάνειες και ποικίλλει από 2 έως 4 mm ενώ μειώνεται με τη γήρανση. Εμφανίζεται περισσότερο παχύς στην περιφέρεια των κοίλων επιφανειών και στο κέντρο των κυρτών επιφανειών. Το μεγαλύτερο πάχος παρουσιάζεται στον χόνδρο της επιγονατίδος που είναι περίπου 5mm.

Οι αρθρικοί χόνδροι ανάλογα με την λειτουργικότητά τους διακρίνονται σε:

- α) *επιχείλιους χόνδρους* που βρίσκονται στην περιφέρεια μερικών αρθρικών επιφανειών, στους οποίους λείπει το κεντρικό τμήμα και έτσι παίρνουν το σχήμα δακτυλιδιού. Χρησιμεύουν στην αύξηση της έκτασης της αρθρικής επιφάνειας των διαρθρώσεων και τέτοιοι απαντώνται στην διάρθρωση του ώμου και του ισχίου, και
- β) *σε διάρθριους χόνδρους* που είναι διαφράγματα από ινώδη χόνδρο που βρίσκονται μεταξύ των αρθρικών επιφανειών και διαιρούν σε δύο μέρη την αρθρική κοιλότητα. Τα διαφράγματα αυτά όταν είναι πλήρη ονομάζονται διάρθριοι δίσκοι όπως είναι η κροταφογναθική διάρθρωση, ενώ όταν είναι ατελή ονομάζονται διάρθριοι μηνίσκοι π.χ στη διάρθρωση του γόνατος.

Αναλογα με τη σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας διακρίνονται τρία είδη αρθρικού χόνδρου, ο ινώδης, ο ελαστικός και ο υαλοειδής χόνδρος (**Εικόνα 2**).

Ο *ινώδης χόνδρος* βρίσκεται σε περιοχές του σώματος που υπόκεινται είτε σε έντονες μηχανικές πιέσεις ή υποχρεώνονται να σηκώνουν μεγάλο βάρος. Χαρακτηρίζεται από μητρική θεμέλια ουσία που περιέχει πυκνό δίκτυο ινών κολλαγόνου τύπου I και παρουσιάζει χαρακτηριστικά ενδιάμεσα πυκνού και υαλοειδούς χόνδρου. Απαντάται στους μεσοσπονδύλιους δίσκους στις προσφύσεις ορισμένων συνδέσμων και την ηβική σύμφυση.

Ο *ελαστικός χόνδρος* περιέχει εκτός από κολλαγόνο τύπου II, άφθονες ελαστικές ίνες στη θεμέλια ουσία που τον καθιστούν εύκαμπτο και εκτατό. Απαντάται στο πτερύγιο

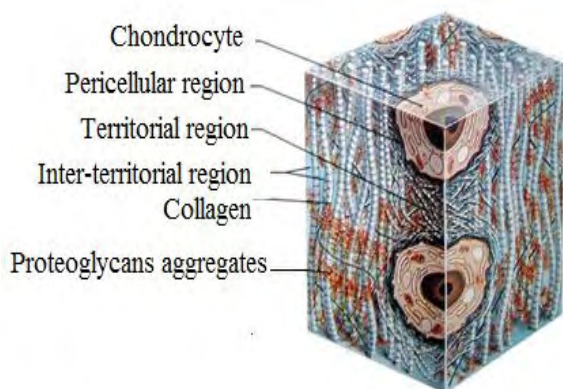
του αυτιού, τα τοιχώματα των έξω ακουστικών πόρων, την ευσταχιανή σάλπιγγα και στους χόνδρους του λάρυγγα.

Ο *υαλοειδής χόνδρος* που είναι η πιο κοινή μορφή χόνδρου στο ανθρώπινο σώμα δεν περιέχει αγγεία, νεύρα και λεμφικό σύστημα (Ο' Driscoll SW, 1998) παρ'όλα αυτά όμως παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των μακρών οστών τόσο πριν όσο και μετά τη γέννηση. Στο έμβρυο χρησιμεύει ως προσωρινός σκελετός ενώ στον ενήλικα βρίσκεται στις αρθρικές επιφάνειες των κινητικών αρθρώσεων, τα τοιχώματα των οργάνων του αναπνευστικού και τα άκρα των πλευρών εκεί που συνενώνονται με το στέρνο (Hartingham 2004, 2010).

1.3. Βιοχημική σύσταση υαλοειδή αρθρικού χόνδρου

1.3.1. Χονδροκύτταρα

Ο μοναδικός τύπος κυττάρων που δίνει γένεση στον υαλοειδή αρθρικό χόνδρο είναι τα χονδροκύτταρα (articular chondrocytes-ACs) τα οποία εντοπίζονται μέσα σε κοιλότητες στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ) και ο κύριος ρόλος τους είναι να συνθέτουν, να συναρμολογούν τα συστατικά της και να την οργανώνουν με μοναδικό τρόπο (**Εικόνα 3**). Η μορφολογία των χονδροκυττάρων διαφέρει. Στην περιφέρεια του αρθρικού χόνδρου τα χονδροκύτταρα έχουν πεπλατυσμένο σχήμα διατασσόμενα παράλληλα προς την αρθρική επιφάνεια, ενώ πιο κεντρικά έχουν υποστρογγύλο σχήμα και οργανώνονται σε ισογενείς ομάδες κυττάρων. Πιο ειδικά τα χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας (Growth Plate Chondrocytes-GPCs) που αποτελούν ένα είδος μήτρας για την ανάπτυξη των οστών μέσω της διαδικασίας της οστεοχόνδρινης οστεοποίησης παρουσιάζουν χαρακτηριστικά σημάδια υπερτροφίας και διαφορά στην φυσιολογική τους δράση (Hardingham & Fosang 1992, Colnot et al., 2005 Hardingham et al., 2006, Fosang & Beier 2011).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση τμήματος αρθρικού χόνδρου στο οποίο διακρίνεται η τοποθέτηση των χονδροκυττάρων και η χωροδιάταξη των συστατικών της ΕΘΟ (Πηγή από: <http://www.intechopen.com/books/injury-and-skeletal-biomechanics/-mechanical-behavior-of-articular-cartilage> Sopena-Juncosa et al., 2000)

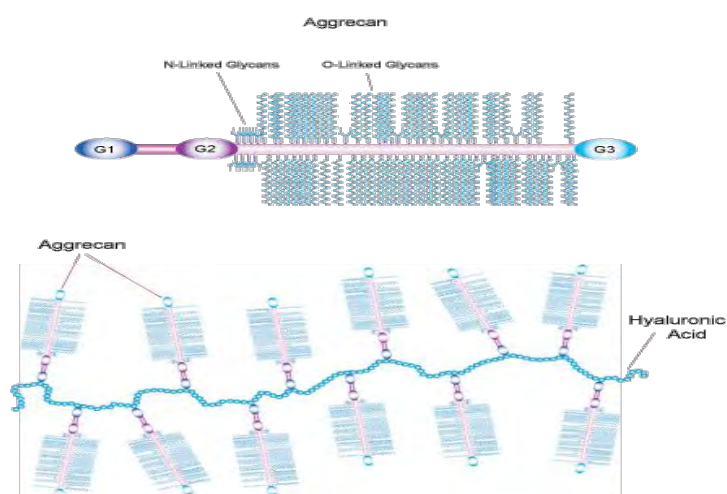
Γενικά, τα ώριμα χονδροκύτταρα έχουν οργανίδια τυπικά εκκριτικών κυττάρων με ευδιάκριτο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και καλά αναπτυγμένο σύστημα Golgi. Συνθέτουν και εκκρίνουν κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες και η μεταβολική τους δραστηριότητα εξαρτάται από την στιβάδα που βρίσκονται (Merceron et al., 2011).

1.3.2. Εξωκυτάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ)

Το 60-80% του συνολικού όγκου του υαλοειδή αρθρικού χόνδρου αποτελείται από νερό. Από το ξηρό του βάρος, το 40-50% αποτελείται από κολλαγόνο και το υπόλοιπο 50% από διάσπαρτα χονδροκύτταρα, πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, μακρομοριακές ενώσεις του μεσοκυτταρίου χώρου, όπως είναι λιπίδια και από ανόργανα άλατα. Ανάλογα με τις δομικές και λειτουργικές ανάγκες της άρθρωσης κατά τη φόρτιση τα αρθρικά χονδροκύτταρα συνθέτουν και αποικοδομούν την ΕΘΟ αποτελώντας ένα υψηλής διαφοροποίησης στρώμα συνδετικού ιστού στο οποίο οφείλονται οι βιοχημικές και φυσικές ιδιότητές του. Στη δομή της θεμέλιας ουσίας του υαλοειδή αρθρικού χόνδρου συμμετέχει κυρίως το κολλαγόνο τύπου II το οποίο αποτελεί το 95% της κολλαγονικής μάζας. Κύριο χαρακτηριστικό των μορίων αυτών είναι ότι αποτελούνται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σε μια σχοινοειδή έλικα σχηματίζοντας μια μακριά, άκαμπτη τρίκλωνη ελικοειδή μορφή. Με τη σειρά τους, τα μόρια κολλαγόνου συναρμολογούνται σε πολυμερή ινίδια που σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο το οποίο σταθεροποιείται με εσωτερικούς και εξωτερικούς διαμοριακούς δεσμούς (υδροξυ-πυριδινικοί δεσμοί). Για να μην πολυμεριστούν μέσα στο κύτταρο, παρασκευάζεται μια πρόδρομη μορφή κολλαγόνου, το προκολλαγόνο το οποίο διαθέτει πρόσθετα πεπτίδια που παρεμποδίζουν την σύνθεση ινιδίων. Το εξωκυττάριο ένζυμο κολλαγενάση αποκόπτει τα επιπλέον πεπτίδια και έτσι η συναρμολόγηση πραγματοποιείται μόνο μετά την εξαγωγή των μορίων από το κύτταρο. Το κολλαγονικό δίκτυο λειτουργεί ως δομικό δίκτυο το οποίο παρέχει μηχανική υποστήριξη στον ιστό και ως συνδετική επιφάνεια μορίων τα οποία σχετίζονται με συνδέσεις τόσο μεταξύ της θεμέλιας ουσίας όσο και μεταξύ της θεμέλιας ουσίας και των κυττάρων της. Σε μικρότερα ποσοστά και σε διάφορους συνδυασμούς στον χόνδρο απαντώνται ίνες κολλαγόνου των τύπων V, VI, IX, X, XI, XII, και XIV. Το κολλαγόνο τύπου IX αντιστοιχεί περίπου στο 1-2% του ολικού κολλαγόνου του ώριμου χόνδρου των ενηλίκων. Εντοπίζεται στην επιφάνεια των μεγάλων κολλαγονικών ινών και θεωρείται ότι καθορίζει τη διάμετρο των ινιδίων και

εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ινών αυτών και πιθανώς σχετίζεται με τη σύνδεση του κολλαγόνου τύπου II με τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Το κολλαγόνο τύπου V και XI αποτελεί το 3% του ολικού κολλαγόνου. Το κολλαγόνο τύπου X εκφράζεται κυρίως στην επιφυσιακή πλάκα των μακρών οστών και έχει σημασία στη διαδικασία της εφάλατωσης. Το κολλαγόνο τύπου VI αποτελεί το 1% του ολικού κολλαγόνου του υαλοειδή χόνδρου και διευκολύνει την αλληλοσύνδεση μεταξύ χονδροκυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Οι ίνες κολλαγόνου τύπου XII και XIV είναι δομικά μόρια που ανιχνεύονται σε μικρή ποσότητα στον υαλοειδή χόνδρο και περιέχουν στο μόριο τους μεγάλες μη κολλαγονικές περιοχές με άγνωστη λειτουργία.

Οι πρωτεογλυκάνες του αρθρικού χόνδρου είναι σύμπλοκα μακρομόρια αποτελούμενα από ένα πρωτεϊνικό πυρήνα υαλουρονικού οξέος συνδεδεμένο με πλάγιες πολυσακχαριδικές αλυσίδες τις γλυκοζαμινογλυκάνες (θειική κερατάνη ή θειική χονδροϊτίνη). Το συνολικό αθροιστικό μακρομόριο της πρωτεογλυκάνης είναι η αγκρεκάνη και αποτελεί το 80-90% των πρωτεογλυκανών του αρθρικού χόνδρου. Μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία έχουν δείξει ότι ο πυρήνας του μορίου αποτελείται από τρεις σφαιρικές (G1,G2,G3) και δύο εκτεταμένες περιοχές σύνδεσης (**Εικόνα 4**). Η αμινο-τελική περιοχή (G1) αλληλεπιδρά με το υαλουρονικό οξύ και σταθεροποιείται με πρωτεϊνικό δεσμό για τον σχηματισμό της αθροιστικής δομής. Μια εκτεταμένη περιοχή σύνδεσης παρατηρείται επίσης μεταξύ των G1 και G2 θέσεων. Στη θέση μεταξύ των G2 και G3 σφαιρικών περιοχών υπάρχει μια περιοχή



Εικόνα 4. Μόριο πρωτεογλυκάνης και σε λεπτομέρεια η δομή συμπλόκου αγκρεκάνης (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1960?lang=en®ion=GR>)

προσκόλλησης θειικής κερατάνης η οποία περιλαμβάνει μέχρι και 30 πλάγιες

αλυσίδες θειικής κερατάνης και ακολουθείται από μια περιοχή προσκόλλησης θειικής χονδροϊτίνης που μπορεί να φθάνει μέχρι 100 πλάγιες αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης. Η δομή των πρωτεογλυκανών ποικίλλει αναλόγως του μήκους των αλυσίδων θειικής κερατάνης και θειικής χονδροϊτίνης, του μήκους του πρωτεϊνικού πυρήνα και της έκτασης του μορίου στη θεμέλια ουσία. Οι πρωτεογλυκάνες επηρεάζουν τις μηχανικές και φυσικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου όπως την αντοχή κατά την εφαρμογή συμπιεστικών και διατμητικών δυνάμεων, την ωσμωτικότητα και την περιεκτικότητα σε νερό.

Η συσσώρευση των πρωτεογλυκανών διευκολύνει την ακινητοποίηση τους εντός του κολλαγονικού δικτύου και ενισχύει τη δομική ακαμψία της θεμέλιας ουσίας. Με την αύξηση της ηλικίας παρατηρούνται αρκετές μεταβολές στη δομή και τη σύσταση τους. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα πρωτεογλυκανών από το 7% περίπου κατά τη γέννηση ελαττώνεται στο μισό κατά την ενηλικίωση, ενώ εμφανίζεται δραματική πτώση της αναλογίας θειικής χονδροϊτίνης προς θειική κερατάνη με την πάροδο της ηλικίας και ελάττωση της περιεκτικότητας σε νερό καθώς οι υποομάδες των πρωτεογλυκανών γίνονται μικρότερες. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της ακαμψίας του χόνδρου.

Ο αρθρικός χόνδρος περιέχει επίσης τέσσερις άλλες μικρές ομόλογες πρωτεογλυκάνες οι οποίες δεν σχηματίζουν αθροιστικά μακρομόρια, δεν συνδέονται με το κολλαγόνο και δεν δημιουργούν συσσωρεύσεις πρωτεογλυκανών. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές έχουν σημαντική βιολογική αξία καθώς επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων με την ΕΘΟ αλλά και κλινική αξία αφού αποτελούν εργαστηριακά μετρήσιμους δείκτες της ανακύκλωσης αλλά και της εκφύλισης του αρθρικού χόνδρου. Μερικές από αυτές είναι η τενασκίνη, η φιμπρονεκτίνη, η αγκυρίνη, η χονδροσυνδετίνη, η διγλυκάνη, η δεκορίνη, η ινομοντουλίνη και η λουμικάνη οι οποίες εντοπίζονται και στους τένοντες. Η διγλυκάνη και η δεκορίνη περιέχουν στο μόριό τους πλάγιες αλυσίδες θειικής κερατάνης ενώ οι άλλες δύο θειικής κερατάνης. Επιπλέον, η δεκορίνη και η ινομοντουλίνη φαίνεται να συνδέουν μεταξύ τους ίνες κολλαγόνου και μπορεί να προάγουν με τον τρόπο αυτό τον σχηματισμό ινιδίων.

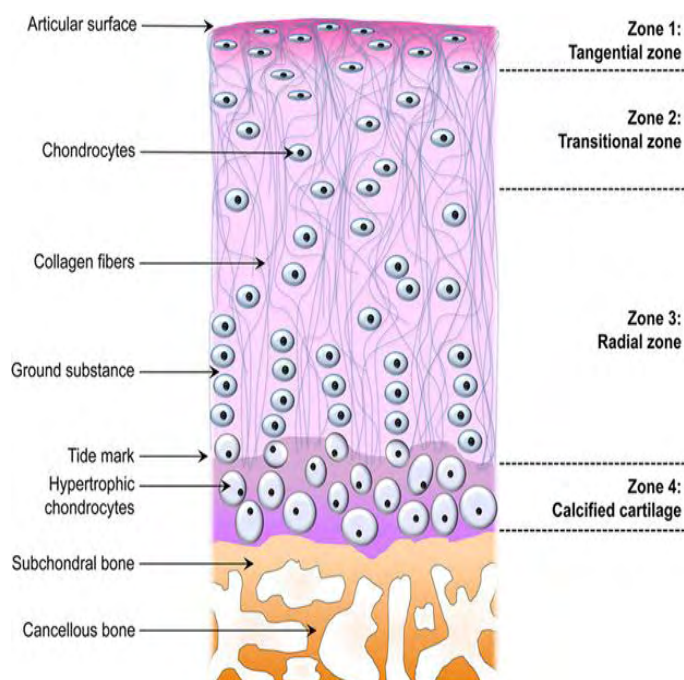
Η περιεκτικότητα του φυσιολογικού χόνδρου σε νερό επιτρέπει τη διάχυση των αερίων, των θρεπτικών ουσιών και των παραπροϊόντων του μεταβολισμού μεταξύ των χονδροκυττάρων και του πλούσιου σε θρεπτικές ουσίες αρθρικού υγρού. Το νερό είναι

συμπυκνωμένο (80%) κοντά στην αρθρική επιφάνεια, ενώ η περιεκτικότητα του ελαττώνεται με γραμμικό τρόπο με την αύξηση του βάθους, έτσι ώστε στην βαθύτερη ζώνη η περιεκτικότητα σε νερό ανέρχεται στο 65%. Η εντόπιση και η μετατόπιση του ύδατος παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μηχανικής λειτουργίας και των ιδιοτήτων λίπανσης του χόνδρου.

Συνολικά, υπάρχουν σημαντικές δομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεογλυκανών και των ινών κολλαγόνου. Οι κολλαγόνες ίνες του ώριμου χόνδρου στις αρθρικές επιφάνειες είναι διατεταγμένες σαν τόξα έτσι ώστε να κατανέμονται ομοιόμορφα οι δυνάμεις που ασκούνται πάνω στον ιστό. Τα μόρια των πρωτεογλυκανών τα οποία βρίσκονται μεμονωμένα ή σε αθροίσεις υπό μορφή δικτύου έχουν υψηλή συγκέντρωση σε νερό καθώς είναι πλούσια σε έντονα διακλαδιζόμενες υδρόφιλες γλυκοζαμινογλυκάνες και λειτουργούν σαν βιολογικά μηχανικά ελατήρια. Ένα μικρό ποσοστό των πρωτεογλυκανών λειτουργεί ως παράγοντας σύνδεσης μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου, τα οποία καλύπτουν ιδιαίτερα μεγάλες αποστάσεις για να διατηρήσουν ή να σχηματίσουν συνδέσεις. Οι δομικές αυτές αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν ισχυρές μηχανικές αλληλεπιδράσεις. Στην ουσία, οι πρωτεογλυκάνες και οι ίνες κολλαγόνου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν μια πορώδη, σύνθετη, ενισχυμένη με ίνες μητρική ουσία, η οποία διαθέτει όλα τα σημαντικά μηχανικά χαρακτηριστικά ενός στερεού, το οποίο είναι πλήρες με νερό και έχει την ικανότητα να αντιστέκεται στις τάσεις και τις καταπονήσεις της λίπανσης των αρθρώσεων. Κατά τη χρήση των αρθρώσεων όταν ασκείται πίεση το νερό εξωθείται από τη θεμέλια ουσία του χόνδρου προς το αρθρικό υγρό. Μετά τη έξοδο του νερού κινητοποιείται ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος συμβάλλει στην ευκαμψία του χόνδρου. Αυτός ο μηχανισμός οφείλεται στην αμοιβαία ηλεκτροστατική απώθηση αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών και θειικών ομάδων των μορίων των γλυκοζαμινογλυκανών. Όταν αφαιρείται η άσκηση πίεσης το νερό προσελκύεται πίσω στα μεσοδιαστήματα μεταξύ των κλάδων των γλυκοζαμινογλυκανών. Έχουν ουσιώδη σημασία για τη διατροφή του χόνδρου και για την διευκόλυνση της ανταλλαγής οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα και άλλων μορίων μεταξύ του αρθρικού υγρού και του αρθρικού χόνδρου. Η θρέψη του αρθρικού χόνδρου εξασφαλίζεται κυρίως με μηχανισμούς αναερόβιου μεταβολισμού κυρίως μέσω διάχυσης από το αρθρικό υγρό που παράγεται από τον αρθρικό υμένα η ποσότητα του οποίου σε μια φυσιολογική άρθρωση είναι ελάχιστη (Buckwalter et al., 1998).

1.4 Αρχιτεκτονική αρθρικού χόνδρου –επίπεδα οργάνωσης

Ο ενήλικος αρθρικός υαλοειδής χόνδρος ιστολογικά παρουσιάζει δύο επίπεδα οργάνωσης. Στο πρώτο επίπεδο ανάλογα με τον προσανατολισμό των ινών του κολλαγόνου, την κατανομή των πρωτεογλυκανών και την οργάνωση των χονδροκυττάρων σε διάφορα βάθη από την αρθρική επιφάνεια διακρίνονται τέσσερις ζώνες (στοιβάδες) παράλληλες προς την αρθρική επιφάνεια: α) η επιφανειακή ή ζώνη ολίσθησης, β) η μέση ή μεταβατική, γ) η ακτινωτή και δ) η ζώνη του αποτιτανωμένου χόνδρου (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Αρχιτεκτονική δομή και προσανατολισμός ινιδίων κολλαγόνου. Μορφολογία και διάταξη ACs (Πηγή από: <http://www.frontbiosci.org/2013/v5s/af/374/fulltext.php?bframe=figures.htm> Czaba et al,2003)

Τα χονδροκύτταρα κάθε ζώνης διαφοροποιούνται ως προς το σχήμα και τη διάταξή τους στο χώρο. Το σχήμα των κυττάρων εξαρτάται επίσης από το είδος, τη θέση και την ωριμότητα του χόνδρινου ιστού.

Η ζώνη I (επιφανειακή ή ζώνη ολίσθησης) είναι η επιφανειακότερη προς την αρθρική κοιλότητα και αποτελεί περίπου το 5-10% του αρθρικού χόνδρου. Χαρακτηρίζεται από ομοιογενείς εφαπτομενικά παράλληλα διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου, δισκοειδή πεπλατυσμένα χονδροκύτταρα τα οποία ανάλογα με τον τύπο του συνδετικού ιστού απαντώνται είτε ως μεμονωμένα διάσπαρτα κύτταρα, είτε ως ζεύγη ή ομάδες κυττάρων με χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και με μικρή περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες. Τα χονδροκύτταρα της ζώνης I με ιδιότητες μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (ινοβλαστών), παράγουν πρωτεϊνικά μόρια, τις lubricins. Οι lubricins μαζί με υαλουρονικό οξύ σχηματίζουν ένα λείο στρώμα που ελαττώνει τον συντελεστή τριβής μεταξύ γειτονικών

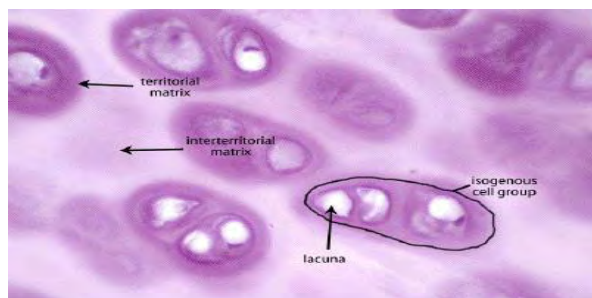
χόνδρινων επιφανειών στις αρθρώσεις (Greene et al., 2011). Σχηματίζεται έτσι μια επιφανειακή μεμβράνη, η επιδερμίδα του χόνδρου που η αντοχή της και η διατήρηση της συνέχειάς της παίζει ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

Η ζώνη II (μέση ή μεταβατική) αποτελεί το 40-45% του αρθρικού χόνδρου και χαρακτηρίζεται από ένα δίκτυο λοξά διατεταγμένων ινών κολλαγόνου, στρογγυλά ή σφαιρικά χονδροκύτταρα με μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα και σημαντική συγκέντρωση πρωτεογλυκανών, κυρίως αγκρεκάνης. Τα κύτταρα έχουν αραιή και άτακτη διάταξη.

Η ζώνη III (ακτινωτή ζώνη) αποτελεί το 40-45% του αρθρικού χόνδρου και χαρακτηρίζεται από μικρότερη περιεκτικότητα σε νερό σε σχέση με τη ζώνη II, κάθετα διατεταγμένες πυκνές ίνες κολλαγόνου, στρογγυλά μικρότερα σε μέγεθος χονδροκύτταρα συχνά οργανωμένα σε στήλες και υψηλή συγκέντρωση πρωτεογλυκανών.

Η ζώνη IV είναι η ζώνη του αποτιτανωμένου χόνδρου και αποτελεί το 5-10% του αρθρικού χόνδρου. Χαρακτηρίζεται από κάθετα διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου στρογγυλά χονδροκύτταρα με αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία με υψηλή συγκέντρωση αλάτων ασβεστίου και χαμηλή ή μηδενική συγκέντρωση πρωτεογλυκανών. Η ανώτερη στιβάδα της ζώνης αυτής αποτελεί τη ζώνη μεταπτώσεως η οποία σχηματίζεται κυρίως κατά την οστεοποίηση της επιφυσιακής πλάκας κατά τη διάρκεια της σκελετικής ωρίμανσης. Η ζώνη μεταπτώσεως είναι σχετικά λεία και η δομή της ποικίλει αναλόγως της ηλικίας του ασθενούς και των διαφόρων παθήσεων. Μεταξύ των ζωνώσεων III και IV εντοπίζεται μια πορώδης περιοχή αποτελούμενη από ινίδια κολλαγόνου που είναι ανεξάρτητα από τα ινίδια κολλαγόνου του υποκείμενου ασβεστοποιημένου χόνδρου της ζώνης IV και εξασφαλίζουν τη μετακίνηση θρεπτικών συστατικών προς τον μη ασβεστοποιημένο χόνδρο της ζώνης III.

Το δεύτερο επίπεδο οργάνωσης του αρθρικού χόνδρου καθορίζεται με βάση την σχέση των χονδροκυττάρων με τη ΕΘΟ. Έτσι η θεμέλια ουσία χωρίζεται σε τρία διαμερίσματα (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Μικροσκοπική απεικόνιση υψηλής ανάλυσης στην οποία τα χονδροκύτταρα οργανώνονται σε ισογενείς ομάδες με βάση τη σχέση τους με την ΕΘΟ (Πηγή από: http://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_2/bone/DMS065/popup.html)

Το πρώτο διαμέρισμα ονομάζεται περικυτάρια θεμέλια ουσία (pericellular matrix) και βρίσκεται σε στενή επαφή με τα χονδροκύτταρα. Είναι πλούσιο σε γλυκοζαμινογλυκάνες και αντί του κολλαγόνου τύπου II επικρατεί το κολλαγόνο τύπου VI. Έτσι το κάθε χονδροκύτταρο μαζί με την περικυτάρια ουσία αποτελούν τον χονδρώνα (Poole et al., 1997). Το δεύτερο διαμέρισμα ονομάζεται interterritorial matrix. Πρόκειται για θεμέλια ουσία η οποία βρίσκεται σε απόσταση από τα χονδροκύτταρα. Αποτελείται από ινίδια κολλαγόνου τύπου II, IX, XI, και XVI που ουσιαστικά δίνουν στον χόνδρο όλες τις φυσικοχημικές ιδιότητες που τον χαρακτηρίζουν και τέλος υπάρχει η territorial matrix η οποία βρίσκεται μεταξύ της περικυτάριας και της interterritorial θεμέλιας ουσίας και κύριο χαρακτηριστικό της είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεογλυκανών και κυρίως θειικής χονδροϊτίνης.

1.5. Βιοχημικά μονοπάτια χονδρογένεσης

Κεντρικό σημείο της μηχανικής των ιστών για την ανάπτυξη κατεστραμμένων τμημάτων είναι η κατανόηση της προέλευσης τους δηλαδή από ποιο τύπο στιβάδας (μεσόδερμα, εξώδερμα ή ενδόδερμα) προέρχεται ο ιστός και ποια είναι τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης μέχρι την τελική του διαφοροποίηση. Στο σχηματισμό του σκελετικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση συμμετέχουν και οι τρεις τύποι βλαστικών στιβάδων δηλαδή τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας του εξωδέρματος, με μικρότερη συμμετοχή τα κύτταρα του ενδοδέρματος, και κατά κύριο λόγο τα μεσεγχευματικά κύτταρα από το μέσο βλαστικό δέρμα του εμβρύου (Goldring et al., 2006). Διάτμηση του παραξονικού μεσοδέρματος εκατέρωθεν της νωτοχορδής δημιουργεί τους σωμίτες οι οποίοι αργότερα θα σχηματίσουν τη σπονδυλική στήλη, τους μυς της ράχης, τη γλώσσα και τα άκρα. Πιο ειδικά τα χονδροκύτταρα των πλευρικών οστών προέρχονται από το παραξονικό σωματικό μεσόδερμα ενώ στις επιφύσεις των μακρών οστών τα χονδροκύτταρα προέρχονται από την σπλαχνική παραξονική μεσοδερμική πλάκα (lateral plate mesoderm –LPM) η οποία επιπλέον δίνει γένεση σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και του καρδιαγγειακού (Kinder et.al, 1999 & Lawson et al., 1991). Οι παράγοντες (διαλυτά μόρια) που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των πρόδρομων μεσεγχευματικών κυττάρων (chondrogenic mesenchymal cells) σε χονδροκύτταρα διαφέρουν από τους παράγοντες που προσδίδουν τη δυναμική στους χονδρώνες (chondrogenic nodules) να μετατραπούν σε πλήρως διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα.

Οι κυριότεροι παρακρινείς (αυξητικοί) παράγοντες που εμπλέκονται στην διαδικασία της χονδρογένεσης είναι οι ακόλουθοι:

TGF-β

Η υπεροικογένεια των πρωτεϊνών TGF-β (Transforming Growth Factor-beta) παίζει ουσιώδη ρόλο στον σχηματισμό του αρθρικού χόνδρου. Μέλη της υπεροικογένειας εκτός από τον TGF-β, είναι οι BMPs (Bone Morphogenic Proteins), οι inhibins και activins, nodal, myostatin. Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των οστεοβλαστών, των χονδροκυττάρων, των νευρικών και των επιθηλιακών κυττάρων. Ο TGF-β είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που απαντά σε πέντε ισομορφές TGF-β1-5. Οι TGF-β1,2,3 θεωρείται ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα και ενεργοποιούν τις διαδικασίες σύνθεσης των πρωτογλυκανών και του κολλαγόνου τύπου II (Vinattier et al., 2009). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι διάφορες ισομορφές του TGF-β έχουν διαφορετικές επιδράσεις στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα ο TGF-β1 ευθύνεται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρόδρομων συμπυκνωμένων χονδροκυττάρων (cell-cell interactions), ενώ ο TGF-β2 ρυθμίζει την διαφοροποίηση των τελευταίων προς υπερτροφικά χονδροκύτταρα (Chung et al., 2008).

BMPs

Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας αποτελούν μέλη της ευρύτερης υπεροικογένειας των TGF-β αυξητικών παραγόντων και εκκρίνονται ως πρόδρομα μόρια. Τουλάχιστον 20 μέλη της οικογένειας των BMPs έχουν βρεθεί ότι παίζουν ουσιώδη ρόλο στις διαδικασίες χονδρογένεσης και οστεογένεσης τόσο έκτοπα όσο και στις φυσιολογικές θέσεις κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης. Μεταξύ των μελών οι BMPs-2,-4,-6,-7,-13 επάγουν τις διαδικασίες χονδρογένεσης των MSCs. Πιο συγκεκριμένα κατά την ανάπτυξη των άκρων η BMP-2 εκφράζεται στα προχόνδρινα συσσωματώματα και *in vitro* ενεργοποιεί τη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου. Μάλιστα διαφορετικοί συνδυασμοί των TGF-β με τις BMPs επάγουν σε διαφορετικό βαθμό τη διαδικασία της χονδρογένεσης με τα καλύτερα αποτελέσματα να εμφανίζονται μεταξύ των συνδυασμών TGF-β3 και BMP-2 αλλά και μεταξύ των TGF-β3 και BMP-6 (Indrawattana, et al., 2004).

FGFs

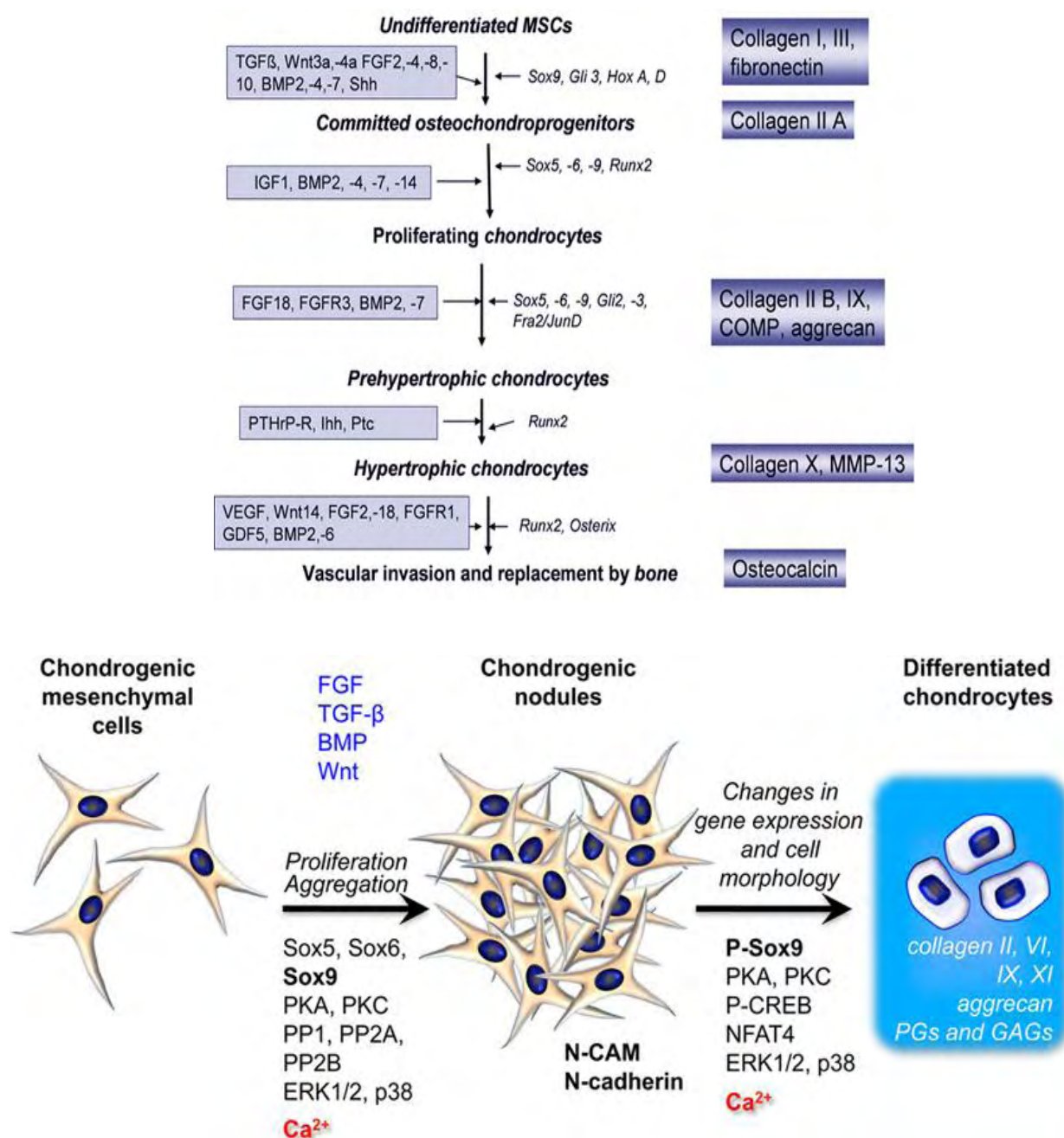
Η οικογένεια των FGF (Fibroblast Growth Factor) αυξητικών παραγόντων περιλαμβάνει 22 μέλη. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας είναι εκκρινόμενα μόρια εκτός από τους παράγοντες FGF-1,2 και FGF 11 και 14. Μελέτες *in vivo* και *in vitro* έχουν δείξει ότι η σηματοδότηση που ξεκινά από τον αυξητικό παράγοντα FGF18 με την ενεργοποίηση του

FGFR 3 υποδοχέα, οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σύνθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και διαφοροποίηση των MSCs προς χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας (Davinson et al., 2005).

IGFs

Τα μόρια της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων IGFs (Insulin-like Growth Factor) παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με το μόριο της ινσουλίνης και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν της διαδικασία της χονδρογένεσης. Ειδικότερα επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης και ευθύνονται για τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών και την παραγωγή κολλαγόνου τύπου II στα χονδροκύτταρα. Μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυασμός του TGF- β 3 και IGF-1 οδηγεί σε διάστημα περίπου 8 εβδομάδων σε μεγαλύτερη σύνθεση γλυκοζαμινογλυκανών από ότι ο TGF- β 1 παράγοντας μόνος του (Sakimura et al., 2006).

Η διαδικασία χονδρογένεσης όπως έχει παρατηρηθεί από in vitro μελέτες πραγματοποιείται σε 5 φάσεις. Στην πρώτη φάση, η πρώτη διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι ότι τα κύτταρα του πρώιμου μεσεγχύματος μεσοδερμικής προέλευσης που έχουν αστεροειδή μορφή κάτω από την επίδραση παρακρινών διαλυτών μορίων που εκκρίνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φάση της γαστριδίωσης όπως είναι ο FGF, ο IGF (insulin –like growth factor) και η υπεροικογένεια των μορίων TGF- β , ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια με τα οποία επάγεται η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως του Pax1 και scleraxis οι οποίοι ενεργοποιούν γονίδια που εκφράζονται ειδικά στα χονδροκύτταρα που αποτελούν τον αρθρικό χόνδρο. Μεταξύ των πρωτεϊνών που παράγονται είναι το κολλαγόνο τύπου I, III και ινωδονεκτίνη καθώς και ένας υποτύπος του κολλαγόνου II, το κολλαγόνο τύπου IIa, η N-cadherin (Ncad) (Oberlender et al., 1994) , η N-cam1 (Widelitz et al., 1993) και μόρια τενασκίνης C (Mackie et al., 1987). Παρατηρείται σταδιακά αλλαγή στη μορφολογία, και τα πρόδρομα χονδροκύτταρα σχηματίζουν ένα δίκτυο το οποίο γεμίζει με κολλώδη, άμορφη μεσοκυττάρια ουσία (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Μονοπάτι χονδρογένεσης κατά την εμβρυογένεση. Παρακρινείς παράγοντες που συμμετέχουν στην ιστογένεση του χόνδρου. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox9 παρατηρείται σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης εκτός από το στάδιο του υπερτροφικού χόνδρου, ενώ η παρουσία ασβεστίου (κάτω εικόνα) είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση κάθε σηματοδοτικού μονοπατιού (Susanne Grassel and Ahmed, 2007, www.bioscience.org/2007/af/2440/fulltext.php?bframe=figures.htm).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox9 (SRY-box9) αρχίζει να εκφράζεται στην πρώτη φάση της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προορίζονται να δώσουν χονδροκύτταρα αλλά παρόλα αυτά τα κύτταρα παραμένουν πολυδύναμα (multipotent). Σε δεύτερη φάση σε έμβρυα ηλικίας πέντε εβδομάδων τα πρόδρομα

χονδροκύτταρα (chondrogenic mesenchymal cells) αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται πιο έντονα, σχηματίζουν πιο εμφανείς συμπυκνώσεις στο μεσέγγυμα και συσσωρεύονται σχηματίζοντας προχόνδρινα συσσωματώματα. Τα συμπυκνωμένα χονδροκύτταρα που προορίζονται να δώσουν γένεση στον αρθρικό χόνδρο (Articular Chondrocytes-ACs) αποτελούν μια υποομάδα (interzone cells) με χαρακτηριστική υποστρόγγυλη μορφολογία (chondrogenic nodules) αποτελούν τους χονδροβλάστες, έχουν βασεόφιλο κυτταρόπλασμα πλούσιο σε ριβοσώματα, και εκκρίνουν τα διαλυτά μόρια BMP-2,-4 & -7 τα οποία επάγουν την έκφραση γονιδίων για σύνθεση κολλαγόνου τύπου II, κολλαγόνου τύπου IIb, IX, XI και αγκρεκάνη. Η σύνθεση και η εναπόθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αρχίζει να διαχωρίζει την κάθε χονδροβλάστη. Έτσι αφού συνθέσουν τα συστατικά της ΕΘΟ στη συνέχεια αποκτούν πιο σφαιρικό σχήμα, ο κυτταροπλασματικός όγκος τους σε σχέση με τον όγκο του πυρήνα ελαττώνεται και εγκολπώνονται μέσα σε κοιλότητες της ΕΘΟ όπου και διατηρούνται σε ληθαργική κατάσταση.

Διακρίνονται από τις αντίστοιχες συμπυκνώσεις μεσεγγύματος της επιφυσιακής αυξητικής πλάκας (Growth Plate Chondrocytes-GPCs) που οδηγούν στο σχηματισμό των οστών. Εκεί κάτω από την επίδραση του άξονα παραθορμόνης PTHrP και του σηματοδοτικού μονοπατιού Ihh τα έντονα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα που συνθέτουν κολλαγόνο τύπου VI και ματριλλίνη 1 (matrilin 1) εκκρίνουν τον παράγοντα Wnt14 και τον παράγοντα Gdf5 (growth differentiation factor 5) και αποκτούν πιο υπερτροφικό φαινότυπο. Το κύριο χαρακτηριστικό είναι η καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox9 ενώ μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Runx2 και του σηματοδοτικού μονοπατιού της Wnt/β-κατενίνης, τα υπερτροφικά GPCs εκφράζουν υψηλά ποσοστά κολλαγόνου τύπου X και MMP-13 και σταδιακά αποπύπτουν. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση της ενδοχονδρικής οστεοποίησης συμμετέχει ο υποδοχέας EGF και το διαλυτό μόριο ligand TNF-α μέσω της Rho/ROCK, MEK,ERK σηματοδότησης (Appleton et al., 2010). Τελικά η ΕΘΟ χάνει τη συνοχή των δομικών συστατικών της και αποτελεί μήτρα (scaffold) για εναπόθεση μεταλλικών αλάτων, προσέλκυση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών από το υποχόνδριο οστό και αντικατάσταση της από οστίτη ιστό. Παράλληλα ο αποδομημένος αρθρικός χόνδρος δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης αγγείωσης μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα VEGF και έτσι αιμοφόρα αγγεία κατακλύζουν τον ιστό προερχόμενα από τον υποκείμενο μυελό των οστών.

1.6. Αύξηση του αρθρικού χόνδρου

Η αύξηση του αρθρικού χόνδρου γίνεται με δύο διεργασίες: α) τη *διάμεση αύξηση*, που προκύπτει από μετωπικές διαιρέσεις των νευροβλαστών εντός της θεμέλιας ουσίας και β) την *αποθετική αύξηση*, που προκύπτει από την ανάπτυξη νέων νευροβλαστών που βρίσκονται στο περιχόνδριο. Η διάμεση αύξηση συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης (*de novo*) σχηματισμού του χόνδρου όταν αυξάνεται η σιτική μάζα, με την εξάπλωση της θεμέλιας ουσίας του χόνδρου εκ των έσω, ενώ η αποθετική αύξηση λαμβάνει χώρα στους νευροβλάστες του περιχονδρίου οι οποίοι διαφοροποιούνται σε μονοκύτταρα με εναπόθεση νέου υλικού κατά τη διέγερση της αύξησης. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του μεσεγγυήματος αποτελούν το περιχόνδριο. Το περιχόνδριο είναι ένα δίστιχο στρώμα πυκνού συνδετικού ιστού. Η ανώτερη στιβάδα του αποκτά ινώδη μορφή περιέχει ινοβλάστες ενώ η κατώτερη-εσωτερική στιβάδα αποτελείται από πολύμορφους, σφαιρικούς κενοτοπιώδης νευροβλάστες, οι οποίοι περιέχουν γλυκογόνο, λιπίδια και άφθονο αδρό ΕΔ και είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση νέας ΕΘΟ. Το περιχόνδριο φιλοξενεί την αγγείωση για το στερούμενο αγγείων χόνδρο και περιέχει επίσης νεύρα και λεμφαγγεία. Αυτά όμως τα αγγεία δεν παρέχουν θρεπτικές ουσίες στο χόνδρο. Ο αρθρικός χόνδρος που καλύπτει τις οστικές επιφάνειες των κινητικών αρθρώσεων στερείται περιχονδρίου και συντηρείται μέσω διάχυσης του οξυγόνου και των θρεπτικών ουσιών από το αρθρικό υγρό, ενώ στην περίπτωση αυτή η ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου αποδίδεται στην διάμεση αύξηση γι' αυτό και η αναγέννησή του είναι μηδαμινή έως απύσχα μετά την ενηλικίωση.

1.7. Μεταβολισμός χονδροκυττάρων

Κάτω από κανονικές συνθήκες η μεταβολική δραστηριότητα του ενήλικου αρθρικού χόνδρου εμφανίζεται μειωμένη και αποδίδεται στην έλλειψη αγγείωσης (Paget et al., 1969, Ito et al., 2012). Γενικά, το ένα τρίτο του αρθρικού χόνδρου, δηλαδή η ζώνη III και V, τρέφεται παθητικά με διάχυση από το υποχόνδριο οστό ενώ τα δύο τρίτα (ζώνη I, II) με διάχυση από το αρθρικό υγρό. Ως αποτέλεσμα τα μονοκύτταρα διατηρούν χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου υψηλότερες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα και χαμηλότερο pH από άλλα κύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο μεταβολισμός τους επηρεάζεται α) από τη περικυττάρια θεμέλια ουσία β) από την δράση κυτοκινών και ορμονών όπως (π.χ τη αυξητική ορμόνη, τη τεστοστερόνη, τη κορτιζόνη, την οιστραδιόλη και τη θυροξίνη) και γ) από την επίδραση μηχανικών δυνάμεων. Η ανακύκλωση της ΕΘΟ

του αρθρικού χόνδρου ελέγχεται μέσω ενζύμων που αποθηκεύονται στο λυσοσωμιακό σύστημα των χονδροκυττάρων. Υπάρχουν τέσσερις τάξεις πρωτεϊνών εντός της ΕΘΟ που εμπλέκονται καταλυτικά στην αποδόμηση των συστατικών της μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης. Τα ένζυμα αυτά είναι πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και ασπαρτικού οξέος καθώς και μεταλλοπρωτεΐνάσες. Το αθροιστικό μόριο των πρωτεογλυκανών (αγκρεκάνη) αποικοδομείται γρήγορα από το ένζυμο “aggrecanase” το οποίο διασπά τον πρωτεϊνικό πυρήνα στη θέση μεταξύ G1 και G2. Τα κλάσματα που προκύπτουν διασπώνται περαιτέρω από άλλες πρωτεΐνάσες και τα τελικά προϊόντα αποβάλλονται στο αρθρικό υγρό. Η ανακύκλωση του κολλαγόνου έχει βραδύτερο ρυθμό και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μεταλλοπρωτεϊνών. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο χρόνος ημίσειας ζωής του κολλαγόνου τύπου II φθάνει τα 117 έτη (Verzijl et al., 2000). Η δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών εξαρτάται από διασθενή κατιόντα. Τα ένζυμα αυτά συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα τα οποία απαιτούν ενζυμική μετατροπή για ενεργοποίηση. Τα ενεργά ένζυμα υπόκεινται σε ρύθμιση και μπορεί να υποστούν μη αναστρέψιμη αναστολή από συγκεκριμένους αναστολείς που παράγονται από τα μονοκύτταρα. Τέτοιος αναστολέας είναι ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) η δραστηριότητα του οποίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση στη θεμέλια ουσία τόσο του ίδιου του αναστολέα όσο και των μεταλλοπρωτεϊνών. Εκτός από τα προαναφερθέντα ένζυμα καταβολισμού τα κύτταρα του χόνδρου παράγουν προσταγλανδίνες. Η ανακύκλωση της ΕΘΟ του αρθρικού χόνδρου ελέγχεται μέσω ενζύμων που αποθηκεύονται στο λυσοσωμιακό σύστημα των χονδροκυττάρων ενώ ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συμβάλλουν στον αποπολυμερισμό και τη περαιτέρω διάσπαση του κολλαγόνου. Τα προϊόντα καταβολισμού απελευθερώνονται στο αρθρικό υγρό και φαγοκυτταρώνονται από κύτταρα του αρθρικού υμένα ο οποίος αντιδρά με φλεγμονώδη αντίδραση συμμετέχοντας στον κύκλο καταστροφής του χόνδρου. Στο μεταβολισμό του αρθρικού χόνδρου έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν επίσης διάφοροι κυτταρικοί μεσολαβητές (κυτοκίνες) και αυξητικοί παράγοντες. Η ιντερλευκίνη – 1 (IL-1) δρα ως ενεργοποιητής των καταβολικών ενζύμων, ενώ η ιντερλευκίνη – 6 (IL- 6) και η ιντερφερόνη - γ ανταγωνίζονται την IL-1. Από τους αυξητικούς παράγοντες, ο IGF – 1(Insulin like Growth Factor 1), ο TGF (Transforming Growth Factor) και ο FGF (Fibroblast Growth Factor), προάγουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και τη σύνθεση κολλαγόνου (Brew et al.2000, Goldring & Marcu 2009, Sun 2010, Goldring et al., 2011, Leong et al., 2011a,b, Rosa et al., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΒΛΑΒΕΣ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

2.1. Αρθροπάθειες

Με τον όρο αρθροπάθεια ή οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται η οξεία ή χρόνια πάθηση μίας άρθρωσης, η οποία καταλήγει στον περιορισμό ή την κατάργηση της λειτουργίας της. Ο όρος αρθροπάθεια είναι ευρύτερος και καλύπτει όλες τις παθήσεις των αρθρώσεων, ανεξάρτητα από την αιτιολογία ή την παθογένεια της, ενώ ο όρος οστεοαρθρίτιδα δηλώνει, συνήθως τις εκφυλιστικού τύπου παθήσεις των αρθρώσεων, σε αντιδιαστολή από τις ρευματικές και σηπτικές αρθρίτιδες. Οι εκφυλιστικές διαταραχές του χόνδρινου συνδετικού ιστού που συνοδεύονται α) από προοδευτική μαλάκυνση δηλαδή απώλεια της φυσιολογικής του σκληρότητας β) από ολική καταστροφή του αρθρικού χόνδρου, γ) από υπερβολική ανάπτυξη (υπερτροφία) νέου οστού και χόνδρου, δ) από δημιουργία οστεόφυτων στις παρυφές των αρθρώσεων και ε) από συρρίκνωση του αρθρικού θυλάκου, σε όλες σχεδόν τις μορφές των αρθροπαθειών, είναι κοινές και ανεξάρτητες από τα αίτια που τις προκαλούν. Ο πόνος, η διόγκωση, η παραμόρφωση και η δυσκαμψία αποτελούν τις συνήθεις κλινικές εκδηλώσεις των αρθρικών παθήσεων. Η ομοιομορφία των συμπτωμάτων οφείλεται στο ότι κάθε άρθρωση αποτελεί ένα ενιαίο ανατομικό και λειτουργικό σύνολο. Παθολογικές καταστάσεις, που έχουν την αρχική τους εστία σε κάποιο από τα στοιχεία που αποτελούν την άρθρωση, οδηγούν αργά ή γρήγορα στη βλάβη και καταστροφή και των υπόλοιπων στοιχείων, με αποτέλεσμα τη λειτουργική έκπτωση όλης της άρθρωσης και την εκδήλωση συμπτωμάτων, τα οποία είναι κοινά, ανεξάρτητα από τη μορφή της αρθροπάθειας.

2.2. Ταξινόμηση αρθροπαθειών

Η διάγνωση των αρθροπαθειών λόγω της ομοιομορφίας των συμπτωμάτων είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Όμως η αναγνώριση του αιτίου που την προκάλεσε βοηθά στην πρόγνωση αλλά και στην θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Γενικά οι αρθροπάθειες ανάλογα με το αν υπάρχει συγκεκριμένος αιτιολογικός παράγοντας διακρίνονται σε πρωτοπαθείς ή ιδιοπαθείς όταν το παθολογικό αίτιο είναι άγνωστο και σε δευτεροπαθείς όταν υπάρχει

σαφής αιτιολογικός παράγοντας στον οποίο οφείλεται η εμφάνιση της πάθησης.

Από πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα, στην οποία δεν υπάρχει εμφανής αιτιολογία δημιουργίας της, υπολογίζεται ότι πάσχουν κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας με συχνότητα 2-3% στον γενικό πληθυσμό, ενώ η νόσος είναι πιο συχνή στις γυναίκες. Τα πιο συχνά αίτια δευτεροπαθούς οστεοαρθρίτιδας είναι:

α) Τραυματισμοί ή συνεχής επαγγελματική χρήση ομάδας αρθρώσεων. Συνήθως στον γενικό πληθυσμό προσβάλλονται άτομα που ασκούν αθλήματα έντονης σωματικής δραστηριότητας και σε χρόνια βάση. Στους τοπικούς τραυματισμούς η βλάβη στον αρθρικό χόνδρο μπορεί να εκτείνεται μεταξύ των τριών χόνδρινων αρθρικών ζωνώσεων έως και το υποχόνδριο οστό. Εάν η βλάβη παραμείνει δίχως θεραπεία οδηγεί σε χρόνια εκφύλιση και δυσλειτουργία της άρθρωσης και πρόωρη οστεοαρθρίτιδα.

β) Συγγενείς κληρονομικές ανωμαλίες (δυσπλασίες). Συνήθως οφείλονται σε έλλειμμα ή ανεπάρκεια παραγωγής του κολλαγόνου τύπου II. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αχονδροπλασία τύπου I, η τύπου II αχονδροπλασία (νανισμός) και η υποχονδροπλασία, ενώ σε με ποικίλλου βαθμού δυσλειτουργία κολλαγόνου τύπου II, προσβάλλονται πολλά είδη χόνδρου και άλλοι ιστοί όπως συμβαίνει στις σπονδυλο-επιφυσσιακές δυσπλασίες, το σύνδρομο Stickler, την οικογενή οστεοαρθρίτιδα με ήπια χονδροδυσπλασία και τη δυσπλασία του Kniest. Άλλες διαταραχές όπως είναι η πολλαπλή επιφυσσιακή δυσπλασία και η ψευδοχονδροπλασία οφείλονται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της ολιγομερούς πρωτεΐνης της θεμέλιας ουσίας του χόνδρου COMP.

γ) Μεταβολικά νοσήματα (αιμοχρωμάτωση, ωχρονοσία, ουρική αρθρίτιδα, νόσος Gaucher).

δ) Αιματολογικά νοσήματα (π.χ. αιμοσφαιρινοπάθειες).

ε) Ενδοκρινοπάθειες (Μεγαλακρία, υποθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός).

στ) Οστική νόσος Paget.

ζ) Νευροπαθητικά νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.

η) Φλεγμονώδεις παθήσεις του αρθρικού υμένα όπως στην ρευματοειδή και αγκυλοποιητική αρθρίτιδα)

θ) επίδραση χημικών ουσιών π.χ αρθρίτιδα από χρήση κορτιζόνης

ι) αρθρίτιδες οφειλόμενες σε ειδικούς μικροβιακούς παράγοντες π.χ φυματίωση, βρουκέλλωση ή σαλμονέλλωση

ι) αρθρίτιδες οφειλόμενες σε νεοπλάσματα των αρθρώσεων

2.3. Επιδημιολογία –Κλινική εικόνα & Προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου

Η εκφυλιστική οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι η πιο συνηθισμένη πάθηση των αρθρώσεων. Εντοπίζεται συχνότερα σε ορισμένες αρθρώσεις (π.χ ισχίο, γόνατο, ώμος) και σε άλλες πιο σπάνια (π.χ ποδοκνημική, αγκώνας) και με διαφορετική συχνότητα μεταξύ ανδρών και γυναικών. Επιδημιολογική μελέτη που έλαβε χώρα στην Αμερική το 2013 μεταξύ ατόμων και των δύο φύλων έδειξε ότι μετά την ηλικία των 50ετών συμπτώματα οστεοαρθρίτιδας του γόνατος εμφάνισαν όλο και περισσότερες γυναίκες σε ποσοστό ~13%, συγκριτικά με τους άνδρες ~10% (Zhang & Jordan, 2013). Επίσης παρατηρείται διαφορετική φυλετική κατανομή. Για παράδειγμα η ΟΑ στο γόνατο είναι πιο σπάνια στους Αφρικανούς και τους Κινέζους και συχνότερη στους πληθυσμούς της νότιας Ευρώπης, θεωρώντας ότι τα υγρά κλίματα σχετίζονται με περισσότερα συμπτώματα. Τα πρώτα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται μετά το 50ο-60ο έτος της ηλικίας. Η νόσος συνήθως είναι υποκλινική και εξελίσσεται με βραδύ ρυθμό. Εκδηλώνεται στους ασθενείς σε προχωρημένη ηλικία καθιστώντας τη διάγνωση, μεταξύ ήπιας μορφής ΟΑ και φυσιολογικής γήρανσης του χόνδρου, δύσκολη.

Αν και μέχρι σήμερα η ΟΑ χαρακτηριζόταν ως ασθένεια της τρίτης ηλικίας νεότερες επιδημιολογικές μελέτες, δείχνουν ότι από τη νόσο προσβάλλονται ακόμη και άτομα μικρότερης ηλικίας (20 – 30 ετών), χωρίς δευτεροπαθή αιτιολογία ενώ εάν συνυπάρξουν επιβαρυντικοί παράγοντες η βλάβη του χόνδρου δίχως θεραπεία οδηγεί σε εκτεταμένη πρόωρη εκφύλιση της άρθρωσης.

Στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ, εκτός από τις μεταβολικές και ορμονικές επιδράσεις, την ηλικία, τον βαθμό καταπόνησης των αρθρώσεων, τις τοπικές μηχανικές φορτίσεις, τις τραυματικές κακώσεις ή προϋπάρχουσα πρωτοπαθή αρθρίτιδα, σπουδαίο ρόλο παίζει η σωματική διάπλαση. Η παχυσαρκία και ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος αποτελεί έναν σημαντικό προδιαθεσιακό παράγοντα κινδύνου και έχει σχετιστεί με πρόωρη εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας κυρίως στις αρθρώσεις των γονάτων και των ισχίων υπέρβαρων γυναικών (Brennan et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, οι ορμόνες που εκκρίνονται από τον λιπώδη ιστό όπως η λεπτίνη, η αδιπονεκτίνη και η ρεζιστίνη σε συνδυασμό αλλά και κάθε μια ξεχωριστά αυξάνουν την έκφραση κυτοκινών, MMPs και της NOS2 που σχετίζονται με εμφάνιση ήπιας φλεγμονώδους αντίδρασης διαταραχή της ομοιόστασης και καταβολισμού του αρθρικού χόνδρου((Kang et al., 2010; Koskinen et al., 2011, Zhang et al., 2010),.

Γενικά όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις, η πάθηση είναι αποτέλεσμα της

φυσιολογικής εξασθένησης του χόνδρου, με την πάροδο των ετών. Κάθε ασθενής εκτός από τις περιπτώσεις των συγγενών κληρονομικών διαταραχών, έχει τη δική του γενετική προδιάθεση, που σημαίνει ότι επηρεάζεται διαφορετικά. Έτσι, ορισμένα άτομα έχουν ελάχιστα συμπτώματα παρά τον εκφυλισμό των αρθρώσεων τους. Άλλοι πάλι στους οποίους εντοπίζονται γενετικά ελαττώματα ή ανωμαλίες στις αρθρώσεις, τους καθιστούν πιο ευάλωτους στην ασθένεια με αποτέλεσμα να έχουν πόνους και ακαμψία που επηρεάζουν έντονα την καθημερινότητά τους. Μέχρι πρόσφατα, οι ισχυρές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρθρικού υμένα, του αρθρικού χόνδρου και του υποχόνδριου οστού στην οστεοαρθρίτιδα δεν επέτρεπαν την κατανόηση του τοπικού και χρονικού σημείου έναρξης εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου. Σήμερα, ωστόσο κλινικές μελέτες και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν αποκαλύψει ότι στην πρόοδο και την εξέλιξη της παθολογίας της νόσου σημαντικό ρόλο παίζουν τα μονοκύτταρα. Μελέτες γονιδιωματικής ανάλυσης (Candidate Gene Studies και Genome Wide Linkage Analysis) μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με πρώιμη όσο και με εκτεταμένη χρόνια ΟΑ έχουν αποκαλύψει έναν αρκετά μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν για τα συστατικά της ΕΘΟ καθώς και σε σηματοδοτικά μόρια που ευθύνονται για την ευαισθησία των ατόμων στην εμφάνιση πρόωρης ΟΑ όπως είναι ο παράγοντας Gdg5, aspirin, secreted frizzled-related protein 3, deionidase 2 και Smad 3. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια των TGF-β, BMP, και Wnt που όπως προαναφέρθηκαν ρυθμίζουν έμμεσα τη διαδικασία διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων και την ωρίμανσή τους κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης. Οποιαδήποτε απόκλιση από τα προκαθορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην φυσιολογική ωρίμανση των χονδροκυττάρων μπορεί να τα οδηγήσει σε αναπτυξιακή αύξηση, σχηματισμό υπερτροφίας και έκφραση κολλαγόνου τύπου X, MMP-13 και Runx2. Με μελέτες επιγενετικής, στην ΟΑ εκτός από τους πολυμορφισμούς γονιδίων, έχουν παρατηρηθεί έμμεσες αλλαγές στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης με τις διαδικασίες μεθυλίωσης του DNA, τις τροποποιήσεις των ιστονών, τις αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και των μηχανισμών δράσης των micro-RNAs. Οι αλλαγές αυτές επιτρέπουν στο κύτταρο να αποκρίνεται άμεσα σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του, προκειμένου να διατηρήσει την ομοιόστασή του τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες όσο και στην ΟΑ (Swingler et al., 2011)

2.4. Διαγνωστικός έλεγχος

Συνολικά το εύρος κίνησης της άρθρωσης αρχικά μπορεί να είναι εντελώς φυσιολογικό σταδιακά όμως με την πρόοδο του εκφυλισμού η κινητικότητα περιορίζεται. Παρεμπόδιση της κίνησης και εμπλοκή της άρθρωσης εμφανίζεται σε περίπτωση που κομμάτι του χόνδρου έχει αποσπαστεί και βρίσκεται ως ελεύθερο σώμα μέσα στην άρθρωση, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του μηνίσκου στην άρθρωση του γόνατος. Οι ασθενείς με εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου συνήθως αναφέρουν πόνο στο σημείο που υπάρχει το πρόβλημα. Η σωματική δραστηριότητα μπορεί να επιδεινώσει το άλγος και να εμφανιστεί και οίδημα στην πάσχουσα άρθρωση. Κατά τη ψηλάφηση μπορεί να διαπιστωθεί συλλογή υγρού ενδοαρθρικά καθώς και αύξηση της θερμοκρασίας η οποία οφείλεται στην φλεγμονώδη διαδικασία. Σύμφωνα με την κλίμακα OCS (Outerbridge Classification System) οι βλάβες στον αρθρικό χόνδρο ταξινομούνται σε 4 στάδια (Πίνακας 1)

Outerbridge Classification of Arthritis Of Articular Cartilage

Grade 0	Normal cartilage
Grade I	Cartilage with softening and swelling
Grade II	Partial-thickness defect with fissures on the surface that do not reach subchondral bone or exceed 1.5 cm in diameter
Grade III	Fissuring to the level of subchondral bone in an area with a diameter more than 1.5 cm
Grade IV	Exposed subchondral bone

Πίνακας 1. Ταξινόμηση βλάβης ΟΑ χόνδρου σύμφωνα με το σύστημα OCS (Πηγή:<http://nurse-practitioners-and-physician-assistants.advancweb.com/Features/Articles/Anterior-Knee-Pain.aspx>Anterior Knee Pain)

Στάδιο I: ο αρθρικός χόνδρος οπτικά μοιάζει φυσιολογικός, αλλά κατά την ψηλάφηση του με ειδικά εργαλεία, είναι πολύ μαλακός και ευπίεστος.

Στάδιο II: παρουσιάζει επιπλέον ρωγμές και ινίδια στις περιοχές βλάβης.

Στάδιο III: εμφανίζει τοπικές εστίες απώλειας, με ελεύθερα τεμάχια χόνδρου και δημιουργία κρατήρων.

Στάδιο IV: πλήρης καταστροφή και το υποκείμενο οστόν είναι τελείως γυμνό.

Η απλή **ακτινογραφία** της άρθρωσης είναι συνήθως η πρώτη εξέταση που γίνεται, χωρίς ωστόσο να αναδεικνύονται παθολογικά ευρήματα. Σήμερα, η **μαγνητική τομογραφία (MRI)** αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την διερεύνηση των βλαβών του χόνδρου καθώς η εξέταση είναι πιο λεπτομερής και επιτρέπει την αξιολόγηση της έκτασης αλλά και του βάθους της βλάβης, που θα καθορίσουν και την επιλογή της θεραπευτικής μεθόδου.

2.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι αλλοιώσεις του αρθρικού χόνδρου, προκαλούμενες είτε από οξύ τραυματισμό ή στην οστεοαρθρίτιδα, αποτελούν αντικείμενο εντατικής κλινικής έρευνας εξαιτίας της φτωχής ενδογενούς αναγεννητικής ικανότητας του υψηλά διαφοροποιημένου χόνδρινου ιστού. Αν και ο ιατρός-θεραπευτής έχει αρκετές επιλογές θεραπευτικής αντιμετώπισης και ανακούφισης των συμπτωμάτων του χρόνιου πόνου και μερικής αποκατάστασης της επιφάνειας που έχει υποστεί κάκωση, καμία δεν μπορεί να επιτύχει μακροχρόνια πλήρη φυσική αποκατάσταση και ίαση συνοδευόμενη από ανάπλαση του τραυματισμένου ιστού. Στα αρχικά στάδια της ασθένειας, οι προτεινόμενες ασκήσεις της άρθρωσης, η φυσιοθεραπεία, η υδροθεραπεία και η μείωση του σωματικού βάρους σε περίπτωση υπέρβαρων ασθενών, επιτρέπουν τη διατήρηση της ευκαμψίας της άρθρωσης.

2.5.1. Φαρμακολογική Προσέγγιση

Όταν η οστεοαρθρίτιδα όμως είναι σε έξαρση, στους ασθενείς αρχικά εφαρμόζεται συντηρητική φαρμακευτική αγωγή που στόχο έχει να περιορίσει το αίσθημα του πόνου και του ερεθισμού. Τα κυριότερα φαρμακευτικά σχήματα που συστήνονται είναι αντιφλεγμονώδη σκευάσματα, όπως η ασπιρίνη, η ιβουπροφαίνη, η ακεταμινοφαίνη η ναπροξένη και η δικλοφαινάκη, μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, διάφορα οπιοειδή αναλγητικά και κορτικοστεροειδή φάρμακα. Επιβοηθητικά είναι επίσης σπρέι και αλοιφές που εφαρμόζονται απευθείας στο σημείο που πάσχει. Αν ο πόνος επιμένει, τότε συστήνονται διάφορα στεροειδή ή υαλουρονικό οξύ σε ενέσιμη μορφή που εγχύονται απευθείας ή μαζί με τοπικό αναισθητικό στην άρθρωση με στόχο την ανακούφιση από τα συμπτώματα φλεγμονής. Οι συντηρητικές θεραπείες ανακουφίζουν τον ασθενή για ορισμένο χρονικό διάστημα ενώ η εξέλιξη του προβλήματος παραμένει ανεξέλεγκτη.

2.5.2. Χειρουργικές Μέθοδοι

Διάφορες μέθοδοι χειρουργικής αποκατάστασης των χόνδρινων βλαβών έχουν αναπτυχθεί σήμερα, οι οποίες επιτελούνται ως επί το πλείστον αρθροσκοπικά και σκοπό έχουν την αντιμετώπιση του πόνου και των οστεοποιήσεων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί καμία μεμονωμένη χειρουργική μέθοδος που να είναι ιδανική για την πλήρη ίαση της εκφυλιστικής νόσου. Στο σχεδιασμό για τη σωστή θεραπευτική προσέγγιση εμπλέκονται πολλοί παράγοντες όπως η ηλικία, η δραστηριότητα του ασθενούς, η αιτιολογία και το στάδιο της νόσου.

Τα κυριότερα είδη χειρουργικών μεθόδων που επιλέγονται στα τελευταία στάδια τη

νόσου ανάλογα με την ηλικία, τη φθορά του χόνδρου, το μήκος των οστών, και την ικανότητα κίνησης της άρθρωσης είναι :

α) Η *ολική αρθροπλαστική* με εμφυτεύματα όταν η καταστροφή του χόνδρου είναι πλήρης. Σήμερα χρησιμοποιούνται σύγχρονα υλικά αντικατάστασης (π.χ κεραμικά και μεταλλικά στοιχεία επικαλυμμένα με υδροξυαπατίτη που έχουν υψηλή αντοχή και χαμηλό συντελεστή τριβής τα οποία αφενός μεν αυξάνουν τη διάρκεια ζωής τους, αφετέρου επιτρέπουν την ανάπτυξη του οστού μέσα στους πόρους της ενδοπρόθεσης μειώνοντας πιθανή χαλάρωση. Τα εμφυτεύματα συνήθως συστήνονται σε ασθενείς που είναι πάνω από την ηλικία των 60-65 ετών ενώ το αυξημένο σωματικό βάρος, ο σακχαρώδης διαβήτης και οι λοιμώξεις αυξάνουν την πιθανότητα επιπλοκών που μπορεί να οδηγήσει σε αναπηρία.

β) Η οστεοτομία προτείνεται σε μικρότερες ηλικίες. Πρόκειται για τεχνική που έχει ως στόχο να αλλάζει (μειώνει) την κατανομή των φορτίων σε μια άρθρωση με συνέπεια την ανακούφιση των συμπτωμάτων.

γ) Η αρθρόδεση. Πρόκειται για οριστική κατάργηση της άρθρωσης και χρησιμοποιείται ως μέθοδος εκλογής συνήθως στην μεταταρσιοφαλαγγική άρθρωση στον αστράγαλο.

δ) Ο *υποχόνδριος τρυπανισμός (subchondrial drilling)*. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται μικρές οπές στο φυσιολογικό υποχόνδριο οστό πολύ κοντά στο σημείο της βλάβης που σκοπό έχουν να διεγείρουν την παραγωγή ινώδους αρθρικού χόνδρου και να επουλώσουν μερικού πάχους βλάβες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στη θεραπεία οστεοχονδρικών βλαβών του αστραγάλου, χωρίς όμως να αντιμετωπίζεται η αιτιολογία του προβλήματος. Σήμερα η μέθοδος συνδυάζεται με έγχυση MSCs περιφερικού αίματος –(platelet rich plasma) με υαλουρονικό οξύ το οποίο σε διάστημα τριών (3) μηνών φαίνεται ότι επιταχύνει την ενσωμάτωση του ινώδους χόνδρου στον υπόλοιπο ιστό χωρίς ενδείξεις αποκόλλησης ή σχηματισμό υπερτροφικού χόνδρου.

ε) *μέθοδος των μικροκαταγμάτων (Microfractures)*. Με ειδικά εργαλεία δημιουργούνται μικροκατάγματα στο υποχόνδριο οστό. Έτσι δημιουργούνται ερεθίσματα για την παραγωγή ιστού που προσομοιάζει με τον φυσιολογικό χόνδρο. Η ταυτόχρονη έγχυση MSCs από μυελό των οστών φαίνεται να δίνει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ασθενείς με εκφύλιση του χόνδρου στο γόνατο.

στ) *μεταμόσχευση αυτόλογων οστεοχόνδρινων τεμαχίων από γειτονικές περιοχές ή τμημάτων του υποχόνδριου οστού (Mosaicplasty)*. Στη μέθοδο αυτή (osteochondral autograft transplantation) μικρά οστεοχόνδρινα τεμαχίδια υγιούς χόνδρου από μη

φορτιζόμενη επιφάνεια της ίδιας ή διαφορετικής άρθρωσης λαμβάνονται με ειδική τεχνική και εμφυτεύονται στην περιοχή της βλάβης στον ίδιο χειρουργικό χρόνο. Οι τρεις παραπάνω μέθοδοι, ενεργοποιούν τα μεσεγχυματικά κύτταρα του περιφερικού αίματος, μέσω του υποκείμενου, του σημείου της βλάβης, μυελού των οστών, τα οποία μεταναστεύουν στο σημείο του εκφυλισμού (Lohmander and Roos, 2007, Dehne et al., 2009, Hattori and Ohgushi, 2009, Ahmed et al., 2011)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

3.1 Αποκατάσταση (Repair)-Αναγέννηση (Regeneration)

Η αποκατάσταση και η αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου είναι ουσιαστικά δύο διακριτές διαδικασίες. Η αποκατάσταση αναφέρεται στην δημιουργία νέου ιστού στο σημείο της βλάβης. Ο νέος ιστός προσομοιάζει μακροσκοπικά με τον υαλοειδή αρθρικό χόνδρο που έχει υποστεί φθορά όμως η σύνθεση της ΕΘΟ, η οργάνωση των ινιδίων και η διαστρωμάτωση των χονδροκυττάρων μέσα στην μητρική ουσία δεν είναι πανομοιότυπη. Ο νέος ιστός βιοχημικά έχει χαρακτηριστικά που μοιάζουν με τον ινώδη αρθρικό χόνδρο και οι μηχανικές ιδιότητες είναι υποδεέστερες του φυσιολογικού (Furukawa et al., 1980, Hunziker et al., 2002). Αντίθετα η αναγέννηση δηλαδή η δημιουργία νέου ιστού που δεν διαφέρει στη δομή, τη λειτουργία και τη σύνθεση των συστατικών από τον κατεστραμμένο ιστό, είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται όσον αφορά τον αρθρικό χόνδρο αλλά και σε άλλους ιστούς, μόνο κατά την εμβρυογένεση, είναι σχεδόν απύσχα κατά την νεογνική ηλικία και ποτέ δεν συμβαίνει μετά την ενηλικίωση (Carlan et al., 1999). Εξαιτίας της απουσίας αγγείωσης κατά τη φυσιολογική διαδικασία αποκατάστασης πολύ σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τον βαθμό αποτελεσματικότητας της ενδογενούς επούλωσης του κατεστραμμένου ιστού, είναι το βάθος της βλάβης. Στις επιφανειακές βλάβες του χόνδρινου ιστού πρόδρομα μεσεγχυματικής προέλευσης κύτταρα από τον αρθρικό υμένα μεταναστεύουν προκειμένου να επουλώσουν τον τραυματισμένο ιστό γεμίζοντας το κενό. Η πλήρωση του τραύματος όμως με τον νέο πληθυσμό κυττάρων είναι ανεπαρκής ο νέος ιστός δεν ενσωματώνεται με τον παρακείμενο και ο τελευταίος καθίσταται υποκυτταρικός. Η ύπαρξη ασυνέχειας προκαλεί στον νέο ιστό συνθήκες νέκρωσης ενώ ο φθαρμένος ιστός εκφυλίζεται επιπλέον και σε μικρό χρονικό διάστημα (εβδομάδων/μηνών) το μέγεθος του τραύματος διευρύνεται (Hunziker et al., 1996, Jackson et al., 2001, Shapiro et al., 1993). Αντίθετα, στις εκτεταμένες οστεοχόνδρινες βλάβες όταν ο μυελός των οστών επικοινωνεί με το σημείο του τραυματισμένου ιστού, στο σημείο της βλάβης δημιουργείται αιμοπεταλιακός θρόμβος μέσω της κυκλοφορίας και πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που περιέχονται στον θρόμβο του αίματος μπορούν

και διαφοροποιούνται είτε προς μονοκύτταρα είτε προς οστεοβλάστες τα οποία σε δεύτερο χρόνο αποκαθιστούν τον χόνδρινο ιστό και ανακατασκευάζουν το υποχόνδριο οστό (Jackson et al., 2001, Shapiro et al., 1993). Η διαδικασία της χονδρογένεσης ολοκληρώνεται έπειτα από αρκετά μεγάλο διάστημα και τα μονοκύτταρα ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσής τους συνθέτουν συστατικά της ΕΘΟ όπως κολλαγόνο τύπου I και II σε διαφορετικό βαθμό. Σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό χόνδρο, ο νέος ιστός συνθέτει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κολλαγόνου τύπου I, V, VI, XII, XV, εμφανίζει μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα όσον αφορά τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και άλλων μη κολλαγονικών πρωτεϊνών και μορίων προσκόλλησης, ενώ παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα κατακράτησης νερού. Σταδιακά η περιεκτικότητα του νέου ιστού σε αγκρεκάνη και κολλαγόνο τύπου II αυξάνεται, όμως τα μονοκύτταρα στον γειτονικό ιστό καθώς δεν συμμετέχουν στο γέμισμα του κενού που δημιουργείται στο σημείο της βλάβης, με την πάροδο του χρόνου αποπίπτουν, η περιοχή γίνεται υποκυτταρική και μετά από διάστημα μερικών μηνών ο νέος ιστός παρουσιάζει ινωχόνδρινο φαινότυπο με σημάδια εκφυλισμού που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους της βλάβης και γενικευμένη ΟΑ.

Λαμβάνοντας υπόψη τη φυσιολογική διαδικασία της ανάπτυξης του μυοσκελετικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση σήμερα, στα πλαίσια χρήσης κυττάρων για την αποκατάσταση βλαβών στον αρθρικό χόνδρο χρησιμοποιούνται είτε με απευθείας εγχύσεις στην άρθρωση, είτε σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες χειρουργικές μεθόδους, αυτόλογα μονοκύτταρα που λαμβάνονται από τον ασθενή από άλλο σημείο υγιούς άρθρωσης, στον ίδιο χειρουργικό χρόνο (DeLise et al., 2000, Tuan, 2004, Ingber et al., 2006, Goerfert et al., 2010). Οι πρώτες απόπειρες εφαρμογής της τεχνικής ανέδειξαν σημαντικά πρακτικά προβλήματα. Εκτός από την έκταση της βλάβης, τα μονοκύτταρα που λαμβάνονται από τον ασθενή είναι ήδη ώριμα γεγονός που σημαίνει ότι η εγγενής ικανότητά τους για πλαστικότητα (Heiflick's limit) είναι περιορισμένη. Έτσι σε εκτεταμένες βλάβες του αρθρικού χόνδρου σε ηλικιωμένους ασθενείς ο αριθμός των "καλλιεργημένων" αυτόλογων χονδροκυττάρων δεν επαρκεί για να επουλωθεί ο αλλοιωμένος ιστός. Επιπλέον, μετά τη λήψη τους από τον ασθενή, τα μονοκύτταρα δείχνουν να χάνουν πολλά από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους διότι η απομάκρυνση τους από το τρισδιάστατο μικροπεριβάλλον της ΕΘΟ διαταράσσει σε σημαντικό βαθμό το επίπεδο διαφοροποίησής τους. Σύντομα από πλήρη διαφοροποιημένα μονοκύτταρα που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Sox9 και

συνθέτουν κολλαγόνο τύπου II, IX, XI και αγκρεκάνη, μετατρέπονται σε μονοκύτταρα με ινώδη φαινότυπο που οργανώνονται σε στιβάδες και συνθέτουν κολλαγόνο τύπου I, V). Σήμερα, η διαδικασία έχει εξελιχθεί και μετά τη λήψη τους αρθροσκοπικά από παρακείμενη υγιή άρθρωση του ασθενή σε πρώτη φάση γίνεται, με τεχνητό τρόπο, επαγωγή γονιδίων (με τη βοήθεια ρετροϊού) που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Sox9 ώστε να εξασφαλιστεί ο μέγιστος βαθμός διαφοροποίησής τους και να παρεμποδιστεί η μετάπτωσή τους σε ινώδη φαινότυπο. Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργούνται κάτω από κατάλληλες συνθήκες σε θρεπτικό μέσο FBS ενισχυμένο με χημικούς παράγοντες όπως η δεξαμεθαζόνη και αυξητικούς παράγοντες όπως οι TGF-β1, TGF-β3, PDGF-BB και FGF-2 που εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Barbero et al, 2003). Στη συνέχεια, με νέα επέμβαση στον ασθενή τα κύτταρα αυτά εμφυτεύονται στην περιοχή της βλάβης παρουσία ή απουσία βιοαποικοδομήσιμων υποστηρικτικών μεμβρανών. Προκειμένου να ξεπεραστούν προβλήματα εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης που ευθύνονται για τη δημιουργία τερατωμάτων και όγκων, τελευταία δοκιμάζονται μέθοδοι που προκαλούν, τεχνητά, ενδογενή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Sox9, σε κυτταρικές καλλιέργειες με υπερωσμωτικό θρεπτικό μέσο (Tew et al., 2009), με χαμηλή συγκέντρωση σε οξυγόνο (Adesida et al., 2012, Schrobback et al., 2012 a,b), παρουσία χημικών μορίων που μπλοκάρουν τις ROCK1, ROCK2, κινάσες που ευθύνονται για τον σχηματισμό ινώδους (Tew & Hardingham 2006), χωρίς ωστόσο η επιτυχία των τεχνικών να έχει εκτιμηθεί ακόμη μακροπρόθεσμα (Batty et al., 2011).

3.2 Κυτταρική θεραπεία

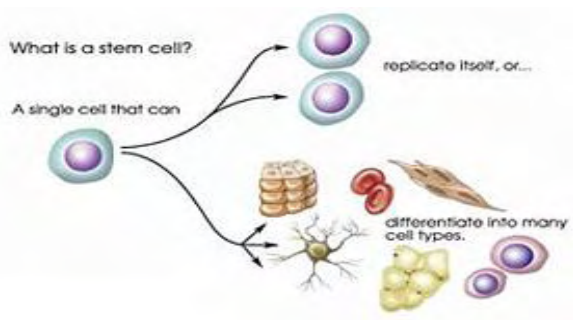
Τη δυναμική της φυσικής αναγέννησης στον οργανισμό δίνουν τα βλαστοκύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα είναι πρωταρχικής σπουδαιότητας κύτταρα κοινά για όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τα κύτταρα αυτά επιτρέπουν την αναγέννηση ιστών και ανακαλύφθηκαν από τους Καναδούς ερευνητές Ernest McCulloch και James Till μόλις το 1963 (Becker et al., 2007). Πολλαπλασιάζονται αργά με μετωπικές διαιρέσεις στους ρυθμούς που υπαγορεύει ο κύκλος ζωής των διαφόρων ιστών στα οποία εδράζουν (tissue turnover), πιθανώς ως τρόπο αποφυγής συσσώρευσης νέων μεταλλαγών (μη συχνός πολλαπλασιασμός σε σταθερή κατάσταση) (Engelhardt et al., 2001). Μετά την ανακάλυψή τους τα βλαστοκύτταρα βρίσκονται στο επίκεντρο του επιστημονικού και ιατρικού ενδιαφέροντος και σήμερα ο τομέας της κυτταρικής θεραπείας με βλαστικά

κύτταρα έχει λάβει το μεγαλύτερο μέρος της ερευνητικής χρηματοδότησης. Η κυτταρική θεραπεία με βλαστοκύτταρα, αφορά τη δυνατότητα να γίνεται χειρουργικά ή μη επεμβατικά π.χ με ενέσεις, έγχυση βλαστικών κυττάρων απευθείας στο σημείο της βλάβης, προερχόμενων από τον ίδιο τον ασθενή ή έναν ιστοσυμβατό δότη, με σκοπό την ανάπλαση του κατεστραμμένου τμήματος ενός ιστού ή ενός οργάνου. Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν ένα θεραπευτικό όπλο στην αναγεννητική ιατρική το οποίο χρησιμοποιείται ήδη στην κλινική πράξη. Η σωστή χρήση τους σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες χειρουργικές μεθόδους εν δυνάμει μπορεί να δώσει σε αρκετές περιπτώσεις λύσεις σε χρόνια προβλήματα οστεοαρθρίτιδας, ρευματοειδούς αρθρίτιδας και στις οξείες τραυματικές κακώσεις του αρθρικού χόνδρου.

3.2.1. Ορισμός Βλαστικών Κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρχέγονα κύτταρα τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία όλων των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Ο όρος "βλαστικά" περιγράφει το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά λειτουργούν ως παρακαταθήκη από την οποία δημιουργούνται (βλαστάνουν) άλλα κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα είναι μοναδικά και διαθέτουν τρία βασικά χαρακτηριστικά:

- α) είναι αδιαφοροποίητα, δηλαδή δεν έχουν αναπτύξει δομές ούτε έχουν κατασκευάσει πρωτεΐνες που να είναι χαρακτηριστικές ενός εξειδικευμένου είδους κυττάρων (αδιαφοροποίητος φαινότυπος)
- β) μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να αυτό-ανανεώνονται για μεγάλες χρονικές περιόδους μέσω κυτταρικής διαίρεσης (απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού και ικανότητα αυτό-ανανέωσης) και
- γ) υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πιο εξειδικευμένα είδη κυττάρων π.χ μυϊκά κύτταρα, κύτταρα του αίματος, του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και άλλων ιστών και οργάνων ώστε να αποκαταστήσουν κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη (πολυδυναμία) (Pera Reuibinoff and Trounson,2000) **(Εικόνα 8)**.



Εικόνα 8. Βασικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων(Πηγή από <http://intrd187s-f12-grosovsky.wikispaces.umb.edu/Gro+up+1+Stem+Cells>)

Μοναδική ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων αποτελεί η ασύμμετρη διαίρεση. Η διαίρεση δίνει γέννηση σε δύο νέα κύτταρα που δεν είναι ισότιμα. Ένα από αυτά παραμένει αδιαφοροποίητο (θυγατρικό βλαστικό) και είναι πανομοιότυπο με το μητρικό. Το άμεσο ανατομικό και χημικό μικροπεριβάλλον του θυγατρικού κυττάρου το οποίο προκύπτει από την αλληλεπίδρασή του με την εξωκυττάρια ουσία, με άλλα κύτταρα και με διαλυτούς αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες είναι αυτό που εξασφαλίζει τη συνεχή ύπαρξη της παρακαταθήκης βλαστικών κυττάρων. Το δεύτερο κύτταρο είναι πιο δεσμευτικό και χαρακτηρίζεται ως προγονικό από το οποίο θα προέλθουν τα μεταβατικά πολλαπλασιαστικά κύτταρα καθώς και οι ώριμοι διαφοροποιημένοι φαινότυποι.

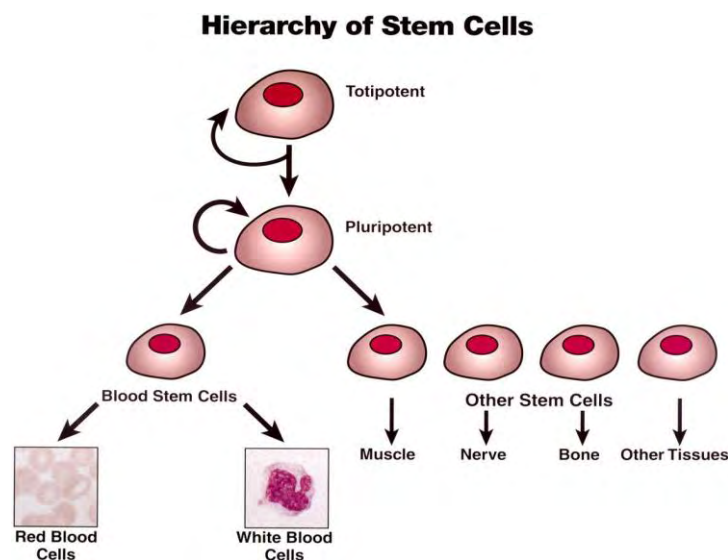
Τα μεταβατικά κύτταρα διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης αποκτούν όμως περισσότερο διαφοροποιημένες λειτουργίες. Τελικά χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετατρέπονται σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Η διαφοροποίηση των κυττάρων που προκύπτουν μετά τη διαίρεση των βλαστικών κυττάρων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει αρκετά στάδια πριν το διαφοροποιημένο κύτταρο διαμορφώσει τον τελικό του φαινότυπο. Στην τελική διαφοροποίηση των κυττάρων συμμετέχουν μια σειρά από εξωγενή και ενδογενή σηματοδοτικά μόρια. Τα ενδογενή σηματοδοτικά μόρια βρίσκονται κάτω από γονιδιακή ρύθμιση ενώ τα εξωγενή σηματοδοτικά μόρια σχετίζονται με εξωκρινή χημικά μόρια που εκκρίνονται από άλλα κύτταρα ή παρακρινή μόρια που παράγονται από γειτονικά κύτταρα που συνθέτουν ένα μικροπεριβάλλον (niche) διακριτό για κάθε κυτταρικό τύπο. Με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) έχουν προκύψει διάφορα μόρια κλειδιά για τη διατήρηση των χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων (Oct3/4, Klf4) τα οποία δεν παρατηρούνται σε πιο ώριμα κύτταρα ενώ χαρακτηριστικά ενεργοποιημένα σηματοδοτικά μονοπάτια στα βλαστικά κύτταρα είναι του Hox γονιδίου, του Notch, του Sonic Hedgehog και του Wnt. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης έχουν αντίκτυπο στο γονιδίωμα το οποίο αποκτά επιγενετικούς δείκτες. Οι επιγενετικοί δείκτες εμποδίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων σε κάθε κυτταρικό τύπο και μεταβιβάζονται στην επόμενη γενεά κυττάρων με μετωπικές διαιρέσεις.

3.2.3. Τα είδη των βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells-ESCs) και β) τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Adult

Mesenchymal Stem Cells- MSCs). Η μελέτη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων παρέχει στους αναπτυξιακούς βιολόγους in vitro μοντέλο για την μελέτη αποφάσεων που καθορίζουν την κυτταρική μοίρα κατά την οντογένεση, ενώ η μελέτη σωματικών βλαστικών (adult stem cells) επιτρέπει στους φυσιολόγους να κατανοήσουν την ομοιόσταση των ιστών.

Τα ESCs ανάλογα με τη δυνατότητα διαφοροποίησής τους διακρίνονται σε α) παντοδύναμα (totipotent cells) και β) σε ολοδύναμα (pluripotent). Τα παντοδύναμα (totipotent cells) είναι αρχέγονα αδιαφοροποίητα που δημιουργούνται με την γονιμοποίηση του ωαρίου και προκύπτουν από τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις στη ζωή ενός εμβρύου δηλαδή περίπου μέχρι την τέταρτη μέρα της γαστριδίου στο στάδιο των οκτώ (08) κυττάρων (Bongso et al., 1994). Τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (human Embryonic Stem Cells, hESCs) εκφράζουν τους δείκτες ολοδυναμικότητας όπως το CD9, CD24, Octamer-Binding protein 4 (Oct4), Nanog, αλκαλική φωσφατάση, LIN28, Rex-1, Crypto/TDGF1, DNMT3B, Sox2, και Thy-1, καθώς και επιφανειακά αντιγόνα stage-specific embryonic antigen -3 και -4 (SSEA-3 και -4) και tumor-rejection antigen 1-60 και 1-80 (TRA-1-60 και TRA-1-80). Επιπλέον όλες οι σειρές ESCs εκφράζουν υψηλά επίπεδα και ενεργότητα τελομεράσης για μεγάλες περιόδους σε κυτταρικές καλλιέργειες (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Τύποι Βλαστικών Κυττάρων (Πηγή από <http://www.stemrx.in/stemcells.html>)

Τα παντοδύναμα (totipotent cells) κύτταρα δίνουν όλους τους τύπους κυττάρων για τη δημιουργία ενός οργανισμού αλλά και όλους τους μη εμβρυϊκούς (εξωεμβρυονικούς) ιστούς που πλαισιώνουν το έμβρυο, όπως ο πλακούντας. Το 1981 οι Evans και

Kaufman σε ποντίκια και αργότερα το 1998 ο Thomson και συνεργάτες του στον άνθρωπο παρατήρησαν ότι κατά την 5^η ημέρα της εμβρυογένεσης, στο στάδιο της βλαστοκύστης, από τα περίπου 100 κύτταρα του βλαστιδίου, τα 30 με 40 περίπου κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Inner Cell Mass), έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών στιβάδων (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) από τα οποία προκύπτουν οι τουλάχιστον 220 διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στον ενήλικα ανθρώπινο οργανισμό, ενώ σε καλλιέργειες *in vitro* σχηματίζουν αυτόματα εμβρυοειδή σωμάτια (*embryoid bodies, EBs*). Τα κύτταρα αυτά είναι απόγονοι των παντοδύναμων κυττάρων και χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα (*pluripotent stem cells*). Αν τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση και θεραπεία απευθείας *in vivo* τότε παρατηρείται σχηματισμός τερατωμάτων και καρκινωμάτων οφειλόμενων στην συνύπαρξη των παντοδύναμων κυττάρων μέσα στην εμβρυοειδή μάζα. Τα ESCs στο στάδιο της βλαστοκύστης δεν μπορούν να δώσουν γένεση σε βιώσιμα έμβρυα απουσία τροφοβλαστικών κυττάρων.

Η πολυδυναμία των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων μειώνεται καθώς συμπληρώνεται και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του εμβρύου. Μετά την γέννηση τα ενήλικα πλέον σωματικά βλαστικά κύτταρα (*adult stem cells*):

- παραμένουν και αποθηκεύονται στο μεσέγχυμα (μεσεγχυματικά στελεχιαία μη-αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα-mesenchymal stem cells) σε ιστούς και όργανα του σώματος, όπως για παράδειγμα ο μυελός των οστών, ο εγκέφαλος, ο λιπώδης ιστός, το δέρμα, η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, τα δόντια και άλλα όργανα ,
- διατηρούν την δυνατότητα να αυτό-ανανεώνονται και μπορούν να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα, μονοκύτταρα, λιποκύτταρα, τενοντοκύτταρα, μυοκύτταρα και αστροκύτταρα και να παράγουν κύτταρα του ιστού ή του οργάνου από το οποίο προέρχονται, συμβάλλοντας μόνο στην ολοκλήρωση της διάπλασής τους και τη διατήρηση της λειτουργίας τους, ενώ φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό επιδιορθωτικό ρόλο σε περίπτωση βλαβών. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα ανάλογα με την ικανότητα διαφοροποίησης τους διακρίνονται σε α) πολυδύναμα (*multipotent*), β) ολιγοδύναμα (*oligopotent*) και γ) μονοδύναμα (*unipotent*). Παράδειγμα πολυδύναμων (*multipotent*) βλαστικών κυττάρων είναι τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού ή του στρώματος στο μυελό των οστών που μπορούν να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα, μονοκύτταρα λιποκύτταρα ή μυϊκά κύτταρα σε αντίθεση με τα στελεχιαία αιμοποιητικά

στον μυελό των οστών που δίνουν γένεση στα ερυθροκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα και είναι υπεύθυνα για την αναπλήρωση όλων των κυττάρων του αίματος ενώ τα νευρικά βλαστικά κύτταρα που δίνουν γένεση μόνο σε κύτταρα του νευρικού συστήματος (π.χ νευρώνες και κύτταρα της γλοίας), είναι πιο δεσμευτικά και χαρακτηρίζονται ως ολιγοδύναμα (oligopotent cells). Τέλος τα μονοδύναμα (unipotent cells) δίνουν γένεση μόνο σε συγκεκριμένο είδος κυττάρου για παράδειγμα τα σπερματογόνια δίνουν γένεση σε σπερματοζωάρια και τα βλαστικά κύτταρα του ήπατος αναπληρώνουν μόνο ηπατικά κύτταρα.

3.3. Ιδιότητες Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

3.3.1 Πλαστικότητα & αυτό-ανανέωση

Αν και τα ενήλικα σωματικά βλαστικά κύτταρα δεν θεωρούνται πολυδύναμα στον βαθμό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν διαφοροποιημένα κύτταρα και άλλων ιστών πλην του ιστού προέλευσής τους. Με βάση τη θεωρία της πλαστικότητας η δέσμευσή τους σε κάποια κυτταρική σειρά δεν είναι μια διαδικασία αυστηρά καθορισμένη και μη αντιστρεπτή αλλά χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα επιτρέποντας στα βλαστικά κύτταρα να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον τους σε περίπτωση που λόγω βλάβης υπάρχει ανάγκη αναγέννησης ενός ιστού ή οργάνου. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα βλαστικά κύτταρα συμβάλλουν στη παραγωγή διαφορετικών κυτταρικών φαινοτύπων και περιγράφεται με τον όρο κυτταρική διαδιαφοροποίηση (cell transdifferentiation).

Για παράδειγμα σε μελέτες μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών ανιχνεύθηκαν μετά από ειδική επισήμανση σκελετικοί μυοβλάστες, καρδιακοί μυοβλάστες, επιθήλιο δέρματος και ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ σε άλλες μελέτες με μυϊκά βλαστικά κύτταρα αποδείχθηκε ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος ενώ τα νευρικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά (Gritti et al., 2002, Clarke et al., 2000). Η ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης και της διαφοροποίησης είναι από τις σημαντικότερες λειτουργίες της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των δύο διαδικασιών παίζει ρόλο στη μοίρα που θα έχει το βλαστικό κύτταρο, διότι η συνεχής αυτό-ανανέωση ενέχει τον κίνδυνο ογκογένεσης ενώ η συνεχής διαφοροποίηση με την πάροδο του χρόνου μπορεί να επιφέρει εξάντληση των αποθεμάτων τους.

3.4. Καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων

Σε πρώτη φάση τα βλαστικά κύτταρα (ESCs/ MSCs) μεταφέρονται σε πλαστικά εργαστηριακά τριβλία τα οποία περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Σήμερα η εσωτερική επιφάνεια του τριβλίου καλύπτεται συνήθως από ένα μονόστιβο στρώμα βοηθητικών κυττάρων (feeder cell layer) τα οποία μετά από κατάλληλη επεξεργασία έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και δεν υποβάλλονται σε κυτταρικές διαιρέσεις. Το στρώμα των τροφοδοτικών κυττάρων (feeder layer) παρέχει στη βάση του τριβλίου την απαραίτητη κολλώδη επιφάνεια πάνω στην οποία προσδένονται και κολλούν τα βλαστικά κύτταρα τα οποία εμπλουτίζουν στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας με θρεπτικά συστατικά. Αν και τα κύτταρα που κατορθώνουν να επιβιώσουν μετά από την παραπάνω διαδικασία είναι ελάχιστα σε αριθμό, αυτά που τελικά παραμένουν μεταφέρονται σε νέα τριβλία και αφήνονται να επωαστούν και να πολλαπλασιαστούν εκ νέου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για αρκετούς μήνες. Σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας (passage) τα κύτταρα ελέγχονται τόσο όσον αφορά τη μορφολογία τους όσο και ως προς την έκφραση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών βιοδεικτών αυτό-ανανέωσης. Ο έλεγχος περιλαμβάνει:

A) παρατήρηση κάτω από οπτικό μικροσκόπιο. Η οπτική παρατήρηση εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα παραμένουν αδιαφοροποίητα μετά τη μακρόχρονη διαδικασία ανακαλλιέργειας τους. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά όταν διατηρούνται αναλλοίωτα διασφαλίζουν ότι τα κύτταρα δεν αποπίπτουν και έχουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης μετά από πολλούς κύκλους ανακαλλιέργειας

B) μέτρηση των επιπέδων έκφρασης επιφανειακών αντιγόνων και μεταγραφικών παραγόντων που χαρακτηρίζουν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα και ειδικότερα των Oct4 και Nanog,

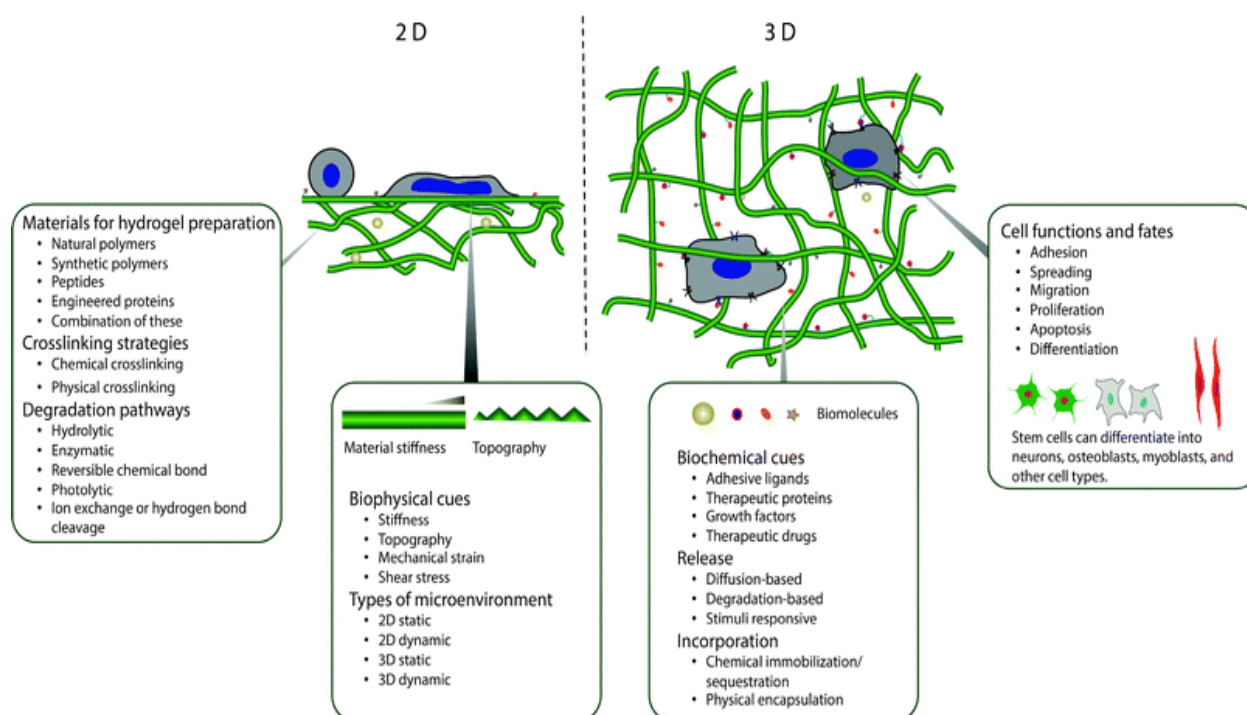
Γ) παρατήρηση των χρωμοσωμάτων κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθούν μεγάλα ελλείμματα ή προσθήκες τμημάτων γενετικού υλικού. Από τη στιγμή που τα κύτταρα κατορθώνουν να επιβιώνουν και αυτό-ανανεώνονται δημιουργούν μια κυτταρική σειρά βλαστικών κυττάρων. Σε οποιοδήποτε στάδιο αυτής της διαδικασίας τα κύτταρα μπορούν να ψυχθούν και να αποψυχθούν χωρίς να χάνουν την ικανότητα αυτό-ανανεώσης σε επόμενη ανακαλλιέργεια.

Δ) στη συνέχεια η πολυδυναμία δηλαδή η ικανότητα διαφοροποίησης ελέγχεται μικροσκοπικά είτε με άμεση απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου ή με μεταβολή

των εργαστηριακών συνθηκών που υποστηρίζουν την αυτό-ανανέωση, είτε μετά από προσθήκη παραγόντων που ευνοούν τη διαφοροποίηση.

Ε) τέλος η ικανότητα σχηματισμού νέου ιστού ελέγχεται με εμφύτευση των κυττάρων in vivo σε ανοσοκατεσταλμένα ζωικά μοντέλα (συνήθως επίμυες). Η δημιουργία καλοήθων όγκων αποτελεί απόδειξη ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Μετά από τη διαδικασία ανακαλλιέργειας τα βλαστικά κύτταρα επωάζονται είτε σε 2D είτε σε 3D υψηλής πυκνότητας κυτταρικά συστήματα (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Κυτταρικά συστήματα χονδρογένεσης in vitro (Kharkar P.et al., 2013)

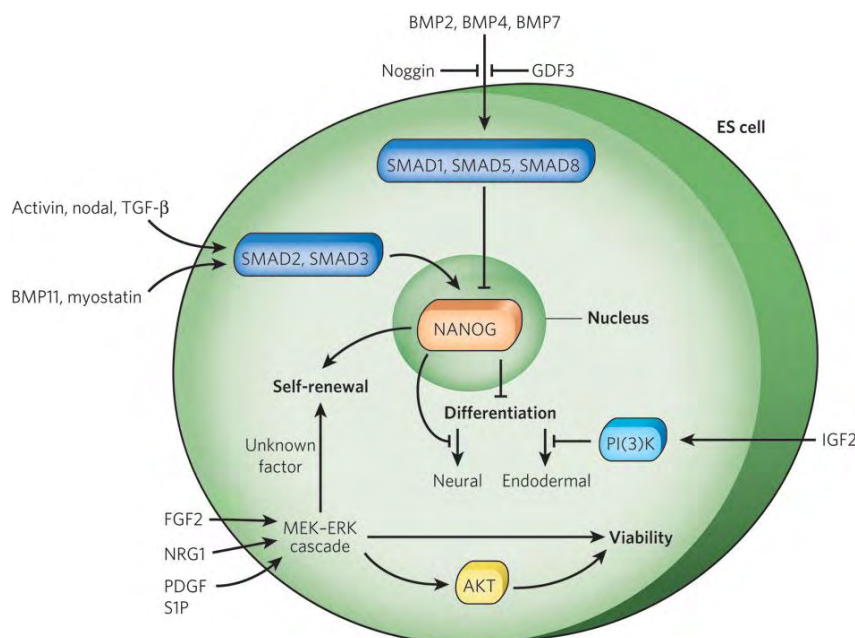
Τα τρισδιάστατα μοντέλα σταθεροποιούν τον φαινότυπο των κυττάρων καθώς μιμούνται τις συνθήκες in vivo και ευνοούν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με τα συστατικά της μητρικής ουσίας. Αντίθετα οι 2D κυτταρικές καλλιέργειες οδηγούν σε διαδιαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων με αποτέλεσμα αυτά να αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο (Zhang et al., 2010, Kharkal P. et al., 2013).

3.5. Η σημασία του μικροπεριβάλλοντος (niches) των βλαστικών κυττάρων

Για να μπορέσει ένα βλαστικό κύτταρο να λάβει την απόφαση της αυτό-ανανέωσης ή της διαφοροποίησης θα πρέπει να δεχθεί σήματα τα οποία είτε προέρχονται από το ίδιο το κύτταρο ή από το μικροπεριβάλλον του. Στα τέλη της δεκαετίας του '70 ο Schofield

(1978) διατύπωσε την άποψη ότι τα βλαστικά κύτταρα εδράζουν μέσα σε εξειδικευμένα μικροπεριβάλλοντα τις φωλεές (niches). Πρόκειται για διακριτά ανατομικά και λειτουργικά μικροπεριβάλλοντα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων, για τον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης, για τη ρύθμιση της συμμετοχής τους σε διαδικασίες ιστικής επιδιόρθωσης, αναγέννησης και αποτροπής ογκογένεσης. Οι φωλεές αποτελούν βασική μονάδα της φυσιολογίας των ιστών τα οποία ενορχηστρώνουν όλα τα σήματα για την επιτυχή και ισορροπημένη απάντηση των βλαστικών κυττάρων στις ιστικές ανάγκες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βλαστικών κυττάρων και φωλεάς αποτελούν δυναμικό σύστημα απαραίτητο για την ομοιόσταση των ιστών. Μάλιστα είναι χαρακτηριστικό ότι ο ίδιος τύπος βλαστικών κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιήσει διαφορετικές φωλεές είτε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους είτε υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Στη δομή των φωλεών συμμετέχουν κύτταρα, στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας, διαλυτοί μεσολαβητές και τρισδιάστατοι χώροι, και η επαφή μεταξύ τους επιτρέπει μοριακές αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων. Αν και υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στους ιστούς όσον αφορά τη φύση και τον εντοπισμό των φωλεών έχουν αναγνωριστεί κοινά χαρακτηριστικά και λειτουργίες. Κάθε φωλεά αποτελείται από μια ομάδα κυττάρων (σωματικά υποστηρικτικά κύτταρα) με συγκεκριμένη εντόπιση και λειτουργία για τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων. Κάθε φωλεά αποτελεί τη φυσική θέση αγκυροβόλησης των βλαστικών κυττάρων ενώ μόρια προσκόλλησης όπως είναι οι ιντρεγκρίνες, η E-cadherin και οι αλληλεπιδράσεις Notch-Delta εμπλέκονται τόσο στην αλληλεπίδραση των βλαστικών κυττάρων και των κυττάρων της φωλεάς όσο και μεταξύ βλαστικών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας. Στη φωλεά επενεργούν εξωκρινείς παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν τον αριθμό των βλαστικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και καθορίζουν τη μοίρας τους. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι οι φωλεές είναι σημαντικές στο να αποτρέπουν την υπερβολική αύξηση του αριθμού των βλαστικών κυττάρων σε θηλαστικά. Τα μοριακά σήματα για τον έλεγχο της αυτό-ανανέωσης και την αποτροπή της διαφοροποίησης φαίνεται να είναι εξαιρετικά συντηρημένα κατά την εξέλιξη και περιλαμβάνουν παρακρινή σηματοδοτικά μονοπάτια, αγκύλες αρνητικής ανατροφοδότησης που μειώνουν την ευαισθησία στα μιτογόνα σήματα και μοριακά μονοπάτια που καταστέλλουν την ενεργοποίηση του προγράμματος διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων είτε καταστέλλοντας τη

μετάφραση είτε μέσω ρυθμιστών της χρωματίνης που καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων της τελικής διαφοροποίησης. Η φυσική μοίρα των βλαστικών κυττάρων είναι η διαφοροποίηση εκτός αν βρεθούν στο ειδικό μικροπεριβάλλον της φωλεάς οπότε όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί εξασφαλίζουν τον έλεγχο μεταξύ αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης (**Εικόνα 11**) (Pera & Tam 2010).



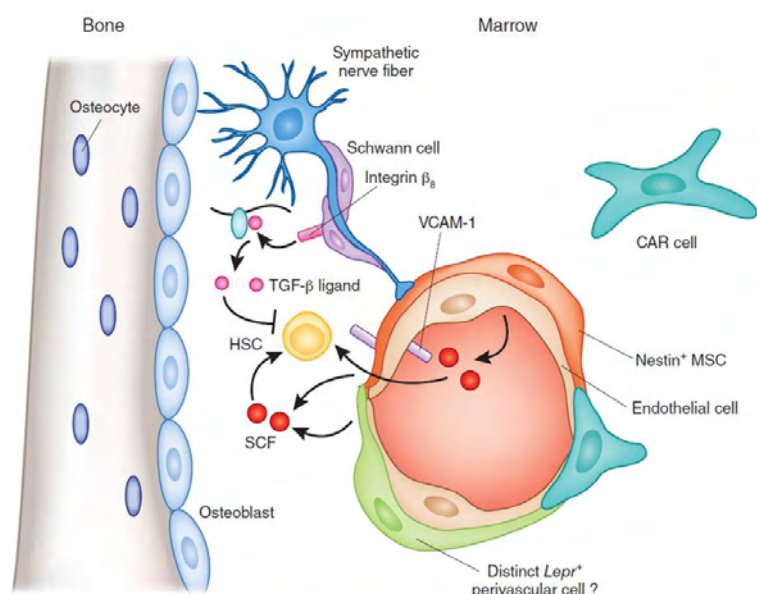
Εικόνα 11. Εξωγενή σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την αυτό-ανανέωση, την διαφοροποίηση και την ζωτικότητα των hESCs. (Πηγή από: [www.nature.com, Martin](http://www.nature.com/Martin) F. Pera & Patrick P.L.Tam, Extrinsic signals that affect self-renewal, differentiation and viability of human ES cells. Nature, 2010; 465, 713-720)

Ένα από τα καλύτερα μελετημένα μικροπεριβάλλοντα-φωλεά είναι του αιμοποιητικού συστήματος. Φυσιολογικά η αιμοποίηση πραγματοποιείται σε εξωμυελικές περιοχές σε ανατομικές δομές που χαρακτηρίζονται ως ερυθροβλαστικά νησίδια. Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (Hematopoietic Stem Cells) αρχικά εντοπίζονται στην οστεοβλαστική φωλεά στην επιφάνεια του οστού. Η οστεοβλαστική φωλεά εκτός από τα HSCs απαρτίζεται από ομάδες κυττάρων με μελέτες να υποστηρίζουν ότι μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων που δομούν το μικροπεριβάλλον των φωλεών περιλαμβάνονται οστεοβλάστες, ενδοθηλιακά και περικύτταρα. Τα κύτταρα της οστεογονικής σειράς (οστεοβλάστες/οστεοκλάστες) ρυθμίζουν την χωρική έκταση του μικροπεριβάλλοντος (niche size). Σε μελέτη τους οι Mendez-Ferrer και συνεργάτες του το 2010, πρότειναν ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του στρώματος στο μυελό των οστών θετικά για τον παράγοντα Nestin συνεντοπίζονται χωρικά με τα HSCs και τις αδρενεργικές νευρικές ίνες στο μυελό των οστών. Τα Nestin+ MSCs σχηματίζουν σε κυτταροκαλλιέργειες αποικίες (colony forming unit –CFU) με δράση παρόμοια με αυτή των ινοβλαστών, πολλαπλασιάζονται σε ανεξάρτητα μη προσκολλημένα σφαιρίδια (mesenspheres) σε transwell συστήματα κυτταρικής καλλιέργειας και όταν συν-καλλιεργηθούν με HSCs τα τελευταία εκφράζουν

γονίδια που ενισχύουν το φαινότυπο αυτό-ανανέωσής τους (Mendez-Ferrer et al., 2010). Σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις σε ασθενείς με κακοήγη νεοπλάσματα του αίματος στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα από ομφαλοπλακουντικό αίμα τα οποία πριν μεταμοσχευθούν καλλιεργήθηκαν *ex vivo* μαζί με κύτταρα του στρώματος από το μυελό των οστών, έδειξαν ότι τα τελευταία παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και μιμούνται το φυσιολογικό μικροπεριβάλλον εμφώλευσης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Με την παραπάνω διαδικασία εξασφαλίζεται όχι μόνο η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη μεταμόσχευση αλλά και η αιμοποίηση, ενώ η μειωμένη συγκέντρωση των T-λεμφοκυττάρων μειώνει τον κίνδυνο ανοσολογικής απόρριψης (Urbano-Ispizua et al., 2001). *In vivo* μελέτες σε ποντίκια με κατεστραμμένο μυελό των οστών μετά από θανατηφόρες δόσεις ακτινοβολίας, στα οποία έγινε μεταμόσχευση HSCs έδειξαν ότι όταν αυτά μεταμοσχευθούν παρουσία των nestin+ MSCs τότε μόνο ευνοούν την διατήρηση των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, χωρίς να σχηματίζονται καλοήθεις όγκοι, υπογραμμίζοντας ότι στην διατήρηση των εμφωλευμένων βλαστικών κυττάρων συμμετέχουν ετερογενείς ομάδες σωματικών βλαστικών κυττάρων με ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Isern et al., 2013).

Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης, η μετακίνηση των HSCs από την οστεοβλαστική φωλεά προς την αγγειακή φωλεά που συνοδεύεται με αγκυροβόληση των HSCs στην επιφάνεια των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι μια διαδικασία η οποία καθορίζεται άμεσα από το μικροπεριβάλλον της φωλεάς. Ανάμεσα στις δύο φωλεές υπάρχει βαθμίδωση συγκεντρώσεων διαλυτών παρακρινών παραγόντων με αυτή της οστεοβλαστικής να παρέχει μικροπεριβάλλον ηρεμίας για τα βλαστικά κύτταρα, ενώ η αγγειακή φωλεά να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση (Mendez-Ferrer, et al., 2010). Η κινητοποίηση των HSCs ρυθμίζεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, ενώ στους μηχανισμούς που ευθύνονται για την στρατολόγηση των βλαστικών κυττάρων και την τοποθέτησή τους στις φωλεές των διαφόρων ιστών (engraftment) ουσιώδη ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η σιτική βλάβη. Οι ιστικές βλάβες προκαλούν τέτοιες μεταβολές στο μικροπεριβάλλον ικανές ώστε να ευνοούν την απελευθέρωση χημικών μορίων από τον ιστό που έχει υποστεί βλάβη. Τα χημικά μόρια αλληλεπιδρούν με επιφανειακούς υποδοχείς των βλαστικών κυττάρων όπως είναι η χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1=stromal derived factor-1) που προσδένεται στον υποδοχέα CXCR4 που εντοπίζεται στην επιφάνεια αιμοποιητικών αλλά και μη αιμοποιητικών

βλαστικών κυττάρων. Εκτός από το κυκλοφορικό σύστημα όπου τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε επαφή με τα μικροαγγεία του μυελού των οστών, οι συμπαθητικές νευρικές ίνες στον μυελό των οστών αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά στοιχεία που απαρτίζουν το δίκτυο του αιμοποιητικού ιστού (π.χ εξωχιτινικά δικτυωτά κύτταρα, ενδοθηλιακά, μακροφάγα, λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας), μέσω χασμοσυνδέσμων, υποδεικνύοντας ότι το νευρικό σύστημα αποτελεί ένα φυσικό κύκλωμα που συνδέει ανατομικά απομακρυσμένους ιστούς και πιθανώς αποτελεί μέσο με το οποίο τα βλαστικά κύτταρα αντιλαμβάνονται τις μεταβολές στην κατάσταση των ιστών (Mendez-Ferrer et al., 2010)(Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση του μικροπεριβάλλοντος των HSCs που ευνοεί την εξάπλωσή και στη συνέχεια τη διαφοροποίησή τους. (Πηγή από www.nature.com, Kunisaki Yuya & Paul Frenette, The complex cellular and molecular make up of the HSC niche in the bone marrow, Nature Medicine (2012); 18, 864-865)

3.6. Βιοϋλικά ανάπτυξης καλλιέργειών

Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις της αναγεννητικής ιατρικής είναι στενά συνδεδεμένες με την μηχανική των ιστών η οποία εστιάζεται στη δημιουργία τρισδιάστατων ικριωμάτων (καλουπιών-scaffolds). Τα βλαστικά κύτταρα εμφυτεύονται σε τεχνητές κατασκευές οι οποίες είναι ικανές να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των ιστών. Τα ικριώματα διαθέτουν διασυνδεδεμένους μακροπόρους έτσι ώστε να επιτρέπουν όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και την κυτταρική μετανάστευση κατευθύνοντας τα βλαστικά κύτταρα στο σημείο της βλάβης, επιτρέπουν τη διάχυση ζωτικών κυτταρικών θρεπτικών συστατικών και απελευθερώνουν βιοχημικούς παράγοντες που βοηθούν στην κυτταρική αύξηση προκειμένου να μιμηθούν το περιβάλλον και να συμβάλλουν στην ανάπλαση του κατεστραμμένου ιστού. Η βιοδιασπασιμότητα είναι ένας σημαντικός παράγοντας καθώς προτιμάται τα ικριώματα να

απορροφούνται από γειτονικούς ιστούς χωρίς την ανάγκη χειρουργικής αφαίρεσης και να αποσυντίθενται αφήνοντας τον νέο ιστό να καταλάβει ολόκληρο το χώρο. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα από τη χρήση τους στο σημείο της βλάβης είναι ότι τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται λειτουργούν ως φυσικοί φραγμοί και εμποδίζουν τον σχηματισμό ινώδους στο σημείο που τοποθετείται το μόσχευμα (Frenkel et al., 1997 & Iwasa et al., 2009). Πολλά διαφορετικά υλικά (φυσικά και συνθετικά, βιο-διασπώμενα και μόνιμα) χρησιμοποιούνται για τη διασπορά των βλαστικών κυττάρων με μορφή υδρογέλης (hydrogels) και στερεών ικριωμάτων (solid scaffolds). Ειδικότερα, στη σύνθεση των υδρογέλων συμμετέχουν υδρόφιλα πολυμερή με πολύ καλή βιοσυμβατότητα και υψηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά που επιτρέπουν την διασπορά και την αφομοίωση από τον παρακείμενο ιστό. Μεταξύ των συνθετικών πολυεστέρων που χρησιμοποιούνται είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) το οποίο μέσα στο ανθρώπινο σώμα αποσυντίθεται σε γαλακτικό οξύ, ενώ παρόμοιοι πολυεστέρες είναι το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και η πολυκαπρολακτόνη (PLC). Τα φυσικά πρωτεϊνικά υλικά με συμβατότητα και μικρή ανοσογονικότητα κατάλληλα για την αφομοίωση από γειτονικούς ιστούς που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των ικριωμάτων περιέχουν φιμπρίνη, η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς ιντεγκρίνης και συμμετέχει στους μηχανισμούς αιμόστασης (Ho et al., 2006), πολυσακχαρικά υλικά όπως η χιτοζάνη, υαλουρονικό οξύ και κολλαγόνο τα οποία απαντώνται σε περίσσεια και συμβάλλουν στην ομοιόσταση της ΕΘΟ του αρθρικού χόνδρου. Τα παραπάνω υλικά μπορούν να υποστούν κατάλληλη επεξεργασία είτε ως γέλες αλλά και ως μεμβράνες είτε μπορούν να εφαρμοστούν στο σημείο της βλάβης με τη μορφή σπόγγων και αφρού ενώ εύκολα αποικοδομούνται με τη βοήθεια ενζύμων. Τα στερεά τρισδιάστατα ικριώματα κατασκευάζονται από πορώδη κεραμικά υλικά που περιέχουν υδροξυαπατίτη τα οποία παρέχουν μηχανική σταθερότητα κατά τη μεταμόσχευση γεμίζοντας τα κενά της κάκωσης. Ωστόσο μελέτες στοχεύουν στην ανεύρεση του καλύτερου συνδυασμού βιοϋλικών επειδή τα βιολικά από τα οποία συντίθενται τα ικριώματα έχουν διαφορετική ιστοσυμβατότητα και ενσωματώνονται ελάχιστα στον προϋπάρχοντα αρθρικό χόνδρο γεγονός που δεν επιτρέπει την ύπαρξη συνέχειας μεταξύ του νεοσυντιθέμενου και του προϋπάρχοντος ιστού (Guo et al., 2004 & Kandel et al., 2006).

3.6. Βλαστικά κύτταρα για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου

A) Ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Δεδομένου ότι τα αυτόλογα μονοκύτταρα δεν μπορούν να εξαπλωθούν στο σημείο του εκφυλισμού και να επουλώσουν ικανοποιητικά μεγάλης έκτασης βλάβες, μέχρι στιγμής ανάμεσα στους πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων που έχει εκτιμηθεί η χρήση τους στην αποκατάσταση βλαβών του αρθρικού χόνδρου είναι τα ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells).

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τους μεσοδερμικής προέλευσης ιστούς που επιλέγονται στην αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου απομονώνονται εύκολα, μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο για να αυξηθεί ο αριθμός τους και μπορούν να καταψυχθούν σε υγρό άζωτο χωρίς να χάσουν, μετά την απόψυξη τους, την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε διάφορους άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. ενώ πριν να χρησιμοποιηθούν σε μεταμοσχεύσεις, σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, ελέγχονται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

α) να παρουσιάζουν ευκολία (πλαστικότητα) προσκόλλησης κάτω από πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας και

β) να εκφράζουν στην κυτταρική τους επιφάνεια τους παράγοντες CD105, CD73, CD90 και γ) να μην εκφράζουν τους δείκτες των αιμοποιητικών κυττάρων όπως είναι οι παράγοντες CD45, CD34, CD14(CD11b), CD79a(CD19) και ο παράγοντας HLA-DR του μέγιστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II.

Οι πρώτοι πληθυσμοί ενήλικων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ταυτοποιήθηκαν στη δεκαετία του 1950 σε περιοχές του μυελού των οστών. Οι Friedenstein και οι συνεργάτες του από το 1968 παρατήρησαν ότι ο μυελός των οστών αποτελείται από δύο πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων. Ο ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων έχει την ικανότητα να διαφοροποιείται σε βλαστικά κύτταρα της ερυθροποιητικής σειράς (αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα) και ο δεύτερος εντοπίζεται στην περιοχή του στρώματος στον μυελό των οστών και παρουσιάζει ιδιότητες προσκόλλησης σε πλαστικά τριβλία, αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης προς τρεις ετερογενείς αποικίες κυττάρων με διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ο πρώτος υποπληθυσμός αποτελείται από μικρά στρογγυλά κύτταρα τα οποία αντιπροσωπεύουν τα βλαστικά ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς μετά από ανοσοιστοχημική σήμανση, τα κύτταρα είναι θετικά για τον παράγοντα CD31 και για τον παράγοντα VIII, ο δεύτερος υποπληθυσμός αντιπροσωπεύει κύτταρα της μυελοειδούς σειράς καθώς τα κύτταρα

έχουν αστεροειδή μορφολογία και είναι θετικά για τον CD45 και τον δείκτη mac-1/CD11b και ο τρίτος υποπληθυσμός κυττάρων αποτελείται από μεγάλα πολυγωνικά κύτταρα με μορφολογία ινοβλάστη τα οποία συνθέτουν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας όπως κολλαγόνο τύπου I, IV, λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη αποτελώντας τα προγονικά οστεοκύτταρα, μονοκύτταρα, κύτταρα του συνδετικού και του λιπώδους ιστού (Freidestein et al., 1974).

Σήμερα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (Bone Marrow Stem Cells- BMSCs) εφαρμόζονται για τη θεραπεία των λεμφωμάτων, τη ριζική θεραπεία των όγκων της παιδικής ηλικίας, όπως είναι το νευροβλάστωμα, το ρετινοβλάστωμα, και τα σαρκώματα, ενώ κλινικές μελέτες διενεργούνται για τις αυτοάνοσες παθήσεις όπως την πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση, τη νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον σακχαρώδη διαβήτη και για την αποκατάσταση της λειτουργίας οργάνων, όπως της καρδιάς μετά από έμφραγμα, του εγκεφάλου στην περίπτωση της εγκεφαλικής παράλυσης, και των οστών μετά από κατάγματα ή οστικά ελλείμματα.

Εκτός από τον μυελό των οστών MSCs έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς όπως από τον λιπώδη ιστό (Mizuno et al., 2012), τον πλακούντα (Timmis et al., 2012), το αρθρικό υγρό (Jones et al., 2008) και τον αρθρικό υμένα (Jones & Pei, 2012), τους μύς (Jackson et al., 2010), την καρδιά, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, το δέρμα, τα μάτια, το γαστρεντερικό σωλήνα, το ήπαρ, το πάγκρεας, τους πνεύμονες, τον μαστό, τις ωοθήκες, τον προστάτη, τους όρχεις και το περιόστεο. Ωστόσο, οι κυτταρικοί πληθυσμοί που παράγονται κατά την οντογένεση και παραμένουν σε εξειδικευμένες φωλεές στα όργανα σε κατάσταση ηρεμίας για μικρές ή μεγάλες χρονικές περιόδους, αν και διαθέτουν απεριόριστη ικανότητα αύξησης και αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης, γενικότερα δεν είναι πανομοιότυποι, και κατόπιν μεταβολών στο μικροπεριβάλλον τους παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ετερογένειας κατά τη διαδικασία διαφοροποίησής τους προς μονοκύτταρα σε *in vitro* καλλιέργειες (Sakaguchi et al., 2005).

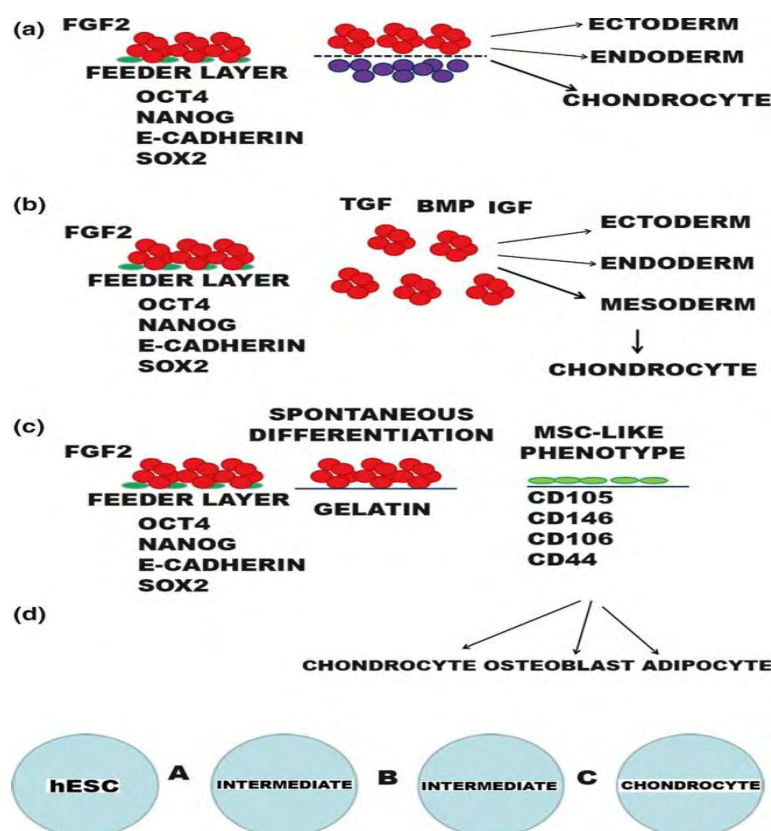
Μέχρι στιγμής, σε αντίθεση με τα αυτόλογα μονοκύτταρα, τα MSCs αν και ο αριθμός τους είναι σχετικά μικρός στους διάφορους ιστούς, εντούτοις μπορούν να καλλιεργηθούν πιο αποτελεσματικά *ex vivo* δίνοντας μεγαλύτερες σε αριθμό κυτταρικές αποικίες (Hardingham et al., 2006, Khan et al., 2009). Με εξειδικευμένα πρωτόκολλα *in vitro* η διαδικασία χονδρογένεσης περιλαμβάνει μετά την απομόνωση τους α) ανάπτυξη σε υψηλής πυκνότητας θρεπτικό μέσο (*pro-chondrogenic medium*) που

αποτελείται από DMEM-serum free, TGF- β 3, δεξαμεθαζόνη και ινσουλίνη, και β) ανάπτυξη των κυττάρων σε καλλιέργεια για 7 περίπου ημέρες όπου η υγρή μάζα του ιστού αυξάνεται και αποτελεί ένδειξη εναπόθεσης γλυκοζαμινογλυκανών στην ΕΘΟ. Στη συνέχεια τα συσσωματώματα που σχηματίζονται στην κυτταροκαλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνικά φιαλίδια πολυπροπυλενίου όπου μετά από υπερφυγοκέντρηση σχηματίζεται σφαιροειδής ιστός. Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια στη χρήση των MSCs από τον μυελό των οστών που έχει μελετηθεί περισσότερο, αποτελεί η διάταξη των κυττάρων στον σχηματιζόμενο σφαιροειδή ιστό. Μετά από ιστολογική ανάλυση το εξωτερικό στρώμα των κυττάρων (2-3 κύτταρα σε βάθος) αποτελείται από πεπλατυσμένα αδιαφοροποίητα MSCs ενώ στο αμέσως επόμενο στρώμα τα MSCs είναι πιο σφαιρικά και προσομοιάζουν τα μονοκύτταρα στα οποία η σύνθεση αγκρεκάνης, sGAG και κολλαγόνου τύπου II είναι αυξημένη σε σχέση με την εσωτερική-πυρηνική αδιαφοροποίητη στιβάδα υπερτροφικών χονδροκυττάρων. Η διάταξη αυτή προσομοιάζει την *in vivo* διαδικασία ενδοχόνδρινης οστεοποίησης κατά την εμβρυογένεση όπου τα υπερτροφικά μονοκύτταρα στην εσωτερική στιβάδα του αποτιτανωμένου χόνδρου αποτίπτουν, αντικαθίστανται από οστεοβλάστες και ο ιστός οστεοποιείται ενώ το ίδιο φαινόμενο με μεγαλύτερη ένταση παρατηρείται κατά την διαδικασία επούλωσης τραυματισμένου οστού μετά από κάταγμα (Barry *et al.* 2001; Taguchi *et al.* 2005; Murdoch *et al.* 2007). Λόγω του ότι κατά την εμβρυογένεση οι ιστοί που αποτελούν την άρθρωση δημιουργούνται από συμπυκνώσεις MSCs με κοινή καταγωγή, τα MSCs από αρθρικό υμένα και παρακείμενους ιστούς της άρθρωσης που απομονώνονται και υπόκεινται στη διαδικασία χονδρογένεσης με τα ίδια πειραματικά πρωτόκολλα διαφοροποιούνται προς μονοκύτταρα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και μειωμένα επίπεδα σχηματισμού υπερτροφικών χονδροκυττάρων, αποτελούν μια πολύ καλή εναλλακτική πηγή κυττάρων για ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου (Pacifci *et al.*, 2005).

B) Εμβρυονικά Βλαστοκύτταρα

Τα περισσότερα ESCs προκύπτουν από γονιμοποιημένα ωάρια *in vitro* (IVF=*in vitro* fertilization) τα οποία προσφέρονται για ερευνητικούς σκοπούς μετά από συγκατάθεση των μητέρων-δοτών. Η χρήση τους στην έρευνα, ωστόσο, έχει εγείρει τόσο ηθικά όσο και πρακτικά ζητήματα, δεδομένου ότι η μαζική παραγωγή τους επιβάλλει τη δημιουργία εμβρύων τα οποία μετά τη λήψη των κυττάρων, απορρίπτονται διότι είναι ανίκανα να

επιβιώσουν, ενώ από την άλλη πλευρά τα προβλήματα ιστοσυμβατότητας μεταξύ του δότη και δέκτη και ο σχηματισμός τερατωμάτων καθιστούν τη χρήση τους περιορισμένη. Ωστόσο, αποτελούν το πιο καλά μελετημένο είδος πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων που μπορούν να αναπλάσουν οποιονδήποτε ιστό με φυσιολογικό τρόπο η διαδικασία διαφοροποίησής τους προς μονοκύτταρα για την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου έχει κατανοηθεί. In vivo μελέτες με υποδόρια εμφύτευση αδιαφοροποίητων hESCs σε SCID-ποντικούς στην περιοχή των νεφρών οδηγούν στο σχηματισμό τερατωμάτων επιβεβαιώνοντας τον ολοδυναμικό χαρακτήρα των κυττάρων, όμως in vitro μετά τον αυθόρμητο σχηματισμό EBs παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου, οι σχηματιζόμενες διαφοροποιημένες ομάδες (clusters of differentiated hESCs) περιέχουν μικρό αριθμό χονδροκυττάρων και μεγαλύτερη αναλογία σε FLK1+ κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι όχι μόνο οι συνθήκες καλλιέργειας αλλά και η χημική ενεργοποίηση των hESCs in vitro ευνοούν τη διαφοροποίησή τους σε αιμοαγγειβλάστες (Kawagushi et al., 2005). Οι κυριότερες στρατηγικές που ακολουθούνται για την διαφοροποίηση των hESC προς μονοκύτταρα συνοψίζονται στο ακόλουθο σχήμα (**Εικόνα 13**)



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση των 4 στρατηγικών που ακολουθούνται για τη δημιουργία χονδροκυττάρων από hESCs. Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες προστίθεται στο θρεπτικό μέσο ο παράγοντας FGF-2 που εξασφαλίζει στα κύτταρα την ικανότητα αυτό-ανανέωσης (πολλαπλασιασμού)

Α. Τα hESCs συν-καλλιεργούνται (co-culture) με ώριμα ενήλικα μονοκύτταρα. Σε σύγκριση με συν-καλλιέργειες με ινοβλάστες που αποτελούν control co-cultures, η σύνθεση κολλαγόνου τύπου II, πρωτεογλυκανών και η έκφραση του παράγοντα Sox9 είναι αυξημένη (Bigdeli et al., 2009).

Β. Μετά την απομάκρυνση του FGF-2, τα hESCs σχηματίζουν εμβρυοειδή συσσωματώματα. Η διαδικασία σχηματισμού EB (Embryoid Bodies) γίνεται αυθόρμητα μετά από προσθήκη στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυτοκινών που ευνοούν την χονδρογένεση (pro-chondrogenic cytokines, TGF, BMP, IGF).

Γ. Όταν τα hESCs αναπτυχθούν σε μονόστιβες καλλιέργειες 2D διαστάσεων σε πλαστικά τριβλία επικαλυμένα με ζελατίνη (gelatin-coated plastic culture dishes) διαφοροποιούνται αυθόρμητα σε κυτταρικούς πληθυσμούς με μεσεγχυματικό φαινότυπο (MSC-like cell population). Στη φάση αυτή εφαρμόζονται διάφορα πρωτόκολλα που επάγουν τη διαδικασία χονδρογένεσης μετά από διαχωρισμό και ομαδοποίηση των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS) με βάση αντιγονικούς επιφανειακούς δείκτες (π.χ CD105, CD44, CD73, CD166).

Δ. Μετά το στάδιο (Γ) η διαδικασία χονδρογένεσης χωρίζεται σε επιμέρους στάδια στα οποία οι πιο διαφοροποιημένοι ενδιάμεσοι κυτταρικοί πληθυσμοί ενισχύονται με κατάλληλο θρεπτικό μέσο πριν μεταβούν στο επόμενο επίπεδο διαφοροποίησης, μιμούμενη τη διαδικασία in vivo χονδρογένεσης κατά την εμβρυογένεση (Murry & Keller 2008). Τα μονοκύτταρα που προκύπτουν μετά τη διαφοροποίηση με την τελευταία στρατηγική (Δ) φαινοτυπικά παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό ωρίμανσης ενώ ποσοτικά τα επίπεδα σχηματισμού αγκρεκάνης και CD44 είναι ελαττωμένα (Oldershaw R., 2012).

B. Επαγόμενα –πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (i-PSCs)

Μέχρι τον 19^ο αιώνα υπήρχε η αντίληψη ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων στα θηλαστικά είναι μια βιολογική διαδικασία μη αντιστρεπτή. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα όμως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας επικεντρώθηκε στην ανεύρεση των παραγόντων που δίνουν στα βλαστικά κύτταρα τις χαρακτηριστικές ιδιότητες της αυτο-ανανέωσης (proliferation) και πολύ-δυναμικότητας (pluripotency-plasticity). Οι πρώτες προσπάθειες επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων ώστε να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία, ξεκίνησαν το 1952 όταν οι Briggs & King προσπάθησαν για πρώτη φορά να μεταφέρουν διπλοειδείς πυρήνες διαφοροποιημένων κυττάρων ώριμου βλαστιδίου (Somatic Cell Nuclear Transfer) σε εμπύρηνα ωοκύτταρα βατράχου. Αργότερα, ο Gurdon το 1962, χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο έδειξε ότι από τους πυρήνες κυττάρων ώριμου βλαστιδίου μπορούν να προκύψουν, με μικρότερη όμως αποτελεσματικότητα, νέοι οργανισμοί. Έκτοτε, η έρευνα δοκιμάστηκε και σε άλλα θηλαστικά και συνεχίστηκε μέχρι τη δεκαετία του 1990 και το 1997 μετά την ανακάλυψη των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης, επιτεύχθηκε επαναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων από τον μαστικό αδένα

προβάτου. Το «γονιμοποιημένο» ωάριο μετά την εμφύτευση σε μήτρα μητέρας -τροφού έδωσε βιώσιμο έμβρυο (το γνωστό πείραμα Dolly), αποδεικνύοντας αδρά ότι το επιγένωμα (epigenotype) των σωματικών κυττάρων δυνητικά μπορεί να σβηστεί και τα κύτταρα μπορούν να επανέλθουν στην κατάσταση της παντοδυναμικότητας (totipotency), δημιουργώντας ένα νέο οργανισμό (Wilmut et al., 1997). Αργότερα, με τη μέθοδο σύντηξης κυττάρων (cell fusion) in vitro επιτεύχθηκε η σύντηξη ενήλικων κυττάρων θύμου αδένος θηλυκού δότη ποντικού με αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (EGCs) αλλά και με ESCs (Tada et al., 2001) και αποδείχθηκε ότι τα υβριδικά τετραπλοειδή κύτταρα ήταν ολοδύναμα και μπορούσαν να συμβάλλουν στο σχηματισμό όλων των κυτταρικών τύπων των τριών βλαστικών στιβάδων σε χιμαιρικό έμβρυο. Το 2005 πραγματοποιήθηκε σύντηξη πυρήνων από ανθρώπινους ινοβλάστες με ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (hESCs) και προέκυψαν υβριδικά κύτταρα με τετραπλοειδή πυρήνα (hybrid cells) τα οποία είχαν παρόμοια μορφολογία, ρυθμό ανάπτυξης, έκφραση αντιγόνων επιφανείας και χαρακτηριστικά ολοδυναμικότητας παρόμοια με αυτά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (hESCs). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι τα υβριδικά κύτταρα που προήλθαν από πυρήνες ανθρώπινων ινοβλαστών μετά από σύντηξη είτε με hESCs είτε με mESCs δεν μπορούσαν να δώσουν γένεση σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων προς συγκεκριμένο είδος κυττάρου υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο (Cowan et al., 2005).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η δυνατότητα επαναπρογραμματισμού ενήλικων σωματικών κυττάρων προκάλεσε το ερευνητικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη πιο ασφαλών πηγών κυττάρων, χωρίς την ιδιότητα να σχηματίζουν τερατώματα όταν μεταμοσχεύονται αλλά ικανά να αναγεννούν και να αποκαθιστούν ιστούς και όργανα που έχουν υποστεί βλάβη. Ενδιαφέροντα κλινικά ευρήματα, την ίδια χρονική περίοδο ανακάλυψης των iPSCs, προέκυψαν όταν από τη χρήση σωματικών κυττάρων πχ. ινοβλαστών στους οποίους εκφράστηκε έκτοπα το γονίδιο MyoD είχε σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοβλάστες, αλλά και από την έκτοπη έκφραση των GATA1 ή PU1 μεταγραφικών παραγόντων που οδήγησε στην μετατροπή των κυττάρων της μυελοειδούς σειράς σε μεγακαρυοκύτταρα / ερυθροκύτταρα, της έκτοπης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων C/EBPα ή C/EBPβ με την οποία τα πρόδρομα B και T λεμφοκύτταρα μετατράπηκαν σε μακροφάγα και της έκτοπης έκφρασης του C/EBPβ με την οποία τα παγκρεατικά

κύτταρα μετασχηματίστηκαν απευθείας σε ηπατοκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν πολύτιμα δεδομένα για την διαφοροποίηση κυττάρων που προκύπτουν μετά από επαναπρογραμματισμό.

Επανάσταση στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής αποτελούν σήμερα τα επαγόμενα-πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα γνωστά ως induced pluripotent stem cells - iPSCs. Πρόκειται για ένα είδος “βλαστικών κυττάρων”, κατασκευασμένων με τεχνητό τρόπο από ενήλικα σωματικά κύτταρα μετά από επαναπρογραμματισμό των πυρήνων τους. Πρωτοπόροι στην τεχνολογία παραγωγής των iPSCs ήταν οι επιστήμονες από το εργαστήριο του Shinya Yamanaka και Takahashi K. στο Κιότο της Ιαπωνίας οι οποίοι λαμβάνοντας υπόψιν τους τα αποτελέσματα των προηγούμενων μεθόδων επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων (SCNT & Cell Fusion-induced reprogramming), υπέθεσαν ότι τα γονίδια που ευθύνονται για την σταδιακή διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στις διάφορες κυτταρικές σειρές, πιθανόν να είναι ικανά να δημιουργούν ανάλογη δυναμική όταν με κατάλληλη μέθοδο εισαχθούν σε ενήλικα σωματικά κύτταρα, και γίνει επαγωγή της έκφρασής τους με τεχνητό τρόπο (Yamanaka et al., 2006). Η ανακάλυψη αυτή χάρισε στους Shinya Yamanaka και Sir John Gurdon το βραβείο Νόμπελ μόλις το 2012. Τα κύτταρα αυτά πλέον υπόσχονται πολλά στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής καθώς έχουν την δυναμική να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και τη δυνατότητα να παράγουν κάθε άλλο τύπο κυττάρου στο σώμα (όπως νευρώνες, καρδιά, ηπατικά κύτταρα και κύτταρα του παγκρέατος), ενώ μπορούν να αποτελέσουν μια ενιαία πηγή κυττάρων τα οποία δύναται να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση κυττάρων σε παθολογικούς εκ γενετής ιστούς ή ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη π.χ μετά από τραυματισμούς ξεπερνώντας ηθικά διλήμματα και προβλήματα όπως η διαθεσιμότητα κυττάρων ή ιστών και η ηλικία του ασθενούς.

B.1. Κλινικές εφαρμογές των iPSCs

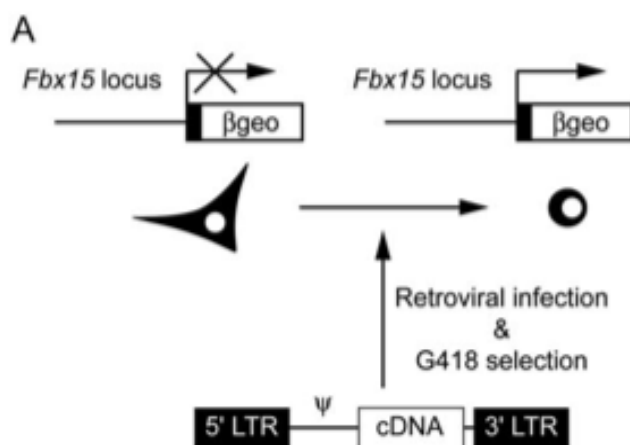
Δεδομένου ότι τα iPSCs μπορούν να προέλθουν απευθείας από ιστούς ενηλίκων ασθενών, παρακάμπτεται όχι μόνο η ανάγκη για χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, αλλά δίνεται η δυνατότητα σε κάθε άτομο να δημιουργήσει τη δική του σειρά πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, γεγονός πολύ σημαντικό στις μεταμοσχεύσεις όπου εκμηδενίζεται ο κίνδυνος ανοσολογικής απόρριψης. Μέχρι στιγμής, iPSCs εκτός από τον άνθρωπο (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007, Park et al., 2007) έχουν

δημιουργηθεί και από άλλα είδη συμπεριλαμβανομένων των αρουραίων (W Li et al., 2009) και των πιθήκων (rhesus monkeys) (Liu et al., 2008) και χρησιμοποιούνται in vitro ως μοντέλα για την κατανόηση των μηχανισμών της παθοφυσιολογίας μιας νόσου καθώς και σε εξατομικευμένες προσπάθειες για την ανακάλυψη φαρμάκων (drug discovery), ενώ στον τομέα των θεραπευτικών μεταμοσχεύσεων η χρήση τους αποτελεί αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Παράλληλα, είναι εφικτή η επιδιόρθωση των ελαττωματικών γονιδίων. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ισογενούς ζεύγους κυττάρων –iPSCs άγριου και μεταλλαγμένου τύπου. Η επιδιόρθωση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας επιτυγχάνεται με ειδικές νουκλεάσες-ένζυμα με χαρακτηριστική δομή δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases) οι οποίες παρουσιάζουν εξειδίκευση όσον αφορά τα σημεία πρόσδεσης στο DNA. Μετά την πρόσδεση τους δρουν ως μοριακά ψαλίδια που κόβουν το DNA στο σημείο που περιέχονται οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες. Με ανάλογο τρόπο προκύπτουν και οι φυσιολογικές αλληλουχίες που προορίζονται να αντικαταστήσουν και να διορθώσουν την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Ακολουθεί σύντηξη των άκρων (DNA-cleaving & DNA-binding-domains) με ομόλογο ανασυνδυασμό (Chun et al., 2011). Σήμερα, τα δεδομένα από πειραματικά ζωικά μοντέλα στα οποία εφαρμόζεται η κυτταρική θεραπεία, είναι ενθαρρυντικά. Οι Weirnis και οι συνεργάτες του έλαβαν iPSCs από ινοβλάστες σε πειραματικό μοντέλο ποντικών με ασθένεια του Parkinson και αφού τα διαφοροποίησαν προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες φάνηκε ότι ενσωματώνονται ικανοποιητικά στον εγκέφαλο με εμφανή σημάδια βελτίωσης των συμπτωμάτων τους (Weirnis et al., 2008). Σε άλλη πειραματική μελέτη οι Hanna και οι συνεργάτες του λαμβάνοντας ινοβλάστες ποντικών από την περιοχή της ουράς αφού τους επαναπρογραμματίσαν στη συνέχεια εισήγαγαν με ομόλογο ανασυνδυασμό το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για την αλυσίδα της β-σφαιρίνης σε ποντίκια που έπασχαν από δρεπανοκυτταρική αναιμία και παρατήρησαν ότι τα διορθωμένα iPSCs έδωσαν φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (Hanna et al., 2007). Τα κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν στους νοσούντες ποντικούς και οι κλινικοί δείκτες όπως τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και η μορφολογία των κυττάρων της ερυθράς σειράς παρουσίασαν βελτίωση. Κλινικά στον άνθρωπο η τεχνολογία των iPSCs μέχρι στιγμής εκτός από την ασθένεια του Parkinson (Solder et al., 2009) και των θαλασσαιμιών (Wang et al., 2009) έχει χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της ασθένειας Lou Gehrig (Dimos et al., 2008), της ατροφίας των μυών της σπονδυλικής στήλης (Ebert et al., 2009), της

οικογενούς δυσσαυτομίας (Lee *et al.*, 2009) και της αναιμίας Fanconi (Raya *et al.*, 2009). Ωστόσο, η βελτίωση των συνθηκών κάτω από τις οποίες παράγονται τα iPSCs, η κατάλληλη ανοσολογική τροποποίηση των iPSCs για την αποτελεσματική εφαρμογή τους στη θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων π.χ στον νεανικό διαβήτη τύπου Ι ή τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι τεχνικές και το μικροπεριβάλλον επαναπρογραμματισμού αλλά και κατά πόσο η γονιδιακή θεραπεία είναι ασφαλής, είναι μερικά ερωτήματα που διερευνώνται από την επιστημονική κοινότητα (Szabłowska-Gadomska *et al.*, 2013).

B.2. Δημιουργία iPSCs πρώτης γενιάς

Οι πρωτοπόροι Yamanaka και Takahashi στα αρχικά τους πειράματα κατάφεραν να ταυτοποιήσουν τους μηχανισμούς και τα μόρια που ρυθμίζουν τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων. Χρησιμοποίησαν ως μοντέλο εμβρυϊονικούς και ενήλικους ινοβλάστες ποντικών. Ο επαναπρογραμματισμός των εμβρυϊκών κυττάρων έγινε με είσοδο είκοσι τεσσάρων γονιδίων “επαναπρογραμματισμού” και ενσωμάτωση τους στο γονιδίωμα των ινοβλαστών. Οι ινοβλάστες σχεδιάστηκαν κατάλληλα και το γονιδιώμά τους τροποποιήθηκε έτσι ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης μετά από επανενεργοποίηση καθενός εκ των είκοσι τεσσάρων γονιδίων που εισήχθησαν στα κύτταρα. Προκειμένου να ελεγχθεί η επαγωγή της ολοδυναμικότητας χρησιμοποίησαν ειδικό γονίδιο αναφοράς, το Fbx15 το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται σε εμβρυονικούς ινοβλάστες. Για να ελεγχθεί η έκφρασή του έγινε σύντηξη του με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και ενός γονιδίου που επιφέρει αντίσταση στην νεομυκίνη (αντιβιοτικό). Το “νέο” γονίδιο (προϊόν σύντηξης των δύο προηγούμενων γονιδίων) εισήχθη στους ινοβλάστες μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με τη βοήθεια ρετροϊού (**Εικόνα 14**).



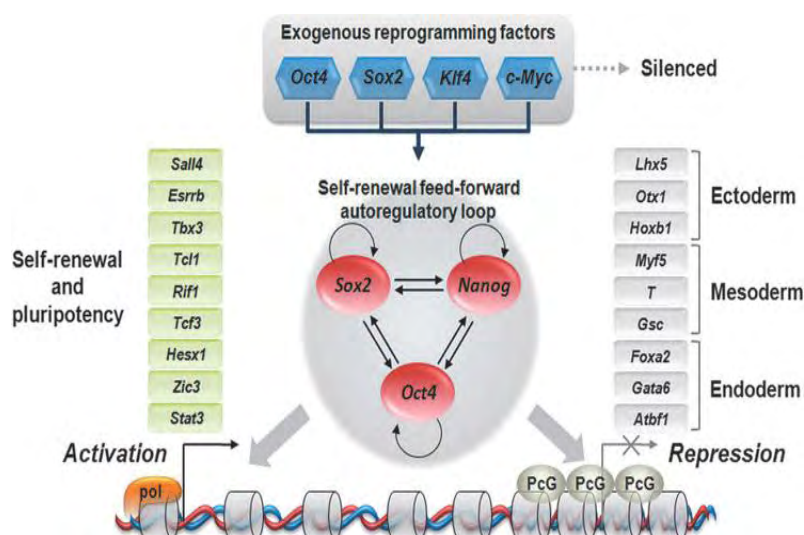
Εικόνα 14. Μηχανισμός εισαγωγής μέσω ρετροϊκού φορέα cDNA-βιβλιοθήκης αποτελούμενης από τα 24 γονίδια επαναπρογραμματισμού, από το γονίδιο που προσδίδει αντίσταση στη νεομυκίνη (G418) και σύντηξή τους με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης στον γονιδιακό τόπο Fbx15 σε εμβρυονικούς ινοβλάστες (Πηγή από www.bio.davinson.edu/html).

Αρχικά εισήχθησαν στους ινοβλάστες και τα είκοσι τέσσερα γονίδια και οι ινοβλάστες επωάστηκαν *in vitro* πάνω σε σθηρική κύτταρα τροφοδότες (feeder cells) με θρεπτικό μέσο ES παρουσία αντιβιοτικού G418. Οι καλλιέργειες που προέκυψαν περιείχαν ανθεκτικές αποικίες κυττάρων που συνολικά παρουσίαζαν βιολογικές ιδιότητες και μορφολογικά χαρακτηριστικά των ESCs όπως σφαιρικό σχήμα, μεγάλο πυρήνα και περιορισμένο κυτταρόπλασμα, έντονη μιτωτική δραστηριότητα, υψηλά επίπεδα έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης, τελομεράσης και αντιγονικούς παράγοντες όπως ο SSEA-1. Στη συνέχεια προκειμένου να καθορίσουν ποιο/α από τα 24 παραπάνω γονίδια προσδίδουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων, άρχισαν να αφαιρούν σταδιακά ένα-ένα τα γονίδια επαναπρογραμματισμού καταλήγοντας σε τέσσερα τα οποία κωδικοποιούν για τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct3/4, Sox2, Klf4 και c-Myc.

Οι Yu και οι συνεργάτες του το 2007 πραγματοποίησαν πειράματα με ανθρώπινους ινοβλάστες στους οποίους εισήγαγαν έναν διαφορετικό συνδυασμό αποτελούμενο από τους παράγοντες Oct3/4, Sox2, με τους Lin28 και Nanog κατορθώνοντας να πάρουν iPSCs. Οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες προσδίδουν πολυδυναμικότητα και σε κύτταρα πρωτεύοντων, υπογραμμίζοντας ότι το δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που προσδίδουν πολυδυναμικότητα στα βλαστικά κύτταρα είναι εξελικτικά συντηρημένο (Yu et al., 2007).

B.3. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού

Οι μεταγραφικοί παράγοντες επαναπρογραμματισμού ελέγχουν μια σειρά από πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η υπερέκφραση του παράγοντα Oct4 οδηγεί σε αναστολή της δράσης του, ενώ οι παράγοντες Nanog, Sox2 και FoxD3 ενεργοποιούν την έκφρασή του (Niwa, 2007). Από αναλύσεις δεδομένων μεγάλης κλίμακας, έχει προκύψει ότι οι παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog μπορούν να ρυθμίζουν οι ίδιοι την έκφρασή τους (αυτό-ρύθμιση) ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους στο κύτταρο (Boyer et al., 2005). Οι παραπάνω παράγοντες δρουν συνεργατικά μεταξύ τους αλλά και με άλλους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Sall4, Dax1, Essrb, Tbx3, Rif1, Nac1 και Zfp δημιουργώντας ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-DNA ή πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που εξασφαλίζει στα βλαστικά κύτταρα την πολυδυναμικότητα και την ικανότητα να αυτό-ανανεώνονται (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού μηχανισμού δράσης των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc που ρυθμίζουν τον επαναπρογραμματισμό του πυρήνα των πολυδύναμων κυττάρων. Μετά από εξωγενή χορήγηση των μεταγραφικών παραγόντων η συγκέντρωση των ενδογενών μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc αυξάνεται. Οι ενδογενείς μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται ενώ οι εξωγενείς με τη σειρά τους απενεργοποιούνται με de novo μεθυλίωση. Οι ενεργοποιημένοι ενδογενείς μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν την RNA pol I, η οποία προσδένεται στους εκκινητές των γονιδίων που σχετίζονται με την αυτό-ανανέωση των κυττάρων (Sall4, Tbx3, Rf1κ.λ.π.) και αντίστοιχα ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος Polycomb που με τη σειρά τους καταστέλλουν τους μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση. (Ji Woong and Youn-sup Yoon, induced pluripotent Stem Cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming, Antioxidants & Redox Signalling, Vol.15, 7, p.1799-1813)

Όταν τα προϊόντα των μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2 και Nanog εκφραστούν έκτοπα τότε ενεργοποιούν τους αντίστοιχους ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες, τα προϊόντα των οποίων συμβάλλουν στην καταστολή γονιδίων που σχετίζονται με κυτταρική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα όταν οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct4 και Sox2 συνδέονται στον υποκινητή του γονιδίου MyoD που φυσιολογικά εκφράζεται στα μυϊκά βλαστοκύτταρα, καταστέλλουν την έκφρασή του, αναστέλλοντας τις διαδικασίες διαφοροποίησης τους προς ώριμα μυϊκά κύτταρα (Niwa, 2007). Από την άλλη πλευρά ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc μαζί με τον Klf4 σχετίζονται περισσότερο με την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αναστέλλοντας τις διαδικασίες κυτταρικού θανάτου (γήρανση-απόπτωση) (Yamanaka et al., 2007). Με ανάλογο τρόπο ο μεταγραφικός παράγοντας Lin28 σε ανθρώπινους ινοβλάστες καταστέλλει τη δράση του *let-7 microRNA*, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Viswanathan et al., 2008). Αντικατάσταση

του παράγοντα c-Myc από άλλο μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων όπως το L-Myc, φάνηκε ότι επάγει πιο αποτελεσματικά τη δημιουργία iPSCs από ινοβλάστες χωρίς όμως να προκαλείται σχηματισμός κακοήθων νεοπλασμάτων (Nakagawa and Yamanaka, et al., 2010).

B.4 Προέλευση κυττάρων για τη δημιουργία των πολυδύναμων (iPSCs)

Η επιλογή του κατάλληλου κυτταρικού τύπου για τη δημιουργία iPSCs είναι μια διαδικασία εξαιρετικά σημαντική για την κλινική θεραπεία. Το δείγμα των κυττάρων που επιλέγεται πρέπει να συλλέγεται ακίνδυνα, με ευκολία και η ποσότητα του να είναι επαρκής γεγονότα που καθορίζουν τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ταχύτητα του επαναπρογραμματισμού. Μέχρι στιγμής iPSCs έχουν δημιουργηθεί από διάφορα είδη ενήλικων σωματικών κυττάρων (**Εικόνα 16**). Μάλιστα η τεχνολογία των iPSCs από ινοβλάστες δέρματος έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο κατανόησης για τη θεραπεία ασθενειών στον άνθρωπο όπως η ανεπάρκεια την απαιμίνησης της αδενοσίνης (ADA), η ασθένεια του Gaucher τύπου III, η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) και Becker (BMD), το σύνδρομο Down (DS), η ασθένεια του Parkinson (PD), ο νεανικός διαβήτης τύπου I (JDM), η ασθένεια του Huntington (HD), το σύνδρομο Lesch-Nyhan (LNS), η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS), η μυϊκή ατροφία της σπονδυλικής στήλης (SMA), η β-θαλασσαιμία, η αναιμία Fanconi (FA) και το σύνδρομο Leopard.

Τα νευρικά βλαστικά (αστροκύτταρα) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ενδογενούς έκφρασης των Sox2 και c-Myc και ο επαναπρογραμματισμός τους απαιτεί μόνο τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4 και Klf4. Αν και η μέθοδος είναι πιο απλή, εμπόδιο αποτελεί η διαδικασία απομόνωσής τους που απαιτεί χειρουργική επέμβαση (Shi et al., 2008). Τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (προερχόμενα από το τριχωτό της κεφαλής ή την ακροβυστία) φυσιολογικά παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα c-Myc αλλά απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα επώασης in vitro. Εντούτοις εμφανίζουν τουλάχιστον εκατό φορές μεγαλύτερη ικανότητα επαναπρογραμματισμού η οποία επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με τους ινοβλάστες δέρματος (Aasen et al., 2008). Μελέτες με ανθρώπινα μελανοκύτταρα από βιοψίες δέρματος έδειξαν ότι ο ενδογενής μεταγραφικός παράγοντας Sox2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και τα κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν αποτελεσματικότερα και ταχύτερα με επαγωγή των τριών παραγόντων Oct4, Klf4 και c-Myc (Utikal et al., 2009). Τα βλαστικά κύτταρα του λιπώδη ιστού που λαμβάνονται με λιποαναρρόφηση

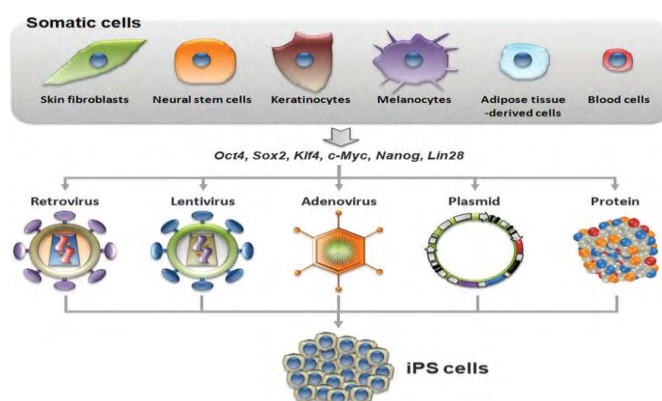
επαναπρογραμματίζονται τουλάχιστον 20 φορές πιο αποτελεσματικά και 2 φορές πιο γρήγορα σε σχέση με τους ανθρώπινους ινοβλάστες μετά από επαγωγή έκφρασης των Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc ενώ in vitro δεν απαιτείται η χρήση υποστηρικτικών τροφοδοτικών κυττάρων (feeder cells)(Sun et al.,2010). Κύτταρα του αίματος από ομφάλιο λώρο που εκφράζουν το αντιγόνο επιφανείας CD+133 επαναπρογραμματίζονται παρουσία των παραγόντων Oct4 και Sox2 αλλά και σε συνδυασμό με τους Nanog και Lin28 ακόμη και αν έχουν υποστεί κρυοσυντήρηση για διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών (Giorgetti et al.,2009, Haase et al., 2009), ενώ μελέτες με λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος που εκφράζουν το αντιγόνο επιφανείας CD+34 τα οποία είναι ενεργοποιημένα, από τον παράγοντα G-CSF των κοκκιωκυττάρων έδειξαν ότι αποτελούν μια πολύ καλή πηγή δημιουργίας iPSCs (Ye et al.,2009, Loh et al.,2010).

Σήμερα, μελέτες επιγενετικής ρύθμισης δείχνουν ότι κάθε κύτταρο ανάλογα με τον τύπο του παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο γονιδιακό και επιγενετικό προφίλ (πρότυπο μεθυλίωσης και τροποποίησης των ιστονών). Έτσι, όταν τα κύτταρα κάτω από κατάλληλες συνθήκες αποδιαφοροποιηθούν και στη συνέχεια γίνει κατευθυνόμενα η διαφοροποίησή τους προς συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, η αποτελεσματικότητα της διαφοροποίησής τους εξαρτάται από το επιγενετικό προφίλ που είχαν πριν από τον επαναπρογραμματισμό τους, το οποίο μοιάζει ως ένα είδος μνήμης (epigenetic memory)(Kim et al., 2010).

B.5 Φορείς επαναπρογραμματισμού

Ο επαναπρογραμματισμός των πυρήνων των σωματικών κυττάρων είναι μια διαδικασία που ενέχει μεταβολές στο γονιδίωμα. Η μέθοδος που επιλέγεται για την αποτελεσματική και ασφαλή μεταφορά των γονιδίων επαναπρογραμματισμού πρέπει ταυτόχρονα να εξασφαλίζει γενωμική σταθερότητα. Οποιαδήποτε αλλαγή στη γονιδιακή σύσταση προκαλεί συνήθως νεοπλασίες οι οποίες περιορίζουν τη θεραπευτική αξία της μεθόδου στην κλινική πράξη. Μελέτες καρυότυπου ανθρώπινων κυτταρικών σειρών iPSCs έχουν δείξει ότι κατά τη διαδικασία επαναπρογραμματισμού χρωμοσωμικές ανωμαλίες εμφανίζονται μετά από περίπου 13 στάδια ανακαλλιέργειας (passages) των κυττάρων όμως η ακεραιότητα του γενετικού υλικού όπως για παράδειγμα το μήκος των τελομερών και η υπομονάδα hTERT της τελομεράσης τόσο σε ποντίκια όσο και στον άνθρωπο παραμένουν σταθερά (Takahashi et al.,2007). Έπιστημονικές μελέτες των

τελευταίων 15 ετών έχουν δώσει στους ερευνητές πολύτιμα εργαλεία για την ασφαλή και αποτελεσματική μεταφορά των παραγόντων επαναπρογραμματισμού η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση ιών είτε με μη-ϊικούς φορείς. Τελευταία, ερευνητικά εξετάζονται μέθοδοι χωρίς τη χρήση γενετικού υλικού που μπορούν να εξασφαλίζουν τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζεται το γονιδίωμα των κυττάρων- στόχων.



Εικόνα 16. Είδη σωματικών κυττάρων που επιλέγονται για επαναπρογραμματισμό –φορείς επαναπρογραμματισμού

(Ji Woong and Youn-sup Yoon, induced pluripotent Stem Cells:Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming,Antioxidants & Redox Signalling, Vol.15, 7, p.1799-1813)

B.5.1. Ιικά συστήματα μεταφοράς (Viral delivery system)

Μέχρι στιγμής για τη μεταφορά γονιδίων επαναπρογραμματισμού στα ενήλικα σωματικά κύτταρα για τη δημιουργία iPSCs έχουν χρησιμοποιηθεί γενετικά τροποποιημένοι ρετροϊοί, λεντιοί αλλά και αδενοϊοί. Οι πιο δημοφιλείς είναι:

B.5.1.α. Ογκορετροϊός (Moloney Murine Leukemia Virus)

Πρόκειται για ρετροϊούς που κατασκευάζονται με τη διαγραφή των ιικών γονιδίων *gag*, *pol*, *env* και την αντικατάστασή τους από τις αλληλουχίες των παραγόντων επαναπρογραμματισμού, αφήνοντας τις απαραίτητες LTRs και Ψ (περιοχή πακεταρίσματος του ιού) cis-acting αλληλουχίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος. Τα γονίδια *gag*, *pol*, *env* εκφράζονται σε κύτταρα συσκευασίας που διαμολύνονται με πλασμίδια ώστε να παράγονται οι δομικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα του ιού. Ακολουθεί η διαμόλυνση των κυττάρων στόχων και μετά την καταστροφή του πυρηνικού φακέλου ο MMLV περνά στον πυρήνα του κυττάρου στόχου κατά τη μίτωση. Αυτό συνεπάγεται ότι ο MMLV ενσωματώνεται τυχαία στο γενετικό υλικό του κυττάρου-στοχού και η έκφραση των γονιδίων του υπόκειται σε

αρνητικές επιδράσεις από την περιβάλλουσα χρωματίνη. Εκτός από το ένζυμο ιντεργκράση που επηρεάζει την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του RNA-ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου-στόχου, το είδος του κυττάρου παίζει καθοριστικό ρόλο. Για παράδειγμα τα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου διαθέτουν τέσσερις θέσεις ενσωμάτωσης για τον RNA-ιό και ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων επιτυγχάνεται πιο γρήγορα σε σχέση με τους εμβρυονικούς ινοβλάστες. Πολύ συχνά οι LTR αλληλουχίες των MMLVs ενεργοποιούνται αυτόματα και αλληλεπιδρούν με ρυθμιστικές περιοχές όπως είναι οι υποκινητές γονιδίων του ξενιστή που ρυθμίζουν τους μηχανισμούς κυτταρικής διαίρεσης (π.χ με το ογκογονίδιο c-Myc) με αποτέλεσμα να προκαλείται ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που οδηγεί στο σχηματισμό τερατωμάτων ή καρκινικών όζων (Aoi et al., 2008).

B.5.1.β. Λεντιοί (Lentiviral vectors)

Πρόκειται για ρετροϊικούς φορείς με τον Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein (VSVg) να χρησιμοποιείται συχνότερα. Έχουν την ιδιότητά τους να μολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα και ενσωματώνουν ταυτόχρονα στο γονιδίωμά τους και τους τέσσερις φορείς επαναπρογραμματισμού, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα χωρίς να απαιτούνται τέσσερις διαφορετικοί φορείς για ενσωμάτωση του κάθε ενός παράγοντα επαναπρογραμματισμού ξεχωριστά (Carey et al., 2009, Sommer et al., 2009). Όπως οι MMLVs, έτσι και οι ιοί-Lenti ενσωματώνονται τυχαία στο γονιδίωμα του δέκτη και μπορούν να ενεργοποιήσουν κατασταλμένα γονίδια όπως το KLF4 και c-myc, διαταράσσοντας τους μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης. Μερική απενεργοποίηση του γονιδίου της ιντεγκράσης με τεχνητή πρόκληση μεταλλάξεων έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, χωρίς να δημιουργηθούν προβλήματα με την ενσωμάτωση των γονιδίων επαναπρογραμματισμού ενώ με τη χρήση χημικών ουσιών όπως είναι η doxycycline η ενσωμάτωση των παραγόντων επαναπρογραμματισμού γίνεται πιο στοχευμένα (Maherali et al. 2008).

B.5.1.γ. Αδενοϊοί (Adenovirus) και Sendai ιοί

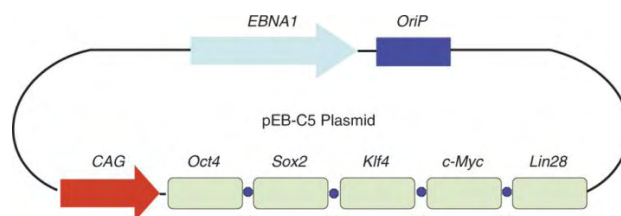
Οι αδενοϊοί είναι DNA-ιοί η οποίοι γενικά οδηγούν σε σχηματισμό τερατωμάτων, όμως δεν μεταβιβάζουν την νοσογονικότητά τους στα γαμετικά κύτταρα καθώς δεν ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Η ικανότητα και η κινητική έκφρασης των παραγόντων επαναπρογραμματισμού στο γονιδίωμα των

iPSCs είναι μειωμένη σε σχέση με τους ρετροϊούς ή τους ιούς lenti (Stadtfield et al. 2008). Όσον αφορά του ιούς Sendai, αν και είναι RNA-ιοί εντούτοις δεν είναι παθογόνοι και δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των ανθρώπινων ινοβλαστών κατά τη διαδικασία επαναπρογραμματισμού η οποία επιτυγχάνεται με απλή διαμόλυνση παρουσία κατάλληλων υποστηρικτικών κυττάρων (feeder based system) (Warren et al., 2010).

B.5.2. Μη ιικοί φορείς

B.5.2.α. Πλασμίδια

Η χρήση των αδενοϊών στη δημιουργία των iPSCs, έδειξε ότι τα τελευταία μπορούν να παραχθούν από σωματικά κύτταρα χωρίς ο φορέας που φέρει τα γονίδια επαναπρογραμματισμού να ενσωματώνει το γενετικό του υλικό σε αυτά. Περισσότερο ασφαλής φορείς επαναπρογραμματισμού είναι τα πολυσιστρονικά πλασμίδια και Klf4 τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια ολιγοπεπτιδίων του ιού 2^A και εκφράζουν γονίδιο αναφοράς για αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό (**Εικόνα 17**). Ο επαναπρογραμματισμός των εμβρυονικών ινοβλαστών είναι πιο αποτελεσματικός όταν παράλληλα με τη χρήση του πολυσιστρονικού πλασμιδιακού φορέα, το ογκογονίδιο c-Myc εκφράζεται έκτοπα με τη χρήση ιικού φορέα (Okita et al., and Yamanaka., 2008)



Εικόνα 17. Δημιουργία πολυσιστρονικού πλασμιδίου με cDNA βιβλιοθήκη των γονιδίων Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc και Lin28 και ιικό πολυπεπτίδιο 2A

Με χρήση της ουσίας Lipofectamine ως μέσο διαμόλυνσης, οι πλασμιδιακοί φορείς εισέρχονται στον πυρήνα των εμβρυονικών ινοβλαστών, με πολύ μικρό ποσοστό πλήρους ενσωμάτωσης στο γονιδίωμά τους ~1-0,01%. Ο πλασμιδιακός φορέας *riggyBac* (PB) έχει την ικανότητα ενσωμάτωσης όλων των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού (Gonzales et al., 2009) ενώ τα γονίδια επαναπρογραμματισμού μπορούν να απομακρύνονται από το γονιδίωμα του κυττάρου στόχου με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσποζάση που διαθέτει ο φορέας *riggyBac*. Δεν είναι ξεκάθαρο αν με την απομάκρυνση των γονιδίων επαναπρογραμματισμού προκαλούνται ταυτόχρονα μόνιμες αλλαγές στο γονιδίωμα των ινοβλαστών. Παρόμοια

μέθοδος απομάκρυνσης των γονιδίων επαναπρογραμματισμού επιτυγχάνεται με το σύστημα Cre-loxP-recombinase. Ωστόσο η μέθοδος επιτυγχάνεται μόνο σε ποσοστό 2% των hiPSCs που εκτίθενται στον φορέα riggyBac, καθώς κάποια κατάλοιπα συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών των τρανσποζονίων στις loxP θέσεις, μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό μεταλλάξεων (Kaji et al, 2009).

B.5.2.β. Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ως μεταγραφικοί παράγοντες

Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού εναλλακτικά, χωρίς τη χρήση ιικού φορέα, μπορούν να εισαχθούν απευθείας μέσα σε σωματικά κύτταρα ποντικών και ανθρώπου με τη βοήθεια μορίων πολυαργινίνης γνωστά ως CPPs (Cell-penetrating peptides) (Zhou et al. 2009, Kaji et al.2009). Πρόκειται για αλληλουχίες πεπτιδίων (~11κατάλοιπα) συνήθως Agr ή Lys, με υδρόφιλο ή υδρόφοβο χαρακτήρα τα οποία λόγω του φορτίου τους μπορούν να συνδέονται με ομοιοπολικούς ή μη δεσμούς με μόρια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-στόχων. Μελέτες έδειξαν ότι τα ανασυνδυασμένα πρωτεϊνικά μόρια εισάγονται στους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού με στόχο να επαναπρογραμματιστεί το γονίδιο αναφοράς OG2/Oct4-GFP, ο επαναπρογραμματισμός επιτυγχάνεται σε τέσσερις επαναλαμβανόμενους κύκλους παρουσία του αναστολέα αποακετυλάσης ιστονών (HDAC) και βαλπροϊκού οξέος (VPA). Σε ανθρώπινους εμβρυονικούς ινοβλάστες απαιτούνται λιγότερα κατάλοιπα αργινίνης, η αποτελεσματικότητα όμως επαναπρογραμματισμού είναι περιορισμένη, μόλις το 0,001% του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού επαναπρογραμματίζεται και σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα ~8 εβδομάδων (Kim et al., 2009)

B.5.2.γ. microRNAs & πολυδυναμικότητα

Μετά την ανακάλυψη των microRNAs (miRNAs), ανοίχθηκαν νέοι δρόμοι στην επιστημονική έρευνα για την κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζουν και πώς εμπλέκονται στους φυσιολογικούς μηχανισμούς λειτουργίας των κυττάρων. Τα μη-κωδικοποιητικά μόρια RNA (noncoding RNAs) αποτελούν σημαντικό κλάσμα του μεταγραφώματος των σπονδυλωτών με ρυθμιστικό ρόλο. Πρόκειται για αλληλουχίες ~22 νουκλεοτιδίων τα οποία ρυθμίζουν με δύο μηχανισμούς την γονιδιακή έκφραση. Είτε συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των mRNA μεταγράφων είτε αναστέλλουν την έκφρασή τους (Kloosterman et al., 2006). Κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης των

mESCs και hESCs σε εμβρυοειδή σωμάτια (embryoid bodies) συμμετέχουν διαφορετικές ομάδες (clusters) miRNAs οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες. Μελέτες έδειξαν ότι μια υποομάδα microRNAs (*miR-291-3p*, *miR-294* και *miR-295*) όταν εκφραστεί σε συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου τους τότε σταματά η διαδικασία της διαφοροποίησης και μπορούν να προκύψουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). Σε ανθρώπινους ινοβλάστες ο μεταγραφικός παράγοντας Lin28 αναστέλλει την δράση του miRNA let-7 που εκφράζεται σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Με τη χρήση αναστολέα (anti-sense RNA) του microRNA *let-7*, διαφοροποιημένοι ινοβλάστες ποντικών μπορούσαν να επαναπρογραμματιστούν τουλάχιστον 4 φορές πιο αποτελεσματικά (Melton et al., 2010).

B.5.2.δ. Μικρά χημικά μόρια

Αν και η γονιδιακή σύσταση μεταξύ των ES και των σωματικών κυττάρων ενός οργανισμού είναι ίδια, οι διαφορές στο επιγένωμα τους είναι τεράστιες και η αποδιαφοροποίηση των τελευταίων είναι μια διαδικασία που προϋποθέτει τη διαγραφή του προϋπάρχοντος επιγενετικού προφίλ στο γονιδιώμά τους. Η χρωματίνη υπόκειται σε ποικίλες επιγενετικές τροποποιήσεις όπως είναι η αναδιαμόρφωσή της, με διαδικασίες μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA, και με τροποποιήσεις των ιστονών. Στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA διαγράφεται και μετά το στάδιο εμφύτευσης στη μήτρα, καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την φυσιολογική ανάπτυξη (Rougier et al., 1998). Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA διατηρούνται σταθερά χωρίς αυτό βέβαια να σημαίνει ότι κάθε γονίδιο έχει ένα σταθερό πρότυπο μεθυλίωσης (Meissner et al., 2008). Έτσι για παράδειγμα στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης η 5'-περιοχή του υποκινητή των γονιδίων Oct4 και Nanog των ESCs περιέχει μη μεθυλιωμένα νησίδια CpG, ενώ στα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα οι υποκινητές των γονιδίων Oct4, Sox2 και Nanog παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης. Ενδιαφέρουσες μελέτες έχουν δείξει ότι η απομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων Oct4, Sox2 και Nanog καθώς και η εκ νέου ενεργοποίηση του αδρανοποιημένου X χρωμοσώματος είναι διαδικασίες που πραγματοποιούνται στα τελευταία στάδια του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων iPS καθώς τα κύτταρα που παρουσιάζουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης στο γονιδιώμά τους (Mikkelsen et al., 2008).

Επιπλέον, εκτός από τη μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσβαση των διαφόρων ρυθμιστικών μορίων και μεταγραφικών παραγόντων πάνω στο γονιδίωμα. Οι εξελικτικά συντηρημένες πρωτεΐνες της ομάδας Polcomb (PcGs) σχηματίζουν συμπλέγματα (PRCs), τα PRC1 και PRC2, τα οποία με τη σειρά τους, με διαδικασίες μεθυλίωσης, συμβάλλουν στην αποσιώπηση των γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση (*Schuettengruber et al., 2007*). Ειδικότερα η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K9 & H3K27) πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συμπλέγματος πρωτεϊνών PRC2. Η μεθυλιωμένη H3K27me3 προσελκύει το δεύτερο σύμπλεγμα πρωτεϊνών PRC1, το οποίο ευνοεί τον σχηματισμό νουκλεοσωμάτων, τον ολιγομερισμό τους και τη συμπύκνωση της χρωματίνης καθιστώντας την περιοχή της χρωματίνης μεταγραφικά ανενεργή. Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών PRC1 περιέχει την λιγάση ουβικουιτινίωσης ιστονών, *Ring1b* η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στην αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης των ESCs (*Stock et al., 2007*). Αντίθετα, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης H3 και η ακετυλίωση της ιστόνης H4 σχετίζονται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές στο γονιδίωμα (*Santos F. και Dean W., 2004*). Μελέτες σε κυτταρικές σειρές iPSCs ποντικών έδειξαν ότι στο γονιδίωμα υπάρχουν αντιπροσωπευτικοί γενετικοί τόποι που παρουσιάζουν συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης στο DNA. Οι Maherali και οι συνεργάτες του με μελέτες ανοσοκατακρύμνισης χρωματίνης διερεύνησαν την παρουσία τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 στα κατάλοιπα K4 και K27 στην περιοχή των υποκινητών 16500 γονιδίων χωρίς να εντοπίσουν αποκλίσεις στο επιγενετικό προφίλ των ESCs και των iPSCs (*Maherali et al., 2008*). Μάλιστα το πρότυπο της τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 στο κατάλοιπο K4 (H3K4me3) ήταν όμοιο σε όλα τα δείγματα που εξέτασαν και επομένως συμπέραναν ότι η διαδικασία επαναπρογραμματισμού εξαρτάται περισσότερο από τις αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης της τριμεθυλιωμένης H3 στο κατάλοιπο K27. Μελέτες με ανοσοκατακρύμνιση χρωματίνης και υβριδοποίηση με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών (ChIP-Chip) έδειξαν ότι τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (ESCs) διαθέτουν περίπου ~2500 μεταγραφικά ενεργές και ανενεργές περιοχές στο γονιδίωμά τους σε σύγκριση με τα αρχέγονα νευρικά βλαστικά κύτταρα (*Meissner et al., 2008*). Οι Mikkelsen και συνεργάτες του προσπαθώντας να χαρτογραφήσουν τις θέσεις μεθυλίωσης της χρωματίνης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, παρατήρησαν συνολικά ότι τα επίπεδα της H3K27me3 ήταν παρόμοια στις διάφορες κυτταρικές σειρές iPSCs. Μάλιστα η ακρίβεια

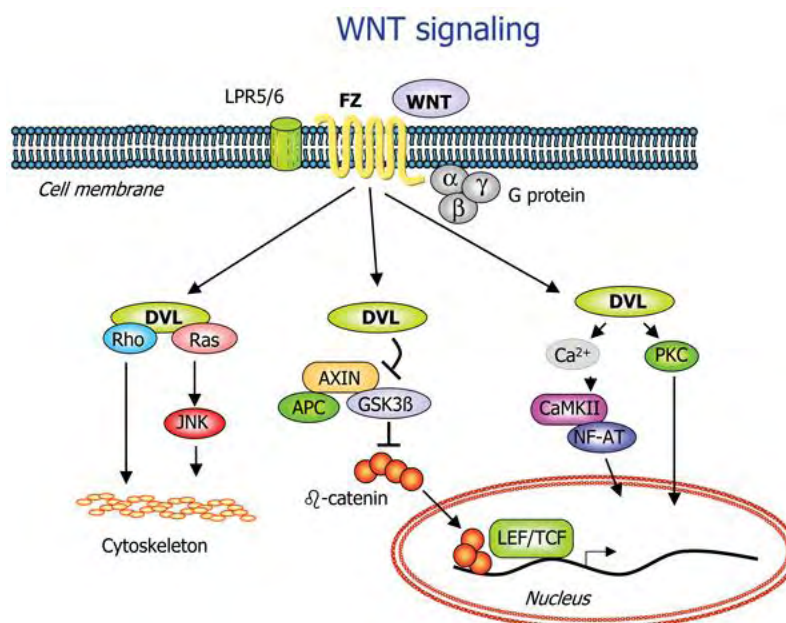
με την οποία αποκαθίστώνται οι θέσεις μεθυλίωσης των ιστονών στις περιοχές γύρω από τους υποκινητές των γονιδίων Oct4 και Nanog καθόριζε σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων.

Καθώς λοιπόν ήταν γνωστό ότι για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων με τη μέθοδο SCNT, το σπουδαιότερο ρόλο παίζει η διαμόρφωση της χρωματίνης (αναστολή της αποακετυλίωσης των ιστονών και η μεθυλίωση του DNA), οι Huangfu και οι συνεργάτες του επιχείρησαν με μικρά χημικά μόρια στοχεύοντας σε ένζυμα να επηρεάσουν τα ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στις τροποποιήσεις της δομής της χρωματίνης, και που σε αρκετές περιπτώσεις μπορούν να αντικαταστήσουν τη δράση έκτοπης έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό τους μοντέλο ινοβλάστες ποντικών με γονίδιο αναφοράς το Oct4-EGFP (Huangfu et al., 2008). Επίσης προκειμένου να διαγράψουν πλήρως το επιγένομα επώασαν τους εμβρυονικούς ινοβλάστες με έναν αναστολέα μεθυλοτρανσφερασών γνωστό ως 5'Azacytidine παρουσία τριών αναστολέων αποακετυλασών (HDAC) του SAHA (suberoylalanilide hydroxamic acid), TSA (trichostatin A) και VPA (valproic acid) και παρατήρησαν ότι παρουσία VPA ο επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών γινόταν με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Οι Shi και οι συνεργάτες του το 2008 ταυτοποίησαν άλλες δύο χημικές ουσίες την BIX01294 και BayK8644 οι οποίες σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4 και Klf4 προάγουν τον επαναπρογραμματισμό των αρχέγονων νευρικών κυττάρων και εμβρυονικών ινοβλαστών σε ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα η ουσία BIX01294 δρα ως αναστολέας της μεθυλοτρανσφεράσης G9a. Εκτός από την de novo μεθυλίωση του DNA του υποκινητή (promoter) του γονιδίου Oct4, στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, η μεθυλοτρανσφεράση G9a, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, καταλύει τη μεταφορά της μεθυλικής ομάδας στο κατάλοιπο λυσίνης στη θέση 9 της ιστόνης H3 (H3K9) προκαλώντας συνολικά αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου Oct4 και παρεμπόδιση του επαναπρογραμματισμού του γονιδίου εκ νέου. Αντίστοιχα, οι Shi και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η ουσία BayK8644 είναι ένας αγωνιστής των L-τασεοευαίσθητων διαύλων ασβεστίου που έμμεσα ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν το επιγενετικό προφίλ των κυττάρων, ενώ με την παρουσία μόνο 2 (π.χ Oct4 & Klf4) εκ των 4 μεταγραφικών παραγόντων επιτυγχάνεται αποτελεσματικά ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων (Shi et al., 2008).

B.5.2.ε.Σηματοδοτικά μόρια που προάγουν την πολυδυναμικότητα

Κατά τη φυσιολογική ροπή των βλαστικών κυττάρων προς τη διαφοροποίηση τόσο εξωγενείς παράγοντες όσο και το ενδογενές δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων συνεργάζονται αρμονικά ελέγχοντας αυστηρά τα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης που εξασφαλίζουν την πορεία προς τη διαφοροποίηση. Με ανάλογο τρόπο εξασφαλίζεται και η διατήρηση της πολυδυναμικότητας που εμφανίζουν τα ESCs. Στη περίπτωση των hESCs η διαδικασία της αυτό-ανανέωσης ρυθμίζεται κυρίως μέσω του μεταγραφικού αυξητικού παράγοντα TGF-β/FGF. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς του TGF-β μεταφέρουν το σήμα στον πυρήνα μετά από φωσφορυλίωση των μεταγωγέων σήματος Smad 2/3. Οι φωσφορυλιωμένοι Smad 2/3 προσδεόνται πάνω σε ειδικές αλληλουχίες της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (Smad Responsive Elements) στον προαγωγέα (promoter) του μεταγραφικού παράγοντα Nanog ο ρόλος του οποίου είναι να προκαλεί άνοιγμα στη δομή της χρωματίνης και να επιτρέπει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 και Sox2, διατηρώντας τα ESCs αδιαφοροποίητα.

Με ανάλογο τρόπο ο υποδοχέας FGFR ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK κινασών και την Akt (Ichida et al., 2009; Maherali and Hochedlinger 2009), ενώ ανάμεσα στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην διατήρηση της ολοδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων είναι το Notch, το Sonic Hedgehog και το Wnt. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt, όταν οι Wnt πρωτεΐνες προσδεθούν στους υποδοχείς τους (Frizzled) ενεργοποιούν μονοπάτια που αναστέλλουν την πρωτεόλυση της β-κατενίνης. Το πλέον σταθερό μόριο της β-κατενίνης προσδένεται στην πρωτεΐνη TCF3, σχηματίζοντας σύμπλοκο το οποίο προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή. Στα ESCs ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας TCF3 αλληλεπιδρά και συναγωνίζεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4 και Nanog για πρόσδεση στο DNA και ως σύμπλοκο με την β-κατενίνη δρα ως καταστολέας γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση, επιτρέποντας την έκφραση των Oct4 και Nanog (Εικόνα 18).

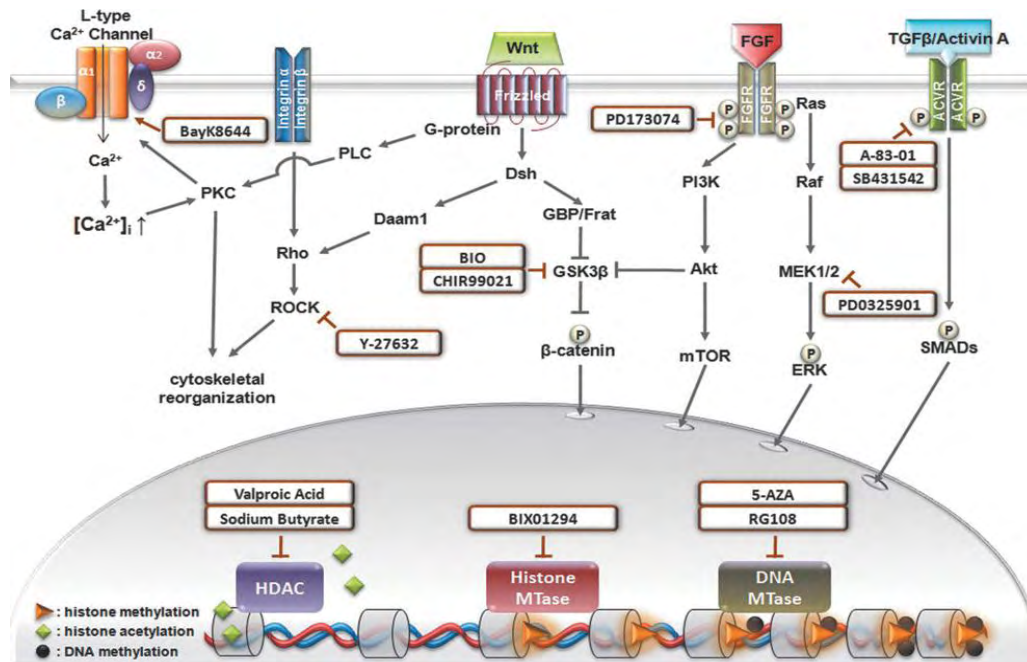


Εικόνα 18. Σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt. Μετά από ενεργοποίηση η β-κατενίνη συμπλοκοποιείται με τον LEF/TCF και καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση

Η κατανόηση των ενδιάμεσων μορίων (effector) που εμπλέκονται στους μοριακούς μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης αυξάνει την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων. Μελέτες έδειξαν ότι απουσία του Sox 2 και c-Myc παράγοντα, με χρήση της ουσίας CHIR99021 που λειτουργεί ως αναστολέας της συνθάσης GSK3β, ενεργοποιείται το Wnt μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ο επαναπρογραμματισμός mEFs (Marson et al., 2008). Με έκτοπη έκφραση του Oct4 και Klf4 και χρήση της ουσίας CHIR99021 σε συνδυασμό με την ουσία Parnate επιτυγχάνεται αποτελεσματικά ο επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων κερατινοκυττάρων ενώ οι mEFs επαναπρογραμματίζονται παρουσία των Oct4, Sox2, c-myc, απουσία του Klf4 με επιτυχία. με χρήση της ουσίας kenraullone που επίσης δρά ως αναστολέας της συνθάσης GSK3β (Lyossitis et al., 2009).

Κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού οι ενήλικοι ινοβλάστες υπόκεινται σε μορφολογικές αλλαγές και τείνουν να εμφανίζουν φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων. Η αλλαγή στη μορφολογία συνοδεύεται από τροποποίηση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης. Συνεπώς με αναστολή τουλάχιστον 3 γνωστών μηχανισμών που εμπλέκονται στην μετάβαση των κυττάρων από το μεσέγχυμα στο επιθήλιο, όπως του υποδοχέα TGF-β (Li et al., 2009), των υποδοχέων FGF (Kaji et al., 2009), της κινάσης MEK (Silva et al., 2008) και της κινάσης ROCK (Krawetz et al., 2008), ο

επαναπρογραμματισμός των κυττάρων επιτυγχάνεται πιο αποτελεσματικά και σε μικρό χρόνο. (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Μικρά χημικά μόρια που συντελούν στην προώθηση του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων (Ji Woong and Youn-sup Yoon, induced pluripotent Stem Cells:Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming,Antioxidants & Redox Signalling, Vol.15, 7, p.1799-1813)

Μεταξύ άλλων μελέτες έχουν δείξει ότι ο επαναπρογραμματισμός των iPSCs διευκολύνεται μετά από χορήγηση αναστολέων αναλόγων του c-AMP π.χ της 8-βρωμοαδενοσίνης, ή του 3'-5' μονοφωσφορικού, αναστολέων ενδιάμεσων μορίων της σηματοδότησης της PKA και μορίων της οικογένειας των Src κινασών, όμως σε καμία περίπτωση μεμονωμένα δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων. Σε αρκετές όμως από τις παραπάνω μελέτες έχει αποδειχθεί ότι πολλά από τα χημικά μόρια λειτουργούν ως δυναμικοί ρυθμιστές και τροποποιητές της δομής της χρωματίνης με αποτέλεσμα να εισάγονται νέες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές που μειώνουν τον αριθμό των κλώνων iPSCs (Desponte and Ding 2010, Li and Ding 2010, Stadtfeld and Hochedlinger 2010).

5.2.στ. Σηματοδοτικά μόρια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο ζωής και τον μεταβολισμό των iPSCs

Η κυτταρική γήρανση δηλαδή η φυσιολογική διαδικασία παύσης της διαίρεσης των κυττάρων είναι ένα φαινόμενο που επηρεάζει in vitro τον επαναπρογραμματισμό των

iPS και ευθύνεται για την μικρή κινητική και χαμηλή αποδοτικότητα της διαδικασίας. Οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην ανεύρεση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Μέχρι στιγμής η ανακάλυψη του τρόπου δράσης των γονιδίων *p53*, *p21^{CIP1}*, και *p16^{Ink4a}/p19^{Arf81}* έχει βοηθήσει όχι μόνο στην κατανόηση των μηχανισμών της ογκογένεσης αλλά και στην πιο αποτελεσματική δημιουργία πολυδύναμων (iPSCs). Για παράδειγμα μελέτες σε mEFs έδειξαν ότι με αυξημένη έκφραση των γονιδίων *Oct4* και *Sox2*, και ταυτόχρονα με αναστολή της δράσης του γονιδίου *p53* είτε άμεσα, μέσω του μορίου *Mdm2*, είτε έμμεσα, μέσω του παράγοντα *Arf*, ο οποίος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επηρεάζει τη δράση του *p21* και οδηγεί το κύτταρο σε γήρανση, τους μετατρέπει σε πολυδύναμα iPSCs (Kamamura et al., 2009). Επίσης μελέτες έδειξαν ότι μετά από προσθήκη του φυσικού αντιοξειδωτικού, βιταμίνης C μειώνεται η έκφραση των γονιδίων *p53* και *p21*, σε ενήλικους ινοβλάστες ποντικών και ο επαναπρογραμματισμός τους πραγματοποιείται πιο αποτελεσματικά (Esteban et al., 2010).

Σε επίπεδο μεταβολισμού πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία του παράγοντα HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 α) και του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc προάγουν τη βιοχημική διεργασία της γλυκόλυσης και βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού των κυττάρων (Vander Heiden et al., 2009, Yoshida et al., 2009). Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι, η μεταβολική εναλλαγή (από την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση) των ανθρώπινων ενήλικων κερατινοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου και αμνιοκυττάρων, επιτυγχάνεται με χρήση αναστολέων των αποακετυλασών, των υποδοχέων TGF- β και των MEK κινασών σε συνδυασμό με το μόριο PS48 που δρα ως ενεργοποιητής της PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase -1) και ενεργοποιεί το μονοπάτι της PI₃/Akt, υπογραμμίζοντας ότι μικρά μόρια που ενισχύουν το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης και καταστέλλουν την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση ευνοούν τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων (Zhu et al., 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο :

ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ iPSCs

4.1. Μέθοδοι επαγόμενης χονδρογένεσης

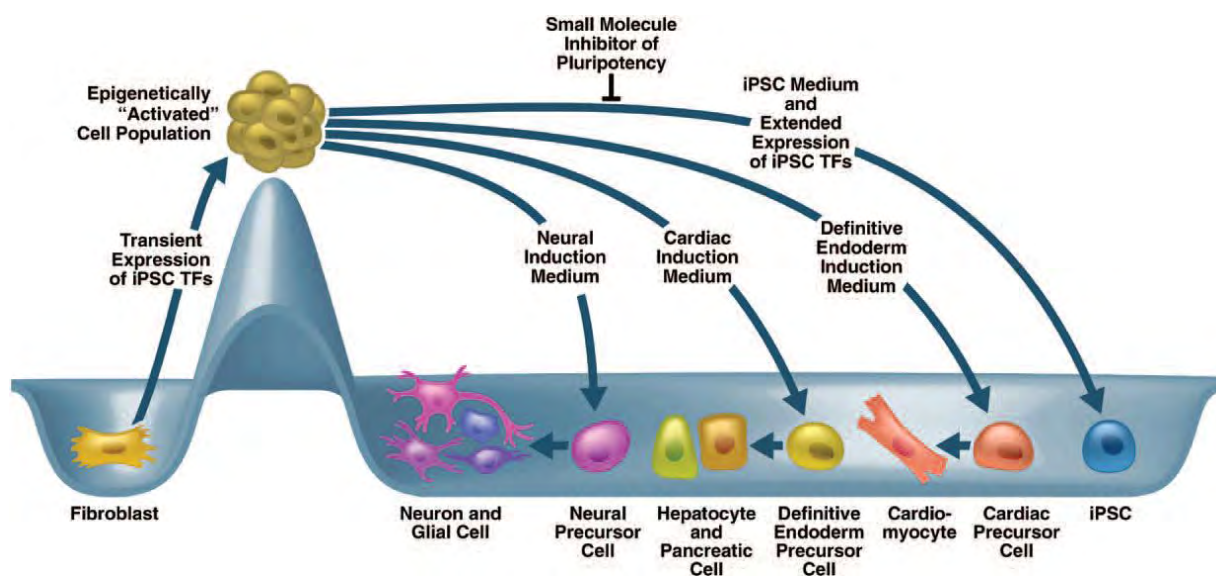
Γενικά από τις πιο σημαντικές προκλήσεις για την επιτυχή κατασκευή *in vitro* μοντέλων iPSCs που συμβάλλουν στην ανάπτυξη κατεστραμμένων ιστών είναι αφενός η κατανόηση του μηχανισμού που ευθύνεται για τη βλάβη π.χ κάποιο γονίδιο σε μονογονιδιακά νοσήματα ή συνδυασμός γονιδίων και περιβαλλοντικών συνθηκών και αφετέρου η επιλογή του κατάλληλου κυτταρικού τύπου που θα χρησιμοποιηθεί για επαναπρογραμματισμό. Τέλος η μεθοδολογία που πρέπει να ακολουθηθεί πρέπει να στοχεύει στην ομοιόμορφη διαφοροποίηση των iPSCs στον επιθυμητό τύπο κυττάρου.

Αν και τεχνικά η μέθοδος επαναπρογραμματισμού των iPSCs είναι απλούστερη σε σύγκριση με την SCNT και την σύντηξη κυττάρων (cell fusion) και ηθικά αποδεκτή, ωστόσο είναι στοχαστική και μη ειδική που σημαίνει ότι με τη είσοδο των παραγόντων επαναπρογραμματισμού απλά επιτυγχάνεται αδρά η διαγραφή του επιγενώματος χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα τα παραγόμενα iPSCs να μπορούν στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν επιτυχώς προς ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την αποτελεσματικότητα και τον χρόνο επαναπρογραμματισμού των κυττάρων-στόχων. Προς το παρόν οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επαγόμενη διαφοροποίηση των iPSCs προς χονδροκύτταρα, είναι ίδιες με αυτές που εφαρμόζονται για την διαφοροποίηση των ESCs. Η εργαστηριακή διαδικασία περιλάμβανε μετά τη βιοψία και τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων, την τοποθέτησή τους πάνω σε τριβλία. Η διατήρηση των κυττάρων επιτυγχάνεται όταν αυτά συν-καλλιεργούνται με κατάλληλα τροποποιημένα κύτταρα ποντικών συνήθως ινοβλάστες (στηρικτικά κύτταρα) και προσθήκη στο θρεπτικό μέσο ορού (animal-derived serum συνήθως FBS), ωστόσο αν και τα στηρικτικά (feeder cells) είναι απενεργοποιημένα είτε με ακτινοβολία είτε με χρήση μιτομυκίνης C εντούτοις δεν αποφεύγεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης και μεταλλαξιγένεσης τους με γενετικό υλικό του ξενιστή. Βέβαια για τα ESCs (mESCs/hESCs) έχουν αναπτυχθεί πιο ασφαλή συστήματα καλλιέργειας στα οποία προστίθενται συστατικά όπως ορός που περιέχει ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

και παράγοντες ανάπτυξης που συνήθως προέρχονται από ινοβλάστες χωρίς να απαιτείται η χρήση στηρικτικών κυττάρων (feeder-free conditions) ή πρόσθετων παραγόντων και τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε τριβλία καλυμμένα με ζελατίνη (Amit&Itskovitz-Eldor,2006). Αντίστοιχα πρωτόκολλα καλλιέργειας με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έχουν αναπτυχθεί και για τα iPSCs τα οποία καλλιεργούνται σε υπόστρωμα όπου το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης περιέχει μια ομάδα από υψηλής καθαρότητας πρωτεϊνικά συστατικά (π.χ. τον ανθρώπινο ανασυνδυασμένο παράγοντα bFGF) και ινωδονεκτίνη στα οποία απαιτείται η παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων συνήθως από εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικών. Πρόσφατα πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι ανθρώπινα νεογνικά κερατινοκύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν όταν συν-καλλιεργηθούν με ενήλικους ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος (Hayashi et al., 2010).

Επειδή η συμβατική μέθοδος επαναπρογραμματισμού είναι μια διαδικασία αργή που απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα έκφρασης των παραγόντων επαναπρογραμματισμού (π.χ 8-12 ημέρες) και την παρουσία συγκεκριμένου περιβάλλοντος σηματοδότησης (π.χ του παράγοντα LIF σε κύτταρα ποντικών), συνήθως δεν επιτυγχάνεται αποτελεσματικά ο πλήρης επαναπρογραμματισμός των κυττάρων-στόχων. Έτσι επινοήθηκε μία νέα στρατηγική διαφοροποίησης, που περιλαμβάνει παροδική έκφραση των παραγόντων επαναπρογραμματισμού και ταυτόχρονη χορήγηση μικρών διαλυτών μορίων που ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που υπαγορεύουν μετά τον επαναπρογραμματισμό, την μοίρα του κυττάρου σε κάθε στάδιο μέχρι και την τελική του διαφοροποίηση (stage specific application) (Oldershaw et al., 2010, Toh et al., 2010). Από την παραπάνω μέθοδο προκύπτουν συγκεκριμένες σειρές προγονικών κυττάρων οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν εκ νέου in vitro αποτελώντας μια ανεξάντλητη πηγή προγονικών και στη συνέχεια πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων. Για παράδειγμα η στρατηγική αυτή εφαρμόστηκε σε ινοβλάστες ποντικών οι οποίοι μετατράπηκαν σε καρδιακά, νευρικά και προγονικά κύτταρα του ενδοδέρματος μετά από παροδική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού (π.χ για 4 ημέρες), σε συνδυασμό με έναν αναστολέα της κινάσης JAK. Η χρήση του αναστολέα απενεργοποιεί το μονοπάτι LIF-STAT3 που μεσολαβείται από την JAK κινάση το οποίο κατά τη φάση του επαναπρογραμματισμού ενεργοποιείται και συντελεί στη διατήρηση της ολοδυναμικότητας. Μετά το στάδιο αυτό που είναι κοινό για όλα τα πατρικά iPSCs, τα επιγενετικά ενεργοποιημένα κύτταρα μπορούν κάτω από την επίδραση αυξητικών

παραγόντων και κυτοκινών όπως του BMP4, FGF4 ή Activin- A, αντίστοιχα να μετατραπούν παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Στον άνθρωπο για παράδειγμα επιτεύχθηκε η μετατροπή ινοβλαστών σε πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα μετά από έκτοπη έκφραση του Oct4 και επώαση με IGFII, bFGF, Flt3L και SCF (Zbabo et al., 2010) (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Απλουστευμένο παράδειγμα διαφοροποίησης iPSCs με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων. Παροδική υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων σε ινοβλάστες οδηγεί στη γρήγορη δημιουργία επιγενετικά ενεργοποιημένων κυττάρων τα οποία είτε μπορούν να παραμείνουν ως iPSCs κάτω από κατάλληλες συνθήκες ενώ παράλληλα με τη βοήθεια μικρών μορίων αναστολέων της ολοδυναμικότητας και στη συνέχεια χορήγηση αυξητικών παραγόντων και διαλυτών κυτοκινών μπορούν να δώσουν προγονικές κυτταρικές σειρές αλλά και σειρές πιο διαφοροποιημένων κυττάρων διαφορετικών από τον αρχικό πληθυσμό (Ma et al., 2013).

Πρόσφατα οι Chen και συν., σε μελέτη τους με ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ESCs και h-iPSCs χρησιμοποίησαν την ουσία SB431542 που είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της TGF- β σηματοδότησης και σε καλλιέργειες 2 διαστάσεων απέδειξαν ότι τόσο τα ESCs όσο και τα iPSCs άμεσα αλλάζουν φαινότυπο (EMT-like) και μετατρέπονται ομοιόμορφα σε κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο (MSCs-like) (Chen et al., 2012).

Όσον αφορά τη διαδικασία χονδρογένεσης από iPSCs εφαρμόζονται δύο μέθοδοι. Στην πρώτη μέθοδο όταν οι καλλιέργειες των iPSCs είναι υψηλής πυκνότητας μετά την απομάκρυνση παραγόντων όπως είναι ο bFGF ευνοείται αυτόματα ο σχηματισμός εμβρυοειδών σωματιδίων (EB). In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι υπό τη μορφή

μικρομάζας τα iPSCs μιμούνται τον σχηματισμό των προχόνδρινων μεσεγχυματικής προέλευσης συμπυκνώσεων που παρατηρούνται κατά την ιστογένεση του αρθρικού χόνδρου (Mello and Tuan, 1999). Ο διαχωρισμός των MSCs-like κυττάρων που προκύπτουν με βάση τα αντιγόνα επιφανείας CD24 και CD105 αφενός μεν εξασφαλίζει ότι τα MSCs δίνουν γένεση σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, αφετέρου όμως είναι ανεπαρκής στην κλινική πράξη (Teramura et al., 2010). Προκειμένου να ξεπεραστεί η δυσκολία διαλογής των MSCs-like κυττάρων που εμφανίζουν χαρακτηριστικά οστεοβλαστών, σε μελέτη τους οι Feng Li και Christopher Niyibizi χρησιμοποιώντας iPSCs από ινοβλάστες ποντικών απέδειξαν ότι μετά τη χορήγηση των αυξητικών παραγόντων TGF- β 1 και β 3 σε συνδυασμό με ρετινοϊκό οξύ διαφοροποιούνται αποτελεσματικά προς κύτταρα που εμφανίζουν χαρακτηριστικά οστεοβλαστών. Μάλιστα όταν τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν πάνω σε κεραμικά ικριώματα και εμφυτεύτηκαν στη συνέχεια σε ποντίκια σχημάτισαν οστό (Feng Li & Christopher Niyibizi, 2012). Επειδή ο TGF- β 1 είναι ασταθής με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής η συνεχής έκφραση του παράγοντα σε σταθερές συγκεντρώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα εξασφαλίζεται με *in vitro* σύστημα γονιδιακής μεταφοράς του παράγοντα με χρήση λεντιϊού (Chen et al., 2011).

Αντίστοιχα, η διαδικασία χονδρογένεσης επάγεται παρουσία all trans-ρετινοϊκού οξέος, TGF- β 3 και BMP-2 (Bilousova et al., 2011). Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφοροποίηση των iPSCs προς χονδροκύτταρα είναι εφικτή χωρίς σχηματισμό εμβρυοειδών σωματιδίων, όταν αυτά καλλιεργούνται πάνω σε τριβλία επικαλυμμένα με ένα λεπτό στρώμα κολλαγόνου τύπου I παρουσία του αναστολέα της ROCK κινάσης, Y-27632 (Liu et al., 2012).

Στη δεύτερη μέθοδο τα κύτταρα αναπτύσσονται πάνω σε μονόστιβο στρώμα υποστηρικτικών κυττάρων π.χ με ώριμα χονδροκύτταρα (co-culture). Το πλεονέκτημα της δεύτερης μεθόδου είναι ότι τα στηρικτικά κύτταρα (feeder cells) εκκρίνουν αυτοκρινείς ή παρακρινείς παράγοντες (αυξητικούς παράγοντες/κυταροκίνες) αλληλεπιδρώντας με τα βλαστοκύτταρα –στόχους χωρίς άμεση επαφή των κυττάρων και ως ένα βαθμό επιτυγχάνεται η δημιουργία περιβάλλοντος που μιμείται τη διαδικασία με την οποία τα μεταμοσχευόμενα iPSCs περιβάλλονται από τα χονδροκύτταρα του φυσιολογικού ιστού *in vivo* (Mo et al., 2009, Aung et al., 2011).

4.2 Κατηγορίες ενήλικων iPSCs που χρησιμοποιούνται για επαναπρογραμματισμό & μέθοδοι επαγόμενης χονδρογένεσης

Όπως προαναφέρθηκε διάφορες κατηγορίες ενήλικων σωματικών κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής για επαναπρογραμματισμό. Ο καλύτερος τύπος κυττάρου όμως για επαγόμενη χονδρογένεση δεν έχει βρεθεί ακόμη διότι η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εξαρτάται από τη μέθοδο που επιλέγεται κάθε φορά ενώ κάθε κυτταρικός τύπος δεν έχει τις ίδιες δυνατότητες διαφοροποίησης. Για παράδειγμα τα κύτταρα του αίματος αν και αποτελούν μια άμεσα προσβάσιμη και μη επεμβατική πηγή κυττάρων για επαναπρογραμματισμό, εντούτοις σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έχει αποδειχθεί ότι μετά τον επαναπρογραμματισμό τους (blood-derived iPSCs) δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν ικανοποιητικά προς οστεοβλάστες σε σύγκριση με τα mESCs ή τους ινοβλάστες ποντικών (fibroblast-derived iPSCs) (Kim et al., 2010). Αντίστοιχα στον άνθρωπο δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κερατινοκύτταρα σε σχέση με τα hESCs (Kim et al., 2011) και συνεπώς δεν μπορούν να αποτελέσουν κατάλληλη πηγή κυττάρων τόσο για ανάπτυξη του δέρματος ή των οστών.

Είναι σαφές ότι η εκτίμηση του καλύτερου κυτταρικού τύπου που επιλέγεται για τη δημιουργία iPSCs και την επαγόμενη χονδρογένεση εξαρτάται από το γονιδιακό προφίλ του κάθε ατόμου-δότη. Αποκλείοντας τον παράγοντα της διαφορετικότητας στο γονιδίωμα μεταξύ των ατόμων και δημιουργώντας από ίδιο δότη κυτταρικές σειρές iPSCs από BMSCs (Bone Marrow Stromal Cells) και DFs (Dermal Fibroblasts) και συγκρίνοντας την ικανότητα διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα των παραγόμενων γενετικά όμοιων κλώνων iPSCs, προκύπτει ότι τα κύτταρα του στρώματος στον μυελό των οστών αν και είναι κύτταρα που έχουν χαμηλό δυναμικό ανακαλλιέργειας, δεν υπολείπονται σε ικανότητα διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα ή οστεοκύτταρα σε σύγκριση με τους ινοβλάστες δέρματος. Μέχρι στιγμής η επικρατέστερη άποψη είναι αυτή που υποστηρίζει ότι ο μεσεγχυματικός φαινότυπος των BMSCs-derived iPSCs πριν τον επαναπρογραμματισμό τους τα καθιστά πιο ικανά να διαφοροποιηθούν σε μεσεγχυματικού τύπου κύτταρα (οστεοκύτταρα/ χονδροκύτταρα). Όσον αφορά το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης συνολικά δεν έχουν βρεθεί διαφορές ωστόσο έχουν παρατηρηθεί κάποιες περιοχές μεθυλίωσης οι οποίες σχετίζονται περισσότερο με την προέλευση τους. Επίσης έχει βρεθεί ότι μεταξύ κλώνων iPSCs ανεξάρτητα από τον κυτταρικό τύπο προέλευσης η ικανότητα διαφοροποίησης τους σε δύο τουλάχιστον διαφορετικούς τύπους μεσεγχυματικών κυττάρων (χονδροκυττάρων/οστεοβλαστών)

διαφέρει. Αυτό σημαίνει ότι επιγενετικά φαινόμενα που επισυμβαίνουν μετά τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων επηρεάζουν την ικανότητα των κυττάρων να διαφοροποιηθούν στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Μέχρι στιγμής έχει δημιουργηθεί ένα σύστημα αξιολόγησης *in silico* για hESCs και μεμονωμένους κλώνους iPSCs στο οποίο για την εκτίμηση του καλύτερου κλώνου για χονδρογένεση συμπεριλαμβάνονται παράμετροι όπως η ηλικία, το φύλο και η κατάσταση υγείας των δοτών. Μελλοντική πρόκληση αποτελεί η συσχέτιση όλων αυτών των παραμέτρων με κλώνους iPSCs που είναι γενετικά όμοιοι (Nasu et al., 2013).

4.2α. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από ινοβλάστες δέρματος

Προκειμένου να προσδιορίσουν τα κριτήρια αποτελεσματικής δημιουργίας αρθρικών χονδροκυττάρων από iPSCs, οι Guzzo και συν., ξεκινώντας από μια πολύ καλά χαρακτηρισμένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων iPSCs από ινοβλάστες δέρματος την (YK26iPSC) (Martins-Taylor et al., 2011), επώασαν παροδικά τα κύτταρα σε θρεπτικό υποστρώμα με μεταβλητές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων (TGF/BMPs) και έλαβαν πληθυσμούς προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων που εμφάνισαν την ικανότητα στη συνέχεια να μετατραπούν σε χονδροκύτταρα περιορίζοντας με τη διαδικασία αυτή τον αριθμό των μη διαφοροποιημένων κυττάρων μέσα στον πρώιμο διαφοροποιημένο κυτταρικό πληθυσμό. Όταν τα iPSCs αρχικά επώαζονται (2-4 ημέρες) σε κυτταρικές καλλιέργειες με μορφή μικρομάζας, χωρίς να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωματίδια, παρουσία του BMP-2, παρουσιάζουν έναν καλύτερο φαινότυπο και πλησιέστερο προς τις προχόνδρινες συμπυκνώσεις που σχηματίζουν τον αρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με τα iPSCs που αντίστοιχα επώαζονται σε καλλιέργειες με τη μορφή pellets. Αργότερα σε επόμενο στάδιο η παρουσία του BMP-2 *in vitro* φαίνεται ότι δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων αλλά ευνοεί περισσότερο την ωρίμανσή τους. Έτσι η σύνθεση κολλαγόνου τύπου IIa1 εμφανίζεται μειωμένη σε αντίθεση με τους δείκτες ωρίμανσης των χονδροκυττάρων όπως είναι ο παράγοντας Runx2 και το κολλαγόνο τύπου X (Guzzo et al., 2013). Βέβαια από την παραπάνω διαδικασία η έκφραση κολλαγόνου τύπου Ia1 που είναι δείκτης σχηματισμού ινώδους αρθρικού χόνδρου, εμφανίζεται αυξημένη. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αφενός ο πληθυσμός των προγονικών MSCs-like iPSCs είναι ετερογενής, αφετέρου δε ο παράγοντας BMP-2 εφόσον χορηγείται σε μεταβλητές συγκεντρώσεις δεν εξασφαλίζει τη δημιουργία ομοιογενών κυτταρικών

πληθυσμών κατάλληλων για την ανάπλαση του χόνδρου (Nakayama and Umeda et al., 2011) και ταυτόχρονα παρουσιάζει πλειοτροπικά χαρακτηριστικά στους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς (Sieber et al., 2009).

Σημαντικό στάδιο της διαδικασίας χονδρογένεσης φαίνεται να αποτελεί ο εμπλουτισμός των προγονικών μεσεγχυματικών χονδροκυττάρων τα οποία θα δώσουν αυστηρά κύτταρα της χονδρογονικής σειράς (chondrolineage progeny) και θα περιορίσουν τον αριθμό των μη διαφοροποιημένων πολυδύναμων κυττάρων. Εκτός από την διαδικασία χειροκίνητης αφαίρεσης των αποφύσεων-μη διαφοροποιημένων MSCs στα εμβρυοειδή σωματίδια (Hwang et al., 2008) και την συν-καλλιέργεια με αυστηρά καθορισμένα στηρικτικά κύτταρα (π.χ OP9-ποντικών) (Barberi et al., 2005) ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας με πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από iPSCs παρουσία του BMP-2 επιτυγχάνεται με μελέτες γονιδιακής έκφρασης σε συνδυασμό με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού (FACs) όπου ο διαχωρισμός των κυττάρων γίνεται με βάση την έκφραση αντιγόνων επιφανείας.

Οι Brian και συν., χρησιμοποιώντας στις μελέτες τους ως μοντέλο, ινοβλάστες από την περιοχή της ουράς ποντικών (tail fibroblast) αφού εισήγαγαν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού σε πρώτη φάση ταξινόμησαν τα κύτταρα με βάση τη μορφολογία τους, την έκφραση επιφανειακών δεικτών και τον σχηματισμό τερατωμάτων. Πάνω στη ανώτερη στοιβάδα κυττάρων που σχηματίστηκε πάνω από τα υποστηρικτικά κύτταρα (feeder cells), τα πιο σφαιρικά κύτταρα οργανώθηκαν σε στήλες παρουσιάζοντας μορφολογία όμοια με τα εμβρυικά. Μετά από ειδικές τεχνικές χρώσης, τα κύτταρα βάφθηκαν θετικά για τους επιφανειακούς δείκτες που εκφράζουν και τα εμβρυονικά κύτταρα, όπως για αλκαλική φωσφατάση, Nanog, Oct4/Pou5f1 & SSEA-1. Μετά από μεταμόσχευση των κυττάρων στους όρχεις και τους νεφρούς ποντικών η ολοδυναμικότητα των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με σχηματισμό τερατωμάτων ενώ με μελέτη του καρυότυπου διαπιστώθηκε έλλειμμα στο χρωμόσωμα 2 καθώς και πλήρης έλλειψη του φυλετικού Y χρωμοσώματος. Στη συνέχεια σε καλλιέργεια με τη μορφή μικρομάζας έγινε προσθήκη για μικρό χρονικό διάστημα του αυξητικού παράγοντα BMP-4 απουσία ορού και τα πιο διαφοροποιημένα κύτταρα διαχωρίστηκαν με το σύστημα GFP (green –fluorescent –protein) με βάση την έκφραση κολλαγόνου τύπου II. Παρατηρήθηκε ότι με βραχύχρονη έκθεση σε BMP-4 δεν σχηματίστηκαν υπερτροφικά χονδροκύτταρα ούτε εμφανίστηκαν σημάδια οστεοποίησης. Έπειτα, τα κύτταρα που εξέφραζαν αυξημένες συγκεντρώσεις κολλαγόνου II ανακαλλιεργήθηκαν αρκετές φορές

παρουσία του παράγοντα bFGF, ενώ παρουσία του TGF-β3 τα κύτταρα σχημάτισαν μικροσφαιρίδια (pellets) που εξέφραζαν υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τύπου II. Το σύστημα απομόνωσης του κυτταρικού πληθυσμού GFP+ μετά από βραχύχρονη έκθεση σε BMP-4, έδωσε μεγαλύτερες καλλιέργειες σε μικροσφαιρίδια και η ΕΘΟ του νέου ιστού παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών. Φάνηκε λοιπόν ότι με τη μέθοδο διαλογής των κυττάρων από τα αρχικά στάδια διαφοροποίησης επιτυγχάνεται η μείωση του αριθμού των μη-διαφοροποιημένων κυττάρων στην καλλιέργεια και έτσι όταν γίνει μεταμόσχευση του νέου ιστού in vivo αποφεύγεται ο σχηματισμός καλοηθών όγκων που προέρχεται από τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Στη συνέχεια οι ερευνητές κατασκεύασαν in vitro μοντέλο με βλάβη στον αρθρικό χόνδρο και ο εν τη γενέσει τεχνητός ιστός από iPSCs παρουσίασε σημάδια ενσωμάτωσης στον ενήλικο ιστό. Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε αντίστοιχη πρόσφατη μελέτη για την ανάπτυξη καρδιακού ιστού των οι Blin και συν, οι οποίοι προχώρησαν σε διαλογή των iPSCs με βάση την έκφραση δεικτών που εκφράζουν τα πρόδρομα καρδιαγγειακά κύτταρα, και διαπίστωσαν ότι ο σχηματισμός τερατωμάτων που συσχετίζονταν με την ύπαρξη αδιαφοροποίητων κυττάρων, περιορίστηκε (Blin et al. 2010).

Όταν η διαδικασία ανακαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε μονόστιβες καλλιέργειες, αυτό είχε επίδραση στον φαινότυπο με συνέπεια να παρατηρηθεί μείωση στη σύνθεση κολλαγόνου τύπου II, ενώ η έκφραση του γονιδίου Acan και του κολλαγόνου τύπου I ήταν αυξημένη. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, όπως άλλωστε συμβαίνει με τα χονδροκύτταρα που απομονώνονται στις αυτόλογες μεταμοσχεύσεις (ACI) τα οποία κάτω από συνθήκες μονόστιβης καλλιέργειας μεταπίπτουν σε φάση αποδιαφοροποίησης.

Επιπλέον όταν τα GFP+ κύτταρα ανακαλλιεργηθούν πάνω από 3 φορές όπως έδειξαν τα πειραματικά αποτελέσματα χάνουν την ικανότητα σχηματισμού ομοιογενών χόνδρινων σφαιριδίων. Πιο συγκεκριμένα σε μικροσφαιρίδια (pellets) που προήλθαν από 2 ανακαλλιέργειες, τα GFP + κύτταρα, συνέθεταν κολλαγόνο μόνο τύπου II και τα κύτταρα δεν εμφάνισαν σημάδια υπερτροφίας, σε αντίθεση με αντίστοιχες καλλιέργειες MSCs που εμφάνισαν αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου τύπου I που είναι δείκτης υπερτροφίας και σχηματισμού ίνωσης και σχετίζεται με αδυναμία επούλωσης κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του χόνδρου μετά από βλάβη.

Επίσης μετά από ειδική χρώση των GFP+ κυττάρων για κολλαγόνο τύπου VI φάνηκε ότι η πρωτεΐνη είναι διάσπαρτη σε όλη την θεμέλια ουσία των κυττάρων του "νέου ιστού", σε αντίθεση με τον φυσιολογικό ενήλικο αρθρικό χόνδρινο ιστό όπου κολλαγόνο τύπου VI εντοπίζεται στην περιφέρεια των χονδροκυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τη θετική χρώση για κολλαγόνο τύπου II & VI και αρνητική για κολλαγόνο τύπου I & X μετά από επώαση των κυττάρων για 21 μέρες, φάνηκε ότι ο νέος ιστός παρουσίαζε χαρακτηριστικά ανώριμου αρθρικού χόνδρου.

Εκτός από τη μορφολογική ομοιότητα, σημαντικό ρόλο για την επιτυχή κατασκευή τεχνητού αρθρικού χόνδρινου ιστού, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ενδογενής μηχανική ικανότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα του ιστού να αντέχουν στην υψηλή φόρτιση, όπως εμφανίζει ο φυσιολογικός ιστός. Είναι γνωστό ότι ο συντελεστής ελαστικότητας σχετίζεται με τη διάταξη των ινών κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών μέσα στην ΕΘΟ. Στον φυσιολογικό ενήλικο ιστό, η επιφανειακή ζώνη του αρθρικού χόνδρου παρουσιάζει χαμηλότερο δείκτη ελαστικότητας και ακαμψία εξαιτίας του υψηλού ποσοστού των κολλαγόνων ινών και των πρωτεογλυκανών, σε σύγκριση με τις άλλες ζώνες. Από τα πειράματα των Brian και συν, τα GFP+ κύτταρα που επιλέχθηκαν εμφάνισαν μεγαλύτερο συντελεστή ελαστικότητας στην κεντρική περιοχή των μικροσφαιριδίων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά διότι αφενός υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η επιτυχής αρχική προεπιλογή των πιο διαφοροποιημένων κυττάρων οδηγεί στον σχηματισμό χονδροκυττάρων τα οποία συνθέτουν συστατικά της ΕΘΟ που διανέμονται σε όλη την έκταση της κατασκευής, και αφετέρου δείχνουν ότι ο τεχνητός ιστός παρουσιάζει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με τον φυσιολογικό ιστό αποτελώντας ένα πολύ καλό μοντέλο *in vitro* για τη μελέτη της βιολογίας του χόνδρου και της μηχανικής του (Brian et al., 2012).

4.2β. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με ΟΑ

Τα κύτταρα του αρθρικού υμένα (Synovial Membrane Cells-SMCs) αποτελούν μια πολύ καλύτερη πηγή κυττάρων με ικανότητα διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα BMSCs, ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη δυνατότητά τους να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις ασθενών για τη θεραπεία της ΟΑ αλλά και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης της αιτιοπαθογένειας της ΟΑ με

πιθανότητα αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανακάλυψη φαρμάκων για την αντιμετώπιση της νόσου αλλά και για την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου στην ΟΑ, προτάθηκε από τους Min-Jeong Kim και συν. Οι ανωτέρω χρησιμοποίησαν ανθρώπινα κύτταρα ινώδη αρθρικού υμένα λαμβάνοντας τα αρθροσκοπικά από την περιοχή της άρθρωσης του γόνατος σε 2 ασθενείς με ΟΑ ηλικίας 71 ετών. Στην προσπάθεια επαναπρογραμματισμού αυτών των κυττάρων οι ανωτέρω ερευνητές εισήγαγαν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού (Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 και TERT). Η εξωγενής έκφραση της TERT βέβαια δεν ήταν αναγκαία για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων απλά προστέθηκε διότι από προηγούμενες μελέτες είχε διαπιστωθεί ότι ο αριθμός, η εξάπλωση και η ικανότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σχετίζεται με την ηλικία. Κατόρθωσαν τόσο σε καλλιέργειες με τη μορφή μικροσφαιριδίων (pellets) όσο και με 3D ικριώματα από πολυκαπρολακτόνη να διαφοροποιήσουν τα iPSCs σε χονδροκύτταρα σε ποσοστό > 80%. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρήγαγαν πρωτεογλυκάνες της ΕΘΟ ενώ μετά από ειδικές τεχνικές χρώσης >50% των χονδροκυττάρων εξέφραζαν δείκτες διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα μεταξύ αυτών τους Sox9, κολλαγόνο τύπου I, II και X. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του mRNA της αγκρεκάνης ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τα hESCs. Όμως από τις 3 κυτταρικές σειρές που εξέτασαν (2 hiPSCs κυτταρικές σειρές και μια κυτταρική σειρά H9-ESC line), οι ανωτέρω διαπίστωσαν σε μία κυτταρική σειρά (hiPSC) υπερτροφικά χονδροκύτταρα με αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου X, υποθέτοντας ότι η ικανότητα διαφοροποίησης των επαγόμενων PSCs προς χονδροκύτταρα σχετίζεται με την κατάσταση της υγείας του δότη (Min-Jeong Kim et al., 2011).

4.2.γ. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από χονδροκύτταρα ασθενών με ΟΑ

Προκειμένου να αξιολογήσουν την ικανότητα χονδρογένεσης μεταξύ επαγόμενων iPSCs από χονδροκύτταρα ασθενών με ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων από υγιείς δότες, και να εκτιμήσουν την αποτελεσματικότητα των δύο μοντέλων επαναπρογραμματισμού, οι Wei και συν., επαναπρογραμμάτισαν τα iPSCs πάνω σε ειδική επιφάνεια (alginate matrix) χρησιμοποιώντας λεντιϊό ως φορέα μεταφοράς του TGF-β1 κατορθώνοντας να πάρουν κύτταρα επαναπρογραμματισμένα iPSCs που δεν διέφεραν με τα hESCs (Wei et al., 2012). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν αυξημένη έκφραση

του αυξητικού παράγοντα VEGF, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του TGF-β1 έχει εκφυλιστική δράση στα OA-επαγόμενα iPSCs. Σε φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση του VEGF είναι αυξημένη στην υπερτροφική επιφάνεια της αυξητικής πλάκας και σχετίζεται με τη διαδικασία της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης κατά την επιμήκη ανάπτυξη του μυοσκελετικού συστήματος. Σε ενήλικο αρθρικό χόνδρο ωστόσο ίδια ποσοστά έκφρασης του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF παρατηρούνται έντονα σε εκφυλιστικές διαταραχές των χονδροκυττάρων όπως στην OA (Pufe et al., 2011). Έτσι αναστέλλοντας την έκφραση του παράγοντα VEGF κατόρθωσαν να επιτύχουν διαφοροποίηση των OC- iPSCs (osteoarthritic chondrocyte-induced pluripotent stem cells). Η έκφραση κολλαγόνου τύπου II, αγκρεκάνης και της ολιγομερούς COMP (cartilage oligomeric matrix protein) αυξήθηκε ενώ μειώθηκε ο δείκτης εκφυλισμού των χονδροκυττάρων VEGF. Με ιστολογική εξέταση παρατηρήθηκε σχηματισμός νέας ΕΘΟ.

Οι ίδιοι στην προσπάθειά τους να διαπιστώσουν αν τα παραπάνω iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα και στη συνέχεια να αφομοιωθούν από τον παρακείμενο ιστό όταν μεταμοσχευθούν στο σημείο της βλάβης *in vivo*, πραγματοποίησαν μια δεύτερη σειρά πειραμάτων και ανέπτυξαν *in vitro* ένα σύστημα συν-καλλιέργειας. Δημιούργησαν μια κυτταρική σειρά iPSCs από χονδροκύτταρα ασθενών με OA και στη συνέχεια τα επώασαν μαζί με φυσιολογικά αρθρικά χονδροκύτταρα. Οι μηχανικές ιδιότητες του νέου ιστού ήταν υποδεέστερες σε σύγκριση με το προηγούμενο μοντέλο καθώς η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για συστατικά της ΕΘΟ στον τεχνητό ιστό ήταν μειωμένη. Όμως δεν ανιχνεύτηκε έκφραση του VEGF, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι ενδογενείς παράγοντες αναστολείς της αγγειογένεσης όπως είναι η metastatin εκφράζεται από τα ώριμα χονδροκύτταρα στο σύστημα συν-καλλιέργειας και αναστέλλει ως παρακρινής παράγοντας την έκφραση του VEGF στα επαγόμενα OC-derived iPSCs (Moses et al., 1999, Liu et al., 2001).

Στην προσπάθειά τους να ξεπεράσουν τις αδυναμίες της κάθε μεθόδου τις εφάρμοσαν σε συνδυασμό. Έτσι αφού κατασκεύασαν iPSCs από χονδροκύτταρα ασθενών με OA παρουσία TGF-β1 με χρήση λεντιού, τα επώασαν σε σύστημα συν-καλλιέργειας με ώριμα αρθρικά χονδροκύτταρα και κατόρθωσαν να τα διαφοροποιήσουν πιο αποτελεσματικά. Μάλιστα προκειμένου να επικυρώσουν την ικανότητα χονδρογένεσης των επαναπρογραμματισμένων χονδροκυττάρων των ασθενών με OA πραγματοποίησαν *in vivo* πειράματα μεταμοσχεύοντας τα παραπάνω κύτταρα υποδόρια στην περιοχή της ράχης σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (nude

mice). Ιστολογικά αλλά και ανοσοιστοχημικά διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου II που αποτελεί και το κυριότερο συστατικό της ΕΘΟ του αρθρικού χόνδρου σε διάστημα 6 εβδομάδων (Wei et al., 2012).

Σε πρόσφατα πειράματά τους ξεπερνώντας την προκατάληψη γύρω από τη δυνατότητα που έχουν τα ενήλικα σωματικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται για επαναπρογραμματισμό και κατευθυνόμενη χονδρογένεση και λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες προσπάθειες χονδρογένεσης οι Borestrom και συν. (2014) έδειξαν για πρώτη φορά ότι τα ώριμα χονδροκύτταρα που λαμβάνονται από δότες σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις (ACI) μπορούν να επαναπρογραμματιστούν αποτελεσματικά με τη χρήση mRNAs, ξεπερνώντας τα προβλήματα εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης που προκαλούν τα συμβατικά ιικά συστήματα όταν αυτά χρησιμοποιούνται ως φορείς των παραγόντων επαναπρογραμματισμού. Επιπλέον μπορούν να διαφοροποιηθούν πιο αποτελεσματικά σε σχέση με ινοβλάστες και στο ίδιο επίπεδο με τους υγιείς δότες χονδροκυττάρων, αποτελώντας μελλοντικά μια πολλά υποσχόμενη ενιαία πηγή κυττάρων ακόμη και σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις (Borestrom et al., 2014).

4.2.δ. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από εμβρυϊκά νευρικά βλαστικά κύτταρα

Σε μελέτη τους οι Medvedev και συν., κατασκεύασαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές iPSCs χρησιμοποιώντας ανθρώπινα εμβρυϊκά νευρικά βλαστικά κύτταρα (FNSCs). Αρχικά επιμόλυναν τα FNSCs με πολυσιστρονικό πλασμιδιακό φορέα που έφερε τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc από ποντίκι και σε δεύτερο χρόνο τα επιμόλυναν με πλασμιδιακό φορέα που έφερε το ανθρώπινο γονίδιο OCT4. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα ανθρώπινα FNS επαναπρογραμματίστηκαν αποτελεσματικά παρά το γεγονός ότι επιμολύνθηκαν από το γονιδίωμα του ποντικού σε ποσοστό 10-15% . Με χρήση βαλπροϊκού οξέος (VPA) και BIX-01294 η απόδοση των κυτταρικών κλώνων iPSCs μάλιστα αυξήθηκε ~7 φορές, ενώ η παροδική έκφραση του γονιδίου OCT4 ήταν επαρκής για τον επαναπρογραμματισμό τους. Οι κυτταρικές σειρές ελέγχθηκαν και βρέθηκε ότι εκφράζουν όλους τους επιφανειακούς δείκτες που χαρακτηρίζουν τα ESCs, ενώ υποβλήθηκαν σε *in vitro* διαφοροποίηση και διαπιστώθηκε ότι μπορούν επιτυχώς να υποβληθούν σε κατευθυνόμενη χονδρογονική διαφοροποίηση και σχηματίζουν λειτουργικό χόνδρινο ιστό (Medvedev et al., 2011). Σε μια προσπάθεια να περιορίσουν τον αριθμό των εξωγενών παραγόντων

επαναπρογραμματισμού οι Kuboth και συν., έδειξαν ότι τα FNSCs μπορούν να επαναπρογραμματιστούν αποτελεσματικά παρουσία των Oct4 και Klf4 δημιουργώντας τα (2F) OK iPRSCs ενώ η ικανότητά τους να σχηματίζουν χονδρογενή συσσωματώματα παρατηρήθηκε όταν αυτά επωάστηκαν παρουσία των παραγόντων TGF- β 1 και BMP-2 (Kuboth et al., 2012).

4.2.ε. Επαγόμενη χονδρογένεση με χρήση iPSCs από μεσεγχυματικά βλαστικά λιποκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του λιπώδη ιστού αποτελούν μια αστείρευτη αντλία κυττάρων για θεραπευτική χρήση. Στον άνθρωπο απαντώνται είτε υποδόρια στο λευκό τμήμα του λιπώδη ιστού είτε στο σπλαχνικό λίπος και απομονώνονται ειδικά μετά από μια σειρά φυγοκεντρήσεων με αυτοματοποιημένες συσκευές λιποαναρρόφησης από το σύνολο των κυττάρων που περιέχονται στο σωματικό λίπος. Είναι πολυδύναμα κύτταρα και μπορούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, μυοκύτταρα και νευρικά κύτταρα. Ειδικότερα με την προσθήκη *in vitro* στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των παραγόντων TGF- β 1, ασκορβικού οξέος και ινσουλίνης τα ADSCs διαφοροποιούνται προς χονδροκύτταρα και *in vivo* τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα εκφράζουν σε σταθερές ποσότητες συστατικά της ΕΘΟ του αρθρικού χόνδρου (Eriksen et al., 2002). Επιπλέον η εφαρμογή τους στη θεραπεία βλαβών σε ιστούς που εμφανίζουν παρόμοια με τον αρθρικό χόνδρο πολύ χαμηλό δυναμικό επούλωσης όπως είναι ο καρδιακός ιστός μετά από ισχαιμική βλάβη έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντική. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρακρινείς παράγοντες που εκκρίνονται από τα μεταμοσχευμένα ADSCs στην περιοχή της βλάβης του καρδιακού μυ ενισχύουν την διαδικασία της αγγειογένεσης, μειώνουν τον ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων στην περιοχή μετά το έμφραγμα και προάγουν την εκβλάστηση νευρώνων στο κατεστραμμένο μυοκάρδιο (Bai et al., 2010, van der Bogt et al., 2009). Σε μελέτη τους οι Danoviz και συν., μετά από μεταμόσχευση ADSCs πάνω σε βιοπολυμερή σε ποντίκια *in vivo*, διαπίστωσαν ότι τα ADSCs βοηθούν στη διατήρηση όλων των μορφομετρικών χαρακτηριστικών των κοιλιών του καρδιακού μυ μετά το έμφραγμα (Danoviz et al., 2010).

Από μελέτες των Qu και οι συν., το 2012 αποδείχθηκε ότι οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού Klf4 και c-Myc εκφράζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα hADSCs σε σχέση με τα hESCs. Μάλιστα, οι παραπάνω χρησιμοποιώντας ως φορέα

των παραγόντων επαναπρογραμματισμού, ένα πολυσυστρονικό πλασμίδιο, χωρίς την παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων (xeno-free feeder layer) κατόρθωσαν να επαναπρογραμματίσουν ανθρώπινα ADSCs. Τα iPSCs από ADSCs εξέφραζαν τους περισσότερους από τους χαρακτηριστικούς δείκτες των ESCs και στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν in vitro σχηματίζοντας εμβρυοειδή σωματίδια αποτελούμενα από κύτταρα των τριών βλαστικών στιβάδων. Μετά από in vivo μεταμόσχευση σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια επιβεβαιώθηκε η πολυδυναμικότητα των επαγόμενων iPSCs με σχηματισμό τερατωμάτων. Με ανάλυση κατά Southern προέκυψε ότι ο πλασμιδιακός φορέας δεν ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των κυττάρων ενώ με ανάλυση καρυοτύπου δεν παρατηρήθηκαν χρωμοσωμιακές αναδιατάξεις (Qu et al., 2012).

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα των παραπάνω μελετών και με δεδομένο ότι τα κύτταρα μπορούν να ληφθούν με απλές μη επεμβατικές μεθόδους τα επαναπρογραμματισμένα MSCs-like iPSCs από κύτταρα του λιπώδη ιστού μπορούν να αποτελέσουν ένα νέο εργαλείο-πηγή κυττάρων για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου.

4.3. Ο ρόλος των iPSCs ως μοντέλων για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων στις αρθροπάθειες

Σήμερα στην κλινική πράξη για την αποκατάσταση βλαβών του αρθρικού χόνδρου η πιο συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η μέθοδος των μικροκαταγμάτων. Επειδή όμως η ενεργοποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών στο υποχόνδριο οστό και η διαφοροποίησή τους προς χονδροκύτταρα είναι μια διαδικασία χρονοβόρα και η αποτελεσματικότητα χονδρογένεσης εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον της ιστικής βλάβης, η μέθοδος των μικροκαταγμάτων εφαρμόζεται σε συνδυασμό με αυτόλογη μεταμόσχευση MSCs στο σημείο της βλάβης η οποία μειώνει σημαντικά τον χρόνο αποκατάστασης. Έντονη ωστόσο είναι η ερευνητική προσπάθεια που γίνεται για την ανεύρεση ουσιών-φαρμάκων η χορήγηση των οποίων μη επεμβατικά ή συνδυαστικά με τις παραπάνω μεθόδους θα μπορούσε να προάγει τις διαδικασίες αυτοανανέωσης και ανάπλασης του χόνδρινου ιστού. Μια τέτοια ουσία που ταυτοποιήθηκε μόλις το 2012 από τους Johnson και συν., είναι η καρτογενίνη η οποία επάγει τη διαφοροποίηση των MSCs προς χονδροκύτταρα, προστατεύει τον χόνδρινο ιστό in vitro και προωθεί την ανάπλαση του σε ποντίκια με οστεοαρθρίτιδα όταν γίνει

απευθείας έγχυση της ουσίας ενδοαρθρικά (Johnson et al., 2012). Επειδή η διαδικασία ταυτοποίησης ανάλογων μορίων είναι δαπανηρή και απαιτεί τη χρήση ζωικών μοντέλων για δοκιμές, οι Yang και οι συν., κατασκεύασαν ένα κυτταρικό μοντέλο hiPSC αναφοράς (hiPSC chondrocyte reporter line) σε 96-well plates με τη βοήθεια του οποίου σε σύντομο χρόνο είναι εφικτή η ταυτόχρονη δοκιμή πολλών διαφορετικών ουσιών-φαρμάκων που δυνητικά μπορούν να επάγουν τη διαδικασία χονδρογένεσης και ανάπτυξης του ιστού χωρίς να υπάρχει ανάγκη ελέγχου της κάθε μιας ουσίας για επαγωγή χονδρογένεσης με συστήματα σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων σε 3D καλλιέργειες (Yang et al., 2012).

4.4 Αξιολόγηση της χρήσης των iPSCs στην ανάπτυξη του χόνδρινου ιστού της τραχείας

Μέχρι στιγμής οι προσπάθειες διαφοροποίησης των MSCs και ES in vitro σε χονδροκύτταρα είναι εφικτή όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων και αναλύσεων μέσω PCR. In vivo όμως όταν τα παραπάνω διαφοροποιημένα κύτταρα μεταμοσχεύονται στους δότες δεν προκύπτει σχηματισμός χόνδρινου ιστού. Η αιτία για την αδυναμία πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η προδιαφοροποίηση που πραγματοποιείται in vitro δεν εξασφαλίζει σταθερό χονδρογενή φαινότυπο in vivo. Ενθαρρυντικά ωστόσο είναι τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών που έχουν δείξει ότι iPSCs από ινοβλάστες ποντικών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα όταν μεταμοσχευθούν απευθείας in vivo πάνω σε 3D-ικριώματα σε πειράματα που έχουν γίνει για τη θεραπεία της φαρυγγοτραχειακής στένωσης με στόχο την ανάπτυξη του τοιχώματος της τραχείας, συνθέτοντας νέο ιστό που προσομοιάζει με χόνδρο (cartilage-like tissue). Μειονέκτημα βέβαια αποτελεί το γεγονός ότι μετεγχειρητικά σε χρονικό διάστημα από 1 έως 4 εβδομάδες, μετά από σύγκριση των παραπάνω μοντέλων, προέκυψε ότι ένας μικρός αριθμός (~30%) από αυτά σχημάτισαν χόνδρινο ιστό αποδεικνύοντας ότι τα αρχικά διαφοροποιημένα iPSCs πιθανόν αποδιαφοροποιούνται ή αποπίπτουν in vivo με τη πάροδο του χρόνου. Σε προηγούμενη μελέτη των ίδιων ερευνητών είχε αποδειχθεί ότι τα iPSCs σχηματίζουν τερατώματα και μάλιστα υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο μέγεθος του σχηματιζόμενου όγκου και των μη διαφοροποιημένων iPSCs, ενώ με την ίδια μελέτη οι ερευνητές επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι η βλάβη στην περιοχή της τραχείας λειτουργεί ως αίτιο που επάγει τη διαφοροποίηση των iPSCs μέσω αυξητικών

παραγόντων (KGF) που εκκρίνονται στο σημείο της ιστικής βλάβης, και τονίζουν την ανάγκη κατασκευής ικτριωμάτων από κατάλληλα υλικά που να ταιριάζουν απόλυτα στο φυσικό μέγεθος του τραύματος, το πάχος και τον όγκο. Μέχρι σήμερα επίσης δεν ήταν εφικτό να διαπιστωθεί εάν και σε ποιο βαθμό ο νέος ιστός πράγματι αποτελεί προϊόν των iPSCs που εμφυτεύονται στο ικρίωμα και αν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ευθύνονται για τον σχηματισμό τερατωμάτων. Με την τεχνολογία όμως των FACs και μέσω της σήμανσης με GFP ή επιφανειακών αντιγόνων όπως είναι ο TRA-1-81 είναι δυνατόν πλέον να ελεγχθεί και να απομονωθεί ο αριθμός των μη διαφοροποιημένων iPSCs πριν την μεταμόσχευση (Imaizumi et al., 2013).

Επίλογος-συμπεράσματα

Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας φαίνεται ότι ο μοναδικός τρόπος για την κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στις ανθρώπινες ασθένειες με τη χρήση των iPSCs γίνεται με τη βοήθεια ζωικών μοντέλων. Δυστυχώς όμως πέρα από τα ηθικά διλήμματα και το οικονομικό κόστος, συχνά πολλά κλινικά ευρήματα που προκύπτουν από τη χρήση τους δεν μπορούν να ερμηνευθούν σωστά καθώς δεν μπορούν να παραλληλιστούν με τον άνθρωπο. Πολύ σημαντική ώθηση στην έρευνα για την ανάπτυξη ιστών έχει δώσει η ανακάλυψη των ESCs καθώς και των MSCs, οι ηθικοί περιορισμοί όμως που προέκυψαν από τη χρήση των πρώτων και τα προβλήματα απομόνωσης ικανού αριθμού MSCs από διάφορους ιστούς-αποθήκες των τελευταίων, έχουν ξεπεραστεί μετά την ανακάλυψη των Yamanaka και των συνεργατών του ότι τα διαφοροποιημένα ενήλικα σωματικά κύτταρα μπορούν κάτω από κατάλληλες εργαστηριακές συνθήκες να επαναφέρουν το βιολογικό τους ρολόι στην εμβρυική τους κατάσταση. Τα iPSCs αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών τόσο για την κατασκευή κυτταρικών μοντέλων που μιμούνται την παθογένεια μιας νόσου και την ανεύρεση φαρμάκων όσο και για την μηχανική των ιστών δηλαδή την σύνθεση με τεχνητό τρόπο ιστών που μπορούν να αναπλάσουν κατεστραμμένα τμήματα μετά από βλάβη.

Σήμερα η κατασκευή προσομοιωτικών κυτταρικών μοντέλων iPSCs, για την παρακολούθηση της πορείας μιας νόσου και την ανάπτυξη των κατεστραμμένων ιστών είτε αυτή οφείλεται καθαρά σε βλάβη του γενετικού υλικού είτε η έναρξη και η εξέλιξή της επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα είναι η ΟΑ ή η ρευματοειδής αρθρίτιδα, χρησιμοποιώντας κύτταρα του ίδιου του ασθενή, είναι εφικτή in

vitro. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι αποφεύγεται ο κίνδυνος ανοσολογικής απόρριψης όταν τα διαφοροποιημένα iPSCs καλούνται in vivo σε ζωικά μοντέλα να επουλώσουν βλάβες ιστών ή οργάνων. Σήμερα παρά τις πολυάριθμες μελέτες in vitro που γίνονται με τη χρήση των iPSCs σε φάση κλινικών δοκιμών βρίσκονται μόνο 2 εκ των οποίων μία αφορά αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων. Όσον αφορά την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου απαιτείται ακόμη αρκετή ερευνητική προσπάθεια για την εφαρμογή τους στην κλινική καθημερινή πρακτική καθώς ακόμη δεν έχουν προσδιοριστεί σαφώς τόσο ο μητρικός κυτταρικός τύπος iPSCs που θα επάγει χονδρογένεση όσο και η ασφαλέστερη μέθοδος επαναπρογραμματισμού που θα διασφαλίσει τη διαφοροποίησή τους προς χονδροκύτταρα χωρίς σχηματισμό τερατωμάτων ή υπερτροφίας στο σημείο της βλάβης του τραυματισμένου ιστού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26: 1276–1284, 2008.

Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2012;3:9.

Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2006). Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods Mol. Biol.* 331, 105–113.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, and Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321: 699–702, 2008

Appleton, C.T., Usmani, S.E., Mort, J.S. and Beier, F. (2010) Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor-alpha induces articular cartilage degradation. *Lab Invest* 90: 20–30.

Aung A, Gupta G, Majid G, Varghese S (2011) Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* **63**: 148-158

Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401:321–326

Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med.* 2005 Jun;2(6):e161

Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1315–1325.

Barry F, Boynton RE, Liu BS, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001; 268:189–200

Batty L, Dance S, Bajaj S, Cole BJ. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes. *ANZ J. Surg.* 2011;81:18–25.

Bian L, Zhai DY, Mauck RL, Burdick JA (2011) Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A* **17**: 1137-1145.

Bilousova, G.; Hyun Jun, D.; King, K.B.; Delanghe, S.; Chick, W.S.; Torchia, E.C.; Chow, K.S.; Klemm, D.J.; Roop, D.R.; Majka, S.M. Osteoblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells form Calcified Structures in Scaffolds both *in vitro* and *in vitro*. *Stem Cells* 2011, 29, 206–216.

Blanchard Ichida JK. J. Lam K. Son EY. Chung JE. Egli D. Loh KM. Carter AC. Di Giorgio FP. Koszka K. Huangfu D. Akutsu H. Liu DR. Rubin LL. Eggan K. A small-molecule inhibitor of Tgf-beta signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009;5:491–503.

Blin G, et al., (2010) A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 120 (4):1125-1139

Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C. and Ratman, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts, *Hum.Reprod.*9, 2110-2117

Boreström C, Simonsson S, Enochson L, Bigdeli N, Brantsing C, Ellerström C, Hyllner J, Lindahl A. Footprint-free human induced pluripotent stem cells from articular cartilage with redifferentiation capacity: a first step toward a clinical-grade cell source. *World J Stem Cells*. 2014 Jan 26;6(1):65-68.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, and Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122: 947–956, 2005

Brennan SL, Cicuttini FM, Pasco JA, Henry MJ, Wang Y, Kotowicz MA, Nicholson GC, Wluka AE. Does an increase in body mass index over 10 years affect knee structure in a population-based cohort study of adult women? *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R139.

Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000;1477:267–283.

Brian O. Diekman, Nicolas Christoforou, Vincent P. Willard, Haosi Sun, Joannah Sanches-Adams, Kam W. Leong and Farshid Guilak, Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells, *PNAS*, 2012;109;49;19172-19177

Briggs R and King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38: 455–463, 1952

Buckwalter J.A, H. J. Mankin, cartilage. Articular, design. tissue, interactions. chondrocyte-matrix, *Instr. Course Lect.* 47;1998:477-486

Buckwalter J.A, H. J. Mankin, cartilage. Articular, degeneration, repair. osteoarthritis, regeneration, *Instr. transplantation, Lect. 4. Course*, 48;7504:1998

Caplan AI, Goldberg VM. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;367 Suppl: S12–S16.

Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, and Jaenisch R. Reprogramming of murine and INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS 1813 human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 157–162, 2009.

Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, Dong L, Wang R, Guo T, Zhao J, Zhang J (2011) Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32: 4793-4805.

Chen YS, Pelekanos RA, Ellis RL, Horne R, Wolvetang EJ, Fisk NM. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Feb;1(2):83-95.

Chung C, J. A. Burdick, cartilage. *Engineering, Adv. tissue, Deliv. Drug*, 6. Rev, 2008:243-262

Chun Y, Byun G, Lee B, Induced pluripotent stem cells and personalized medicine:current progress and future perspectives, *Anat Cell Biol*. 2011 Dec;44(4) 245-255

Csaba Matta , Roza Zakany Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair *Frontiers in Bioscience* S5, 305-324, January 1, 2013

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309:1369-1373

Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One*. 2010;5:e12077.

Davidson D, A. Blanc, D. Filion, et al.Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol. Chem*. 2005 27;280(21)

DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development.*Osteoarthritis Cartilage* 8: 309-334

De Mara CS, Duarte AS, Sartori-Cintra AR, Luzo AC, Saad ST, Coimbra IB. chondrogenesis from umbilical cord blood cells stimulated with BMP-2 and BMP-6. *Rheumatology international*. 2012

Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittinger M, Lindahl A (2009) Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use inmatrix-associated autologous chondrocyte transplantation *Arthritis Res Ther* 11: R133.

Desponte C, Ding S. 2010. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol* 636: 207–218.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, and Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218– 1221, 2008.

Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, and Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277–280, 2009.

Engelhardt M, Finke J. Does telomere shortening count? *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):888-90.

Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:763–769.

Esteban MA, Wang T, Qin H, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6:71-79

Fosang AJ, Beier F. Emerging frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2011;25:751–766.

Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*. 1997;79(5):831–836.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2): 83–92.

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1980;62(1):79–89.

Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M (2011) Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *NatRev Mol Cell Biol* **12**: 36-47.

Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boue S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, and Izpisua Belmonte JC. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5: 353–357, 2009.

Goepfert C, Slobodianski A, Schilling AF, Adamietz P, Portner R (2010) Cartilage engineering from mesenchymal stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **123**: 163-200.

Goldring M.B., Tsuchimochi K., Ijiri K. (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33–44

Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2009;11:224

Goldring MB, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur. Cell Mater.* 2011;21:202–220.

Gonzalez F, Monasterio M, Tiscornia G, Pulidoa NM, Vassenaa R, Moreraa LB. Generation of mouse induces pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8918–22.

Grassel Susanne, Nazish Ahmed¹ Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation *Frontiers in Bioscience* 2007;12: 4946-4956

Greene, G.W., Banquy, X., Lee, D.W., Lowrey, D.D., Yu, J. and Israelachvili, J.N. (2011) Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5255–5259

Guo X, Wang C, Duan C, et al. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng.* 2004;10(11–12):1830–1840.

Guzzo RM, Gibson J, Xu RH, Lee FY, Drissi H. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cellular Biochem* 2013; 114(2): 480-90.

Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Scholer HR, and Martin U. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5: 434–441, 2009

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6:861–870.

Hardingham T.E (2004) Articular Cartilage. In: *Oxford Textbook of Rheumatology*, pp 325-334 (ed.M.P.Isenberg), Oxford:Oxford University Press

Hardingham TE, Oldershaw RA, Tew SR. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J. Anat.* 2006;209:469–480.

Hardingham T.E (2010), Fell-Muir Lecture:cartilage 2010-the known unknowns. *Int.J.Exp.Pathol.* 91, 203-209

Hattori K, Ohgushi H (2009) [Progress of research in osteoarthritis. Tissue engineering therapy for osteoarthritis]. *Clin Calcium* **19**: 1621-1628.

Hayashi Yohei, Techuan Chan, Masaki Warashina, Masakazu Fukuda, Takashi Ariizumi, Koji Okabayashi, Naoya Takayama, Makoto Otsu, Koji Eto, Miho Kusuda Furue, Tatsuo Michiue, Kiyoshi Ohnuma, Hiromitsu Nakauchi, and Makoto Asashima, Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions PLoS One. 2010; 5(11): e14099.

Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1587–1595.

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, and Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by smallmolecule compounds. *Nat Biotechnol* 26: 795–797, 2008

Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78(5):721–733.

Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(6):432–463

Hwang NS, Kim MS, Sampattavanich S, Baek JH, Zhang Z, Elisseeff J. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):284-91.

Indrawattana, N.; Chen, G.; Tadokoro, M.; Shann, L.H.; Ohgushi, H.; Tateishi, T.; Tanaka, J.; Bunyaratvej, A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 320, 914-919.

Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G (2006) Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng* **12**: 3265-3283.

Imaizumi M, Nomoto Y, Sato Y, Sugino T, Miyake M, Wada I, Nakamura T, Omori K, Evaluation of the use of induced pluripotent stem cells for the regeneration of tracheal cartilage, *Cell Transplant* 2013;22(2):341-53

Isern J, Martín-Antonio B, Ghazanfari R, Martín AM, López JA, del Toro R, Sánchez-Aguilera A, Arranz L, Martín-Pérez D, Suárez-Lledó M, Marín P, Van Pel M, Fibbe WE, Vázquez J, Scheduling S, Urbano-Ispizúa Á, Méndez-Ferrer S. Self-renewing human bone marrow mesospheres promote hematopoietic stem cell expansion. *Cell Rep.* 2013 May 30;3(5):1714-24.

Ito S, et al. Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells. *Biomaterials.* 2012;33:5278–5286.

Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009;17(6):561–577.

Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83A(1):53–64.

Jackson WM, Lozito TP, Djouad F, Kuhn NZ, Nest LJ, Tuan RS, et al. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. *J. Cell Mol. Med*. 2010;15:2377.

Jones EA, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1731–1740.

Jones B, Pei M. Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2012 doi: 10.1089/ten.teb.2012.0002.

Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*. 2012 May 11;336(6082):717–21.

Kandel RA, Gryn timer M, Pilliar R, et al. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model. *Biomaterials*. 2006;27(22):4120–4131.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, and Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458:771–775, 2009

Kang, E.H., Lee, Y.J., Kim, T.K., Chang, C.B., Chung, J.H., Shin, K. *et al.* (2010) Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther* 12: R231.

Kharkar Prathamesh M., Kristi L. Kiick and April M. Kloxin Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments *Chem. Soc. Rev.*, 2013,42, 7335-7372

Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone*. 2005;36:758–769.

Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, and Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460: 1140–1144, 2009.

Khan WS, Malik AA, Hardingham TE. Stem cell applications and tissue engineering approaches in surgical practice. *J. Perioper. Pract*. 2009;19:130–135.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, and Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472–476, 2009.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, and Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290, 2010.

Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, et al. (2011) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 1117–1119 [

Kim MJ, Son MJ, Son MY, Seol B, Kim J, Park J, Kim JH, Kim YH, Park SA, Lee CH, Lee KS, Han YM, Chang JS, Cho YS. Generation of human induced pluripotent stem cells from osteoarthritis patient-derived synovial cells. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3010-21.

Kinder S. J., Tsang T. E., Quinlan G. A., Hadjantonakis A. K., Nagy A., Tam P. P.(1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126, 4691-4701.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres *Nat Protoc.* 2007;2(8):1963-72.

Kloosterman WP and Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*11: 441–450, 2006

Koelling S, Miosge N. Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Nov;9(11):1399-405

Koskinen, A., Vuolteenaho, K., Nieminen, R., Moilanen, T. and Moilanen, E. (2011) Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol* 29: 57–64.

Krawetz RJ, Li X, and Rancourt DE. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays* 31: 336–343, 2009

Kuboth S, Kramer J, Rohwedel J. Chondrogenic differentiation *in vitro* of murine two-factor induced pluripotent stem cells is comparable to murine embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 2012; 196(6): 481-9.

Kunisaki Yuya & Paul Frenette, The complex cellular and molecular make up of the HSC niche in the bone marrow, *Nature Medicine* (2012); 18, 864-865

Lawson K. A., Meneses J. J., Pedersen R. A.(1991). *Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. Development* 113, 891-911.

Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, and Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patientspecific iPSCs. *Nature* 461: 402–406, 2009

Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011a;1240:32–37.

Leong DJ, Li YH, Gu XI, et al. Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2. *FASEB J.* 2011b;25:182–191.

Li Feng and Christopher Niyibizi, Cells derived from murine induced pluripotent stem cells (iPSC) by treatment with members of TGF-beta family give rise to osteoblasts differentiation and form bone in vivo, *Cell Biology* 2012, 13:35

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, and Ding S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4: 16–19, 2009

Li W, Ding S. 2010. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 31: 36–45

Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2008 Dec 4;3(6):587-90.

Liu N, Lapceovich RK, Underhill CB, Han Z, Gao F, Swartz G, Plum SM, Zhang L, Green SJ (2001) Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res* 61: 1022-1028

Liu, Y.; Goldberg, A.J.; Dennis, J.E.; Gronowicz, G.A.; Kuhn, L.T. One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One* **2012**, 7, e33225

Lohmander LS, Roos EM (2007) Clinical update:treating osteoarthritis. *Lancet* **370**: 2082-2084.

Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cell with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8912-8917

Ma Tianhua, Min Xie, Timothy Laurent, Sheng Ding, Progress in the Reprogramming of Somatic Cells, *Circ.Res.*, 2013; 112:562-574

Mackie, E.J., Thesleff, I., Chiquet-Ehrismann, R. 1987. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* **105**:2569-2579.

Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;3:340–5

Marson A Foereman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, Jaenisch R, Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency, *Cell Stem Cell.* 2008;3:132-135
Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM, Compton T, Crandall L, Montgomery KD, Lalande M, Xu RH. 2011. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29:488–491.

Medvedev SP, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, *et al.* Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. *Stem Cells Dev* 2011; 20(6): 1099-112.

Mello MA, Tuan RS. 1999. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: An in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:262–269.

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 2008 Aug 7;454(7205):766-70

Melton C, Judson RL, and Bluelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463: 621–626, 2010

Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.

Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, Gauthier O, Geffroy O, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C (2011) The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant*, in press.

Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, and Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454: 49–55, 2008.

Min-Jeong Kim, Myung Jin Son, Mi-Young Son, Binna Seol, Janghwan Kim, Jongjin Park, Jung Hwa Kim, Yong-Hoon Kim, Su A Park, Chul-Ho Lee, Kang-Sik Lee, Yong-Mahn Han, Jae-Suk Chang, and Yee Sook Cho, Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells From Osteoarthritis Patient-Derived Synovial Cells *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 10, October 2011, pp 3010–3021

Mitsuyoshi Imaizumi, Yukio Nomoto, Yuka Sato, Takashi Sugino, Masao Miyake, Ikuo Wada, Tatsuo Nakamura, and Koichi Omori Evaluation of the Use of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for the Regeneration of Tracheal Cartilage *Cell Transplantation*, Vol. 22, pp. 341–353, 2013

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30:804–810.

Mo XT, Guo SC, Xie HQ, Deng L, Zhi W, Xiang Z, Li XQ, Yang ZM (2009) Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone* **45**: 42–51.

Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R (1999) Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2645-2650

Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells*. 2007;25:2786–2796.

Nancy S. Landínez-Parra , Diego A. Garzón-Alvarado and Juan Carlos Vanegas-Acosta Mechanical Behavior of Articular Cartilage, Engineering, Biochemical Enineering, Injury and Skeletal biomechanics Chapter 11, Tarun Goswami,2012

Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, and Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation- deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14152–14157, 2010.

Nakayama N, Umeda K. 2011. From Pluripotent stem cells to lineage-specific chondrocytes: Essential signaling and cellular intermediates. In: Atwood C, editor. Embryonic stem cells: The hormonal regulation of pluripotency and embryogenesis. Manhattan, New York: InTech.

Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K, Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS One*. 2013;8(1):e53771

Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134: 635–646, 2007

Oberlender, S.A., Tuan, R.S. 1994. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*. **120**:177-187.

O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(12):1795–1812.

Oldershaw RA, Hentze H, Rust WL, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat. Biotechnol.* 2010a;28:1187–1194.

Oldershaw RA, Baxter M, Lowe M, et al. A chemically-defined protocol for generating chondrocytes from human embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 2010b.

Oldershaw Rachel, Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future, *Int.J.Path* (2012), 93, 389-400

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, and Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949–953, 2008

Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2005;75:237–248.

Paget J. The classics. II. Healing of cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1969;64:7–8.

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 1):5–10

Pera MF & Patrick P.L.Tam, Extrinsic signals that affect self-renewal, differentiation and viability of human ES cells. *Nature*, 2010; 465, 713-720

POOLE C.A Department of Anatomy, Faculty of Medicine and Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand Articular cartilage chondrons: form, function and failure *J. Anat.* (1997) 191 pp. 1-13.

Pufe T, Petersen WJ, Miosge N, Goldring MB, MentleinR, Varoga DJ, Tillmann BN (2004) Endostatin/collagen XVIII – an inhibitor of angiogenesis – is expressed incartilage and fibrocartilage. *Matrix Biol* **23**: 267-276.

Qu X, Liu T, Song K, Li X, Ge D. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions. *PLoS One.* 2012;7(10):e48161

Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, Gonzalez F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surralles J, Bueren J, and Izpisua Belmonte JC. Diseasecorrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460: 53–59, 2009

Redinger CF, Levine SP, Blotzer MJ, Majewski MP. Evaluation of an occupational health and safety management system performance measurement tool-II: scoring methods and field study sites. *AIHA J (Fairfax, Va).* 2002 Jan-Feb;63(1):34-40.

Redinger CF, Levine SP, Blotzer MJ, Majewski MP. Evaluation of an occupational health and safety management system performance measurement tool-III: measurement of initiation elements. *AIHA J* (Fairfax, Va). 2002 Jan-Feb;63(1):41-6

Rosa SC, Rufino AT, Judas FM, Tenreiro CM, Lopes MC, Mendes AF. Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 2011;112:2813–2824.

Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Péquignot E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* 1998 Jul 15;12(14):2108-13.

Sakaguchi, Y.; Sekiya, I.; Yagishita, K.; Muneta, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis. Rheum.* 2005, 52, 2521-2529

Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, Osaki M, Shindo H. Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold. *Cells Tissues Organs.* 2006;183(2):55-61

Santos F and Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 127: 643–651, 2004.

Schofield, R.(1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the hematopoietic stem cell. *Blood Cells* 4,7-25

Schrobbach K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res.* 2012a;347:649–663.

Schrobbach K, Malda J, Crawford RW, Upton Z, Leavesley DI, Klein TJ. Effects of oxygen on zonal marker expression in human articular chondrocytes. *Tissue Eng. Part A.* 2012b;18:920–933.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, and Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128: 735–745, 2007.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532–553

Shi Y, Do JT, Despons C, Hahm HS, Scholer HR, and Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2: 525–528, 2008

Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:343–355.

Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, and Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 6: e253, 2008.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, and Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136: 964–977, 2009.

Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, and Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27: 543–549, 2009.

Stadtfeld M, Brennand K, and Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 18: 890–894, 2008.

Standfeld Matthias and Kornal Hochedlinger, Induced pluripotency: History, mechanisms and applications, *Genes & Development*, 2010 24:2239-2263
Stock JK, Giadrossi S, Casanova M, Brookes E, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N, Fisher AG, and Pombo A. Ring1- mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol* 9: 1428–1435, 2007

Sun HB. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010;1211:37–50.

Swingler, T.E., Wheeler, G., Carmont, V., Elliott, H.R., Barter, M.J., Abu-Elmagd, M. *et al.* (2011) The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 5 December

Szabo E, Rampalli S, Risuepo RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig- Comyn A, Levadoux-Martin M, Bhatia M. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010;468:521–526.

Szabłowska-Gadomska I, Górka A, Małcki M. Induced pluripotent stem cells (iPSc) for gene therapy. *Med Wieku Rozwoj*. 2013 Jul-Sep;17(3):191-5. Review

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001;11:1553-1558

Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;331:31–36.

Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676, 2006.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872, 2007.

Tuan RS (2004) Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. Clin Orthop Relat Res **427**: S105-117.

Taylor Ahmed N., Wunder DW J, Nagy A, Gross AE, Kandel RA (2010) Passaged human chondrocytes accumulate extracellular matrix when induced by bovine chondrocytes. J Tissue Eng Regen Med **4**: 233-241.

Teramura, T.; Onodera, Y.; Mihara, T.; Hosoi, Y.; Hamanishi, C.; Fukuda, K. Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse-induced pluripotent stem cells. *Cell. Reprogram.* **2010**, *12*, 249–261.

Tew SR, Hardingham TE. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. J. Biol. Chem. 2006;281:39471–39479.

Tew SR, Peffers MJ, McKay TR, et al. Hyperosmolarity regulates SOX9 mRNA posttranscriptionally in human articular chondrocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009;297:C898–C906.

Timmins NE, Kiel M, Günther M, et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. Biotechnol. Bioeng. 2012;109:1817–1826.

Toh WS, Lee EH, Guo XM, et al. Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. Biomaterials. 2010;31:6968–6980.

Urbano-Ispizua, A., Rozman, C., Pimentel, P., Solano, C., de la Rubia, J., Brunet, S., Pe´ rez-Oteiza, J., Ferra´ , C., Zuazu, J., Caballero, D., et al.; Spanish Group for Allogeneic Peripheral Blood Transplantation. (2001). The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA identical siblings. Blood 97, 383–387

Utikal J, Maherali N, Kulalert W, and Hochedlinger K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. J Cell Sci 122: 3502–3510, 2009

van der Bogt KE, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. Transplantation. 2009;87:642–652

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009;324:1029-1033

Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J. et al. (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. J Biol Chem 275: 39027–39031

- Vinatier C, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, D. Noel, engineering. a. Cartilage, combination. crucial, cells. of, biomaterials, biofactors, Trends Biotechnol. 2009;27:307-314
- Viswanathan SR, Daley GQ, and Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. Science 320: 97–100, 2008
- Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, and Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. Cell Res 19: 1120–1123, 2009.
- Warren L., P. D. Manos, T. Ahfeldt et al., “Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA,” Cell Stem Cell, vol. 7, no. 5, pp. 618–630, 2010
- Wei Yiyong, Wen Zeng, Rong Wan, Jun Wang, Qi Zhou, Shijing Qiu and Shree Ram Singh, Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix, European Cells and Materials, 2012;23,p1-12
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, and Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease. Proc Natl Acad Sci US A 105: 5856–5861, 2008
- Widelitz, R.B., Jiang, T.X., Murray, B.A., Chuong, C.M. 1993. Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* **156**:399-411.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810–813, 1997
- Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions Bull World Health Organ. 2003;81(9):646-56. Epub 2003 Nov 14.
- Woong Ji and Youn-sup Yoon, induced pluripotent Stem Cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming, Antioxidants & Redox Signalling, Vol.15, 7, p.1799-1813
- Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2007;1:39–49.
- Yang SL, Harnish E, Leeuw T, *et al.* Compound screening platform using human induced pluripotent stem cells to identify small molecules that promote chondrogenesis. Protein Cell 2012; 3(12): 934-42
- Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang YY, Dang CV, Spivak JL, Moliterno AR, and Cheng L. Human induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. Blood 114: 5473–5480, 2009.

Yoshida Y, Takahashi K, Okita k, Ichisaka T, Yamanaka S, Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 2009;5:651-655

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, and Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131: 1109–1123, 2007

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, and Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920, 2007.

Zhang, Z., Xing, X., Hensley, G., Chang, L.W., Liao, W., Abu-Amer, Y. *et al.* (2010) Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. *Arthritis Rheum* 62: 1993–2003.

Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 Aug;26(3):355-69.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, and Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381–384, 2009

Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, Ding S, Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds, *Cell Stem Cell*. 2010;7:651-655

Πηγές από διαδίκτυο:

1. http://www.elire.gr/info_det.php?di=17
2. <http://dancehealthier.com/2012/04/25/an-educational-look- /inside-the-body-cartilage/> Marieb, Elaine, N., & Mitchell, Susan, J. Human Anatomy & Physiology Laboratory Manual: Ninth Edition. Pearson Education, Inc. 2011.
3. <http://www.intechopen.com/books/injury-and-skeletal-biomechanics/-mechanical-behavior-of-articular-cartilage> Sopena-Juncosa et al., 2000
4. <http://intrad187s-f12-grosovsky.wikispaces.umb.edu/Group+1+Stem+Cells>
5. <http://www.stemrx.in/stemcells.html>
6. www.bio.davinson.edu/html
7. S.L. Carney, H. Muir, The structure and function of cartilage proteoglycans, *Physiol. Rev.* 68 (1988) 858–910.