



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ microRNAs ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΗΣ
ΑΡΘΡΩΣΗΣ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ»

ΑΛΙΚΗ ΠΑΠΑΖΗΣΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ BSc, MSc

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσέζου Ασπασία (Επιβλέπων/ουσα)

Τραχανά Βαρβάρα (Μέλος)

Τζέτη Μαρία (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, ΕΤΟΣ 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF MEDICINE



LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS

POSTGRADUATE PROGRAMME (MSc)
«HUMAN GENETICS»

**«EXPRESSION PROFILES AND CHARACTERIZATION
OF MicroRNAs
IN PATIENTS TISSUES WITH DEGENERATIVE ARTHRITIS»**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	V
ABSTRACT.....	VI
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	VII
ΜΕΡΟΣ 1^ο - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο – ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	1
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	1
1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΓΟΝΑΤΟΥ.....	3
1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΓΟΝΑΤΟΥ ΜΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	7
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ.....	7
2.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο – ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (miRNA) ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΑ.....	11
3.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΑ.....	11
3.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ microRNA	12
ΜΕΡΟΣ 2^ο – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ - 1 ^ο	21
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ – 2 ^ο	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ - 3 ^ο	40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-16 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου	40
3.2) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-19a σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου	41
3.3) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-19b σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου	42
4) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-21 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου.....	44
3.5) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-125-5p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου	45
3.6) Προσδιορισμός των γονιδίων – στόχων του miR-21 με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων.....	47
3.7) Επιδράσεις σε ΟΑ χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα μηνίσκου με miR-21 για την μελέτη της έκφρασης των TLR-4 και IL-1β	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΕΙΚΟΝΑ 1. ΜΕΡΙΚΟΥΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	2
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΑΡΘΡΩΣΗΣ ΓΟΝΑΤΟΥ	3
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΟΙ ΖΩΝΕΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	4
ΕΙΚΟΝΑ 4. Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΥΜΕΝΑ	4
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΟΙ ΔΙΑΚΡΙΤΕΣ ΖΩΝΕΣ	5
ΚΑΙ Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΗΝΙΣΚΟΥ	5
ΕΙΚΟΝΑ 7. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΜΕΣΩ ELISA ΑΠΟ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΑΡΘΡΙΚΟ ΧΟΝΔΡΟ ²⁹	8
ΕΙΚΟΝΑ 8. Η ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΚΑΤΑΒΟΛΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΚΑΙ Η ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (ΠΧ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ) ΤΗΣ ΥΜΕΝΩΔΟΥΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΟΑ.....	9
ΕΙΚΟΝΑ 9. ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ	10
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	13
ΕΙΚΟΝΑ 11. ΈΝΑΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟ ΤΑ miRNAs ΠΟΥ ΕΝΟΧΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΑ ΚΑΙ ΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	13
ΕΙΚΟΝΑ 12. Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-19a/b ΣΤΗ ΡΑ	18
ΕΙΚΟΝΑ 13. Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-21 ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	19
ΕΙΚΟΝΑ 14.	20
ΟΙ ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ miR-125	20
ΕΙΚΟΝΑ 14. ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ (ΠΑΝΩ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ 48 ΩΡΩΝ (ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ 20x)	24
ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΜΕΝΑ (ΑΡΙΣΤΕΡΑ) ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΗΝΙΣΚΟΥ (ΔΕΞΙΑ)	24
ΕΙΚΟΝΑ 15. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%	26
ΕΙΚΟΝΑ 16. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΜΙΑ DNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ – ΣΤΟΧΟ.....	29
ΕΙΚΟΝΑ 17. ΟΙ ΠΙΟ ΚΟΙΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ REAL TIME PCR.....	30
ΕΙΚΟΝΑ 18. ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (AMPLIFICATION PLOT).....	32
ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗ REAL TIME PCR	32
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-16 ΣΤΑ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	40
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-16 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΟΑ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	41
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-16 ΜΕΤΑΞΥ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	41
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR19a ΣΕ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	42
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-19a ΜΕΤΑΞΥ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΗΝΙΣΚΟΥ	42
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-19b ΣΤΑ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	43
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-19b ΣΤΑ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	43
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-19b ΜΕΤΑΞΥ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΗΝΙΣΚΟΥ	44
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-21 ΣΕ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	45
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-21 ΜΕΤΑΞΥ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΗΝΙΣΚΟΥ	45
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-125-5p ΣΤΑ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	46
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-125-5p ΣΤΑ ΟΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	46
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-125-5p ΜΕΤΑΞΥ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΗΝΙΣΚΟΥ.	47
ΕΙΚΟΝΑ 19. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ miR-21 ΠΟΥ ΣΥΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	48
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-21 ΣΕ ΟΑ ΥΜΕΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ 50nM miR-21 ΓΙΑ 24h ΚΑΙ 48h. ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΙΝΑΙ ΟΜΑΛΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ GAPDH. *p<0.05.....	48
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-21 ΣΕ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ 50nM miR-21 ΓΙΑ 24h ΚΑΙ 48h. ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΙΝΑΙ ΟΜΑΛΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ GAPDH. *p<0.05 NS=NOT SIGNIFICANT (ΜΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ)	49
<i>ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ – ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.....</i>	<i>8</i>
<i>ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ RT – PCR ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΦΕΡΘΕΝΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΓΕΘΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΤΑ Tm ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΚΥΚΛΟΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΗΣ RT – PCR.</i>	<i>47</i>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο και την πλέον κοινή μορφή αρθρίτιδας. Αν και η ΟΑ μέχρι πρόσφατα χαρακτηριζόταν ως μη-φλεγμονώδης νόσος, νέες μελέτες, που συσχετίζουν την εκφύλιση της άρθρωσης ως απόρροια γενετικών, περιβαλλοντικών ή μηχανικών συνιστωσών, αποκάλυψαν πως και η φλεγμονή παίζει ρόλο στην αποδιοργάνωση του αρθρικού χόνδρου. Για το λόγο αυτό αναζητούνται εκείνοι οι βιοδείκτες, με τη βοήθεια των σύγχρονων εργαλείων της μοριακής βιολογίας, τα microRNAs, που συσχετίζουν την ΟΑ με τη φλεγμονή. Αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες, δείκτες εξέλιξης αλλά και δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αναζητηθούν στόχοι microRNAs, που δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένοι για τη νόσο, έτσι ώστε να αποκαλυφθεί η συμβολή τους στην ασθένεια. Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα ασθενών με ΟΑ γονάτου σταδίου III. Οι ιστοί της άρθρωσης που επιλέχθηκαν προς μελέτη είναι ο χόνδρος, ο μηνίσκος και ο υμένας της άρθρωσης του γονάτου. Τα microRNAs που επιλέχθηκαν για προσδιορισμό της έκφρασης τους είναι το **miR-16**, **miR-19a/b**, **miR-21** και **miR-125-5p**. Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Στατιστική σημαντικότητα αναδείχθηκε για το miR-21 καθώς παρουσίασε μειωμένη έκφραση στον ιστό του χόνδρου ($p=0.021$) και του υμένα ($p=0.004$). Τα ευρήματα δείχνουν ότι μπορεί να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του στη φλεγμονή και η απορρύθμιση του μέσα από το μονοπάτι για την εξέλιξη της νόσου.

Λέξεις κλειδιά: ΟΑ, γόνατο, φλεγμονή, μηνίσκος, χόνδρος, υμένας, mir-16, mir19a/b, mir-21, mir-125-5p

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a multifactorial disease and one of the most common form of arthritis. Although osteoarthritis until recently was characterized as a non-inflammatory disease, new evidence that relate the degeneration of the joint as a result of genetic, environmental or mechanical factors, revealed that inflammation plays a role in the disruption of the articular cartilage. Therefore, the modern tools of molecular biology, the microRNAs, help us find those biomarkers that correlate the osteoarthritis with inflammation. These biomarkers can be used as prognostic and growth indicators and potential therapeutic targets. The purpose of this thesis is the discovery of microRNAs targets, which are not specifically studied for the disease, so as to reveal their contribution to it. The case study used 12 samples from patients with stage III knee osteoarthritis. The joint tissues selected are: the cartilage, meniscus, and synovium of the knee joint and the microRNAs selected are **miR-16, miR-19a/b, miR-21 και miR-125-5p**. The results were collected and analyzed using the SPSS statistical program. The miR-21 highlighted a statistical significance as it showed decreased expression in cartilage ($p=0.021$) and synovium ($p=0.004$) tissue. The findings confirm that miR-21 plays a part in the inflammation and the deregulation of it's pathway will help us determine the disease progression.

Keywords: OA, knee joint, inflammation, meniscus, cartilage, synovium, mir-16, mir19a/b, mir-21, mir-125-5p

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανάπτυξη και πρόοδος της επιστημονικής εξέλιξης, τεχνολογικής προόδου, του συστήματος υγείας αλλά και άλλων τομέων της καθημερινότητας, οδήγησαν και οδηγούν σε μια καινούργια πραγματικότητα στο δημογραφικό δείκτη ανά τον κόσμο, όπου η σύνθεση του πληθυσμού αλλάζει με σταδιακή αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Μια διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα τη γήρανση του πληθυσμού, όπου ο αναπτυγμένος αλλά και αναπτυσσόμενος κόσμος επιδίδεται σε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των δεικτών της καθημερινότητας και κυρίως των δεικτών υγείας.

Ασθένειες όπως οι διάφοροι τύποι αρθρίτιδας, εμφανίζονται όλο και πιο συχνά τόσο στο γενικό όσο και στον ηλικιωμένο πληθυσμό και χρίζουν μεγαλύτερης προσοχής. Μία από αυτές είναι και η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) που έχει προεκτάσεις τόσο οικονομικές όσο και κοινωνικές για τη καθημερινή ποιότητα της ζωής του ατόμου. Η σύγχρονη ιατρική με την ερευνητική ανάπτυξη και με τα εργαλεία της μοριακής βιολογίας, βρίσκεται ήδη σε ένα αγώνα για αναζήτηση και βελτίωση των παροχών υγείας με νέα φάρμακα, νέα θεραπευτικά σχήματα και νέες προσεγγίσεις για αναχαίτιση αλλά και ίαση νοσημάτων όπως και η ΟΑ. Μέσα από την έρευνα αυτή αποκαλύπτονται νέοι ρόλοι παραγόντων προώθησης της νόσου, όπως αυτός της φλεγμονής στην ΟΑ, οι οποίοι ενδέχεται να δώσουν νέες κατευθύνσεις για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, έχει σκοπό να διερευνήσει το ρόλο της φλεγμονής στην ΟΑ γόνατος. Πιο συγκεκριμένα να διευρυνθεί η συσχέτιση της φλεγμονής κατά την ανάπτυξη της ΟΑ στους ιστούς του μηνίσκου, του χόνδρου και του υμένα της άρθρωσης του γονάτου με τα μικρά κωδικά RNAs, των οποίων ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

Κατά την ανάπτυξη της εργασίας γίνεται συνοπτική παρουσίαση της νόσου της ΟΑ, στοιχείων των ιστών του γονάτου από όπου χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό καθώς και παραγόντων που οφείλονται για την εμφάνιση της νόσου. Επιπλέον περιγράφεται συνοπτικά η εξέλιξη της φλεγμονής και δίνονται στοιχεία που συσχετίζουν τις δύο καταστάσεις φλεγμονής και ΟΑ μέσα από τη βιβλιογραφία. Διερευνώντας τα χαρακτηρισμένα μοριακά μονοπάτια των microRNA στόχων, αναζητείται ο προσδιορισμός του ρόλου τους και ο χαρακτηρισμός τους, για πρώτη φορά όπως παρουσιάζεται μέσα από την έρευνα για λογαριασμό της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Παρατίθενται οι συσχετισμοί που ανακλύπτουν όπως και στατιστικά στοιχεία για τα ευρήματα από την μελέτη των ιστών των ασθενών για τους συγκεκριμένους microRNA δείκτες. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός νέων στόχων και παραγόντων που έχουν ρόλο στη παθογένεια και ανάπτυξη

της νόσου, ώστε να προάγουν την έρευνα για την βελτίωση της υγείας και της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Στα πλαίσια της εργασίας που πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα της Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Ασπασία Τσέζου για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της διπλωματικής αυτής εργασίας. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τη διδακτορική υπότροφο του εργαστηρίου Ιωάννα Παπαθανασίου για την συνεργασία, καθοδήγηση και συμβολή της στην περάτωση της παρούσας διπλωματικής. Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τις διδακτορικές φοιτήτριες του εργαστηρίου για τη διεξαγωγή της έρευνας και για το ευπρόσδεκτο κλίμα που μου προσέφεραν, καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε μαζί καθ' όλη τη διάρκεια, τόσο για τα θεωρητικό μέρος όσο και για το εργαστηριακό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

ΜΕΡΟΣ 1^ο - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

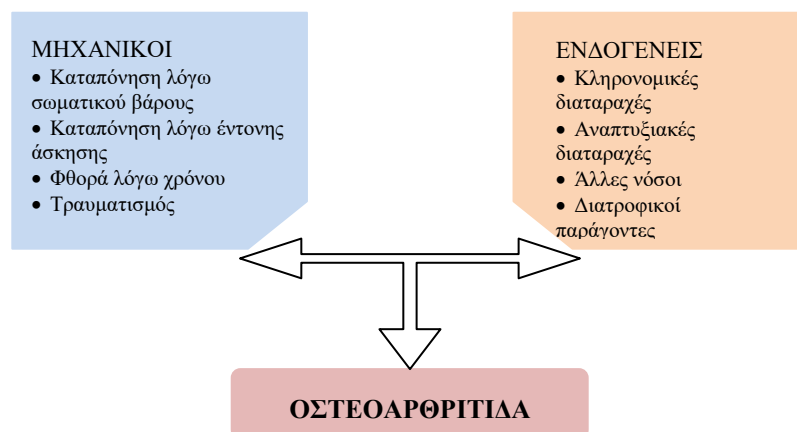
Η Αρθρίτιδα περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων και περισσότερες από 100 συγκαταλέγονται στα γενικά χαρακτηριστικά της νόσου. Κύρια συμπτώματα που συναντώνται στις αρθρίτιδες είναι ο πόνος, η δυσκαμψία, η παραμόρφωση αλλά και το πρήξιμο στις αρθρώσεις.¹ Συγκεκριμένα ασθένειες όπως η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), η Ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), η Ουρική αρθρίτιδα (Ποδάγρα) αποτελούν τις πιο συχνές εκφάνσεις της Αρθρίτιδας. Με βάση την Αμερικανική Ρευματολογική Εταιρεία (American Rheumatism Association) οι αρθρίτιδες ταξινομούνται ως: Ρευματοειδής αρθρίτιδα, Εκφυλιστική αρθρίτιδα (Οστεοαρθρίτιδα, ΟΑ), Ουρική αρθρίτιδα, Charcot joint (Νευροπαθητική αρθρίτιδα), Αρθρίτιδα ειδικών φλεγμονωδών παραγόντων (όπως λόγω μυκοβακτηριδίου φυματίωσης, βρουκέλλας, σαλμονέλλας), Αρθρίτιδα ρευματικού πυρετού, Μέτα-τραυματική αρθρίτιδα, Αρθρίτιδα λόγω νεοπλασμάτων των αρθρώσεων.

Μία από τις αρθρίτιδες, η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), ονομάζεται και *εκφυλιστική αρθρίτιδα*. Συναντάται και με τον όρο *εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων*¹. Αποτελεί τον πιο συχνό τύπο ανάμεσα στις αρθρίτιδες προσβάλλοντας εκατομμύρια ανθρώπους ανά το κόσμο. Είναι χρόνια νόσος η οποία προσβάλλει τις αρθρώσεις του ισχίου και του γονάτου.² Χαρακτηρίζεται από την διαταραχή της ομοιόστασης, δηλαδή των φυσιολογικών ρυθμών αναβολισμού και καταβολισμού της άρθρωσης. Αποτέλεσμα αυτών είναι η σταδιακή διάβρωση και η φθορά του αρθρικού χόνδρου που καλύπτει τα επιμέρους οστά της άρθρωσης. Μηχανικοί και ενδογενείς παράγοντες συνεισφέρουν σε αυτήν την ανωμαλία της άρθρωσης (Εικόνα 1).

Οι αρθρίτιδες είναι νόσοι της τρίτης ηλικίας. Η ΟΑ αποτελεί μια από αυτές και τα συμπτώματα της εμφανίζονται σε ηλικίες άνω των 60 ετών, λόγω της φθοράς της άρθρωσης στο χρόνο. Υπολογίζεται ότι περίπου 30 εκατομμύρια αμερικανοί³ παρουσιάζουν ΟΑ, όπου το 80% έχει ηλικία άνω των 55 ετών και μόλις το 1% εμφανίζει ΟΑ σε ηλικία 25-35.⁴⁻⁷ Στην Ελλάδα το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών (Ε.Ι.Ρ.Ε.) αναφέρει πως η συνολική συχνότητα συμπτωματικής ΟΑ ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων⁸ με τις γυναίκες να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα, ενώ στο γενικό πληθυσμό τα ποσοστά αυξάνονται με την αύξηση της ηλικίας. Η ΟΑ γονάτου εμφανίζεται στην Ελλάδα με συχνότητα 6%.⁸

Η νόσος χαρακτηρίζεται πολυπαραγοντική καθώς τα αίτια για την εμφάνιση της ποικίλουν. Η ΟΑ χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την Πρωτοπαθή (ή Ιδιοπαθή) που είναι κυρίως ασυμπτωματική και δεν έχει κάποια αιτιολογική βάση και τη Δευτεροπαθή η οποία εκφράζεται ως ακόλουθο κάποιας άλλης νόσου ή τραυματισμού π.χ. δυσπλασία, ουρική αρθρίτιδα κλπ. Μια σειρά από βιοχημικές, μοριακές και μορφολογικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στην άρθρωση και εξελίσσουν την νόσο μέσα από μια ποικιλία αιτιών.^{9,10} Τα ενδογενή αίτια που επηρεάζονται από την ηλικία, το φύλο, την κληρονομικότητα και άλλα συγγενή αίτια και β) τα μηχανικά αίτια όπου η φθορά προκαλείται μέσα από τη φυσική δραστηριότητα, με κάποιου είδους κάκωσης ή μυϊκής αδυναμίας. Άλλη αιτία εμφάνισης της ΟΑ είναι διάφορες μορφές δυσπλασίας λόγω γενετικών παραγόντων και επουλωτικών διαδικασιών, όπως οι μικροβιακές φλεγμονές αλλά και η δημιουργία υποχόνδριου οστού.

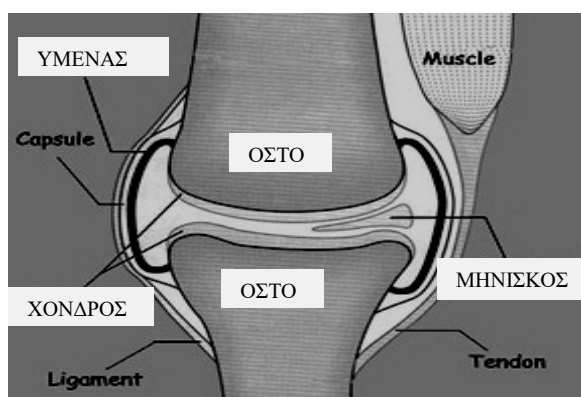
Η εκδήλωση της ΟΑ μπορεί να οφείλεται σε ένα ή σε συνδυασμό παραγόντων.¹¹ Αυτοί οι παράγοντες λειτουργούν, είτε αντιδραστικά ενεργοποιώντας εκ νέου τους ίδιους, είτε εμπλέκουν επιπλέον παράγοντες στην ασθένεια οι οποίοι επιτείνουν τα συμπτώματα και την ανάπτυξη της νόσου. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα είναι η εκδήλωση πόνου σε κατάσταση ηρεμίας, που υποχωρεί με τη κίνηση. Προοδευτικά ο πόνος αυτός παρατείνεται ενώ περιορίζεται η δυνατότητα πλήρους κίνησης της άρθρωσης. Σε προχωρημένα στάδια της ΟΑ, παρατηρείται η αποδόμηση του χόνδρου, η εμφάνιση νέων οστικών δομών και παρουσία οιδήματος, ως αντίδραση των αλλαγών, που συμβαίνουν στον υμένα της άρθρωσης. Κλινικά ο ασθενής παρουσιάζει μια μορφή αναπηρίας με περιορισμό καθημερινών κινήσεων, δυσκαμψία και πόνο. Πολλά από τα συμπτώματα σε αρχικά στάδια μπορεί να εξαφανίζονται ή να εμφανίζονται με εξάρσεις κατά περιόδους. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του τρόπου εξέλιξης της νόσου, καθώς τα ανωτέρα συμπτώματα είναι αποτέλεσμα της φθοράς του χόνδρου και της υπερπλασίας της άρθρωσης σε μεταγενέστερο χρόνο.



Εικόνα 1. Μερικούς από τους παράγοντες εμφάνισης και ανάπτυξης της νόσου

1.2 ANATOMIA ΓΟΝΑΤΟΥ

Το γόνατο είναι μία από τις μεγαλύτερες αρθρώσεις του σώματος. Τα οστά που το αποτελούν είναι το οστό του μηρού, της κνήμης και της επιγονατίδας. Επιπλέον ένα σύνολο συνδέσμων και μυών σταθεροποιούν και δίνουν τη δυνατότητα κίνησης στην άρθρωση. Τα μέρη της άρθρωσης αποτελούνται από τον αρθρικό (ή και υαλώδη λόγω της υφής του) χόνδρο (cartilage), τον υμένα (synovium, synovial membrane, synovial fluid) και το μηνίσκο (meniscus). Η αρχιτεκτονική της άρθρωσης περιλαμβάνει και τα σημεία ένωσης των οστών. Η διάταξη αυτή επιτρέπει τη μηχανική κίνηση, τη λίπανση καθώς και την αποφόρτιση της άρθρωσης (Εικόνα 2).

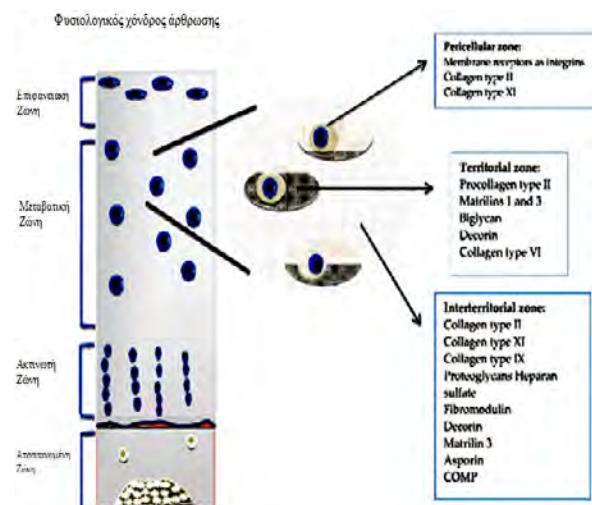


Εικόνα 2. Ανατομία άρθρωσης γονάτου

Ο αρθρικός χόνδρος (cartilage) είναι το μέρος που καλύπτει το οστό στην άρθρωση. Λειτουργεί αντιστεκόμενος στο φορτίο της άρθρωσης διανέμοντάς το κατά μήκος. Φυσιολογικά δεν έχει μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα ενώ οι όποιες αναβολικές και καταβολικές δραστηριότητες είναι απόλυτα ρυθμισμένες (η απορρύθμιση οδηγεί σε ΟΑ). Δεν νευρώνεται ούτε έχει λεμφαγγεία, ενώ η αιμάτωση είναι περιορισμένη. Εμφανίζει αναγεννητική ικανότητα, που είναι και αυτή περιορισμένη. Συνίσταται από κύτταρα (χονδροκύτταρα) και από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ-ECM). Η σύσταση του φυσιολογικού χόνδρου αποτελείται από νερό (65-80%). Από τα διάφορα στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ - ECM), στο 90% του ξηρού βάρους της, περιέχει κυρίως πρωτεογλυκάνες (ιδίως αγγρικές - aggrecanes), κολλαγόνο, και γλυκοπρωτεΐνες. Τα κύτταρα του χόνδρου, τα χονδροκύτταρα, κατέχουν το 1-2% του όγκου της άρθρωσης.¹² Τα χονδροκύτταρα έχουν ως φυσιολογική λειτουργία την αναπλήρωση των μακρομορίων της ΕΘΟ. Η οργάνωση του αρθρικού χόνδρου ξεκινάει από την διασπορά των χονδροκυττάρων σε τρεις διαφορετικές στοιβάδες. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με βάση τις αποστάσεις

διασποράς των χονδροκυττάρων.¹³ Η κάθε ζώνη έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ανάλογα με το σχήμα των χονδροκυττάρων, με την ενεργοποίηση και την έκφραση διαφόρων μορίων.

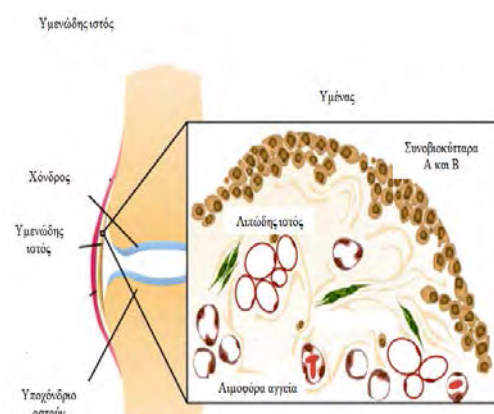
Στις ζώνες αυτές κατατάσσονται ως ενεργά σε μικρό βαθμό (resting cells) και με δυνατότητα έντονης βιοσυνθετικής δραστηριοποίησης όπου απαιτηθεί. Επιπλέον είναι επιφορτισμένα με την παραγωγή πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται ως πηγή διάφορων ενζύμων και αναστολέων τους. Ο ώριμος αρθρικός χόνδρος (υαλοειδής) στη πλήρη εξέλιξή του συνίσταται από τέσσερις ζώνες διαφοροποιημένων χονδροκυττάρων: την



Επιφανειακή ζώνη, την Μεταβατική ζώνη, την Ακτινωτή ζώνη και την Αποτιτανωμένη ζώνη.¹⁴ (Εικόνα 3)

Εικόνα 3. Οι ζώνες διασποράς των χονδροκυττάρων

Η δομή του υμένα αποτελείται από συνδετικό ιστό που περικλείει τα οστά κοντά στις αρθρικές επιφάνειες. Συνίσταται από δύο στοιβάδες την εξωτερική που ονομάζεται ινώδης θύλακας και την εσωτερική που ονομάζεται αρθρικός υμένας. Ο φυσιολογικός υμένας έχει μια λεπτή στρώση κυττάρων υμένα, ενώ τα κύτταρά του, (Συνοβιοκύτταρα Α και Β) έχουν τα χαρακτηριστικά των μακροφάγων και των ινοβλαστών. Οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την έκκριση του αρθρικού υγρού.¹⁵ (Εικόνα 4) Τα μακροφάγα είναι τα κύτταρα που μαζί με τα χονδροκύτταρα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ομοίωση του αρθρικού χόνδρου. Τα πιο σημαντικά μόρια παραγωγής κυττάρων του υμένα που ουσιαστικά καλύπτει όλη την άρθρωση είναι η λουμπρικήνη (λιπαντίνη) και το υαλουρονικό οξύ (HA). Στο εσωτερικό του υμένα γίνεται μεταφορά διαφόρων πρωτεϊνών και άλλων μορίων¹⁶. Ο υμένας

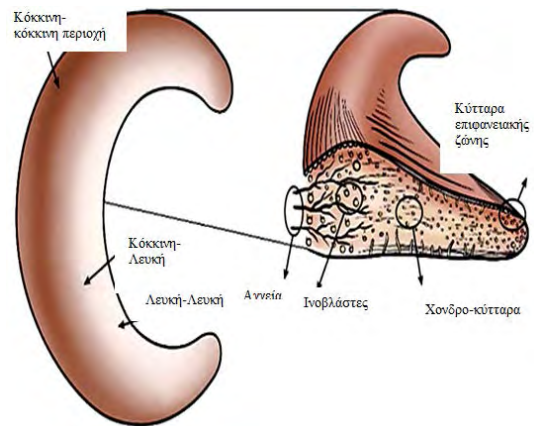


λειτουργεί για την απορρόφηση των κραδασμών. Επιπλέον απομακρύνει τα κατάλοιπα της φθοράς και

Εικόνα 4. Η δομή της μεμβράνης του υμένα

εμπλουτίζει με θρεπτικά συστατικά τα χονδροκύτταρα στον αρθρικό χόνδρο. Επίσης διαδραματίζει βοηθητικό ρόλο στην προστασία και στη διατήρηση της ακεραιότητας του αρθρικού χόνδρου στις αρθρώσεις.

Ο φυσιολογικός μηνίσκος αποτελείται από 72% νερό και 28% από λοιπά οργανικά συστατικά, κυρίως θεμέλιας ουσίας και κυττάρων. Από το ποσοστό αυτό το 75% είναι κολλαγόνο, το 17% GAGs (Glycosaminoglycans), λιγότερο από 1% συνδετικές γλυκοπρωτεΐνες, 0,6% περίπου ελαστίνη και επιπλέον συστατικά σε πολύ μικρές ποσότητες (όπως fibronectin, thrombospondin). Η δομή του μηνίσκου χωρίζεται σε τρεις διακριτές περιοχές¹⁷ (Εικόνα 5): Α) Την κόκκινη-κόκκινη περιοχή, όπου περιέχει κολλαγόνο Ι σε ποσοστό 80%, Β) Την ενδιάμεση κόκκινη-λευκή περιοχή και Γ) Την λευκή-λευκή περιοχή. Στην περιοχή της ΕΘΟ κυριαρχούν πρωτεογλυκάνες (με πιο σημαντικές τις biglycan και decorin) οι οποίες συνδέονται με τις GAGs δημιουργώντας αντίστοιχες δομές με αυτές του χόνδρου. Τα κύτταρα του μηνίσκου διαφοροποιούνται ανάλογα την περιοχή και τη θέση που βρίσκονται. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων είναι παρόμοια με των ινοβλαστών (fibroblasts) και των χονδροκυττάρων (chondrocytes). Επίσης σ' αυτές τις τρεις ζώνες

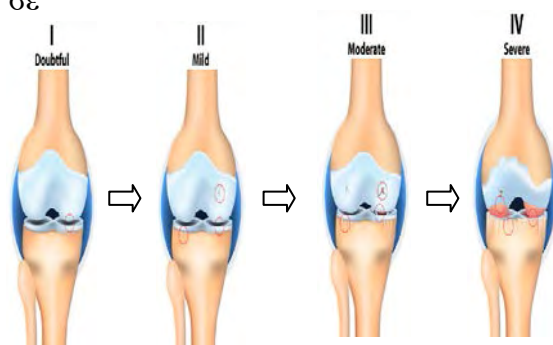


παρουσιάζεται μια περιοχή, που τα κύτταρα έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τους ινοβλάστες, μια δεύτερη που μοιάζουν με ινοβλάστες και χονδροκύτταρα και μια τρίτη όπου τα κύτταρα μοιάζουν αδιαφοροποίητα και θεωρείται πως έχουν θεραπευτικές και αναγεννητικές ιδιότητες.

Εικόνα 5. Οι διακριτές ζώνες και η σύσταση του μηνίσκου

1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΓΟΝΑΤΟΥ ΜΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΑ

Σήμερα είναι αποσαφηνισμένο πως σε φυσιολογικές συνθήκες, το χονδροκύτταρο επιτελεί σπουδαίο ρόλο, διατηρώντας ισορροπία ανάμεσα σε διεργασίες καταβολισμού και αναβολισμού όπως η καταστροφή μέσα από διάφορες αιτίες και η ανανέωση του χόνδρου αντίστοιχα



(remodelling). Η ΟΑ εκδηλώνεται προσβάλλοντας κυρίως τον αρθρικό χόνδρο που καλύπτει τις αρθρικές επιφάνειες. Η διατήρηση της ισορροπίας και της ομοιόστασης μπορεί να διαταράσσεται λόγω των καταβολικών και αποπτωτικών διεργασιών που επικρατούν στην άρθρωση. Ο χόνδρος αρχίζει να διαρρηγνύεται (ρηγματώνεται - cracking) αποκτώντας ρωγμές, στη συνέχεια εκφυλίζεται και τελικά αποδιοργανώνεται καθιστώντας ακάλυπτες τις επιφάνειες της άρθρωσης.¹⁸ Με τη πάροδο του χρόνου επέρχεται περαιτέρω φθορά, οι επιφάνειες των οστών κινδυνεύουν να μείνουν όλο και λιγότερο προστατευμένες από χόνδρους και τα οστά κινδυνεύουν να καταστραφούν λόγω απογύμνωσης. Η κίνηση περιορίζεται, οι περιφερειακοί μύες αρχίζουν πορεία ατροφίας, οι σύνδεσμοι χαλαρώνουν, και το τελικό στάδιο της ΟΑ είναι η εμφάνιση νέων οστικών δομών, τα οστεόφυτα.

Τα τελευταία χρόνια αποκαλύπτεται όλο και περισσότερο ο ρόλος του αρθρικού υμένα στην παθολογική εξέλιξη της νόσου. Η φλεγμονή του αρθρικού υμένα που εμφανίζεται στην ΟΑ, επιτείνει εκ νέου την καταβολική διαδικασία του αρθρικού χόνδρου. Με την εξέλιξη της νόσου, το ιστολογικό πρότυπο του υμένα παρουσιάζει αλλαγές, οι οποίες παρατηρούνται στις κεντρικές συνδέσεις αισθητικών νευρώνων με την ανάπτυξη και την ανακατασκευή τους αλλά και με τη συνεχή διέγερση των κυττάρων, που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη αίσθηση του πόνου.^{19,20} Η αγγειογένεση στην άρθρωση με ΟΑ είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά τη φλεγμονή. Επάγεται άμεσα, νέα αγγείωση με απελευθέρωση παραγόντων διέγερσης από τα μακροφάγα, αλλά και έμμεσα με τη διέγερση άλλων κυττάρων που μπορούν να παράγουν αυτές τις ουσίες επαγωγής.

Ο μηνίσκος, όμοια με το χόνδρο ακολουθεί πορεία αποδόμησης με κατάτμηση των ινών κολλαγόνου έχοντας ως συνέπεια τη ρήξη και την εκφύλιση της θεμελιώδους ουσίας. Παρόλο που και εδώ παρουσιάζεται τοπικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων αλλά και της αγγείωσης, οι συνεχιζόμενες μηχανικές καταπονήσεις εξαιτίας της ελάττωσης του χόνδρου, της φλεγμονής και της αυξημένης παραγωγής του NO επεκτείνουν την απόπτωση του ιστού.^{21,22}

Η φυσιολογική εκδήλωση της νόσου εμφανίζεται ως επακόλουθο της γήρανσης. Η επιδείνωση της ασθένειας εξελίσσεται με αργό ρυθμό, επιτρέποντας τη φυσιολογική κινητικότητα των αρθρώσεων των ασθενών για πολλά χρόνια.²³ Εδώ πρέπει να σημειωθεί η διαφορά της νόσου ΟΑ με τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ), όπου η πρώτη περιλαμβάνει τη διάβρωση του αρθρικού χόνδρου ενώ η δεύτερη τη φλεγμονή της αρθρικής μεμβράνης, η οποία προστατεύει και λιπαίνει τις αρθρώσεις, προκαλώντας πόνο και πρήξιμο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΦΛΕΓΜΟΝΗ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Ως φλεγμονή χαρακτηρίζεται η έκφραση μιας τοπικής ιστικής αντίδρασης απέναντι σε ένα βλαπτικό παράγοντα. Συνοπτικά κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση τα αγγεία και τα συνδετικά στοιχεία του ιστού ανταποκρίνονται στον βλαπτικό παράγοντα και ανάλογα το ερέθισμα, διαπερνούν και διαπηδούν στις εστίες φλεγμονής μέσω μορίων προσκόλλησης (adhesion molecules).^{24,25,26} Τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν μόρια όπως πρωτεολυτικά ενζυμα, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, νιτρικό οξύ που κατευθύνουν την αποδόμηση και την ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών των εστιών, ενώ ταυτόχρονα φαγοκυτταρώνονται από τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα και ουδετερόφιλα). Οι βλαπτικοί παράγοντες που πυροδοτούν τη φλεγμονώδη αντίδραση ποικίλουν, μπορεί να είναι μικροβιακοί, φυσικοί, μηχανικοί και χημικοί παράγοντες.²⁷ Ανεξάρτητα από το είδος του παράγοντα έναρξης της φλεγμονής και της περιοχής της βλάβης, η διαδικασία απόκρισης είναι άμεση και η πορεία που ακολουθείται είναι ίδια με μικρές διαφορές, ανάλογα την περίπτωση.

Αποτέλεσμα της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι η επιδιόρθωση του ιστού (tissue repair), καθώς απομακρύνεται η αιτία της βλάβης και προστατεύεται ο οργανισμός. Ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει απόκριση χαρακτηρίζεται: *ως οξεία*, όταν υπάρχει άμεση και πρόωμη απόκριση στο παθολογικό αίτιο και συνήθως η διάρκεια ανέρχεται από λίγες ώρες έως λίγες ημέρες και *ως χρόνια* όταν υπάρχει ήπια απόκριση, συχνά χωρίς συμπτώματα, και διαρκεί από ημέρες έως έτη. Στη χρόνια φλεγμονή παρατηρούνται κυρίως λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, η παρουσία των οποίων υποδεικνύει κάποια σημαντική ιστική καταστροφή. Ωστόσο η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της αντίδρασης στη φλεγμονή, μπορεί να οδηγήσει σε βλαπτικές για τον ίδιο τον οργανισμό καταστάσεις, όπως είναι οι αυτοάνοσες νόσοι (ΡΑ) αλλά και σε άλλες νόσοι, όπως πνευμονική ίνωση, αναιμία κ.α.²⁶

Οι μηχανισμοί της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι κομμάτι της απόκρισης της φυσικής άμυνας του οργανισμού. Η φλεγμονή εμπλέκει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων και συντονίζει ένα σύνολο αντιδράσεων και λειτουργιών. Για το συντονισμό αυτό επιστρατεύονται μια σειρά από διαλυτά μόρια, που καλούνται μεσολαβητές της φλεγμονής. Τέτοιοι μεσολαβητές πρωτεϊνικής ή και γλυκοπρωτεϊνικής φύσης είναι οι κυτταροκίνες (κυτοκίνες). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού χρησιμοποιούν τις κυτταροκίνες για την επικοινωνία μεταξύ τους και για

αλληλεπιδράσεις με άλλους τοπικούς κυρίως στόχους. Ο τρόπος δράσης τους μπορεί να είναι αυτοκρινής, ενεργοποιώντας τα ίδια τα κύτταρα που τα παράγουν αλλά και παρακρινής σε διπλανά κύτταρα. Οι ουσίες που παράγουν περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες, τις χυμοκίνες, τις ιντερφερόνες, τους διεγερτικούς παράγοντες, τους αυξητικούς παράγοντες και τους παράγοντες νέκρωσης (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Μεσολαβητές - κυτταροκίνες

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ
Ιντερλευκίνες	IL-	IL-1, IL-2 κ.α.
Ιντερφερόνες	INF-	IFN α , IFN β , IFN γ
Χυμοκίνες	-	MCP-1, MIP-1 α
Αυξητικοί Παράγοντες	GF	NGF, EGF
Διεγερτικοί παράγοντες	CSF	M-CSF, G-CSF, GM-CSF
Παράγοντες Νέκρωσης	TNF-	TNF α , TNF β

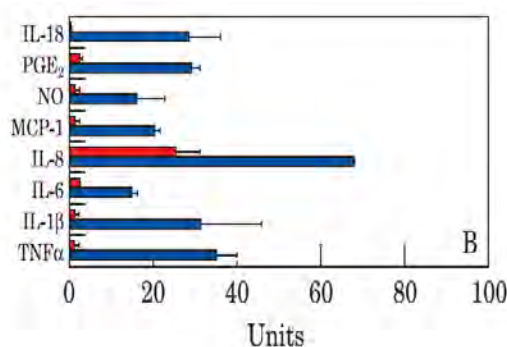
Στο σύνολο των αποκρινόμενων χημικών μεσολαβητών κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση, συμπεριλαμβάνονται οι αγγειοδραστικές αμίνες, όπως η ισταμίνη και η σεροτονίνη, το συμπλήρωμα, το σύστημα πήξης, οι κινίνες και παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, όπως οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες. Οι διαδικασίες έκφρασής τους μπορούν να διεγείρουν μια διαδικασία ανατροφοδότησης ή και την εκδήλωση ενός νέου μηχανισμού.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εμπλέκονται στη φλεγμονή είναι: τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Κυρίαρχος παράγοντας της φλεγμονής ανάμεσα στα κύτταρα είναι τα μακροφάγα. Εκκρίνουν πληθώρα μεσολαβητών όπως κυτταροκίνες (πχ IL-1, TNF- α), πρωτεάσες (όξινης, ουδέτερες), συστατικά συμπληρώματος, διάφορους μεταβολίτες, ρίζες οξυγόνου, NO κ.α. που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της φλεγμονής²⁸.

Οι κυτταροκίνες εκκρίνονται κυρίως από τα

μακροφάγα. Με τη σειρά τους οι ιντερλευκίνες παράγονται από τα λευκοκύτταρα. Αντίστοιχα ο

TNF α παράγεται από μακροφάγα, T- κύτταρα και NK κύτταρα, ενώ ο TNF- β παράγεται από ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Στις βιολογικές δράσεις του TNF- α είναι η ρύθμιση της λειτουργίας των λευκοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και η αύξηση της



Εικόνα 7. Επίπεδα κυτταροκινών μέσω Elisa από ΟΑ και φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο²⁹

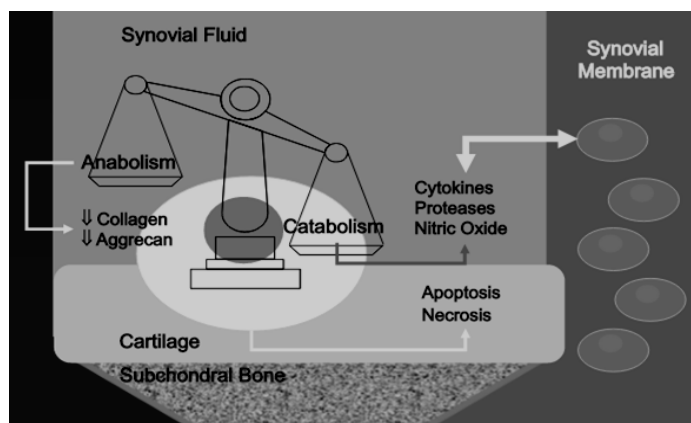
προσκόλλησης μορίων στο ενδοθήλιο. Ο TNF-α επάγει τις ιντερλευκίνες IL-1 και IL-6 που παράγονται επίσης από τα μακροφάγα προωθώντας τη φλεγμονή και τα σηπτικά φαινόμενα. Η IL-1 έχει υποδοχείς σε πολλά κύτταρα, επάγοντας περαιτέρω δράσεις της φλεγμονώδους αντίδρασης ως προφλεγμονώδη κυτοκίνη. Αυξάνει τη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων και μαζί με τον TNF-α ασκεί συστηματική δράση στη φλεγμονή.

Αντίθετα η έκκριση της IL-10 έχει ως αποτέλεσμα την αναχαίτιση της φλεγμονής αναστέλλοντας την παραγωγή κυτταροκινών. Άλλοι παράγοντες, όπως ο TGF-β, συμβάλλουν στην αγγειογένεση και στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών ενώ ο GM-CSF διεγείρει την αύξηση του αριθμού των μακροφάγων.

2.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

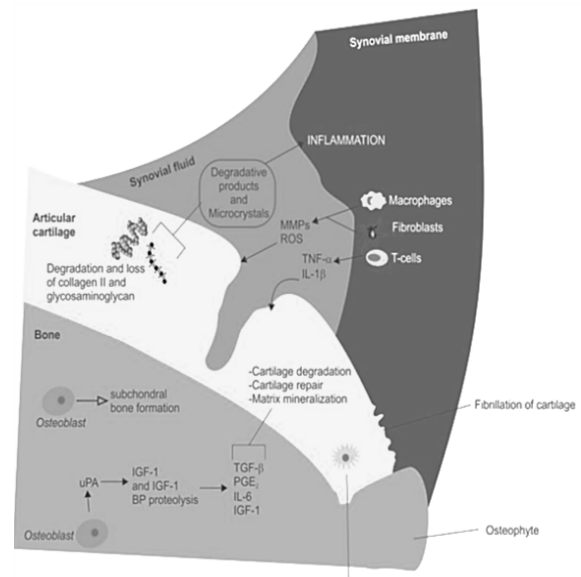
Εναρκτήριο αίτιο ή παράγοντας στην ΟΑ είναι η καταπόνηση του χόνδρου και η σταδιακή του αποδόμηση. Αρχικά η ΟΑ χαρακτηρίζονταν ως μη-φλεγμονώδης νόσος, μετά όμως από τις τελευταίες έρευνες διαπιστώθηκε η φλεγμονώδης διάσταση της νόσου.³⁰ Σ' αυτή την περαιτέρω αποδόμηση αναδύεται ο ρόλος της υμενώδους μεμβράνης του αρθρικού χόνδρου που εξελίσσεται σε ήπια χρόνια φλεγμονή με την πάροδο του χρόνου. Τη στιγμή της έναρξης της ΟΑ, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, λαμβάνουν μέρος στη αναπτυξιακή διαδικασία της νόσου που παράγονται από τον αρθρικό υμένα. Στη συνέχεια διασπείρονται μέσω του αρθρικού υγρού στο χόνδρο και χαρακτηρίζονται ως προ-φλεγμονώδη κατάσταση, που κατά την εξέλιξη της νόσου εμφανίζονται ως αντιδράσεις φλεγμονής.

Παρατηρώντας την ανάπτυξη της νόσου, η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και καταβολικών αντιδράσεων στον χόνδρο οδηγεί στην ΟΑ, με τη φλεγμονή να εμφανίζεται μετά την έναρξη της σταδιακής διάλυσης του χόνδρου, προκαλώντας περαιτέρω ενίσχυση των σταδίων της οστεοαρθρίτιδα (εικόνα 8).³¹ Στη φλεγμονική έναρξη καθοριστικό ρόλο παίζουν οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ενώ ταυτόχρονα οι αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες



Εικόνα 8. Η διαταραχή της ισορροπίας προς το καταβολικό μονοπάτι και η συνεισφορά των προϊόντων

αυξάνουν τα επίπεδα τους στο αρθρικό υγρό στην ΟΑ. Τα προϊόντα καταβολισμού του χόνδρου περνούν στη υμενώδη μεμβράνη μέσω του υμενώδους υγρού και επάγουν τη φλεγμονή. Οι MMPs, οι ROS, η IL-1 και ο TNF- α είναι τα πρώτα προϊόντα που παράγονται από τα μακροφάγα, τους ινοβλάστες και τα Τ-κύτταρα.³² (εικόνα 9) Ο TNF- α , ως προπεπτίδιο, ενεργοποιείται από μια μεταλλοπρωτεΐναση την ADAM 17 (TACE – Tnf-A-Converting-Enzyme), ενώνεται με τον υποδοχέα του TNF- α , TNF-R στην κυτταρική μεμβράνη των χονδροκυττάρων και αλλάζει τον υποδοχέα για να ενεργοποιήσει μια σειρά από αντιδράσεις. Επίσης η IL-1, επάγει την ενεργοποίηση της IL-1 β και την πρόσδεση στον υποδοχέα IL-1R, παρουσιάζοντας αύξηση στην επιφάνεια των χονδροκυττάρων της ΟΑ. Ο TNF- α με την IL-1 επάγουν τα αρθρικά κύτταρα για την παραγωγή νέων φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6 και η IL-8³². Επιπλέον διεγείρουν πρωτεάσες και τη PGE2 (Prostaglandine E2) στο αρθρικό υγρό, όπου η PGE2 φαίνεται να διαδραματίζει ενεργό ρόλο στην αποδιοργάνωση του αρθρικού χόνδρου. Η IL-6 αυξάνει τα φλεγμονώδη κύτταρα του υμένα και διεγείρει το πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων.



Εικόνα 9. Μεσολαβητές καταστροφής του χόνδρου

Έτσι επάγεται περαιτέρω η αύξηση της IL-1 και των μεταλλοπρωτεϊνών συνεχίζοντας τη διαδικασία της αποδόμησης. Η IL-8 μέσω των κοκκιοκυττάρων (PMNs), επιδρά στην περαιτέρω απελευθέρωση του TNF- α , της IL-1 και της IL-6. Ο LIF (Leukemic Inhibitory Factor) αυξάνει τις IL-1, IL-8 στα χονδροκύτταρα και τον TNF- α και την IL-1 των κυττάρων του υμένα της άρθρωσης³². Ρυθμίζει το μεταβολισμό του συνδετικού ιστού ενώ επάγει τη κολλαγογένεση και τη Stromelysin-1. Επιπλέον προωθεί την έκφραση πρωτεογλυκανών και του NO.

Παρατηρείται σταδιακή απορρύθμιση των χονδροκυττάρων που απελευθερώνουν εκ νέου MMPs, ενώ διασπώνται και αποσυντίθενται οι πρωτεογλυκάνες του δικτύου του κολλαγόνου. Τα ίδια τα χονδροκύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση και μειώνεται η σύνθεση κολλαγόνου. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στο σύνολο του αρθρικού χόνδρου δίνουν ένα πλήθος παθολογικών καταστάσεων στη ΟΑ εξαιτίας της έκφρασης των παραπάνω κυταροκινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (miRNA) ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΑ

3.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΑ

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Conrad Waddington το 1940 και έχει επικρατήσει να αναφέρεται στη μελέτη των αναστρέψιμων, κληρονομήσιμων μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, χωρίς να αλλάζουν την αλληλουχία του DNA.³³

Η γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση έχει μπει στο στόχαστρο της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης και μελετά παράγοντες όπως η ηλικία, η διατροφή κ.α., οι οποίοι μπορούν να αλλάξουν προοδευτικά το μοτίβο της έκφρασης αρκετών χαρακτηριστικών χωρίς, όπως αναφέρθηκε να αλλάξει η γενετική πληροφορία του γονιδίου.³⁴

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που εξετάζονται, είναι η μεθυλίωση του DNA (DNA methylation), οι τροποποιήσεις των ιστονών (Histone modification) και η λειτουργία των μικρο-RNAs (miRNAs, micro RNAs, miRNAs). Τα μικρο-RNA αποτελούν αντικείμενο μελέτης της σύγχρονης μοριακής βιολογίας και ιατρικής και προέρχονται από τη κωδικοποίηση γονιδίων που δίνουν πρόδρομα μόρια RNA. Η λειτουργία και ο μηχανισμός δράσης περιγράφεται παρακάτω.

Οι παραπάνω μηχανισμοί επηρεάζουν την εξέλιξη ασθενειών. Ανάμεσα σε αυτές και την ΟΑ. Οι μηχανισμοί που παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΟΑ είναι η μεθυλίωση του DNA³⁵⁻³⁷ και τα miRNAs. Αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA, προκαλεί παρεμβάσεις στο τρόπο σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στον εκκινητή του γονιδίου, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του. Το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA σε ΟΑ-χονδροκύτταρα παρουσιάζει δυναμικές τροποποιήσεις, μόνο σε περιοχές εκκινήτων συγκεκριμένων γονιδίων και όχι μεθυλίωση του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Φλεβμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1β που αναφέρθηκε παραπάνω, επάγουν την έκφραση αποικοδομητικών ενζύμων της Ε.Θ.Ο.³⁵ Η μειωμένη μεθυλίωση των CpG νησιδίων των εκκινητών των IL-1β, MMP-3, 9, 13, και ADAMTS-4 σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων αυτών στο τελευταίο στάδιο της ΟΑ.³⁸ Μια νέα επιγενετική τροποποίηση, η υδροξυμεθυλίωση της κυτοσίνης (5 hmC), εμφανίζει αυξημένη μεθυλίωση στους εκκινητές των CpG νησιδίων των MMP-1, MMP-3 σχετίζοντας την με την αποδόμηση των ΟΑ-χονδροκυττάρων.³⁶ Μελέτες προτείνουν πως το C αλληλόμορφο αλλάζει την

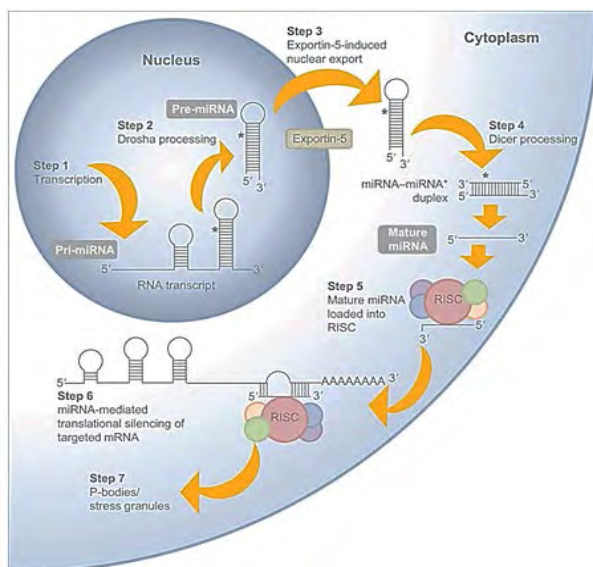
έκφραση του GDF5 με τη δημιουργία CpG δινουκλεοτιδίων τα οποία στη συνέχεια μεθυλιώνονται.³⁴

Οι ιστονικές τροποποιήσεις εμπλέκονται και αυτές στην ΟΑ. Μείωση των πρωτεϊνών του κολλαγόνου (Col2a1) από ιστονικές αδενυλάσες 1 και 2, (HDAC1 και HDAC2) εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στην ΟΑ.³⁹ Από την άλλη μεριά τα αυξημένα επίπεδα της HDAC7 στην ΟΑ πιστεύεται ότι συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση μέσω MMP-13 και εμποδίζεται η δράση αναστολέων HDACs.⁴⁰ Αυτές και άλλες δράσεις όπως η αύξηση της απόπτωσης και της αυτοφαγίας χονδροκυττάρων μέσω μείωσης του SIRT1^{41,42} όπως και άλλες διερευνούν τις επιγενετικές περιπτώσεις στη ΟΑ για την αποκάλυψη του μοριακού μηχανισμού προώθησης ης νόσου.

3.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ microRNA

Τα miRNAs είναι μικρά, μονόκλιωνα μόρια RNA αποτελούμενα από μήκος 22-24 νουκλεοτιδίων και ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση διαφόρων γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω της πρόσδεσης τους στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR). Τα microRNAs δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά περιέχουν πληροφορία η οποία υβριδίζεται με μερική ή πλήρη συμπληρωματικότητα με αγγελιοφόρα RNA (mRNA) και έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρωτεϊνσύνθεσης του mRNA.^{43,44} (εικόνα 10Α)

Η βιογένεση των ώριμων microRNAs είναι μια πολύπλοκη και εξειδικευμένη διαδικασία η οποία ξεκινά με τη μεταγραφή του miRNA γονιδίου από το ένζυμο RNA πολυμεράση II για την παραγωγή του πρώιμου miRNA (pri-miRNA). Το pri-miRNA μετάγραφο που παράγεται έχει μέγεθος πάνω από 100 νουκλεοτίδια, καλύπτεται με μια μεθυλιωμένη γουανίνη (5'cap) και πολυαδενυλιώνεται. Αναγνωρίζεται από την ενδοριβονουκλεάση Drosha και προκύπτει η πρόδρομη δομή pre-miRNA με τη μορφή βρόγχου-φουρκέτας και μήκος περίπου 70 νουκλεοτιδίων. Τα pre-miRNA μεταφέρονται εκτός πυρήνα με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα, την exportin-5. Η ωρίμανση του μορίου επιτυγχάνεται με τη δράση μιας RNase III, της ενδοριβονουκλεάσης Dicer, η οποία παράγει το τελικό μόριο των 22 νουκλεοτιδίων. Η αλληλεπίδραση του ώριμου miRNA με το στόχο του, επιτυγχάνεται με το σύμπλοκο RISC, είτε καταστέλλοντας, είτε αποδομώντας το mRNA στόχο με πλήρη ή μερική συμπληρωματικότητα.

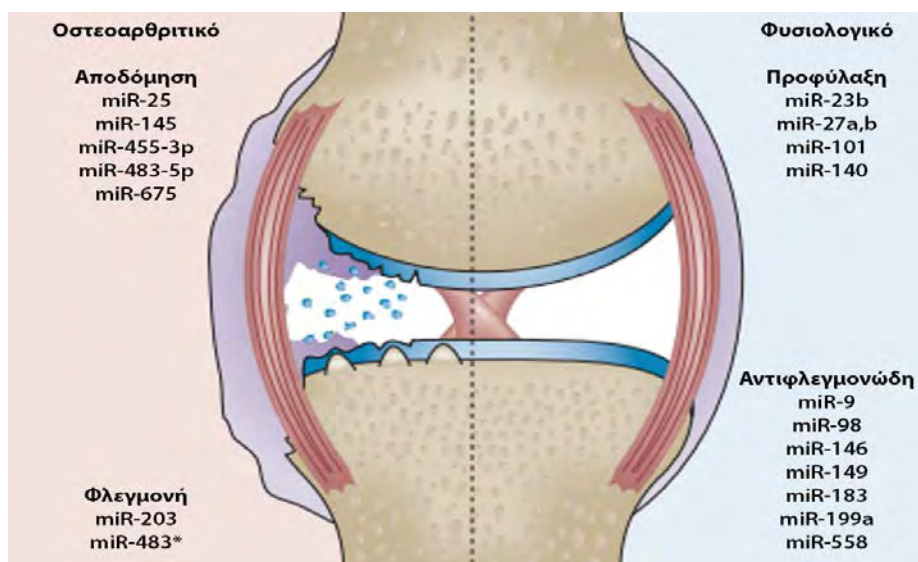


Εικόνα 10. Μηχανισμός βιογένεσης

3.3 Τα microRNAs ΚΑΙ Η ΟΑ

Στην ΟΑ ήδη έχουν χαρακτηριστεί μια σειρά από miRNAs⁴⁵ (εικόνα 11) που διαδραματίζουν ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του αρθρικού χόνδρου, έχοντας ως στόχο τη διατήρηση της ομοιοστασίας της άρθρωσης, ρυθμίζοντας τα κατάλληλα γονίδια.⁴⁶ Όσον αφορά τις παθολογικές καταστάσεις έχουν ενοχοποιηθεί γιατί με την διαφοροποιημένη έκφραση τους στην ΟΑ, συμβάλλουν προς τη κατεύθυνση των καταβολικών δράσεων και αντιδράσεων που προκαλούν τη φλεγμονή.

Εικόνα 11. Ένας αριθμός από τα miRNAs που ενοχοποιούνται στην ΟΑ και τη φλεγμονή



Η ΟΑ ως χρόνια εκφυλιστική αρθρίτιδα επιτρέπει τη σταδιακή αποδόμηση των ιστών της άρθρωσης, δηλαδή του αρθρικού χόνδρου, του μηνίσκου και της υμενώδους μεμβράνης μέσω αναβολικών και καταβολικών διαδικασιών. Τα miRs που συμβάλλουν στην αποδόμηση

του αρθρικού χόνδρου είναι τα miR-25, miR-145, miR-455-3p, miR-483-5p και miR-675, ενώ αντίθετα, λειτουργία με τις αποδιοργανωτικές διαδικασίες έχουν τα miR-23b, miR-27a,b, miR-101 και miR-140.⁴⁷

Στον αρθρικό χόνδρο η έκφραση του miR-140 παρουσιάζεται μειωμένη στους ασθενείς με ΟΑ έναντι του χόνδρου της φυσιολογικής άρθρωσης. Τόσο στην χονδρογένεση όσο και στην ΟΑ παρατηρήθηκε η εμπλοκή του miR-194 (που στοχεύει την έκφραση του SOX5 και μειώνει την εκδήλωση της ΟΑ) και η μείωση του miR-27a. Θεωρείται πως οι δύο αυτοί παράγοντες στοχεύουν την μείωση του ADAMTS5, της MMP-13 και του IGFBP-5.⁴⁸

Στη φυσική εξέλιξη για την εκδήλωση της ΟΑ εμπλέκονται μηχανισμοί που σχετίζονται με την ηλικία. Τα miR-193b και miR-199a-3p που συμμετέχουν στην ΟΑ παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση, λόγω γήρατος του αρθρικού χόνδρου που συμβάλλει στη γήρανση των χονδροκυττάρων, μέσω ρύθμισης της αγγρεκάνης, του κολλαγόνου τύπου II και του Sox9.⁴⁹ Προς το παρόν τα miR-199a-3p και miR-193b έχει παρατηρηθεί πως ενέχονται στην ευαισθησία των χονδροκυττάρων αλλά χωρίς να είναι κατανοητός ακόμη ο τρόπος και οι στόχοι με τους οποίους πετυχαίνουν τη ρύθμιση. Άλλα miRNAs μόρια που εμπλέκονται στην ΟΑ είναι τα miR-193b, miR-199a-3p, miR-181b, miR-22, miR-455 και miR-675, που συσχετίστηκαν στην εκδήλωση της ΟΑ, συμβάλλοντας το καθένα σε διάφορες λειτουργίες.⁵⁰ (πίνακας 4) Από αυτά, η έκφραση του miR-181b ρυθμίζεται σημαντικά στους χονδρογενετικούς μηχανισμούς με διέγερση από το TGF-β και μείωση του miRNA, ενώ αντίστοιχα στην ΟΑ η έκφρασή του σημειώνει σημαντική αύξηση.⁵¹

Τα δεδομένα αυτά συγκλίνουν στο γεγονός ότι το miR-181b όπως και άλλα miRNAs, μπορούν να αποτελούν θεραπευτικούς στόχους και στρατηγικές, για ασθένειες συσχετιζόμενες με τις αρθρώσεις.

microRNAs	ΣΤΟΧΟΙ	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ
miR-140	IGFBP-5	Παθογένεση ΟΑ (+)
	ADAMTS-5	Παθογένεση ΟΑ (-)
	MMP-13	Παθογένεση ΟΑ (-)
miR-194	Sox5	Παθογένεση ΟΑ (-)
miR-203	TRPV4	Παθογένεση ΟΑ (+)
miR-455	ACVR2B, smad2, CHRDL1	Ομοίσταση χόνδρου Παθογένεση ΟΑ (+)

miR-320c	ADAMTS-5	Παθογέννεση OA (-)
miR-125b	ADAMTS-4	Παθογέννεση OA (-)
miR-27b	MMP-13	Παθογέννεση OA (-)
miR-22	PPAR α , BMP7	Παθογέννεση OA (-)
miR-199a*	COX-2	Παθογέννεση OA (-)
miR-34a	Not detected	Παθογέννεση OA (+)
miR-181b	Not detected	Παθογέννεση OA (+)
miR-146	Not detected	Παθογέννεση OA (-)
miR-193b miR-199a-3p	Aggrecan, type2 collagen, Sox9	Παθογέννεση OA (+)
miR-675	Not detected	Ομοίσταση χόνδρου (+)

Πίνακας 2. Μελετημένοι στόχοι σε διάφορα μοντέλα στην OA

Σήμερα είναι γνωστό πως τα miRNAs έχουν σημαντικό ρόλο στη κανονική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και τη διατήρηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. miR-181). Αυτό συμπεριλαμβάνει τις διεργασίες των ανοσολογικών μηχανισμών, όπως την αντί-ικη άμυνα του οργανισμού (π.χ. miR-196), την ανοσολογική απόκριση αλλά και την αυτοανοσία.⁵²⁻⁵⁴ Μέσα από πειραματικά μοντέλα ποντικών και κλινικές έρευνες, έχουν χαρακτηριστεί μόρια που εμπλέκονται σε παθογενετικούς μηχανισμούς. Η υπερέκφραση του miR-17-92 ενοχοποιείται στην λεμφοπολλαπλασιαστική διαταραχή και στην αυτοανοσία, καθώς εμπλέκεται στην αυξημένη ενεργοποίηση των κυττάρων T και B⁵⁵, ενώ η μείωση έκφρασης του miR-146a προκαλεί αυθόρμητη αυτοανοσία.⁵⁶ Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και στον άνθρωπο, όπου η διαταραχή στην έκφραση των miR συμβάλλει σε ασθένειες όπως στη σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA). Μια τέτοια διαταραχή εμφανίζεται στο miR-155, όπου η αύξησή του σε ασθενείς συσχετίστηκε με αυτόνοσα νοσήματα.⁵⁷⁻⁶¹ Τέτοιου είδους παρατηρήσεις θέτουν τα miR-146a και miR-155 ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους της PA⁶². Επιπλέον μελέτες με πολυμορφισμούς των miRNAs συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, πολυμορφισμός στη θέση σύνδεσης στο 3UTR του miR-146a για το στόχο IRAK1 έχει συσχετιστεί με τη PA.^{63,64} Άλλα miRs, όπως miR-17-92 και miR-19 που έχουν στόχους τα PTEN και IKZF4, εμπλέκονται με την αυξημένη έκφραση τους, σε συγκεκριμένα μονοπάτια ρύθμισης του ανοσοποιητικού, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση και

την απόκριση των Th17 κυττάρων καταλήγοντας σε παθολογική εξέλιξη σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιηθήκαν.^{65,66}

Ένας από τους αρχικούς παράγοντες προφλεγμονωδών κυτταροκινών είναι η IL-1 που αποτελεί ισχυρό επαγωγέα πολλών μορίων όπως χημειοκινών, φλεγμονωδών πρωτεϊνών κ.α.. Η μορφή της IL-1 είναι ουσιαστικά η συνισταμένη μορφή δύο κυτταροκινών της IL-1α και IL-1β. Η IL-1. Είναι η πλέον μελετημένη κυτταροκίνη στη φλεγμονή καθώς έχει χαρακτηριστεί ότι υπερεκφράζεται στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Leukocytes - PBLs) σε ασθενείς με ΟΑ.⁶⁷⁻⁷⁰ Κατά συνέπεια μια σειρά από microRNAs όπως το miR-146a, το miR-155, το miR-181a και το miR-223 που εκφράζονται φυσιολογικά σε κύτταρα του ανοσοποιητικού και ταυτόχρονα ευθύνονται για τη ρύθμιση της φλεγμονής, παρατηρούνται σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs) σε ασθενείς με ΟΑ.⁷¹ Αντίστοιχα, σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων του miR-132 παρατηρήθηκε στο πλάσμα του αίματος σε ασθενείς με ΟΑ ή ΡΑ.⁷²

Άλλες κυτταροκίνες, εκτός της IL-1 και του TNF-α, που η έκφραση τους ελέγχεται από miRNAs, είναι η IL-6, η IL-10, η IL-17, η IL-18 και η IL-21. Συγκεκριμένα κάθε μία από αυτές ρυθμίζεται και απορρυθμίζεται ανάλογα με τη συγκέντρωση των miRNAs που τις ελέγχουν ή επηρεάζουν τα μονοπάτια τους με διέγερση ή καταστολή τους. Τέτοια miRNAs που έχουν ενοχοποιηθεί για τη φλεγμονή είναι το miR-145, το οποίο βρέθηκε πως επηρεάζει την επαγωγή της IL-1β με συνέπεια την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας⁷³ και το miR-203 που κατευθύνει την αυξημένη έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 1 (MMP-1) και επανέκφραση της IL-6 μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης NF-κΒ.⁷⁴ Τα let-7a, miR-26 και miR-150 ρυθμίζουν την έκφραση της IL-17.⁷⁵ Η IL-10 ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας καταστέλλεται από λιποπρωτεΐνες μέσω του miR-155⁷⁶, το miR-223 καταστέλλει τον IGF-1 που μεσολαβεί στην έκφραση της IL-10, ενώ αντίστοιχα το miR-34b εμφανίζεται υπερεκφρασμένο στα Τ-κύτταρα σε ασθενείς με ΡΑ.⁷⁷ Επιπλέον η IL-21 και IL-6 ελέγχεται από το miR-10a μέσω του STAT σηματοδοτικού μονοπατιού.⁷⁸ Ακόμη ένα miRNA που διεγείρεται από την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-1β είναι το miR-146a που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο αρχικό στάδιο της ΟΑ. Σε μεταγενέστερο στάδιο στην ΟΑ υπερεκφράζονται τα miR-9 και miR-199, ενώ στο χόνδρο μειώνεται το miR-140.^{79,80} Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε παρατηρήθηκε ότι η προφλεγμονώδης IL-1b επάγει την παραγωγή TNF-α μέσα σε πρωτογενή χονδροκύτταρα στα αρχικά στάδια της φλεγμονής και έχει ως συνέπεια την υπερέκφραση του miR-9 το οποίο αναστέλλει τη έκκριση της MMP-13,

αναχαιτίζοντας τη φλεγμονή. Παρόμοια δράση στα χονδροκύτταρα έχει το miR-27b⁸¹ που καταστέλλει τη φλεγμονή μέσω αποσιώπησης της MMP-13. Στον υμένα ιστό παρατηρήθηκε η κύρια έκφραση της φλεγμονής, έχοντας παρόμοιες εναρκτήριες αντιδράσεις τόσο στην υμενίτιδα όσο και στη ΡΑ. Σε έρευνα διακρίθηκε πως η συγκέντρωσή του miR-16 σε ασθενείς με ΡΑ ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο υμενώδες υγρό από ότι στο πλάσμα⁷¹ ενώ του miR-155 ήταν αυξημένη τόσο στο υμενώδες υγρό όσο και στο αίμα ασθενών με ΡΑ.^{82,83}

Εκτός από τα miRNAs που επάγουν τη φλεγμονή, όπως το miR-203 και το miR-483, σημαντικό ρόλο έχουν και τα αντι-φλεγμονώδη miRNAs, όπως τα miR-9, miR-98, miR-146, miR-183, miR-199a και miR-588 που έχουν προστατευτική δράση προκειμένου να αναχαιτίσουν την ανοσολογική απόκριση.⁸⁴ Διαταραχή της συγκέντρωσής τους επιτείνει τη φλεγμονή.

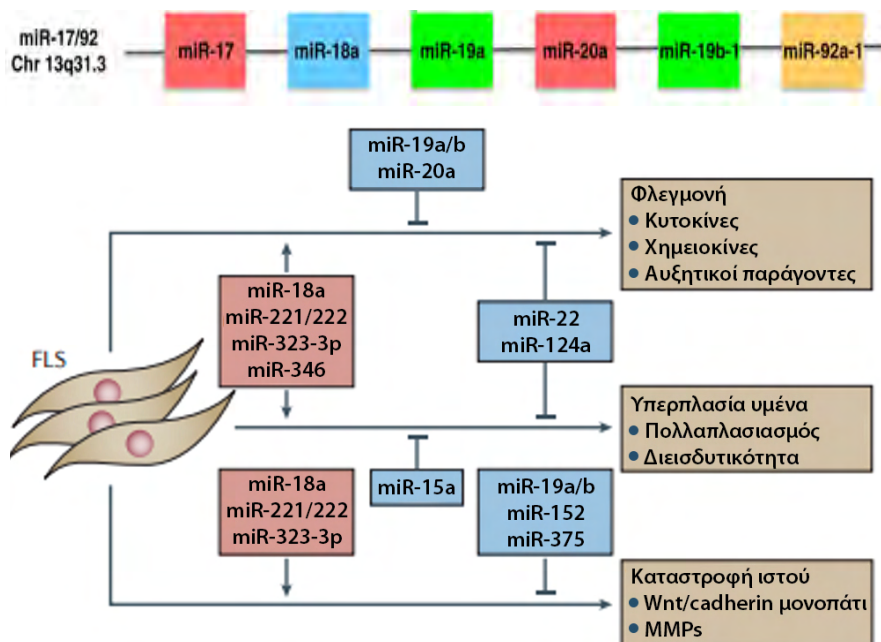
3.4 microRNAs ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΑ

Τα miRNAs που συμμετέχουν στην φλεγμονή και ΟΑ δεν έχουν απόλυτα αποσαφηνισμένο ρόλο. Στην εργασία αυτή επιλέχθηκαν πέντε miRNAs που δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η συσχέτιση τους με τη φλεγμονή σε ασθενείς με ΟΑ τελευταίου σταδίου. Τα miRNAs αυτά είναι: *miR-16*, , *mir-19a*, *mir-19b*, *mir-21* και *mir-125a-5p*.

Το miR-16, είναι αρχικά γνωστό ως καταστολέας του όγκου με επαγωγή της απόπτωσης. Ωστόσο η λειτουργία του σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις ή αντιδράσεις του ανοσοποιητικού είναι συγκεχυμένες. Συγκεκριμένα, αύξηση του miR-16 στοχεύει τον SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) και αυξάνει το μονοπάτι ρύθμισης της ενεργοποίησης του NF-κΒ για την έκφραση της IL-82.^{85,86} Αντίστοιχα στη διαφοροποίηση των μονοπύρηνων δενδριτικών κυττάρων, η μείωση του miR-16 φαίνεται ότι στοχεύει στην αναστολή του κΒ (IκΒ), της κινάσης α (IKKα) και αναστέλλεται η ενεργοποίηση των γονιδίων του NF-κΒ.⁸⁷ Ακόμη δεν υπάρχει σαφή εικόνα για την έκφραση του miR-16 και πως μεταβάλλεται με τους μεσολαβητές της φλεγμονής.⁸⁸ Ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα για το miR-16 αποτελούν τα συμπεράσματα έρευνας⁸⁹ που δείχνουν πως έχει σημαντικό ρόλο στο κυτταρικό κύκλο μέσω της απευθείας στόχευσης του PDCD4 (Programmed cell death 4) με αποτέλεσμα τη καταστολή της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών μακροφάγων στην αθηροσκλήρωση μέσω των μονοπατιών MAPK και NF-κΒ, μειώνοντας τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Επιπλέον συνδέεται στις UA πλούσιες περιοχές

στο 3'UTR και μειώνει τα mRNA του TNF-a.⁹⁰ Αποτελεί λοιπόν έναν από τους στόχους μελέτης της εργασίας.

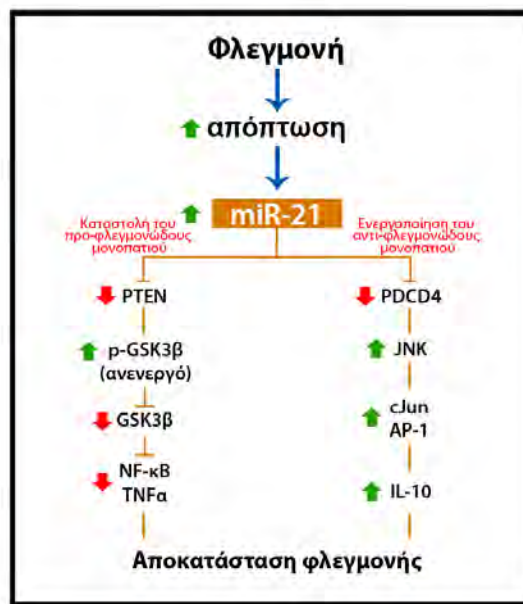
Το miR-19a/b αποτελεί μέλος της ομάδας miR-17-92. Αυτή η ομάδα είναι ο άμεσος μεταγραφικός παράγοντας του c-Myc και στοχεύει σε μείωση των E2F1, PTEN και BIM που προάγουν το πολλαπλασιασμό και την αναστολή απόπτωσης. Συγκεκριμένα ο miR-19a/b στοχεύει το PTEN, που λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας καθώς αναστέλλει το μονοπάτι απόπτωσης, διαφοροποίησης και μετανάστευσης της πρωτεϊνικής κινάσης B, το PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι.⁹¹ Ωστόσο η λειτουργία της ομάδας δεν είναι κοινή σε όλες τις περιπτώσεις. Έτσι στους ινοβλάστες της υμενώδους μεμβράνης στη PA έχει εμφανιστεί το miR-19a/b (όπως και τα miR-20a και miR-30a-3p) που λόγω της φλεγμονής και μέσω της σηματοδότησης των TLR2 και TLR4 υποδοχέων, μειώνονται τα επίπεδα του miR-19a/b. Η μείωση της ρύθμισης του miR έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της IL-6 και της MMP-3.⁹² Σε πρόσφατη έρευνα διερευνήθηκε πως ακόμη ένας στόχος του miR-19b είναι ο TNF-a. Λόγω της έντονης αποπτωτικής του δραστηριότητας, η έκφραση του TNF-a εμφανίστηκε αυξημένη ενώ του miR-19b παρουσιάστηκε μειωμένη.⁹³



Εικόνα 12. Η δράση του miR-19a/b στη PA

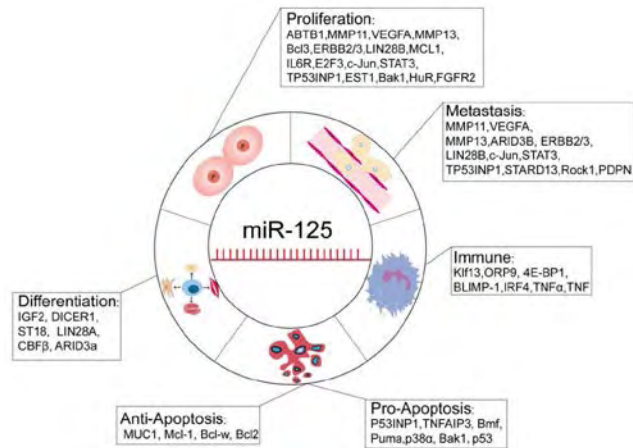
Από τα πιο καλά μελετημένα σε όγκους miR είναι το miR21, γνωστό και ως oncomir. Το miR-21 εμφανίζεται κυρίως σε καρκίνους αλλά και σε πολλούς ιστούς με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτή της φλεγμονής. Επίσης παίζει ρόλο στην αιμοποίηση

καθώς και σε πολλά MAPK μονοπάτια. Στις διαδικασίες της φλεγμονής έχει παρατηρηθεί σε διάφορα στάδια.⁹⁴ Το pri-miR-21 επάγεται από την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω του μονοπατιού NK-kB. Στην συνέχεια το ώριμο miR-21, στην άμεση απόκριση, ανατροφοδοτείται μέσω του TNF-α. Στη φλεγμονή επάγεται και αυξάνει την έκφραση της IL-10 μέσω της μείωσης του PDCD4 (Programmed Cell Death 4)⁹⁵. Εκτός από την ενεργοποίηση του αντιφλεγμονώδες αυτού μονοπατιού στοχεύει επίσης τη μείωση του προ-φλεγμονώδες μονοπατιού μέσω της μείωσης του PTEN.^{96,97} (εικόνα 13)



Εικόνα 13. Η δράση του miR-21 κατά τη φλεγμονή

Η οικογένεια του miR-125 αποτελείται από αρκετά συντηρημένα και με πλειοτροπική δράση miRNAs, όπως το miRNA-125a-3p, miRNA-125a-5p, miRNA-125b-1 και miRNA-125b-2.⁹⁸ (εικόνα 23) Ο κύριος ρόλος της οικογένειας αυτών των miRNAs εντοπίζεται στις διαδικασίες του καρκίνου, τόσο στην επαγωγή του όσο και στη μείωσή του. Συγκεκριμένα ένα από αυτά, το miR-125b διαπιστώθηκε ως πιο αξιόπιστος μάρτυρας στη διάγνωση του καρκίνου.⁹⁹ Παρόλο αυτά το σύνολο της ομάδας των miRs είναι απαραίτητο να ελεγχθεί περαιτέρω. Η PA έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με μείωση στη συγκέντρωση του πλάσματος του miR-125a-3p¹⁰⁰ ενώ τα επίπεδα του miR-125a-5p παρουσίασαν αύξηση.¹⁰¹ Επίσης το miR-125a-5p βρέθηκε να ενέχεται στη πρόληψη λιπιδίων μέσω σηματοδότησης του TLR-2 και TLR-4 και να μειώνει ορισμένες φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-2 η IL-6 ο TNF-α και ο TGF-β στα μακροφάγα.¹⁰²



Εικόνα 14.
Οι διάφοροι στόχοι ρύθμισης της οικογένειας του miR-125

Στόχος της εργασίας είναι η διερεύνηση των παραπάνω miRNAs στους ιστούς της άρθρωσης γονάτου (χόνδρο, υμένα και μηνίσκο) ασθενών σε τελευταίο στάδιο ΟΑ και φλεγμονής.

ΜΕΡΟΣ 2^ο – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ - 1^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA σε διάφορους ιστούς οστεοαρθρικής άρθρωσης (χόνδρος, υμένας, μηνίσκος) που συσχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής.

Συγκεκριμένα στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν:

- A.** Τα επίπεδα έκφρασης των miR-16, miR-19a, miR-19b, miR21 και miR125-5p σε χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα μηνίσκου.
- B.** Αναζήτηση μορίων στόχων του miR21 με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής
- Γ.** Επιλογή των γονιδίων στόχων TLR-4 και IL-1b, για τη διερεύνηση του ρόλου τους στη φλεγμονή στην ΟΑ
- Δ.** Επιδράσεις με το miR-21 σε χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα μηνίσκου για πειραματική μελέτη της αλληλεπίδρασης του miR21 με τα mRNAs στόχους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ – 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου, αρθρικού υμένα και μηνίσκου από την ίδια άρθρωση από ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ, στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από όλους τους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη ελήφθη επίσης αρθρικό υγρό υπό άσηπτες συνθήκες στο χώρο του χειρουργείου και περιφερικό αίμα. Συνολικά 12 δείγματα οστεοαρθρικού χόνδρου, υμένα και μηνίσκου συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χονδροδυσπλασία, σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ακτινογραφικός έλεγχος πριν υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική και οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν με το σύστημα Kellgren - Lawrence με βάση τα ακόλουθα κριτήρια: κατηγορία 0: φυσιολογική άρθρωση, κατηγορία 1: ελάχιστα οστεόφυτα, κατηγορία 2: σαφή οστεόφυτα, κατηγορία 3: οστεόφυτα και στένωση μεσαρθρίου διαστήματος, κατηγορία 4: οστεόφυτα, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος και σκλήρυνση υποχόνδριου οστού. Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν βαθμολογία ≥ 3 στην κλίμακα Kellgren – Lawrence με το 90% αυτών να έχουν βαθμολογηθεί με 4.

Τα δείγματα ελέγχου, 7 δείγματα φυσιολογικού χόνδρου και 5 δείγματα φυσιολογικού υμένα λήφθηκαν από άτομα που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αποκατάσταση καταγμάτων ή ακρωτηριασμό και δεν είχαν ιστορικό παθήσεων των αρθρώσεων ή αλλοιώσεις συμβατές με ΟΑ όπως προέκυψε μετά από ακτινολογικό έλεγχο.

2.2 Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων, ινοβλαστών του αρθρικού υμένα και κυττάρων μηνίσκου

Η απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων έγινε από τμήμα αρθρικού χόνδρου, μηνίσκου και υμένα που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της ολικής αρθροπλαστικής γόνατος. Αμέσως μετά την παραλαβή του δείγματος από το χειρουργείο έγινε έκπλυση του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer (PBS w/o Ca^{2+} Mg^{2+} , HyClone) ώστε να καθαριστεί από τα υπολείμματα του χειρουργείου και να διατηρηθεί σταθερό το pH του.

Για την απομόνωση των κυττάρων οι ιστοί υπεβλήθησαν σε ενζυμική κατεργασία αρχικά με προνάση, η οποία διασπά τις πρωτεογλυκάνες ώστε να απελευθερωθούν οι ίνες του κολλαγόνου και κατόπιν με κολλαγενάση, η οποία οδηγεί σε διάσπαση των κολλαγόνων ινών και απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham'F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του, εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 5% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει αναγκαίους αναπτυξιακούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με αντιβιοτικά, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, R/S) σε αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού.

Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37° C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Αναλυτικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

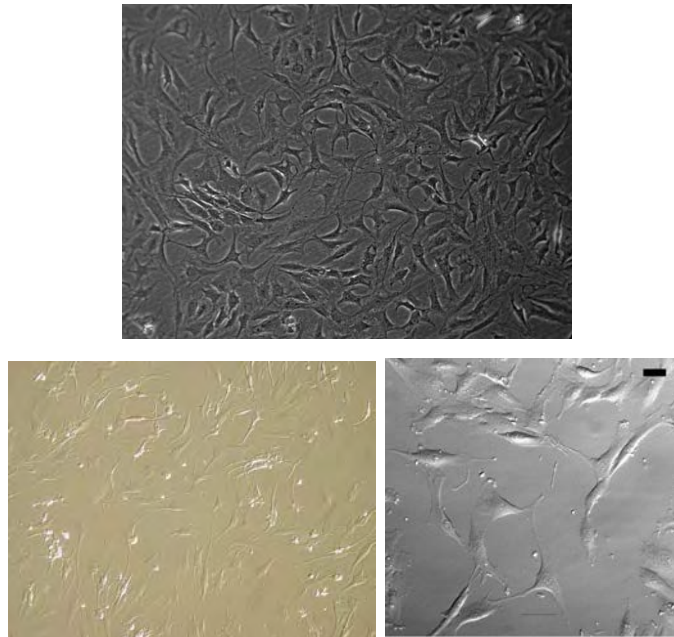
1. Ξέπλυμα του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS w/o Ca²⁺ Mg²⁺
2. Τεμαχισμός του ιστού με αποστειρωμένο νυστέρι
3. Μεταφορά των τεμαχίων σε τρυβλίο petri χωρητικότητας 2ml θρεπτικού υλικού
4. Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche) 5mg/ml σε 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά.
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μιας χρήσης
6. Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche) 5mg/ml σε 2ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 24 ώρες.

Την επόμενη ημέρα:

7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε πλαστικό σωληνάριο των 15 ml (falcon), φυγοκέντρωση στις 2000rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, απόρριψη του υπερκείμενου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές.

8. Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25 cm^3 μαζί με 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο (37°C , $5\% \text{CO}_2$).

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 48 ώρες προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και αποκτούν πεπλατυμένο, πολυγωνικό σχήμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 14 που ακολουθεί.



Εικόνα 14. Χονδροκύτταρα (πάνω) σε καλλιέργεια 48 ωρών (μεγέθυνση 20x)

Κύτταρα υμένα (αριστερά) και κύτταρα μηνίσκου (δεξιά)

Η ανακαλλιέργεια κυττάρων γινόταν κάθε 7 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν, όταν τα κύτταρα των διαφόρων ιστών είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 1 έως 2 ανακαλλιέργειες γινόταν και κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o Ca^{++} , Mg^{++} και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν.

Οι φλάσκες παρέμειναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο

μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως γινόταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς απομόνωση των κυττάρων. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με πλάκα NewbauerQ 20 ml από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20ml Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση $1-2 \times 10^6$ κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ /ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους -20°C για 4 ώρες, κατόπιν στους -80°C για 24 ώρες και τελικά στους -150°C .

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 6ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25 cm^3 και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

2.3 Απομόνωση RNA από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κυττάρων μηνίσκου

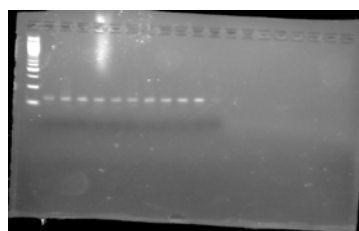
Από τις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων, των κυττάρων του υμένα και του μηνίσκου απομονώθηκε mRNA για τη διερεύνηση της μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

1. Σε κύτταρα αποκολλημένα από τη φλάσκα προστέθηκε 1ml Trizol (Invitrogen, life Technologies, Paisley, UK) με στόχο τη λύση των κυττάρων.
2. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5min στο υδατόλουτρο στους $15-30^{\circ}\text{C}$.

3. Προστέθηκε σε καθένα 200ml χλωροφόρμιο, ακολούθησε έντονη ανακίνηση τους για 15 sec και επώαση για άλλα 2-3 min στο υδατόλουτρο στους 15-30°C.
4. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C.
5. Μετά την φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει Trizol/χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA.
6. Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο των 2ml όπου πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης.
7. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 10 min στο υδατόλουτρο στους 15-30°C και φυγοκέντρηση τους στις 12000 rpm για 10 min στους 4°C.
8. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500ml κρύας αιθανόλης 70% στο ίζημα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 10000 rpm στους 4°C.
9. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, και το ίζημα αφού στέγνωσε πολύ καλά (το σωληνάριο βρίσκεται σε πάγο με ανοιχτό καπάκι και προστατευμένο με τρυπημένη μεμβράνη) διαλυτοποιήθηκε. Η διάλυση έγινε με προσθήκη 30ml ddH_2O .
10. Ακολούθησε επώαση στο υδατόλουτρο για 10 min στους 55-60°C.

2.4 Ηλεκτροφόρηση του RNA – Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή αгарόζης 2%

2.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) για προσδιορισμό της έκφρασης των microRNAs

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τα καλλιεργημένα κύτταρα των τριών ιστών, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές είτε

ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας (stem loop RT primer, 5pmol) ώστε να ενισχυθεί η περιοχή που περιέχει το microRNA που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε (miR-16, 19a, 19b, 21, 125-5p stem loop RT primer, or U6 small nuclear RNA (RNU6B) stem loop RT primer). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφή MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl). Η σύνθεση cDNA από RNA 1μgr πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια και περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Στάδιο 1

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
RNA	1μgr
Stem loop primer (5pmol)	2μl
δισ απεσταγμένο νερό (<i>ddH₂O</i>)	Έως τελικό όγκο 13μl

Στάδιο 2

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
Ρυθμιστικό διάλυμα 5×	4μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)	2μl
MMLV RT (200u/ml)	1μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.
- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 37°C, 60 λεπτά
 - 65°C, 10 λεπτά
 - Τελική θερμοκρασία 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως αντίγραφο «αναφοράς» χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RNU6B. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του προϊόντος, το cDNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (F: Forward, R: Reverse) για τις αλληλουχίες του U6 cDNA. Οι εκκινητές για το γονίδιο RNU6B είναι:

U6 F : 5' – GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT -3'

U6 R : 5' – CTCACACCGTGTTCGTTCCA -3'

- ο Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίσχυση του γονιδίου U6 περιέχει:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
cDNA	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq Pol	0,125μl
Εκκινητής U6 (5μM)	0,5μl
Εκκινητής U6 (5 μM)	0,5μl
δix απεσταγμένο νερό (<i>ddH₂O</i>)	17,875μl

- ο Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίσχυση των microRNAs (16, 19a, 19b, 21, 125-5p) περιέχει τα άνωθεν με τους αντιστοίχους εκκινητές των microRNAs.

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- ο Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για ένα λεπτό
- ο 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση – σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 15 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα
- ο τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των mir 16 / mir 19a / mir-19b / mir 21 / mir 125-5p και του γονιδίου αναφοράς RNU6B με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Βασικές αρχές μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος μοριακής βιολογίας, με την εφαρμογή της οποίας συντίθεται ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA *in vitro* με την βοήθεια της Taq DNA πολυμεράσης και των εκκινητών. Η PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές – ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς

τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA – εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 20 - 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1) Αποδιάταξη του εκμαγείου DNA (denaturation)

Συνθήκες συνθήκες: 94°C - 96°C, 20'' -60''

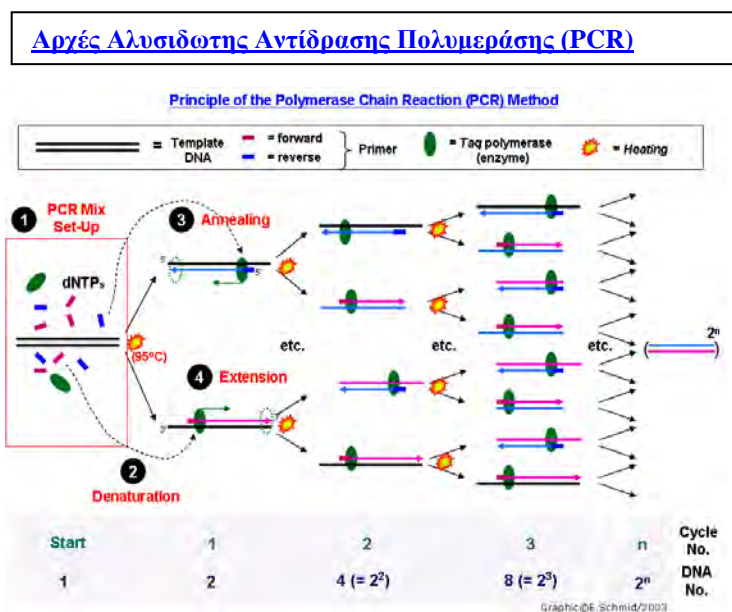
2) Σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing).

Συνθήκες συνθήκες: 37°C - 65°C, 20'' -60''.

3) Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3'(extension).

Συνθήκες συνθήκες: 72°C, 0,5-2 min.

Η διαχρονική διάταξη του κάθε σταδίου εξαρτάται κυρίως από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA. Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από η κύκλους προϊόν PCR περιέχει 2^n δίκλιωνα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές (εικόνα 16).



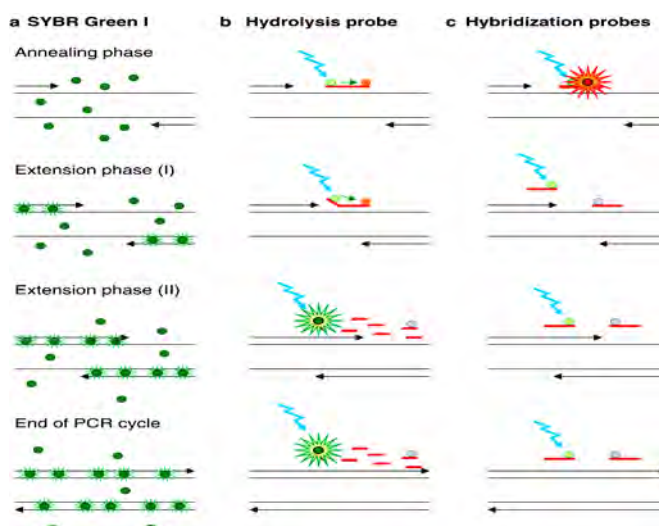
Εικόνα 16. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για μια DNA αλληλουχία – στόχο

Ο έλεγχος των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, δηλαδή η παρουσία ή όχι των αντίστοιχων τμημάτων συγκεκριμένου μεγέθους, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% με μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών 100 bp (Gibco).

2.6 Ποσοτικοποίηση των miR 16 / 19a / 19b / 21 / 125-5p και των mRNA μεταγραφών των γονιδίων IL-1B, TLR-4 και του μικρού πυρηνικού RNA U6 (RNU6B) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction –RT PCR).

Βασικές αρχές της μεθόδου

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time polymerase chain reaction), ονομάζεται η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας – στόχου με τη μέθοδο της PCR και η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο έλεγχος της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων (probes). Σήμερα οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη real-time PCR είναι: α) η SYBR green I χρωστική, β) οι ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis probes) και γ) οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes) (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη real time PCR

Η απλούστερη μέθοδος είναι αυτή στην οποία το προϊόν PCR ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές που συνδέονται στο δίκλωνο DNA. Το SYBR green I είναι μια τέτοια χρωστική, η οποία παράγει σήμα φθορισμού. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη του ποσού του DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της real time PCR. Επιπλέον η

SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m).

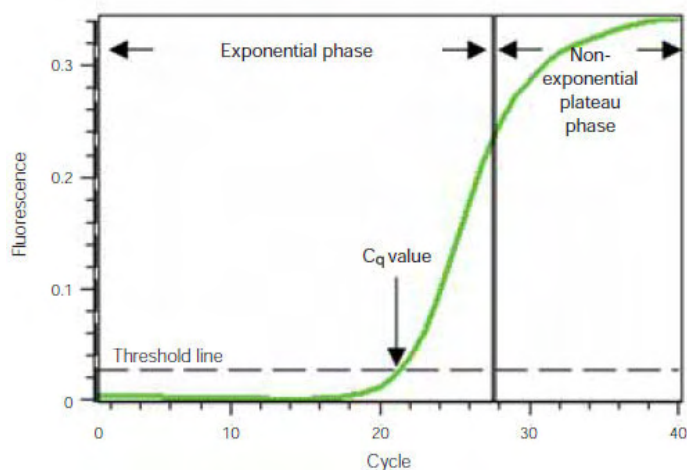
Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης.

Μεγαλύτερη ειδικότητα στη real time PCR επιτυγχάνεται με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher) και είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία του αναμενόμενου μεταγράφου.

Τα πλεονεκτήματα της real time PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι πολλά. Το πιο σημαντικό ίσως αναφέρεται στην ικανότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτο πλατύ δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

Ποσοτικοποίηση

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι (threshold) – σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε ποιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι (cycle threshold, C_t). Οι τιμές C_t εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) που προκύπτει κατά τη real time PCR

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού (fluorescence) σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων (cycles) αντίδρασης. Ως κατώφλι (threshold line) ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από τη συσκευή πραγματοποίησης της αντίδρασης. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του στατικά σημαντικού σήματος για κάθε δείγμα (threshold cycle – Ct), σε σχέση το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού. Οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος και εντοπίζονται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού (exponential phase). Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού (plateau phase). Το ΔRn (delta Rn) είναι το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού της χρωστικής διαιρούμενη από την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μιας χρωστικής αναφοράς αποτελεί το Rn (normalized reporter). Αυτή η χρωστική αναφοράς (passive reference dye) είναι απαραίτητη για την διόρθωση διακυμάνσεων που αφορούν αλλαγές στη συγκέντρωση ή τον όγκο και συμπεριλαμβάνεται σε όλα τα SDS kits της αντίδρασης PCR. Ανάλογα με το σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification). Η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) παρέχει την μεγαλύτερη ακρίβεια στην

ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση μίας καμπύλης αναφοράς (standard curve), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγθεί μια γνωστή συγκέντρωση – μάρτυρας, που μπορεί να προέρχεται από DNA, RNA cDNA, ανασυνδυασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Αυτή η συγκέντρωση – μάρτυρας θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα. Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις τιμές Ct της κάθε αραιώσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη. Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα.

Η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και με τη μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά την αλυσιδωτή ενίσχυση, με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθητικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Το ποσό του μορίου – στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο – ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Επιλογή εσωτερικού μάρτυρα

Κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι δυνατό να προκύψουν σφάλματα που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού του υλικού DNA ή RNA μεταξύ των δειγμάτων. Η διόρθωση αυτής της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού μάρτυρα (endogenous control) ως προς

τον οποίο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, θα κλωνοποιηθεί στη συνέχεια το δείγμα. Ο ιδανικός εσωτερικός μάρτυρας θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφόρων ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και θα πρέπει να παραμείνει ανεπηρέαστος από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης θα πρέπει να εκφράζεται αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι η β-ακτίνη, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και άλλα RNAs όπως το μικρό πυρηνικό RNA U6 (RNU6B). Στην παρούσα μελέτη ως εσωτερικός μάρτυρας επελέγη η δεϋδραγονάση της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GARDH) καθώς και το RNU6B στην περίπτωση της ανίχνευσης μικρών μη κωδικών αλληλουχιών RNA (microRNAs) ένα από τα πρώτα RNA που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό. Εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας.

Προετοιμασία της αντίδρασης

Πριν την αντίδραση, στο cDNA κάθε δείγματος έγινε αραιώση 1:5 ή 1:100 στην περίπτωση που το cDNA πραγματοποιήθηκε με step loop primers και χρησιμοποιήθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς cDNA.

Για την ποσοτικοποίηση των miR-16 / 19a / 19b / 21 / 125-5p και ποσοτικοποίηση των γονιδίων IL-1b, TRL-4, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Power SYBR Green (Applied Biosystems Foster, CA), στη συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems Foster, CA), ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές καθώς και οι εκάστοτε συνθήκες αναφλερονται στον Πίνακα .

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-40), καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης ακολουθίας – στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 95°C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA – στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, καθώς ο κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική RT – PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των αναφερθέντων γονιδίων καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων, τα Tm των εκκινητών και οι κύκλοι ενίσχυσης της RT – PCR.

Γονίδιο	Εκκινητές	Tm	Αριθμός κύκλων
miR 16	F: 5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAAT-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3	62°C	45
miR 19a	F: 5'-CTGGAGTGTGCAAATCTATGC-3 R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3	62°C	45
miR 19b	F: 5'-TCCTGTGCAAATCTATGCAAAAC-3 R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3	64°C	45
miR 21	F: 5'-GCGGCAACACCAGTCGATG-3 R: 5'-TGCGTGTCGTGGAGTC-3	62°C	45
miR 125-5p	F: 5'-ACCCTCCCTGAGACCCTAAC-3 R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3	64°C	45
U6	F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3 R: 5'-CTCACACCGTGTCGTTCCTCA-3	70°C	45
GAPDH	F: 5'-ACCACTGTCCACGCCATCAC-3 R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3	64°C	45
TLR-4	F: 5'-TGAGCAGTCGTGCTGGTATC -3 R: 5'- CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC-3	62°C	45
IL-1B	F: 5'-GGGCCTCAAGGAAAAGAATC -3 R: 5'- TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA-3	60°C	45

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιέχει:

cDNA	→	3μl
SYBR Green	→	5μl
Εκκινητής Forward (5p/mol)	→	0,5μl
Εκκινητής Reverse (5p/mol)	→	0,5μl
δισ απεσταγμένο νερό	→	1μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για ένα λεπτό
- × κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση – σύνδεση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature, Tm) του κάθε εκκινητή για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

2.7 Αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων με τη χρήση μικρών μη κωδικών αλληλουχιών RNA (microRNAs)

✓ Βασικές αρχές της μεθόδου

Η χρήση των μικρών μη κωδικών αλληλουχιών RNA (microRNAs) αποτελεί μια σύγχρονη προσέγγιση για την στοχευμένη αναστολή της έκφρασης γονιδίων που ευθύνονται για την εκδήλωση και εξέλιξη διαφόρων πολυπαραγοντικών και μη νόσων. Τα microRNAs είναι αλληλουχίες RNA μήκους 20 -24 νουκλεοτιδίων, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μετα-μεταγραφικά. Τα ώριμα microRNAs είναι συμπληρωματικά με περισσότερα του ενός mRNA γονιδίων και η συμπληρωματικότητα αυτή παρατηρείται στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων στην 3'- αμετάφραστη περιοχή των mRNA – στόχων και σε σπάνιες περιπτώσεις στην 5'- αμετάφραστη περιοχή τους ή σε κωδικοποιούσες περιοχές. Στην περίπτωση της πλήρους συμπληρωματικότητας παρατηρείται άμεση αποδόμηση των μεταγραφών, ενώ η μερική συμπληρωματικότητα εμποδίζει τη μετάφραση τους σε ώριμες πρωτεΐνες.

✓ Πρωτόκολλο αποσιώπησης γονιδίων με τη χρήση *microRNAs*

Μία ημέρα πριν γίνει η διαμόλυνση των κυττάρων με το miR-21, οστεοαρθρικά και φυσιολογικά κύτταρα, καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο που ήδη περιγράφηκε, τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 6 πηγαδάκια (six- well plates) και προστέθηκαν 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 χωρίς FBS και αντιβιοτικά. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες (37°C, 5% CO₂). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών τιμών.

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κάθε πηγαδιού ήταν η εξής:

- 1) Προσθήκη 5 μl λιποφεκταμίνης σε 495 μl DMEM/F-12 χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση.
- 2) Προσθήκη 5 μl *microRNA* σε 495 μl DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση.
- 3) Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του *microRNA*. Καλή ανάδευση.
- 5) Επώαση του μίγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS (δύο φορές).
- 7) Μεταφορά 1 ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη/*microRNA*.
- 8) Προσθήκη 1 ml DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά (στα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου προστέθηκε μόνο 2 ml DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά).

Μετά το πέρας του κάθε χρονικού διαστήματος επίδρασης ακολούθησε συλλογή των κυττάρων, απομόνωση RNA, πρωτεϊνών και κυτταρικού εκχυλίσματος με τις μεθόδους που περιγράφηκαν προηγουμένους.

✓ Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) ύστερα από επιδράσεις με το miR 21

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τα καλλιεργημένα κύτταρα των τριών ιστών, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές

εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml) Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl). Η σύνθεση cDNA από RNA 1μgr πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια και περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Στάδιο 1

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
RNA	1μgr
Τυχαία εξανουκλεοτίδια (3μg/μl)	2μl
δισ απεσταγμένο νερό (<i>ddH₂O</i>)	Έως τελικό όγκο 13μl

Στάδιο 2

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
Ρυθμιστικό διάλυμα 5×	4μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)	2μl
MMLV RT (200u/ml)	1μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Το διάλυμα RNA με τα τυχαία ολιγονουκλεοτίδια, θερμάνθηκε στους 65°C επί 5min για την αποδιάταξη δευτερογενών δομών του RNA.
- Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.
- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 37°C, 60 λεπτά
 - 65°C, 10 λεπτά
 - Τελική θερμοκρασία 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως αντίγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο στάδιο της γλυκόλυσης. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του προϊόντος, το

cDNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (F: Forward, R: Reverse) για τις αλληλουχίες του GAPDH cDNA. Οι εκκινητές για το γονίδιο GAPDH είναι:

GAPDH F : 5' – ACCACTGTCCACGCCATCAC -3'

GAPDH R : 5' – TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

- ο Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιέχει:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
cDNA	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα My Taq HS 2x	10μl
Εκκινητής U6 (5μM)	0,5μl
Εκκινητής U6 (5 μM)	0,5μl
δix απεσταγμένο νερό (<i>ddH₂O</i>)	6μl

Ο προσδιορισμός της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων TLR-4, IL-1β πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Real Time PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.8 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 20 και συγκεκριμένα το Kruskal-Wallis και Mann-Whitney U test.

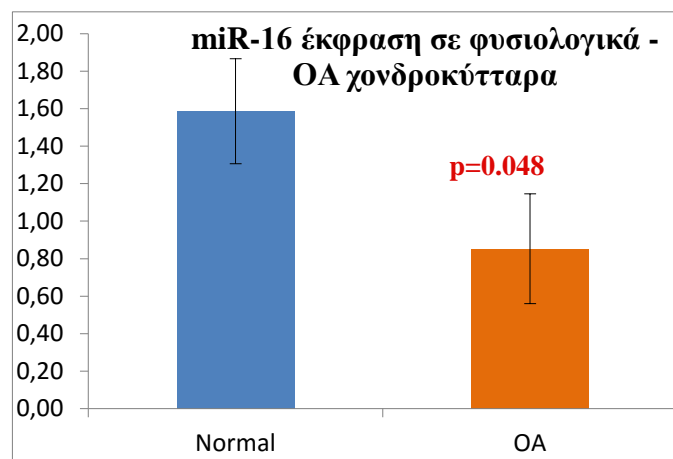
Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με το μέσο τυπικό σφάλμα (mean \pm standard error mean, SEM)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ - 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

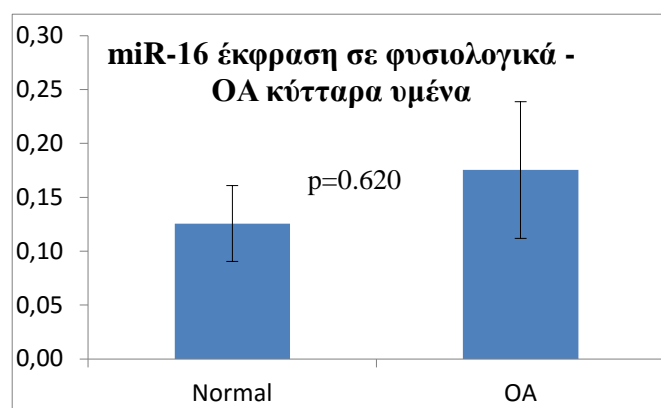
3.1) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-16 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

Στην προσπάθεια ανάζητησης νέων miRNAs που συσχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής στην OA, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των miR-16, miR-19a, miR-19b, miR21 και miR125-5p σε χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα μηνίσκου. Αρχικά ο προσδιορισμός της έκφρασης του miR-16 έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο RT—PCR. Από τις μετρήσεις παρατηρείται στατιστικά, σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-16 στα χονδροκύτταρα σε ασθενείς με OA σε σχέση με τα χονδροκύτταρα φυσιολογικού ιστού ($p=0.048$)



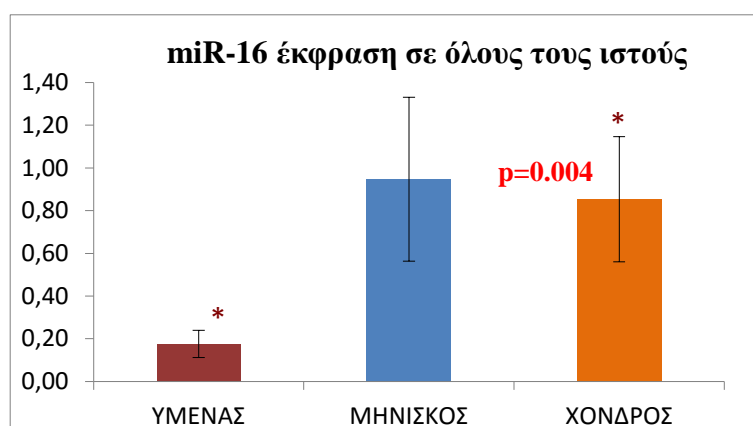
Διάγραμμα 1. Η έκφραση του miR-16 στα OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Τα επίπεδα έκφρασης του σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA υμενοκυττάρων δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-16 σε OA υμενοκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. ($p=0.620$)



Διάγραμμα 2. Η έκφραση του miR-16 σε φυσιολογικά και OA υμενοκύτταρα

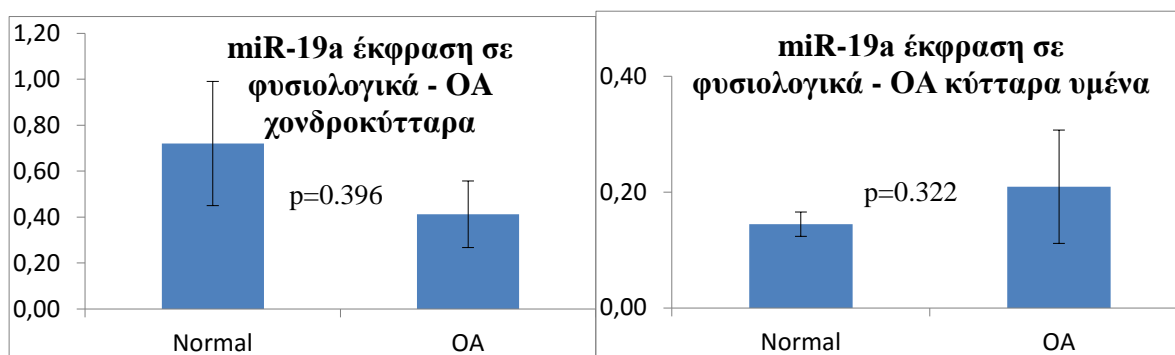
Παρατηρώντας τα επίπεδα έκφρασης του miR-16 στους ιστούς του υμένα, του μηνίσκου και του χόνδρου, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-16 εμφανίστηκε μειωμένη στον υμένα σε σύγκριση με τους άλλους δύο ιστούς. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των υμενοκυττάρων και των χονδροκυττάρων με $p=0.004$.



Διάγραμμα 3. Σύγκριση της έκφρασης του miR-16 μεταξύ OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων

3.2) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-19a σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

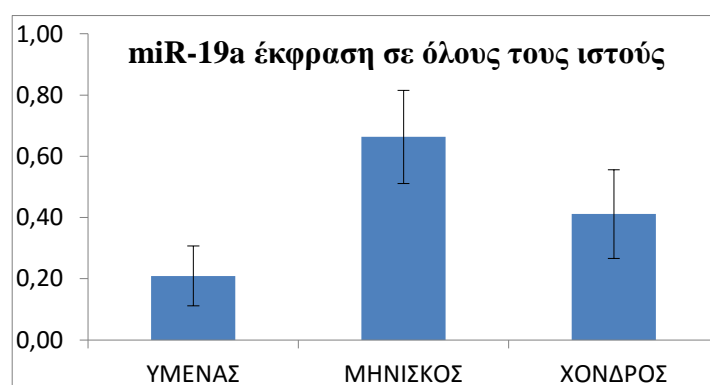
Το επόμενο miR που μελετήθηκε ήταν το miR-19a. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-19a μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων ($p=0.396$) και υμενοκυττάρων ($p=0.322$).



Διάγραμμα 4. Η έκφραση του miR19a σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και υμενοκύτταρα

Παρακάτω παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η έκφραση του miR-19a σε ιστούς από ολόκληρη την άρθρωση του γονάτου ασθενών με ΟΑ.

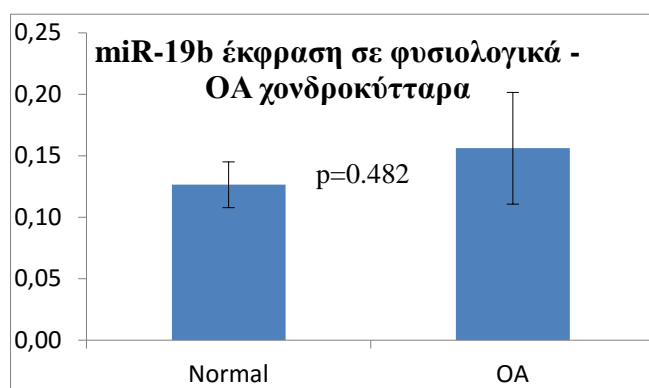
Η έκφραση του miR εμφανίζει κλιμακούμενη εικόνα ανάμεσα στους ιστούς, με το μηνίσκο να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση, ακολουθούν τα κύτταρα του χόνδρου και τέλος αυτά του υμένα, χωρίς όμως την εμφάνιση στατιστικής σημαντικότητας.



Διάγραμμα 5. Σύγκριση της έκφρασης του miR-19a μεταξύ ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

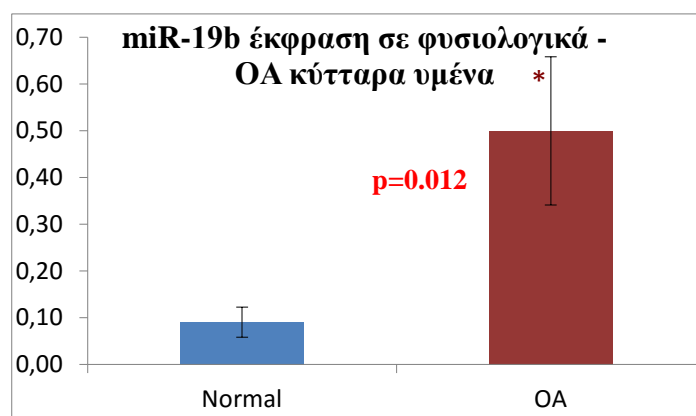
3.3) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-19b σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

Το miR-19b αποτελεί ένα ακόμη μέλος της ομάδας miR-17-92 και είναι ο επόμενος στόχος μελέτης από τα miR που επιλέχθηκαν. Τα επίπεδα έκφρασης του σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων δεν έδειξαν στατιστική σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-19b μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. ($p=0.482$)



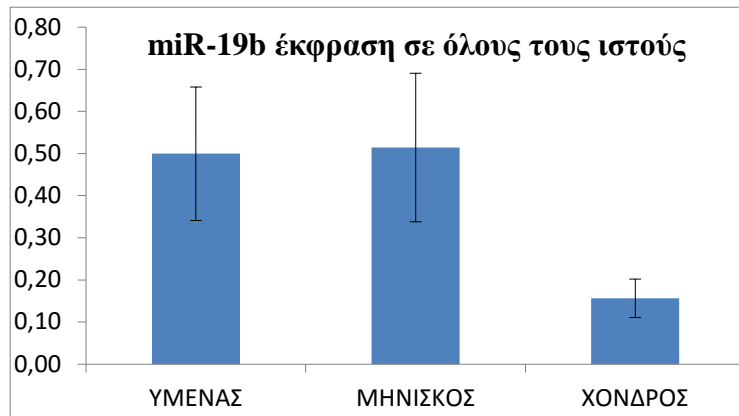
Διάγραμμα 6. Η έκφραση του miR-19b στα OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Απεναντίας τα επίπεδα έκφρασης του miR-19b σε καλλιεργείες φυσιολογικών και OA υμενοκυττάρων εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση, $p=0.012$.



Διάγραμμα 7. Η έκφραση του miR-19b στα OA και φυσιολογικά υμενοκύτταρα

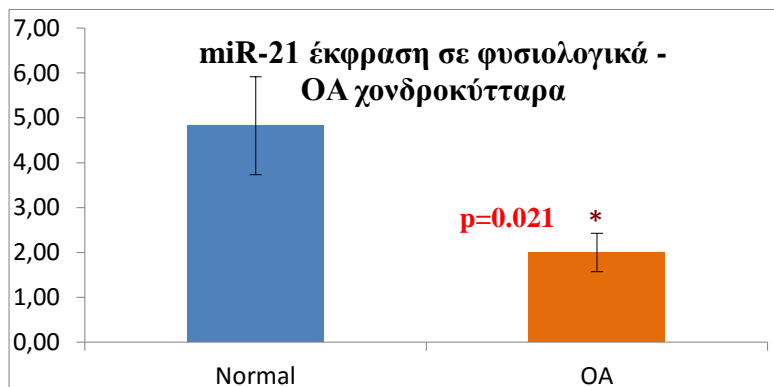
Παρατηρώντας όλους τους ιστούς της άρθρωσης, η έκφραση του miR είναι μεγαλύτερη στον υμένα και στο μηνίσκο σε σύγκριση με το χόνδρο χωρίς όμως αυτή η αύξηση να εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα.

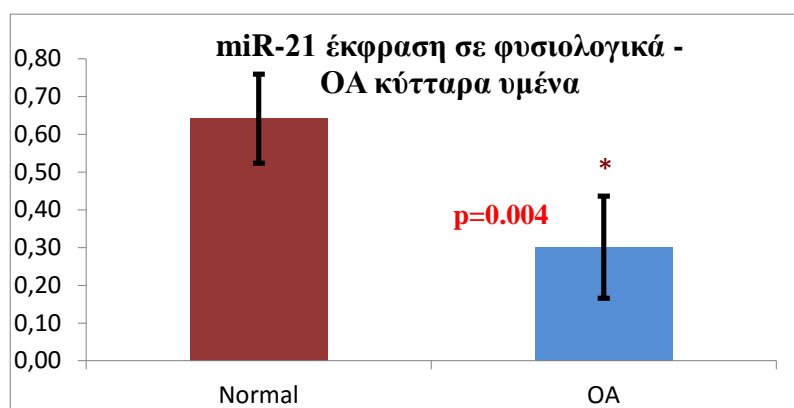


Διάγραμμα 8. Σύγκριση της έκφρασης του miR-19b μεταξύ OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

4) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-21 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

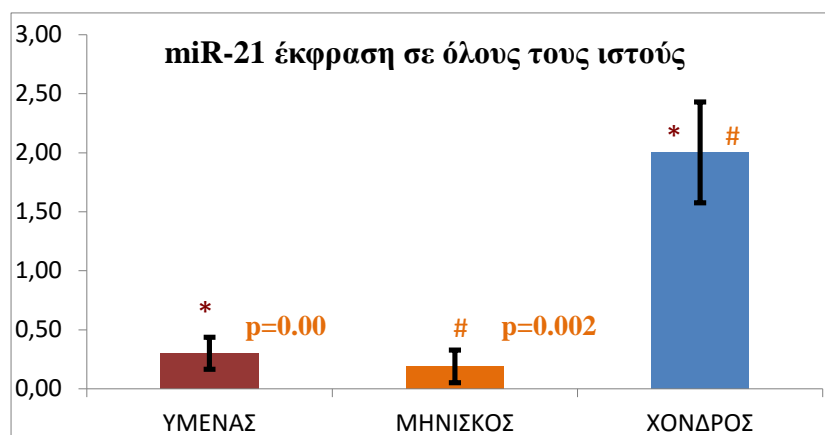
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το miR-21 είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα miR.⁹³ Μελέτες έχουν δείξει πως η συσχέτιση του με την OA είναι άμεση αλλά σε ρόλο διαφορετικό από αυτό της φλεγμονής. Ο λόγος που το επιλέξαμε ήταν για να μελετήσουμε τη πιθανή συμμετοχή του σε ένα ακόμη μονοπάτι που εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της OA. Πράγματι, οι μετρήσεις που ακολουθήθηκαν στην προσπάθεια προσδιορισμού της έκφρασης miR-21 ήταν επιτυχής. Παρατηρήθηκε στατιστική σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του miR-21 μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων ($p=0.021$) με ταυτόχρονη στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ OA και φυσιολογικών υμενοκυττάρων ($p=0.004$).





Διάγραμμα 9. Η έκφραση του miR-21 σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και υμενοκύτταρα

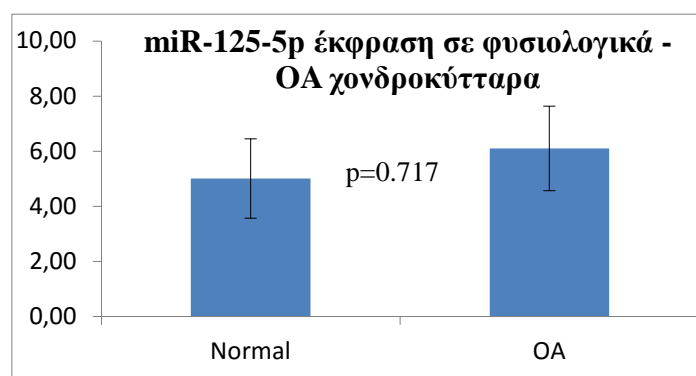
Συγκρίνοντας όλους τους ιστούς της άρθρωσης, υμένα, μηνίσκο και χόνδρο, παρατηρήθηκε στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ υμένα και χόνδρου με $p=0.00$, ενώ ανάλογη στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ μηνίσκου και χόνδρου $p=0.002$.



Διάγραμμα 10. Σύγκριση της έκφρασης του miR-21 μεταξύ OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

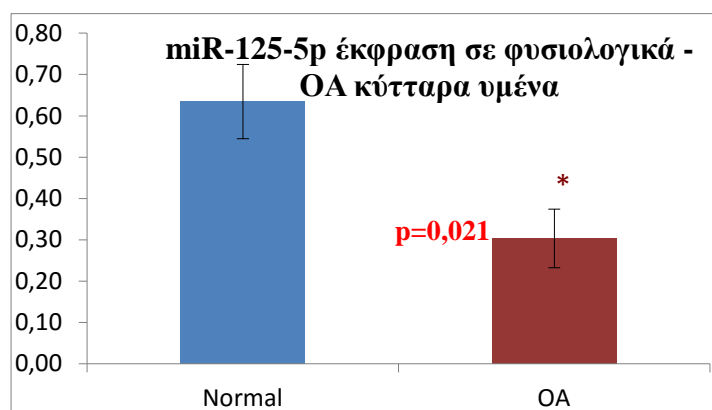
3.5) Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-125-5p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

Λαμβάνοντας υπόψη την πλειοτροπική δράση της μεγάλης οικογένειας των miR-125 και τη συμμετοχή τους στη φλεγμονώδη αντίδραση διαφόρων ασθενειών ερευνήσαμε την ενδεχόμενη συμμετοχή του στην OA. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-125-5p πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA κυττάρων χόνδρου, υμένα και μηνίσκου. Η έκφραση του miR-125-5p στα κύτταρα του χόνδρου με OA δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα, καθώς υπολογίστηκε στο $p=0.620$.



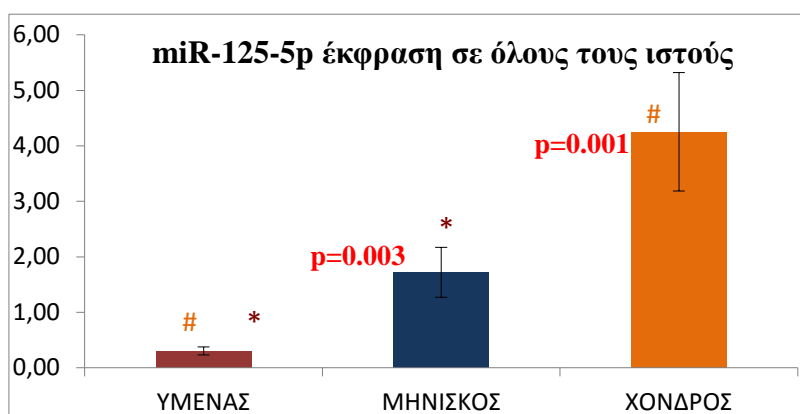
Διάγραμμα 11. Η έκφραση του miR-125-5p στα OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Αντίθετα σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA υμενοκυττάρων παρατηρήθηκε μείωση στα κύτταρα του υμένα των ασθενών με OA με στατιστική σημαντικότητα $p=0.021$.



Διάγραμμα 12. Η έκφραση του miR-125-5p στα OA και φυσιολογικά υμενοκύτταρα

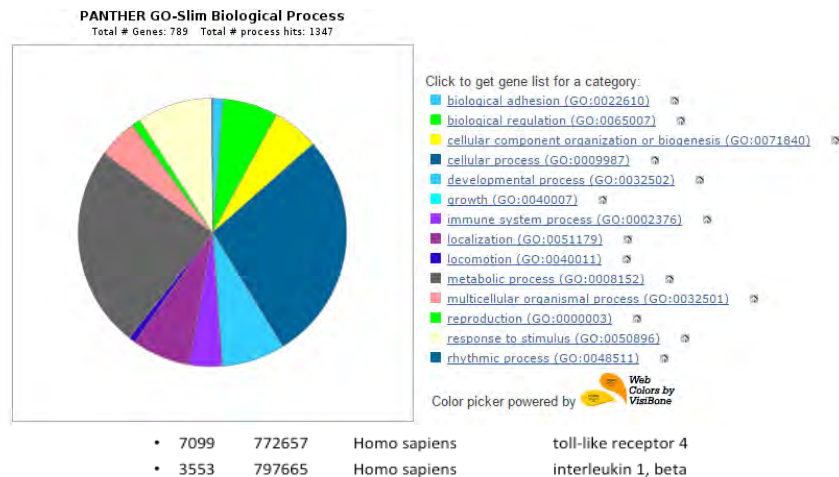
Μελετώντας συγκεντρωτικά όλους τους OA ιστούς της άρθρωσης, παρατηρείται στατιστική σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-125-5p μεταξύ υμενοκυττάρων και χονδροκυττάρων με $p=0.001$, ενώ ο προσδιορισμός της έκφρασης του miR-125-5p μεταξύ των κυττάρων του μηνίσκου και του υμένα εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα, $p=0.003$.



Διάγραμμα 13. Σύγκριση της έκφρασης του miR-125-5p μεταξύ OA χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου.

3.6) Προσδιορισμός των γονιδίων – στόχων του miR-21 με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων

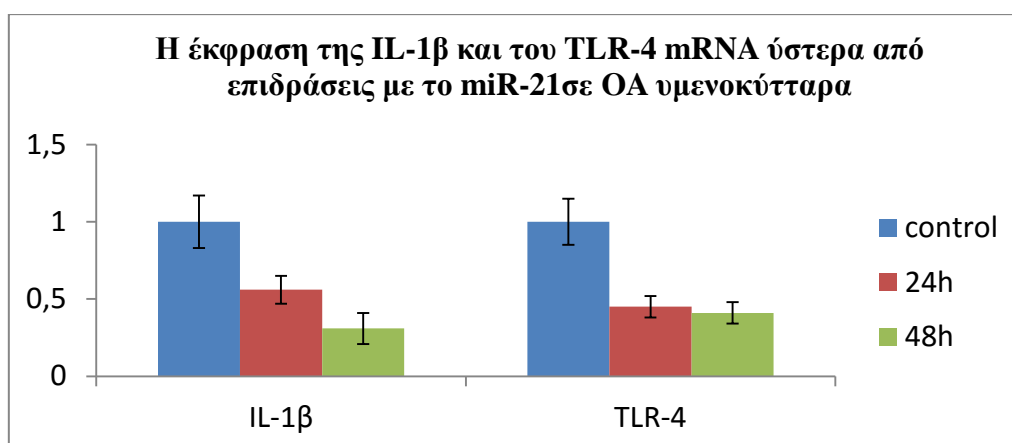
Για να διερευνήσουμε το ρόλο του miR-21 στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή χρησιμοποιήσαμε τρία διαφορετικά υπολογιστικά προγράμματα, το TargetScan 6.2, το miRanda και το miRBase. Απο τις βάσεις δεδομένων των υπολογιστικών προγραμμάτων αναγνωρίστηκαν αρκετά γονίδια στόχοι του miR-21. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Panther έγινε ανάλυση της βιολογικής λειτουργίας των γονιδίων στόχων του miR-21 που έχουν επαληθευτεί πειραματικά. Ακολουθήθηκε περαιτέρω επεξεργασία με το πρόγραμμα DAVID όπου και επιλέχθηκαν τα γονίδια στόχοι του miR-21 που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η επαλήθευση της συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας μεταξύ του miR-21 και των γονιδίων TLR-4 και IL-1β πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα microRNA.



Εικόνα 19. Βιολογική λειτουργία γονιδίων και γονίδια στόχοι του miR-21 που συσχετίζονται με φλεγμονή

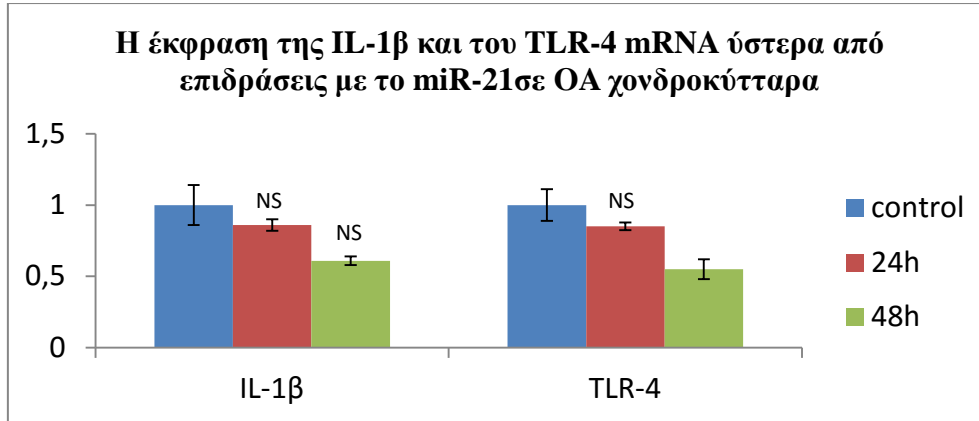
3.7) Επιδράσεις σε ΟΑ χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα μηνίσκου με miR-21 για την μελέτη της έκφρασης των TLR-4 και IL-1β

Προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο του miR-21 στην έκφραση γονιδίων που λαμβάνουν χώρα στη φλεγμονώδη αντίδραση (TLR-4 και IL-1β), επιδράσαμε σε οστεοαρθρικά κύτταρα χόνδρου, υμένα και μηνίσκου με 50nM miR-21 για 24h και 48h. Η χορήγηση ήταν επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα κύτταρα του υμένα για την IL-1β και τον TLR-4 μετά τη χορήγηση του miR-21 στις 24h και 48h, σε σχέση με αυτά στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε η επίδραση. (εικόνα 20)



Διάγραμμα 14. Μεταγραφική έκφραση του miR-21 σε ΟΑ υμενοκύτταρα μετά από επίδραση με 50nM miR-21 για 24h και 48h. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. *p<0.05

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του mRNA του γονιδίου TLR-4 στις 48h στα κύτταρα του χόνδρου. Ο προσδιορισμός της έκφρασης της IL-1β στις 24h και 48h δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα, όπως και του TLR-4 στις 24h.



Διάγραμμα 15. Μεταγραφική έκφραση του miR-21 σε OA χονδροκύτταρα, μετά από επίδραση με 50nM miR-21 για 24h και 48h. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $p < 0.05$ NS=Not Significant (μη στατιστικά σημαντικό)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ - 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μικρά μη κωδικά RNAs, miRNAs, έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων και έχουν σημαντική διαγνωστική και προγνωστική αξία σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Τα miRNAs είναι σημαντικός στόχος μελέτης καθώς μέσα από την συμπεριφορά τους και την συγκέντρωσή τους σε φυσιολογικούς και σε παθολογικούς ιστούς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες σε πολλές ασθένειες, όπως και της οστεοαρθρίτιδας.

Δίνουν πολλές πληροφορίες για την εξέλιξη της ΟΑ, έχοντας προγνωστική αξία αλλά δύναται και να παρουσιάσουν το στάδιο, στο οποίο έχει προχωρήσει η νόσος. Επειδή είναι σημαντικός ο ρόλος που διαδραματίζουν, πληθώρα μελετών και μελετητών έχει στραφεί στη έρευνά τους.⁷⁰⁻⁷⁴

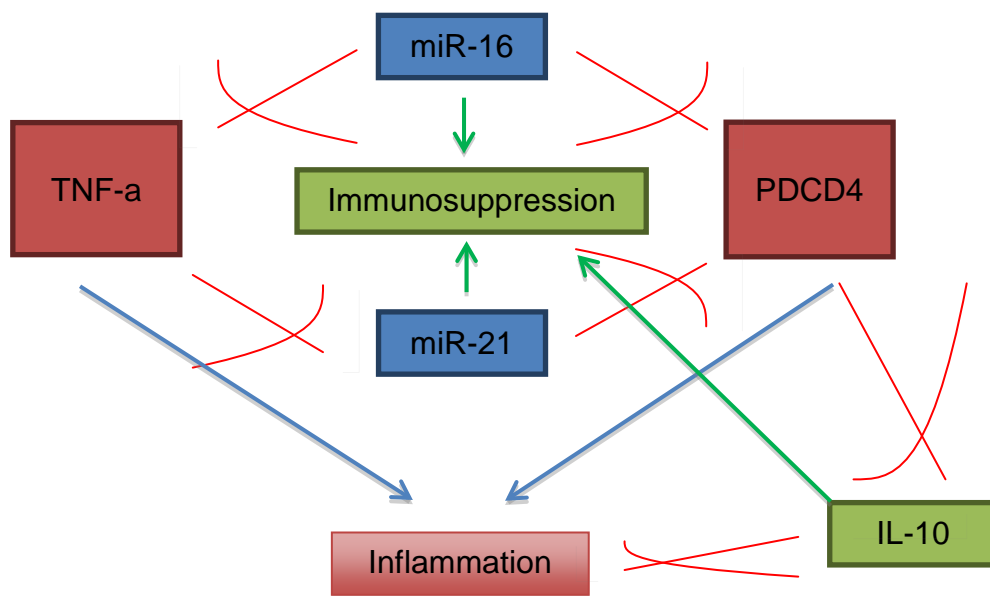
Τελευταίες έρευνες έχουν χαρακτηρίσει την ΟΑ ως φλεγμονώδη νόσο και όπως συμβαίνει σε κάθε διαταραχή, ο οργανισμός τείνει να επαναφέρει την ομοιόσταση του.

Όπως προαναφέρθηκε η φλεγμονή εμπλέκει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων και συντονίζει ένα σύνολο αντιδράσεων και λειτουργιών. Μπορεί να επιδιορθώσει βλάβες που τυχόν προκλήθηκαν μπορεί όμως και να οδηγήσει σε χρόνιες φλεγμονές, όπως στην ΟΑ.

Η ΟΑ θεωρείται πλέον, ως νόσος όλων των ιστών της άρθρωσης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστών πραγματοποιούνται μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και είναι πεδίο εντοπισμού παθογενετικών μηχανισμών. Παράλληλα έχουν αρχίσει να αποκαλύπτονται πολλές πτυχές του καταρράκτη της παθογένειας της νόσου αλλά και οι νέοι ρόλοι των επιμέρους ιστών. Ο ρόλος της φλεγμονής στην ΟΑ σηματοδοτείται μέσω της επίδρασης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, καθώς αλλάζουν τον φαινότυπο το δικό τους και της άρθρωσης, με κατεύθυνση τις καταβολικές διαδικασίες λόγω της έντονης βιοχημικής δραστηριότητά τους.

Για την διερεύνηση των παραγόντων που εμφανίζονται στην ΟΑ και στην φλεγμονή, που καταστέλλουν ή διεγείρουν την εξέλιξη της νόσου, μελετήθηκε ο προσδιορισμός της έκφρασης συγκεκριμένων miR σε ιστούς γονάτου ασθενών με ΟΑ τελευταίου σταδίου. Ως πρώτο μόριο που χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί ο ρόλος του στη παθογένεια, ήταν ο προσδιορισμός της έκφρασης του *miR-16* σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ ιστών του χόνδρου, του υμένα και του μηνίσκου. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα χονδροκύτταρα με ΟΑ ($p=0.048$). Η μείωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με το ρόλο του miR ύστερα από τη

διερεύνηση του μέσα από διάφορες μελέτες.^{88,89} Η μείωσή του σε συνδυασμό με το ενεργό PDCD4 (Programmed cell death 4), έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση των φλεγμονωδών μακροφάγων στο χόνδρο. Ο PDCD4 είναι επίσης στόχος και για το *miR-21* που επίσης μελετήθηκε. Ένας ακόμη στόχος για το miR-16 είναι η σύνδεσή του με τις UA πλούσιες περιοχές στο 3'UTR, μειώνοντας έτσι τα mRNA του TNF-a.⁸⁹ Ο TNF-a είναι από τους πιο βασικούς παράγοντες προώθησης της φλεγμονής. Η μείωσή του αυξάνει τα επίπεδα του TNF-a, ο οποίος με τη σειρά του έχει διαπιστωθεί πως σε υψηλά επίπεδα καταστέλλει την έκφραση του miR-21. Πράγματι η κυτταροκίνη αυτή βρίσκεται τόσο στους ιστούς του χόνδρου όσο και του υμένα, μέσω του αρθρικού υγρού, όπου και παρατηρείται η μείωση του miR-21.



Εικόνα 21. Θεωρητικό μοντέλο δράσης των miR-16 και miR-21 για την αναχαίτιση της φλεγμονής.

Ωστόσο η μελέτη της έκφρασης του miR-16 στον υμένα σε ασθενείς με ΟΑ δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τον υγιή ιστό. Στο μηνίσκο δεν καταγράφηκε συσχέτιση σε σχέση με τους άλλους δύο ιστούς και αυτό οφείλεται στην έντονη αποδόμηση του τελευταίου σταδίου ΟΑ. Ένα ακόμη εύρημα, είναι η διαφορά της έκφρασης μεταξύ χόνδρου και υμένα ($p=0.048$) όπου τα υψηλά επίπεδα έκφρασης στο χόνδρο μπορεί να θεωρηθούν ως χαρακτηριστικό έντονων βιοχημικών διαδικασιών της ΟΑ, ενώ η χαμηλότερη έκφραση του υμένα δηλώνει τη παρουσία της υποβόσκουσας φλεγμονής της ασθένειας.

Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και για το miR-21 όπου υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά της έκφρασης μεταξύ χόνδρου και υμένα ($p=0.00$). Η σημαντική μείωση του miR-21 τόσο στα χονδροκύτταρα με OA ($p=0.021$) όσο και στα κύτταρα του υμένα ($p=0.004$), μπορεί να ενισχύει το γεγονός του ενεργού PDCD4 και τη συνεχή έκφραση επιπλέον φλεγμονωδών κυτταροκινών. Επίσης, στατιστική σημαντικότητα παρουσιάστηκε μεταξύ των OA κυττάρων χόνδρου και μηνίσκου ($p=0.002$), αν και η μελέτη του συγκεκριμένου ιστού (μηνίσκου) με φυσιολογικά κύτταρα δεν έδωσε συσχέτιση. Αντίθετα με το miR-16, το miR-21 κατέγραψε ισχυρή συσχέτιση με τον υμενώδη ιστό ($p=0.004$) δηλώνοντας πως η μειωμένη παρουσία του στον ιστό είναι σημάδι φλεγμονής της OA. Κατά την ολοκλήρωση της φλεγμονής, η IL-6 σηματοδοτεί μονοπάτια αύξησης του ίδιου του miR-21, για αναχαίτιση της ανοσολογικής διαδικασίας. Η φυσιολογική διαδικασία περιλαμβάνει τη λειτουργία του miR, που καταστέλλει την ενεργοποίηση του αντιφλεγμονώδους μονοπατιού μέσω στόχευσης και καταστολής του PTEN⁷⁹ αλλά και του PDCD4, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η μείωση των επιπέδων του miR, αυξάνει τα επίπεδα του γονιδίου PTEN, το οποίο μετά από μια σειρά αντιδράσεων ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-κB αλλά και του TNF-α που επιτείνει τη φλεγμονή. Ένας ακόμη στόχος για το miR-21 στο μονοπάτι αυτό, είναι και η ανατροφοδότησή του από το μεταγραφικό παράγοντα STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)¹⁰³ που επάγει το miR. Ο STAT3 αναστέλλεται από τη σύνδεση του με την πρωτεΐνη PIAS3,¹⁰⁴ ενώ το miR-21 αποσιωπεί το μετάγραφο της πρωτεΐνης, αφήνοντάς την να επάγει περαιτέρω το miR-21. Μπορούμε να θεωρήσουμε πως τα μειωμένα επίπεδα αποτελούν στοιχεία φλεγμονής και αποσιώπησης συγκεκριμένων αντιφλεγμονωδών μονοπατιών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της έκφρασης των miR-19 (miR-19a και miR-19b-3p) σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA ιστών χόνδρου, υμένα και μηνίσκου. Από την έρευνα, η μελέτη του miR-19a δεν έδειξε κάποια ποιοτικά σημαντικά αποτελέσματα στο σύνολο των ιστών. Ο προσδιορισμός συνεχίστηκε με το miR-19b-3p. Ωστόσο αυτό που εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα ($p=0.012$) και συσχετιζόμενα αποτελέσματα είναι η σημαντική αύξηση του miR-19b-3p στον ιστό του υμένα των ασθενών με OA. Η αύξηση έρχεται σε αντίθεση με την εικόνα που παρουσιάζεται σε αντίστοιχες έρευνες λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης.

Η πλειοτροπική δράση των miR-19 αφήνει περιθώρια περαιτέρω ερμηνειών για τη λειτουργία του συγκεκριμένου miR-19b-3p. Οι ρόλοι του δεν είναι ακόμη αποσαφηνισμένοι. Πρόσφατα έχει συνδεθεί ως μάρτυρας μέσω της κυκλοφορίας του στο πλάσμα, σε ένα

σύνολο συστημικών καρδιολογικών ασθενειών.¹⁰⁵ Άλλη έρευνα παρουσίασε την ισχυρή συσχέτιση αυτού του κυκλοφορούντος miRNA, με την οστική πυκνότητα.¹⁰⁶ Θεωρούμε πως οι αυξημένες τιμές του miR-19b-3p μπορεί να σχετίζονται, μέσω των αγγειογενετικών μηχανισμών του υμένα, στην αύξηση σημάτων προς το υποχόνδριο οστό της άρθρωσης και της δημιουργίας νέων οστικών δομών. Για τα miR-19a/b και γενικά για τα miR της οικογένειας miR-17~92, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να εντοπιστεί πλήρως η δράση και η τύχη τους στους ιστούς και στις ασθένειες που εμφανίζονται. Ο συνδυασμός υμένα και υποχόνδριου οστού σε ΟΑ αλλά και σε άλλες μορφογενετικές αρθρίτιδες, θα μπορούσε να δώσει μια καλύτερη εικόνα για τον πλήρη ρόλο των miR-19a/b αλλά κυρίως του miR-19b-3p, ώστε να εξηγηθούν πληρέστερα η αύξησή του σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό αλλά και να αποκαλυφθούν τα μονοπάτια της δράσης του.

Τέλος έγινε προσδιορισμός της έκφρασης του miR-125-5p της οικογένειας miR-125, σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ ιστών χόνδρου, υμένα και μηνίσκου. Από τη μελέτη δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση σε οστεοαρθρικό χόνδρο και μηνίσκο. Ωστόσο συγκρίνοντας όλους τους ιστούς της άρθρωσης παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ χόνδρου και υμένα ($p=0.001$) και μεταξύ χόνδρου και μηνίσκου ($p=0.003$). Ο υμένας έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση των ασθενών με ΟΑ ακολουθώντας μειωμένο πρότυπο ($p=0.021$). Τα μειωμένα επίπεδα του miR-125-5p συμβαδίζουν με την υπόθεση πως έχει κατασταλτικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, καθώς στον ιστό που παρατηρήθηκε η μείωση, ήταν ο υμένας.¹⁰⁷ Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω και τη σχετική βιβλιογραφία της οικογενείας των miR-125, όπως και το μεγάλο πεδίο στόχευσης της, απαιτείται η πραγματοποίηση μεγαλύτερης έρευνας στην ΟΑ για τον εξακρίβωση του ρόλου και του τρόπου ρύθμισης του κάθε μέλους της οικογενείας.⁹⁸

Η χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων μπορεί να δίνει πληροφορίες σχετικά με την αντιστοίχιση των microRNAs με τα mRNAs στόχους, ωστόσο δεν παρέχει πληροφορίες σε κυτταρικό επίπεδο, με τον τρόπο δηλαδή που αλληλεπιδρούν τα γονίδια – στόχους στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφραση τους. Ως εκ τούτου, προκειμένου να μελετηθεί αν η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων TLR-4, IL-1β σχετίζεται με την φλεγμονώδη αντίδραση στην ΟΑ ακολουθήθηκε πειραματική μελέτη της αλληλεπίδρασης του miR-21 με τα mRNAs στόχους.

Μετά τη χορήγηση του miR-21 σε ΟΑ κύτταρα χόνδρου, υμένα και μηνίσκου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης των TLR-4 και IL-1β στις 24 και 48 ώρες σε υμενοκύτταρα. Η φλεγμονή που παρουσιάζεται στα υμενοκύτταρα μέσω της

υπερέκφρασης του miR-21 στους ιστούς, λόγω της *in vitro* επώασης, επιβεβαιώνει τη δράση του miR-21 στις φλεγμονώδεις διαδικασίες.

Η δράση του miR-21 ρυθμίζει άμεσα τα μονοπάτια του PDCD4 και του PTEN. Μετά από επιδράσεις με το miR-21 στα κύτταρα του υμένα βρέθηκε πως καταστέλλει τα mRNA των PTEN και PDCD4 γονιδίων, στοχεύοντας απευθείας στην 3'-UTR περιοχή τους.^{108,109} Πρόσφατες έρευνες έδειξαν την άμεση συσχέτιση του PTEN με τον υποδοχέα TLR-4 σε φυσιολογικές συνθήκες.^{110,111} Η ενεργοποίησή του πραγματοποιείται ύστερα από την αλληλεπίδραση του με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα της κυτταρικής μεμβράνης (PIP3), όπου στη συνέχεια καταστέλλεται η Akt από το καταρράκτη αντιδράσεων P3IK/Akt, με αποτέλεσμα να προωθείται η ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-kB και να εκκρίνονται επιπλέον φλεγμονώδεις μεσολαβητές.¹¹⁰ Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, η μείωση των επιπέδων του PTEN θα έχει αντίκτυπο στην ενεργοποίηση του TLR-4 υποδοχέα στη κυτταρική μεμβράνη, όπου θα υπάρχει αντίστοιχη μείωση των επιπέδων του. Ακολούθως, τα χαμηλά επίπεδα του PTEN ρυθμίζουν αρνητικά τη μετανάστευση και τη διήθηση των κυττάρων και των MMPs τα οποία επάγουν περαιτέρω τη φλεγμονή.¹⁰⁸ Οι δύο αυτές τελευταίες δράσεις φαίνεται πως επηρεάζονται και από τα επίπεδα του miR-21.¹⁰⁸ Η μείωση αυτή του PTEN που συμβάλλει στη μειωμένη μετακίνηση των μεσολαβητών, αντικατοπτρίζεται και στα χονδροκύτταρα με καθυστερημένη απόκριση των φλεγμονωδών προϊόντων από τον υμένα στον χόνδρο, επιφέροντας μείωση των επιπέδων τους. Επακόλουθο αυτής είναι και η μείωση της έκφρασης του TLR-4 στα χονδροκύτταρα, κάτι που παρατηρείται μετά από 48h. Η μείωση του TLR-4 επηρεάζει και την επαγωγή πλήθος άλλων κυτταροκινών όπως της IL-6, του TNF-a κ.α. καθώς περνούν μέσα από τη θετική διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB.^{112,113}

Η παραπάνω σύνδεση του miR-21 με τις διαδικασίες της φλεγμονής, έχει ως συνέπεια τη μείωση της ενεργότητας τους NF-kB και κατ' επέκταση των φλεγμονωδών προϊόντων όπως του TNF-a και της IL-1β. Η μειωμένη ενεργόποίηση του TLR-4 μέσω του PTEN, παρουσία του miR-21, μειώνει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα στα υμενοκύτταρα αποδιεγείροντας τη παραγωγή των κυτταροκινών IL-1, TNF-a, IL-6 που δρουν υπέρ της φλεγμονής¹¹⁴, δίνοντας στατιστική σημαντικότητα στα μειωμένα επίπεδα της IL-1β τόσο τις πρώτες 24ώρες όσο και τις 48ώρες. Στα χονδροκύτταρα η έκφραση IL-1β δεν σημείωσε στατιστική σημαντικότητα. Η IL-1β προέρχεται από τα κύτταρα του υμένα και μέσω της E.Θ.Ο. διεγείρει τα κύτταρα του χόνδρου. Ίσως σε αρχικό στάδιο έντονων

προφλεγμονωδών διαδικασιών, να ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί η έκφραση της ιντερλευκίνης για στατιστική σημαντικότητα στα χονδροκύτταρα.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητός ο ρόλος και η σημαντικότητα του miR-21 στα πλαίσια της φλεγμονή στην ΟΑ. Τα μονοπάτια στα οποία επεμβαίνει είναι καθοριστικά για την εξέλιξη της φλεγμονής και της δράσης των μεσολαβητών. Η μειωμένη έκφραση που παρατηρήθηκε στους ιστούς των κυττάρων του υμένα και του χόνδρου ασθενών σε προχωρημένο στάδιο ΟΑ, συνηγορεί στην απουσία ρύθμισης και καταστολής των αντιδράσεων που συντηρούν τη χρόνια φλεγμονή στην ΟΑ. Επίσης μπορεί να αποτελέσει ένα θεραπευτικό στόχο στο μέλλον, για την αναχαίτιση της αποδιοργάνωσης των δύο ιστών της άρθρωσης αλλά και σε περαιτέρω μελέτες ώστε να αποκαλυφθούν νέοι ρόλοι και νέοι στόχοι, στις διαδικασίες της φλεγμονώδους εξέλιξης της ασθένειας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bhatia D, Bejarano T, Novo M. Current interventions in the management of knee osteoarthritis. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2013;5(1):30-38.
2. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ : British Medical Journal*. 2006;332(7542):639-642.
3. Yuqing Zhang and Joanne M. Jordan, *Epidemiology of Osteoarthritis, Clin Geriatr Med*. 2010 August ; 26(3): 355–369
4. Clough JD. *The Cleveland Clinic Guide to Arthritis*. New York, NY: Kaplan Publishing; 2009.
5. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 2008;58:26-35.
6. Gelfand JM, Gladman DD, Mease PJ, et al. Epidemiology of psoriatic arthritis in the population of the United States. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:573.
7. Espinosa M, Gottlieb BS. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatr Rev* 2012;33:303-13.
8. Andrianakos, et al, Rheumatic disease in Greece, *The Journal of Rheumatology* 2003; 30:7
9. Brandt KD, Dieppe P, Radin E, Etiopathogenesis of osteoarthritis, *Med Clin North Am.*, 2009;93(1):1-24
10. Giuseppe Musumeci et al., Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression, Review, *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16(3), 6093-6112; doi:10.3390/ijms16036093
11. Paul A Dieppe, L Stefan Lohmander, Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis, Volume 365, No. 9463, p965–973, 12 March 2005
12. Ahmet Erdemir et al, Multiscale cartilage biomechanics: technical challenges in realizing a high-throughput modelling and simulation workflow *Interface Focus* 2015 5 20140081; DOI: 10.1098/rsfs.2014.0081. Published 20 February 2015
13. Bader D. L. et al, “Biomechanical Influence of Cartilage Homeostasis in Health and Disease,” *Arthritis*, vol. 2011, Article ID 979032, 16 pages, 2011, doi:10.1155/2011/979032
14. Chris Kiani et al., Structure and function of aggrecan, *Cell Res*. 2002 March; 12(1): 19–32.
15. Monique van Meegeren, Blood-induced joint damage: novel targets for therapy, *Universiteit Utrecht ISBN: 978-94-6191-422-4, Haemophilia*. 2010 Jul;16 Suppl 5:121-3. *Haemophilia*. 2012 Jul;18 Suppl 4:112-9
16. Nivedan Tiwar et al., Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool, *Journal of Biomedical Optics* 155, 056001 September/October 2010
17. Eleftherios A. et al., The knee meniscus: Structure function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration, *Biomaterials* 32 (2011) 7411 7431
18. Conaghan PG et al., Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance, *Guideline Development Group, BMJ*. 2008 Mar 1;336(7642):502-3

19. Bonnet C. S. and D. A. Walsh , Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation, *Rev Rheumatology* 2005;44:7–16
20. Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:384–99
21. Noble J., Hamblen D. The pathology of the degenerate meniscus lesion. *The Journal of bone and joint Surgery*, 1975, 57:180
22. Hashimoto S., Takahashi K., Ochs R.L., Coutts R.D., Amiel D., Lotz M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42:2123-31
23. Nybo H, Petersen HC, Gaist D, Jeune B, Andersen K, McGue M, Vaupel JW, Christensen K,J *Am Geriatr,Soc*,2003; 51(10):1365-1373
24. Longo DL et al. *Harrison’s Principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill Companies. 18th ed. 2011.
25. Ncbi, PubMedHealth, What is an inflammation?, January 7, 2015
26. Ciaccia L. Fundamentals of Inflammation. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2011;84(1):64-65.
27. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE; Nielsen; Andersen; Girardin (February 2007). "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation". *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2): 061127015327006
28. Doxakis Anastakis et al., Mechanisms and Applications of Interleukins in Cancer Immunotherapy, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16(1), 1691-1710
29. Attur MG et al. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002; Vol. 10, No. 1
30. Rahmati M. et al., Review: Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges, *Bone* 85 (2016) 81–90
31. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, ed. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001;2:2195-2215.
32. Ali Mobasheri et al., Review: Scientific Evidence and Rationale for the Development of Curcumin and Resveratrol as Nutraceuticals for Joint Health, *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(4), 4202-4232
33. Roberts, S.B., Wootton, E., De Ferrari, L. et al., Epigenetics of osteoarticular diseases: recent developments, *Rheumatol Int* (2015) 35: 1293.
34. Rudolf Jaenisch, Adrian Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat Genet.* 2003 March; 33 (Suppl): 245–254
35. Roberts S. B. et al., Epigenetics of osteoarticular diseases: recent developments, *Rheumatol Int* (2015) 35:1293–1305

36. Tsezou A., Osteoarthritis Year in Review 2014: genetics and genomics, *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 2017e2024
37. Chen D, Shen J and Hui T. Epigenetic and microRNA regulation during osteoarthritis development [version 1; referees: 3 approved] *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):1092
38. Kim H, Kang D, Cho Y, Kim J-H. Epigenetic Regulation of Chondrocyte Catabolism and Anabolism in Osteoarthritis. *Molecules and Cells*. 2015;38(8):677-684.
39. Hong, Sohee et al. "A Novel Domain in Histone Deacetylase 1 and 2 Mediates Repression of Cartilage-Specific Genes in Human Chondrocytes." *The FASEB Journal* 23.10 (2009): 3539–3552. PMC
40. Higashiyama R, Miyaki S, Yamashita S, et al. Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2010;20(1):11
41. Miyazaki S, Kakutani K, Yurube T, et al. Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells. *Arthritis Research & Therapy*. 2015;17(1):253.
42. Antonio Miranda-Duarte, Chapter 2: Epigenetic Mechanisms in Osteoarthritis , *Osteoarthritis - Progress in Basic Research and Treatment*, Edited by Qian Chen, ISBN 978-953-51-2136-7, 272 pages, Publisher: InTech, Chapters published July 01, 2015 under CC BY 3.0 license
43. Witold Filipowicz, Suvendra N. Bhattacharyya & Nahum Sonenberg, Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, *Nature Reviews Genetics* 9, 102-114 (February 2008)
44. Gibson Gary, Asahara Hiroshi, microRNAs and cartilage, *J. Orthop. Res.*, vol31,Is.9 1333-1344
45. Rita Vicente, et al, Dereglulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic Diseases, *nature reviews, rheumatology*, 24 Dec 2015
46. Miyaki, S. & Asahara, H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 543–552 (2012)
47. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Duval N, Martel-Pelletier J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2009;10:148. 85
48. Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S et al. Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 2009;60:1035–41.
49. Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A and Mochida J: MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res* 30: 1915-1922, 2012.
50. WU et al., miRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis, *International Journal of Molecular Medicine* 34: 13-23, 2014

51. Song J, Lee M, Kim D, Han J, Chun CH and Jin EJ: MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 210-214, 2013.
52. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9:839–845
53. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:111–122
54. Simpson LJ, Ansel KM (2015) MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest* 125:2242–2249
55. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9:405–414
56. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, Garcia-Flores Y, Luong M, Devrekanli A, Xu J, Sun G, Tay J, Linsley PS, Baltimore D (2011) miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 208:1189–1201
57. Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK (2012) MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev* 11:174–179
58. Junker A (2011) Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585:3738–3746
59. Paraboschi EM, Solda` G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD, Salviati A, Barizzone N, Leone M, Duga S, Asselta R (2011) Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* 12:8695–8712
60. Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL (2011) Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187:2213–2221
61. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, Reilly J, Ierna M, Fraser AR, Stolarski B, McSharry C, Hueber AJ, Baxter D, Hunter J, Gay S, Liew FY, McInnes IB (2011) MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11193–11198
62. Sharma A.R. et al., miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis, *Rev.*, 36, No. 3, 425–439, 2016
63. Chatzikiyiakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA (2010) A polymorphism in the 30-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 77:411–413
64. Chatzikiyiakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA (2012) miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev* 11:

65. Liu SQ, Jiang S, Li C, Zhang B, Li QJ (2014) miR-17-92 cluster targets phosphatase and tensin homology and Ikaros Family Zinc Finger 4 to promote TH17-mediated inflammation. *J Biol Chem* 289:12446–12456
66. Simpson LJ, Patel S, Bhakta NR, Choy DF, Brightbill HD, Ren X, Wang Y, Pua HH, Baumjohann D, Montoya MM, Panduro M, Remedios KA, Huang X, Fahy JV, Arron JR, Woodruff PG, Ansel KM (2014) A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production. *Nat Immunol* 15:1162–1170
67. Sokolove J and Lepus C. M., Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations, *Ther Adv Musculoskel Dis* (2013) 5(2) 77–94
68. Daghestani H.N., Kraus V.B., Inflammatory biomarkers in osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage* 23 (2015) 1890-1896
69. Attur M, Belitskaya-Levy I, Oh C, Krasnokutsky S, Greenberg J, Samuels J, et al. Increased interleukin-1beta gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63(7):1908e17.
70. Okuhara A, Nakasa T, Shibuya H, Niimoto T, Adachi N, Deie M, et al. Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2012;22(3):446e57.
71. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(3):R86.
72. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8(6):R187.
73. Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, Quan Y, Dong S. Effect of microRNA-145 on IL- 1beta-induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett* 2014;588(14):2344–2352
74. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, Gay R, Buckley CD, Tak PP, Gay S, Kyburz D. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* 2011;63(2):373–381.
75. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, Suzuki O, Adachi N, Ochi M. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:1–11.

76. Quinn SR, Mangan NE, Caffrey BE, Gantier MP, Williams BR, Hertzog PJ, McCoy CE, O'Neill LA. The role of Ets2 transcription factor in the induction of microRNA-155 (miR-155) by lipopolysaccharide and its targeting by interleukin-10. *J Biol Chem* 2014;289(7):4316–4325.
77. Lu MC, Yu CL, Chen HC, Yu HC, Huang HB, Lai NS. Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production. *Clin Exp Immunol* 2014;177(3):641–651.
78. Park HJ, Kim DH, Lim SH, Kim WJ, Youn J, Choi YS, Choi JM. Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. *Immune Netw* 2014;14(1):21–29.
79. Jones SW, Watkins G, Le Good N et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:464–72.
80. Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2010;62:1361–71
81. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440(7081):237e41.
82. Mookherjee N, El-Gabalawy HS. High degree of correlation between whole blood and PBMC expression levels of miR-155 and miR-146a in healthy controls and rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods* 2013;400–401:106–10.
83. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:3222–3232.
84. Rita Vicente, et al, Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic Diseases, nature reviews, rheumatology, 24 Dec 2015
85. Zhou R, Li X, Hu G, Gong AY, Drescher KM, Chen XM. miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated transactivation of interleukin-8 gene. *PLoS One.* 2012;7:e30772
86. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol.* 2010;11:799–805 95
87. Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008;29:343–51
88. Liang, X., Xu, Z., Yuan, M., Zhang, Y., Zhao, B., Wang, J., Zhang, A., Li, G. "MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4". *International Journal of Molecular Medicine* 37, no. 4 (2016): 967-975.
89. Jing, Q. et al. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120, 623–634

90. Gijss van Haften and Reuven Agami, Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled, *Genes & Dev.* 2010. 24: 1-4
91. Rita Vicente et al., Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases, *Nature Reviews Rheumatology* 12, 211–220 (2016)
92. Hong Wei Li et al., Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 11, 2531-2536.
93. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:19. Hong Wei Li et al., Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 11, 2531-2536
94. Frankel LB, et al., (2008). "Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells". *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2): 1026–33.
95. Dimitrios Iliopoulos et al., STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1, via PTEN and CYLD, are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer, *Mol Cell*. 2010 August 27; 39(4): 493–506
96. Amitava Das et al., Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages: A Role of MicroRNA-21 in the Resolution of Wound Inflammation, *J Immunol* published online 3 January 2014
98. Sun et al., Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts, *Journal of Hematology & Oncology*, 2013, 6:6
99. Yin H. et al., Progress on the relationship between miR-125 family and tumorigenesis *Experimental Cell Research*, 339 (2015) 252–260
100. H. Wang, W. Peng, X. Ouyang, W. Li, Y. Dai, Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus, *Transl Res*, 160 (2012), pp. 198–206
101. K. Murata, M. Furu, H. Yoshitomi, M. Ishikawa, H. Shibuya, M. Hashimoto, et al., Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis, *PLoS One*, 8 (2013), p. e69118
102. Chen T, Huang Z, Wang L et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. *Cardiovasc Res* 2009;83:131–9.
103. Akira S. et al., "Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway". 1994, *Cell*. 77 (1): 63–71
104. Mohr SE, Boswell RE (Mar 1999). "Zimp encodes a homologue of mouse Miz1 and PIAS3 and is an essential gene in *Drosophila melanogaster*". *Gene*. 229 (1-2): 109–16

105. Wang K-J, et al., Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are Promising Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction, *Cell Physiol Biochem* 2016;38:1015-1029
106. Roland Kocijan et al., Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures, *J Clin Endocrinol Metab*, doi: 10.1210/jc.2016-2365
107. Banerjee S1, et al., miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation, *J Biol Chem*. 2013 Dec 6;288(49):35428-36
108. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese Journal of Cancer*. 2011;30(6):371-380.
109. Dimitrios Iliopoulos et al., STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1, via PTEN and CYLD, are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer, *Mol Cell*. 2010 August 27; 39(4): 493–506
110. Huahua Yin et al, Association between TLR4 and PTEN Involved in LPS-TLR4 Signaling Response, *BioMed Research International* Volume 2016, Article ID 6083178
111. Yin H, Tan Y, Wu X, et al. Association between TLR4 and PTEN Involved in LPS-TLR4 Signaling Response. *BioMed Research International*. 2016;2016:6083178.
112. Sashwati Roy, Chandan K. Sen, MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation, *Physiological Genomics* 2011 **Vol.** 43 no. 10, 557-565
113. Luke A. O'Neill, et al., MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signaling, *Nature Reviews Immunology* 11, 163-175 (March 2011)
114. LI H-W, et al, Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016;11(6):2531-2536.