



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΕΚΦΡΑΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΓΧΥΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ
ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΖΩΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ»

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΒΑΛΑΡΟΥΤΣΟΥ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM

“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS

**«EXPRESSION OF MARKERS IN JOINT TISSUES AFTER INJECTION OF INDUCED STEM CELLS IN ANIMAL
MODEL OF OSTEOARTHRITIS »**

EVANGELIA VALAROUTSOU

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος του παρόντος Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου και υπεύθυνη του προγράμματος κα. Ασπασία Τσέζου, για την απaráμιλλης αξίας καθοδήγηση που μου προσέφερε. Ακόμη, θα ήθελα να στείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ευανθία Μουρμούρα, για την υπομονή και την πολύτιμή της βοήθεια στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ επίσης όλους τους καθηγητές και τα μέλη του προγράμματος για τις γνώσεις και εμπειρίες που μοιράστηκαν μαζί μου, εντός και εκτός της αίθουσας διδασκαλίας, και ιδιαίτερωσ την κα. Ιωάννα Παπαθανασίου: ελπίζω η θετική της ενέργεια στο χώρο του εργαστηρίου να συνεχίσει να ενισχύει το ηθικό πολλών μελλοντικών φοιτητών. Τέλος, ευχαριστώ τους συμφοιτητές και φίλους μου καθώσ, παρά τις δυσκολίες που τεθήκαμε να αντιμετωπίσουμε τη χρονιά του 2020, με βοήθησαν να την απολαύσω και να δημιουργήσω υπέροχες αναμνήσεις.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	7
A. Εισαγωγή	9
A1. Οστεοαρθρίτιδα	9
α. Επιδημιολογικά στοιχεία	9
β. Αιτιοπαθογένεια.....	10
γ. Μηχανισμοί	15
δ. Γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες.....	21
A2. Τύποι ζωικών μοντέλων ΟΑ.....	26
A3. Επαγόμενα βλαστοκύτταρα και ΟΑ	28
B. Σκοπός της εργασίας	32
Γ. Μοντέλο μελέτης.....	33
Δ. Υλικά και μέθοδοι	34
Δ1. Καλλιέργειες κυττάρων	34
Δ2. Απομόνωση RNA	35
Δ3. Παραγωγή cDNA.....	37
Δ4. Real time PCR	40
Δ5. Στατιστική εκτίμηση	42
E. Αποτελέσματα.....	43
E1. Έκφραση δεικτών.....	44
α. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε χονδροκύτταρα.....	44
β. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MMP13 και IL-1β σε χονδροκύτταρα.....	46
γ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε κύτταρα υμένα.....	48
δ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MMP13 και IL-1β σε κύτταρα υμένα	50
ε. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε κύτταρα μηνίσκου.....	52
ζ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MMP13 και IL-1β σε κύτταρα μηνίσκου	54
ΣΤ. Συζήτηση	56
Ζ. Συμπεράσματα	64
Βιβλιογραφία	65

Περίληψη

Η οστεοαρθρίτιδα είναι πάθηση του μυοσκελετικού συστήματος και προκαλεί αναπηρία σε όλο και περισσότερους ανθρώπους ετησίως. Η φύση της πάθησης είναι πολυπαραγοντική, διαθέτοντας περιβαλλοντική, γενετική κι επιγενετική παράμετρο. Χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό των ιστών μέσω διαταραχής της σύστασης και δομής τους, έντονες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και αδυναμία των κυττάρων να επιτελέσουν επαρκή επιδιόρθωση των ιστών της άρθρωσης. Οι συνήθεις προσεγγίσεις αντιμετώπισης περιλαμβάνουν κυρίως ανακούφιση των συμπτωμάτων ή χειρουργικές επεμβάσεις στις σοβαρότερες περιπτώσεις. Η χρήση βλαστοκυττάρων για την ανάπλαση των ιστών άρθρωσης με οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση με αναδυόμενο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα. Συγκεκριμένα τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα φαίνεται να αποτελούν νέο υποψήφιο για χρήση στην αντιμετώπιση της πάθησης. Στόχο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε ο έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β* μετά από ενδοαρθρική έγχυση μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) σε άρθρωση γόνατος ζωικού μοντέλου οστεοαρθρίτιδας, ώστε να διερευνηθεί η ικανότητά τους στην ανάπλαση των ιστών της ΟΑ άρθρωσης και κατ'επέκταση η χρήση τους ως πιθανός θεραπευτικός παράγοντας στην ΟΑ. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιήθηκαν 12 λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, στα οποία προκλήθηκε ΟΑ μέσω μηχανικής αποσταθεροποίησης της άρθρωσης με χειρουργική επέμβαση διατομής του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου (ACLT). Πραγματοποιήθηκε ενδοαρθρική έγχυση μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) και λήψη δειγμάτων αρθρικού χόνδρου, υμένα και μηνίσκου. Μετά από καλλιέργεια των δειγμάτων, απομόνωση του RNA και παραγωγή βιβλιοθήκης cDNA υπολογίστηκαν με την μέθοδο της Real Time PCR τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β* και έγινε σύγκριση ανάμεσα στα φυσιολογικά, στα ΟΑ χωρίς έγχυση iMSCs και στα ΟΑ που έλαβαν έγχυση με iMSCs. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση έκφρασης του *COL2* σε όλα τα ΟΑ δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά, καθώς και σημαντική αύξηση της έκφρασης του σε όλα τα ΟΑ που έλαβαν έγχυση με iMSCs σε σχέση με τα ΟΑ που δεν έλαβαν κυτταρική έγχυση. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης των *COL10*, *MMP13* και *IL-1β* σε όλα τα ΟΑ

δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά, και σημαντική μείωση της έκφρασης τους στα ΟΑ που έλαβαν έγχυση με iMSCs σε σχέση με τα ΟΑ που δεν έλαβαν έγχυση. Συμπερασματικά, η έγχυση επαγόμενων iMSCs στην άρθρωση ζωικού μοντέλου οστεοαρθρίτιδας οδήγησε σε επαναφορά της έκφρασης των γονιδίων στα φυσιολογικά επίπεδα, αναδεικνύοντας την πιθανή θεραπευτική δυνατότητα της κυτταρικής θεραπείας με iMSCs στην αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας.

Λέξεις-Κλειδιά: Οστεοαρθρίτιδα, επιδιόρθωση άρθρωσης, επαγόμενα βλαστοκύτταρα, ενδοαρθρική ένεση, ζωικό μοντέλο

Abstract

Osteoarthritis is a musculoskeletal system disease that causes disability to an increasing number of people every year. The nature of the disease is multifactorial, having environmental, genetic and epigenetic parameters. It is characterized by degeneration of the tissues through disruption of their composition and structure, intense inflammatory responses and the cells' inability to perform adequate joint tissue repair. Common treatment approaches mainly include symptom relief or surgery for more severe cases. The use of stem cells for the regeneration of joint tissue in osteoarthritis is a new therapeutic approach of growing interest in the scientific community. In particular, induced stem cells appear to be a new candidate for use in the treatment of the disease. Present study aimed to investigate the transcriptional expression levels of *COL2*, *COL10*, *MMP13* and *IL-1 β* genes after intra-articular injection of mesenchymal cells derived from induced pluripotent stem cells (iMSCs) into the knee joint of OA animal model, and consequently the iMSCs' regenerative capability and possible use as a potential therapeutic agent in OA. To achieve this, 12 New Zealand white rabbits were selected, in which OA was established through mechanical joint destabilization using anterior cruciate ligament transection (ACLT). Intra-articular injection of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells (iMSCs) was performed and samples of articular cartilage, membrane and meniscus were retrieved. Cell cultures were created from these samples, followed by isolation of the RNA and production of a cDNA library. Quantification of *COL2*, *COL10*, *MMP13* and *IL-1 β* transcriptional expression levels was achieved through the method of Real Time PCR and a comparison was made between normal samples, OA samples without injection of iMSCs and OA samples injected with iMSCs. A significant decrease in *COL2* expression was observed in all OA samples compared to normal, as well as a significant increase in its expression in all OA samples injected with iMSCs compared to OA samples that did not receive cell injection. Also, there was a significant increase in the expression of *COL10*, *MMP13* and *IL-1 β* in all OA samples compared to normal, and a significant decrease in their expression in OA samples injected with iMSCs compared to non-injected OA samples. In conclusion, the injection of iMSCs into the joint

of osteoarthritis animal model enabled the restoration of gene expressions to normal levels, highlighting the possible therapeutic potential of cell therapy with iMSCs in the treatment of osteoarthritis.

Keywords: Osteoarthritis, joint repair, induced pluripotent stem cells, intra-articular injection, animal model

A. Εισαγωγή

A1. Οστεοαρθρίτιδα

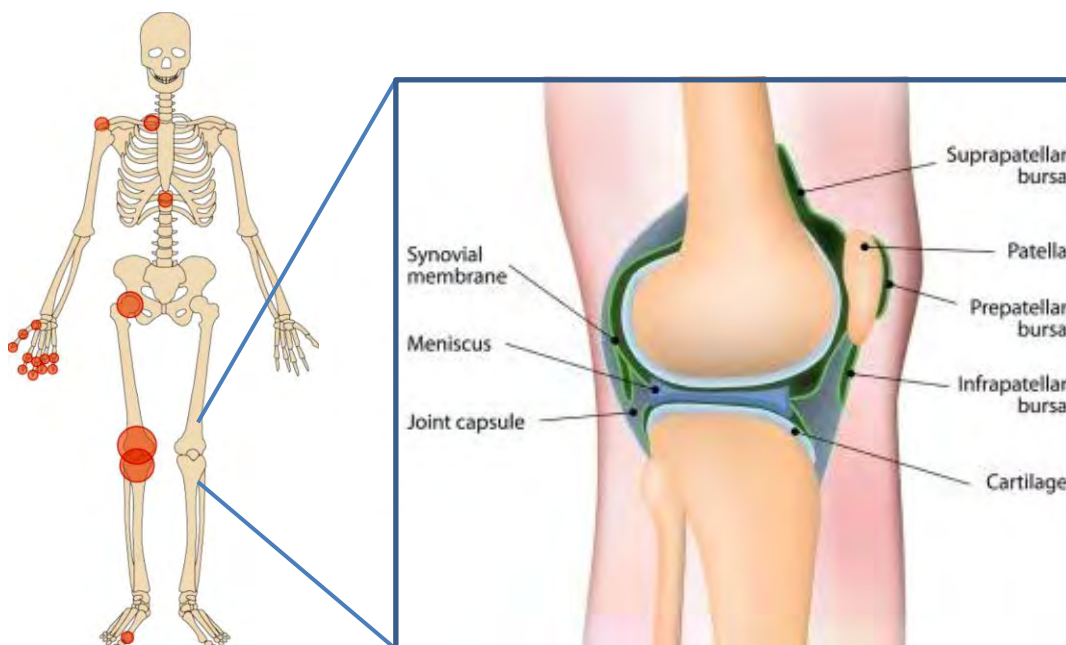
α. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η οστεοαρθρίτιδα ανήκει στις παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος και αποτελεί έως και σήμερα σοβαρό κοινωνικοοικονομικό βάρος για πολλές ανθρώπινες κοινωνίες στον κόσμο. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των χρόνων που ζουν άνθρωποι έχοντας κάποιου τύπου μυοσκελετική αναπηρία (YLD, years lived with disability) έχει αυξηθεί τα τελευταία είκοσι χρόνια κατά περισσότερο από 13% και ότι οι μυοσκελετικές παθήσεις, με την οστεοαρθρίτιδα να αποτελεί μία από τις κυριότερες, είναι η πρώτη αιτία για αναπηρία. Συγκεκριμένα τα άτομα με ΟΑ αντιμετωπίζουν τόσο το μεγάλο βάρος λόγω της πάθησης όσο και μικρότερη βελτίωση σε σχέση με άλλες μυοσκελετικές παθήσεις, καθώς υπάρχουν περιορισμένες αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, κυρίως για ανακούφιση των συμπτωμάτων ή επίπονες χειρουργικές επεμβάσεις όταν αυτό είναι αναγκαίο.¹ Επίσης, οι ασθενείς επιβαρύνονται και σε ψυχολογικό επίπεδο, καθώς οι επιπτώσεις της (πόνος, αναπηρία κλπ) μπορούν να προκαλέσουν από κατάθλιψη και προβλήματα μνήμης λόγω αδυναμίας ύπνου, έως και αυξημένες πιθανότητες αυτοκτονικών τάσεων.² Ο επιπολασμός της πάθησης εξαρτάται τόσο από τον τύπο της άρθρωσης που νοσεί, όσο και από τον πληθυσμό που μελετάται. Στις Ηνωμένες Πολιτείες καταγράφονται το 2018 περίπου 14 εκατομμύρια περιπτώσεων οστεοαρθρίτιδας γόνατος, περισσότερες από τις μισές των οποίων αφορούν άτομα ηλικίας κάτω των 65 ετών. Στη Σουηδία, η πλειοψηφία των αιτήσεων για άδεια από την εργασία αποδίδεται σε περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας γόνατος.¹ Όσον αφορά την οικονομική παράμετρο της πάθησης, το 2013 υπολογίστηκε για όλους τους τύπους ΟΑ ετήσιο συνολικό κόστος έως 19.5 χιλιάδες ευρώ ανά ασθενή παγκοσμίως, ενώ για ΟΑ ισχίου και γόνατος υπολογίστηκε ετήσιο συνολικό κόστος έως 12 χιλιάδες ευρώ ανά ασθενή παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, στη Βόρεια Αμερική υπολογίστηκε ετήσιο κόστος για όλους τους τύπους ΟΑ 6.7 χιλιάδες ευρώ ανά ασθενή και για ΟΑ ισχίου και γόνατος 10 χιλιάδες ευρώ ανά ασθενή. Στην

Ευρώπη το ετήσιο κόστος για όλους τους τύπους ΟΑ υπολογίστηκε σε 0.7 χιλιάδες ευρώ ανά ασθενή, και για ΟΑ ισχίου και γόνατος χίλια ευρώ ανά ασθενή.³ Μέχρι σήμερα το κόστος αυτό έχει γίνει ακόμη μεγαλύτερο και υπολογίζεται να ανέβει περαιτέρω τα επόμενα χρόνια. Πρόκειται λοιπόν για μια πάθηση που αποτελεί σοβαρότατο παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, ιδιαίτερα καθώς οι συνθήκες ζωής βελτιώνονται και ο μέσος όρος ηλικίας συνεχώς αυξάνεται.

β. Αιτιοπαθογένεια

Για να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται η άρθρωση σε περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας, θα πρέπει πρώτα να αναλυθεί η φυσιολογία της άρθρωσης, κι έπειτα να αναφερθεί η αιτιοπαθογένεια της πάθησης. Ως παράδειγμα θα χρησιμοποιηθεί η άρθρωση του γόνατος καθώς αυτή θα μελετηθεί και στην παρούσα εργασία.



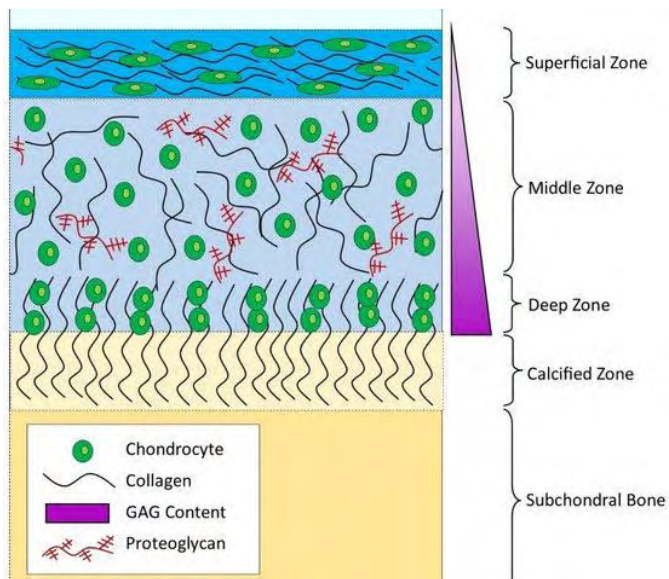
Εικόνα 1: Αριστερά: Αρθρώσεις που προσβάλλει συνθέστερα η ΟΑ. Πηγή: Wieland 2005⁴

Δεξιά: Φυσιολογική άρθρωση γόνατος. Πηγή: [Julie Gudmestad](#) 2007

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται περιεκτικά η ανατομία της άρθρωσης του γόνατος. Η εξωτερική μεμβράνη συνδετικού ιστού (ligament) κρατά τα οστά της άρθρωσης (μηριαίο οστό, επιγονατίδα, κνήμη, περόνη) σταθερά, και ο εσωτερικός αρθρικός υμένας (synovium) εκκρίνει ένα κιτρινωπό υγρό, το αρθρικό υγρό (synovial fluid). Εντός της αρθρικής κάψουλας

περιέχονται ο αρθρικός χόνδρος (cartilage) και ο μηνίσκος (meniscus), καθώς και ορογόνοι θύλακες (bursae) και μάζες λιπωδών κυττάρων (fat pads).

Ο αρθρικός χόνδρος ανήκει στους ιστούς που επηρεάζονται κατά κόρον στην οστεοαρθρίτιδα. Ο χονδρικός ιστός αποτελείται από πυκνό εξωκυττάριο υγρό (extracellular matrix, ECM) και μια ζώνωση χονδροκυττάρων (chondrocytes). Τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνοσύνθεση και άρα για τη διατήρηση της φυσιολογικής σύστασης



του χόνδρου. Στο εξωκυττάριο υγρό περιέχονται νερό, κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, καθώς και μικρότερα ποσοστά μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών. Ο ρόλος του χονδρικού ιστού είναι να προσφέρει μηχανική προστασία στην άρθρωση.⁵

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση χονδρικού ιστού: οργάνωση χονδροκυττάρων, ινών κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών.
Πηγή: Rebecca Davies 2019⁷

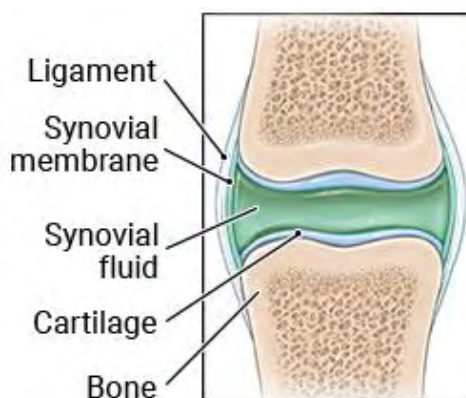
Κατά μήκος του χόνδρου δημιουργούνται 4 στοιβάδες, σε κάθε μια από της οποίες τα χονδροκύτταρα και το κολλαγόνο (κυρίως τύπου II) οργανώνονται διαφορετικά (Εικόνα 2). Στην επιφανειακή στοιβάδα (superficial zone) υπάρχει σχετικά υψηλός αριθμός χονδροκυττάρων τα οποία παίρνουν πεπλατυσμένο σχήμα, ενώ οι ίνες κολλαγόνου πακετάρονται παράλληλα προς την επιφάνεια. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα προστατευτικό στρώμα. Η μεσαία στοιβάδα (middle zone) καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του χόνδρου. Περιέχει διάσπαρτες παχιές ίνες κολλαγόνου και πιο αραιά και σφαιρικά χονδροκύτταρα. Η στοιβάδα αυτή λειτουργεί ως σύνδεσμος ανάμεσα στην επιφάνεια και στα βαθύτερα στρώματα, και αποτελεί για την άρθρωση την πρώτη υποστηρικτική ζώνη ενάντια στις πιέσεις. Ακολουθεί η βαθιά στοιβάδα (deep zone), όπου συσσωματώματα χονδροκυττάρων και ίνες κολλαγόνου λαμβάνουν κάθετη διάταξη. Εδώ περιέχεται το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεογλυκανών. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, η βαθιά ζώνη

προσφέρει την καλύτερη μηχανική υποστήριξη στην άρθρωση. Τέλος, η ζώνη ασβεστοποίησης (calcified zone) είναι σύνδεσμος ανάμεσα στο χόνδρο και το υποχόνδριο οστό.⁶

Ο υμένας είναι μια μεμβράνη που περικλείει τα συστατικά της αρθρικής κάψουλας. Διαθέτει αγγείωση και ενυδάτωση. Διακρίνεται από δύο στρώματα, ένα εσωτερικά προς την άρθρωση κι ένα εξωτερικά προς την κάψουλα. Υπάρχουν δύο είδη υμενοκυττάρων που απαρτίζουν τη μεμβράνη. Τα κύτταρα τύπου Α μοιάζουν με μακροφάγα και είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση άχρηστων ουσιών και παθογόνων, καθώς και για την έκκριση κυτοκινών. Τα κύτταρα τύπου Β αποτελούν ινοβλάστες του υμένα και βοηθούν στη συγκράτηση του αρθρικού υγρού εντός της αρθρικής κάψουλας.

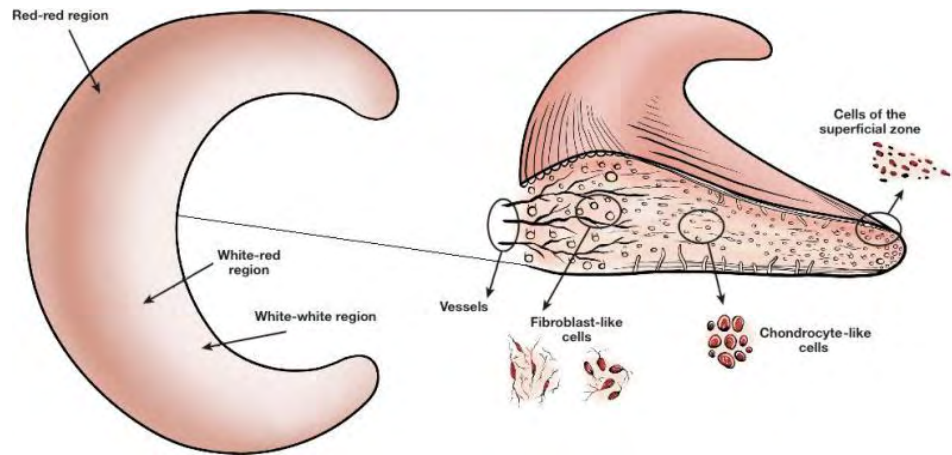
Ο υμένας λειτουργεί ως φραγμός ελέγχοντας την είσοδο ουσιών στο χώρο της άρθρωσης. Επίσης διοχετεύει το αρθρικό υγρό με υαλουρονικό οξύ και πρωτεογλυκάνη 4 (λιπαντική ουσία), που αποτελούν βασικά συστατικά για την μηχανική στήριξη που προσφέρει. Το αρθρικό υγρό κρατά τους ιστούς της άρθρωσης καλά ενυδατωμένους και είναι υπεύθυνο για την μεταφορά θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου στον αρθρικό χόνδρο, καθώς ο χονδρικός ιστός δεν διαθέτει αγγείωση.⁸

Ο μηνίσκος αποτελείται από δύο τμήματα, το μέσο μηνίσκο και τον πλευρικό μηνίσκο. Ρόλος του μηνίσκου είναι να προσφέρει αντοχή απέναντι σε δυνάμεις που ασκούνται στην άρθρωση, όπως το βάρος, οι πιέσεις και οι κραδασμοί. Επίσης διαθέτει μεγάλο ποσοστό νερού, καθώς και αγγείωση, κι έτσι συμμετέχει στη λίπανση και στη διοχέτευση θρεπτικών στον αρθρικό χόνδρο.



Εικόνα 3: Υμένας, αρθρικό υγρό και χόνδρος άρθρωσης. Πηγή: [Healthwise](#) 2018

Ο ιστός του μηνίσκου περιέχει διάφορα είδη κυττάρων και ECM. Εδώ συναντώνται δύο είδη ινωδών πρωτεϊνών, το κολλαγόνο (κυρίως τύπου Ι) και η ελαστίνη. Επίσης περιέχονται πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες προσκόλλησης (adhesion glycoproteins), που βοηθούν αντίστοιχα στην απορρόφηση νερού και στην επικοινωνία ανάμεσα στα κύτταρα και στα στοιχεία του ECM.



Εικόνα 4: Ζώνωση και μορφολογία κυττάρων μηνίσκου. Πηγή: Eleftherios A. Makris 2011⁹

Η μορφολογία των κυττάρων του ιστού του μηνίσκου ποικίλει (Εικόνα 4). Τα κύτταρα της εξωτερικής ζώνης έχουν σχήμα οβάλ και ομοιάζουν στην εμφάνιση και τη συμπεριφορά με τους ινοβλάστες. Επίσης διαθέτουν κυτταρικές επεκτάσεις για να επικοινωνούν μεταξύ τους και με το ECM. Στη βαθύτερη ζώνη συναντώνται κύτταρα σφαιρικού σχήματος, όπως επίσης και μεγαλύτερα επίπεδα κολλαγόνου τύπου II και πρωτεογλυκανών, κυρίως αγγρεκάνης. Επειδή η βιοχημεία αυτή θυμίζει αρκετά το χονδρικό ιστό, τα κύτταρα της ζώνης αυτής ονομάζονται ινοχονδροκύτταρα. Τέλος, στην επιφάνεια του ιστού παρατηρούνται πεπλατυσμένα προστατευτικά κύτταρα.⁹

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί πάθηση ολόκληρης της άρθρωσης. Η φυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας θα μπορούσε να περιγραφεί περιεκτικά ως καταστροφή των ιστών της αρθρικής κάψουλας. Παράγοντες που θέτουν τους ιστούς της άρθρωσης επιρρεπείς σε φθορά μπορούν να αντιμετωπιστούν και ως παράγοντες κινδύνου της πάθησης. Υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία όσον αφορά την αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, στην οποία η παχυσαρκία καθώς και η έλλειψη άσκησης αναγράφονται ως τα συνηθέστερα αίτια κινδύνου για την εμφάνιση και την πρόοδο της.¹⁰ Άλλα αίτια σε επίπεδο συστήματος είναι η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, η διατροφή, η πυκνότητα και μάζα των οστών, κάποια υπάρχουσα γενετική προδιάθεση, ένα μεταβολικό σύνδρομο ή η ύπαρξη συστημικής φλεγμονής.

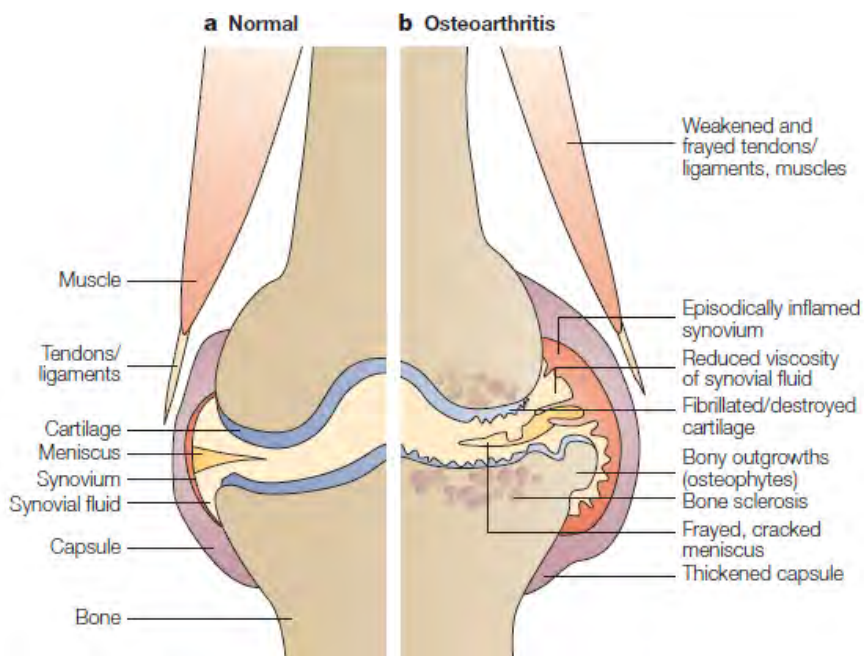
Πολλοί ονομάζουν την οστεοαρθρίτιδα «πάθηση της μεγάλης ηλικίας». Αν και αυτό δεν είναι ακριβές, η ηλικία συνδέεται με την εμφάνιση της πάθησης για το λόγο ότι ενέχει καταστάσεις φθοράς και ευαισθησίας των μυών και των αρθρώσεων, και άρα παθήσεις που

επηρεάζονται από τους παράγοντες αυτούς.¹¹ Το φύλο και η εθνικότητα παίζουν επίσης ρόλο, καθώς έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα ποσοστά ΟΑ στις γυναίκες και σε Καυκάσιους είναι μεγαλύτερα.¹² Επιπλέον, οι γυναίκες αναφέρουν συχνότερα συμπτώματα πόνου, ο οποίος αποτελεί ορόσημο στην ΟΑ. Τα αποτελέσματα αυτά ενδέχεται να οφείλονται τόσο σε διαφορές στη γονιδιακή και ορμονική ρύθμιση (όσον αφορά το φύλο), όσο και κυριότερα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες π.χ. τρόπος ζωής, φόρτο εργασίας. Στο επίπεδο της άρθρωσης, ανατομικές ανωμαλίες και προβλήματα στη φυσιολογία και τη μηχανική των ιστών μπορούν να συμβάλουν σε εμφάνιση ή επιδείνωση της οστεοαρθρίτιδας. Τέτοιοι παράγοντες είναι το σχήμα της άρθρωσης και των οστών, η μυϊκή αδυναμία, η ευθυγράμμιση της άρθρωσης και το φορτίο των πιέσεων, καθώς και πρόκληση τραυματισμού, π.χ. στην άθληση.² Από τα προαναφερθέντα αίτια, η άσκηση, η διατροφή, η μυϊκή επάρκεια, η αποφυγή τραυματισμών και η παχυσαρκία αφορούν κατά κόρον τον τρόπο ζωής των ασθενών και για τον λόγο αυτό αποτελούν τους βασικούς στόχους σε προσεγγίσεις αποκατάστασης.

Λόγω της μεγάλης ετερογένειας της φύσης της οστεοαρθρίτιδας υπάρχουν πολλαπλοί τρόποι κατηγοριοποίησης των περιστατικών. Η πιο συνήθης είναι αυτή σε Πρωτογενή ΟΑ (Primary OA, POA), που προκαλείται από ενδογενή αίτια (γήρας, κληρονομικότητα/γενετική προδιάθεση) και σε Δευτερογενή ΟΑ (Secondary OA, SOA) που οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες (τραυματισμός, ύπαρξη άλλης πάθησης, παχυσαρκία, φλεγμονή). Επίσης, η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να διακριθεί σε πρώιμης έναρξης και καθυστερημένης έναρξης. Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών αιτιών που συνδέονται με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας δίνει έναν πολυπαραγοντικό χαρακτήρα στην πάθηση. Για παράδειγμα, η πρόκληση τραυματισμού της άρθρωσης λόγω άθλησης σε νεαρό άτομο με γενετική προδιάθεση είναι πιο πιθανό να οδηγήσει σε ΟΑ πρώιμης έναρξης σε σχέση με ένα άτομο χωρίς γενετική προδιάθεση. Μια ενδιαφέρουσα κατηγοριοποίηση όπως προτάθηκε από τους Bijlsma et al το 2011 είναι δυνατή με βάση τη φαινοτυπική έκφραση της πάθησης, στην οποία περίπτωση ο φαινότυπος της ΟΑ μπορεί να διακριθεί σε μετα-τραυματικό, μεταβολικό, γήρατος, πόνου και γενετικό. Η κατηγοριοποίηση αυτή δίνει τη δυνατότητα για διαφορική θεραπευτική προσέγγιση ειδική για κάθε είδος ασθενή.¹³

γ. Μηχανισμοί

Γενικά, με την αύξηση της ηλικίας, τα γερασμένα χονδροκύτταρα αδυνατούν να επιτελέσουν επαρκή επιδιόρθωση της σύστασης του χόνδρου. Επίσης, αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις (όπως διαφοροποιημένο πρότυπο μεθυλίωσης DNA μεταξύ OA και υγιών χονδροκυττάρων) στα γερασμένα χονδροκύτταρα επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων και απορρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην παχυσαρκία οι αυξημένες μηχανικές πιέσεις αποτελούν μεγάλη επιβάρυνση για την άρθρωση. Επιπλέον η παχυσαρκία μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή μέσω απελευθέρωσης κυτοκινών από το λιπώδη ιστό, οι οποίες σηματοδοτούν καταβολικά μονοπάτια και οδηγούν σε καταστροφή των ιστών. Σε περιπτώσεις τραυματισμού της άρθρωσης παρατηρείται αύξηση κυτοκινών και τοπική φλεγμονή με επακόλουθη περαιτέρω καταστροφή των ιστών. Επίσης είναι πλέον γνωστό ότι η χρόνια συστηματική φλεγμονή σε περιπτώσεις OA μπορεί να συμβάλει στην πρόοδο της πάθησης, καθώς φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές απορρυθμίζουν τα χονδροκύτταρα ενεργοποιώντας καταβολικές διαδικασίες.¹⁴

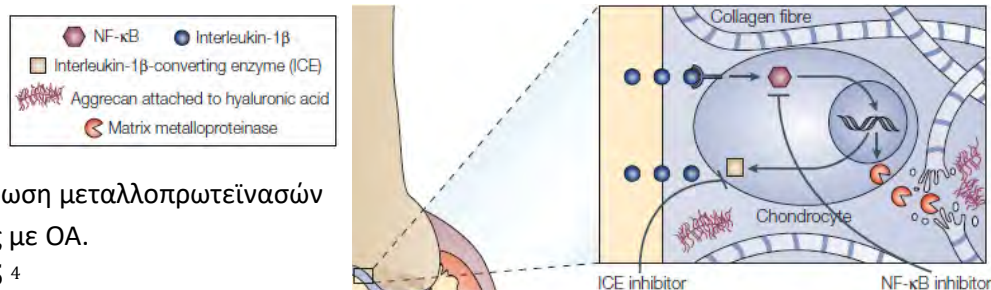


Εικόνα 5: Αριστερά: φυσιολογική άρθρωση. Δεξιά: άρθρωση με OA. Πηγή: Wieland 2005 ⁴

Τα πρώτα σημάδια διάβρωσης μιας άρθρωσης με ΟΑ παρατηρούνται στον αρθρικό χόνδρο. Η επιβάρυνση του ιστού με μεγάλες πιέσεις, όπως επίσης και ο τραυματισμός ή η γήρανση του ιστού προκαλούν μορφολογικές τροποποιήσεις στα χονδροκύτταρα (όγκος, pH, συγκέντρωση ιόντων). Σήματα κινδύνου που απελευθερώνονται σε αυτές τις περιπτώσεις ονομάζονται αλαρμίνες. Οι αλαρμίνες αναγνωρίζονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού που ανταποκρίνονται στην πρόκληση ζημίας στους ιστούς της άρθρωσης στρατολογώντας το ανοσοποιητικό στα αρχικά στάδια της ΟΑ. Κατά την απόκριση του ανοσοποιητικού και μέσω μονοπατιών TLR (toll-like receptors) σηματοδοτείται γρήγορα η παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.¹⁵

Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης για προσπάθεια επαναφοράς της φυσιολογικής σύστασης του ιστού όπως προαναφέρθηκε ελέγχεται από τις κυτοκίνες. Ισχυρή καταβολική δράση έχουν οι ιντερλευκίνες (πχ IL-1β). Επίσης καταβολικές αλλά λιγότερο ισχυρές κυτοκίνες είναι οι ιντερφερόνες και οι παράγοντες νέκρωσης όγκων (πχ TNFα). Αναβολική δράση διαθέτουν οι αυξητικοί παράγοντες που προωθούν τη σύνθεση. Οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται σηματοδοτούν την ενεργοποίηση αναβολικών ή καταβολικών διαδικασιών ανάλογα με τις ανάγκες του ιστού, προωθώντας δηλαδή είτε την κυτταρική αύξηση είτε την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων. Στην ΟΑ, η καταστροφή του ιστού του χόνδρου ξεκινάει από την επιφανειακή στοιβάδα, όπου αυξάνεται η έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), πρωτεολυτικά ένζυμα που απενεργοποιούν παράγοντες σημαντικούς για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του ιστού (Εικόνα 6). Σημαντικότερη θεωρείται η MMP13 ή κολλαγενάση 3, η οποία κόβει κυρίως το κολλαγόνο τύπου II (COL2).¹⁵ Επίσης πολύ σημαντικές πρωτεϊνάσες αποτελούν οι αγγρεκανάσες (ADAMTS, A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) που κόβουν την αγγρεκάνη. Οι αγγρεκανάσες θεωρούνται ορόσημο της καταστροφής του χόνδρου στις φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων, καθώς δρουν στα αρχικά στάδια, πριν ακόμη από τη δράση των MMPs που συμβαίνει στα μετέπειτα στάδια της πάθησης. Οι πιο γνωστές αγγρεκανάσες είναι οι ADAMTS-4 και ADAMTS-5.¹⁶ Φυσιολογικά, η ρύθμιση της δράσης των MMPs γίνεται από ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs). Στην ΟΑ οι TIMPs υπολειτουργούν, με αποτέλεσμα οι MMPs να δρουν ανεξέλεγκτα. Σημαντική είναι και η δράση του κολλαγόνου τύπου X (COL10), ρόλος του οποίου είναι η

οστεοποίηση του χόνδρου σε περιπτώσεις υπερτροφίας του χονδρικού ιστού. Η οστεοποίηση του χόνδρου είναι μια διαδικασία που συναντάται συχνά στην ΟΑ.¹⁷



Εικόνα 6: Απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών σε χόνδρο άρθρωσης με ΟΑ.
Πηγή: Wieland 2005 ⁴

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ο ρόλος των κυτοκινών στη ρύθμιση της παραγωγής προ-φλεγμονωδών προσταγλαδινών. Οι κυτοκίνες ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A2 (PLA2) που τέμνει τη λιπιδική μεμβράνη των κυττάρων και απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ. Επίσης προάγουν την έκφραση της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2), η οποία ενισχύεται σε καταστάσεις φλεγμονής και καταλύει την μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλαδίνη H2 (PGH2). Η PGH2 αποτελεί πρόδρομο μόριο για δύο βασικές για τη φλεγμονώδη αντίδραση προσταγλαδίνες: την προσταγλαδίνη E2 που προάγει τη φλεγμονή και την προσταγλαδίνη D2 που τη σταματά.

Με την καταστροφή του κολλαγόνου τύπου 2 και των πρωτεογλυκανών, επέρχεται η σταδιακή ρήξη της επιφανειακής στοιβάδας. Στο σημείο αυτό οι βαθύτερες ζώνες ενισχύουν την παραγωγή κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών προσπαθώντας να επαναφέρουν τη φυσιολογική συγκέντρωση ώστε να είναι δυνατή η αποκατάσταση του ιστού. Καθώς όμως τα συμπτώματα της πάθησης γίνονται σοβαρότερα, η ικανότητα επαναφοράς των αλλαγών δεν είναι δυνατή, παρατηρείται μεγάλο ποσοστό φλεγμονής, και η φθορά φτάνει τα βαθύτερα στρώματα. Στα υμενοκύτταρα άρθρωσης με ΟΑ αρχικού σταδίου εντοπίζεται επίσης αυξημένη παραγωγή κυτοκινών, πιθανώς σε απάντηση στα φλεγμονώδη σήματα του χόνδρου, που θα οδηγήσουν σε περαιτέρω φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η φλεγμονή εδώ θα προκαλέσει πάχυνση του υμένα και της κάψουλας, με παράλληλη μείωση του χώρου της άρθρωσης.¹⁵

Σε επίπεδο μεταβολισμού των κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι η εμφάνιση και πρόοδος της ΟΑ είναι συνδεδεμένη με προβλήματα στις μεταβολικές διαδικασίες. Κύτταρα διαφόρων

ιστών προσβεβλημένης άρθρωσης παρουσιάζουν αλλαγές όσον αφορά τόσο τον ενεργειακό μεταβολισμό (γλυκόζη, κύκλος Krebs, β-οξείδωση), όσο και το μεταβολισμό λιπιδίων.

Έχει παρατηρηθεί ότι, σε σύγκριση με υγιή χονδροκύτταρα, τα OA χονδροκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κινάσης του πυροσταφιλικού και επομένως αυξημένη γλυκόλυση. Οι αλλαγές στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο ECM και στα χονδροκύτταρα επηρεάζουν τις επιδιορθωτικές διαδικασίες του χόνδρου. Στα υγιή κύτταρα, οι αλλαγές στα επίπεδα εξωκυττάριας γλυκόζης εξομαλύνονται με την παραγωγή ή την διάσπαση GLUT-1 (μεταφορέας της γλυκόζης 1). Όμως τα OA χονδροκύτταρα φαίνεται να αδυνατούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα GLUT-1 σε περιπτώσεις μεγάλης συγκέντρωσης γλυκόζης, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται γλυκόζη και να δημιουργείται ένα διαβητικό ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο περιβάλλον. Επίσης, λόγω της μεταβολικής αστάθειας, εντός των κυττάρων γίνεται μεγαλύτερη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), και στην ECM παρατηρείται περίσσεια προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης/ γλυκοτοξίνες (advanced glycation end products, AGEs), με καταστροφικές για τον χόνδρο συνέπειες. Συγκεκριμένα οι ρίζες οξυγόνου αποδιοργανώνουν μιτοχονδριακές και άλλες κυτταρικές διαδικασίες οδηγώντας σε δυσλειτουργία της άρθρωσης. Σε μελέτες αρθρώσεων διαβητικών ποντικών εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα CML (καρβοξυλομεθυλολυσίνη, ανήκει στα AGEs) και MMP1, και μειωμένη έκφραση σημαντικών για τη λειτουργία του χόνδρου πρωτεϊνών όπως το κολλαγόνο τύπου 2, η αγγρεκάνη και ο SOX9 (μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την ανάπτυξη και ομοιόσταση του χόνδρου).¹⁸

Έχει αποδειχθεί ότι και ο κύκλος του Krebs χρησιμοποιείται σε μεγάλο ρυθμό, όπως και η γλυκόλυση, για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών σε υμένα OA άρθρωσης, καθώς στοιχεία των βημάτων του κύκλου (κιτρικό, cis-ακοτινικό, μηλικό, σουκινικό, ακετογλουταρικό, φουμαρικό) εντοπίστηκαν αυξημένα. Επιπλέον, η μεγάλη συγκέντρωση ακετογλουταρικού ενδέχεται να σημαίνει μείωση σύνθεσης των GAGs, καθώς στην παραγωγή και των δύο βασικό μόριο αποτελεί η γλουταμίνη. Ακόμη, η β-οξείδωση παρατηρήθηκε αυξημένη σε άτομα με OA. Στον ορό των ασθενών εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα ακυλοκαρνιτινών, μόρια που ρυθμίζουν την πρόσληψη των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια

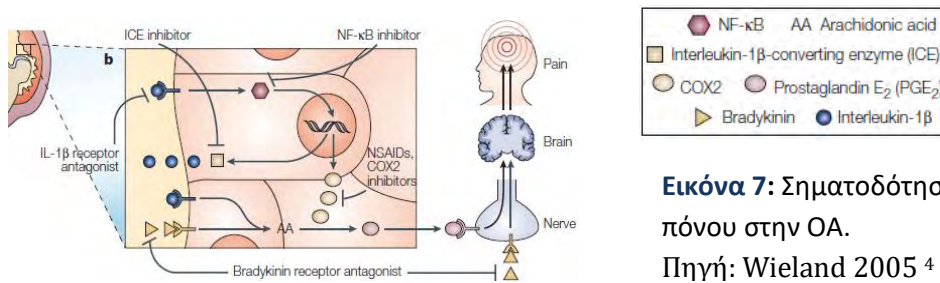
κατά το μονοπάτι της β-οξειδωσης. Τα χαμηλά επίπεδα στον ορό υποδηλώνουν αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα και έχουν συνδεθεί με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ΟΑ.¹⁸

Όσον αφορά το μεταβολισμό λιπιδίων, μελετώντας την πρόοδο της ΟΑ σε περιπτώσεις παχυσαρκίας, πέρα από την προφανή εμβιομηχανική επιβάρυνση που προκαλεί η παχυσαρκία στις αρθρώσεις, παρατηρείται και συσχέτιση της πάθησης με την απορρύθμιση της λιπιδικής ομοιόστασης. Εκτός της παχυσαρκίας, η ΟΑ έχει συσχετιστεί και με άλλα μεταβολικά σύνδρομα, όπως ο διαβήτης και η υπέρταση. Σε μελέτη του μεταβολικού προφίλ σε υμένα και πλάσμα τριών ομάδων ατόμων (με ΟΑ και διαβήτη, μόνο με ΟΑ, και υγιών), βρέθηκαν δύο φωσφατιδιλοχολίνες (PC ae C34:3 και PC ae C36:3) σε χαμηλά επίπεδα στα άτομα με ΟΑ και σε ακόμα χαμηλότερα σε άτομα με ΟΑ και διαβήτη, σε σύγκριση με τα υγιή. Οι δύο αυτές PC ανήκουν σε ομάδα φωσφολιπιδίων που ρυθμίζουν τόσο φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές όσο και σηματοδοτικά μόρια, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και τα εικοσανοειδή αντίστοιχα. Επιπλέον, στο αρθρικό υγρό των ατόμων με ΟΑ και διαβήτη εντοπίστηκε αυξημένη συγκέντρωση AGEs, κάτι που συσχετίστηκε με τα πολύ χαμηλά επίπεδα των προαναφερθέντων φωσφατιδιλοχολινών.¹⁸

Πρέπει να αναφερθεί πως το σύνολο των προαναφερθέντων καταστάσεων (φλεγμονή, απορρύθμιση μεταβολισμού, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι πολλαπλασιασμού των κυττάρων κλπ) οδηγεί σε πρόωση γήρανση (cell senescence) των χονδροκυττάρων, υμενοκυττάρων και λοιπών κυττάρων των ιστών της ΟΑ άρθρωσης. Τα γερασμένα κύτταρα χάνουν σε μεγάλο βαθμό τη δυνατότητα τέλεσης σωστών κυτταρικών διεργασιών κι έχουν σημαντική πιθανότητα λαθών που οδηγεί σε μεγαλύτερη απελευθέρωση κυτοκινών και ανεβασμένα ποσοστά απόπτωσης. Αυτό σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονής δημιουργούν μια προοδευτικά λιγότερο λειτουργική άρθρωση. Στη γήρανση των κυττάρων που προκαλείται από αίτια όπως η παχυσαρκία ή ο κακός τρόπος ζωής, προστίθεται και αυτή της φυσιολογικής αύξησης της ηλικίας, ορίζοντας έτσι το συνολικό χαρακτήρα της παραμέτρου «γήρανση» στην πάθηση της οστεοαρθρίτιδας.¹⁹

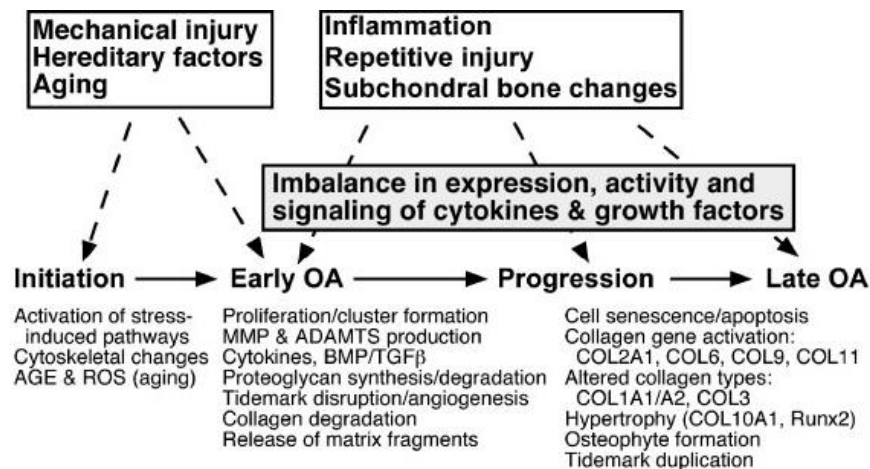
Εξίσου σημαντική με τα παραπάνω είναι και η παράμετρος πόνος που αποτελεί ένα από τα ορόσημα στην οστεοαρθρίτιδα. Ο μηχανισμός πρόκλησης πόνου στην ΟΑ βασίζεται

στους αισθητήριους νευρώνες των ιστών της άρθρωσης και του υποχόνδριου οστού (Εικόνα 7). Εξαιρείται ο χονδρικός ιστός ο οποίος δεν διαθέτει νεύρωση. Διέγερση των αισθητήριων



Εικόνα 7: Σηματοδότηση του πόνου στην OA.
Πηγή: Wieland 2005 ⁴

νευρώνων της άρθρωσης προκαλείται μετά από τη βιοχημική απορρύθμιση που λαμβάνει χώρα στην OA και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως η προσταγλαδίνη E₂ και η βραδυκινίνη. Οι απολήξεις των νευρώνων της άρθρωσης που αναγνωρίζουν τους παράγοντες αυτούς είναι ευαισθητοποιημένες με αποτέλεσμα να ενισχύουν τα σήματα προς τα αισθητήρια κέντρα του νωτιαίου μυελού και να προκαλούν αυξημένο αίσθημα πόνου.⁴ Στην Εικόνα 8 φαίνεται μια αναπαράσταση των βημάτων εξέλιξης της οστεοαρθρίτιδας, των αιτιολογικών παραγόντων, καθώς και των κυτταρικών μηχανισμών που ενέχονται σε κάθε βήμα.



Εικόνα 8: Πορεία εξέλιξης της οστεοαρθρίτιδας, πιθανά αίτια (πάνω) και κυτταρικές και μορφολογικές αλλαγές (κάτω). Πηγή: Goldring 2007 ²⁰

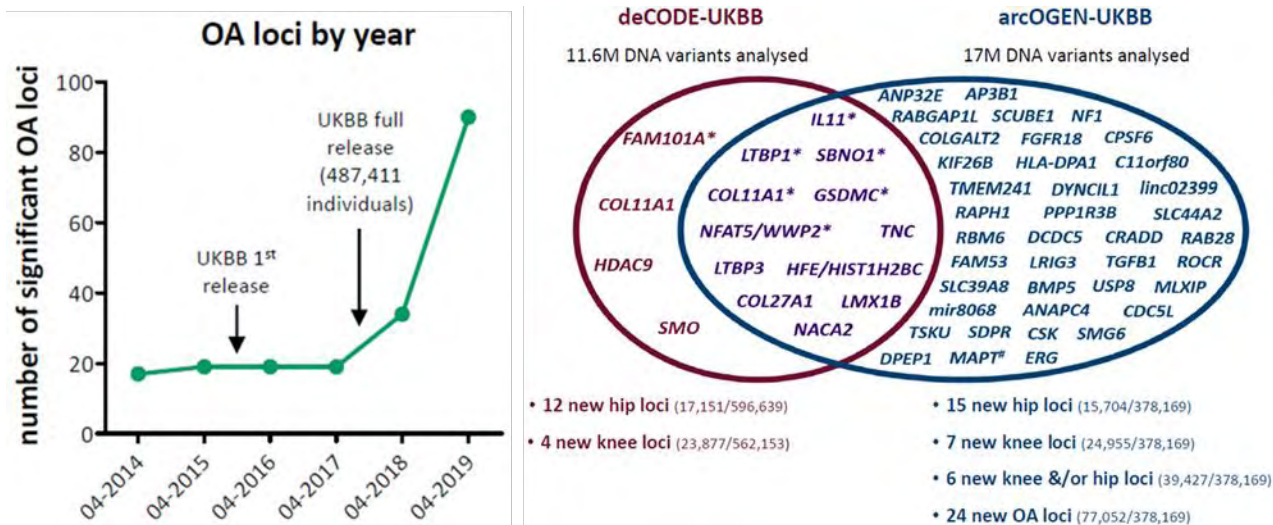
δ. Γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες

Η γενετική κι επιγενετική παράμετρος παίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή οστεοαρθρίτιδα. Κληρονομικότητα στη ΟΑ δεν σημαίνει κληρονομικότητα της πάθησης, αλλά κληρονομικότητα της προδιάθεσης εμφάνισης της. Συγκεκριμένα, προδιαθετικοί παράγοντες για την πρώιμης έναρξης ΟΑ έχουν Μενδελικό χαρακτήρα, πρόκειται δηλαδή για ένα μόνο γονίδιο μοναδικό για μία οικογένεια που έχει μεγάλο αντίκτυπο στο φαινότυπο της πάθησης. Τα άτομα που πάσχουν από πρώιμη ΟΑ αποτελούν τη μειονότητα των περιπτώσεων. Αντίθετα η ΟΑ καθυστερημένης έναρξης μπορεί να προκληθεί από συνδυασμό παραγόντων, τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών. Οι μεταλλάξεις που συναντώνται σε αυτή την περίπτωση διαφέρουν από άτομο σε άτομο κι έχουν μικρότερη επίδραση στο φαινότυπο. Η γενετική συνιστώσα στην ΟΑ υπολογίζεται να ανέρχεται σε ποσοστό άνω του 40%.²¹ Μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν μονοπάτια σηματοδότησης της ανάπτυξης και της καταστροφής των κυττάρων, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), αλλά και μεταλλάξεις σε γενετικούς τόπους με άγνωστο μέχρι τώρα ρόλο στην ΟΑ μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση και πρόοδο της πάθησης.

Μεταλλάξεις γονιδίων βρέθηκαν αρχικά μέσα από *ex-vivo* μελέτες σε ιστούς ασθενών και *in-vivo* μελέτες σε ειδικά σχεδιασμένα μοντέλα ζώων. Οι γενετικοί τόποι που ανακαλύφθηκαν να συμμετέχουν στην ΟΑ φαίνεται να επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τα επίπεδα έκφρασης ή μεθυλίωσης γονιδίων, και λιγότερο την ποιότητα των πρωτεϊνών.²¹ Γονίδια που συνδέονται με την ΟΑ ενέχονται σε γνωστά μονοπάτια ανάπτυξης και σκελετογένεσης όπως παραγωγής κολλαγόνου (*Col2a1*, *Col9a1*, *Col11a1*), TGF-β (*GDF5*, *SMAD3*), Wnt (*FRZB*), Indian Hedgehog (*IHH*), Notch, αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (*FGF*), και οι μεταλλάξεις σε αυτά οδηγούν σε καταβολικές διαδικασίες. Χαρακτηριστικό αποτελεί το παράδειγμα του γονιδίου *RUNX2*.¹⁴ Η πρωτεΐνη Runx2 είναι μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε οστεοβλάστες.²² Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ζωικά μοντέλα ΟΑ.

Πρόσφατες GWAS μελέτες (genome wide association studies) έριξαν φως σε νέους γενετικούς τόπους που συνδέονται με προδιάθεση για ΟΑ, ορίζοντας το συνολικό αριθμό γνωστών ΟΑ γενετικών τόπων σε 90. Οι δύο μεγαλύτερες από αυτές τις μελέτες, στις οποίες

ανακαλύφθηκαν 56 από τους 90 γενετικούς τόπους, πραγματοποιήθηκαν μέσω μετα-αναλύσεων βασισμένες σε περίπου 488.000 άτομα που είναι καταχωρημένα στην UK BioBank σε συνδυασμό με την ισλανδική βάση δεδομένων deCODE²³ στην μία, και την βρετανική arcOGEN²⁴ στην άλλη (Εικόνα 9). Στην arcOGEN αναλύθηκαν έως 17.5 εκατομμύρια γενετικών παραλλαγών. Η μελέτη deCODE αποτελεί την μεγαλύτερη έως σήμερα GWAS μελέτη για την οστεοαρθρίτιδα, όπου αναλύθηκαν 11.6 εκατομμύρια γενετικών παραλλαγών σε ένα σύνολο άνω των 650.000 ατόμων. Και στις δύο έρευνες πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές μετα-αναλύσεις για τις ΟΑ γόνατος και ισχίου. Τα αποτελέσματα εξακρίβωσαν τη σύνδεση με την ΟΑ ορισμένων ήδη γνωστών παραλλαγών, ενώ έφεραν στο προσκήνιο και νέες παραλλαγές. Σημαντικό αποτέλεσμα ήταν και η εξακρίβωση ότι συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι συνδέονται με προδιάθεση σε ΟΑ διαφορετικής άρθρωσης. Για παράδειγμα ο GDF5 σχετίζεται κυρίως με την ΟΑ γόνατος, ενώ ο PTHLH σχετίζεται κυρίως με την ΟΑ ισχίου. Επίσης, μέσω της μελέτης arcOGEN ανακαλύφθηκαν εκτός των άλλων και νέοι ΟΑ-σχετιζόμενα SNPs.²⁵



Εικόνα 9: Η μεγάλη επίπτωση των μελετών με βάση τα δεδομένα της UK BioBank στην ανακάλυψη σημαντικών για την ΟΑ γενετικών τόπων τα τελευταία χρόνια (αριστερά) και οι νέες παραλλαγές που βρέθηκαν μέσα από τις deCODE και arcOGEN GWAS (δεξιά). Πηγή: Reynard et al 2019²⁵

Μια από τις υποθέσεις για τη συσχέτιση γενετικών τόπων και προδιάθεσης σε ΟΑ είναι ότι επιδρούν στην μορφολογική ανάπτυξη και το σχήμα των οστών και των αρθρώσεων, κάνοντάς τα πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη ΟΑ σε μετέπειτα στάδιο της ζωής. Την υπόθεση αυτή στηρίζουν μελέτες παραλλαγών που βρίσκονται σε γενετικούς τόπους ΟΑ και σχετίζονται με το ύψος, το σχήμα του ισχίου και την αναπτυξιακή δυσπλασία ισχίου (DDH). Όντως, μέσω GWAS σε Ευρωπαίους με DDH ²⁶ αποδείχτηκε ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην DDH και στον πολυμορφισμό SNP rs143384 του γονιδίου GDF5 που σχετίζεται με την ΟΑ γόνατος. Μελέτες σε knock-out ποντίκια για το GDF5 έδειξαν συσχέτιση του γονιδίου GDF5 με την μορφολογική ανάπτυξη του ισχίου.²⁷

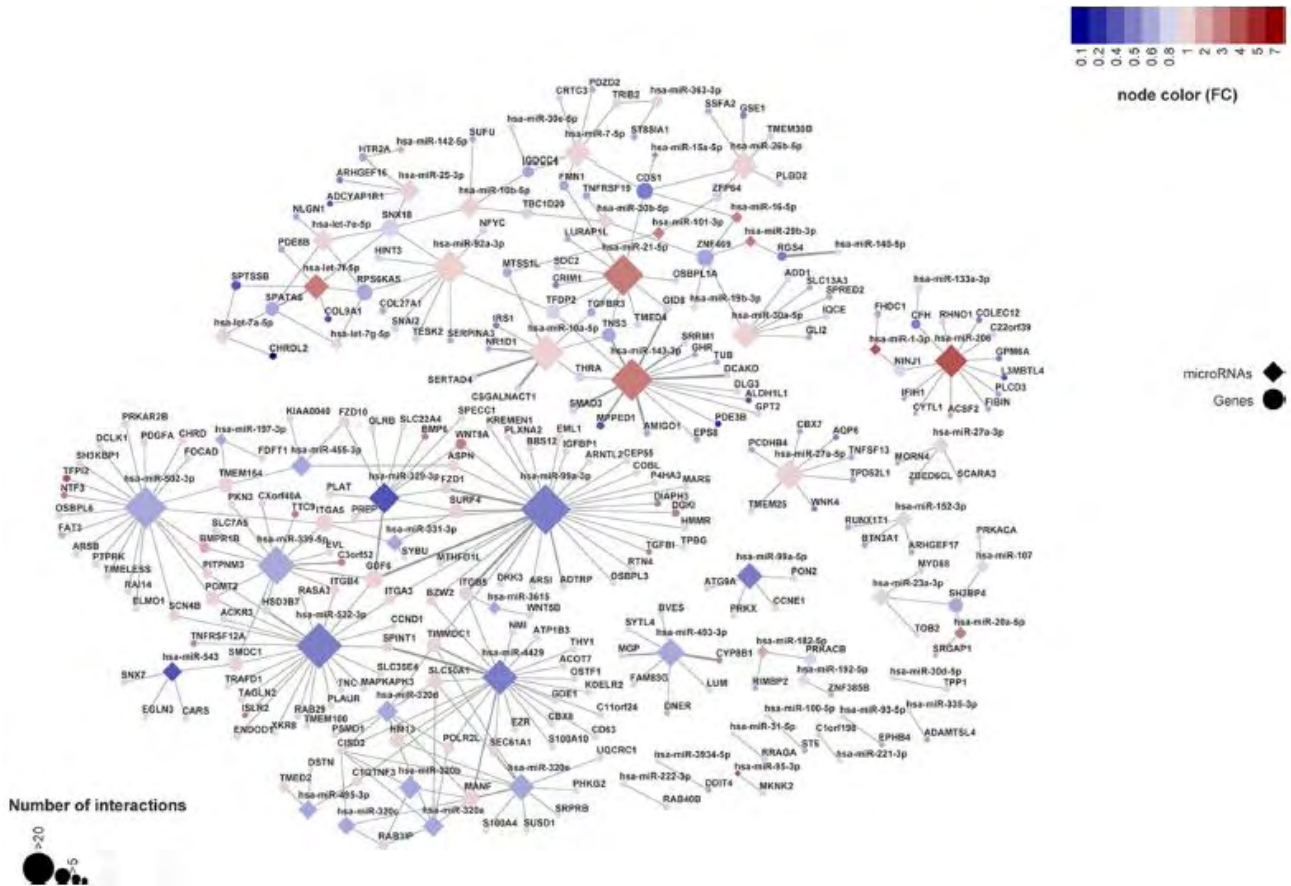
Στο παραπάνω παράδειγμα φαίνεται η σημασία όχι μόνο της ανεύρεσης των συσχετιζόμενων με την προδιάθεση για ΟΑ παραλλαγών, αλλά και του τρόπου με τον οποίο οι παραλλαγές αυτές επηρεάζουν την ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων. Αυτό περιλαμβάνει τα γονίδια στόχους, τα κύτταρα και τους ιστούς που επηρεάζονται, αλλά και σε ποια ηλικία συναντώνται οι επιπτώσεις. Η εύρεση των απαντήσεων στα παραπάνω ερωτήματα επιτυγχάνεται μέσω μελετών λειτουργικότητας, όπου οι υποψήφιες παραλλαγές αναλύονται σε ζωικά μοντέλα για το μηχανισμό δράσης τους και το ρόλο τους στη ΟΑ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι γενετικές παραλλαγές στην ΟΑ επηρεάζουν κυρίως τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων. Όντως, SNPs που απαντώνται στην ΟΑ (όπως και σε άλλες ασθένειες) φαίνεται να μεταβάλλουν τη δυνατότητα σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων, μειώνοντας την έκφραση των γειτονικών γονιδίων συγκριτικά με το άλλο αλληλόμορφο. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας διαδικτυακά εργαλεία όπως το HarloReg είναι δυνατή η εύρεση πλήθους πολυμορφισμών που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με τα SNPs αυτά. Πρόσφατη μελέτη επιχείρησε να βρει όλα τα SNPs που προκαλούν διαφορετική έκφραση αλληλομόρφων σε χόνδρο με ΟΑ.²⁸ Βρέθηκαν 2070 SNPs σε 1031 γονίδια που εκφράζονται στο χόνδρο, κάποια με γνωστή συσχέτιση με την ΟΑ όπως τα *ALDH1A2*, *MGP* και *COL11A1*, και σε συνδυασμό με βάσεις δεδομένων για πολυμορφισμούς που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, βρέθηκαν SNPs σε γενετικούς τόπους των οποίων η συσχέτιση με την προδιάθεση για ΟΑ ανακαλύφθηκε πρόσφατα.

Σημαντικό ρόλο τη μελέτη της OA έχει και η επιγενετική, όπως η μεθυλίωση του DNA, τα microRNAs και άλλα μη-κωδικά μόρια RNA που επηρεάζουν τη μεταγραφή γονιδίων.

Όσον αφορά την μεθυλίωση του DNA, έχει δειχθεί ότι τα διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης που συναντώνται σε ιστούς που πάσχουν επηρεάζουν την έκφραση γνωστών γονιδίων της OA, όπως *MMP13*, *GDF5*, *SOX9*, *DIO2* και *ADAMTS4*. Όμως, δεν είναι ξεκάθαρο εάν η επιγενετική αυτή αλλαγή αποτελεί αίτιο εμφάνισης της OA, ή αποτέλεσμα των επιπτώσεων της πάθησης στα κύτταρα. Υπάρχουν υποθέσεις για τους τρόπους με τους οποίους το διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA μεταξύ OA και υγιών ιστών μπορεί να οδηγήσει στην OA. Μια υπόθεση ορίζει ότι ορισμένα επιγενετικά προφίλ είναι περισσότερο επιρρεπή στην εμφάνιση και πρόοδο της πάθησης. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω της ύπαρξης SNPs που προδιαθέτουν για την OA και που επηρεάζουν το πρότυπο μεθυλίωσης γονιδίων. Για παράδειγμα, το rs143383 C>T SNP στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *GDF5* μπορεί να επηρεάσει το πρότυπο μεθυλίωσης και άρα τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στον αρθρικό χόνδρο, αυξάνοντας την προδιάθεση για εμφάνιση ή πρόοδο της OA. Άλλη υπόθεση προτείνει ότι η επιγενετική απορρύθμιση που προκαλεί η γήρανση αποτελεί τον διαμεσολαβητή για την αλλοίωση του χόνδρου κατά την πρόοδο της OA. Με άλλα λόγια, το διαφοροποιημένο πρότυπο μεθυλίωσης λόγω επιγενετικής απορρύθμισης σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα ενεργοποιεί μονοπάτια ανάπτυξης που μπορούν να οδηγήσουν σε μορφολογικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα την οστεοποίηση του χόνδρου.²⁹

Μέχρι σήμερα πολλά microRNAs έχουν συσχετιστεί με αλλαγές που παρατηρούνται στον χόνδρο κατά την πρόοδο της OA. Ένα από τα πιο γνωστά είναι το miR-140, το οποίο είναι ειδικό για τον αρθρικό χόνδρο όπου φυσιολογικά ρυθμίζει την ανάπτυξη και την ομοίωση, ενώ έλλειψη του οδηγεί σε συμπτώματα OA.³⁰ Πρόσφατη έρευνα επιχείρησε να χαρτογραφήσει όλα τα miRNAs που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας, καθώς και τα mRNA που στοχεύουν.³¹ Ο χάρτης αλληλεπίδρασης που παρήχθη περιλαμβάνει 62 διαφορετικής έκφρασης miRNAs και 238 διαφορετικής έκφρασης mRNA στόχους (Εικόνα 10). Για παράδειγμα, το miR-99a-3p, το οποίο δεν είχε συσχετιστεί με την OA στο παρελθόν, στοχεύει 36 γονίδια και βρέθηκε να υποεκφράζεται σε χόνδρο με OA. Στα γονίδια στόχους του ανήκουν τα *FZD1*, *ITGB5* και *GDF6*. Επίσης, miRNA που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στην OA

είναι το miR-143-3p, όπου μεταξύ των γονιδίων στόχων συγκαταλέγονται τα *DKAKD*, *AMIGO1* και *SMAD3*. Για τα δύο αυτά miRNA πραγματοποιήθηκε και μελέτη λειτουργικότητας, η οποία εξακρίβωσε κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις αυτές.



Εικόνα 10: Χάρτης αλληλεπιδράσεως miRNA – mRNA στην ΟΑ.

Πηγή: Coutinho de Almeida et al 2019³¹

Εκτός από τα microRNAs, ρόλο στην ΟΑ παίζουν και άλλα μη-κωδικά μόρια RNA, όπως τα μεγάλα μη-κωδικά RNAs (lncRNAs) ή τα κυκλικά RNAs (circRNAs), αν και η έρευνα στα μόρια αυτά βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Ένα από τα lncRNAs που έχει βρεθεί να συμμετέχει στην ΟΑ είναι το ROCR το οποίο δρα ανοδικά της πρωτεΐνης SOX9 κατά την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Πρόσφατη έρευνα αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια για χαρακτηρισμό των lncRNAs που απαντώνται σε οστεοαρθρικό χόνδρο γόνατος και ισχίου, καταγράφοντας 1834 μόρια lncRNA.³²

Τα κυκλικά μόρια RNA προκύπτουν κατά το μάτισμα των mRNA, όπου τα 3' και 5' άκρα της περιοχής που κόβεται ενώνονται σχηματίζοντας θηλιά. Σε μελέτη χόνδρου με OA προσδιορίστηκε ο προστατευτικός ρόλος ενός τέτοιου μορίου, του CircSERPINE2, που προέρχεται από το μάτισμα του mRNA του γονιδίου *SERPINE2*.³³ Η έκφραση του CircSERPINE2 στην OA είναι μειωμένη, και πλήρης αναστολή της έκφρασης του με χρήση siRNA βρέθηκε ότι σταματά την έκφραση σημαντικών για την ομοιόσταση του χόνδρου γονιδίων όπως το *SOX9*, ενώ οδηγεί σε υπερέκφραση καταβολικών γονιδίων όπως η *MMP13*. Σε πειράματα για την εύρεση της ακριβούς δράσης του CircSERPINE2 ανακαλύφθηκε πως προσδένει και κρατά ανενεργό ένα miRNA, το miR-1271, του οποίου η έκφραση είναι αυξημένη στη OA. Υπερέκφραση του miR-1271 έχει το ίδιο αποτέλεσμα με την αναστολή του CircSERPINE2.

A2. Τύποι ζωικών μοντέλων OA

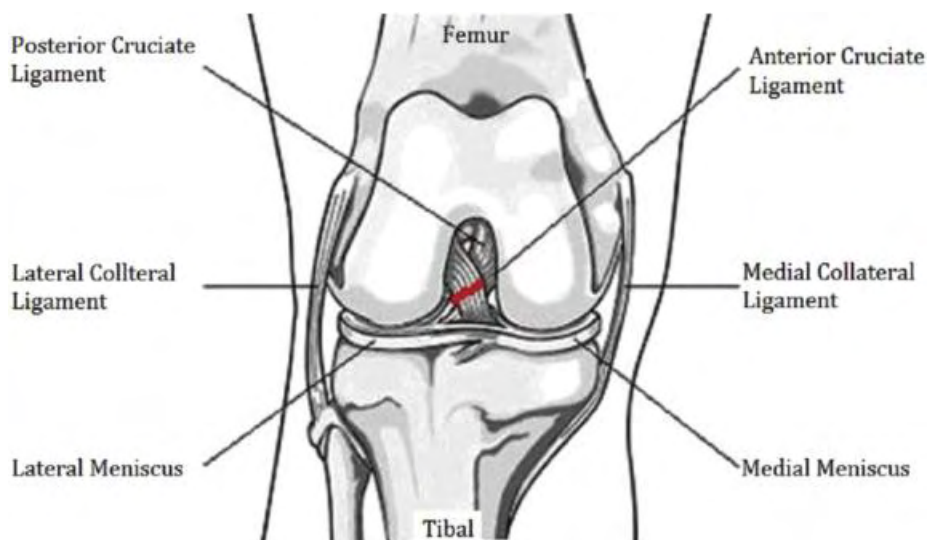
Όπως για τις περισσότερες παθήσεις, έτσι και για τη μελέτη της οστεοαρθρίτιδας έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον ζωικά μοντέλα, καθένα με πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η ανάλυση ζωικών μοντέλων με OA τις τελευταίες δεκαετίες έχει προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την πάθηση, ιδιαίτερα όσον αφορά τη μετατραυματική οστεοαρθρίτιδα, που είναι και ο τύπος που έχει μελετηθεί εκτενέστερα.³⁴ Η OA στα ζωικά μοντέλα μπορεί να προκληθεί με διάφορους τρόπους, ανάλογα με το κομμάτι της πολυπαραγοντικής της φύσης που θέλουμε να μελετήσουμε. Τέτοιοι τρόποι είναι η πρόκληση πρωτογενούς OA, είτε με επιταχυνόμενη γήρανση, είτε πρώιμη με διαγονιδιακά ζώα, ή η πρόκληση OA με χειρουργική ή χημική προσέγγιση. Η άρθρωση των μοντέλων που επιλέγεται πιο συχνά είναι το γόνατο. Ζώα που χρησιμοποιούνται μπορούν να είναι μικρού ή μεγάλου μεγέθους. Δυστυχώς κανένα μοντέλο δεν μπορεί να προσομοιάσει τέλεια την εικόνα της πάθησης στον άνθρωπο.^{34,35}

Μικρά ζώα όπως το ποντίκι, ο αρουραίος, το κουνέλι ή το ινδικό χοιρίδιο είναι χρήσιμα καθώς δεν κοστίζουν πολύ και είναι εύκολα στην διαχείριση και στέγαση.³⁶ Επίσης η μικρότερη διάρκεια ζωής των μικρών ζώων δίνει τη δυνατότητα μελέτης όλων των σταδίων παθήσεων που περιέχουν ηλικιακό παράγοντα, όπως η οστεοαρθρίτιδα. Μεγαλύτερα ζώα όπως ο σκύλος,

η κασίκα, το άλογο ή και πρωτεύοντα όπως ο βαβουίνος φέρουν περισσότερες ομοιότητες στη μορφολογία των αρθρώσεων με τον άνθρωπο και προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες μέσω καλύτερης προσομοίωσης της πάθησης αλλά και για θεραπευτικές προσεγγίσεις σε κλινικό επίπεδο. Η χρήση μεγαλύτερων ζώων επιφέρει μεγάλο οικονομικό κόστος εφόσον τα μεγαλύτερα ζώα έχουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, γεγονός που από τη μία δίνει ακριβείς πληροφορίες για την πρόοδο της πρωτογενούς ΟΑ, αλλά από την άλλη η μελέτη της σε όλο το εύρος ηλικίας του ζώου μπορεί να διαρκέσει δυνητικά έως και μερικές δεκαετίες. Σημαντική είναι και η ηθική συνιστώσα κατά τη χρήση πειραματόζωων, τόσο σε μικρά ζώα όσο και στα μεγαλύτερα ζώα, ειδικά στα πρωτεύοντα. Για παράδειγμα, χιμπατζήδες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες πολυπαραγοντικών παθήσεων συχνά αναπτύσσουν, όπως και οι άνθρωποι, ψυχολογικές διαταραχές όπως κατάθλιψη και μετατραυματικό στρες.³⁴

Το κουνέλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη μελέτη εκφυλιστικών παθήσεων των αρθρώσεων, και ιδιαίτερα των τρόπων επιδιόρθωσης των ιστών άρθρωσης γόνατος με ΟΑ. Το γονιδίωμα του κουνελιού είναι πλήρως γνωστό, και το γόνατο του διαθέτει μερικές ανατομικές ομοιότητες με το ανθρώπινο. Όντας μικρόσωμο ζώο, προσφέρει εύκολη πρόσβαση στην άρθρωση του γόνατος για χειρουργικές προσεγγίσεις, λήψη ιστού και κυτταρικές εγχύσεις. Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνεται και το γεγονός ότι η οστεοαρθρίτιδα είναι μια πολύ συνήθης πάθηση στα ζώα αυτά. Από την άλλη, η φυσιολογία του αρθρικού χόνδρου του κουνελιού είναι πολύ διαφορετική από του ανθρώπου. Ο αρθρικός χόνδρος είναι αρκετά λεπτότερος, διαθέτει περισσότερα χονδροκύτταρα, και μεταβλητή ζώνωση. Ο μηνίσκος διαθέτει επίσης αρκετές μορφολογικές διαφορές. Ακόμη, η πρόοδος της ΟΑ διαφέρει από ζώο σε ζώο, τόσο ανάλογα με την ηλικία, όσο κι επειδή παρατηρούνται συχνά περιπτώσεις αυθόρμητης επούλωσης του τραυματισμού του χόνδρου. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να μελετηθεί σε όλη τη διάρκεια της ζωής του, δίνοντας μια καλή εικόνα της προόδου της πάθησης.^{35,36}

Στις περιπτώσεις μελέτης χειρουργικά προκληθείσας ΟΑ ο τραυματισμός προκαλείται άμεσα ή έμμεσα. Οι συνηθέστερες προσεγγίσεις στην άμεση επέμβαση είναι η διατομή πρόσθιου χιαστού συνδέσμου (ACLT) (Εικόνα 11), η εκτομή μηνίσκου και η μέση ρήξη μηνίσκου, όπως επίσης και η χημική προσέγγιση, για παράδειγμα με εισαγωγή φλεγμονωδών



Εικόνα 11: Διατομή πρόσθιου χιαστού. Πηγή: Han et al 2017³⁶

διαμεσολαβητών.³⁴ Η έμμεση προσέγγιση περιλαμβάνει την επίτευξη τραυματισμού μέσω εξωτερικών μηχανικών πιέσεων.³⁷ Ανεξαρτήτως της προσέγγισης που θα επιλεγεί, τα ζωικά μοντέλα ΟΑ στοχεύουν σε μελέτες σύντομου χρονικού εύρους, λόγω της ταχείας εμφάνισης και προόδου της πάθησης. Στις περιπτώσεις αυτές δεν είναι δυνατή η λήψη πληροφορίας σχετικά με την οστεοαρθρίτιδα που εμφανίζεται φυσικά λόγω εκφυλισμού των αρθρώσεων με την πάροδο της ηλικίας.³⁴ Η επέμβαση με διατομή πρόσθιου χιαστού (Anterior Cruciate Ligament Transection, ACLT) αποτελεί την πιο συχνή και ευρέως γνωστή χειρουργική επέμβαση για δημιουργία μοντέλου ΡΤΟΑ. Ο λόγος που προτιμάται σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις είναι επειδή οδηγεί σε πιο αργή πρόοδο της οστεοαρθριτικής κάκωσης προσφέροντας περισσότερες δυνατότητες μελέτης.³⁴

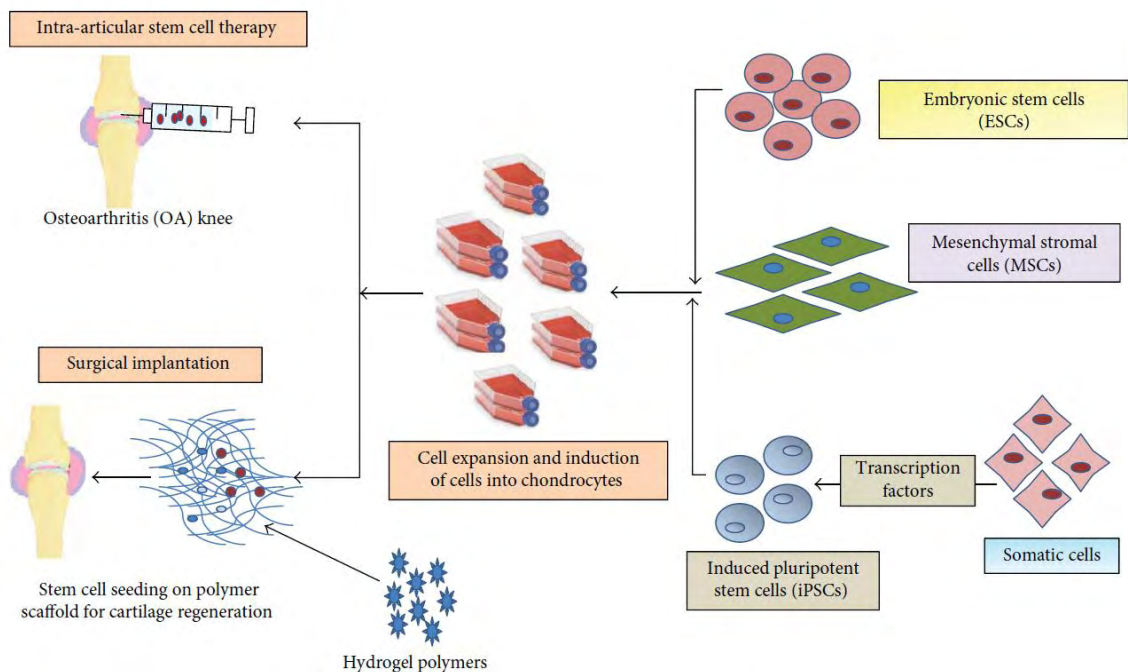
A3. Επαγόμενα βλαστοκύτταρα και ΟΑ

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) αποτελούν κύτταρα με δυνατότητα γρήγορου πολλαπλασιασμού και πολυδύναμης διαφοροποίησης. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1976 και χαρακτηρίστηκαν πρόσφατα από τη Διεθνή Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας ως κύτταρα που διαθέτουν τρεις βασικές ιδιότητες: τη δυνατότητα να προσκολλούνται σε πλαστική επιφάνεια, την θετική ή αρνητική έκφραση συγκεκριμένων δεικτών (π.χ. θετική έκφραση CD105, αρνητική έκφραση CD45) και την

ικανότητα αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης σε μεσεγγυματικές κυτταρικές σειρές όπως χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα ή κύτταρα λιπώδους ιστού.^{38,39} Ενήλικα MSCs μπορούν να απομονωθούν από ιστούς όπως ο νωτιαίος μυελός, ο υμένας άρθρωσης ή ο λιπώδης ιστός. Επαγόμενα MSCs προέρχονται από άλλα βλαστικά κύτταρα, όπως εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) ή ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα επαγόμενα από σωματικά (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs). Θεραπευτικές προσεγγίσεις στη ΟΑ με χρήση βλαστοκυττάρων συμπεριλαμβάνουν *in vitro* καλλιέργειες με σκοπό τη διαφοροποίηση με παροχή ειδικών σημάτων στον επιθυμητό κυτταρικό τύπο για έγχυση σε ιστό, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε μέσω της τεχνολογίας μηχανικής ιστών ως ικρίωμα (Εικόνα 12).^{40,41} Εναλλακτικά, όπως θα δειχθεί στην παρούσα μελέτη, τα βλαστοκύτταρα μπορούν να εγχυθούν κατευθείαν στον ιστό και να διαφοροποιηθούν ανάλογα με την κυτταρική σηματοδότηση του οργανισμού στον απαραίτητο για τις ανάγκες του ιστού κυτταρικό τύπο.

Για τον έλεγχο της θεραπευτικής τους ικανότητας τα ενήλικα MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά, τόσο σε προ-κλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο, όμως δυστυχώς παρατηρείται αρκετά μειωμένη επιδιορθωτική ικανότητα των βλαστοκυττάρων αυτών στις περιπτώσεις της ευρείας αρθρικής κάκωσης που συναντάται στην ΟΑ.⁴²

Από την άλλη, τα MSCs που επάγονται από iPSCs (iPSC-derived MSCs, iMSCs) γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλή τα τελευταία χρόνια. Η χρήση επαγόμενων βλαστοκυττάρων στη θεραπεία παθήσεων εκφυλισμού των αρθρώσεων φαίνεται να φέρει πλεονεκτήματα συγκριτικά με τα ενήλικα MSCs. Ενώ τα ενήλικα προέρχονται από δότη και μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση, τα επαγόμενα MSCs είναι ειδικά για έναν ασθενή, φέροντας έτσι εξαιρετικές προοπτικές στην εξατομικευμένη θεραπεία παθήσεων που απαιτούν ανάπλαση ιστού, όπως η οστεοαρθρίτιδα. Επίσης, η απομόνωση ενήλικων βλαστοκυττάρων είναι επίπονη για το δότη, ενώ η χρήση iPSCs για την παραγωγή MSCs αποφεύγει τα ηθικά εμπόδια που απαντώνται στη χρήση των ολοδύναμων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Επιπλέον, λόγω της πολυδύναμης φύσης των MSCs μειώνεται ο κίνδυνος *in vivo* τερατογένεσης που υπάρχει στην περίπτωση του μεγάλου δυναμικού ανάπτυξης και διαφοροποίησης των ολοδύναμων κυττάρων, προσφέροντας ασφάλεια στη χρήση για



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικών θεραπευτικών προσεγγίσεων με χρήση βλαστοκυττάρων στην ΟΑ. Πηγή: Dubey et al 2018 ⁴⁰

κυτταρικές θεραπείες.^{43,44} Αξίζει να αναφερθεί ότι τα ενήλικα MSC μειονεκτούν σε βάρος των επαγόμενων στο γεγονός ότι φτάνουν σε κατάσταση γήρανσης συντομότερα, κάτι που εξηγεί την μειωμένη επιδιορθωτική τους ικανότητα. Το 2010 οι Lian και συν. απέδειξαν την αυξημένη δυνατότητα επιβίωσης των iMSCs συγκριτικά με τα ενήλικα MSCs σε ζωικό μοντέλο ποντικού με ισχαιμία των πίσω άκρων,⁴⁵ ανοίγοντας τον δρόμο για περαιτέρω μελέτες ελέγχου των in vivo επιδιορθωτικών ικανοτήτων των iMSCs.

Σημαντική είναι και η προσφορά των βλαστοκυττάρων στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων μέσω της δημιουργίας in vitro μοντέλων για την προσομοίωση του κυτταρικού προφίλ εκφυλισμένων ιστών και τον ανώδυνο έλεγχο των δυνατοτήτων των υπό μελέτη ουσιών. Το 2012 οι Johnson και συν. ανακάλυψαν με τον τρόπο αυτό την καρτογενίνη, ουσία που είχε τη δυνατότητα να επάγει σε καλλιέργειες μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από μυελό την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη χονδρογένεση, όπως το SOX9, η αγγρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II. Επίσης, η ίδια ουσία βοήθησε στη διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα και in-vivo μετά από ενδοαρθρική ένεση της σε δύο ζωικά μοντέλα ΟΑ, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την επιδιόρθωση του εκφυλισμένου χόνδρου.⁴⁶ Η προσφορά

στη φαρμακευτική γίνεται ακόμη μεγαλύτερη με τη χρήση επαγόμενων βλαστοκυττάρων, καθώς προέρχονται από κύτταρα ασθενών. Η μελέτη αυτών δίνει πληροφορίες για νέους παράγοντες κινδύνου αλλά και παραλλαγές της πάθησης, και συνεπώς τη δυνατότητα για εις βάθος ανάλυση της φύσης της και ανάπτυξη τρόπων αντιμετώπισης.⁴⁷

Όπως είναι φανερό στο προηγούμενο παράδειγμα, ζωτικής σημασίας αποτελεί η χρήση ζωικών μοντέλων για τη μελέτη της οστεοαρθρίτιδας και για την ανάπτυξη μεθόδων επιδιόρθωσης του αρθρικού χόνδρου με επαγόμενα βλαστοκύτταρα. Το 2016 οι Zhu και συν. παράγαγαν εμβρυικά σώματα (EBs) από iPSCs προερχόμενα από ασθενείς με OA, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποίησαν σε χονδροκύτταρα σε μικρό χρονικό διάστημα και με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας, όπως απέδειξε ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων SOX9, αγγρεκάνη και κολλαγόνο τύπου II. Μετά από ενδοαρθρική έγχυση των χονδροκυττάρων σε οστεοαρθρικό γόνατο ζωικού μοντέλου παρατηρήθηκε σε διάστημα δεκαπέντε (15) εβδομάδων σημαντική επιδιόρθωση του χόνδρου χωρίς την παρουσία ανοσολογικής απάντησης.⁴⁸ Ένα χρόνο αργότερα, οι Zhu και συν. πραγματοποίησαν ένεση εξωσωμάτων εκκρινόμενων από iMSCs σε οστεοαρθρικό γόνατο ζωικού μοντέλου OA επιτυγχάνοντας σημαντικά επίπεδα επιδιόρθωσης του αρθρικού χόνδρου.⁴⁹ Συνδυάζοντας όσα αναφέρθηκαν έως εδώ, πρόσφατη έρευνα των Richard και συν. περιέλαβε απομόνωση ενήλικων MSCs από τρεις ηλικιωμένους ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα. Στη συνέχεια, από τα ενήλικα αυτά βλαστοκύτταρα παράγαγαν iPSCs που έπειτα χρησιμοποίησαν για την επαγωγή iMSCs, στα οποία διαπιστώθηκε η έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών πολυδυναμίας, όπως οι Oxt4, Sox2 και Nanog. Τα επαγόμενα αυτά βλαστοκύτταρα εγχύθηκαν στις ραχιαίες πλευρικές περιοχές ζωικών μοντέλων για τη δημιουργία τερατωμάτων. Ο ιστολογικός έλεγχος των τερατωμάτων έδειξε επιτυχή in vivo διαφοροποίηση σε κυτταρικές σειρές οστού, χόνδρου και λιπώδους ιστού.⁵⁰ Όλες αυτές οι προσεγγίσεις δημιουργούν νέες προοπτικές για περαιτέρω μελέτες χρήσης επαγόμενων βλαστοκυττάρων για τη θεραπεία μέσω αναγέννησης των ιστών άρθρωσης με οστεοαρθρίτιδα.

B. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων που αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες: αναβολικούς, καταβολικούς, υπερτροφίας και φλεγμονωδών διεργασιών, σε διάφορους ιστούς οστεοαρθρικής άρθρωσης ζωικού μοντέλου οστεοαρθρίτιδας, μετά από ενδοαρθρική έγχυση μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) με στόχο την διερεύνηση πιθανής θεραπευτικής δράσης των iMSCs στην ανάπτυξη των ιστών ζωικού μοντέλου ΟΑ.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκαν τα mRNA επίπεδα των γονιδίων *COL2* (αναβολικός δείκτης), *MMP13* (καταβολικός δείκτης), *COL10* (δείκτης υπερτροφίας) και *IL-1β* (δείκτης φλεγμονωδών διεργασιών) σε δείγματα ιστών αρθρικού χόνδρου, υμένα και μηνίσκου ζώων με φυσιολογικές αρθρώσεις, αρθρώσεις με ΟΑ και αρθρώσεις με ΟΑ που έλαβαν έγχυση iMSCs. Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της απομόνωσης RNA, δημιουργίας βιβλιοθήκης cDNA και υπολογισμού των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μέσω Real Time PCR, με επακόλουθη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Γ. Μοντέλο μελέτης

Για την πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν ως ζωικά μοντέλα OA 12 κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, τα οποία είχαν ήδη δημιουργηθεί στο πλαίσιο ερευνητικού προγράμματος. Στα κουνέλια προκλήθηκε οστεοαρθρίτιδα με χειρουργική επέμβαση διατομής πρόσθιου χιαστού (ACLT). Η συγκεκριμένη διαδικασία έχει δειχθεί ότι προκαλεί OA μέσω μηχανικής αποσταθεροποίησης της άρθρωσης. 21 ημέρες μετά την επέμβαση, 3 από τα 12 κουνέλια θυσιάστηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη OA. Από τα υπόλοιπα 9 ζώα, 5 διέθεταν οστεοαρθρικά γόνατα, ενώ στα 4 είχε πραγματοποιηθεί εικονική επέμβαση και διέθεταν φυσιολογικά γόνατα (Sham). Επίσης, στο πλαίσιο του προαναφερθέντος ερευνητικού προγράμματος είχαν δημιουργηθεί μεσεγυχματικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs), με τα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση στο ζωικό μοντέλο της OA.

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν 3 ομάδες δειγμάτων. Στην ομάδα Sham συμπεριλαμβάνονταν τα ζώα τα οποία είχαν φυσιολογικά γόνατα, ενώ στην ομάδα OA συγκαταλέγονται τα ζώα τα οποία υπεβλήθησαν σε ACLT και δεν πραγματοποιήθηκε έγχυση iMSCs κυττάρων. Τέλος στην τρίτη ομάδα, συμπεριλήφθησαν τα ζώα στο δεξί γόνατο των οποίων πραγματοποιήθηκε ενδοαρθρική έγχυση 10^6 κυττάρων iMSCs διαλυμένων σε PBS μετά από την ACLT.

Οι 3 ομάδες δειγμάτων φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

Τριάντα (30) ημέρες μετά την έγχυση των iMSCs, προκλήθηκε γενική αναισθησία στα ζώα και ευθανασία μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 5ml pentobarbital σύμφωνα με διεθνείς οδηγίες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκτομή του δέρματος γύρω από την άρθρωση και οστεοτομή στο σημείο πάνω από τη μηριαία τροχλία και κάτω από τον κνημιαίο κόνδυλο για συλλογή των προς μελέτη ιστών: αρθρικό χόνδρο, υμένα και μηνίσκο.

Πίνακας 1: Ομάδες δειγμάτων

Όνομα ομάδας	Αριθμός δειγμάτων	Είδος δειγμάτων
Sham	4	Φυσιολογικά
OA	5	Αριστερά γόνατα με OA
iMSCs	5	Δεξιά γόνατα με OA και έγχυση iMSCs

Δ. Υλικά και μέθοδοι

Δ1. Καλλιέργειες κυττάρων

Τόσο η συλλογή, όσο και οι καλλιέργειες των κυττάρων έγιναν κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής Bluebeam 4 Class II biohazard cabinet. Έγινε χρήση της Megafuge φυγόκεντρου της Heraeus Instruments και του Axiovert 5100 ανάστροφου μικροσκοπίου. Οι καλλιέργειες των κυττάρων περιείχαν το θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 (Gelifesciences, SH30023.01) εμπλουτισμένο με 50ml FBS (Gibco, 10270098) σε αναλογία 10%, και με 5ml πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης σε αναλογία 1%. Οι συνθήκες του κλίβανου για την ανάπτυξη των καλλιεργειών ήταν σταθερές με θερμοκρασία 37° C, διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) 5%, καθώς και σταθερό ποσοστό υγρασίας.

Πιο λεπτομερώς, για τις καλλιέργειες των κυττάρων χόνδρου, υμένα και μηνίσκου χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

1. Ξεπλένουμε τον ιστό με PBS (Lonza, BE17-516Q) και τον τεμαχίζουμε με νυστέρι.
2. Μεταφέρουμε τον ιστό σε τριβλίο petri και προσθέτουμε διάλυμα 2ml που περιέχει 1.8ml θρεπτικού υλικού και 200μl προνάσης. Ρόλος της προνάσης είναι να διασπάσει τις πρωτεογλυκάνες ώστε να απελευθερωθούν οι ίνες κολλαγόνου. Επωάζουμε σε κλίβανο για 30 λεπτά.
3. Αφαιρούμε το προηγούμενο διάλυμα και προσθέτουμε νέο διάλυμα 2ml που περιέχει 1.8ml θρεπτικού υλικού και 200μl κολλαγενάσης. Ρόλος της κολλαγενάσης είναι να διασπάσει τις ίνες κολλαγόνου ώστε να απελευθερωθούν τα κύτταρα. Επωάζουμε σε κλίβανο για 24 ώρες.
4. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο κάθε τριβλίου σε Falcon 15ml και φυγοκεντρούμε στα 1200g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 2ml θρεπτικού υλικού και αναδεύουμε καλά ώστε να διαλυθεί το ίζημα.

6. Μεταφέρουμε το δείγμα σε φλάσκα, προσθέτουμε 5ml θρεπτικού υλικού και διατηρούμε στον κλίβανο. Όταν ο αριθμός των κυττάρων αυξηθεί επαρκώς, εκτελούμε το πρωτόκολλο διατήρησης του υλικού για την απομόνωση του RNA, ή για μετέπειτα πάγωμα των κυττάρων.

Δ2. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα, οι καλλιέργειες αρχικά επεξεργάστηκαν με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, προσθέτουμε 10ml PBS, ξεπλένουμε όλη την επιφάνεια της φλάσκας κι έπειτα το αφαιρούμε.
2. Προσθέτουμε 2ml θρυψίνης (Gibco, 253000054). Ρόλος της θρυψίνης είναι να διασπάσει τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησης ώστε να μπορέσουμε να τα συλλέξουμε. Επωάζουμε σε κρίβανο για 5 με 10 λεπτά. Ελέγχουμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο για να επιβεβαιώσουμε ότι ξεκόλλησαν και προσθέτουμε 10ml θρεπτικού υλικού για να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης.
3. Μεταφέρουμε 4ml δείγματος σε Falcon 15ml και φυγοκεντρούμε στα 1500g για 6 λεπτά.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 5ml PBS και φυγοκεντρούμε στα 1500g για 6 λεπτά.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε σε διηθητικό χαρτί.
6. Προσθέτουμε 1ml ισοθειοκυανική γουανιδίνη (Trisol). Ρόλος της είναι η λύση των κυττάρων και η μετουσίωση των πρωτεϊνών ώστε να επιτευχθεί η διατήρηση του RNA για απομόνωση. Αναδεύουμε και μεταφέρουμε σε Eppendorf. Αναδεύουμε έντονα με vortex.

Για διατήρηση αποθηκεύουμε στους -80°C . Εναλλακτικά, για το πάγωμα των κυττάρων για μελλοντική χρήση, ετοιμάζουμε μείγμα παγώματος που περιέχει 60% θρεπτικό υλικό, 30% FBS και 10% DMSO. Προσθέτουμε 1ml μείγματος σε Falcon, αναδεύουμε ήπια και μεταφέρουμε σε ειδικό σωληνάριο παγώματος. Αποθηκεύουμε στους -150°C .

Για να πραγματοποιηθεί η απομόνωση είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των κυτταρικών συστατικών ώστε να συλλέξουμε μόνο το RNA. Η λύση των κυττάρων και η απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών έχει επιτευχθεί με τη χρήση του Trisol. Ο διαχωρισμός

επιτυγχάνεται με τη χρήση χλωροφορμίου. Για τις ψυχρές φυγοκεντρίσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η Haraeus Biofuge Fresco ψυχόμενη φυγόκεντρος της Thermo Scientific, για το υδατόλουτρο το Waterbath WNB της Memmert και για την επώαση σε κλίβανο ο Haraeus Oven της Thermo Scientific. Για την κατακρήμνιση και τον καθαρισμό του RNA χρησιμοποιήθηκαν ισοπροπανόλη και αιθανόλη 70% αντίστοιχα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο (για κάθε 1ml Trisol) και ανακινούμε έντονα με vortex. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Φυγοκεντρούμε στα 12000g σε θερμοκρασία 4° C για 15 λεπτά. Στο σημείο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών. Το RNA περιέχεται στην υπερκείμενη φάση, την οποία μεταφέρουμε σε νέο Eppendorf.
4. Προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλης (για κάθε 1ml Trisol) και ανακινούμε ήπια. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε πάγο.
5. Φυγοκεντρούμε στα 12000g σε θερμοκρασία 4° C για 10 λεπτά. Στο σημείο αυτό το RNA βρίσκεται κατακρημνισμένο ως ίζημα.
6. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε στο ίζημα 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε στα 7500g σε θερμοκρασία 4° C για 8 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, στεγνώνουμε το στόμιο του Eppendorf με καθαρό διηθητικό χαρτί και επωάζουμε με ανοιχτό καπάκι στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37° C για μία ώρα ώστε να εξατμιστεί όλη η ποσότητα του υγρού.
8. Προσθέτουμε 30μl ddH₂O και αναδεύουμε ήπια με την πιπέτα ώστε να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
9. Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55 - 60° C για 10 λεπτά κι έπειτα αναδεύουμε ξανά με πιπέτα. Αποθηκεύουμε στους -80° C.

Πριν το επόμενο βήμα παραγωγής βιβλιοθήκης cDNA, οφείλει να επιτευχθεί έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας του RNA που απομονώθηκε. Για τον ποιοτικό έλεγχο

πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση κάθε δείγματος σε πηκτή αγαρόζης 2%, όπου εμφανίστηκαν 3 μπάντες που αντιστοιχούν στα 28S, 18S και 5S RNA. Η μπάντα του mRNA, που είναι και αυτό που μας ενδιαφέρει, δεν είναι ορατή, καθώς είναι πολύ λιγότερο ποσοτικά σε σχέση με το rRNA. Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε ότι το RNA είχε καθαριστεί επιτυχώς. Για τον ποσοτικό έλεγχο, πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:100 του κάθε δείγματος και φωτομέτρηση στα 260nm και 280nm. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 και η συγκέντρωση του RNA με βάση τον τύπο: Συγκέντρωση = αραίωση x OD₂₆₀ x 40 (mgr/ml).

Δ3. Παραγωγή cDNA

Η παραγωγή βιβλιοθήκης cDNA από το απομονωμένο RNA πραγματοποιείται με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Η μέθοδος αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970 από τον Howard Temin ως ο τρόπος που οι ρετροϊοί μεταφέρουν τη γενετική τους πληροφορία από RNA σε DNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Έκτοτε έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο ως μία ευαίσθητη τεχνική παραγωγής DNA με βάση το RNA, η προσφορά της οποίας στις μελέτες έκφρασης γονιδίων είναι अपαράμιλλης αξίας. Οι αντίστροφες μεταγραφάσες που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα στα εργαστήρια είναι η M-MLV που προέρχεται από τον ιό λευχαιμίας των τρωκτικών (Moloney Murine Leukemia Virus), και η AMV που προέρχεται από τον ιό μυελοβλάστωσης των πτηνών (Avian Myeloblastosis Virus). Για την επίτευξη αντίστροφης μεταγραφής του απομονωμένου RNA επιλέγονται τυχαίοι εκκινητές (primers) που συνδέονται σε διάφορες θέσεις κατά μήκος της αλληλουχίας, καθώς και ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές θυμίνης που συνδέονται στην poly-A ουρά του mRNA. Με προσθήκη νουκλεοτιδίων (dNTPs) και σε ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, η αντίστροφη μεταγραφάση θα επεκτείνει τους εκκινητές παράγοντας ένα DNA κλώνο συμπληρωματικό ως προς το εκμαγείο RNA. Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε ειδικό μηχάνημα που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής. Το τελικό προϊόν αποτελεί μια βιβλιοθήκη cDNA, που αντιστοιχεί στο μεταγράψωμα του κυττάρου.⁵¹

Για την παραγωγή της cDNA βιβλιοθήκης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, 28025-013), που

περιέχει διάλυμα 5X First-Strand Buffer, διάλυμα DTT και αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV RT (200U/μl). Επίσης χρησιμοποιήθηκε μείγμα τυχαίων εκκινητών Random Primer N6 (GeneON, S300). Το μηχάνημα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαδικασία είναι το Veriti 96-Well Thermal Cycler της εταιρίας Applied Biosystems.

Το παρακάτω είναι το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την παραγωγή cDNA:

1. Προετοιμάζουμε το μείγμα της αντίδρασης σύνδεσης των εκκινητών ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Για κάθε δείγμα προσθέτουμε 1μl μείγματος τυχαίων εκκινητών, 1μl μείγματος dNTPs και 11μl ddH₂O.
2. Ανακινούμε ήπια και μοιράζουμε από 13μl σε νέα Eppendorf ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
3. Προσθέτουμε σε κάθε αντιδραστήριο 2μl του αντίστοιχου δείγματος και τα τοποθετούμε στον θερμικό κυκλοποιητή.

Το πρόγραμμα υβριδισμού των εκκινητών έχει ως εξής:

- Θερμοκρασία 65° C για 5 λεπτά.
- Μείωση θερμοκρασίας στους 4° C.

4. Προετοιμάζουμε το μείγμα της αντίδρασης επιμήκυνσης των εκκινητών. Για κάθε δείγμα προσθέτουμε 5μl διαλύματος 5X First-Strand Buffer, 2μl διαλύματος DTT και 0,5μl αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT (200U/μl).
5. Ανακινούμε ήπια και μοιράζουμε από 7μl σε κάθε Eppendorf. Επανατοποθετούμε στον θερμικό κυκλοποιητή.

Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από την βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το πρόγραμμα επιμήκυνσης των εκκινητών έχει ως εξής:

- Θερμοκρασία 37° C για 2 λεπτά.
- Θερμοκρασία 25° C για 10 λεπτά.
- Θερμοκρασία 37° C για 50 λεπτά.
- Θερμοκρασία 70° C για 15 λεπτά.
- Μείωση θερμοκρασίας στους 4° C.

Ο έλεγχος ποιότητας για την επιβεβαίωση επιτυχούς παραγωγής της βιβλιοθήκης cDNA πραγματοποιείται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Πρόκειται για τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, μέσω συνεχούς αποδιάταξης της δίκλωνης αλυσίδας και παραγωγής νέων συμπληρωματικών κλώνων με επαναλαμβανόμενους κύκλους αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται εκκινητές (αριστερός/forward και δεξιός/reverse) που υβριδίζονται ειδικά στο τμήμα που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Στην περίπτωση ποιοτικού ελέγχου μιας βιβλιοθήκης το τμήμα που ενισχύεται είναι ένα «housekeeping» γονίδιο. Πρόκειται για ένα γονίδιο αναφοράς που εκφράζεται συνεχώς, είναι δηλαδή πάντα μέρος του μεταγραφώματος όλων των κυττάρων που μελετούνται. Εκτός από το εκμαγείο cDNA και του εκκινητές, στην αντίδραση προστίθενται νουκλεοτίδια και η κατάλληλη DNA πολυμεράση. Η δημοφιλέστερη πολυμεράση για την τεχνική αυτή είναι η Taq DNA πολυμεράση που προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση είναι θερμοανθεκτική κι έτσι αποτελεί ιδανική επιλογή για την συγκεκριμένη τεχνική, καθώς διατηρείται λειτουργική στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη της δίκλωνης DNA αλυσίδας.

Για τον ποιοτικό έλεγχο της cDNA βιβλιοθήκης μας επιλέχθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο GAPDH που αποτελεί housekeeping γονίδιο των κυττάρων της άρθρωσης. Το μείγμα αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε είναι το DreamTaq Green PCR Mix (Thermo Scientific, K1081) που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση: DreamTaq DNA πολυμεράση, DreamTaq Green Buffer, διάλυμα MgCl₂, μείγμα dNTPs, καθώς και την απαραίτητη χρωστική για τον μετέπειτα έλεγχο της επιτυχούς ενίσχυσης μέσω ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη. Το μηχάνημα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαδικασία είναι το Veriti 96-Well Thermal Cycler της εταιρίας Applied Biosystems. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο GAPDH είναι οι εξής:

GAPDH Forward Primer: 5' TCACCATCTTCCAGGAGCGA 3'

GAPDH Reverse Primer: 5' CACAATGCCGAAGTGGTCGT 3'

Το παρακάτω είναι το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του GAPDH:

1. Προετοιμάζουμε το μείγμα αντίδρασης ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Για κάθε δείγμα προσθέτουμε 12,5μl DreamTaq Green PCR Mix, 1μl του forward εκκινιτή, 1μl του reverse εκκινιτή και 7,5μl ddH₂O.
 2. Ανακινούμε ήπια και μοιράζουμε από 22μl σε νέα Eppendorf ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
 3. Προσθέτουμε σε κάθε αντιδραστήριο 3μl του αντίστοιχου δείγματος και τα τοποθετούμε στον θερμικό κυκλοποιητή.
- Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς περιγράφεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για ενίσχυση του γονιδίου GAPDH.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Επαναλήψεις
Αποδιάταξη	95° C	1 '	1
Αποδιάταξη	95° C	15 "	
Υβριδισμός	60° C	15 "	35
Επιμήκυνση	72° C	30 "	
Τελική επιμήκυνση	72° C	7 '	1
Διατήρηση	4° C	-	1

Όπως προαναφέρθηκε, το προϊόν της ενίσχυσης ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, όπου εμφανίζεται μία μπάντα που αντιστοιχεί στο ενισχυμένο γονίδιο. Αυτό ελέγχεται με χρήση ladder ώστε να διαπιστωθεί ότι πρόκειται όντως για το γονίδιο GAPDH: η μπάντα βρίσκεται σε ύψος που αντιστοιχεί στο γνωστό μοριακό βάρος του γονιδίου.

Δ4. Real time PCR

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την έκφραση των δεικτών χρησιμοποιούμε την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με τρόπο ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η αξιοπιστία της μεθόδου επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό της μεταβολής της έκφρασης ενός γονιδίου χρησιμοποιώντας σε κάθε έλεγχο ως

σημείο αναφοράς την έκφραση του housekeeping γονιδίου, η οποία είναι σταθερή σε όλα τα προς μελέτη κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου ελέγχονται μέσω ανίχνευσης της ποσότητας των DNA αντιγράφων της βιβλιοθήκης, που με τη σειρά τους αντιστοιχούν στην ποσότητα των mRNA αντιγράφων του κυττάρου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ένα ειδικό μόριο ανιχνευτής που συνδέεται στη διπλή έλικα DNA. Καθώς οι κύκλοι της Real Time PCR προχωρούν, συνδέονται περισσότεροι ανιχνευτές ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων. Αρχικά το σήμα είναι μη ανιχνεύσιμο, στη συνέχεια παρατηρείται εκθετική αύξηση και τέλος, μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων, φτάνει σε ένα πλατώ, εξαρτώμενο για κάθε γονίδιο από τις συνθήκες έκφρασης του συγκεκριμένου ιστού. Στο τέλος της διαδικασίας έχει παραχθεί μία καμπύλη σήματος η οποία είναι αντιπροσωπευτική της ποσότητας του DNA. Μεγάλης σημασίας είναι το σημείο Ct (Cycle threshold, κύκλος κατώφλι) της καμπύλης, το οποίο αντιστοιχεί στον κύκλο στον οποίο ο αριθμός των αντιγράφων είναι τέτοιος ώστε το σήμα να γίνεται ανιχνεύσιμο. Η τιμή Ct εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του εκάστοτε δείγματος και είναι αυτή που χρησιμοποιείται για τον συγκριτικό υπολογισμό της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται με βάση την έκφραση του housekeeping γονιδίου κάθε δείγματος κυττάρων.⁵²

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε ο φθορίζων ανιχνευτής SYBR Green, που περιέχεται στο SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, 4472908). Το μηχανήμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου στο οποίο έλαβε χώρα η διαδικασία είναι το 7300 Real Time PCR System της εταιρίας Applied Biosystems. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το γονίδιο GAPDH που αποτελεί housekeeping γονίδιο των κυττάρων της άρθρωσης. Οι εκκινήτες για κάθε γονίδιο αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Real Time PCR Primers

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	TCACCATCTTCCAGGAGCGA	CACAATGCCGAAGTGGTCGT
Collagen II (COL2)	GCACCCATGGACATTGGAGGG	ATGTTTTAAAAAATACAGAG
Collagen X (COL10)	ACCTTCTGCACTGCTCACCT	ACCGCTCAGCGTAGAACACT
IL-1β	TGGTGTTGTCTGGCACGTAT	TCTTTCATCACGCAGGACAG
MMP13	GGGGAAGCAGTTTACCATCA	AATTTCCCCCAAATGGAAAG

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την τεχνική της Real Time PCR είναι το εξής:

1. Προετοιμάζουμε τα μείγματα της αντίδρασης ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, έχοντας ένα διαφορετικό μείγμα (με διαφορετικό σετ εκκινητών) για κάθε γονίδιο. Για κάθε δείγμα προσθέτουμε 5μl SYBR Select Master Mix, 0,3μl του forward εκκινητή, 0,3μl του reverse εκκινητή και 2,4μl ddH₂O.
2. Ανακινούμε ήπια και μοιράζουμε από 8μl σε κάθε πηγαδάκι του ειδικού πιάτου Real Time PCR 96 θέσεων.
3. Προσθέτουμε 2μl από το κατάλληλο δείγμα cDNA σε κάθε πηγαδάκι και αναδεύουμε προσεκτικά με την πιπέτα.
4. Τοποθετούμε το πιάτο στο μηχάνημα Real Time PCR.

Το πρόγραμμα Real Time PCR που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για έλεγχο μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *GAPDH*, *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β*.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Επαναλήψεις
	50° C	2 '	1
Αποδιάταξη	95° C	2 '	1
Αποδιάταξη	95° C	15 "	
Υβριδισμός	60° C	15 "	45
Επιμήκυνση	72° C	30 "	
Τελική επιμήκυνση	72° C	7 '	1
Διατήρηση	4° C	-	1

Δ5. Στατιστική εκτίμηση

Για τη στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα «Graph Pad Prism v8» στο οποίο πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των τιμών $2^{-\Delta\Delta CT}$ των προς μελέτη γονιδίων και η παρασκευή διαγραμμάτων. Η στατιστική ανάλυση για τη διερεύνηση της διαφοροποιημένης έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ των τριών ομάδων μελέτης πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA και μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis, ακολουθούμενες από μετα-ανάλυση με τα τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Tukey's post-hoc test και Dunn's post-hoc test, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα (mean \pm standard error of the mean, SEM). Για τη στατιστική σημαντικότητα ελήφθη υπόψη η τιμή P-value < 0,05.

Ε. Αποτελέσματα

Για τη μελέτη της θεραπευτικής δυνατότητας της έγχυσης επαγόμενων βλαστοκυττάρων σε ζωικό μοντέλο ΟΑ, μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β* στους κυτταρικούς τύπους της άρθρωσης, χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα του μηνίσκου. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα σε τρεις ομάδες δειγμάτων: φυσιολογικά ζώα (Sham), οστεοαρθρικά ζώα (OA), και οστεοαρθρικά ζώα που έλαβαν θεραπεία με έγχυση επαγόμενων βλαστοκυττάρων (iMSCs). Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε τόσο με βάση τις μακροσκοπικές εικόνες των αρθρώσεων των ζωικών μοντέλων (Εικόνες 13 και 14), όσο και με βάση τα mRNA επίπεδα των υπό μελέτη γονιδίων.



Εικόνα 13: Μακροσκοπική φωτογραφία άρθρωσης αριστερού γόνατος ζώου με ΟΑ.



Εικόνα 14: Μακροσκοπική φωτογραφία άρθρωσης δεξιού γόνατος ζώου με ΟΑ μετά από έγχυση iMSCs.

Παρατηρήθηκαν ορατά σημάδια φθοράς των ιστών και απώλειας του χόνδρου στις αρθρώσεις ζώων με ΟΑ που δεν έλαβαν έγχυση iMSCs. Στις αρθρώσεις ζώων με ΟΑ που έλαβαν έγχυση iMSCs είναι διακριτές οι υγιείς δομές του αρθρικού χόνδρου και του υμένα.

E1. Έκφραση δεικτών

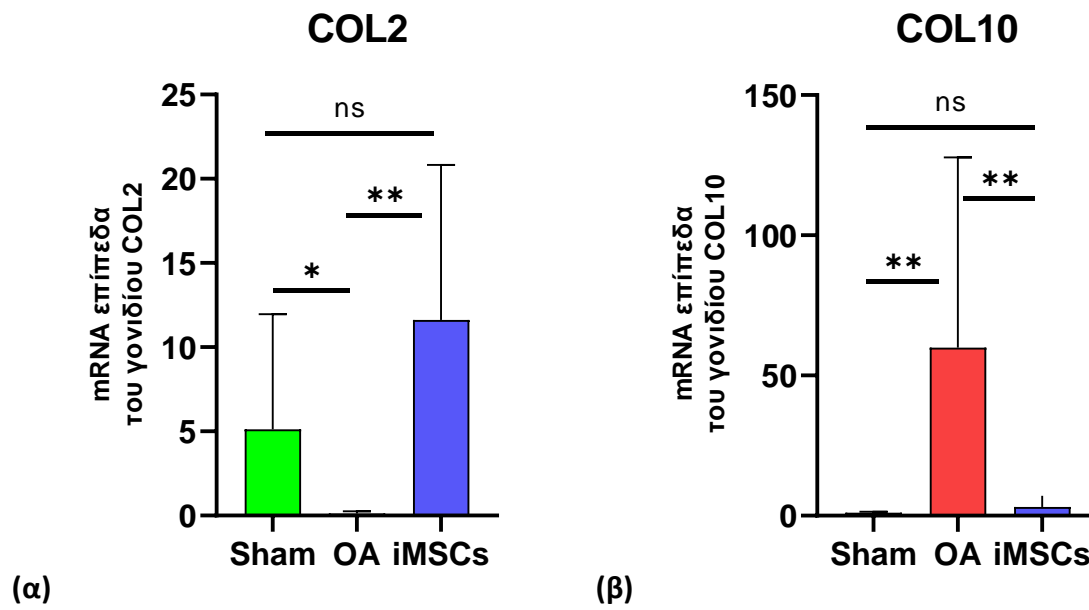
Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η ικανότητα των iMSCs στην ανάπλαση τόσο του αρθρικού χόνδρου, όσο και των λοιπών ιστών της άρθρωσης, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων χαρακτηριστικών της OA, σε χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα του μηνίσκου και των τριών ομάδων μελέτης [φυσιολογικά ζώα (Sham), οστεοαρθρικά ζώα (OA), και σε οστεοαρθρικά ζώα που έλαβαν θεραπεία με έγχυση επαγόμενων βλαστοκυττάρων (iMSCs)]

α. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε χονδροκύτταρα

Αρχικά, διερευνήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου COL2 και παρατηρήθηκαν διαφοροποιημένα mRNA επίπεδα μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα mRNA επίπεδα του γονιδίου COL2 σε χονδροκύτταρα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0016**) (Εικόνα 15α). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν και η μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του COL2 σε χονδροκύτταρα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0166**). Αντιθέτως, τα mRNA επίπεδα του γονιδίου COL2 δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χονδροκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Επιπλέον, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν αναφορικά και με τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου COL10. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα mRNA επίπεδα του γονιδίου COL10 σε χονδροκύτταρα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0054**) (Εικόνα 15β). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του COL10 σε χονδροκύτταρα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0078**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μεταξύ των χονδροκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Χονδροκύτταρα



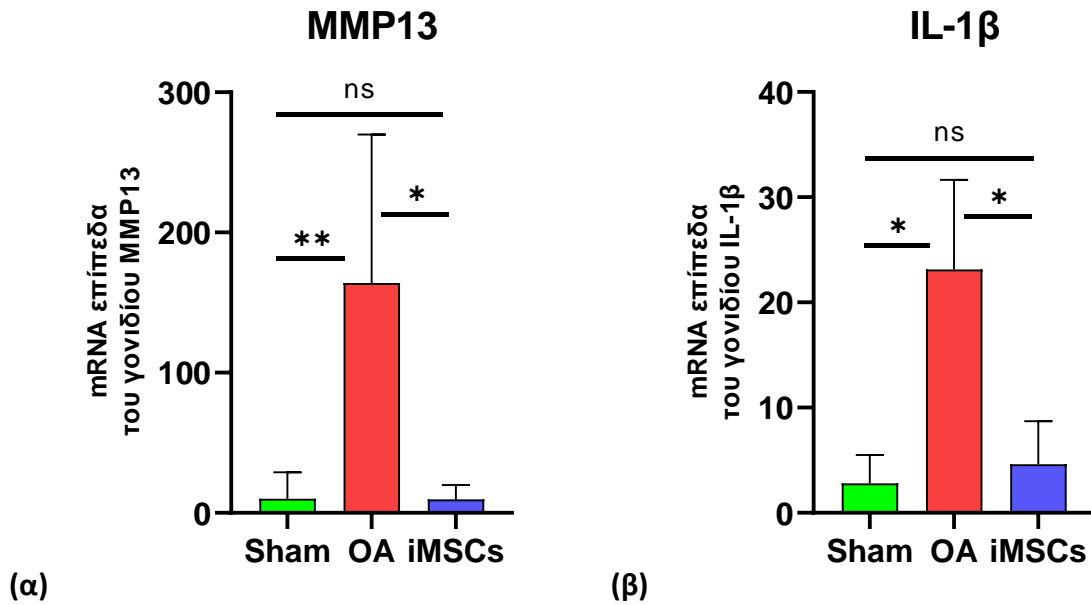
Εικόνα 15: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2* (α) και *COL10* (β) σε χονδροκύτταρα. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

β. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MMP13 και IL-1β σε χονδροκύτταρα

Εν συνεχεία, προκειμένου να διαλευκάνουμε περαιτέρω το ρόλο των iMSCs στην αναδόμηση του αρθρικού χόνδρου, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της *MMP13* και της *IL-1β*, οι οποίες αποτελούν μόρια-δείκτες της OA. Αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης της *MMP13*, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα mRNA επίπεδα του γονιδίου *MMP13* σε χονδροκύτταρα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0233**) (Εικόνα 16α). Επίσης στατιστικά σημαντικά αυξημένα ήταν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *MMP13*, σε χονδροκύτταρα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0033**), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των χονδροκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Επιπλέον, μείωση παρατηρήθηκε και στα mRNA επίπεδα του γονιδίου *IL-1β* σε χονδροκύτταρα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.031**) (Εικόνα 16β). Επίσης τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο της Real-time PCR έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *IL-1β* σε χονδροκύτταρα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0108**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χονδροκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Χονδροκύτταρα



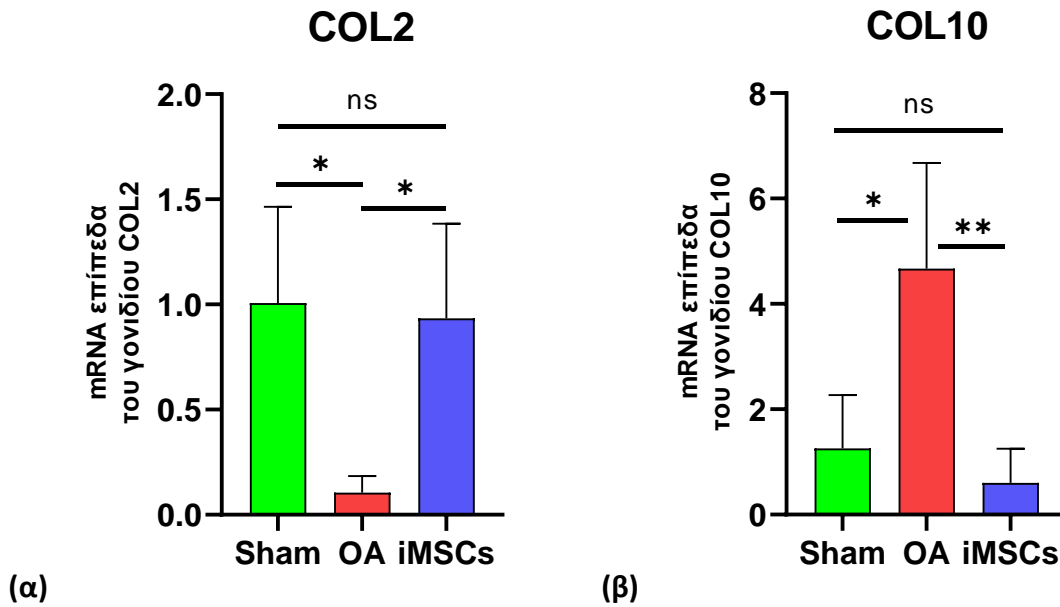
Εικόνα 16: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* (α) και *IL-1β* (β) σε χονδροκύτταρα. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

γ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε κύτταρα υμένα

Ο πιθανά θεραπευτικός ρόλος των iMSCs μελετήθηκε και σε κύτταρα του υμένα. Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την τεχνική της Real-time PCR, υπέδειξαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα mRNA επίπεδα του γονιδίου *COL2* σε κύτταρα υμένα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0125**) (**Εικόνα 17α**). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν η μείωση μεταγραφικής έκφρασης του *COL2* σε κύτταρα υμένα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0108**), ενώ διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των υμενοκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα mRNA επίπεδα του γονιδίου *COL10* σε κύτταρα υμένα με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0052**) (**Εικόνα 17β**). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *COL10* σε υμενοκύτταρα με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0388**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *COL10* ανάμεσα σε υμενοκύτταρα φυσιολογικών γονάτων και γονάτων μετά από έγχυση των iMSCs (P-value > 0.05).

Κύτταρα Υμένα



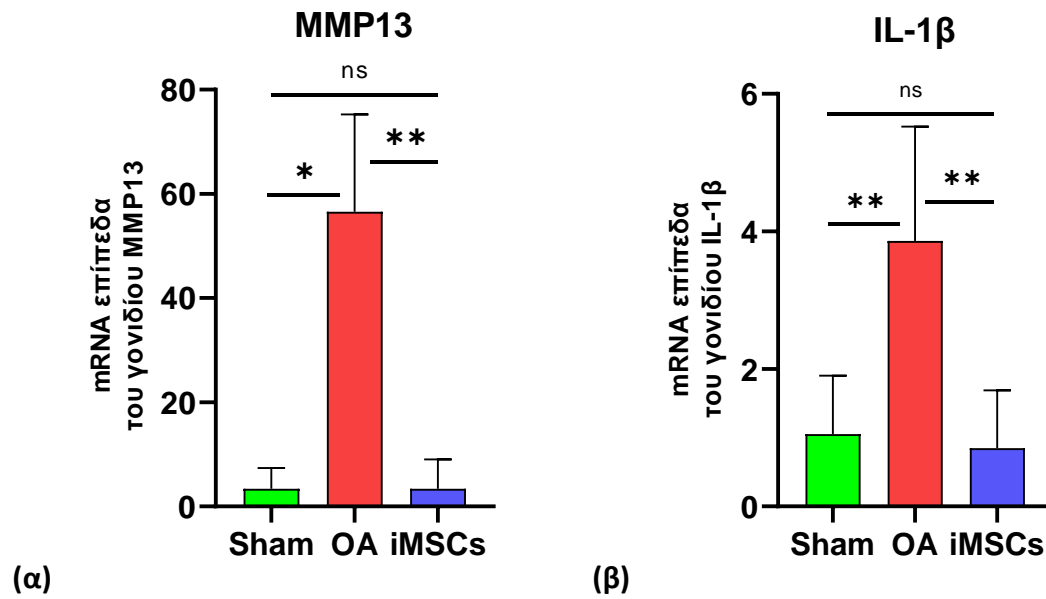
Εικόνα 17: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2* (α) και *COL10* (β) σε κύτταρα του υμένα. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

δ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MMP13 και IL-1β σε κύτταρα υμένα

Ομοίως με τα χονδροκύτταρα, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* και *IL-1β* μελετήθηκαν και σε κύτταρα του υμένα. Η ανάλυση έδειξε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της *MMP13* είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένα *MMP13* σε κύτταρα υμένα με ΟΑ μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0065**) (Εικόνα 18α). Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου της *MMP13* σε υμενοκύτταρα με ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0162**). Αντιθέτως, τα mRNA επίπεδα του γονιδίου *MMP13* δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υμενοκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικά γόνατα και γόνατα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Επιπλέον, διαφορές παρατηρήθηκαν και αναφορικά με τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης 1β. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα mRNA επίπεδα του γονιδίου *IL-1β* σε κύτταρα υμένα με ΟΑ μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0023**) (Εικόνα 18β), ενώ αυξημένα βρέθηκαν τα επίπεδα αυτής σε υμενοκύτταρα με ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0053**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε υμενοκύτταρα φυσιολογικά και υμενοκύτταρα κατόπιν της εγχύσεως με iMSCs (P-value > 0.05).

Κύτταρα Υμένα



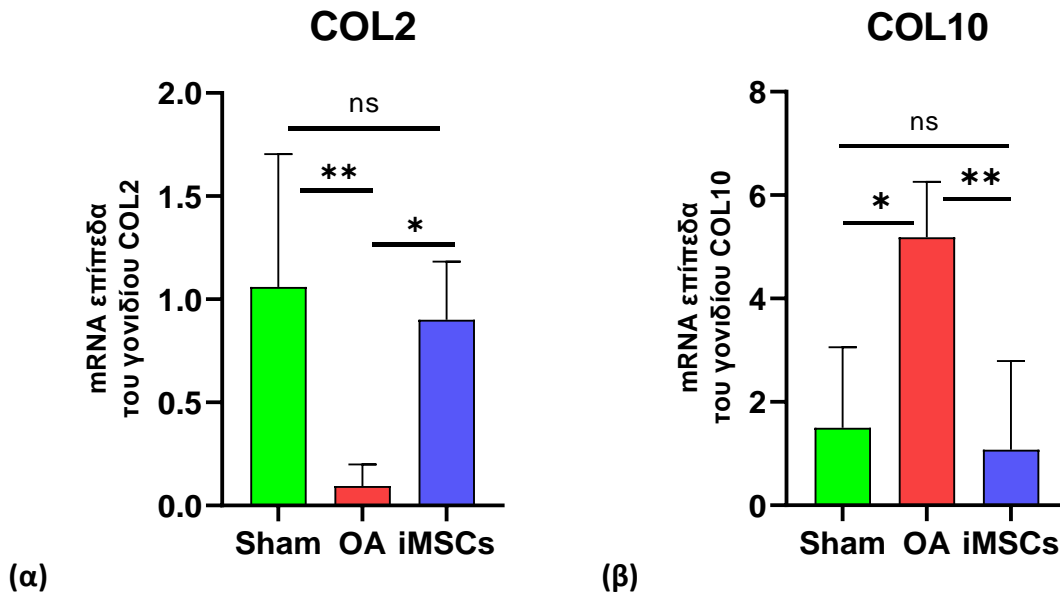
Εικόνα 18: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* (α) και *IL-1β* (β) σε κύτταρα του υμένα. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

ε. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL2 και COL10 σε κύτταρα μηνίσκου

Στο τελικό στάδιο της μελέτης, και προκειμένου να μελετήσουμε πλήρως το ρόλο των iMSCs στην ανάπτυξη όλων των ιστών της άρθρωσης, τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων διερευνήθηκαν και στα κύτταρα του μηνίσκου. Συγκεκριμένα, το γονίδιο COL2 παρουσίαζε σημαντικά αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα μηνίσκου με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0103**) (Εικόνα 19α). Επίσης σημαντικά μειωμένη βρέθηκε η έκφρασή του σε κύτταρα μηνίσκου με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0061**), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφοροποιημένη έκφραση των επιπέδων mRNA του COL2 κύτταρα του μηνίσκου που προήλθαν από φυσιολογικά γόνατα συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από τα γόνατα στα οποία έγινε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου COL10 σε κύτταρα μηνίσκου με OA μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0087**) (Εικόνα 19β), ενώ αντιθέτως σημαντικά αυξημένη βρέθηκε η έκφρασή του σε κύτταρα μηνίσκου με OA σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0278**). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές αναφορικά με τα επίπεδα mRNA του COL10 σε κύτταρα του μηνίσκου που προήλθαν από φυσιολογικά γόνατα συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από τα γόνατα στα οποία έγινε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Κύτταρα Μηνίσκου



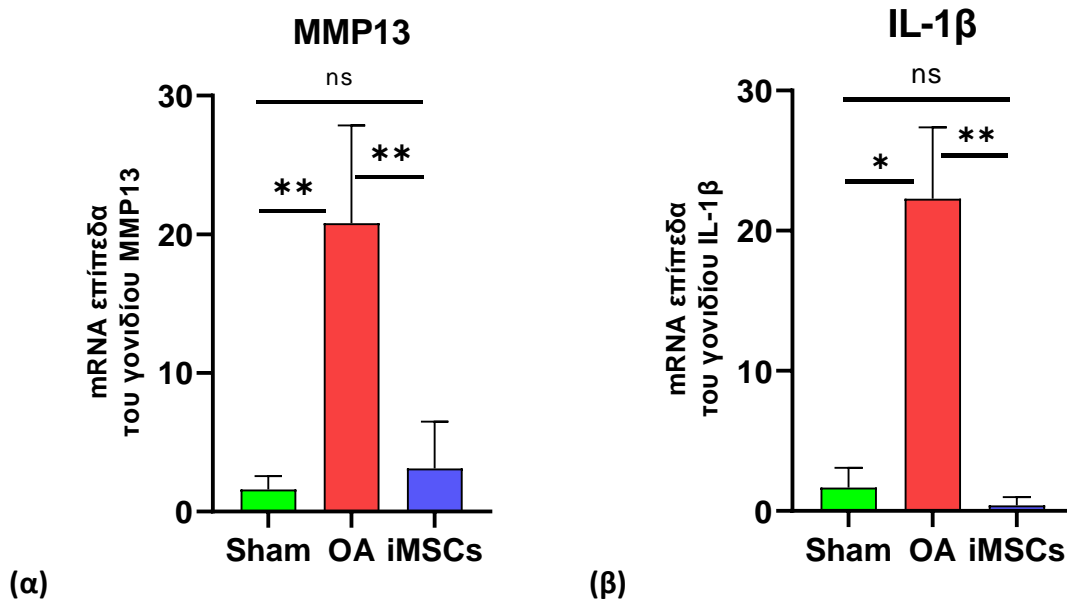
Εικόνα 19: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2* (α) και *COL10* (β) σε κύτταρα του μηνίσκου. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

ζ. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* και *IL-1β* σε κύτταρα μηνίσκου

Στην συνέχεια της μελέτης, διερευνήθηκε περαιτέρω η επίδραση των iMSCs στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* και *IL-1β* στις υπό μελέτη ομάδες δειγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στη μεταγραφική έκφραση της *MMP13* σε κύτταρα μηνίσκου με ΟΑ μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0081**) (Εικόνα 20α). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν η αύξηση μεταγραφικής έκφρασης του *MMP13* σε κύτταρα μηνίσκου με ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0077**). Τα επίπεδα mRNA της *MMP13* δεν διέφεραν μεταξύ των κυττάρων του μηνίσκου που προήλθαν από φυσιολογικά γόνατα συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από τα γόνατα στα οποία έγινε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Τέλος, ομοίως μείωση παρουσίαζαν και τα mRNA επίπεδα του γονιδίου *IL-1β* σε κύτταρα μηνίσκου με ΟΑ μετά από την έγχυση iMSCs συγκριτικά με αυτά στα οποία δεν έγινε έγχυση (P-value = **0.0021**) (Εικόνα 20β), ενώ αύξηση παρατηρήθηκε σε κύτταρα μηνίσκου με ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά (P-value = **0.0371**). Τα επίπεδα mRNA της *IL-1β* δεν διέφεραν μεταξύ των κυττάρων του μηνίσκου που προήλθαν από φυσιολογικά γόνατα συγκριτικά με αυτά που απομονώθηκαν από τα γόνατα στα οποία έγινε έγχυση με iMSCs (P-value > 0.05).

Κύτταρα Μηνίσκου



Εικόνα 20: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *MMP13* (α) και *IL-1β* (β) σε κύτταρα του μηνίσκου. Για τη στατιστική σημαντικότητα ισχύει * : $P \leq 0.05$ | ** : $P \leq 0.01$ | ns: $P > 0.05$.

ΣΤ. Συζήτηση

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο κοινή μορφή εκφυλιστικής νόσου των αρθρώσεων και αποτελεί σοβαρό κοινωνικό-οικονομικό πρόβλημα παγκοσμίως. Πρόκειται για μία πάθηση ολόκληρης της άρθρωσης, δεδομένου ότι αλλοιώσεις παρατηρούνται σε όλους τους ιστούς αυτής. Κύρια χαρακτηριστικά της ΟΑ είναι ο εκφυλισμός όλων των ιστών της άρθρωσης, η σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, καθώς και η οστεοποίηση του χόνδρου. Επιπλέον στα παθογενετικά χαρακτηριστικά της νόσου συγκαταλέγονται διαταραχές στην ισορροπία των απαραίτητων συστατικών των ιστών και της εξωκυττάριας ουσίας οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα να παρατηρείται απώλεια της φυσιολογικής σύστασης της άρθρωσης. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την αδυναμία των κυττάρων να επιτελέσουν επαρκή επιδιόρθωση του κατεστραμμένου χόνδρου, οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της άρθρωσης.⁵³

Οι μέχρι στιγμής θεραπευτικές προσεγγίσεις επικεντρώνονται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της οστεοαρθρίτιδας, ενώ η χειρουργική επέμβαση είναι μονόδρομος για την προχωρημένη μορφή της νόσου. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται όλο και περισσότερες προσπάθειες αντιμετώπισης της πάθησης μέσω νέων τεχνικών αναγέννησης των εκφυλισμένων ιστών. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση ζωικών μοντέλων της ΟΑ διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο, καθώς αποτέλεσε το μοντέλο στο οποίο ενδοαρθρικές εγχύσεις είτε με κυτταρικούς τύπους είτε με μακρομόρια έχουν δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σχετικά με την επιδιόρθωση της άρθρωσης, όπως αυτό προκύπτει από τα μέχρι σήμερα πειραματικά δεδομένα. Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, έχουν προταθεί διάφοροι κυτταρικοί τύποι οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικό μέσο για την αποκατάσταση της άρθρωσης. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα, η μεταφορά των οποίων σε εκφυλισμένο αρθρικό χόνδρο έχει δοκιμαστεί αρκετά τις τελευταίες δεκαετίες τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε ασθενείς και έχει δώσει θετικά αποτελέσματα, με τα υγιή χονδροκύτταρα να μπορούν να λειτουργούν ως αντιαρθρικός παράγοντας και να επιτρέπουν την εξομάλυνση της σύστασης του ιστού μέσω

σύνθεσης παραγόντων που ενέχονται στη χονδρογένεση, όπως το κολλαγόνο τύπου II.^{54,55} Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τα οποία στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν in-vivo, ώστε να επιτευχθεί πλήρης κάλυψη των αναγκών των εκφυλισμένων ιστών.^{40,43} Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν από ιστούς (ενήλικα MSCs) ή να προέλθουν από ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (επαγόμενα MSCs).

Ο λιπώδης ιστός, ο υμένας και ο μυελός αποτελούν ιστούς από τους οποίους είναι συνήθης η απομόνωση βλαστοκυττάρων για έγχυση σε άρθρωση. Ο λιπώδης ιστός φαίνεται να είναι η πιο ανώδυνη επιλογή για απομόνωση βλαστοκυττάρων από δότη. Έγχυση βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού έχει αποδειχθεί να μειώνει τα επίπεδα εκφυλισμού του χόνδρου ζωικού μοντέλου OA χωρίς να δημιουργεί ανεπιθύμητα αποτελέσματα.⁵⁶ Επιπλέον, καινοτόμες ιδέες όπως η έγχυση βλαστοκυττάρων λιπώδους ιστού αποθηκευμένων σε κάψουλες άλατος⁵⁷ ή η έγχυση ολόκληρων θραυσμάτων λιπώδους ιστού⁵⁸ ενισχύουν τα επίπεδα αποτελεσματικότητας και ασφάλειας. Θετικά αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και μέσω ενδοαρθρικής έγχυσης σε ζωικά μοντέλα OA βλαστοκυττάρων προερχόμενων από ιστό υμένα, μυελού και ομφάλιου λώρου, εξασφαλίζοντας σε κάθε περίπτωση ταυτόχρονη ασφαλή ανοσοκατασταλτική δράση. Η αποτελεσματικότητα αυτή επιτυγχάνεται μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στη χονδρογένεση όπως τα γονίδια KDM6A, SOX9, COL2A1 και ACAN, καθώς και της αύξησης παραγωγής αντιφλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TGF-β1 και η IL-10, και μείωσης παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF-α και IL-β.⁵⁹⁻⁶⁴

Παρά το γεγονός ότι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα για την κυτταρική θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας, η χρήση τους παρουσιάζει μειωμένη επιτυχία καθώς τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού. Από την άλλη, η χρήση των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) και των προερχόμενων από αυτά μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (iMSCs) για τη θεραπεία της OA φαίνεται να έχει αναδυόμενο ενδιαφέρον και αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες τεχνικές. Τα iPSCs δημιουργούνται μέσω in-vitro επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων ώστε να εκφράσουν τους παράγοντες Yamanaka. Πρόκειται για τους τέσσερις παράγοντες ολοδυναμίας Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4

που συναντώνται στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, η έκφραση των οποίων στα iPSCs τους δίνουν ολοδύναμο χαρακτήρα όμοιο των εμβρυονικών.⁶⁵ Έγχυση iPSCs σε μοντέλο ποντικού με οστεοχονδρική κάκωση έχει δείχθει να επιφέρει επιδιόρθωση του χονδρικού ιστού μέσω αύξησης της έκφρασης δεικτών όπως οι Sox-9, COL2A1 και αγγρεκάνη και in-vivo χονδρογένεσης.⁶⁶ Τα iPSCs έχουν χρησιμοποιηθεί και για έγχυση σε γόνατο μοντέλου μικρού χοίρου CLAWN με οστεοχονδρική κάκωση όπου το in-vivo περιβάλλον ενεργοποίησε την αύξηση της έκφρασης των SOX9 και COL2 από τα iPSCs και την διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα.⁶⁷ Επιπλέον, έχει περιγραφεί η αυξημένη ικανότητα επιβίωσης των iMSCs μετά από έγχυση σε μοντέλο ποντικού με ισχαιμία των πίσω άκρων, σε σχέση με ενήλικα MSCs προερχόμενα από μυελό, καθώς και η ικανότητά τους για επαγωγή μυογένεσης και μείωση της φλεγμονής.⁴⁵ Το δυναμικό ανάπλασης που διαθέτουν τα iMSCs είναι υψηλό, αφού εκφράζουν γονίδια που συναντώνται στα ολοδύναμα κύτταρα, αλλά όχι στα ενήλικα MSCs, όπως τα INHBE, DNMT3B, POU5F1P1, CDKN1C και GCNT2.⁶⁸ Ακόμη, μελέτη θεραπείας της οστεοαρθρίτιδας με ενδοαρθρική έγχυση εξωσωμάτων εκκρινόμενων από iMSCs σε μοντέλο ποντικού απέδειξε αύξηση παραγωγής κολλαγόνου τύπου II και μεγαλύτερη επιδιόρθωση του χόνδρου σε σχέση με εξωσώματα εκκρινόμενα από ενήλικα MSCs.⁴⁹

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των iMSCs στην αναγέννηση των ιστών της άρθρωσης και κατ' επέκταση τον ρόλο τους στην κυτταρική θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας. Προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή των iMSCs στην αποκατάσταση των ιστών της άρθρωσης χρησιμοποιήθηκε ζωικό μοντέλο κουνελιού Νέας Ζηλανδίας τα οποία υπέστησαν διατομή του πρόσθιου χιαστού για τη δημιουργία μηχανικής αστάθειας στην άρθρωση και την επακόλουθη πρόκληση OA. Μετά την επιβεβαίωση της εγκατάστασης της OA, πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις με iMSCs στο δεξί γόνατο των κουνελιών. Με το πέρας τριάντα ημερών, τα ζώα θυσιάστηκαν και απομονώθηκαν οι κυτταρικοί τύποι από τους διάφορους ιστούς της άρθρωσης. Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των iMSCs στην ανάπλαση της άρθρωσης, διερευνήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β* σε χονδροκύτταρα, υμενοκύτταρα και κύτταρα του μηνίσκου μετά από την έγχυση των iMSCs στο ζωικό μοντέλο της OA.

Τα υπό μελέτη γονίδια συνιστούν χαρακτηριστικούς μοριακούς δείκτες της ΟΑ, καθώς η έκφρασή τους είναι ενδεικτική συγκεκριμένων κυτταρικών διεργασιών. Ειδικότερα, τα γονίδια *COL2* και *MMP13*, συνιστούν δείκτες των αναβολικών και καταβολικών διεργασιών, αντιστοίχως, που επιτελούνται στην άρθρωση, ενώ το γονίδιο *COL10* είναι χαρακτηριστικός δείκτης υπερτροφίας. Επιπλέον, δεδομένου ότι η ΟΑ χαρακτηρίζεται από μία κατάσταση χρόνιας φλεγμονής, η έκφραση της ιντερλευκίνης *IL-1β* συνιστά αντιπροσωπευτικό δείκτη των φλεγμονωδών διαδικασιών που ενεργοποιούνται μέσα στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης. Δεδομένου ότι οι διεργασίες αυτές είναι αντιπροσωπευτικές του περιβάλλοντος μιας ΟΑ άρθρωσης, τα επίπεδα έκφρασής τους έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες βελτίωσης της κατάστασης των ιστών ζωικών μοντέλων με ΟΑ μετά από ενδοαρθρική έγχυση βλαστοκυττάρων.⁶⁹ Στο πλαίσιο χρήσης επαγόμενων βλαστοκυττάρων, οι Wang και συν. πραγματοποίησαν έγχυση εξωσωμάτων εκκρινόμενων από επαγόμενα από εμβρυικά βλαστοκύτταρα MSCs (ESC-MSCs) σε οστεοαρθρικό μοντέλο ποντικού και παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *COL2* και μείωση της έκφρασης του *ADAMTS5* (καταβολικός δείκτης) παρουσία *IL-1β*.⁷⁰ ESC-MSCs χρησιμοποίησαν και οι Kimbrel και συν. επιδεικνύοντας το ρόλο τους ως ανοσολογικοί ρυθμιστές και την μεγαλύτερη θεραπευτική τους συνεισφορά σε σχέση με MSCs προερχόμενα από μυελό μετά από έγχυση σε ζωικά μοντέλα των αυτοάνοσων νοσημάτων.⁷¹ Παρά τα θετικά αυτά αποτελέσματα, η χρήση εμβρυικών βλαστοκυττάρων υπόκειται σε πλήθος ηθικών προβληματισμών. Αντίθετα, τα iMSCs αποτελούν μια καινοτόμα κατηγορία επαγόμενων βλαστοκυττάρων στην τεχνική ενδοαρθρικής έγχυσης, καθώς προέρχονται από τα ολοδύναμα iPSCs και αποφεύγουν ταυτόχρονα κάθε ηθικό εμπόδιο.

Στην παρούσα μελέτη, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (iMSCs) προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). Η μακροσκοπική ανάλυση των ιστών της άρθρωσης έδειξε βελτίωση της κλινικής εικόνας της άρθρωσης μετά από έγχυση των iMSCs συγκριτικά με τα γόνατα στα οποία δεν έγινε έγχυση. Η βελτίωση αυτή προσομοίαζε μία φυσιολογική κατάσταση, παρέχοντας τις πρώτες ενδείξεις για τον επιδιορθωτικό ρόλο των συγκεκριμένων κυττάρων σε μία οστεοαρθρική άρθρωση. Οι υγιείς δομές του αρθρικού χόνδρου και του υμένα των αρθρώσεων που έλαβαν έγχυση είναι

διακριτές, ενώ μπορούν να παρατηρηθούν η φθορά και απώλεια του χόνδρου στους ιστούς των αρθρώσεων που δεν έλαβαν έγχυση (βλέπε Εικόνες 13 και 14). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την προαναφερθείσα μελέτη των Zhu και συν. οι οποίοι σε παρόμοια προσέγγιση χρησιμοποίησαν εξωσώματα εκκρινόμενα από iMSCs για τη θεραπεία ζωικού μοντέλου ποντικού με OA, επιτυγχάνοντας ικανοποιητικά θεραπευτικά αποτελέσματα.⁴⁹ Και οι δύο μελέτες αποδεικνύουν τις δυνατότητες της ενδοαρθρικής έγχυσης των iMSCs για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας.

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνησουμε και σε μοριακό επίπεδο την επίδραση των iMSCs σε μία OA άρθρωση, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *COL2*, *COL10*, *MMP13* και *IL-1β*, τα οποία είναι γονίδια-δείκτες της OA. Το γονίδιο *COL2* εκφράζεται φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς μίας υγιούς άρθρωσης, κωδικοποιώντας το ινώδες κολλαγόνο τύπου II. Πρόκειται για πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη δομή και τη σύσταση των ιστών της άρθρωσης, και ιδιαιτέρως του χόνδρου.^{6,9,72} Τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *COL2* σε άρθρωση με OA έδειξαν σημαντική μείωση σε σχέση με τα φυσιολογικά, γεγονός που εξηγείται από τη φύση της νόσου, καθώς προκαλεί ρήξη της δομής και σύστασης του χόνδρου, καταστροφή των χονδροκυττάρων και επομένως μείωση των επιπέδων κολλαγόνου τύπου II.⁴ Αντίθετα, ο χόνδρος με OA που έλαβε έγχυση iMSCs έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *COL2*. Παρόμοια αποτελέσματα με στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκαν και στα δείγματα των κυττάρων υμένα και μηνίσκου. Και στις δύο περιπτώσεις, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *COL2* είχαν μείωση στα κύτταρα ιστών με OA, και εμφανή αύξηση σε αυτά που έλαβαν έγχυση με iMSCs (βλέπε Εικόνες 15α, 17α και 19α). Η αύξηση τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκε σε όλους τους κυτταρικούς τύπους της άρθρωσης μετά από την έγχυση των iMSCs υποδηλώνει αποκατάσταση των οστεοαρθρικών βλαβών και παρέχει τις πρώτες ενδείξεις ότι τα iMSCs συμβάλλουν στην επιδιόρθωση μίας OA άρθρωσης καταδεικνύοντας έναν πιθανό θεραπευτικό τους ρόλο.

Επιπλέον, ένα ακόμη γονίδιο το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της OA, είναι το *COL10*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κολλαγόνο τύπου X και σε

διαδικασίες οστεοποίησης του αρθρικού χόνδρου. Η παραπάνω διαδικασία συμβαίνει φυσιολογικά στις περιπτώσεις υπερτροφίας του χόνδρου, οπότε και ο αριθμός των χονδροκυττάρων πρέπει να μειωθεί.^{17,73} Τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης μας, έδειξαν σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *COL10* στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η σηματοδότηση για οστεοποίηση του χόνδρου παρατηρείται να συμβαίνει σε μη-φυσιολογικά ανεβασμένα επίπεδα στις περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας.^{74,75} Αντίθετα, χονδροκύτταρα με OA που έλαβαν έγχυση με έγχυση iMSCs έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *COL10*. Αλλά και σε κύτταρα υμένα και μηνίσκου που έλαβαν έγχυση παρατηρείται σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης του *COL10* συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν έλαβαν έγχυση, όπου τα επίπεδα έκφρασης έδειξαν σημαντική αύξηση (βλέπε Εικόνες 15β, 17β και 19β), ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα iMSCs έχουν επιδιορθωτικό ρόλο στην OA άρθρωση.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο των iMSCs στην κυτταρική θεραπεία της OA, μελετήθηκαν και τα επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης 13, που αποτελεί μόριο-δείκτη της OA καθώς αυξημένα επίπεδα αυτής έχουν συσχετιστεί με εκφυλιστικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε μία OA άρθρωση.^{76,77} Στη μελέτη μας, αυξημένα βρέθηκαν και τα επίπεδα της *MMP13* σε όλους τους κυτταρικούς τύπους στα γόνατα με OA συγκριτικά με τα κύτταρα που απομονώθηκαν από τη φυσιολογική άρθρωση, γεγονός που επιβεβαιώνει και την εγκατάσταση της πάθησης στο ζωικό μοντέλο. Αντιθέτως, τα χονδροκύτταρα από γόνατα κουνελιών όπου πραγματοποιήθηκε έγχυση με iMSCs παρουσίασαν σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *MMP13*. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η *MMP13* αποδομεί κυρίως το κολλαγόνο τύπου II, και φυσιολογικά συνεισφέρει στην διατήρηση της ισορροπίας στην ποσότητα των συστατικών των ιστών της άρθρωσης¹⁵, συμπεραίνουμε ότι η μείωση στα επίπεδα έκφρασης που παρατηρείται μετά την έγχυση των iMSCs ενισχύει το ρόλο των συγκεκριμένων κυττάρων στην ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου. Ομοίως στα δείγματα των κυττάρων οστεοαρθρικού υμένα και μηνίσκου είχαμε σημαντικά αποτελέσματα μείωσης των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *MMP13* μετά από έγχυσης iMSCs. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση της *MMP13* υποδεικνύουν ότι η έγχυση

iMSCs σε άρθρωση με ΟΑ έχει αναβολική δράση και επιδιορθωτικό ρόλο στην αποκατάσταση της φυσιολογικής σύστασης των ιστών της άρθρωσης.

Το γονίδιο *IL-1β* κωδικοποιεί την ιντερλευκίνη 1-β, μία προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη με ισχυρή καταβολική δράση. Πρόκειται για διαμεσολαβητή φλεγμονώδους απάντησης με σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών μηχανισμών όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση.^{15,78} Η *IL-1β* υπερεκφράζεται κατά την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας, ενισχύοντας φλεγμονώδεις διεργασίες και προκαλώντας αυξημένη παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων.⁷⁹ Τα αποτελέσματα της μελέτης μας σχετικά με τη μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *IL-1β* σε οστεοαρθρικό αρθρικό χόνδρο έδειξαν σημαντική αύξηση συγκριτικά με τα φυσιολογικά, κάτι που είναι αναμενόμενο καθώς η φλεγμονή αποτελεί ένα από τα ορόσημα της νόσου της οστεοαρθρίτιδας. Αντίθετα, ο οστεοαρθρικός χόνδρος που έλαβε έγχυση με iMSCs έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *IL-1β*. Στα δείγματα των κυττάρων υμένα και μηνίσκου παρατηρήθηκαν εξίσου σημαντικά αυξημένα επίπεδα κατά την απουσία έγχυσης και μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *IL-1β* παρουσία έγχυσης. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα iMSCs μειώνουν σημαντικά τη φλεγμονή όχι μόνο στον υμένα που συνιστά τον ιστό που επηρεάζεται περισσότερο από φλεγμονώδεις διαδικασίες, αλλά παρατηρείται μείωση της φλεγμονής σε όλη την άρθρωση ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τον επιδιορθωτικό ρόλο των iMSCs σε μία ΟΑ άρθρωση.

Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την επιδιορθωτική ικανότητα των επαγόμενων από iPSCs μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στην ανάπλαση των εκφυλισμένων ιστών αρθρώσεων με ΟΑ. Πιθανή βελτιστοποίηση της προσέγγισης θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω συνδυασμού των iMSCs με στοιχεία που ενισχύουν περαιτέρω την παραγωγή χονδροκυττάρων και την εξισορρόπηση των φυσιολογικών επιπέδων των συστατικών της άρθρωσης. Για παράδειγμα, οι Heck και συν. συνδύασαν σε in-vitro έγχυση σε οστεοαρθρικό αρθρικό υγρό μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μαζί με τον αγωνιστή PPAR-δ, ο οποίος προώθησε τη δράση του παράγοντα TGF-β στην διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα.⁸⁰ Με παρόμοιο σκεπτικό, οι Sun και συν. πραγματοποίησαν έγχυση συνδυασμού βλαστοκυττάρων με μικροσφαιρίδια TGF-β3 σε μοντέλο κουνελιού με ΟΑ. Τα δείγματα που έλαβαν τον συνδυασμό των δύο αυτών στοιχείων έδειξαν περισσότερο

μειωμένα επίπεδα ΟΑ στις έξι (6) εβδομάδες μετά την έγχυση συγκριτικά με δείγματα που δεν έλαβαν έγχυση μικροσφαιριδίων, καθώς και σημαντικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων κολλαγόνου τύπου II και αγγρεκάνης.⁸¹ Επίσης, η προσθήκη υαλουρονικού οξέος στις εγχύσεις έχει δειχθεί να ενισχύει την παραγωγή χονδροκυττάρων και κολλαγόνου τύπου II.^{80,82,83} Ενδιαφέρουσα προσέγγιση αποτελεί και η πρόκληση περιβάλλοντος υποξίας στους ιστούς άρθρωσης με ΟΑ κατά την έγχυση βλαστοκυττάρων, καθώς αυτό, όπως έχει αποδειχθεί από τους Neybecker και συν. και Zhi και συν., προωθεί την έκφραση ζωτικών για τη χονδρογένεση παραγόντων, όπως η πρωτεΐνη SOX9, η αγγρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II.^{60,62}

Αν και οι μελέτες σε ερευνητικό επίπεδο για την επιβεβαίωση των δυνατοτήτων και τη βελτιστοποίηση της συγκεκριμένης προσέγγισης συνεχίζονται, κλινικές δοκιμές δίνουν ήδη ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, κλινικές μελέτες παρακολούθησης ασθενών με ΟΑ γόνατος, μέσης ηλικίας 60 ετών, που έλαβαν ενδοαρθρική έγχυση επαγόμενων από λιπώδη ιστό βλαστοκυττάρων έδειξαν ασφαλή και ικανοποιητική βελτίωση της λειτουργίας των αρθρώσεων.⁸⁴⁻⁸⁶ Εξίσου καλά αποτελέσματα δειχθηκαν σε κλινικές μελέτες έγχυσης ενήλικων βλαστοκυττάρων μυελού, αλλά και μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων επαγόμενων από μυελό, όπου ασθενείς ηλικίας άνω των 30 ετών είχαν μείωση φλεγμονής και πόνου και βελτίωση κλινικής εικόνας μέσα στον πρώτο χρόνο παρακολούθησης.^{87,88} Μερικές έρευνες προτείνουν την έγχυση πολλαπλών έναντι μίας μόνο αρχικής δόσης, για την επίτευξη μεγαλύτερης βελτίωσης^{61,89,90}, αν και σε ορισμένες ερευνητικές μελέτες έχει δειχθεί να μην επιφέρει περαιτέρω κλινικό όφελος.⁹¹ Ενδιαφέρουσα προοπτική έχει η δοκιμή της επιδιορθωτικής ικανότητας και των iMSCs σε κλινικό επίπεδο. Πάντως, τα θετικά έως τώρα αποτελέσματα δίνουν το έναυσμα για μεγαλύτερες και τυχαιοποιημένες μελλοντικές κλινικές μελέτες, ώστε σύντομα να πραγματοποιηθεί η επιτυχής εισαγωγή της ενδοαρθρικής έγχυσης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στις τεχνικές ευρείας χρήσης για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας.

Z. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η μέθοδος ενδοαρθρικής έγχυσης επαγόμενων από iPSCs μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε άρθρωση ζωικού μοντέλου οστεοαρθρίτιδας μπορεί να επαναφέρει την έκφραση δεικτών που συνδέονται με την πάθηση αυτή σε φυσιολογικά επίπεδα και να οδηγήσει σε ανάπλαση των ιστών και βελτιωμένη κλινική εικόνα της άρθρωσης. Συνεπώς, η έγχυση επαγόμενων από iPSCs βλαστοκυττάρων απευθείας στην εκφυλισμένη άρθρωση αποτελεί μία θεραπευτική προσέγγιση με εξαιρετικές προοπτικές για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας. Αναγκαία είναι η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών για την περαιτέρω εξακρίβωση των δυνατοτήτων της τεχνικής αυτής.

Βιβλιογραφία

1. Kloppenburg M, Berenbaum F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. *Osteoarthr Cartil.* 2020;28(3):242-248. doi:10.1016/j.joca.2020.01.002
2. Vina ER, Kent Kwoh C. Epidemiology of Osteoarthritis: Literature Update Ernest. *Physiol Behav.* 2018;30(2):160-167. doi:10.1016/j.gde.2016.03.011
3. Salmon JH, Rat AC, Sellam J, et al. Economic impact of lower-limb osteoarthritis worldwide: a systematic review of cost-of-illness studies. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(9):1500-1508. doi:10.1016/j.joca.2016.03.012
4. Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis - An untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):331-344. doi:10.1038/nrd1693
5. Huber M, Trattng S, Lintner F. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol.* 2000;35(10):573-580. doi:10.1097/00004424-200010000-00003
6. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-468. doi:10.1177/1941738109350438
7. Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative Medicine: A Review of the Evolution of Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) Therapy. *Bioengineering.* 2019;6(1):1-16. doi:10.3390/bioengineering6010022
8. Monemdjou R, Fahmi H, Kapoor M. Synovium in the pathophysiology of osteoarthritis. *Therapy.* 2010;7(6):661-668. doi:10.2217/thy.10.72
9. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials.* 2011;32(30):7411-7431. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.037
10. Maly MR, Marriott KA, Chopp-Hurley JN. Osteoarthritis year in review 2019: rehabilitation and outcomes. *Osteoarthr Cartil.* 2020;28(3):249-266. doi:10.1016/j.joca.2019.11.008
11. Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(1):15-26. doi:10.1016/j.berh.2009.08.006
12. Cleveland RJ, Alvarez C, Schwartz TA, et al. The impact of painful knee osteoarthritis on mortality: a community-based cohort study with over 24 years of follow-up. *Osteoarthr Cartil.* 2019;27(4):593-602. doi:10.1016/j.joca.2018.12.008
13. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPIJG. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011;377(9783):2115-2126. doi:10.1016/S0140-6736(11)60243-2

14. Chen D, Shen J, Zhao W, et al. Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* 2017;5(September 2016). doi:10.1038/boneres.2016.44
15. Bar-Or D, T. Rael L, W. Thomas G, N. Brody E. Inflammatory Pathways in Knee Osteoarthritis: Potential Targets for Treatment. *Curr Rheumatol Rev.* 2015;11(1):50-58. doi:10.2174/1573397111666150522094131
16. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3507-3514. doi:10.1002/jcb.23298
17. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):1-19. doi:10.1101/cshperspect.a004978
18. Zhai G. Alteration of metabolic pathways in osteoarthritis. *Metabolites.* 2019;9(1). doi:10.3390/metabo9010011
19. Mobasheri A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59(5-6):333-339. doi:10.1016/j.rehab.2016.07.004
20. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):626-634. doi:10.1002/jcp.21258
21. Aury-Landas J, Marcelli C, Leclercq S, Boumédiène K, Baugé C. Genetic Determinism of Primary Early-Onset Osteoarthritis. *Trends Mol Med.* 2016;22(1):38-52. doi:10.1016/j.molmed.2015.11.006
22. Genetics Home Reference RUNX2 gene. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RUNX2>
23. Styrkarsdóttir U, Lund SH, Thorleifsson G, et al. Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. *Nat Genet.* 2018;50(12):1681-1687. doi:10.1038/s41588-018-0247-0
24. Tachmazidou I, Hatzikotoulas K, Southam L, et al. Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nat Genet.* 2019;51(2):230-236. doi:10.1038/s41588-018-0327-1
25. Reynard LN, Barter MJ. Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthr Cartil.* 2020;28(3):275-284. doi:10.1016/j.joca.2019.11.010
26. Hatzikotoulas K, Roposch A, Wainwright A, et al. Genome-wide association study of developmental dysplasia of the hip identifies an association with GDF5. *Commun Biol.* 2018;1(1). doi:10.1038/s42003-018-0052-4
27. Kiapour AM, Cao J, Young M, Capellini TD. The role of Gdf5 regulatory regions in development of hip morphology. *PLoS One.* 2018;13(11):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0202785

28. den Hollander W, Pulyakhina I, Boer C, et al. Annotating Transcriptional Effects of Genetic Variants in Disease-Relevant Tissue: Transcriptome-Wide Allelic Imbalance in Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(4):561-570. doi:10.1002/art.40748
29. den Hollander W, Meulenbelt I. DNA methylation in osteoarthritis. *Curr Genomics.* 2015;16:419-426. doi:10.2174/1389202916666150817212711
30. Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 2010;24(11):1173-1185. doi:10.1101/gad.1915510
31. Coutinho De Almeida R, Ramos YFM, Mahfouz A, et al. RNA sequencing data integration reveals an miRNA interactome of osteoarthritis cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(2):270-277. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213882
32. Ajekigbe B, Cheung K, Xu Y, et al. Identification of long non-coding RNAs expressed in knee and hip osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2019;27(4):694-702. doi:10.1016/j.joca.2018.12.015
33. Shen S, Wu Y, Chen J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(6):826-836. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214786
34. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res.* 2016;11(1):1-27. doi:10.1186/s13018-016-0346-5
35. Thysen S, Luyten FP, Lories RJU. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *DMM Dis Model Mech.* 2015;8(1):17-30. doi:10.1242/dmm.016881
36. Han P-F, Chen C-L, Tian Z, et al. How to establish an expected animal model of post-traumatic osteoarthritis? *Chinese Nurs Res.* 2017;4(2):57-63. doi:10.1016/j.cnre.2017.06.002
37. Samvelyan HJ, Hughes D, Stevens C, Staines KA. Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. *Calcif Tissue Int.* 2020;(0123456789). doi:10.1007/s00223-020-00670-x
38. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: Optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int.* 2014;2014(1). doi:10.1155/2014/951512
39. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80-).* 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
40. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, et al. Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: A review. *Stem Cells Int.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/5421019

41. Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, et al. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):19172-19177. doi:10.1073/pnas.1210422109
42. Freitag J, Bates D, Boyd R, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2016;17(1):1-13. doi:10.1186/s12891-016-1085-9
43. Kim HJ, Park J-S. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Dev Reprod*. 2017;21(1):1-10. doi:10.12717/dr.2017.21.1.001
44. Guzzo RM, Gibson J, Xu RH, Lee FY, Drissi H. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cell Biochem*. 2013;114(2):480-490. doi:10.1002/jcb.24388
45. Lian Q, Zhang Y, Zhang J, et al. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*. 2010;121(9):1113-1123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.898312
46. Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science (80-)*. 2012;336(6082):717-721. doi:10.1126/science.1215157
47. Diekman BO, Guilak F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: Challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):119-126. doi:10.1097/BOR.0b013e32835aa28d
48. Zhu Y, Wu X, Liang Y, et al. Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes. *BMC Biotechnol*. 2016;16(1):1-11. doi:10.1186/s12896-016-0306-5
49. Zhu Y, Wang Y, Zhao B, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1-11. doi:10.1186/s13287-017-0510-9
50. Pichard L, Brondelo JM, Becker F, et al. Generation of human pluripotent stem cell lines (iPSCs) from mesenchymal stem cells (MSCs) from three elderly patients with osteoarthritis. *Stem Cell Res*. 2020;44(December 2019):101721. doi:10.1016/j.scr.2020.101721
51. Coffin JM, Fan H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu Rev Virol*. 2016;3:29-51. doi:10.1146/annurev-virology-110615-035556
52. S.A. Deepak, K.R. Kottapalli, R. Rakwal, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*. 2007;8(4):234-251. doi:10.2174/138920207781386960

53. Hollander AP, Dickinson SC, Kafienah W. Stem cells and cartilage development: Complexities of a simple tissue. *Stem Cells*. 2010;28(11):1992-1996. doi:10.1002/stem.534
54. Grande DA, Singh IJ, Pugh J. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec*. 1987;218(2):142-148. doi:10.1002/ar.1092180208
55. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-895.
56. Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One*. 2017;12(4):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0176107
57. Choi S, Kim JH, Ha J, et al. Intra-articular injection of alginate-microencapsulated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis in rabbits. *Stem Cells Int*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/2791632
58. Zeira O, Scaccia S, Pettinari L, et al. Intra-Articular Administration of Autologous Micro-Fragmented Adipose Tissue in Dogs with Spontaneous Osteoarthritis: Safety, Feasibility, and Clinical Outcomes. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(11):819-828. doi:10.1002/sctm.18-0020
59. Jia Z, Liu Q, Liang Y, et al. Repair of articular cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2018;16(1):1-12. doi:10.1186/s12967-018-1485-8
60. Neybecker P, Henrionnet C, Pape E, et al. In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1-15. doi:10.1186/s13287-018-1071-2
61. Mahmoud EE, Adachi N, Mawas AS, Deie M, Ochi M. Multiple intra-articular injections of allogeneic bone marrow-derived stem cells potentially improve knee lesions resulting from surgically induced osteoarthritis: An animal study. *Bone Jt J*. 2019;101 B(7):824-831. doi:10.1302/0301-620X.101B7.BJJ-2018-1532.R1
62. Zhi Z, Zhang C, Kang J, et al. The therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on osteoarthritis is improved by the activation of the KDM6A/SOX9 signaling pathway caused by exposure to hypoxia. *J Cell Physiol*. 2020;(January):1-10. doi:10.1002/jcp.29615
63. Xing D, Wu J, Wang B, et al. Intra-articular delivery of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells temporarily retard the progression of osteoarthritis in a rat model. *Int J Rheum Dis*. 2020;23(6):778-787. doi:10.1111/1756-185X.13834

64. Kim H, Yang G, Park J, Choi J, Kang E, Lee BK. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord in rabbit temporomandibular joint model of osteoarthritis. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-50435-2
65. Medvedeva E V., Grebenik EA, Gornostaeva SN, et al. Repair of damaged articular cartilage: Current approaches and future directions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8). doi:10.3390/ijms19082366
66. Ko JY, Kim K II, Park S, Im G II. In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(11):3571-3581. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.009
67. Uto S, Nishizawa S, Hikita A, Takato T, Hoshi K. Application of induced pluripotent stem cells for cartilage regeneration in CLAWN miniature pig osteochondral replacement model. *Regen Ther*. 2018;9:58-70. doi:10.1016/j.reth.2018.06.003
68. Spitzhorn LS, Megges M, Wruck W, et al. Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1-18. doi:10.1186/s13287-019-1209-x
69. Desando G, Carola C, Federica S, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(R22). <http://arthritis-research.com/content/15/1/R22>
70. Wang Y, Yu D, Liu Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1-13. doi:10.1186/s13287-017-0632-0
71. Kimbrel EA, Kouris NA, Yavarian GJ, et al. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev*. 2014;23(14):1611-1624. doi:10.1089/scd.2013.0554
72. HGNC. COL2A1 collagen type II alpha 1 chain [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1280>
73. HGNC. COL10A1 collagen type X alpha 1 chain [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=collagen+type+x+homo>
74. Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during Osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*. 2008;25(1):1-6.
75. Rosen V. Mechanisms of endochondral ossification in the pathogenesis of OA. *Osteoarthr Cartil*. 2013;21:S1. doi:10.1016/j.joca.2013.02.011
76. Wang M, Sampson ER, Jin H, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):1-11. doi:10.1186/ar4133
77. HGNC. MMP13 matrix metalloproteinase 13 [Homo sapiens (human)].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4322>

78. HGNC. IL1B interleukin 1 beta [Homo sapiens (human)].
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>
79. Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2008;35(12):2306-2312. doi:10.3899/jrheum.080346
80. Heck BE, Park JJ, Makani V, Kim EC, Kim DH. PPAR- δ Agonist With Mesenchymal Stem Cells Induces Type II Collagen-Producing Chondrocytes in Human Arthritic Synovial Fluid. *Cell Transplant*. 2017;26(8):1405-1417. doi:10.1177/0963689717720278
81. Sun Q, Zhang L, Xu T, et al. Combined use of adipose derived stem cells and TGF- β 3 microspheres promotes articular cartilage regeneration in vivo. *Biotech Histochem*. 2018;93(3):168-176. doi:10.1080/10520295.2017.1401663
82. Lv X, He J, Zhang X, et al. Comparative Efficacy of Autologous Stromal Vascular Fraction and Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined With Hyaluronic Acid for the Treatment of Sheep Osteoarthritis. *Cell Transplant*. 2018;27(7):1111-1125. doi:10.1177/0963689718773333
83. Feng C, Luo X, He N, et al. Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model. *Tissue Eng - Part A*. 2018;24(3-4):219-233. doi:10.1089/ten.tea.2017.0039
84. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study. *Am J Sports Med*. 2017;45(12):2774-2783. doi:10.1177/0363546517716641
85. Lu L, Dai C, Zhang Z, et al. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: A prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1-10. doi:10.1186/s13287-019-1248-3
86. Lee WS, Kim HJ, Kim K II, Kim GB, Jin W. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(6):504-511. doi:10.1002/sctm.18-0122
87. Chahal J, Gómez-Aristizábal A, Shestopaloff K, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Treatment in Patients with Osteoarthritis Results in Overall Improvement in Pain and Symptoms and Reduces Synovial Inflammation. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(8):746-757. doi:10.1002/sctm.18-0183
88. Garay-Mendoza D, Villarreal-Martínez L, Garza-Bedolla A, et al. The effect of intra-articular injection of autologous bone marrow stem cells on pain and knee function in

- patients with osteoarthritis. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(1):140-147. doi:10.1111/1756-185X.13139
89. Horie M, Choi H, Lee RH, et al. Intra-articular Injection of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Promote Rat Meniscal Regeneration by Being Activated to Express Indian Hedgehog that Enhances Expression of Type II Collagen. *Osteoarthr Cartil*. 2012;20(10):1197–1207. doi:10.1016/j.joca.2012.06.002
 90. Matas J, Orrego M, Amenabar D, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(3):215-224. doi:10.1002/sctm.18-0053
 91. Magri C, Schramme M, Febre M, et al. Comparison of efficacy and safety of single versus repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis of the metacarpophalangeal/metatarsophalangeal joint in horses: A clinical pilot study. *PLoS One*. 2019;14(8):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0221317