



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ο ρόλος του *miR-21* στην εκφυλιστική αρθρίτιδα»

ΚΥΡΙΑΚΑΚΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΤΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΜΕΛΟΣ

ΜΠΑΛΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΕΔΙΠ, ΜΕΛΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

MASTER’S THESIS
«The role of miR-21-5p in osteoarthritis»

KYRIAKAKISTAVROULA
Biochemist-Biotechnologist

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παπαθανασίου για την αμέριστη καθοδήγηση, και για την πίστη της σε μένα,

Την κ. Τσέζου, Ομότιμη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής και τον κ.Μπαλή, ΕΔΙΠ, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή,

Την Αλίκη Παπαγεωργίου για την βοήθεια και την υπομονή της,

Τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής για τη δημιουργία ενός ζεστού και ευχάριστου κλίματος εργασίας,

Τέλος ευχαριστώ την Αναστασία, τον Βασίλη και τον Σωτήρη για την αγάπη τους, και τη Μαμά και τον Μπαμπά μου, που ό,τι κι αν κάνω είναι περήφανοι για μένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μία εκφυλιστική πάθηση των αρθρώσεων κατά την παθοφυσιολογία της οποίας παρατηρείται η αλλοίωση του χόνδρου της άρθρωσης λόγω αποδόμησης της εξωκυτταρικής ουσίας, περαιτέρω διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων προς υπερτροφικά κύτταρα και τελικά επαγωγής του κυτταρικού θανάτου αυτών. Η ΟΑ χαρακτηρίζεται ως πολυπαραγοντικό νόσημα, με παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση της να είναι γενετικοί, επιγενετικοί, ηλικιακοί, μεταβολικοί, ενώ επίσης η ύπαρξη ιστορικού τραυματισμών και ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της νόσου. Η ΟΑ αφορά πληθώρα διαφορετικών αρθρώσεων του σώματος, με συχνότερα επηρεαζόμενες τις αρθρώσεις των γονάτων και στη συνέχεια των αστραγάλων και του ισχίου. Η ΟΑ αποτελεί την κύρια αιτία αναπηρίας παγκοσμίως. Για το λόγο αυτό, η εύρεση μίας αποτελεσματικής θεραπείας κρίζει ύψιστης αναγκαιότητας. Προκειμένου να ανακαλυφθούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι και τελικά αποτελεσματικότερες θεραπευτικές επεμβάσεις για τη συγκεκριμένη νόσο, η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει την προσοχή της πέρα από το επίπεδο της γενετικής, σε αυτό της επιγενετικής και κυρίως στη δράση των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs).

Μεγάλος αριθμός μελετών της τελευταίας δεκαετίας έχουν αναδείξει μια πληθώρα miRNAs να παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στους οστεοαρθριτικούς ιστούς, μεταξύ αυτών και το miR-21-5p. Το miR-21-5p έχει αποτελέσει αντικείμενο πληθώρας ερευνών εξαιτίας του σημαντικού ρόλου που φαίνεται να παίζει στην ανάπτυξη διαφορετικών τύπων καρκίνου, καθώς και της συσχέτισης του με ασθένειες χρόνιας φλεγμονής όπως είναι η ΟΑ. Στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miR-21-5p στην αιτιοπαθογένεια της εκφυλιστικής αρθρίτιδας. Για την επίτευξη του στόχου πραγματοποιήθηκαν τόσο *in vitro* πειραματικές διαδικασίες όσο και αναλύσεις με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p ήταν σημαντικά αυξημένα στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, αναδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή του στους μηχανισμούς αιτιοπαθογένειας της νόσου μέσω των γονιδίων που μπορεί να ρυθμίζει επιγενετικά. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας και σηματοδοτικών μονοπατιών ανέδειξε τη συμμετοχή των γονιδίων-στόχων σε διεργασίες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης του αρθρικού χόνδρου και της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Με τις διεργασίες αυτές σχετίστηκαν τρία συγκεκριμένα γονίδια το *SOX5*, *SOX6* και *GDF5*. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p στα ΟΑ χονδροκύτταρα με χρήση κατάλληλου αναστολέα, επέφερε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω

γονιδίων και παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης των χονδροκυττάρων, προτείνοντας τη συμμετοχή του miR-21-5p στη διατήρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των χονδροκυττάρων μέσω της επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων *SOX5*, *SOX6* και *GDF5*.

Λέξεις-κλειδιά: Οστεοαρθρίδα (OA), μικρά μη κωδικά RNAs (miRNAs), επιγενετική ρύθμιση, *miR-21-5p*

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease in which the joint cartilage is damaged due to the breakdown of the extracellular matrix, further differentiation of chondrocytes into hypertrophic cells, and ultimately induction of cell death. OA is characterized as a multifactorial disease, with contributing factors being genetic, epigenetic, age-related, and metabolic. Joint injury and increased body mass index also contribute to the pathophysiology of the disease. OA can affect a variety of joints with the knees being the most commonly affected, followed by the ankles and hips.

OA is the main cause of disability in the world. Therefore, it's crucial to find an effective treatment. In recent years, scientists have been looking beyond genetics to epigenetics, and in particular to the function of small non-coding RNA molecules (miRNAs) to find new therapeutic strategies for the disease.

A large number of studies over the last decade have highlighted a plethora of miRNAs that exhibit differential expression in osteoarthritic tissues, including miR-21-5p. miR-21-5p plays important role in the development of different types of cancer, and its function has been associated with chronic inflammatory diseases such as OA. The aim of this thesis was to investigate the role of miR-21-5p in the pathogenesis of OA. To achieve this goal, both *in vitro* experimental procedures and analyses using bioinformatics tools were performed.

Our results showed that miR-21-5p expression levels were significantly increased in osteoarthritic chondrocytes compared to normal, highlighting its possible involvement in the disease pathogenesis mechanisms through the genes it may epigenetically regulate. Enrichment analysis revealed the involvement of target genes in processes related to articular cartilage growth and chondrocyte differentiation. Three specific genes, *SOX5*, *SOX6*, and *GDF5*, were associated with these processes. The reduction of miR-21-5p expression levels in OA chondrocytes resulted in an increase in the expression levels of the above genes and chondrocyte cell survival, suggesting the involvement of miR-21-5p in maintaining the proliferative capacity of chondrocytes through epigenetic regulation of *SOX5*, *SOX6*, and *GDF5* gene expression.

Key words: *osteoarthritis(OA), miRNAs, epigenetic regulation, miR-21-5p*

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	9
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.1.2. Παράγοντες εμφάνισης	10
1.1.3. Θεραπευτικές προσεγγίσεις	11
1.1.4. Βιοδείκτες στην ΟΑ	12
1.2. Ανάπτυξη & Μορφολογία του χόνδρινου ιστού.....	12
1.2.1. Χονδρογένεση.....	12
1.2.2. Ενδοχονδριακή Οστεοποίηση.....	13
1.2.3. Φυσιολογική μορφολογία χόνδρου.....	14
1.2.4. Παθολογική μορφολογία χόνδρου στην ΟΑ.....	16
1.3..Επιγενετική τροποποίηση στην ΟΑ.....	18
1.3.1MicroRNAs.....	18
1.3.2. Μονοπάτι βιογένεσης των microRNAs.....	18
1.3.3. Ο ρυθμιστικός ρόλος των microRNAs στην ΟΑ.....	19
1.3.4 miR-21-5p.....	22
1.3.5. Ο ρόλος του miR-21-5p στην ΟΑ.....	22
1.4.Σκοπός εργασίας.....	23
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	23
2.1. Δείγματα αρθρικού χόνδρου.....	24
2.2. Απόψυξη (Thawing) Max&Mean χονδροκυττάρων.....	24
2.3.Δημιουργία κυτταροκαλλιιεργειών χονδροκυττάρων.....	25
2.4.Ανακαλλιέργεια (Splitting).....	25
2.5..Απομόνωση RNA.....	26
2.6.Σύνθεση stemloopcDNA για το miR-21-5p.....	27
2.7.Real-Time PCR για το miR-21-5p.....	28
2.8.Διαμόλυνση χονδροκυττάρων με μόριο αναστολέα του miR-21-5p.....	29

2.9.Σύνθεση cDNA με random primers.....	30
2.10.RT-PCR για τα γονίδια-στόχους SOX5, SOX6 και GDF5.....	31
2.11. Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας με Resazurin.....	33
2.12. Ανάλυση αποτελεσμάτων RealTimePCR.....	34
2.13. Βιοπληροφορική Ανάλυση γονιδίων-στόχων του miR-21-5p.....	34
2.14. Στατιστική ανάλυση.....	34
 3. Αποτελέσματα	
3.1. Έκφραση του miR-21-5p σε min&maxOA χονδροκύτταρα.....	35
3.2.Προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p με εργαλεία βιοπληροφορική.....	35
3.3.Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GOenrichmentanalysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p.....	37
3.4.Ανάλυση δικτύου αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (PPInetwork) των γονιδίων- στόχων του miR-21-5p.....	38
3.5.Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων SOX5,SOX6 και GDF5 μετά από χορήγηση αναστολέα για το miR-21-5p σε κυτταροκαλλιέργειες MaxOA χονδροκυττάρων.....	40
3.6. Αποτελέσματα Δοκιμασίας κυτταρικής βιωσιμότητας με Resazurin.....	42
 4.Συζήτηση.....	42
 5.Βιβλιογραφία.....	49

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά της Οστεοαρθρίτιδας

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα ή Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) κατηγοριοποιείται ως μία ασθένεια των αρθρώσεων που προκαλεί τον εκφυλισμό του αρθρικού ιστού εξαιτίας της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και της απόπτωσης των χονδροκυττάρων (Neogi et al., 2025). Η ΟΑ αποτελεί την πιο συνήθη μορφή εκφυλιστικής νόσου των αρθρώσεων ξεπερνώντας σε μεγάλο βαθμό τη συχνότητα εμφάνισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας στον πληθυσμό, ενώ αποτελεί την κύρια αιτία αναπηρίας σε παγκόσμιο επίπεδο (Neogi et al., 2025). Ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας έχουν αναδειχθεί γενετικοί, μεταβολικοί και επιγενετικοί παράγοντες (Di Nicola et al., 2020; Guilak et al., 2018; Kumavat et al., 2021; Goldring & Goldring, 2015; Dubey et al., 2018; Zhuo et al., 2012), η ηλικία του ατόμου, το αυξημένο σωματικό βάρος αλλά και η επαναλαμβανόμενη άρση αυξημένου φορτίου σε συνδυασμό με το ιστορικό ύπαρξης τραυματισμών (Kacprzak et al., 2025; Di Nicola et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της φλεγμονής στην ΟΑ κάτι που στην αρχή της μελέτης της αγνοούνταν από την επιστημονική κοινότητα, καθώς μόρια-μεσολαβητές του ανοσοποιητικού (Kumavat et al., 2021; Neogi et al., 2025), της έμφυτης ανοσίας (Guilak et al., 2018), αλλά και η χαμηλού βαθμού φλεγμονή που επικρατεί στον οργανισμό εξαιτίας του γήρατος (inflammaging) (Neogi et al., 2025; Dubey et al., 2018) έχουν αποδειχτεί πως συμβάλλουν στην εξέλιξη του οστεοαρθρικού φαινοτύπου.

Ο καλύτερα μελετημένος ιστός στην περίπτωση της ΟΑ είναι ο χόνδρινος ιστός που πλαισιώνει την άρθρωση (Neogi et al., 2025). Αποτελεί έναν ευλύγιστο ιστό καθώς απαρτίζεται από ίνες κολλαγόνου και ένα μοναδικό κυτταρικό τύπο, αυτόν των χονδροκυττάρων. Η λειτουργία του συμβάλλει στην απορρόφηση των μηχανικών πιέσεων τις οποίες υπόκεινται η άρθρωση ενώ επιτρέπει την πραγματοποίηση των κινήσεων των άκρων (Guilak et al., 2018). Ειδικότερα τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανανέωση των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας του χόνδρου μέσω της παραγωγής ινών κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνων όπως είναι οι αγγρεκάνες, όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Πάρα το γεγονός πως ο χόνδρινος ιστός παρουσιάζει ικανότητα αυτο-ανανέωσης, η διαδικασία αυτή παρουσιάζει αργό ρυθμό καθώς έχει καταγραφεί πως ο χρόνος ημιζωής του μορίου του κολλαγόνου έχει εύρος από δεκαετίες έως και εκατονταετία, ενώ η ανανέωση των πρωτεογλυκάνων του χόνδρου έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και μετά από 20 χρόνια (Di Nicola et al., 2020; Guilak et al., 2018). Το γεγονός αυτό επεξηγεί την αντιφατική φύση του χόνδρινου ιστού της άρθρωσης καθώς ενώ παρουσιάζει την ικανότητα

να υπόκεινται ισχυρές μηχανικές πιέσεις, είναι εξαιρετικά ευάλωτος σε μικρούς τραυματισμούς (Kacprzak et al., 2025).

1.1.2. Παράγοντες εμφάνισης ΟΑ

Η ΟΑ αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, δηλαδή παρουσιάζει μια πληθώρα αιτιολογικών παραγόντων γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών (Berenbaum et al., 2018). Οι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετιστεί μέχρι σήμερα με την παρουσίαση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου είναι η ηλικία του ατόμου, το φύλο, το αυξημένο σωματικό βάρος, η γενετική προδιάθεση, οι διατροφικές συνήθειες, υπάρχοντες τραυματισμοί και τέλος η μηχανική φόρτωση των αρθρώσεων με αυξημένα βάρη (Blagojevic et al., 2010; Silverwood et al., 2015). Όσον αφορά τη συνιστώσα του φύλου στην εμφάνιση της ΟΑ, είναι πλέον γνωστό πως η ΟΑ γονάτου και ισχύου είναι συχνότερη στον γυναικείο πληθυσμό, ενώ αυτό το ποσοστό αυξάνεται κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης (Silverwood et al., 2015). Είναι πιθανό για την παρατηρούμενη διαφορά στην επίπτωση της νόσου να ευθύνονται, πέρα από την απώλεια οστού, τη μειωμένη μυϊκή μάζα και δύναμη, και τον μειωμένο όγκο του χόνδρου που συνοδεύει τον φαινότυπο των γυναικών, και διαφορές στην έκφραση ορμονικών παραγόντων (Glyn-Jones et al., 2015). Μέχρι σήμερα τα αποτελέσματα των μελετών για το συγκεκριμένο αντικείμενο παρουσιάζονται αντικρουόμενα, επομένως απαραίτητη είναι η περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας αποτελεί το σωματικό βάρος και συγκεκριμένα η εμφάνιση παχυσαρκίας, μία κατάσταση όπου ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) ξεπερνάει τα 30 kg/m² (Blagojevic et al., 2010). Συγκεκριμένα τα παχύσαρκα και σε μικρότερο βαθμό τα υπέρβαρα άτομα (BMI > 25 kg/m²) εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση ΟΑ γονάτου αλλά και χεριού, με τη σχέση να είναι δόσοεξαρτώμενη (Glyn-Jones et al., 2015). Έχει αποδειχτεί πως με την αύξηση του δείκτη μάζας σώματος κατά 5 kg/m², ο κίνδυνος για την εμφάνιση ΟΑ γονάτου αυξάνεται κατά ένα ποσοστό της τάξης του 35% (Silverwood et al., 2015). Συμβατά με τα παραπάνω δεδομένα είναι αποτελέσματα μελετών που συσχετίζουν την απώλεια βάρους με τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης του οστεοαρθρικού φαινοτύπου (Zhang & Jordan, 2010). Ειδικότερα παρατηρήθηκε πως η μείωση του σωματικού βάρους κατά 5 κιλά συνοδεύεται από μείωση του κινδύνου εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας γονάτου σε βαθμό της τάξης του 50% (Blagojevic et al., 2010). Επιπρόσθετα η απώλεια βάρους αποδείχθηκε πως συνέβαλε στη μείωση του πόνου και της φλεγμονής, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη λειτουργία της άρθρωσης (Glyn-Jones et al., 2015). Η παθοφυσιολογία της ΟΑ γονάτου που προκαλείται από τον υψηλό δείκτη μάζας σώματος, οφείλεται στην αυξημένη μηχανική πίεση στην οποία υπόκεινται οι αρθρώσεις (Silverwood et al., 2015). Αυτό βέβαια

δεν αποτελεί την εξήγηση της συσχέτισης μεταξύ της παχυσαρκίας και της οστεοαρθρίτιδας χειρός, γεγονός που υποδεικνύει τη συμβολή μεταβολικών παραγόντων όπως το μεταβολικό σύνδρομο στην παθοφυσιολογία της νόσου (Berenbaum et al., 2018).

Η γενετική συνιστώσα της οστεοαρθρίτιδας είναι ισχυρή, καθώς έχει αποδειχτεί ότι ευθύνεται για το 40% των περιπτώσεων OA γονάτου και το 60% των περιπτώσεων OA ισχίου και χεριού (Zhang & Jordan, 2010). Τα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τον οστεοαρθρικό φαινότυπο περιλαμβάνουν το γονίδιο *GDF5*, το *IGFR-1*, το *COL2A1* και τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς της βιταμίνης D (Glyn-Jones et al., 2015).

Στην εξέλιξη της OA, είναι πιθανό να συμβάλλουν διατροφικοί παράγοντες όπως η έλλειψη βιταμινών D, K και C, αν και η επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης απαιτεί την διεξαγωγή περαιτέρω μελετών (Berenbaum et al., 2018). Η πιθανότητα εμφάνισης OA γονάτου αυξάνεται επίσης εξαιτίας τραυματισμών της περιοχής. Η ύπαρξη ιστορικού ρήξης πρόσθιου χιαστού συνδέσμου (ACL) συνδέεται με την ανάπτυξη πρόωρης OA σε ποσοστό ~13%, ενώ όταν τραυματίζονται και άλλες δομές της άρθρωσης όπως ο χόνδρος, το υποχόνδριο οστό και ο μηνίσκος, το ποσοστό αυξάνεται στο 21–40% (Silverwood et al., 2015). Η συνεχής επιβάρυνση μιας άρθρωσης λόγω επαγγελματικής ή αθλητικής δραστηριότητας συνδέεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης OA (Blagojevic et al., 2010). Η OA γονάτου εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα που γονατίζουν συχνά, η OA ισχίου σε άτομα που σηκώνουν μεγάλα βάρη ή στέκονται όρθια για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ η OA χειρός σε επαγγέλματα που απαιτούν τη δεξιότητα των χεριών (Zhang & Jordan, 2010). Όσον αφορά τη σωματική άσκηση, η σχέση της με την ανάπτυξη OA είναι πολύπλοκη καθώς η επαναλαμβανόμενη χρήση των αρθρώσεων φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο, αλλά δεν έχει διευκρινιστεί αν αυτό οφείλεται κυρίως στη δραστηριότητα καθαυτή ή στους τραυματισμούς που τη συνοδεύουν (Berenbaum et al., 2018).

1.1.3. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η OA, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρουσιάζεται ως μία ασθένεια πολύπλοκης φύσεως και για το λόγο αυτό οι μηχανισμοί ανάπτυξης της δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Το γεγονός αυτό αποτρέπει την ανάπτυξη μίας ουσιαστικής θεραπείας με αποτέλεσμα οι παρούσες θεραπευτικές προσεγγίσεις να μην επιτυγχάνουν την ίαση της ασθένειας αλλά περισσότερο την καταπράυνση των συμπτωμάτων αυτής. Αυτές διαχωρίζονται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες (Quicke et al., 2021): την εξάλειψη τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου, την φαρμακευτική αγωγή και τέλος την πραγματοποίηση χειρουργικής επέμβασης. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τακτικές όπως η απώλεια βάρους, η ήπια σωματική άσκηση

και η φυσικοθεραπεία (Devezaetal.,2021; Bannuruetal.,2019). Στη δεύτερη η χορήγηση φαρμάκων μέσω κατάποσης όπως είναι τα NSAIDs(Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs), το acetaminophen αλλά και η χορήγηση ενέσεων στην άρθρωση με κορτικοστεροειδή (Bannuruetal.,2019;Yuetal.,2015).Ο οστεοαρθριτικός φαινότυπος αποτελεί μια μη αναστρέψιμη κατάσταση επομένως οι προαναφερθείσες προσεγγίσεις αποσκοπούν στην αναστολή του ρυθμού εξέλιξης της νόσου και στην απαλλαγή σε ένα βαθμό του ασθενούς από τα συμπτώματα. Βέβαια σε περιπτώσεις προχωρημένου σταδίου της ασθένειας επιλέγεται η πραγματοποίηση χειρουργικών μεθόδων όπως είναι η ολική αρθροπλαστική γονάτου (Total knee arthroplasty, TKA)(Katzetal.,2013;AmericanAcademyofOrthopaedicSurgeons,2016).

1.1.4. Βιοδείκτες στην ΟΑ

Η οστεοαρθρίτιδα εντοπίζεται σε ασθενείς σε κλινικό επίπεδο, συνδυαστικά με τη χρήση της μεθόδου της ακτινογραφίας (Mobasherietal.,2023). Βέβαια κατά τη μελέτη του οστεοαρθριτικού φαινοτύπου χρησιμοποιούνται βιοδείκτες με τους πιο συνήθεις να αποτελούν μόρια που προκύπτουν κατά την αποδόμηση των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας του χόνδρου (CTX-II,COMP) (Lohmanderetal.,1994; Tsengetal.,2009; Sowersetal.,2009; Jungetal.,2004), φλεγμονώδεις παράγοντες (CRP, IL-6,TNF-α) (Livshitsetal.,2009;Goldringetal.,2000), αλλά και μεταβολικοί (λεπτίνη, αντιπονεκτίνη,ινσουλίνη) (Franciscoetal.,2019;Courtiesetal.,2017;Tchetinaetal.,2020;Gaoetal.,2020). Μέχρι στιγμής όσων αφορά τη χρήση δεικτών για την παρακολούθηση τόσο της εμφάνισης όσο και της εξελικτικής πορείας της νόσου κανένας βιοδείκτης βιοχημικός, μεταβολικός, ή ανοσολογικός δεν παρουσιάζει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα.

1.2. Ανάπτυξη & Μορφολογία του αρθρικού χόνδρου

1.2.1. Χονδρογένεση

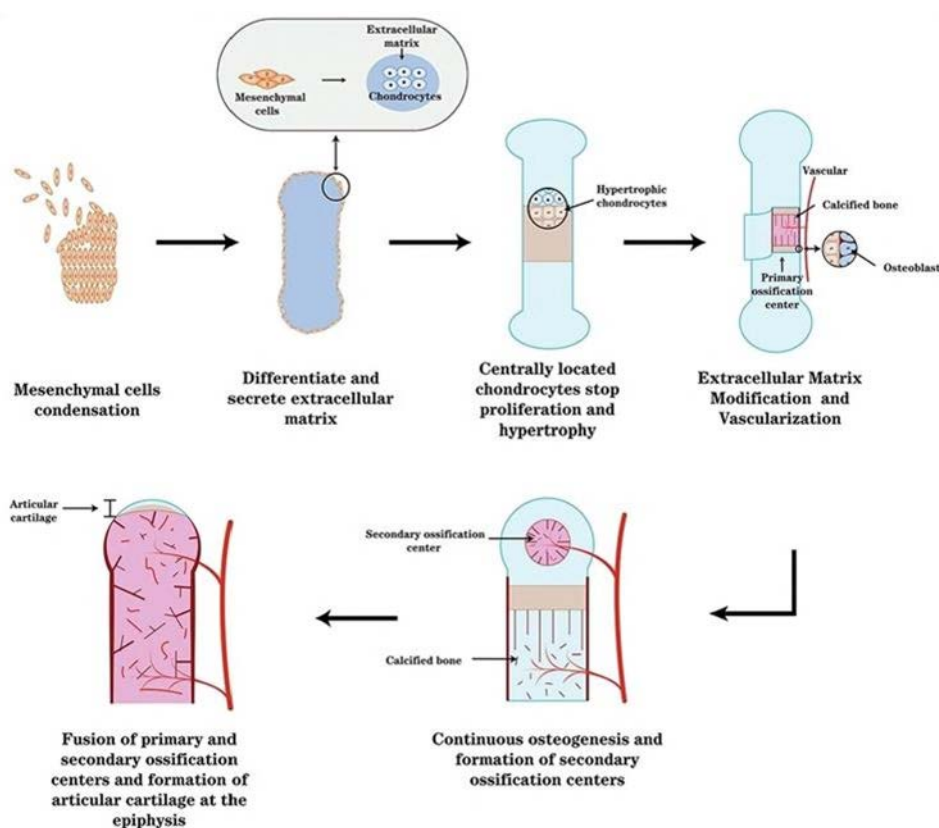
Η χονδρογένεση αποτελεί το πρώτο βήμα στην ακολουθία των γεγονότων που τελικά οδηγεί στην ανάπτυξη των οστών. Προκειμένου να ξεκινήσει η συγκεκριμένη διαδικασία αρχικά στρατολογούνται και συγκεντρώνονται μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) στο σημείο όπου θα προκύψει το χόνδρινο ικρίωμα και στη συνέχεια το μελλοντικό οστό(Baietal.,2019). Στο σημείο αυτό δημιουργούνται κυτταρικές διεπαφές (σύνδεση μέσω N-καδερίνης) μεταξύ των MSCs γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο την επαγωγή του πολλαπλασιασμού αυτών, αλλά σημάνει και τη δέσμευση τους στην μοίρα διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα (Prein etal.,2019). Τελικά τα ώριμα χονδροκύτταρα παράγουν τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας του χόνδρινου ιστού, η οποία αποτελείται από

διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου, με κύριο το κολλαγόνου τύπου 2, και πρωτεογλυκάνες με κύριες τις αγγρεκάνες(Eyre,2002;Roughley & Lee,1994). Η χονδρογένεση όπως κάθε μοριακή διαδικασία συνοδεύεται από έναν καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών, όμως κάποια μόρια κλειδιά παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία στην πραγματοποίηση της. Τέτοια μόρια αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας SOX και πιο συγκεκριμένα οι SOX9, SOX5 και SOX6(Chen & Wu,2019; Lee et al.,2011). Οι παραπάνω παράγοντες είναι απαραίτητοι για την επίτευξη της χονδρογένεσης. Συγκεκριμένα σε περιπτώσεις όπου παρατηρούνται παραλλαγές στο γονίδιο του SOX9 ή ολική καταστολή της έκφρασης αυτού σε πειραματικές συνθήκες, δεν είναι δυνατή η δημιουργία του χόνδρου αλλά ούτε και οστού(Lefebvre et al.,2001). Ο SOX9 επάγει την έκφραση του SOX5 και μαζί με το SOX6 επάγουν την χονδρογένεση μέσω της εκκίνησης της έκφρασης των γονιδίων των συστατικών της ECM του χόνδρου(COL2A1, ACAN)(DeLise et al.,2000). Επίσης το SOX9 έχει βρεθεί πως σε οστεοαρθρικά κύτταρα ασκεί ρυθμιστική επίδραση στα επίπεδα των αποδομητικών ενζύμων της εξωκυτταρικής μήτρας όπως είναι οι αγγρεκανάσες(ADAMTS5, ADAMTS4, ADAMTS7, ADAMTS12) (Zhang et al.,2015), ενώ επίσης αποτρέπει την επικράτηση του υπερτροφικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων μέσω καταστολή της έκφρασης του παράγοντα RUNX2 (Leung et al.,2011) και αναστολής της σηματοδότηση της β-κατενίνης(μονοπάτι Wnt)(Li et al.,2023). Ανασταλτικά για την πρόωρη μετατροπή των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, δρα η σηματοδότηση δύο ακόμα σημαντικών μονοπατιών, των PI3k/Akt και mTOR διατηρώντας ταυτόχρονα των πολλαπλασιαστικό ρυθμό των κυττάρων(Phul et al.,2016; Bai et al.,2019; Lin et al.,2006; Michigami, 2014).

1.2.2. Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση

Στη συνέχεια μετά από την ολοκλήρωση της χονδρογένεσης και την δημιουργία των ώριμων χονδροκυττάρων, τα κύτταρα αυτά μπορούν να ακολουθήσουν ένα εκ των δύο μονοπατιών. Είτε παραμένουν στην παρούσα τους κατάσταση πλαισιώνοντας τον ώριμο χόνδρο είτε υπόκεινται σε περαιτέρω διαφοροποίηση με αποτέλεσμα να μετατραπούν σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα (Prein et al.,2019). Το γεγονός αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα προς την επίτευξη της ενδοχόνδριας οστεοποίησης (Li & Dong,2016). Τα χονδροκύτταρα φυσιολογικά, βρίσκονται σε μία ισορροπία ανάμεσα στην αναβολική και καταβολική τους κατάσταση. Κατά την πρώτη παράγουν και εκκρίνουν συστατικά της ECM του χόνδρινου ιστού με στόχο της αναδόμησης του. Κατά την δεύτερη υπερτροφική κατάσταση, υιοθετούν έναν αντίθετο ρόλο καθώς εκκρίνουν στη θέση του κολλαγόνου τύπου 2, *COLX* και αποδομητικά ένζυμα όπως μεταλλοπρωτεάσες με σημαντικότερη την *MMP-13* και αγγρεκανάσες όπως η *ADAMTS5*. Τα χονδροκύτταρα που μετατρέπονται σε υπερτροφικά στο

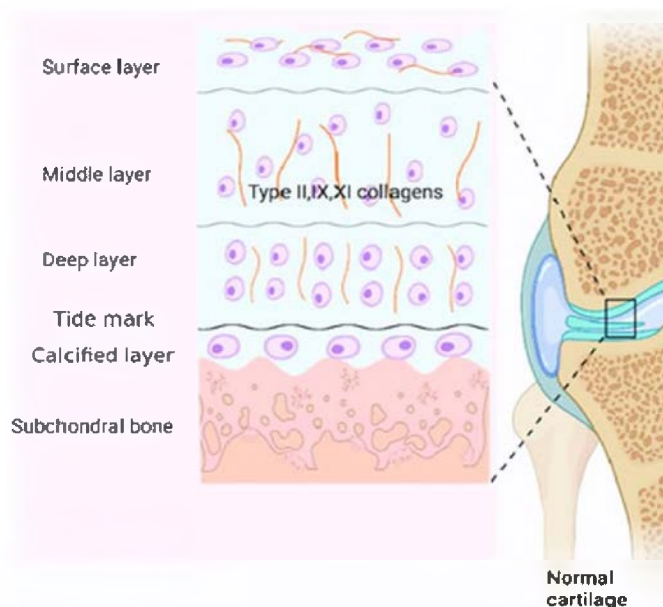
σημείο αυτό αποτελούν το κέντρο οστεοποίησης. Ακόμα επάγουν την αγγείωση του χόνδρινου ικρίωματος που έχει σχηματιστεί μέσω έκκρισης του παράγοντας αγγειογένεσης *VEGF* (Komori et al., 2020). Η διαδικασία αυτή διευκολύνεται όπως είναι φυσικό από την απώλεια της πυκνής οργάνωσης της εξωκυτταρικής μήτρας των κυττάρων εξαιτίας της αποδόμησης αυτής (Rim et al., 2020; Umlauf et al., 2010). Στο σημείο αυτό τα υπερτροφικά κύτταρα οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης και δίνουν την θέση τους στα κύτταρα από τα οποία θα προκύψει το οστό, τους οστεοβλάστες (Prein et al., 2019). Τελικά το οστό αναπτύσσεται σταδιακά μέσω επιμήκυνσης της αναπτυξιακής πλάκας προς τις δύο κατευθύνσεις των άκρων, τα οποία πλαισιώνονται από τον ώριμο χόνδρο (Provot et al., 2005) (Εικόνα 1).



1.2.3. Φυσιολογική μορφολογία χόνδρου

Ο πλήρως διαμορφωμένος χόνδρος διαχωρίζεται σε ζώνες οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική οργάνωση των ινών κολλαγόνου, επίπεδα πρωτεογλυκάνων αλλά και μεταβολές στη μορφολογία των χονδροκυττάρων. Οι ζώνες είναι 4 και ονομάζονται επιφανειακή, ενδιάμεση, εν τω βάθει και ασβεστοποιημένη (με κατεύθυνση από την επιφάνεια του χόνδρου προς τα μέσα) (Εικόνα 2). Η επιφάνεια της πρώτης ανέρχεται σε ποσοστό 10% της συνολικής

επιφάνειας του χόνδρινου ιστού. Παρουσιάζει ίνες κολλαγόνου που οργανώνονται παράλληλα ως προς την επιφάνεια του χόνδρου, χονδροκύτταρα που εμφανίζουν πεπλατυσμένη μορφολογία και χαμηλά επίπεδα πρωτεογλυκανών (Poole et al., 1982).

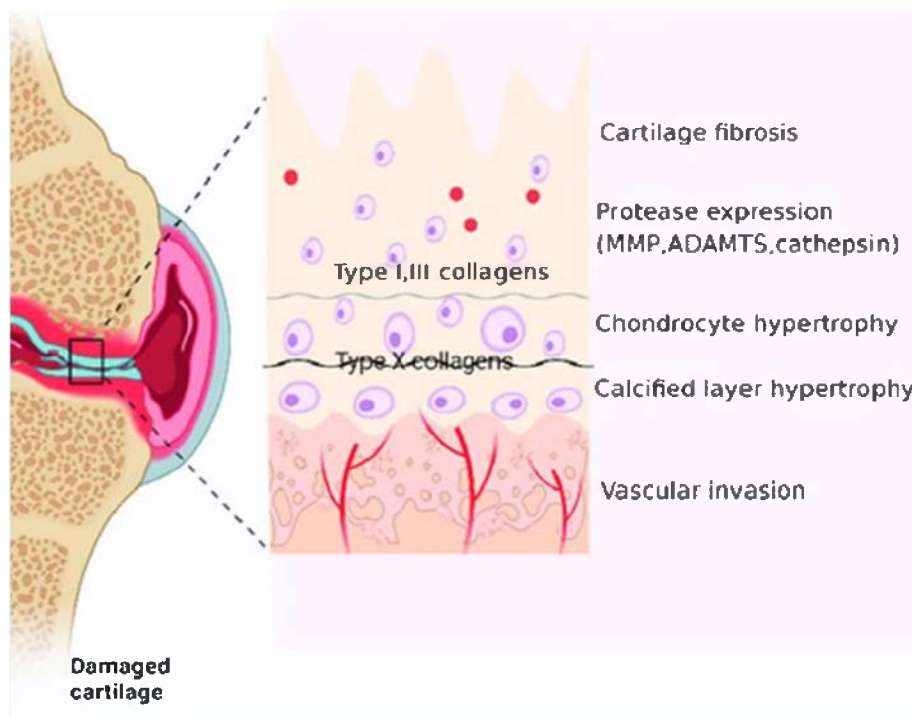


Στην συνέχεια ακολουθεί η ενδιάμεση ζώνη η οποία όπως και η επιφανειακή καταλαμβάνει το 10% της επιφάνειας του χόνδρινου ιστού. Στη συγκεκριμένη ζώνη παρατηρούνται ίνες κολλαγόνου προσανατολισμένες προς όλες τις κατευθύνσεις ενώ τα χονδροκύτταρα έχουν υιοθετήσει μία πιο σφαιρική μορφολογία. Η εν των βάθει ζώνη επεκτείνεται έως την διαχωριστική στοιβάδα “tidemark” η οποία διαχωρίζει την ασβεστοποιημένη ζώνη από τον υπόλοιπο χόνδρο. Στην συγκεκριμένη ζώνη αυτή τη φορά οι ίνες κολλαγόνου οργανώνονται κάθετα ως προς την επιφάνεια του χόνδρου ενώ τα χονδροκύτταρα σχηματίζουν οργανωμένες επιμήκης δομές (Hunziker et al., 2002; Poole et al., 1982) . Τα χονδροκύτταρα της κάθε ζώνης όταν είναι απαραίτητο λόγω της συνεχούς μηχανικής πίεσης στην οποία υπόκεινται η άρθρωση, επάγουν την ανανέωση της εξωκυτταρικής μήτρας του χόνδρου παράγοντας τα συστατικά αυτής (ίνες διαφορετικών τύπων κολλαγόνου, μόρια πρωτεογλυκανών)(Grodzinsky, 1983; Maroudas, 1975; Vanwanseele et al., 2002) . Το μικροπεριβάλλον των χονδροκυττάρων στον χόνδρινο ιστό αποτελείται όπως προαναφέρθηκε από την εξωκυτταρική μήτρα η οποία διακρίνεται σε περικυτταρική και διακυτταρική ανάμεσα σε αυτά. Η πρώτη παρουσιάζει υψηλή πυκνότητα σε πρωτεογλυκάνες (Poole et al., 1980) ενώ φέρει συγκεκριμένους τύπους ινών κολλαγόνου, σχηματίζοντας ένα στρώμα γύρω από το κάθε κύτταρο. Η συγκεκριμένη στιβάδα υποστηρίζεται πως συμμετέχει στην αντίληψη των μηχανικών πιέσεων από το κύτταρο αλλά

και στον μεταβολισμό του (Guilak et al., 2006). Η διακυτταρική εξωκυτταρική μήτρα από την άλλη συμβάλλει στην δομική και μηχανική επικοινωνία μεταξύ των χονδροκυττάρων του ιστού (Quinn et al., 2005).

1.2.4. Μορφολογία του χόνδρου στην ΟΑ

Κατά την εγκαθίδρυση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου στην άρθρωση, τα χονδροκύτταρα υπόκεινται σε πέντε διαφορετικές φάσεις. Κατά την πρώτη παρατηρείται ο αυξημένος πολλαπλασιασμός και η απόπτωση αυτών. Κατά τη δεύτερη παρατηρείται η αύξηση της αναβολικής τους δραστηριότητας, ενώ κατά την τρίτη η αύξηση της καταβολικής. Στην τέταρτη παρατηρείται μεταβολή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων ενώ στην πέμπτη προκύπτει ο σχηματισμός νέων δομών που ονομάζονται “οστεόφυτα” (Sandell & Aigner, 2001) (Εικόνα 3).



Κατά την δεύτερη, “αναβολική” φάση, τα χονδροκύτταρα αυξάνοντας την παραγωγή συστατικών της εξωκυτταρικής τους μήτρας (ίνες προκολλαγόνου II, III) προσπαθούν να επανορθώσουν την βλάβη που έχει ήδη υποστεί ο χόνδρος της άρθρωσης (Loeser et al., 2012). Σε μετέπειτα στάδιο της νόσου τα χονδροκύτταρα υιοθετούν ένα καταβολικό φαινότυπο. Αυτή τη φορά παράγουν και απελευθερώνουν αποδομητικά ένζυμα όπως είναι οι μεταλλοπρωτεάσες, και οι αγγρεκανάσες, συνδυαστικά με κολλαγόνο COLX, με αποτέλεσμα

την περαιτέρω επιδείνωση της διάβρωσης του χόνδρινου ιστού (Rengel et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα χονδροκύτταρα υπάρχουν σε μία δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις δύο προαναφερθείσες καταστάσεις, μία διαδικασία προσεκτικά ρυθμισμένη έτσι ώστε η σύνθεση και η αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας να μην οδηγεί στη δημιουργία παθογένειας στον ιστό, γεγονός που συμβαίνει στην ΟΑ. Τότε, η λεπτή αυτή ισορροπία διαταράσσεται, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα τόσο της συνθετικής δραστηριότητας των κυττάρων όσο και της αποδομητικής. Μόρια που συμμετέχουν στην επαγωγή της πρώτης αποτελούν οι κυτοκίνες *TGF-β1/2/3*, *IGF-1*, οι *BMPs*, και οι αυξητικοί παράγοντες *FGF1/4/8*. Στην επαγωγή της δεύτερης συμμετέχουν οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες *IL-1*, *IL-17*, *IL-18* και *TNF-α* με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών και την μειωμένη παραγωγή των καταστολέων τους (Goldring, 1999, 2000). Επιπρόσθετα κατά την ΟΑ παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των χονδροκυττάρων. Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παρουσιάζουν έναν ελαφρώς αυξημένο πολλαπλασιαστικό ρυθμό σε σχέση με αυτό των φυσιολογικών κυττάρων που είναι σχεδόν αμελητέος (Sandell, 2001). Διαφορετικές θεωρίες έχουν διατυπωθεί για την αιτία της παραπάνω μεταβολής. Πιθανό είναι να οφείλεται στην αυξημένη έκθεση των χονδροκυττάρων σε αυξητικούς παράγοντες προερχόμενους από το αρθρικό υγρό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ασυνέχεια του δικτύου κολλαγόνου της εξωκυτταρικής μήτρας, που αποτελεί φαινοτυπικό γνώρισμα της νόσου (Charlier & Hwang, 2016). Η απόπτωση των χονδροκυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό στάδιο στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας. Έχει επιβεβαιωθεί πως ο αποπτωτικός ρυθμός των χονδροκυττάρων στην ΟΑ παρουσιάζει αύξηση, αλλά κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα, της τάξης του 0.1% (Sandell, 2001). Η πληροφορία αυτή οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα πως ο κυτταρικός θάνατος των χονδροκυττάρων συμβάλλει πιθανότατα σε περιορισμένο βαθμό στην εξέλιξη της νόσου. Παρόλα αυτά, λόγω της δυσλειτουργικής απομάκρυνσης των νεκρών κυττάρων από τον ιστό, παρατηρείται η συσσώρευση αποπτωτικών προϊόντων όπως του κατακρημνισμένου ασβεστίου και του πυροφωσφορικού, τα οποία πιθανότατα επιδεινώνουν τη διάβρωση του χόνδρου (Charlier & Hwang, 2016). Επιπρόσθετα, ο οστεοαρθρικός φαινότυπος έχει συσχετιστεί με την εγκαθίδρυση αυξημένων επιπέδων νιτρικού οξέος (NO) και του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεσή του, της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS) (Studer & Lotz, 2004; Jiang & Zhang, 2023). Τα μόρια αυτά είναι πιθανό να συμμετέχουν στην επαγωγή της μειωμένης σύνθεσης πρωτεογλυκάνων της εξωκυτταρικής μήτρας, στην παρεμπόδιση της απόκρισης των χονδροκυττάρων στον αυξητικό παράγοντα *IGF-1*, αλλά τελικά και στην απόπτωση αυτών (Studer & Lotz, 2004).

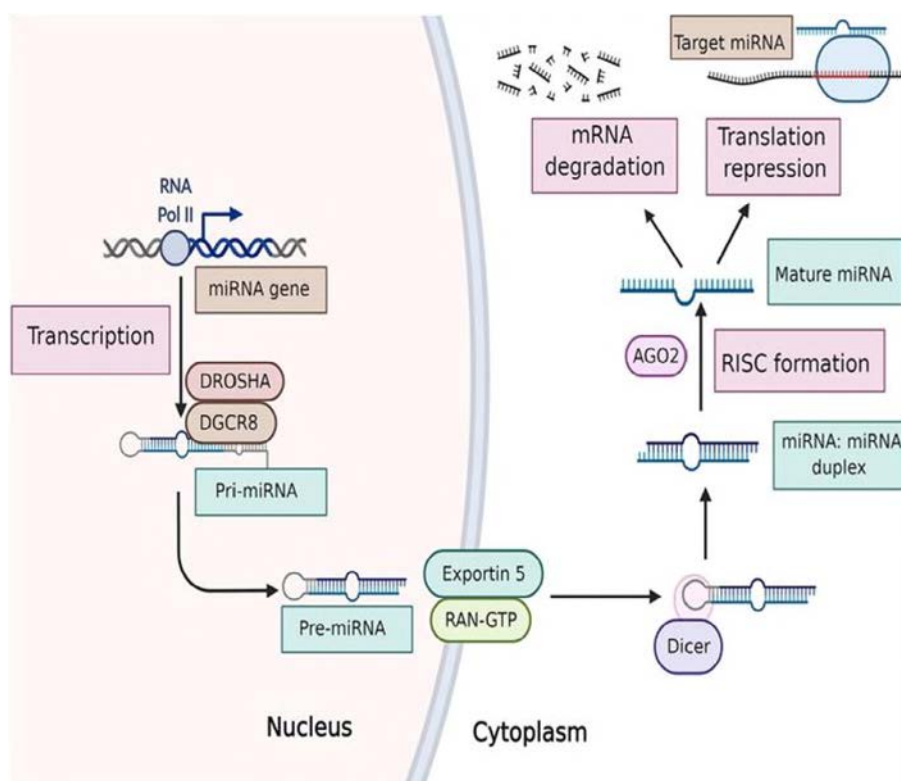
1.3. Επιγενετικές τροποποιήσεις στην ΟΑ

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη μελέτη της επιγενετικής ρύθμισης στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας (Jeffries et al., 2014). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις διαχωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τη μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και τέλος τη δραστηριότητα των miRNAs (Jeffries et al., 2014). Όσον αφορά τη μεθυλίωση, αποτελεί την προσθήκη μεθυλομάδων (-CH₃) στις περιοχές των CpG νησίδων των υποκινητών γονιδίων, ενώ η διαδικασία της απομεθυλίωσης αφορά την απομάκρυνση αυτών (Li et al., 2013). Μελέτες έχουν αποδείξει τη συσσώρευση μεθυλομάδων στο γονίδιο του *COL9A1* στην οστεοαρθρίτιδα, με αποτέλεσμα την άσκηση αρνητικής ρύθμισης στα επίπεδα έκφρασης του συστατικού της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων και συνεπακόλουθα την επιδείνωση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου (Steinberg et al., 2012).

Επιπρόσθετα, σε οστεοαρθρικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων των μεθυλοτρανσφερασών (*DNMT1*, *DNMT3A* και *DNMT3B*), συμβάλλοντας στην αιτιοπαθογένεια της νόσου (de Andres et al., 2013), ενώ επίσης έχει αποδειχθεί η συμμετοχή των ενζύμων των απομεθυλασών (*TET*) στην εξέλιξη του οστεοαρθρικού φαινοτύπου μέσω της ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης και της αποδόμησης του χόνδρου (Hashimoto et al., 2013). Διαταραχές στο πρότυπο τροποποίησης των ιστονών, έχει επίσης αποδειχθεί ότι συνδέονται με την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας (Coulson et al., 2018). Τέτοιου είδους τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση και ακετυλίωση των ιστονών, οι οποίες επηρεάζουν τη δομή και την προσβασιμότητα της ευχρωματίνης και της ετεροχρωματίνης σε μεταγραφικούς παράγοντες (Martinez-Redondo & Vaquero, 2013). Επιγενετικοί δείκτες όπως οι H3K9me₃, H3K27me₃ και H3K4me₃ συνδέονται άμεσα με τον οστεοαρθρικό φαινότυπο, επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων-κλειδιών για τη χονδρογένεση και τη σύνθεση της ECM των χονδροκυττάρων (Barter et al., 2012). Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι τα *SOX9*, *COL2A1* και *ACAN* (Bradley et al., 2015). Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει τον πολύπλοκο ρόλο των ενζύμων των απακετυλασών (*HDACs*) και ειδικότερα των Σιρτουινών (*SIRT6*) στην οστεοαρθρίτιδα (Caron et al., 2018), καθώς φαίνεται σε κάποιες περιπτώσεις να ασκούν προστατευτική επίδραση έναντι στον οστεοαρθρικό φαινότυπο, ενώ σε άλλες συμβάλλουν στην επιδείνωση αυτού (Dvir-Ginzberg et al., 2016).

1.3.1. Μονοπάτι βιογένεσης των microRNAs

Τα microRNAs (ή αλλιώς miRNAs) ανήκουν στα μικρά μη κωδικά μόρια RNA με μήκος 19-22 nt. Δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω 2 πιθανών μηχανισμών. Υβριδίζουν το μετάγραφο-στόχο τους, και με βάση το ποσοστό υβριδισμού καταστέλλουν την έκφραση του (ατελής συμπληρωματικότητα) είτε το αποδομούν (πλήρης συμπληρωματικότητα). Όσον αφορά το μονοπάτι βιογένεσης των miRNAs, αμέσως μετά τη μεταγραφή παρουσιάζουν δομή φουρκέτας που ονομάζεται pri-miRNA. Έπειτα το πρόδρομο μόριο αυτό επιδέχεται περαιτέρω επεξεργασία από το σύμπλοκο *Drosha/DGCR8* στον πυρήνα με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μόριο που ακόμα παρουσιάζει μορφή φουρκέτας με μικρότερο όμως μήκος, το pre-miRNA. Αυτό μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου τροποποιείται από την *Dicer1* έτσι ώστε τελικά να προκύψει η αλληλουχία του ώριμου miRNA. Τελικά τα miRNAs αποτελούν μέρος του συμπλόκου *RISC* δρώντας ως μόρια-οδηγοί για την επιτυχή στόχευση των μεταγράφων των πιθανών γονιδίων-στόχων (Bartel, 2009; Fabian et al., 2010; Kim et al., 2009; Newman and Hammond, 2010) (Εικόνα 4).



1.3.3. Ο ρυθμιστικός ρόλος των microRNAs στην ΟΑ

Ως miRNAs χαρακτηρίζονται τα μονόκλωνα μη κωδικά μόρια RNAs μήκους 19-25 nt (Ishibashi et al., 2022). Αποτελούν ρυθμιστικά μόρια της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μηχανισμός που επιτυγχάνεται είτε μέσω παρεμπόδισης της

πραγματοποίησης της μετάφρασης είτε μέσω αποικοδόμησης της αλληλουχίας mRNA στόχου (Grendaetal.,2013;Pueta.,2019;Meister&Tuschl,2004;Wakiyamaetal.,2007). Η σημασία του συγκεκριμένου μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης αντικατοπτρίζεται στο γεγονός πως τα 2/3 των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος υπόκεινται σε τέτοιου είδους ρυθμιστικό έλεγχο(Strmsek&Kunej,2015). Τα miRNAs συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών του κυττάρου. Κάποιες βιολογικές διεργασίες στις οποίες παρουσιάζουν σημαντικό ρόλο είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση και η επίτευξη της ανοσοαπόκρισης (Alwani&Baj-Krzyworzeka,2021). Βέβαια τα miRNAs δεν συμβάλλουν μόνο στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Είναι γνωστό πως σε περίπτωση απορρύθμισης της έκφρασης των ίδιων των miRNA γονιδίων εξαιτίας της δημιουργίας μεταλλάξεων στην αλληλουχία τους, τα ρυθμιστικά αυτά μόρια συμμετέχουν στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων και την εμφάνιση ασθενειών όπως είναι η Οστεοαρθρίτιδα(Eastlack&Alahari,2015). Αυξανόμενος αριθμός μελετών(Xiaetal.,2014; Nedunchezhiyanetal.,2022;Yaoetal.,2023;Caldoetal.,2024;Balaskasetal.,2023) εστιάζουν τα τελευταία χρόνια στον ρόλο των miRNAs στην παθοφυσιολογία της συγκεκριμένης νόσου, με αποτέλεσμα την εύρεση συσχέτισης μεταξύ των μορίων αυτών και πολλαπλών πτυχών της πολυπαραγοντικής αιτιοπαθογένειας της. Αρχικά συμμετέχουν στην ρύθμιση της απόπτωσης των χονδροκυττάρων που πλαισιώνουν τον χόνδρινο ιστό. Στην συνέχεια μέσω διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ αναβολικού και καταβολικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων συμβάλλουν στην καταστροφή και αποδόμηση του πλέγματος της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων. Τέλος παρουσιάζουν δραστηριότητα και στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης οδηγώντας στην επικράτηση της φλεγμονής στον ιστό, μία κατάσταση που οδηγεί σε επιδείνωση του οστεοαρθριτικού φαινοτύπου. Πλέον πέρα από την γνωστή επίδραση των miRNAs στον φαινότυπο των χονδροκυττάρων έχει παρατηρηθεί και η επίδραση της ρύθμισης τους στον κυτταρικό πληθυσμό των ινοβλαστών (OAsynovialfibroblasts, OASF) της άρθρωσης(Moran-Mogueletal.,2018; Liuetal.,2014). Η μελέτη του ρόλου των αρνητικών ρυθμιστών miRNAs στην παθοφυσιολογία των διαφόρων ασθενειών και συγκεκριμένα της οστεοαρθρίτιδας, αποτελεί ένα αναγκαίο βήμα προς την ανεύρεση νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών στόχων και μορίων άλλα και βιοδεικτών(Szalaetal.,2024).

Έχει αποδειχτεί πως τα miRNAs συμμετέχουν στην εξέλιξη της ΟΑ μέσω της ρύθμισης της ομοιόστασης του χόνδρου, της απόπτωσης των χονδροκυττάρων και της φλεγμονώδους απόκρισης. Αρχικά το miR-140, του οποίου τα επίπεδα μειώνονται στην ΟΑ, έχει αποδειχθεί πως στοχεύει άμεσα τα μετάγραφα γονιδίων που σχετίζονται με την ομοιόσταση του χόνδρινου ιστού και την ανάπτυξη των χονδροκυττάρων, όπως είναι τα

SMAD3, *HDAC4*, *CXC112*, *BMP2*, *IGFBP-5* και *MMP-13* (Tardif et al., 2009; Nicolaset al., 2008; Paisetal., 2010). Από την άλλη το miR-146a έχει αποδειχθεί πως συμμετέχει στη ρύθμιση κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η απόπτωση ή κυτταρικός θάνατος και η αυτοφαγία, και στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας (Chenetal., 2017; Li et al., 2012; Zhanget al., 2015). Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί πως συμμετέχει στη ρύθμιση της επαγωγής της αίσθησης του πόνου που αποτελεί το κύριο σύμπτωμα της οστεοαρθριτιδας (Yamasaki et al., 2009; Li et al., 2011). Το miR-9-5p του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, ασκεί επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση, αλλά και στην αποδόμηση συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων μέσω ρύθμισης της *MMP-13* (Kopańska et al., 2017; Hu & Ecker, 2021). Το miR-22 έχει συσχετιστεί με την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας μέσω ενεργοποίησης αποδομητικών ενζύμων όπως είναι οι αγγρεκανάσες και οι μεταλλοπρωτεάσες *MMPs*, και την ενίσχυση της φλεγμονής μέσω της στόχευσης των μεταγράφων των *PfARa* και *BMP-7* (Iliorouloset al., 2008). Παράλληλα, το miR-27b αναστέλλει την έκφραση του *COL1A1* αλλά και των αποδομητικών ενζύμων, *MMP-13* και *ADAMTS8*, μέσω στόχευσης των μεταγράφων των γονιδίων τους (Yanget al., 2017). Αντιφλεγμονώδη δράση αποδίδεται στο miR-149-5p, το οποίο παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα στην ΟΑ, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των φλεγμονώδων παραγόντων *INF-α*, *IL-1β* και *IL-6* (Law et al., 2021). Το miR-128 έχει συσχετιστεί με την καταστολή της διαδικασίας της αυτοφαγίας μέσω στόχευσης του μεταγράφου του *Atg12* (Lian et al., 2018), ενώ το miR-210 φαίνεται να ασκεί προστατευτικό ρόλο έναντι της επιδείνωσης του οστεοαρθρικού φαινοτύπου αναστέλλοντας τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω *NF-κB* (Qi et al., 2012; Zhanget al., 2015). Επιπλέον, το miR-335-5p εμπλέκεται στην αποδόμηση της ECM των χονδροκυττάρων και ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια *WNT* και *NF-κB* με αποτέλεσμα την ενίσχυση της φλεγμονής στον πάσχοντα ιστό (Kopańska et al., 2017; Lu et al., 2021), ενώ το miR-485-5p αναστέλλει το *SOX9*, αναστέλλοντας τη χονδρογένεση και προάγοντας τη φλεγμονή (Chen et al., 2018).

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία περίπλοκη σχέση μεταξύ της δραστηριότητας των ρυθμιστικών μορίων miRNAs και την παθοφυσιολογία της εκφυλιστικής νόσου των αρθρώσεων. Κάποια μόρια miRNA παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον πάσχοντα ιστό σε σχέση με κύτταρα φυσιολογικού, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει πως φυσιολογικά υιοθετούν έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην εγκαθίδρυση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου. Βέβαια από την άλλη κάποια miRNAs παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με αυτά προερχόμενα από φυσιολογικά δείγματα. Το γεγονός αυτό πιθανώς αποτελεί ένδειξη ενός επιζήμιου ρόλου, που

οδηγεί τελικά στην επιδείνωση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου. Τέλος τα miRNAs συμμετέχουν σε πληθώρα πτυχών της ασθένειας, όπως είναι η επαγωγή και η καταστολή της εξάπλωσης της φλεγμονής, της αποδόμησης της εξωκυτταρικής μήτρας και της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων (Szala et al., 2024).

1.3.4. MiR-21-5p

Το miR-21-5p αποτελεί ένα από τα πιο μεθοδικά μελετημένα μόρια microRNAs μέχρι σήμερα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον σημαντικό ρόλο που υιοθετεί κατά την διαφοροποίηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας έτσι ένα “oncomir”. Η θέση του γονιδίου του εντοπίζεται στον γενετικό τόπο Vacuole Membrane Protein locus (VMP1), του χρωμοσώματος 17. Η έκφραση του miR-21 επάγεται από την επικράτηση συνθηκών υποξίας και φλεγμονής, οι οποίες επιτρέπουν τελικά την δράση του (Jenike & Halushka, 2021). Έχει αποδειχτεί πως το miR-21-5p συμμετέχει στην καταστολή της απόπτωσης και την επαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, ενώ στον καρδιακό ιστό οδηγεί στην ίνωση. Επιπλέον έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με τις παραπάνω λειτουργίες όπως είναι διαφορετικοί τύποι καρκίνου, ασθένειες που χαρακτηρίζονται από τη χρόνια φλεγμονή και διάφορες καρδιοπάθειες (Pfeffer et al., 2015; Sheedy, 2015; Surina et al., 2021). Τέλος οι πιο γνωστοί και σε μεγαλύτερο βάθος μελετημένοι στόχοι του miR-21 αποτελούν τα μετάγραφα των γονιδίων *PTEN*, *TRIM1* και *PDCD4* (Jenike & Halushka, 2021).

1.3.5. Ο ρόλος του miR-21-5p στην ΟΑ

Ο ρόλος του miR-21-5p στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας παρουσιάζεται πολύπλοκος, καθώς το συγκεκριμένο miR συμμετέχει στη ρύθμιση πληθώρας διαδικασιών που σχετίζονται με τη νόσο. Παράλληλα, τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί πως αυξάνουν στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα ενώ σε άλλες πως μειώνονται. Μεγάλος αριθμός μελετών (Hoshikawa et al., 2020; Luan et al., 2022; Konteles et al., 2025; Zhang et al., 2020; Zhang et al., 2014; Wang et al., 2019; Ma et al., 2020; Weng et al., 2021) έχουν αναδείξει την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p σε οστεοαρθρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση υποδοχέων TLR-7, την ενίσχυση φλεγμονής και την προώθηση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, το miR-21-5p ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση παραγόντων όπως ο *FGF18* και ο *SRY1*, και επηρεάζει την έκφραση αναβολικών και καταβολικών γονιδίων, όπως τα *COL2A1*, *ACAN*, και *MMP-3*, *MMP-13* αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αποδόμησης της εξωκυτταρικής μήτρας και την προαγωγή της αγγειογένεσης στον χόνδρο. Αντίθετα, δύο μελέτες (Zhu et al.,

2019; Qin et al., 2022), στις οποίες παρατηρήθηκε η πτώση των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου miR στην OA, έχουν αναδείξει την πιθανή προστατευτική δράση του. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση των επιπέδων του miR-21-5p συνδέθηκε με την ενίσχυση των επιπέδων αναβολικών γονιδίων όπως το *COL2A1* και την αρνητική ρύθμιση των καταβολικών ενζύμων, *MMP-13* και *ADAMTS-5*. Επίσης παρατηρήθηκε η μείωση της απόπτωσης των χονδροκυττάρων. Επιπλέον, η παρουσία του miR-21-5p σε M1 μακροφάγα φαίνεται να επάγει την μετατροπή τους στον ανενεργό φαινότυπο M2, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη φλεγμονή στον χόνδρο. Τα παραπάνω δεδομένα, δείχνουν πως ο ρόλος του miR-21-5p στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας είναι πολυδιάστατος και εξαρτάται από τα διαφορετικά μονοπάτια που επηρεάζει, τόσο φλεγμονώδη όσο και αναβολικά (Zhu et al., 2019; Qin et al., 2022).

1.4. Σκοπός πτυχιακής εργασίας

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για την μελέτη της επιγενετικής ρύθμισης, επαγόμενης από τα μικρά μη κωδικά μόρια microRNAs, στο πλαίσιο της παθογένεσης της οστεοαρθρίτιδας. Απώτερος σκοπός αυτού του εγχειρήματος αποτελεί η εύρεση μορίων μέσω της στόχευσης των οποίων θα επιτευχθεί η αναστροφή του οστεοαρθριτικού φαινοτύπου. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miR-21-5p στον οστεοαρθριτικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων κατά την *in vitro* καλλιέργεια τους. Για τον σκοπό αυτό, διεξάχθηκαν οι εξής πειραματικές μέθοδοι:

1. Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-21-5p σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα
2. Ο προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του miR-21-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής
3. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p
4. Προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων-στόχων *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα μετά από χορήγηση αναστολέα για το miR-21-5p
5. Αξιολόγηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων μετά από χορήγηση αναστολέα για το miR-21-5p

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Δείγματα αρθρικού χόνδρου

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή χονδροκύτταρα (ΟΑ χονδροκύτταρα) τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα αρθρικού χόνδρου δέκα ασθενών που είχαν υποβληθεί σε χειρουργείο ολικής αρθροπλαστικής γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπεδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που συμπεριελήφθησαν στην έρευνα απομονώθηκαν από σημεία του αρθρικού χόνδρου με υψηλό βαθμό αλλοίωση τα οποία παρουσίαζαν ΟΑ προχωρημένου σταδίου. Ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλης ασθένειας ή ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και σηπτική ΟΑ, χονδροδυσπλασία και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από την μελέτη. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν έξι άτομα, χωρίς να έχουν ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος ή ακρωτηριασμό.

2.2. Απόψυξη (Thawing) χονδροκυττάρων

Τα χονδροκύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C σε ειδικά φιαλίδια.

Πρωτόκολλο

1. Μεταφορά θρεπτικού μέσου στον κλίβανο
2. Μεταφορά 5μL θρεπτικού στα φιαλίδια των παγωμένων κυττάρων για απενεργοποίηση του DMSO
3. Μεταφορά περιεχομένου των φιαλιδίων σε falcon
4. Πραγματοποίηση φυγοκέντρισης των σωληναρίων στις 1500 στροφές, για 6 λεπτά.
5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
6. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με προσθήκη 2 ml θρεπτικού DMEM στα σωληνάρια
7. Προσθήκη 3ml θρεπτικού DMEM/F12 σε φλάσκες T25
8. Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα T25.

2.3. Δημιουργία κυτταροκαλλιιεργειών χονδροκυττάρων

Υλικά

1. FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10% v/v
2. DMEM (Dulbecco's Modified eagle Medium, BioWest, Material: L0103-500)
3. Αντιβιοτικά (Penicillin/Streptomycin, P/S), 1% v/v
4. Διάλυμα PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)

Τα παραπάνω συστατικά συντελούν το διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου, το οποίο χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των χονδροκυττάρων.

Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

Για την επίτευξη στείρων συνθηκών και την παρεμπόδιση ανάπτυξης οποιαδήποτε επιμόλυνσης, το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιείται υπό τη λειτουργία θαλάμου κάθετης νηματικής ροής δεύτερης τάξης.

Οι καλλιέργειες των χονδροκυττάρων αναπτύχθηκαν σε φλάσκες πολυστυρενίου T25, οι οποίες παρείχαν στα κύτταρα την κατάλληλη επιφάνεια για την προσκόλληση και τον μετέπειτα πολλαπλασιασμό τους. Οι φλάσκες των κυτταροκαλλιεργειών φυλάσσονται σε κλίβανο προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επώαση των κυττάρων υπό τις σταθερές συνθήκες, των 37°C, με παροχή 5% CO₂.

2.4. Ανακαλλιέργεια (Splitting)

Υλικά

1. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1X in PBS, Material: L0940-100)
2. PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)
3. Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM/F12

Πρωτόκολλο Ανακαλλιέργειας για φλάσκα T25

1. Αφαίρεση του παλιού θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα
2. Πλύση της φλάσκας με διάλυμα PBS (3ml) για απομάκρυνση υπολειμμάτων DMEM, με σκοπό την επίτευξη μέγιστης δραστηριότητας της θρυψίνης
3. Προσθήκη 1 ml θρυψίνης
4. Επώαση της φλάσκας στον κλίβανο για 5 λεπτά
5. Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν έχουν «σηκωθεί» από την επιφάνεια όπου αναπτύσσονται αλλά και για τον εντοπισμό τυχόν συσσωματωμάτων.
6. Προσθήκη 4ml πλήρους θρεπτικού DMEM/F12 προκειμένου να κατασταλεί η δράση της θρυψίνης (Τελικός όγκος=5ml)
7. Διαμοιρασμός διαλύματος 2.5ml, μέσα στο οποίο αιωρούνται τα κύτταρα σε 2 νέες φλάσκες είτε σε μία καινούργια φλάσκα ενώ τα 2.5ml παραμένουν στην αρχική.
8. Προσθήκη 2.5ml πλήρους θρεπτικού DMEM/F12 στις φλάσκες, για επίτευξη του τελικού όγκου των 5ml.
9. Επώαση των νέων φλασκών στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂).

2.5. Απομόνωση RNA

Υλικά

1. Trizol (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK)
2. Χλωροφόρμιο (Merck)
3. Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amresco)
4. 70% αιθανόλη (Scharlau)
5. RNase-free water (QIAGEN)
6. Διάλυμα PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)
7. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1X in PBS, Material: L0940-100)

Πρωτόκολλο

1. Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού από το κάθε well
2. Προσθήκη 0.5ml Trizol σε κάθε well
3. Ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά σε eppendorf των 2ml
4. Προσθήκη 0.1ml χλωροφορμίου (υπολογισμός χλωροφορμίου ως εξής 0.2ml χλωροφόρμιο για κάθε 1ml Trizol που χρησιμοποιήθηκε αρχικά)
5. Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε vortex
6. Πραγματοποίηση επώασης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Πραγματοποίηση φυγοκέντρισης για 15 λεπτά, στους 4°C, στις 12.000 στροφές
8. Τοποθέτηση του υπερκειμένου σε νέο eppendorf των 2ml
9. Προσθήκη 0.5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης (υπολογισμός ισοπροπυλικής αλκοόλης ως εξής 0.5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol που χρησιμοποιήθηκε αρχικά)
10. Πραγματοποίηση επώασης δέκα λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου
11. Πραγματοποίηση φυγοκέντρισης για δέκα λεπτά, στους 4°C, στις 12.000 στροφές
12. Απόχυση του υπερκειμένου και πλύση του RNA με 1ml 70% αιθανόλης
13. Πραγματοποίηση φυγοκέντρισης για 10 λεπτά, στους 4°C, στις 10.000 στροφές
14. Απόχυση του υπερκειμένου
15. Στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου
16. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 30μl dH₂O (δεν εμπεριέχει RNAσες)
17. Πραγματοποίηση επώασης για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο (60°C)
18. Αποθήκευση του απομονωμένου RNA στους -80°C.

2.6. Σύνθεση stemloopcDNA για το miR-21-5p

[27]

Ως stemloop ονομάζεται ένα είδος εκκινητή που εμφανίζει μορφολογία φουρκέτας. Παρουσιάζει ειδικότητα για το miRNA ενδιαφέροντος, και χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχυθεί το μέγεθος του (περίπου 19-22nt). Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση RealTimePCR, καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία αυτή έχουν μήκος παρόμοιο με αυτό του miRNA (περίπου 20nt), ενώ το υπόστρωμα τους πρέπει να έχει μήκος τουλάχιστον διπλάσιο από αυτό προκειμένου να ενισχυθεί επιτυχώς. Στο πρώτο βήμα του stemloopcDNA πραγματοποιείται η υβριδοποίηση του εκκινητή stemloop με την αλληλουχία στόχο, ενώ στο δεύτερο πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA. Εκτός από τη σύνθεση stemloopcDNA για το miRNA ενδιαφέροντος, σε αυτή την περίπτωση το miR-21-5p πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για το γονίδιο αναφοράς U6.

Υλικά

Σύνθεση stemloopcDNA βήμα 1^ο	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SL-RT	1μL
dNTPs	1μL
DdH ₂ O	11μL
RNA	2μL

Σύνθεση stemloopcDNA βήμα 2^ο	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
MMLV	0,5μL
DTT	2μL
5x buffer	4μL

Πρωτόκολλο

1. Παρασκευή των 2 MasterMix του πρώτου βήματος για το miR-21-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
2. Διαμοιρασμός 13μl MasterMix σε κάθε eppendorf
3. Προσθήκη 2μl RNA από το κάθε δείγμα

4. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 1stSTEP, 65°C για 5 λεπτά.
5. Παρασκευή των 2 MasterMix του δεύτερου βήματος για το miR-21-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
6. Διαμοιρασμός 6.5μl από το MasterMix στο κάθε δείγμα
7. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 2ndSTEP, 37°C για 2 λεπτά, 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 50 λεπτά, 70°C για 15 λεπτά

2.7. Real-TimePCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης miR-21-5p

Υλικά

Master Mix mir-21-5p	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer του mir-155-5p	0,5μl
Reverse primer του mir-155-5p	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

MasterMix γονιδίου αναφοράς U6	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer του U6	0,5μl
Reverse primer του U6	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

Πρωτόκολλο

1. Πραγματοποίηση αραιώσης 1:20 των cDNA του miR-21-5p και του U6
2. Προετοιμασία των MasterMix για το mir-21-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
3. Προσθήκη 12μl του miR-21-5pMasterMix στις κατάλληλες θέσεις του ειδικού plate της RT-PCR
4. Προσθήκη 3μl cDNA σε κάθε θέση (Τελικός όγκος αντίδρασης=15μl).

5. Προσθήκη 12μl του U6 MasterMix στις ανάλογες θέσεις του ειδικού plate της RT-PCR
6. Προσθήκη 3μl cDNA U6 σε κάθε striptube (Τελικός όγκος αντίδρασης=15μl).
7. Τοποθέτηση του plate στο μηχάνημα της RT-PCR, και επιλογή του επιθυμητού προγράμματος αντίδρασης (60°C).

2.8. Διαμόλυνση χονδροκυττάρων με μόριο αναστολέα του miR-21-5p

24 ώρες πριν την διαμόλυνση των κυττάρων, αυτά μεταφέρονται σε 6-wellplate, όπου καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο (DMEM/F12) με απουσία αντιβιοτικών καθώς αυτά μειώνουν το ποσοστό επιτυχίας της διαμόλυνσης.

A) Προετοιμασία των διαλυμάτων για την πραγματοποίηση της διαμόλυνσης με λιποφεκταμίνη

Πρωτόκολλο

1. Ανάμειξη 125μl DMEM/F12 με 2.5μl siRNA/mimic ή inhibitory miRNA (A)
2. Ανάμειξη 125μl DMEM/F12 με 2.5μl λιποφεκταμίνης 2000 (B)
3. Ανάμειξη 125μl DMEM/F12 με 2.5μl negative control (Anc)
4. Ανάμειξη 125μl DMEM/F12 με 2.5μl λιποφεκταμίνης 2000 (Bnc)
5. Ανάμειξη 1:1 των διαλυμάτων A και B, μέσω μεταφοράς του πρώτου στο eppendorf του τελευταίου (διάλυμα Γ)
6. Πραγματοποίηση επώασης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου για τη δημιουργία του συμπλέγματος λιποφεκταμίνης και inhibitory miRNA
7. Ανάμειξη 1:1 Anc και Bnc, μέσω μεταφοράς του πρώτου στο eppendorf του τελευταίου (διάλυμα Γnc)
8. Πραγματοποίηση επώασης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου για τη δημιουργία του συμπλέγματος λιποφεκταμίνης και negative control

B) Διαμόλυνση (transfection)

Πρωτόκολλο

1. Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού από τα wells
2. Προσθήκη διαλύματος PBS για την πλύση των wells

3. Προσθήκη 1750μL θρεπτικού DMEM/F12 χωρίς αντιβιοτικά σε κάθε well
4. Προσθήκη 250μL διαλύματος Γ στα wells για την επίδραση του με inhibitory miRNA
5. Προσθήκη 250μL διαλύματος Γnc στα wells του negative control
6. Τοποθέτηση των 6-well plate στον κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂) για 48-72 ώρες

2.9. Σύνθεση cDNA με random primers

Υλικά

Mix 1 cDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
Random primers	1μL
dNTPs	1μL
dH ₂ O	11,5μL
RNA	1,5μL

Mix 2 cDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
5x buffer	4μL
DTT	1μL
MMLV	0,5μL

Πρωτόκολλο

1. Παρασκευή του MasterMix του πρώτου βήματος
2. Διαμοιρασμός 15μL MasterMix σε κάθε eppendorf
3. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 1st STEP, 65°C για 5 λεπτά.
4. Παρασκευή του MasterMix του δεύτερου βήματος
5. Διαμοιρασμός 5.5μL από το MasterMix στο κάθε δείγμα

6. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 2ndSTEP, 37°C για 2 λεπτά, 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 50 λεπτά, 70°C για 15 λεπτά

2.10. RT-PCR για τα γονίδια-στόχους SOX5, SOX6 και GDF5

Υλικά

A)

Master Mix SOX5	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer	0,5μl
Reverse primer	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

MasterMix γονιδίου αναφοράς GAPDH	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer του GAPDH	0,5μl
Reverse primer του GAPDH	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

B)

Master Mix SOX6	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer	0,5μl
Reverse primer	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

MasterMix γονιδίου αναφοράς GAPDH	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer του GAPDH	0,5μl
Reverse primer του GAPDH	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

I)

Master Mix GDF5	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer	0,5μl
Reverse primer	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

MasterMix γονιδίου αναφοράς GAPDH	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	8,5μl
Forward primer του GAPDH	0,5μl
Reverse primer του GAPDH	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

Πρωτόκολλο

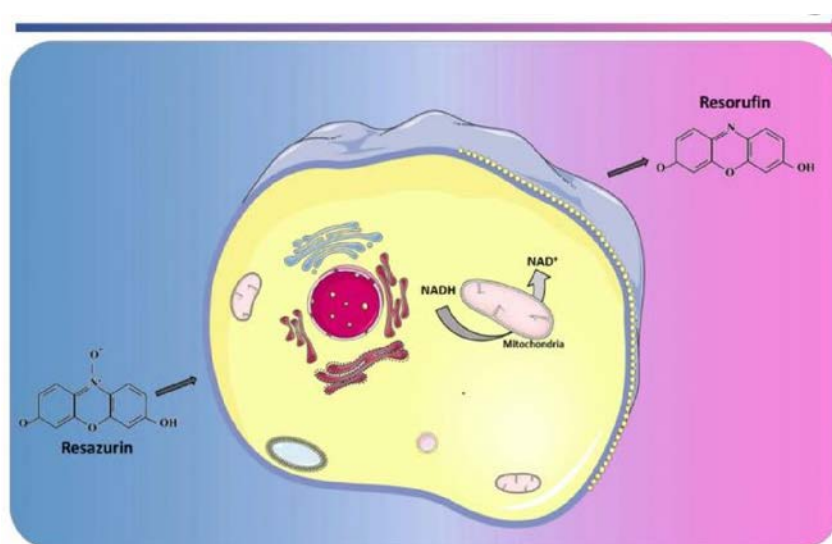
1. Πραγματοποίηση αραίωσης 1:20 των cDNA του κάθε δείγματος
2. Προετοιμασία των MasterMix για τα 3 γονίδια στόχους SOX5,SOX6 και GDF5 και το γονίδιο αναφοράς GAPDH
3. Προσθήκη 12μl του MasterMix στις κατάλληλες θέσεις του ειδικού plate της RT-PCR
4. Προσθήκη 3μl cDNA σε κάθε θέση (Τελικός όγκος αντίδρασης=15μl).
5. Προσθήκη 12μl του GAPDH MasterMix στις ανάλογες θέσεις του ειδικού plate της RT-PCR

6. Προσθήκη 3μl cDNA GAPDH σε κάθε θέση (τελικός όγκος αντίδρασης=15μl).
7. Τοποθέτηση του plate στο μηχάνημα της RT-PCR, και επιλογή του επιθυμητού προγράμματος αντίδρασης (60°C).

2.11. Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας με Resazurin

Η δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας με Resazurin αποτελεί μία δοκιμασία φθορισμού που ανιχνεύει την κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα. Σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα, η Resazurin, μία μπλε μη φθορίζουσα χρωστική μετατρέπεται από τα ένζυμα των αφυδρογονασών στη resorufin, μία κόκκινη φθορίζουσα ένωση.

Η φθορίζουσα εκπομπή παρακολουθείται με μήκος κύματος διέγερσης 530–560 nm και μήκος κύματος εκπομπής 590 nm, ενώ η απορρόφηση παρακολουθείται στα 570 nm και 600 nm. Το φθορίζον σήμα που δημιουργείται λόγω της παραπάνω αντίδρασης βρίσκεται σε αναλογία με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων του δείγματος (Petiti et al., 2024) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Αντίδραση μετατροπής της Resazurin στη φθορίζουσα ένωση Resorubin (Petiti et al., 2024)

Σε ΟΑ χονδροκύτταρα, αφού μεταφέρθηκαν σε πλάκα των 96 οπών και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διαμόλυνσης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8, χορηγήθηκε κατάλληλο ποσότητα της Resazurin (10% του όγκου), ακολούθησε επώαση στον κλίβανο για 4 ώρες και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm και 600 nm, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.12. Ανάλυση αποτελεσμάτων RealTimePCR

Τα δεδομένα που προέκυψαν από το λογισμικό της RealTimePCR αναλύθηκαν με βάση τη μέθοδο σύγκρισης των Ct, όπου ο βαθμός της αύξησης ή της μείωσης των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου ενδιαφέροντος κανονικοποιείται σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης ενός εσωτερικού μάρτυρα των δειγμάτων αναφοράς(control), μέσω της σχέσης $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001).

Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μαθηματικοί τύποι:

1. ΔCt : η διαφορά του Ct του γονιδίου ενδιαφέροντος από το Ct του γονιδίου αναφοράς, δηλαδή $\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$
2. $\Delta\Delta Ct$: αποτελεί τη διαφορά του ΔCt του δείγματος της επίδρασης από το ΔCt του δείγματος αναφοράς(control), δηλαδή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{Control}}$
3. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, RQ αποτελεί η σχετική ποσοτικοποίηση

2.13. Βιοπληροφορική Ανάλυση γονιδίων-στόχων του miR-21-5p

Για την εύρεση των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p έγινε χρήση της βάσης δεδομένων miRtaBase που εμπεριέχει γονίδια-στόχους που έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά με διάφορες μεθόδους. Προκειμένου να μελετηθεί η συμμετοχή των γονιδίων-στόχων σε βιολογικές διεργασίες και κυτταρικά μονοπάτια χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα enrichR, όπου έγινε η ανάλυση GO biological processes και Reactome pathways. Η ανάλυση του δικτύου αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια-στόχοι του miR-21-5p πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου STRING: functional protein association networks.

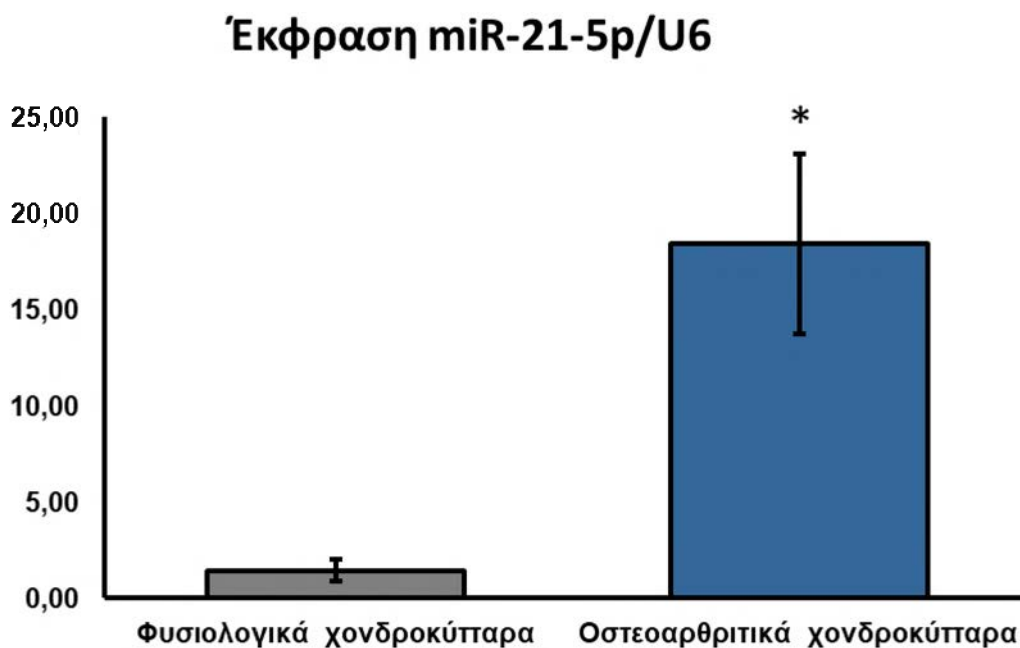
2.14. Στατιστική ανάλυση

Για την πραγματοποίηση της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο SPSS 23, με όριο στατιστικής σημαντικότητας το κατώφλι $p < 0.05$. Τα παρακάτω αποτελέσματα αποτελούν μέσοι όροι (mean), ενώ παρουσιάζεται η τιμή του στατιστικού λάθους (standard error).

3. Αποτελέσματα

3.1. Έκφραση του miR-21-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

Πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), με σκοπό τον εντοπισμό μεταβολών στην έκφραση του miR-21-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά (OA) χονδροκύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς U6. * $p < 0.05$.

3.2. Προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής

Βασίζόμενοι στα αποτελέσματα έκφρασης του miR-21-5p που έδειξαν διαφοροποιημένα επίπεδα του μορίου μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων, ακολούθησε προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p με τη χρήση του εργαλείου miRTarBase. Η βάση δεδομένων miRTarBase παρέχει επιβεβαιωμένους στόχους των miRNAs με βάση πειραματικά δεδομένα. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα που υποστηρίζονται αποκλειστικά από ισχυρές πειραματικές διαδικασίες, όπως η διαδικασίες qPCR, WesternBlot και ReportAssay. Τα αποτελέσματα έδειξαν 50 γονίδια-στόχους του miR-21-5p που έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά με τις ανωτέρω μεθόδους, μεταξύ των οποίων και γονίδια που ανέχονται στην παθογένεια της OA (Πίνακας 1)

[36]

Strong evidence γονίδια-στόχοι του miR-21-5p (MirTarBase)	
APAF1	SMARCA4
FASLG	SOX5
RHOB	STRN
BCL2	TGFBR2
BMPR2	TPM1
CDK6	VHL
CCR7	CDK2AP1
DAXX	ANP32A
E2F1	GDF5
EGFR	RECK
EIF4A2	TP63
FOXO3	LRRFIP1
MSH6	DNM1L
HPGD	RASGRP1
IL12A	PIAS3
IRAK1	DUSP10
SMAD7	ISCU
MMP9	DDAH1
MSH2	CDIP1
MTAP	SOX6
MYD88	SOX17
NFIB	WWC2
PFKFB2	SLC16A10
SERPINB5	ANKRD46
SERPINI1	CASC2

Πίνακας 1: Η λίστα των 50 γονιδίων στόχων που αποκομίστηκε από τη βάση δεδομένων miRTarBase. Τα παραπάνω γονίδια έχουν επιβεβαιωθεί ως στόχοι του miR-21-5p μέσω της πραγματοποίησης των μεθόδων reporter assay, qPCR και Western Blot.

3.3. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p.

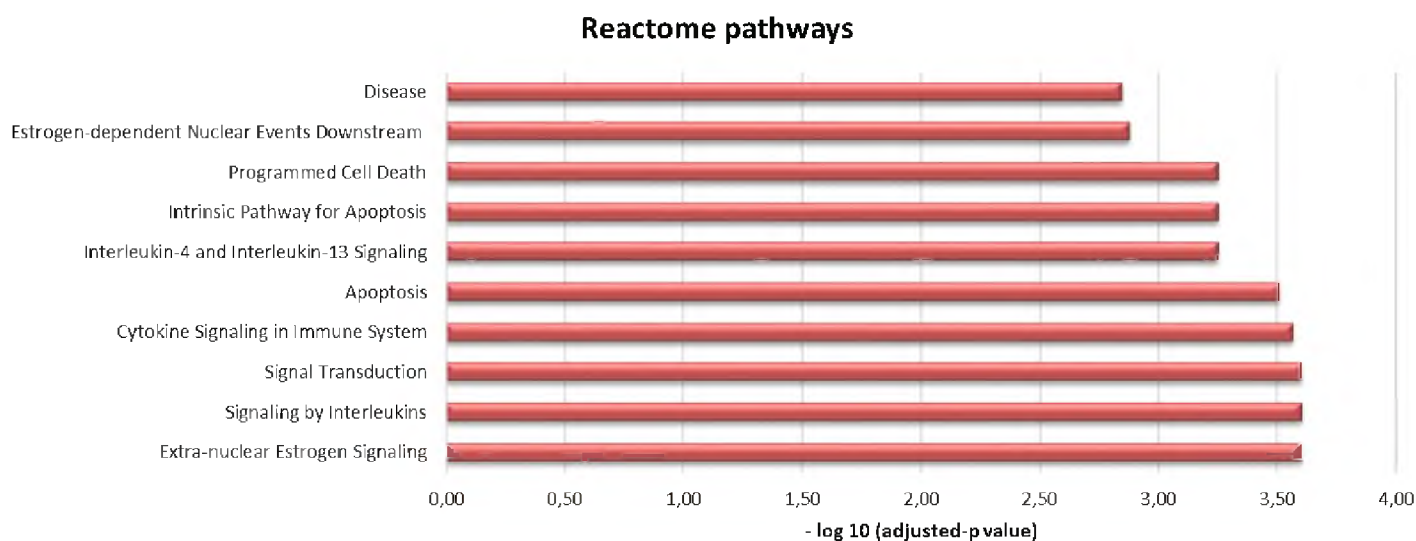
Στην συνέχεια ακολούθησε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO enrichment analysis) και σηματοδοτικών μονοπατιών ώστε να βρεθεί ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p και αν συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες και σηματοδοτικά μονοπάτια που ενέχονται στην εκδήλωση της εκφυλιστικής αρθρίτιδας. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο βιοπληροφορικής *enricherR*.

Από την ανάλυση οντολογίας με σκοπό την εύρεση των βιολογικών διεργασιών που συμμετέχουν τα 50 γονίδια-στόχοι του miR-21-5p προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 7, τα γονίδια στόχοι φαίνεται πως συμμετέχουν στην ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, και η κυτταρική διαφοροποίηση ανάμεσα σε άλλες. Ύψιστου ενδιαφέροντος για την συγκεκριμένη μελέτη αποτέλεσε η συμμετοχή των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p στις διεργασίες της θετικής ρύθμισης της ανάπτυξης του χόνδρου και της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Εφόσον το miR-21-5p ασκεί κατασταλτική επίδραση στα γονίδια-στόχους του, αυτό θα είχε ως πιθανό αποτέλεσμα τελικά την αρνητική ρύθμιση της ανάπτυξης του χόνδρου. Επομένως είναι πιθανό το miR-21-5p να κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΟΑ, και μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της νόσου. Με τις διεργασίες αυτές σχετίστηκαν τρία συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία επίσης φάνηκε πως συμμετέχουν και στον μεγαλύτερο αριθμό των λοιπών διαδικασιών που απεικονίζονται στο διάγραμμα. Τα γονίδια αυτά είναι το *SOX5*, *SOX6* και *GDF5*.



Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης οντολογίας, για την συμμετοχή των 50 γονιδίων-στόχων του miR-21-5p σε βιολογικές διεργασίες.

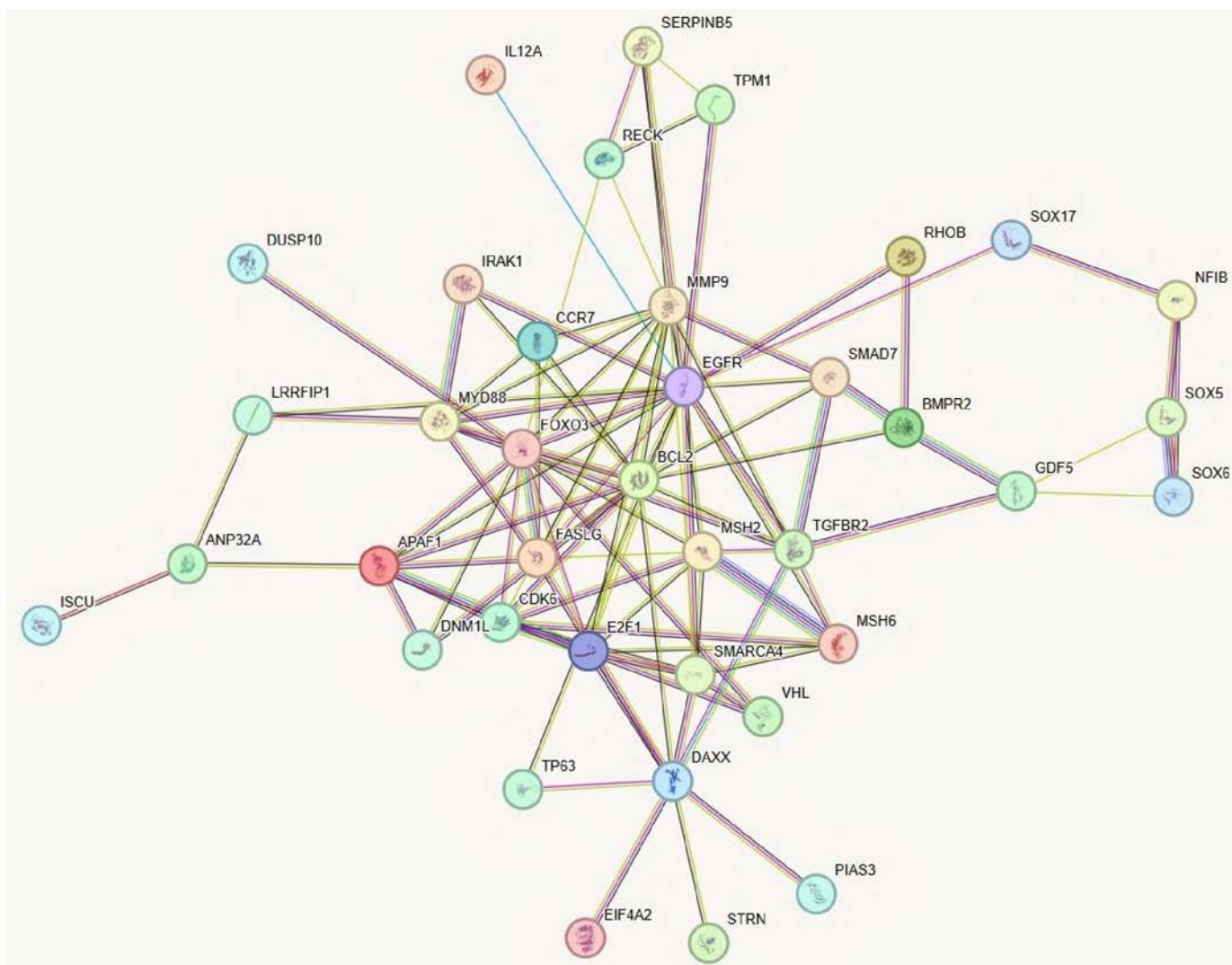
Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Reactome για την εύρεση και των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια-στόχοι του miR-21-5p. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 μεταξύ των κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι του miR-21-5p είναι μονοπάτια που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και την απόπτωση καθώς και τη με δράση των οιστρογόνων, διαδικασίες που παίζουν καίριο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ.



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης Reactome pathways για τα 50 γονίδια-στόχους του miR-21-5p.

3.4. Ανάλυση δικτύου αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (PPI network) των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p.

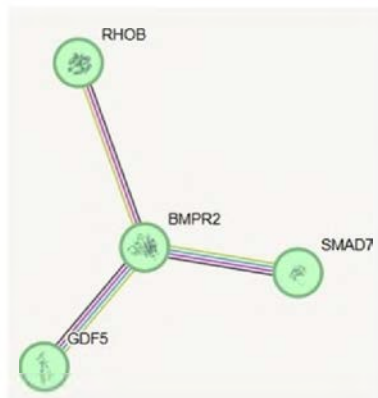
Η ανάλυση του δικτύου αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια-στόχοι του miR-21-5p πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου STRING: functional protein association networks. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 9 από την ανάλυση προέκυψε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων 48 πρωτεϊνών με 104 ζεύγη πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και κατά μέσο όρο, κάθε πρωτεΐνη συνδέεται με περίπου 4 άλλες πρωτεΐνες [PPI enrichment p-value:< 1.0e-16]. Οι 48 πρωτεΐνες φαίνεται να είναι ισχυρά συνδεδεμένες μεταξύ τους και σχηματίζουν λειτουργικές ομάδες/συμπλέγματα που να ανήκουν σε συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία ή μονοπάτια.



Εικόνα 9: Δίκτυο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια-στόχοι του *miR-21-5p*

Ακολούθησε η ομαδοποίηση (clustering) των απεικονιζόμενων πρωτεϊνών εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο MCL. Από την ομαδοποίηση των γονιδίων-στόχων του *miR-21-5p* προέκυψαν δύο ομάδες γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση του χόνδρου και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων που συμμετέχουν στα δύο συμπλέγματα εμφανίζονται τα γονίδια *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ανωτέρω λειτουργικής ανάλυσης (Εικόνα 10).

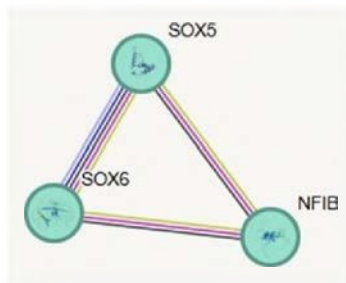
Ομάδα 1



Λειτουργική ανάλυση ΟΜΑΔΑ 1

Terms	Description
GO:0061036	Positive regulation of cartilage development
GO:1902731	Negative regulation of chondrocyte proliferation
GO:0030509	BMP signaling pathway

Ομάδα 2



Λειτουργική ανάλυση ΟΜΑΔΑ 2

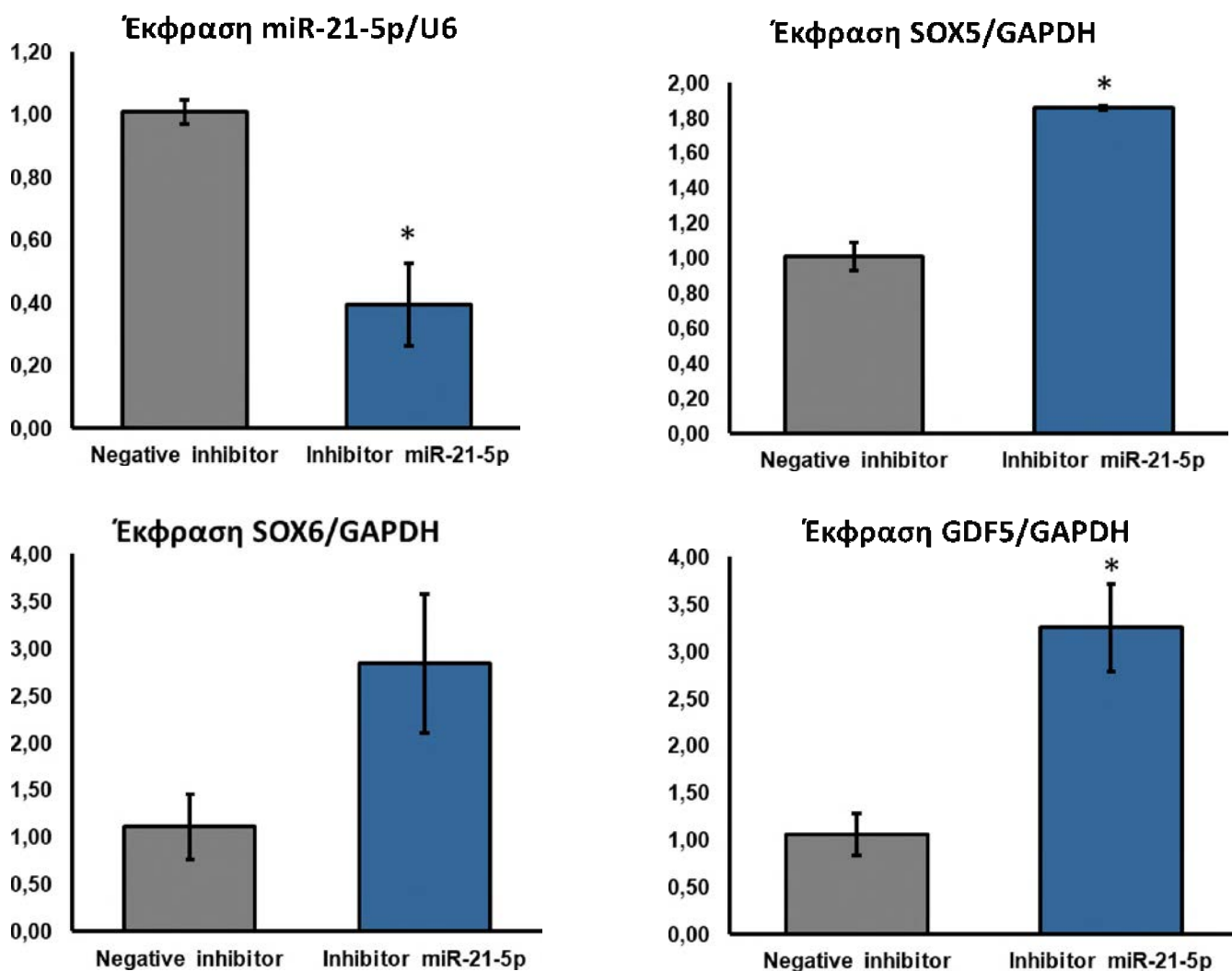
Terms	Description
GO:0002062	Chondrocyte differentiation
GO:0032332	Positive regulation of chondrocyte proliferation
WP474	Endochondral ossification

Εικόνα 10: Ομαδοποίηση και λειτουργική ανάλυση των γονιδίων-στόχων του miR-21-5p που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών

3.5. Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων SOX5, SOX6 και GDF5 μετά από χορήγηση αναστολέα για το miR-21-5p σε κυτταροκαλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης ανέδειξαν τα γονίδια *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* ως στόχους του miR-21-5p που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες και μονοπάτια σχετιζόμενα με την ανάπτυξη του χόνδρου αλλά και της ΟΑ. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ρύθμιση της έκφρασης τους από το miR-21-5p σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση της έκφρασης του miR-21-5p εντός των ΟΑ χονδροκυττάρων με χρήση της τεχνολογίας RNAi και ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης των τριών γονιδίων-στόχων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR (qRT-PCR) για την ανίχνευση πιθανών μεταβολών στα μεταγραφικά επίπεδα των παραγόντων *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* σε ΟΑ χονδροκύτταρα τα οποία είχαν υποστεί μετασχηματισμό με λιποφεκταμίνη και αναστολέα του miR-21-5p. Όπως βλέπουμε στο παρακάτω γράφημα κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της έκφρασης του miR-21-5p, σε σχέση με τη συνθήκη του

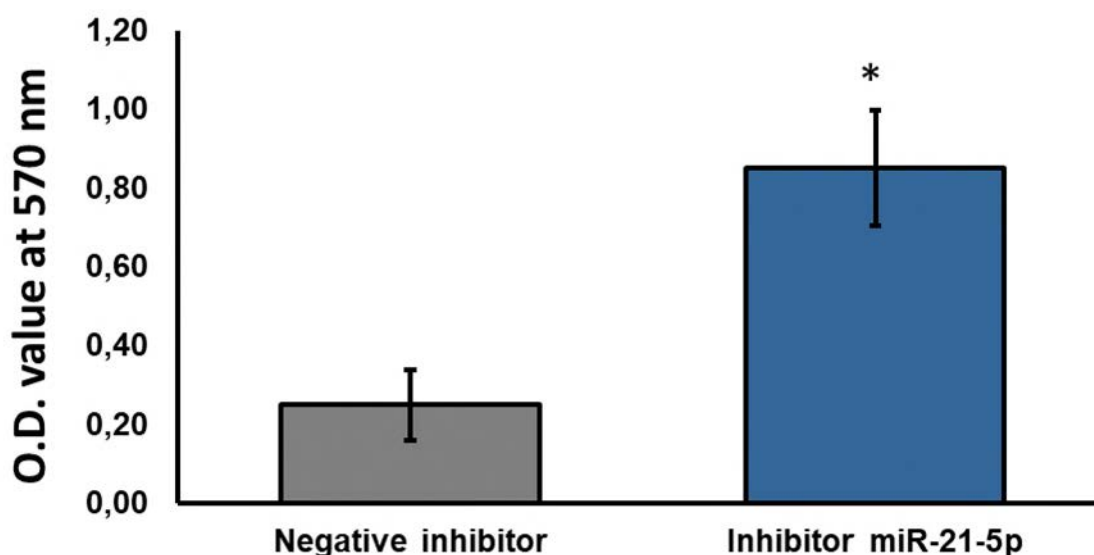
μάρτυρα. Εφόσον τα *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* αποτελούν γνωστοί στόχοι του miR-21-5p, αναμένεται πως κατά την μείωση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA, τα επίπεδα της μεταγραφής των 3 γονιδίων στόχων θα παρουσιαστούν αυξημένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα επίπεδα mRNA και των τριών γονιδίων-στόχων αυξάνονται στα ΟΑ χονδροκύτταρα μετά τη μείωση της έκφρασης του miR-21-5p, αναδεικνύοντας το ρόλο του miR-21-5p στη διαδικασία της ανάπτυξης του φυσιολογικού χόνδρου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα τα οποία υπέστησαν μετασχηματισμό με ειδικό αναστολέα για το miR-21-5p. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς U6. Τα επίπεδα έκφρασης των *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο *GAPDH*. * $p < 0.05$.

3.6. Αποτελέσματα Δοκιμασίας κυτταρικής βιωσιμότητας με Resazurin

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας προκειμένου να δούμε αν η τροποποίηση της έκφρασης του miR-21-5p μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12, η μείωση της έκφρασης του miR-21-5p έχει θετική επίδραση στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των ΟΑ χονδροκυττάρων, αναδεικνύοντας τον mi-21-5p ως έναν πιθανό στόχο που μέσω της τροποποίησης της έκφρασης του θα μπορούσε να αυξήσει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των χονδροκυττάρων, συμβάλλοντας στην αναδόμηση του εκφυλισμένου χόνδρου.



Εικόνα 12: Απεικόνιση της κυτταρικής βιωσιμότητας των χονδροκυττάρων μετά τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p στα ΟΑ χονδροκύτταρα

4. Συζήτηση

Η Οστεοαρθρίτιδα αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα το οποίο επιφέρει την σταδιακή αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου και την επακόλουθη απόπτωση των χονδροκυττάρων (Neogietal., 2025). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα τελικά στάδια της νόσου, ο χόνδρος να έχει εκφυλιστεί πλήρως. Το γεγονός αυτό καθιστά την κινητικότητα της άρθρωσης και συνεπακόλουθα την βάδιση αδύνατη για τον ασθενή. Ο επιπολασμός της οστεοαρθρίτιδας εμφανίζεται υψηλός καθώς η συγκεκριμένη νόσος αποτελεί την πρώτη σε συχνότητα αιτία πρόκλησης αναπηρίας σε παγκόσμιο επίπεδο (Neogietal., 2025). Με βάση τα

παραπάνω δεδομένα καθίσταται προφανής η ύψιστη σημασία της εύρεσης μίας αποτελεσματικής θεραπείας για την οστεοαρθρίτιδα. Οι διαθέσιμες μέχρι σήμερα θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες διαχωρίζονται σε φαρμακευτικές, μη φαρμακευτικές και χειρουργικές, παρουσιάζουν ανικανότητα πλήρους ίασης του οστεοαρθρικού φαινοτύπου (Quickeetal., 2022). Συμβάλλουν παρόλα αυτά στην επιβράδυνση της εγκαθίδρυσης αυτού και στην καταπράυνση της αίσθησης του πόνου, που αποτελεί και το κύριο σύμπτωμα της νόσου (Hunteretal., 2019). Για το λόγο αυτό, η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει το ενδιαφέρον της προς τη μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων και συγκεκριμένα των μορίων miRNAs, με σκοπό τη διαλεύκανση της συμμετοχής τους στην παθογένεση της νόσου και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Το miR-21-5p προκύπτει από την έκφραση γονιδίου που εντοπίζεται στον γενετικό τόπο *VacuoleMembraneProteinlocus* (VMP1), του χρωμοσώματος 17 (Jenike & Halushka, 2021) και έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για τον πιθανό του ρόλο στην επαγωγή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων. Στη συγκεκριμένη μελέτη σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του miR-21-5p σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα με σκοπό την εξακρίβωση της ύπαρξης διαφορών στα επίπεδα έκφρασης στις δύο ομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το miR-21-5p υπερεκφράζεται στα χονδροκύτταρα που προέρχονται από οστεοαρθρικό χόνδρο σε σχέση με τα φυσιολογικά. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με τα αποτελέσματα οκτώ ανεξάρτητων μελετών (Hoshikawa etal.,2020; Luan etal.,2022; Konteles etal.,2025; Zhang etal.,2020; Zhang etal.,2014; Wang etal.,2019; Ma etal.,2020; Weng etal.,2021). Η πρώτη επιστημονική ομάδα παρατήρησε πως κατά την οστεοαρθρίτιδα τα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p αυξάνουν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR-7 μέσω πρόσδεσης του miRNA και την επαγωγή του χρόνιου πόνου που χαρακτηρίζει την νόσο. Οι Hoshikawaetal επίσης παρατήρησαν μέσω της χορήγησης αναστολέα για το miR-21 ή εναλλακτικά ανταγωνιστή για τους TLR-7υποδοχείς, την επαγωγή μακροχρόνιας αναλγησίας. Επομένως, οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως το miR-21-5p αποτελεί ένας υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του κύριου συμπτώματος της ΟΑ. Στην συνέχεια, οι Luanetal στη μελέτη τους επίσης ανίχνευσαν την ενίσχυση των επιπέδων έκφρασης του miR-21 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα υγιή. Επιπρόσθετα απέδειξαν πως το miR-21 αναστέλλει τη δράση του παράγοντα *FGF18* με αποτέλεσμα την ενίσχυση των συνθηκών φλεγμονής στον αρθρικό ιστό, επιδεινώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον οστεοαρθρικό φαινότυπο. Οι Kontelesetal κατά την μελέτη τους πραγματοποίησαν τη χορήγηση μικρών εξωκυτταρικών κυστιδίων τα οποία εμπεριείχαν υψηλά επίπεδα του miR-21-5p σε οστεοαρθρικά κύτταρα προερχόμενα από οστεοαρθρικό υμένα. Αυτό είχε ως

αποτελεσμα την αρνητική ρύθμιση της έκφρασης αναβολικών γονιδίων όπως τα *COL2A1* και *ACAN* και την θετική ρύθμιση καταβολικών γονιδίων όπως είναι τα *MMP-3*, *MMP-13*, και γονίδια που κωδικοποιούν φλεγμονώδεις παράγοντες. Επίσης, απέδειξαν την στόχευση του μεταγράφου του γονιδίου *KLF6* από το miR-21-5p, μέσω της οποίας το συγκεκριμένο miR τελικά επάγει τη ρύθμιση της φλεγμονής στον νοσούντα ιστό. Μία ακόμα μελέτη κατά την οποία ανιχνεύθηκε η συσχέτιση της αύξησης των επιπέδων του miR-21 με την οστεοαρθρίτιδα αποτέλεσε αυτή των Wangetal. Οι ερευνητές παρατήρησαν πως κατά την σίγηση του συγκεκριμένου miR επάχθηκε η αναστροφή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου, καθώς το miR-21 φυσιολογικά ασκεί επίδραση στα επίπεδα της έκφρασης γονιδίων των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης αυτών. Επίσης, απέδειξαν την άμεση στόχευση του μεταγράφου του παράγοντα FGF18 από το miR-21-5p. Κατά την μελέτη των Maetal, επίσης παρατηρήθηκε η αυξημένη έκφραση του miR-21-5p σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα υγιά. Αναλυτικότερα, οι ερευνητές εντόπισαν την άσκηση θετικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων *MMP-13*, *VEGF*, *pERK1/2* και αρνητικής του *Spry1* από το miR-21-5p. Τελικά οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο miRNA συμβάλλει στην επιδείνωση του OA φαινοτύπου μέσω ενίσχυσης της αποδόμησης της ECM των χονδροκυττάρων και επαγωγής της αγγειογένεσης στον χόνδρινο ιστό. Από την άλλη δύο μελέτες ανίχνευσαν την μείωση των επιπέδων του miR-21-5p στα OA χονδροκύτταρα και ανέδειξαν την πιθανή προστατευτική του δράση έναντι στην εγκαθίδρυση του OA φαινοτύπου (Zhu etal.,2019;Qin etal.,2022). Κατά την πρώτη, οι Zhuetal απέδειξαν πως η αύξηση των επιπέδων του miR-21 συμβάλλει στην θετική ρύθμιση των επιπέδων των αναβολικών γονιδίων *COL2A1* και την αρνητική ρύθμιση των αποδομητικών ενζύμων *MMP-13* και *ADAMTS-5*. Επιπλέον κατά την πραγματοποίηση της δοκιμασίας SA-β-gal, παρατηρήθηκε μείωση των κυττάρων που βάφτηκαν από τη χρώση και συνεπακόλουθα αύξηση του βαθμού επιβίωσης των χονδροκυττάρων σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα. Επομένως οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως η δράση του miR-21-5p δρα προστατευτικά, αναστέλλοντας την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων. Από την άλλη στη δεύτερη μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-21 στην παθογένεση της OA και συγκεκριμένα στην πτυχή της ανοσοαπόκρισης. Αρχικά οι Qinetal ανίχνευσαν υψηλά επίπεδα του miR-21-5p στο εσωτερικό αποπτωτικών κυστιδίων προερχόμενων από τα αντιφλεγμονώδη M2 μακροφάγα. Τα κυστίδια αυτά ενδοκυττώνονται από τα ενεργά M1 μακροφάγα και μέσω της ρυθμιστικής δράσης του miR-21-5p, επάγουν την μετατροπή τους προς τον ανενεργό φαινότυπο M2 μέσα σε διάστημα 24 ωρών. Επομένως οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο miR δρα προστατευτικά έναντι της

επιδείνωσης του ΟΑ φαινοτύπου μέσω της καταστολής της εξάπλωσης της φλεγμονής στον χόνδρινο ιστό και της μείωσης του βαθμού απόπτωσης των χονδροκυττάρων.

Από τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό το γεγονός πως ο ρόλος του miR-21-5p στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας παρουσιάζεται σύνθετος και πραγματοποιείται με παραπάνω από ένα μηχανισμούς, αφού το miR-21-5p έχει αποδειχτεί πως συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών μονοπατιών που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη νόσο. Προκειμένου να αναδείξουμε το ρόλο της διαφοροποιημένης έκφρασης του miR-21-5p στον οστεοαρθρικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων, ακολούθησε προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του και λειτουργική ανάλυση για την εύρεση των βιολογικών διεργασιών και μονοπατιών που συμμετέχουν. Με τη χρήση της βάσης δεδομένων miRtaRBase, εξήχθη μία λίστα 50 γονιδίων στόχων του miR-21-5p τα οποία έχουν αποδειχθεί να στοχεύονται από το miR-21-5p μέσω της πραγματοποίησης πειραματικών διαδικασιών όπως είναι η χρήση qPCR, WesternBlot και ReportAssay. Από την ανάλυση οντολογίας που πραγματοποιήθηκε με στόχο την ανίχνευση των βιολογικών διεργασιών που συμμετέχουν τα γονιδια-στόχοι προέκυψε ότι αυτά εμπλέκονται σε κρίσιμες λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η κυτταρική διαφοροποίηση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή αυτών, στη θετική ρύθμιση της ανάπτυξης του χόνδρου και διαδικασίας της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Δεδομένου ότι το miR-21-5p ασκεί κατασταλτική δράση στα γονιδια-στόχους του, το εύρημα αυτό υποδηλώνει πιθανή αρνητική επίδραση της αυξημένης έκφρασης του miRNA στην ανάπτυξη και διατήρηση του χόνδρου. Επίσης, οι στόχοι του miR-21-5p εμπλέκονται σε μονοπάτια που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και την απόπτωση καθώς και με τη δράση των οιστρογόνων, διαδικασίες που παίζουν καίριο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ. Η ανάλυση του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των γονιδίων-στόχων επιβεβαίωσε την εμπλοκή του miR-21-5p με διαδικασίες που σχετίζονται με την χονδρογένεση και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Τέλος, από τη βιοπληροφορική ανάλυση, ξεχώρισαν τρία συγκεκριμένα γονίδια, τα *SOX5*, *SOX6*, και *GDF5* τα οποία συμμετείχαν τόσο στη ρύθμιση της χονδρογένεσης όσο και σε μεγάλο εύρος άλλων κυτταρικών λειτουργιών (Lefebvre et al., 1998; Lefebvre & Smits, 2005; Han & Lefebvre, 2008; Katoku-Kikyo & Kikyo, 2025).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί σε κυτταρικό επίπεδο η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης των *SOX5*, *SOX6*, και *GDF5* από το miR-21-5p, τα χονδροκύτταρα υπέστησαν μετασχηματισμό με αναστολέα για το miR-21-5p, και ακολούθησε ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων στόχων *SOX5*, *SOX6* και *GDF5*. Αρχικά κατά τον μετασχηματισμό των χονδροκυττάρων με τον αναστολέα του miR-21-5p παρατηρήθηκε η πτώση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p ενδογενώς (γεγονός που επιβεβαιώνει την

επιτυχία του μετασχηματισμού), ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των *SOX5* και *GDF5* σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης τους στη συνθήκη του μάρτυρα. Τα επίπεδα έκφρασης του *SOX6* παρουσίασαν επίσης αυξητική τάση έπειτα από τον μετασχηματισμό με τον αναστολέα του miR-21-5p. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των ΟΑ χονδροκυττάρων μετά από τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p, αναδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό εξέλιξης της ΟΑ από το miR-21-5p μέσω της επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης τριών γονιδίων που εμπλέκονται στη χονδρογένεση και κατ' επέκταση στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των χονδροκυττάρων.

Η βιβλιογραφία παρέχει αποτελέσματα μελετών, αν και μικρού αριθμού, που υποστηρίζουν την ρύθμιση της έκφρασης και συνεπώς της δράσης των *SOX5*, *SOX6* και *GDF5* μέσω της δραστηριότητας του miR-21-5p σε πληθώρα κυτταρικών τύπων. Όσον αφορά το πρώτο γονίδιο στόχο *SOX5*, τρεις μελέτες έχουν διερευνήσει την σχέση του με το συγκεκριμένο miRNA. Κατά την πρώτη μελέτη (Tangetal.,2022) αποδείχθηκε η αρνητική ρύθμιση του μεταγράφου του *SOX5* από το miR-21-5p σε κύτταρα Leydig, τα οποία αποτελούν τον κυτταρικό τύπο που εκκρίνει την κύρια ανδρική ορμόνη, την τεστοστερόνη. Παρατηρήθηκε πως μέσω της επίτευξης της παραπάνω αλληλεπίδρασης ασκείται ρύθμιση στον πολλαπλασιαστικό και αποπτωτικό ρυθμό των συγκεκριμένων κυττάρων. Κατά τη δεύτερη μελέτη (Aguennouzet al.,2021), διερευνήθηκε ο ρόλος της ρύθμισης του *SOX5* από το miR-21-5p στη διαδικασία της μελανογένεσης, στο πλαίσιο της πάθησης της λεύκης. Αρχικά οι ερευνητές ανίχνευσαν αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του miR-21-5p σε ασθενείς με λεύκη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων. Επίσης παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα του miR-21-5p παρουσίαζαν αναλογία με την σοβαρότητα της ασθένειας και την ένταση των συμπτωμάτων αυτής. Όταν επάχθηκε ο μετασχηματισμός μελανοκυττάρων με μόριο mimic για το miR-21-5p εντοπίστηκε η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *MITF*, και η μείωση των επιπέδων των παραγόντων β-κατενίνης, *CDK2* και *SOX5*. Τέλος στην τρίτη έρευνα (Fangetal.,2022), αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε ο ρόλος του miR-21-5p στη ρύθμιση του αγγειογεννητικού και οστεογεννητικού δυναμικού των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από τον ομφάλιο λώρο, όπου επίσης παρατηρήθηκε η στόχευση του *SOX5* από το συγκεκριμένο miRNA.

Όσον αφορά την στόχευση του μεταγράφου του παράγοντα *SOX6* από το miR-21-5p, έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης δύο ερευνών (Zhou et al.,2020). Στην πρώτη διερευνήθηκε στο πλαίσιο του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Αποδείχθηκε πως μέσω της αρνητικής ρύθμισης του *SOX6* το miR-21-5p επάγει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων που επέρχονται κατά τη μετάσταση. Στη δεύτερη

μελέτη (Bai et al., 2016) διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-21-5p στην διαφοροποίηση των προγονικών ηπατοκυττάρων προς κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Αποδείχθηκε πως το miR-21-5p μέσω της στόχευσης του μεταγράφου του *SOX6* ενεργοποιεί την εκκίνηση της διαφοροποίησης, ενώ στην περίπτωση ενίσχυσης του *SOX6* η διαδικασία αυτή αναστέλλεται.

Όσον αφορά τη στόχευση του μεταγράφου του *GDF5* από το miR-21-5p, η διαθέσιμη βιβλιογραφία αφορά αποκλειστικά την αλληλεπίδραση τους στο πλαίσιο της οστεοαρθρίτιδας. Οι Zhang et al. στην μελέτη τους, εντόπισαν την αυξημένη έκφραση του miR-21-5p στην TMJ (Temporomandibular Joint) οστεοαρθρίτιδα, η οποία επέφερε την αρνητική ρύθμιση του παράγοντα *GDF5* με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων καταβολικών παραγόντων όπως η μεταλλοπρωτεάση 13. Όταν προκλήθηκε η σίγηση της έκφρασης του miR-21-5p παρατηρήθηκε η αύξηση των επιπέδων του *GDF5* και η αναστροφή των επιπτώσεων της αναστολής του στον ΟΑ φαινότυπο (Zhang et al., 2020). Μία ακόμα ερευνητική ομάδα μελέτησε την ρύθμιση του *GDF5* από το miR-21-5p και οδηγήθηκε στο συμπέρασμα πως μέσω αυτού του μονοπατιού το miR-21 επιδρά στην εξέλιξη της ΟΑ, καθώς επάγει την αναστολή της χονδρογένεσης (Zhang et al., 2014). Τέλος, μία έρευνα έχει εστιάσει στην επίδραση ενός αναστολέα του παράγοντα *Nfκβ* οποίος αποτελεί γνωστός μεταγραφικός παράγοντας του γονιδίου του miR-21-5p, στην απόπτωση των χονδροκυττάρων και την ενεργοποίηση των ινοβλαστών (Weng et al., 2021). Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση του άξονα miR-21-5p/*GDF5/SOX5*. Βρέθηκε πως στην οστεοαρθρίτιδα παρατηρείται η υπερέκφραση των παραγόντων *NFκβ*, *TNF-α*, *IL-6* και του ρυθμιστικού μορίου miR-21-5p. Επίσης αποδείχθηκε πως τα ίδια τα ΟΑ κύτταρα επάγουν την απόπτωση των εναπομεινάντων υγιών κυττάρων του χόνδρινου ιστού μέσω καταστολής της έκφρασης γονιδίων όπως είναι τα *SOX5*, *TGF-β1* και *GDF5*. Όταν χορηγήθηκε στα ΟΑ χονδροκύτταρα μόριο αναστολέας του παράγοντα *NFκβ* επάχθηκε η πτώση των επιπέδων έκφρασης του miR-21-5p που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των *SOX5*, *GDF5*, *TGF-β1*, *BMPI2* και *COL4A1*, ενώ συνεπακόλουθα παρατηρήθηκε η μείωση του αποπτωτικού ρυθμού των υγιών χονδροκυττάρων.

Από τη μελέτη των προαναφερθέντων βιβλιογραφικών πηγών καθίσταται εμφανής ο διττός ρόλος του miR-21-5p στην οστεοαρθρίτιδα. Η πλειοψηφία των ερευνών υποστηρίζει την επιζήμια δράση του miR-21-5p στην ομοίωση του χόνδρινου ιστού, καθώς υποδεικνύουν την ικανότητα του να ενισχύει τη φλεγμονή, την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας των χονδροκυττάρων και να επάγει την πρόκληση του πόνου στην άρθρωση. Τις παραπάνω λειτουργίες ενεργοποιεί μέσω αρνητικής ρύθμισης παραγόντων όπως ο *FGF18* και ο *Spry1*, την θετική ρύθμιση καταβολικών και προφλεγμονώδων γονιδίων και τέλος την ενεργοποίηση του υποδοχέα *TLR7* (Hoshikawa et al., 2020; Luan et al.,

2022; Konteles et al., 2025; Wang et al., 2019; Ma et al., 2020). Παράλληλα κάποιες μελέτες έχουν αποδείξει την μείωση των επιπέδων του miR-21-5p κατά τον οστεοαρθρικό φαινότυπο και υποστηρίζουν τον πιθανό προστατευτικό ρόλο του έναντι της εξέλιξης της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις το miR-21-5p δρα μέσω της θετικής ρύθμισης γονιδίων που σχετίζονται με τον αναβολικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων, ενώ επίσης έχει αποδειχτεί πως συμμετέχει στον επαναπρογραμματισμό των μακροφάγων προς τον ανενεργό τους φαινότυπο με αποτέλεσμα να αποτρέπει την εγκαθίδρυση της φλεγμονής στον χόνδρινο ιστό (Zhu et al., 2019; Qin et al., 2022). Επομένως, το miR-21-5p φαίνεται να συμμετέχει σε περισσότερες από μία πτυχές της παθοφυσιολογίας της OA (φλεγμονή, αποδόμηση της ECM, αίσθηση του πόνου), οπού παρουσιάζει διπλή φύση, η οποία πιθανώς εξαρτάται από το περιβάλλον του κυττάρου, το στάδιο της νόσου αλλά και τις αποκλίνουσες πειραματικές συνθήκες της κάθε έρευνας. Το γεγονός αυτό αν και καθιστά ακόμη πιο περίπλοκο το δίκτυο ρύθμισης του miR-21-5p στην OA, πιθανώς σημαίνει την δυνατότητα χρήσης του συγκεκριμένου miRNA ως θεραπευτικό στόχο στην μία περίπτωση και βιοδείκτη στην άλλη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως η μείωση της έκφρασης του miR-21-5p, του οποίου η έκφραση είναι αυξημένη στα OA χονδροκύτταρα, μπορεί να αυξήσει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν θετικά στη ρύθμιση ανάπτυξης του αρθρικού χόνδρου συμβάλλοντας στην αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων. Ωστόσο, προκειμένου να διαλευκανθεί σε μεγαλύτερο βαθμό ο ρόλος του miR-21-5p στη διαδικασία της εξέλιξης του οστεοαρθρικού φαινοτύπου είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση εκτενέστερων πειραματικών διαδικασιών. Εκτός από τη συνθήκη μετασχηματισμού των κυττάρων με αναστολέα για το miR-21-5p είναι απαραίτητη και συνθήκη υπερέκφρασης του miR-21-5p σε χονδροκύτταρα. Τέλος, προκειμένου να αποκομιστούν περισσότερες πληροφορίες για τον μηχανισμό του άξονα miR-21-5p και των τριών γονιδίων στόχων του, και στις δύο συνθήκες, θα πρέπει μελετηθεί τόσο σε επίπεδο RNA αλλά και πρωτεΐνης η έκφραση των παραγόντων *GDF5*, *SOX5* και *SOX6* καθώς και των καθοδικών μορίων στόχων τους που σχετίζονται με την διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου (*ACAN*, *COL1A1*) και τη ρύθμιση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος της άρθρωσης.

5. Βιβλιογραφία

Deveza LA, Robbins SR, Duong V, Fu K, Wajon A, Eyles JP, et al. Greater efficacy of a combination of conservative therapies for thumb base OA in individuals with lower radial subluxation - a pre-planned subgroup analysis of the COMBO trial. *Osteoarthritis and Cartilage* 2021;29:1498–506. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.07.010>.

Yu SP, Hunter DJ. Managing osteoarthritis. *Aust Prescr* 2015;38:115–9. <https://doi.org/10.18773/AUSTPRESCR.2015.039>.

Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M., Kraus, V. B., Lohmander, L. S., Abbott, J. H., Bhandari, M., Blanco, F. J., Espinosa, R., Haugen, I. K., Lin, J., Mandl, L. A., Moilanen, E., Nakamura, N., Snyder-Mackler, L., Trojian, T., ... McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11), 1578–1589. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.011>

American Academy of Orthopaedic Surgeons. (2016). Surgical management of osteoarthritis of the knee: Evidence-based clinical practice guideline. American Academy of Orthopaedic Surgeons. https://www.aaos.org/globalassets/quality-and-practice-resources/surgical-management-knee/smoak-cpg_4.22.2016.pdf

Lohmander, L. S., Saxne, T., & Heinegård, D. K. (1994). Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(1), 8–13. <https://doi.org/10.1136/ard.53.1.8>

Tseng, S., Reddi, A. H., & Di Cesare, P. E. (2009). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): A biomarker of arthritis. *Biomarker Insights*, 4, 33–44. <https://doi.org/10.4137/BMI.S2095>

Sowers, M. F., Karvonen-Gutierrez, C. A., Yosef, M., et al. (2009). Longitudinal changes of serum COMP and urinary CTX-II predict X-ray defined knee osteoarthritis severity and stiffness in women. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(12), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.06.001>

Jung, M., Christgau, S., Lukoschek, M., et al. (2004). Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology*, 71(2), 70–76. <https://doi.org/10.1159/000074419>

Livshits, G., Zhai, G., Hart, D. J., et al. (2009). Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. *Arthritis & Rheumatism*, 60(7), 2037–2045. <https://doi.org/10.1002/art.24598>

Goldring, M. B. (2000). Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Current Rheumatology Reports*, 2(6), 459–465. <https://doi.org/10.1007/s11926-000-0021-y>

Francisco, V., Ruiz-Fernández, C., Pino, J., et al. (2019). Adipokines: Linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochemical Pharmacology*, 165, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.030>

- Courties, A., Sellam, J., & Berenbaum, F. (2017). Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 29(2), 214–222. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000373>
- Tchetina, E. V., Markova, G. A., & Sharapova, E. P. (2020). Insulin resistance in osteoarthritis: Similar mechanisms to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2020, 4143802. <https://doi.org/10.1155/2020/4143802>
- Gao, Y.-H., Zhao, C.-W., Liu, B., et al. (2020). An update on the association between metabolic syndrome and osteoarthritis and on the potential role of leptin in osteoarthritis. *Cytokine*, 129, 155043. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155043>
- Mobasheri, A., Thudium, C. S., Bay-Jensen, A. C., Maleitzke, T., Geissler, S., Duda, G. N., & Winkler, T. (2023). Biomarkers for osteoarthritis: Current status and future prospects. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 37(2), 101852. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2023.101852>
- Eyre, D. R. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research*, 4(1), 30–35. <https://doi.org/10.1186/ar380>
- Roughley, P. J., & Lee, E. R. (1994). Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microscopy Research and Technique*, 28(5), 385–397. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070280504>
- Li, Y., Wang, Y., Chubinskaya, S., Schoeberl, B., Florine, E., Kopesky, P., Grodzinsky, A. J., & Gibson, M. A. (2023). Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>
- Leung, V. Y. L., Gao, B., Leung, K. K. H., Melhado, I. G., Wynn, S. L., Au, T. Y. K., Dung, N. W. F., Lau, J. Y. B., Mak, A. C. Y., Chan, D., & Cheung, K. M. C. (2011). SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genetics*, 7(11), e1002356. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002356>
- Phull AR, Eo SH, Abbas Q, Ahmed M, Kim SJ. Applications of Chondrocyte Based Cartilage Engineering: An Overview. *Biomed Res Int* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1879837>.
- Bai Y, Gong X, Dou C, Cao Z, Dong S. Redox control of chondrocyte differentiation and chondrogenesis. *Free Radic Biol Med* 2019;132:83–9. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.10.443>.
- Prein C, Beier F. ECM signaling in cartilage development and endochondral ossification. *Curr Top Dev Biol* 2019;133:25–47. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2018.11.003>.
- Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 2006;12:1971–84. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.12.1971>.
- Michigami T. Current understanding on the molecular basis of chondrogenesis. *Clin Pediatr Endocrinol Case Reports Clin Investig Off J Japanese Soc Pediatr Endocrinol* 2014;23:1–8. <https://doi.org/10.1292/CPE.23.1>.

- Lefebvre, V., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and cartilage*, 9 Suppl A, S69–S75. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0447>
- Zhang, Q., Ji, Q., Wang, X., Kang, L., Fu, Y., Yin, Y., Li, Z., Liu, Y., Xu, X., & Wang, Y. (2015). SOX9 is a regulator of ADAMTSs-induced cartilage degeneration at the early stage of human osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(12), 2259–2268. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.06.014>
- DeLise, A. M., Fischer, L., & Tuan, R. S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(5), 309–334. <https://doi.org/10.1053/joca.1999.0306>
- Li J, Dong S. The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation. *Stem Cells Int* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2470351>.
- Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:658–65. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.11.068>.
- Rim YA, Nam Y, Ju JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072358>.
- Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:4197–211. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0498-0>.
- Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells* 2020;43:168–75. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2019.0244>.
- Baker-Lepain, J. C., & Lane, N. E. (2010). Relationship between joint shape and the development of osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(5), 538–543. <https://doi.org/10.1097/BOR.0B013E32833D20AE>,
- Bliddal, H., Leeds, A. R., & Christensen, R. (2014). Osteoarthritis, obesity and weight loss: Evidence, hypotheses and horizons - a scoping review. *Obesity Reviews*, 15(7), 578–586. <https://doi.org/10.1111/OBR.12173>,
- Courties, A., Gualillo, O., Berenbaum, F., & Sellam, J. (2015). Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), 1955–1965. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.05.016>
- de Lange-Brokaar, B. J. E., Ioan-Facsinay, A., van Osch, G. J. V. M., Zuurmond, A. M., Schoones, J., Toes, R. E. M., Huizinga, T. W. J., & Kloppenburg, M. (2012). Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: A review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(12), 1484–1499. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.08.027>
- Felson, D. T. (2013). Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.09.012>

- Liu-Bryan, R., & Terkeltaub, R. (2015). Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1), 35–44. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2014.162>,
- Louati, K., Vidal, C., Berenbaum, F., & Sellam, J. (2015). Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: Systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open*, 1(1). <https://doi.org/10.1136/RMDOPEN-2015-000077>,
- Sellam, J., & Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(11), 625–635. <https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2010.159>,
- Wang, Q., Rozelle, A. L., Lopus, C. M., Scanzello, C. R., Song, J. J., Larsen, D. M., Crish, J. F., Bebek, G., Ritter, S. Y., Lindstrom, T. M., Hwang, I., Wong, H. H., Punzi, L., Encarnacion, A., Shamloo, M., Goodman, S. B., Wyss-Coray, T., Goldring, S. R., Banda, N. K., Robinson, W. H. (2011). Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nature Medicine*, 17(12), 1674–1679. <https://doi.org/10.1038/NM.2543>,
- Grodzinsky, A. J. (1983). ELECTROMECHANICAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CONNECTIVE TISSUE. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 9(2), 133–199.
- Guilak, F., Alexopoulos, L. G., Upton, M. L., Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A., & Haider, M. A. (2006). The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), 498–512. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.011>
- Hunziker, E. B., Quinn, T. M., & Häuselmann, H. J. (2002). Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(7), 564–572. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0814>
- Maroudas, A. (1975). Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. *Biorheology*, 12(3–4), 233–248. <https://doi.org/10.3233/BIR-1975-123-416>,
- Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A., & Rosenberg, L. (1982). An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *Journal of Cell Biology*, 93(3), 921–937. <https://doi.org/10.1083/JCB.93.3.921>,
- Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A., Tang, L. H., Choi, H., & Rosenberg, L. (1980). Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 28(7), 621–635. <https://doi.org/10.1177/28.7.6156200>,
- Quinn, T. M., Hunziker, E. B., & Häuselmann, H. J. (2005). Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(8), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.011>

Vanwanseele, B., Lucchinetti, E., & Stüssi, E. (2002). The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: Current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(5), 408–419. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0529>

Ishibashi, O., Hayashi, M., Horikawa, A., Owada, H., Miyamoto, R., Mizukami, N., & Inui, T. (2022). The Role of miR-217-5p in the Puromycin Aminonucleoside-Induced Morphological Change of Podocytes. *Non-coding RNA*, 8(3), 43. <https://doi.org/10.3390/ncrna8030043>

Strmsek, Z., & Kunej, T. (2015). MicroRNA Silencing by DNA Methylation in Human Cancer: a Literature Analysis. *Non-coding RNA*, 1(1), 44–52. <https://doi.org/10.3390/ncrna1010044>

Grenda, A., Budzyński, M., & Filip, A. A. (2013). Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych [Biogenesis of microRNAs and their role in the development and course of selected hematologic disorders]. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 67, 174–185. <https://doi.org/10.5604/17322693.1038361>

Pu, M., Chen, J., Tao, Z., Miao, L., Qi, X., Wang, Y., & Ren, J. (2019). Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(3), 441–451. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2940-7>

Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., & Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & development*, 21(15), 1857–1862. <https://doi.org/10.1101/gad.1566707>

Eastlack, S. C., & Alahari, S. K. (2015). MicroRNA and Breast Cancer: Understanding Pathogenesis, Improving Management. *Non-coding RNA*, 1(1), 17–43. <https://doi.org/10.3390/ncrna1010017>

Xia, B., Di Chen, Zhang, J., Hu, S., Jin, H., & Tong, P. (2014). Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcified tissue international*, 95(6), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9917-9>

Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., Zhong, Y., He, T., Chen, S., & Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>

Nedunchezhiyan, U., Varughese, I., Sun, A. R., Wu, X., Crawford, R., & Prasad, I. (2022). Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Frontiers in immunology*, 13, 907750. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.907750>

Caldo, D., Massarini, E., Rucci, M., Deaglio, S., & Ferracini, R. (2024). Epigenetics in Knee Osteoarthritis: A 2020-2023 Update Systematic Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 14(2), 269. <https://doi.org/10.3390/life14020269>

Balaskas, P., Goljanek-Whysall, K., Clegg, P. D., Fang, Y., Cremers, A., Smagul, A., Welting, T. J. M., & Peffers, M. J. (2023). MicroRNA Signatures in Cartilage Ageing and Osteoarthritis. *Biomedicines*, 11(4), 1189. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041189>

Liu, SC., Chuang, SM., Hsu, CJ. et al. CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression. *Cell Death Dis* 5, e1485 (2014). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.453>

Moran-Moguel, Maria Cristina, Petarra-del Rio, Stefania, Mayorquin-Galvan, Evangelina E., Zavala-Cerna, Maria G., Rheumatoid Arthritis and miRNAs: A Critical Review through a Functional View, *Journal of Immunology Research*, 2018, 2474529, 16 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2474529>

Alwani, A., & Baj-Krzyworzeka, M. (2021). mikroRNA jako cel terapeutyczny w chorobach nowotworowych [MiRNAs - targets in cancer therapy]. *Postepy biochemii*, 67(3), 259–267. https://doi.org/10.18388/pb.2021_390

Balaskas, P., Goljanek-Whysall, K., Clegg, P. D., Fang, Y., Cremers, A., Smagul, A., Welting, T. J. M., & Peffers, M. J. (2023). MicroRNA Signatures in Cartilage Ageing and Osteoarthritis. *Biomedicines*, 11(4), 1189. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041189>

Szala, D., Kopańska, M., Trojaniak, J., Jabłoński, J., Hanf-Osetek, D., Snela, S., & Zawlik, I. (2024). The Role of MicroRNAs in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 25(12), 6352. <https://doi.org/10.3390/ijms25126352>

Jenike, A. E., & Halushka, M. K. (2021). miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>

Pfeffer, S. R., Yang, C. H., & Pfeffer, L. M. (2015). The Role of miR-21 in Cancer. *Drug development research*, 76(6), 270–277. <https://doi.org/10.1002/ddr.21257>

Sheedy F. J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Frontiers in immunology*, 6, 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00019>

Surina, S., Fontanella, R. A., Scisciola, L., Marfella, R., Paolisso, G., & Barbieri, M. (2021). miR-21 in Human Cardiomyopathies. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 767064. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.767064>

Song, J., Ahn, C., Chun, C. H., & Jin, E. J. (2014). A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 32(12), 1628–1635. <https://doi.org/10.1002/jor.22718>

Zhang, A., Zhang, Y., & colleagues. (2020). Knockout of miR-21-5p alleviates cartilage matrix degradation and TMJ-OA progression. *Bone & Joint Research*, 9(10), 689–700. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.910.BJR-2019-0234.R1>

Zhu, H., Yan, X., Zhang, M., Ji, F., & Wang, S. (2019). miR-21-5p protects IL-1 β -induced human chondrocytes from degradation. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 14, 118. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1160-7>

Qin, L., Yang, J., et al. (2022). The miR-21-5p enriched in the apoptotic bodies of M2 macrophage-derived extracellular vesicles alleviates osteoarthritis by changing macrophage

phenotype. International Journal / Journal details (online). <https://doi.org/10.3390/...> / PMID: PMC10308169. (Εκδοση πρόσβασης: full text στο PMC).

Luan, J., Che, G., Man, G., & Xiao, F. (2022). Ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng* attenuates monoiodoacetate-induced osteoarthritis by inhibiting miR-21-5p/FGF18-mediated inflammation. *Journal of Food Biochemistry*, 46, e14340. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14340>.

Weng, P.-W., et al. (2021). Novel NF-κB inhibitor SC75741 mitigates chondrocyte degradation and OA progression via NF-κB/miR-21 axis. *International Journal / Molecular paper* (2021). PMC article: Novel NFκB inhibitor SC75741 mitigates chondrocyte degradation and preserves chondrogenesis in osteoarthritis (PMCID: PMC8538686).

Konteles, V., Papathanasiou, I., Tzetis, M., Kriebardis, A., & Tsezou, A. (2025). Synovial fibroblast extracellular vesicles induce inflammation via delivering miR-21-5p in osteoarthritis. *Cells*, 14(7), 519. <https://doi.org/10.3390/cells14070519>.

Wang, X. B., Zhao, F. C., Yi, L. H., Tang, J. L., Zhu, Z. Y., Pang, Y., Chen, Y. S., Li, D. Y., Guo, K. J., & Zheng, X. (2019). MicroRNA-21-5p as a novel therapeutic target for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, kez102. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez102>

Zhang, Y., Jia, J., Yang, S., Liu, X., Ye, S., and Tian, H. (2014). MicroRNA-21 Controls the Development of Osteoarthritis by Targeting GDF-5 in Chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 46, e79. doi:10.1038/emmm.2013.152

Chen, C., Liu, Y. M., Fu, B. L., Xu, L. L., & Wang, B. (2021). MicroRNA-21: An Emerging Player in Bone Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 12, 722804. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.722804>

Ma, S., Zhang, A., Li, X., Zhang, S., Liu, S., Zhao, H., Wu, S., Chen, L., Ma, C., & Zhao, H. (2020). MiR-21-5p regulates extracellular matrix degradation and angiogenesis in TMJOA by targeting Spry1. *Arthritis research & therapy*, 22(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2145-y>

Wang, X. B., Zhao, F. C., Yi, L. H., Tang, J. L., Zhu, Z. Y., Pang, Y., Chen, Y. S., Li, D. Y., Guo, K. J., & Zheng, X. (2019). MicroRNA-21-5p as a novel therapeutic target for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, kez102. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez102>

Hoshikawa, N., Sakai, A., Takai, S., & Suzuki, H. (2020). Targeting Extracellular miR-21-TLR7 Signaling Provides Long-Lasting Analgesia in Osteoarthritis. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 19, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.011>

Berenbaum, F., Wallace, I. J., Lieberman, D. E., & Felson, D. T. (2018). Modern-day environmental factors in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(11), 674–681. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0073-x>

Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., & Jordan, K. P. (2010). Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.010>

- Cooper, C., Snow, S., McAlindon, T. E., Kellingray, S., Stuart, B., Coggon, D., & Dieppe, P. A. (2000). Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(5), 995–1000. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200005\)43:5<995::AID-ANR6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200005)43:5<995::AID-ANR6>3.0.CO;2-1)
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3)
- Li, Y., Wei, X., Zhou, J., & Wei, L. (2013). The age-related changes in cartilage and osteoarthritis. *BioMed Research International*, 2013, 916530. <https://doi.org/10.1155/2013/916530>
- Silverwood, V., Blagojevic-Bucknall, M., Jinks, C., Jordan, J. L., Protheroe, J., & Jordan, K. P. (2015). Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(4), 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.019>
- Zhang, Y., & Jordan, J. M. (2010). Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine*, 26(3), 355–369. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.03.001>
- Unair, Muhammad; Khan, Farooq; Khan, Muhammad M.; Hossain, Zahid; Ahmed, Zafar; Aziz, Muhammed (2017). Novel homozygous sequence variants in the GDF5 gene cause Grebe-type acromesomelic dysplasia. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 35(5), 599–603. <https://doi.org/10.1007/s00774-015-0693-z>
- Al-Qattan, Mohammad M.; Addasi, Ashraf M.; Al-Shahrani, Mofteh Matbouly; Al-Mishari, Samir A. (2015). Two novel homozygous missense mutations in the GDF5 gene cause Brachydactyly type C. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(7), 1621–1626. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37040>
- Dawson, Kevin; Henderson, Jayne; Green, Lawrence; McDermott, Tina; Viswanathan, Anuradha; Anderson, Jennifer; Wenstrup, R. J.; Matsumoto, K.; Khatri, Eshwar; Di Rocco, Gian; Zabel, Bernhard; Sebald, Winfried; Mundlos, Stefan; Knaus, Peter (2006). GDF5 is a second locus for multiple-synostosis syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 79(1), 85–91. <https://doi.org/10.1086/504046>
- Leonidou, Andreas; Irving, Melita; Holden, Simon; Katchburian, Marcos (2016). Recurrent missense mutation of GDF5 (p.R438L) causes proximal symphalangism in a British family. *World Journal of Orthopedics*, 7(12), 839–842. <https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i12.839>
- Southam, L.; Rodriguez-Lopez, A.; Wilkins, J.; Word, A. L.; Loughlin, J.; Chapman, K. (2007). A functional SNP in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Human Molecular Genetics*, 16(18), 2226–2232. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm172>
- Faryal, S.; Farooq, Muhammad; Abdullah, U.; Ali, Z.; Saadi, S. M.; Ullah, F.; Khan, K.; Sarwar, Y.; Sher, M.; Chopra, A. A.; Tommerup, N.; Baig, S. M. (2021). A GDF5 frameshift mutation segregating with Grebe-type chondrodysplasia and Brachydactyly Type C+ in a six-generation family: Clinical report and mini-review. *European Journal of Medical Genetics*, 64(7), 104226. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104226>

- Charlier, E., & Hwang, S. (2016). Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2146. <https://doi.org/10.3390/ijms17122146>
- Jiang, H., & Zhang, J. (2023). Connection between osteoarthritis and nitric oxide. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 995978. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.995978>
- Sandell, L. J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*, 3(2), 107–113. <https://doi.org/10.1186/ar14>
- Studer, R. K., & Lotz, M. (2004). Nitric oxide decreases IGF-1 receptor function in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(7), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.04.005>
- Jeffries, M. A., Donica, M., Baker, L., Stevenson, M., Annan, A., Humphrey, M. B., & Sawalha, A. H. (2014). Genome-wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatology*, 66(10), 2804–2815. <https://doi.org/10.1002/art.38762>
- Li, Y., Wang, J., Asadi, A., & Liu, C. (2013). Epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 54(4-5), 270–278. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.828031>
- Steinberg, J., Lian, J. B., & Im, H. J. (2012). Epigenetic regulation of the COL9A1 gene in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 64(12), 3983–3992. <https://doi.org/10.1002/art.34695>
- de Andres, M. C., Ramos, Y. F., van de Loo, F. A., et al. (2013). DNA methylation in osteoarthritis: Differential regulation of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(11), 2033–2041. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.08.005>
- Hashimoto, K., Otero, M., Imagawa, K., de Andres, M. C., Coico, P., & Goldring, M. B. (2013). TET enzymes regulate chondrocyte homeostasis in osteoarthritis through DNA demethylation. *Arthritis & Rheumatism*, 65(7), 2006–2016. <https://doi.org/10.1002/art.37956>
- Coulson, J. M., & McAlinden, A. (2018). Epigenetic regulation of histone modifications in cartilage development and osteoarthritis. *Frontiers in Genetics*, 9, 513. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00513>
- Martinez-Redondo, P., & Vaquero, A. (2013). Histone modifications in the regulation of gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(3), 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.007>
- Barter, M. J., Peffers, M. J., Clegg, P. D., & Young, D. A. (2012). Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(5), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.005>
- Bradley, E. W., & McAlinden, A. (2015). Regulation of chondrogenic genes in osteoarthritis: The role of epigenetic modifications. *Frontiers in Genetics*, 6, 309. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00309>

Caron, M., Richard, D., & McAlinden, A. (2018). Histone deacetylases in cartilage and osteoarthritis: Role of HDACs and SIRT6. *Frontiers in Genetics*, 9, 561. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00561>

Dvir-Ginzberg, M., & Ginsberg, S. D. (2016). Sirtuins and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 21, 1516–1531. <https://doi.org/10.2741/4425>

Lefebvre, V., Li, P., & de Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO Journal*, 17(19), 5718–5733. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5718>

Lefebvre, V., & Smits, P. (2005). Transcriptional control of chondrocyte differentiation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 75(3), 200–212. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20050>

Han, Y., & Lefebvre, V. (2008). L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16), 4999–5013. <https://doi.org/10.1128/MCB.00695-08>

Katoku-Kikyo, N., & Kikyo, N. (2025). METTL14 regulates chondrogenesis through the GDF5–RUNX2/3–collagen axis. *Nature Communications*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59346-5>

Petiti, J., Revel, L., & Divieto, C. (2024). Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*, 14(4), 156. <https://doi.org/10.3390/bios14040156>

Chen, L., Li, Q., Wang, J., Jin, S., Zheng, H., Lin, J., & He, Y. (2018). MiR-485-5p promotes chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in osteoarthritis by targeting SOX9. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(10), 3143–3150. https://doi.org/10.26355/eurrev_201805_15034

Chen, L., Yang, L., & Yao, L. (2017). Role of microRNA-146a in regulating chondrocyte apoptosis in osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 8455–8462. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7708>

Hu, W., & Ecker, M. (2021). Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1742. <https://doi.org/10.3390/ijms22041742>

Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE*, 3(11), e3740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003740>

Kopańska, M., Szala, D., Czech, J., Gabło, N., Gargas, K., Trzeciak, M., & Snela, S. (2017). MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 12(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0542-y>

- Law, H. C. H., Cheung, K. S. C., Sze, K. M. F., Chan, L. W. C., Lee, J. M. F., Ng, E. O. T., Cheung, H. H., Wong, L. Y. R., & Wong, A. S. T. (2021). miR-149-5p regulates inflammatory cytokine production in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 23(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02478-3>
- Li, J., Huang, J., Dai, L., Yu, D., Chen, Q., Zhang, X., & Dai, K. (2012). miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4. *Arthritis Research & Therapy*, 14(2), R75. <https://doi.org/10.1186/ar3797>
- Li, X., Gibson, G., Kim, J. S., Kroin, J., Xu, S., van Wijnen, A. J., & Im, H. J. (2011). MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene*, 480(1–2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.03.003>
- Lian, W. S., Ko, J. Y., Wu, R. W., Sun, Y. C., Chen, Y. S., Wu, S. L., & Wang, F. S. (2018). MicroRNA-128a represses chondrocyte autophagy and exacerbates knee osteoarthritis by disrupting Atg12. *Arthritis & Rheumatology*, 70(2), 201–212. <https://doi.org/10.1002/art.40346>
- Lu, X., Yu, Y., Tan, S., Wang, Z., & Zhang, Z. (2021). MicroRNA-335-5p promotes chondrocyte inflammation by activating the WNT and NF- κ B pathways in osteoarthritis. *International Immunopharmacology*, 96, 107758. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107758>
- Nicolas, F. E., Pais, H., Schwach, F., Lindow, M., Kauppinen, S., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008). Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140. *RNA*, 14(12), 2513–2520. <https://doi.org/10.1261/rna.1188108>
- Pais, H., Nicolas, F. E., Soond, S. M., Swingler, T. E., Clark, I. M., Chantry, A., & Dalmay, T. (2010). Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level. *RNA*, 16(3), 489–494. <https://doi.org/10.1261/rna.1769210>
- Qi, Y., Ma, N., Yan, F., Yu, Z., Wu, G., Qiao, Y., Li, F., Zhang, J., Dong, Z., & Yang, D. (2012). MicroRNA-210 negatively regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting ACVR1. *Bone*, 50(6), 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.03.010>
- Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J. P., Duval, N., & Martel-Pelletier, J. (2009). Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10(1), 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-10-148>
- Yang, J., Qin, S., Yi, C., Ma, G., Zhu, H., & Zhou, W. (2017). MiR-27b regulates chondrocyte differentiation and cartilage development by targeting matrix metalloproteinase 13. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1000–1006. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.138>
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., Yasunaga, Y., Asahara, H., & Ochi, M. (2009). Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 60(4), 1035–1041. <https://doi.org/10.1002/art.24404>

Zhang, L., Su, P., Xu, C., Chen, C., Liang, A., Du, K., Peng, Y., & Huang, D. (2015). MicroRNA expression profile changes in human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Bone*, 88, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.016>

Zhang, Z., Kang, Y., Liu, W., Ma, J., Guo, X., Li, Y., & Wang, R. (2015). Identification of microRNAs involved in osteoarthritis through genome-wide microRNA expression profiling in a rat model of osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 494–502. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3459>

Di Nicola, V. (2020). Degenerative osteoarthritis, a reversible chronic disease. *Regenerative Therapy*, 15, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.07.007>

Dubey, N. K., Mishra, V. K., Dubey, R., Deng, Y.-H., Tsai, F.-C., Deng, W.-P., & Su, C.-W. (2018). Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: A review. *Stem Cells International*, 2018, 5421019. <https://doi.org/10.1155/2018/5421019>

Guilak, F., Nims, R. J., Dicks, A., Wu, C.-L., & Meulenbelt, I. (2018). Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biology*, 71–72, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.008>

Goldring, M. B., & Goldring, S. R. (2015). Changes in the osteoarthritis paradigm. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(11), 651–653. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.110>

Kacprzak, B., Raszewski, G., & Dziegiel, P. (2025). Molecular aspects of cartilage microfracturation: Rehabilitation insights. *Orthopedic Reviews*, 17(2), 129917. <https://doi.org/10.52965/001c.129917>

Kumavat, R., Kumar, V., Raghav, R., & Mohan, V. (2021). Biomarkers of joint damage in osteoarthritis: Current status and future directions. *Journal of Orthopaedic Research*, 39(2), 262–272. <https://doi.org/10.1002/jor.24826>

Neogi, T., Atukorala, I., Malfait, A.-M., Ding, C., Hunter, D. J., & Arden, N. (2025). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 11, 10. <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00594-6>

Zhuo, Q., Yang, W., Chen, J., & Wang, Y. (2012). Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(12), 729–737. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.135>

Hunter, D. J., Bierma-Zeinstra, S., Carr, A., & Pitsillidou, I. (2019). Osteoarthritis. *The Lancet*, 393(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)

Neogi, T., Atukorala, I., Malfait, A.-M., Ding, C., Hunter, D. J., & Arden, N. (2025). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 11, 10. <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00594-6>

Quicke, J. G., Conaghan, P. G., Corp, N., Peat, G., & Thomas, M. J. (2022). Osteoarthritis year in review 2021: Epidemiology & therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.10.007>