



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**«Αναστολή της έκφρασης γονιδίων που
ενέχονται στην οστεοαρθρίτιδα»**

ΟΡΦΑΝΙΔΟΥ ΤΙΜΟΚΛΕΙΑ

Βιολόγος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2012

© 2012 Ορφανίδου Τιμόκλεια

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τριμελής Επιτροπή

κ. Μαλίζος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κ. Βαρυτιμίδης Σωκράτης	Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κα. Τσέζου Ασπασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής (Επιβλέπουσα)

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (12^η/14-12-2011 ΓΣΕΣ):

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

κ. Στεφανίδης Ιωάννης	Αν. Καθηγητής Παθολογίας
κ. Γιαννούκας Αθανάσιος	Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής
κ. Τρυποσκιάδης Φίλιππος	Καθηγητής Καρδιολογίας
κ. Καραχάλιος Θεόφιλος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κ. Βαρυτιμίδης Σωκράτης	Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κ. Μαλίζος Ν. Κωνσταντίνος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κα. Τσέζου Ασπασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής (Επιβλέπουσα)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	12
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
A.1 Οστεοαρθρίτιδα	17
A.1.1 Γενικά Γνωρίσματα	17
A.1.2 Ταξινόμηση	17
A.1.3 Επιδημιολογία της οστεοαρθρίτιδας	17
A.1.4 Κατανομή της οστεοαρθρίτιδας μεταξύ των αρθρώσεων	18
A.1.5 Προδιαθεσικοί παράγοντες	19
A.1.5.1 Ηλικία	20
A.1.5.2 Φύλο	20
A.1.5.3 Δείκτης μάζας σώματος	21
A.1.5.4 Γενετική Προδιάθεση: τύποι μελετών	22
A.1.6 Δομή του αρθρικού χόνδρου	25
A.1.7 Μεταβολισμός του αρθρικού χόνδρου	26
A.1.8 Αρθρικός χόνδρος και οστεοαρθρίτιδα	27
A.1.9 Χονδροκύτταρα και οστεοαρθρίτιδα	28
A.2 Υπερτροφία και Επασβέστωση των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα	33
A.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX-2 στον υπερτροφικό φαινότυπο στην ΟΑ	34
A.2.2 Οι αυξητικοί παράγοντες στον υπερτροφικό φαινότυπο στην ΟΑ: ο ρόλος του FGF23	36
A.2.2.1 Σύνδεση του FGF-23 σε υποδοχείς και ο ρόλος των συμπαραγόντων	39
A.2.2.2 Η σύνδεση του FGF-23 στον FGFR1c προκαλεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών	40
A.3 Η Συμβολή του φωσφόρου στην υπερτροφία και την επασβέστωση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων	41
A.3.1 Η είσοδος του Ρi στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω αντλιών εξαρτώμενων από Na ⁺	43
A.3.2 Η συμβολή του FGF23 στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του φωσφόρου	44
A.4 Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D₃	46
A.4.1 Ρύθμιση των ιόντων Ca ²⁺ και Ρi από την 1,25(OH) ₂ D ₃	47
A.4.2 Ορμονικές και γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D ₃ στα χονδροκύτταρα	48
A.4.3 Προέλευση βιταμίνης D ₃	51
A.5 Σχεδιασμός μελέτης - Σκοπός	54

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
B.1 Υλικό και μέθοδοι	56
B.1.1 Συλλογή δειγμάτων	56
B.1.2 Καλλιέργεια χονδροκυττάρων	57
B.1.3 Απομόνωση RNA από φρέσκο αρθρικό χόνδρο και από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα	60
B.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	62
B.1.5 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων VDR, Pit-1, Pit-2, RUNX2, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP-13, OPN, OC με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)	64
B.1.6. Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα	72
B.1.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου –SDS Συνθήκες καλλιέργειας	74
B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών RUNX2, FGF23, FGFR1c, VDR, Pit-1, Pit-2, COL10A1, MMP-13, OPN, OC, total-ERK, phospho-ERK1/2, κασπάση-9 με την τεχνική Western Blot	75
B.1.9 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων του FGF23 στο θρεπτικό υλικό καλλιεργειών χονδροκυττάρων με την ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφνητική μέθοδο – ELISA	77
B.1.10 Ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Protein Immunoprecipitation, IP) FGF23-FGFR1c και VDR-RUNX2 σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα	79
B.1.11 Ανίχνευση της πρωτεΐνης VDR με ανοσοφθορισμό	81
B.1.12 Επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις hrFGF23, 1,25(OH) ₂ D ₃ , φωσφόρου, φωσφονοφορμικού οξέος	82
B.1.13 Ανίχνευση στοιχείων δέσμησης του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D receptor Responsive Elements, VDREs) στους υποκινητές των γονιδίων FGF23 και RUNX2 με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης	83
B.1.14 Αποσιώπηση του mRNA των γονιδίων VDR και FGF23	89
B.1.15 Έλεγχος της απόπτωσης των χονδροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής	93
B.1.16 Στατιστική ανάλυση	95
B.2. Αποτελέσματα	96
B.2.1 Δείγματα αρθρικού χόνδρου	96
B.2.2 Ταυτοποίηση της υπερτροφίας στα οστεοαρθρικά δείγματα χόνδρου με μελέτη της έκφρασης του COL10A1	96
B.2.3 Μελέτη της έκφρασης του VDR και του κυτταρικού εντοπισμού του σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα	96
B.2.4 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Pit-1 και Pit-2 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων	97
B.2.5 Μελέτη της έκφρασης του RUNX2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά και χονδροκύτταρα	98
B.2.6. Μελέτη της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του RUNX2 και του VDR	99
B.2.7 Μελέτη της έκφρασης του FGF23 και προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων του σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά και χονδροκύτταρα	100
B.2.8 Μελέτη της σχέσης ρύθμισης μεταξύ του FGF23 και του RUNX2	101
B.2.9 Μελέτη της έκφρασης του FGFR1c και της δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ FGF23 και FGFR1c	

	102
B.2.10 Επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	103
B.2.11 Αναστολή της έκφρασης του VDR σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων	106
B.2.12 Ανάλυση του υποκινητή του FGF23 για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης της βιταμίνης D	108
B.2.13 Επίδραση σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων με Pi ή/και PFA	109
B.2.14 Συνεργιστική δράση του Pi και της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην ενεργοποίηση του μονοπατιού FGF23	112
B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	126

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, κα. Ασπασία Τσέζου για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθόλη την διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Κωνσταντίνο Μαλίζο για την άψογη συνεργασία μας και την επίβλεψη της διατριβής, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Βαρυτιμίδη Σωκράτη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλους τους συνεργάτες της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την παροχή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ πάρα πολύ όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τους Βασίλη Παπανικολάου, Ιωάννα Παπαθανασίου, Φωτεινή Κωστοπούλου, Μαρία Παλιανοπούλου, Ευανθία Μουρμούρα, Θεοδώρα Σιμοπούλου, Νίκο Στεφάνου, Stephanie Dubos και Βασιλική Γκρέτση.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και όλους τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, τη συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Τιμόκλεια Ορφανίδου

Βιολόγος, M.Sc.

Λάρισα, 2012.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή νόσο των αρθρώσεων με μεγαλύτερη επίπτωση σε ηλικίες άνω των 60 ετών. Είναι μία πάθηση που επηρεάζει όλα τα στοιχεία της άρθρωσης κυριότερα όμως τον αρθρικό χόνδρο και που μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις αρθρώσεις με πλέον συχνή εμφάνιση στο χέρι, το πόδι, το γόνατο, τη σπονδυλική στήλη και το ισχίο. Θεωρείται μια πολυπαραγοντική νόσος, στην εμφάνιση και εξέλιξη της οποίας έχει βρεθεί ότι είναι σημαντική η συνεισφορά γενετικών παραγόντων.

Η φυσιολογική πορεία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων στην αναπτυξιακή πλάκα περιλαμβάνει τα στάδια του πολλαπλασιασμού, της υπερτροφίας και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Το προϊόν της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας, είναι ο ανθεκτικός, μόνιμος χόνδρος ενήλικα ατόμου. Τα χονδροκύτταρα του μόνιμου χόνδρου, φυσιολογικά, δεν υφίστανται πολλαπλασιασμό ή υπερτροφική διαφοροποίηση και δεν αποπίπτουν σε αντίθεση με τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας. Παρόλα αυτά, στην οστεοαρθρίτιδα, παρατηρούνται αλλαγές στο προφίλ των χονδροκυττάρων που προσομοιάζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται επανεκκίνηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και υπερτροφική διαφοροποίηση, στα πλαίσια της οποίας πρωταγωνιστούν ποικίλοι μεταγραφικοί και αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα, ορμόνες και κυτοκίνες.

Η υπερτροφία στην ΟΑ συνδέεται και με άλλες φαινοτυπικές μεταβολές, όπως την επασβέστωση του χόνδρου και έχει βρεθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της επασβέστωσης του χόνδρου, της κλινικής διαβάθμισης της νόσου και της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου Χ, δείκτη χαρακτηριστικού της υπερτροφίας.

Σημαντικό ρόλο στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων διαδραματίζει η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, η οποία αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μέσω σύνδεσής της με τον ειδικό υποδοχέα VDR συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην υπερτροφία και την επασβέστωση του ΟΑ χόνδρου. Επιπλέον, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ συμβάλει στη δημιουργία υπερτροφικών χονδροκυττάρων, κυρίως κοντά στις περιοχές του χόνδρου που έχουν επασβεστωθεί, και στο σχηματισμό μεμβρανικών κυστιδίων, πλούσια σε Pi και Ca^{2+} , στην εξωκυττάρια ουσία (ECM). Τα τελευταία οδηγούν στο σχηματισμό κρυστάλλων ασβεστίου (CPPD, BCP) οι οποίοι διαβρώνουν το χόνδρο και σχετίζονται με την εξέλιξη της ΟΑ. Στη διαδικασία της υπερτροφίας και της επασβέστωσης του χόνδρου συμμετέχει επιπλέον ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF23), ο οποίος αποτελεί έναν φωσφατουρικό παράγοντα που επάγει την πρόωρη μετατροπή των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας σε υπερτροφικά. Ο FGF23 προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς FGFRs και ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια στα κύτταρα στόχους. Ιδιαίτερα, η πρόσδεση του FGF23 στον υποδοχέα FGFR1c προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP-κινασών στα χονδροκύτταρα. Όσον αφορά στη λειτουργία του,

συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιόντων Ca^{2+}/Pi και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της $1,25(OH)_2D_3$, μέσω καταστολής της δραστηριότητας της 1α -υδροξυλάσης στους νεφρούς. Ο FGF23 εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε κύτταρα τα οποία επασβεστώνουν την ECM, όπως οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα, και η έκφρασή του διαφοροποιείται πριν και μετά την επασβέστωση. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της υπερτροφίας και της επασβέστωσης διαδραματίζουν επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα Pi. Τα αυξημένα εξωκυττάρια επίπεδα του Pi εισέρχονται στα χονδροκύτταρα μέσω του συμμεταφορέα Na^+/Pi , Pit-1 και επάγουν την έκφραση γονιδίων της υπερτροφίας όπως RUNX2, OPN και OC.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου μορίων που επάγουν την υπερτροφία και την επασβέστωση στα OA χονδροκύτταρα, όπως η $1,25(OH)_2D_3$ και το Pi, οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί, καθώς και η αναστολή της έκφρασής τους. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος και δεν είχαν άλλες ρευματικές παθήσεις, χονδροδυσπλασίες ή αυτοάνοσα. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν άτομα που νοσηλεύτηκαν για λόγους τραυματισμού ή κατάγματος. Αναλυτικότερα, στο πειραματικό μέρος της διατριβής διερευνήθηκαν τα ακόλουθα:

- ο υπερτροφικός φαινότυπος των χονδροκυττάρων από δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών με οστεοαρθρίτιδα γόνατος, με τη μελέτη γονιδίων χαρακτηριστικών της υπερτροφίας, όπως τα COL10A1, OPN και OC,
- η δράση της $1,25(OH)_2D_3$ μέσω της έκφρασης του υποδοχέα της VDR σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- η δράση του Pi μέσω της έκφρασης των συμμεταφορέων Na^+/Pi , Pit-1 και Pit-2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα FGF23 και του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση,
- η έκφραση του FGFR1c, ενός ειδικού υποδοχέα του FGF23 και η ενεργοποίηση της σηματοδότησης που επάγεται από την σύνδεσή τους στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά
- ο ρόλος της $1,25(OH)_2D_3$ ή του Pi στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης του FGF23 και η συμβολή τους στην επαγωγή της υπερτροφίας σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- ο ρόλος της αναστολής του VDR ή των αντλιών Pit-1, Pit-2 στην αναστροφή του υπερτροφικού φαινότυπου σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα,
- το συνδυαστικό αποτέλεσμα της επίδρασης με $1,25(OH)_2D_3$ και Pi στην επαγωγή της υπερτροφίας σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα.

Η ύπαρξη υπερτροφίας επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα OA χόνδρου που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη με την παρουσία οστεοφύτων και με την ανίχνευση αυξημένης έκφρασης του δείκτη COL10A1.

Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα VDR και των Pit-1, Pit-2 στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, προτείνοντας αφενός την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα OA χονδροκύτταρα, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα της, και αφετέρου την συσσώρευση του Pi στο εξωκυττάριο στρώμα των OA χονδροκυττάρων, το οποίο προκαλεί υπερέκφραση των αντλιών Pit-1, Pit-2, προκειμένου να εισέλθει στο κυτταρόπλασμά τους.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι τόσο ο φωσφατουρικός αυξητικός παράγοντας FGF23 όσο και ο μεταγραφικός παράγοντας της υπερτροφίας RUNX2 υπερεκφράζονται στα OA χονδροκύτταρα και μάλιστα ο FGF23 επάγει την έκφραση του RUNX2. Έτσι προτείνεται ότι η υπερέκφρασή τους αλλά και η αλληλεπίδρασή τους, σχετίζεται με την υπερτροφία στα OA χονδροκύτταρα, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου.

Η επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ή Pi στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του FGF23 και του υποδοχέα του FGFR1c και ως ακολούθως την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP-κινασών και τη φωσφορυλίωση της ERK1/2. Η ενεργοποίηση του ανωτέρου σηματοδοτικού μονοπατιού είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων χαρακτηριστικών της υπερτροφίας, όπως τα RUNX2, COL10A1, οστεοποντίνη (OPN), οστεοκαλσίνη (OC), την επαγωγή καταβολικών μορίων όπως μεταλλοπρωτεϊνάση-13 (MMP-13) αλλά και την απόπτωση των χονδροκυττάρων. Ανάλυση του υποκινητή του FGF23, έδειξε για πρώτη φορά, ότι διαθέτει περιοχές δέσμευσης του συμπλόκου $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επαγωγή της έκφρασής του FGF23 από τη $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ πραγματοποιείται άμεσα με την πρόσδεση του συμπλόκου στον υποκινητή του. Στη συνέχεια, ακολούθησε αναστολή του VDR ή των Pit-1, Pit-2 στα OA χονδροκύτταρα, η οποία προκάλεσε την αναστολή της έκφρασης των FGF23 και FGFR1c, απενεργοποίηση του μονοπατιού MAP-κινασών και μείωση της έκφρασης όλων των δεικτών, RUNX2, COL10A1, OPN, OC, MMP-13 και της απόπτωσης. Το αποτέλεσμα της αναστολής του VDR ή των Pit-1, Pit-2, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ή με Pi στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα και επιπρόσθετα αναδεικνύει τον μηχανισμό μέσω του οποίου διενεργούνται οι δράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στα OA χονδροκύτταρα. Ταυτόχρονη αναστολή του VDR και των Pit-1, Pit-2, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των FGF23 και FGFR1c συγκριτικά με τη μεμονωμένη αναστολή του VDR ή των Pit-1, Pit-2. Επίσης διαπιστώθηκε μεγαλύτερη απώλεια στη φωσφορυλίωση της ERK1/2 και στατιστικά σημαντική μείωση όλων των γονιδίων-δεικτών (COL10A1, OPN, OC, MMP-13) στα OA χονδροκύτταρα.

Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν την εμπλοκή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στην υπερτροφία και την επασβεστώση των OA χονδροκυττάρων. Συγκεκριμένα η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

μέσω σύνδεσης της στον υποδοχέα VDR, εμφανίζει αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα στα OA χονδροκύτταρα, η οποία ενισχύεται περαιτέρω από τη είσοδο αυξημένων επιπέδων Pι στα χονδροκύτταρα μέσω των Pit-1, Pit-2. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο 1,25(OH)₂D₃-VDR προσδένεται σε ειδικές περιοχές στον υποκινητή του FGF23 και προκαλεί την ενίσχυση της έκφρασής του. Με τη σειρά του, ο FGF23 προσδένεται στον υποδοχέα FGFR1c και ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAP-κινασών, με στόχο την αύξηση της έκφρασης δεικτών της υπερτροφίας και της επασβέστωσης του ECM με τελικό αποτέλεσμα τον εκφυλισμό του χόνδρου. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη αναδεικνύουν νέα μόρια, όπως η 1,25(OH)₂D₃, που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στόχων.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common disease of the joints, with higher incidence at ages over 60 years. It is a disease that affects all elements of the joint, with most prominent the articular cartilage. It can occur in all joints, with most frequent occurrence in the hand, foot, knee, spine and hip. It is considered a multi-factorial disease, in which genetic contribution has been found to play a significant role in its development and progression,.

The developmental stages of the growth-plate differentiation of chondrocytes include proliferation, hypertrophy and finally cell death. The final product of growth-plate chondrocytes', differentiation and maturation, is the resistant, permanent, adult articular cartilage. Under normal conditions, the chondrocytes in the permanent articular cartilage do not undergo proliferation, hypertrophic differentiation or apoptosis, in contrast with growth-plate chondrocytes. However, osteoarthritic chondrocytes adopt phenotypic characteristics of growth-plate chondrocytes and restart to proliferate and undergo hypertrophic differentiation, under the signal of various transcription and growth factors, enzymes, hormones and cytokines.

Hypertrophy in OA is also linked with other phenotypic changes, as cartilage calcification, and has been is a correlation between cartilage calcification, clinical classification of the disease and the expression of collagen type X, a hypertrophy characteristic marker.

The active metabolite of vitamin D is $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, which plays an important role in chondrocytes' hypertrophy. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ binds to its specific receptor VDR and participates in the regulation of genes' expression, which are involved in hypertrophy and calcification in OA cartilage. Moreover, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, contributes to hypertrophic differentiation of chondrocytes, especially close to the calcified area of the cartilage, and in the formation of matrix vesicles in extracellular matrix, which contain Ca^{2+} . Matrix vesicles are responsible for the formation of calcium containing crystals (CPPD, BCP), which erode the cartilage and are correlated with disease progression. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is a phosphaturic factor, which is also involved in the process of cartilage hypertrophy and calcification and promotes the premature differentiation of proliferating growth-plate chondrocytes to hypertrophic. FGF23 binds to specific receptors FGFRs and activates signaling pathways in the target cells. Particularly, FGF23 binding to FGFR1c promotes the activation of MAP-kinase pathway in chondrocytes. Moreover, FGF23 function involves the homeostasis of Ca^{2+}/Pi metabolism and the regulation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ metabolism through repression of 1α -hydroxylase activity. FGF23 has been found to be highly expressed in cells that calcify their extracellular matrix, like osteoblasts and chondrocytes and exhibits differentiated expression before and after calcification. Finally, increased extracellular levels of Pi exhibit important role in cartilage hypertrophy and calcification. Pi enters chondrocytes through Na^+/Pi

contrasporters, Pit-1, and promotes the expression of hypertrophy-related genes, as RUNX2, osteopontin and osteocalcin.

The objective of this study is the investigation of molecules which induce hypertrophy and calcification in osteoarthritic chondrocytes, like $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and Pi, the implicated molecular mechanisms and the investigation of the inhibition of their expression. We used articular cartilage samples from osteoarthritic patients, who were undergoing total knee replacement surgery and were not suffering from other rheumatic diseases, chondrodysplasias or autoimmune diseases. The control group was consisted from individuals who were hospitalized for injury or fracture repair. In the experimental part of the thesis were investigated:

- the role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ through the expression of its receptor VDR in osteoarthritic and normal chondrocytes,
- the role of Pi through the expression of Na^+/Pi cotransporters, Pit-1 και Pit-2 in osteoarthritic and normal chondrocytes,
- the role of the growth factor FGF23 and the transcription factor RUNX2 in osteoarthritic and normal chondrocytes, as well as their interaction,
- FGFR1c expression, a specific receptor for FGF23, and the signaling that is activated via FGF23 binding to FGFR1c in osteoarthritic and normal chondrocytes,
- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or Pi implication in the activation of FGF23 signaling and their role in the induction of hypertrophy in normal chondrocytes,
- the impact of VDR or Pit-1, Pit-2 inhibition in the inversion of hypertrophic phenotype in OA chondrocytes,
- the additive effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and Pi treatment in the induction of hypertrophy in normal chondrocytes.

We observed up-regulated VDR and Pit-1, Pit-2 expression levels in OA chondrocytes compared to normal, suggesting that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, via the binding to its receptor VDR exhibits increased transcriptional activity in OA chondrocytes compared to normal. Moreover, we observed that Pi is accumulated in the extracellular matrix of OA chondrocytes and provokes the over-expression of Pit-1, Pit-2 cotransporters in order to enter the cells.

We also observed that the phosphaturic growth factor FGF23 and the hypertrophy transcription factor RUNX2 are over-expressed in OA chondrocytes and furthermore FGF23 increases RUNX2 expression. Our data suggest that FGF23 and RUNX2 over-expression and interaction is associated with hypertrophy in OA chondrocytes contributing to disease progression.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or Pi treatment in normal chondrocytes promoted FGF23 and FGFR1c expression and as a consequence activated MAPK pathway and ERK1/2 phosphorylation. The activation of MAPK signaling pathway resulted in the enhancement of hypertrophy-

related genes' expression, like RUNX2, COL10A1, osteopontin, osteocalcin, the induction of the catabolic metalloproteinase-13, and the apoptotic death of chondrocytes. Analysis of FGF23 promoter showed, for the first time, the presence of vitamin D response elements (VDREs), that permit the binding of 1,25(OH)₂D₃-VDR complex and the direct regulation of FGF23 transcription. Furthermore, we proceeded with VDR or Pit-1, Pit-2 inhibition in OA chondrocytes, which resulted in reduced FGF23 and FGFR1c expression, inactivation of MAPK pathway and reduced expression of all markers, as RUNX2, COL10A1, OPN, OC, MMP-13 and finally inhibition of apoptosis. The effect of VDR or Pit-1, Pit-2 inhibition confirms the observations from the 1,25(OH)₂D₃ or Pi treatment of normal chondrocytes, and furthermore reveals the mechanism that mediates the effects of 1,25(OH)₂D₃ and Pi in OA chondrocytes. The simultaneous inhibition of VDR and Pit-1, Pit-2, resulted in additive significant reduction of FGF23 and FGFR1c expression compared to the individual VDR or Pit-1, Pit-2 inhibition. Moreover, we observed the complete inactivation of MAPK pathway and significant reduced expression of all marker genes (COL10A1, OPN, OC, MMP-13) in OA chondrocytes.

Our findings suggest the implication of 1,25(OH)₂D₃ and Pi in hypertrophy and calcification in OA chondrocytes. Specifically, 1,25(OH)₂D₃, via its binding to its receptor VDR, exhibited enhanced transcriptional activity in OA chondrocytes, which is further induced by the entry of elevated extracellular Pi levels. Subsequently, 1,25(OH)₂D₃ -VDR complex binds to VDREs, which are located in FGF23 promoter and promotes the enhancement of its expression. Then, FGF23 binds to FGFR1c and activates MAPK pathway, resulting in the expression of hypertrophy and ECM calcification related genes and finally to cartilage degeneration. Our results reveal new molecules, as 1,25(OH)₂D₃, which could be evaluated as a new therapeutic target.

*«Τίποτε στη ζωή δεν είναι για να το φοβόμαστε
αλλά για να το κατανοήσουμε»
-Μαρί Κιουρί-*

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 Οστεοαρθρίτιδα

A.1.1 Γενικά γνωρίσματα

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και συνοδεύεται από την εμφάνιση χρόνιου πόνου, περιορισμό στην κίνηση της άρθρωσης και σε προχωρημένα στάδια σχετίζεται με αναπηρία. Είναι μία πάθηση που επηρεάζει όλη την άρθρωση και χαρακτηρίζεται κυρίως από αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου αλλά επιφέρει αλλαγές και στα υπόλοιπα δομικά στοιχεία της άρθρωσης, όπως το οστό, το μηνίσκο, τον αρθρικό υμένα, τον αρθρικό θύλακο (σάκος) και τους μύες [1]. Επιπλέον αλλαγές που συμβαίνουν κατά την οστεοαρθρίτιδα περιλαμβάνουν τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού καθώς και τη δημιουργία κυστών και οστεοφύτων [2]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της προχωρημένης ΟΑ είναι ο έντονος πόνος και η δυσλειτουργία της άρθρωσης ενώ επίσης παρατηρείται και σύσπαση της άρθρωσης, ατροφία των μυών και δυσμορφία του άκρου [3, 4].

A.1.2 Ταξινόμηση

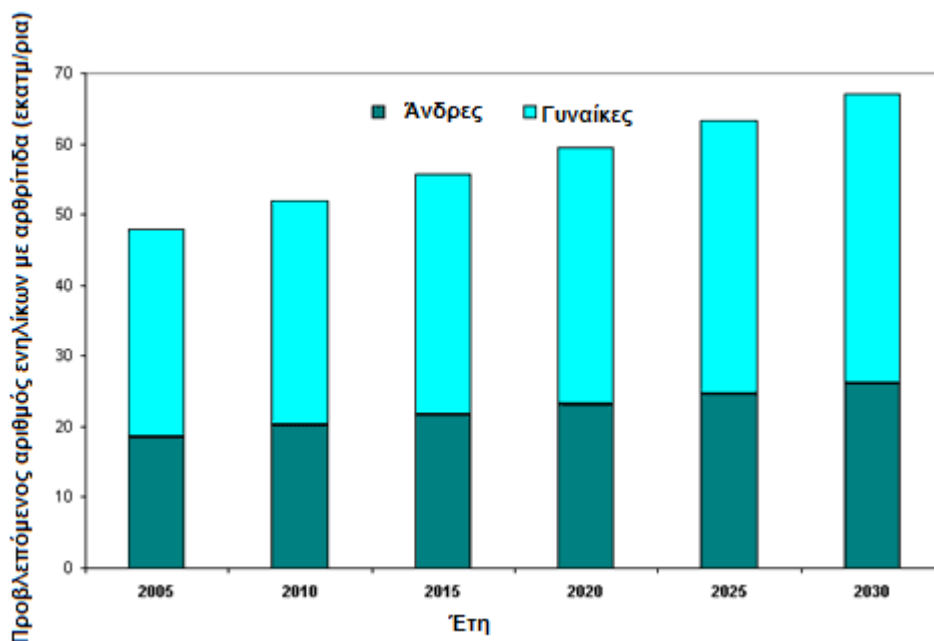
Η ΟΑ διαχωρίζεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής ΟΑ διαγιγνώσκεται αφού προχωρήσει η νόσος στο τελευταίο στάδιο χωρίς προφανείς αιτίες, ενώ η δευτεροπαθής ΟΑ εμφανίζεται σε σχετικά νεαρή ηλικία και μπορεί να οφείλεται σε αναπτυξιακή ανωμαλία ή προηγούμενη σοβαρή επέμβαση ή τραύμα. Τα συχνότερα αίτια δευτεροπαθούς ΟΑ είναι τραύματα, συστηματικά νοσήματα (αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson, ακρομεγαλία, υπερπαραθυρεοειδισμός, εναπόθεση κρυστάλλων ασβεστίου), ανατομικές αιτίες (ανισοσκελία, συγγενές εξάρθρημα ισχίου), ή είναι επακόλουθο λοιμώξεων (σηπτική αρθρίτιδα) [5].

Η ΟΑ χαρακτηρίζεται ως η κύρια εκφυλιστική αρθρίτιδα και συχνά συνοδεύεται από εξάρσεις φλεγμονής, οι οποίες σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου [6]. Από την στιγμή της εμφάνισης της ΟΑ ο πόνος και η δυσκολία στην κίνηση σταδιακά αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης και η χρόνια κατάσταση της ΟΑ σε συνδυασμό με την έλλειψη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης ή θεραπείας καθιστούν την πάθηση αυτή ένα σημαντικό κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα για τους ασθενείς, το σύστημα υγείας και το κράτος [7-9].

A.1.3 Επιδημιολογία της οστεοαρθρίτιδας

Η ΟΑ είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων στις αναπτυγμένες χώρες. Στην Ευρώπη κάθε 1,5 λεπτό μία άρθρωση αντικαθίσταται λόγω οστεοαρθρίτιδας, ενώ στις ΗΠΑ πραγματοποιούνται ετησίως περίπου 500,000 αρθροπλαστικές

επεμβάσεις [10], [11] (εικόνα 1). Στη μελέτη Framingham (ΗΠΑ) ένα στα τέσσερα άτομα στην ηλικία των 60 ετών παρουσίαζε ακτινολογικές αλλοιώσεις οστεοαρθρίτιδας ενώ το ποσοστό αυτό ξεπερνούσε το 50% στον πληθυσμό άνω των 80 ετών [12]. Η επίπτωση της έχει αναφερθεί ότι είναι 4.14% στην Βραζιλία [13], και 11.7% στην Κούβα [14]. Στην Ασιατική ήπειρο η επίπτωση της ΟΑ γόνατος κυμαίνεται μεταξύ 3.1– 4.6% στο Πακιστάν [15] και 7.5% - 10.6% στο Μπαγκλαντές [16]. Δεκατρείς μελέτες που αφορούσαν 29.621 ενήλικες από διάφορες επαρχίες της Κίνας ανέφεραν ότι η συχνότητα συμπτωματικής ΟΑ έφτανε το 20.8% [17]. Στην Ελλάδα η επίπτωση της ΟΑ γόνατος σε ηλικίες μέχρι 60 ετών ανέρχεται σε ποσοστό 14%, ενώ σε ηλικίες μεγαλύτερες των 80 ετών φθάνει το 30% [18]. Πιθανές εξηγήσεις για αυτές τις επιδημιολογικές διαφορές αποτελούν οι γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών καθώς και οι διαφορές στις συνθήκες διαβίωσης, στην ηλικία, στην επαγγελματική δραστηριότητα αλλά και στον ορισμό της ΟΑ στις διάφορες μελέτες.



Εικόνα 1. Προβλεπόμενη επίπτωση αρθρίτιδας σε ενήλικες της Αμερικής άνω των 18, για τα έτη 2005-2030 [19]

A.1.4 Κατανομή της οστεοαρθρίτιδας μεταξύ των αρθρώσεων

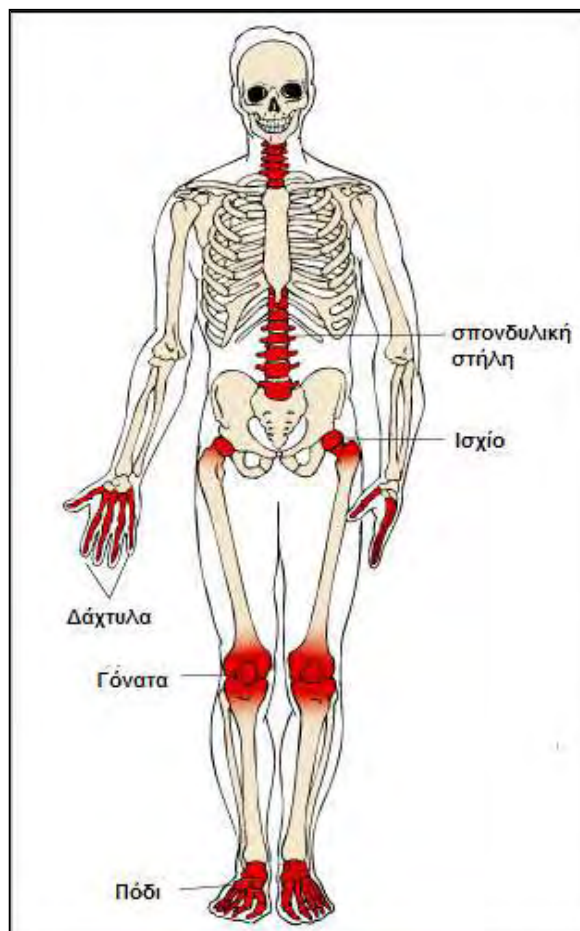
Οι αρθρώσεις που μπορεί να εμφανιστεί η οστεοαρθρίτιδα με μεγαλύτερη συχνότητα περιλαμβάνουν κυρίως το χέρι, το ισχίο και το γόνατο (εικόνα 2). Λιγότερο συχνά εμφανίζεται στο πόδι και τη σπονδυλική στήλη. Επίσης, πρόωρη ΟΑ μπορεί να αναπτυχθεί σπάνια στον αστράγαλο, τον καρπό και τον ώμο [20-22]. Ο εντοπισμός της οστεοαρθρίτιδας στους τρεις πιο συχνούς τύπους αρθρώσεων (χέρι, ισχίο και γόνατο) δημιουργεί ποικίλα προβλήματα κατά την επιδημιολογική

έρευνα της νόσου. Ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ αυτών των αρθρώσεων ποικίλει και εξαρτάται από χαρακτηριστικά όπως η σύγκλιση των εκατέρωθεν οστών της άρθρωσης, το πάχος του αρθρικού χόνδρου, τη μηχανική δύναμη που ασκείται στην εκάστοτε άρθρωση, τη σταθερότητα και την παρουσία η όχι μηνίσκου [23, 24].

A.1.5 Προδιαθεσικοί παράγοντες

Η προσδιορισμός των αιτιολογικών παραγόντων της ΟΑ δεν είναι εύκολη διαδικασία και υφίσταται διαρκώς διερεύνηση [25, 26]. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στην ΟΑ χαρακτηρίζονται ως «αντίδραση που πραγματοποιείται στην άρθρωση ως απόκριση σε τραυματισμό ή άλλη προσβολή και σχετίζεται με τη γήρανση», στην εξέλιξη της οποίας συμβάλουν συστηματικοί, γενετικοί, και περιβαλλοντικοί παράγοντες [27]. Επίσης οι προδιαθεσικοί παράγοντες ποικίλουν ανάλογα τη θέση της άρθρωσης και διαφέρουν από τους παράγοντες που σχετίζονται με την εξέλιξη της ΟΑ [28]. Παρόλα αυτά, οι κυριότεροι

συστηματικοί παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΟΑ είναι η ηλικία και το φύλο [29]. Επίσης, ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) σχετίζεται στενά με την εμφάνιση της νόσου αλλά η συμβολή του εξαρτάται από έναν συνδυασμό μεταβολικών παραγόντων και αυξάνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη ΟΑ ιδιαίτερα για αρθρώσεις που επιβαρύνονται περισσότερο από το βάρος (γόνατο) [30, 31]. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και οι διατροφικές συνήθειες των ατόμων [32]. Η κληρονομικότητα της ΟΑ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου και ανέρχεται σε ποσοστό 39-65% [33]. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται όλο και περισσότερο στη συμβολή του γενετικού παράγοντα στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου με στόχο την ανάδειξη



Εικόνα 2. Αρθρώσεις στις οποίες εμφανίζεται οστεοαρθρίτιδα.

μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη φλεγμονή, μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και πρωτεΐνες της αναδιαμόρφωσης του οστού.

A.1.5.1 Ηλικία

Η ηλικία αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΟΑ. Σε ηλικίες 15-44 το ποσοστό ανέρχεται σε 5%, 45-64 ετών σε ποσοστό 25-30%, ενώ μετά την ηλικία των 65 το ποσοστό εμφάνισης ΟΑ φτάνει το 60% και σε κάποιους πληθυσμούς αγγίζει το 90% [9, 20, 34]. Με την πάροδο του χρόνου, τα χονδροκύτταρα που αποτελούν τον μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό του αρθρικού χόνδρου υφίστανται αλλαγές όσον αφορά στη λειτουργία τους, στην ικανότητά τους να αποκρίνονται σε ερεθίσματα του άμεσου περιβάλλοντός τους, όπως σε κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και ένζυμα. Επίσης ελαττώνεται η ελαστικότητα του χόνδρου και η ικανότητά του να ανθίσταται σε μηχανικές πιέσεις. Επιπλέον τα χονδροκύτταρα συνθέτουν λιγότερη αγγρεκάνη, που αποτελεί δομικό λίθο του χόνδρου, ενώ η απώλεια των τελομερών των χονδροκυττάρων οδηγεί σε κυτταρική γήρανση με αποτέλεσμα να χάνουν τη λειτουργικότητά τους [35-37]. Η ανάπτυξη οστεοφύτων στην άρθρωση του γόνατος αυξάνει κατά 20% για κάθε αύξηση της ηλικίας κατά 5 έτη [31]. Οι οστεοαρθρικές ακτινολογικές αλλοιώσεις αυξάνονται με την πρόοδο της ηλικίας [38], αν και αυτές οι αλλαγές δεν συνδυάζονται πάντα με κλινική συμπτωματολογία [39, 40]. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την προχωρημένη ηλικία με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των Lawrence [41] και των μελετών Framingham [42], NHANES III [43], Rotterdam [44] και ESORDIG [18]. Η συσχέτιση μεταξύ οστεοαρθρίτιδας ισχίου και μεγάλης ηλικίας έχει υποστηριχθεί σε δύο μεγάλες Σκανδιναβικές μελέτες [45, 46], καθώς και στις μελέτες ESORDIG [18] και Rotterdam [44]. Η μεγάλη ηλικία έχει συσχετισθεί και με την ανάπτυξη ΟΑ χεριού όπως προέκυψε από τις μελέτες των Lawrence [41], BLSA [47, 48], Zoetermeer [49] καθώς και στη μελέτη Michigan Bone Health [50]. Αν και εμφανώς πρόκειται για πάθηση της μεγάλης ηλικίας, η ΟΑ δεν αποτελεί αναπόφευκτη αιτία της γήρανσης.

A.1.5.2 Φύλο

Η εμφάνιση της ΟΑ μετά την ηλικία των 65 είναι συχνότερη στις γυναίκες δύο φορές περισσότερο απ' ό τι στους άνδρες (εικόνα 3). Στην αναλογία αυτή αναφέρεται κυρίως η ΟΑ γόνατος, ενώ η ΟΑ ισχίου και χεριού διαφέρουν μόνο κατά 1% (εικόνα 4) [51]. Στη Θεσσαλία, σε μικρότερο πληθυσμιακό δείγμα, έχει βρεθεί ότι η αναλογία γυναίκες προς άνδρες είναι πολύ υψηλή 5:1, πιθανόν λόγω της ενασχόλησης των γυναικών με τις αγροτικές εργασίες και την επακόλουθη επιβάρυνση των αρθρώσεων [52]. Η διαφορά εμφάνισης ΟΑ ανάλογα με το φύλο

οφείλεται κυρίως στην απώλεια των οιστρογόνων στις γυναίκες κατά την εμμηνόπαυση. Η παρουσία των οιστρογονικών υποδοχέων α και β (Estrogen Receptor α και β , ER α και ER β) στα χονδροκύτταρα υποστηρίζει ότι ο αρθρικός χόνδρος υπόκειται στη δράση των οιστρογόνων [53]. Η απώλεια των οιστρογόνων μετά την ηλικία των 50 στις γυναίκες ελαττώνει τον ρυθμό αναδιαμόρφωσης του υποχόνδριου οστού, συνεισφέροντας στην παθοφυσιολογία της ΟΑ [54].

Άρθρωση	Επιπολασμός ΟΑ - Γυναίκες	Επιπολασμός ΟΑ - Άνδρες	Επιπολασμός ΟΑ - Σύνολο
Γόνατο	27.3%* 95% CI [26.9–27.7] $I^2 = 99.3\%$	21.0%* 95% CI [20.5–21.5] $I^2 = 99.7\%$	23.9% 95% CI [23.6–24.2] $I^2 = 99.8\%$
Ισχίο	11.6% 95% CI [11.1–12.1] $I^2 = 99.7\%$	11.5% 95% CI [11.0–12.1] $I^2 = 99.9\%$	10.9% 95% CI [10.6–11.2] $I^2 = 99.8\%$
Χέρι	43.3% 95% CI [42.6–44.0] $I^2 = 99.1\%$	44.5% 95% CI [43.5–45.5] $I^2 = 99.9\%$	43.3% 95% CI [42.7–42.9] $I^2 = 100\%$

* $P < 0.01$ μεταξύ ανδρών - γυναικών με τη δοκιμασία Mann - Whitney

Εικόνα 3. Συνολικός επιπολασμός ΟΑ γόνατος, ισχίου, χεριού (95% CIs) ανάλογα με το φύλο και τη θέση της άρθρωσης [51].

A.1.5.3 Δείκτης μάζας σώματος

Ισχυρή συσχέτιση έχει αναφερθεί μεταξύ του BMI και της ΟΑ γόνατος [31]. Η αύξηση του BMI αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας, αλλά ταυτόχρονα είναι ένας ευμετάβλητος παράγοντας διότι η προδιάθεση που εμφανίζει εξαρτάται από ένα συνδυασμό μεταβολικών παραγόντων και αυξάνεται σε αρθρώσεις που υποβαστάζουν το βάρος [29]. Συνεπώς το αυξημένο BMI σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ γόνατος [55]. Στους συμμετέχοντες στη μελέτη Framingham, τα παχύσαρκα ή υπέρβαρα άτομα εμφάνιζαν σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν ΟΑ γόνατος [30]. Στη ίδια μελέτη, τα άτομα τα οποία έχασαν βάρος εμφάνιζαν πλέον μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ συγκριτικά με αυτά που διατήρησαν σταθερό το βάρος τους [56]. Ωστόσο αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ του BMI και της εμφάνισης ΟΑ δεν οφείλεται αποκλειστικά στο μηχανικό φορτίο, καθώς δεν έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ του βάρους σώματος και της ΟΑ ισχίου, ενώ είναι μία άρθρωση που επιβαρύνεται εξίσου με το γόνατο από το αυξημένο βάρος [57]. Μία άλλη μελέτη αργότερα απέδειξε ότι η μείωση του κινδύνου εμφάνισης ΟΑ δεν οφείλεται τόσο στην απώλεια βάρους αλλά στην απώλεια λίπους [58]. Επίσης σε τουλάχιστον τρεις μελέτες αναφέρεται η ανάπτυξη ΟΑ χεριού σε άτομα τα οποία είχαν BMI στην κλίμακα του παχύσαρκου ή υπέρβαρου [57, 59]. Τέλος, η μελέτη Chingford υποστηρίζει ότι τα άτομα τα οποία είχαν ΟΑ γόνατος εμφάνιζαν όλα τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, όπως υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, υπεργλυκαιμία, χαμηλή HDL και κοιλιακή

παχυσαρκία σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από το γενικό πληθυσμό (59% έναντι 23%) [31, 60].

A.1.5.4 Γενετική Προδιάθεση: τύποι μελετών

Στην εκδήλωση και την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο γενετικός παράγοντας, ο οποίος μελετήθηκε πρώτη φορά το 1940. Στα μέσα όμως του 1990 ξεκίνησαν ουσιαστικές και αναλυτικές μελέτες για την ανίχνευση γενετικών τόπων που να σχετίζονται στενά με την ανάπτυξη της πρωτοπαθούς ΟΑ. Μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες καθώς και μελέτες διδύμων έχουν αναδείξει τη συμμετοχή του γενετικού παράγοντα στην αιτιολογία της ΟΑ (εικόνα 4). Αρχικά περιελάμβαναν τη διερεύνηση υποψήφιων γονιδίων που θα προδιέθεταν για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Οι μέθοδοι με τις οποίες διερευνήθηκε ο γενετικός παράγοντας αφορούσαν (α) την παραμετρική ανάλυση σύνδεσης σε απομονωμένες οικογένειες κατά τις οποίες η ΟΑ κληρονομείται ως μεντελικό χαρακτηριστικό με σκοπό την ανίχνευση κάποιου υποψήφιου γενετικού τόπου, (β) τις μελέτες σύνδεσης σε μοντέλα διδύμων και (γ) τις μελέτες συσχέτισης σε γνωστά γονίδια [61]. Επίσης, η γενετική αιτιολογία της ΟΑ προσεγγίστηκε με μελέτες έκφρασης, οι οποίες αποσκοπούν στην ανίχνευση των λειτουργικών μορίων που κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία είτε υπερ- είτε υπο-εκφράζονται σε αρθρικό χόνδρο ΟΑ σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό.

Όσον αφορά στις μελέτες ανάλυσης σύνδεσης, τέσσερις μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες (Φιλανδία [62], Ηνωμένο Βασίλειο [63, 64], Ισλανδία [65], ΗΠΑ [66, 67]) πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή υποψήφιων γενετικών τόπων στην ΟΑ. Οι προσπάθειες των μελετών ανέδειξαν γενετικούς τόπους στα χρωμοσώματα 2, 4, 6, 7, 11, 16, X, με το χρωμόσωμα 2 να εμφανίζει θετική συσχέτιση σε όλες τις μελέτες (εικόνα 4) [61].

Στους γενετικούς τόπους που αποκάλυψαν οι παραπάνω μελέτες, εδράζονται γονίδια τα οποία διερευνήθηκαν περαιτέρω ως προς τη συσχέτισή τους με την ΟΑ. Στις περιοχές αυτές εδράζονται γονίδια που κωδικοποιούν κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1 στο χρωμόσωμα 2 (2q11.2-q13) [61, 62, 68-70] και η ιντερλευκίνη-4 στο χρωμόσωμα 16 (16p12.1) [63, 71]. Επιπλέον το γονίδιο MATN3

Country	Locus	Gene	Strata
UK	2q24.3-q31.1	<i>FRZB</i>	Female hip
	4q13.1-q13.2	-	Female hip
	6p12.3-q13	-	Female hip
	11q13.4-q14.3	-	Female hip
	16p12.3-p12.1	<i>IL4R</i>	Female hip
	16q22.1-q23.1	-	Females
Finland	2q12-q21	IL1 cluster	Hand (DIP ^a), knee and hip
	4q26-q27	-	Hand (DIP ^a)
	7p15-p21	-	Hand (DIP ^a)
	Xcen	-	Hand (DIP ^a)
Iceland	2p24.1	<i>MATN3</i>	Hand (CMC ^b and DIP ^a)
	3p13-p12.3	-	Hand (DIP ^a)
USA	4q32.1-q32.2	-	Hand (DIP ^a)
	1p32.1-p22.1	-	Hand ^a
	2p24.2-p21	-	Hand ^a
	7p14.1-p12.3	-	Hand ^a
	7q35-q36.1	-	Hand (DIP ^a)
	9q21.13-q21.33	-	Hand ^a
	11q13.2-q14.2	-	Hand ^a
	12q24.33	-	Hand ^a
	13q14.11-q14.3	-	Hand ^a
15q22.31-q26.1	-	Hand (CMC ^b)	
19q12-q13.33	-	Hand ^a	

Εικόνα 4. Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ΟΑ. Αποτελέσματα 4 μεγάλων πολυκεντρικών μελετών

(χρ 2p24.1) το οποίο κωδικοποιεί για τη δομική πρωτεΐνη matrilin-3 [72] στον χόνδρο, το γονίδιο FRZB (χρ 2q32.1) του χονδρογενικού ρυθμιστή της εκκρινόμενης και σχετιζόμενης με θηλιά πρωτεΐνης 3 (chondrogenic regulator secreted frizzled-related protein 3) [73]. Η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται από τον αρθρικό χόνδρο ενήλικου ατόμου και δρα ως ανταγωνιστής στους προσδέτες για το μονοπάτι Wnt [74]. Το μονοπάτι αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη χονδρογένεση και η πρωτεΐνη frizzled-related 3 έχει βρεθεί ότι ελέγχει την ωρίμανση των χονδροκυττάρων [75]. Ένα ακόμα γονίδιο είναι αυτό της BMP5 (χρ 6p12.1) που κωδικοποιεί για τη μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (bone morphogenetic protein 5) και ανήκει στη υπεροικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (transforming growth factor, TGFβ) που συμμετέχει στη ρύθμιση και διατήρηση του αρθρικού χόνδρου [76].

Οι μελέτες σύνδεσης αντικαθίστανται από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος. Στις μελέτες συσχέτισης γονιδίων κυρίαρχη θέση κατέχουν τα δομικά γονίδια του εξωκυττάρου στρώματος του χόνδρου και του οστού και γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού αυτών των ιστών.

Όσον αφορά στα δομικά γονίδια της εξωκυττάριας ουσίας, το κολλαγόνο τύπου II (COL2A1) (χρ 12q13.11) [77], αποτελεί κύριο συστατικό του αρθρικού χόνδρου. Επίσης μελετήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν το κολλαγόνο IX και XI, καθώς και γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μη κολλαγονικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας όπως η αγγρεκάνη (AGC) και η ολιγομερή πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας του χόνδρου (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) (χρ 19p13.11). Επιπλέον αναδείχθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του γονιδίου της asporin (ASPN) [78, 79] και της καλμοδουλίνης (CALM1) [80-82] με την OA. Η ASPN είναι μία πρωτεΐνη του εξωκυττάρου στρώματος του χόνδρου και κατέχει σημαντική θέση στη διαδικασία της χονδρογένεσης. Πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο ASPN αφορούν τον αριθμό επαναλήψεων που επηρεάζει το μήκος του ασπαρτικού οξέος στην πρωτεΐνη. Οι επαναλήψεις αυτές ποικίλουν από 12 έως 18. Ο πιο συνήθης αριθμός είναι 13 (D13), ενώ το αλληλόμορφο με D14 έχει σχετιστεί στενά με την OA γονάτου σε μεγάλο δείγμα πληθυσμού. Η έκφραση του D14 σε OA γονάτου είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς [79]. Συνολικά, οι μελέτες αυτές δεν προσκόμισαν επαρκή στοιχεία για το ρόλο μεταλλάξεων σε γονίδια δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας στη δημιουργία της OA [61, 68] ενώ οι πολυμορφισμοί του κολλαγόνου τύπου II βρέθηκε ότι συνδέονταν περισσότερο με την ανάπτυξη χονδροδυσπλασιών παρά με OA [83, 84]. Επομένως οι μεταλλάξεις που μπορεί να ανιχνευθούν στην αλληλουχία των γονιδίων αυτών δεν έχουν μεγάλη συχνότητα ώστε να αποτελούν παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη OA στον γενικό πληθυσμό [85].

Στη δεύτερη κατηγορία γονιδίων περιλαμβάνονται αυτά που συμμετέχουν στο μεταβολισμό τόσο του χόνδρου όσο και του οστού, όπως ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR, χρ q13.1) [86] και του οιστρογονικού υποδοχέα α (ESRα, χρ 6q25.1). Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει τα δύο αυτά γονίδια με την ΟΑ [87, 88]. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώνονται από όλες τις μελέτες καθώς η ΟΑ είναι ένα ετερογενές νόσημα και δεν οφείλεται στη διαταραχή μεμονωμένων γονιδίων [89]. Παρόλα αυτά η συμβολή των παραπάνω γονιδίων διερευνάται διαρκώς και ένας αριθμός μελετών συσχετίζει θετικά τα γονίδια αυτά με την εμφάνιση της ΟΑ [90, 91].

Από τις μελέτες ανάλυσης σύνδεσης προέκυψε ότι στο χρωμόσωμα 2 εδράζεται το γονίδιο για την IL-1, η οποία είναι μία βασική προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που διαμεσολαβεί πολλές κυτταρικές αποκρίσεις [70]. Στο ιστορικό της ΟΑ περιλαμβάνεται μία χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που διαδραματίζεται στο αρθρικό περιβάλλον και στο οποίο συμμετέχουν μία ομάδα κυτοκινών. Τέτοιες κυτοκίνες παράγονται από τα χονδροκύτταρα σε απόκριση μεταγραφικών παραγόντων και ασκούν τη δράση τους είτε παρακρινώς είτε αυτοκρινώς [6]. Σημαντικότερο ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση διαδραματίζουν οι IL-1, IL-4 και ο υποδοχέας της IL-4 (IL-4R) [70]. Πολυμορφισμοί στα γονίδια της IL-1 και του IL-4R συσχετίζονται με την εμφάνιση της ΟΑ, ενώ η IL-4 και ο IL4R διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του αρθρικού χόνδρου στα μηχανικά ερεθίσματα, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητάς του [69, 70, 92, 93]. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών προσδίδουν υψηλό παράγοντα κινδύνου σε αυτά τα γονίδια όσον αφορά στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΟΑ.

Εναλλακτικός τρόπος προσέγγισης της συμβολής του γενετικού παράγοντα στην ΟΑ αποτελούν οι μελέτες έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Αρχικά οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε γονίδια που εκφράζονται στα χονδροκύτταρα και συμμετέχουν στη διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και την απόκρισή του σε μεταβολικές αλλαγές του περιβάλλοντος (πίνακας 1). Ανιχνεύθηκε διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ οστεοαρθρικού και φυσιολογικού χόνδρου σε 54 γονίδια, από τα οποία οι ερευνητές κατέληξαν σε 12 με κριτήριο τα γονίδια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους, όπως η μεταλλοπρωτεΐνάση ADAM12, ο οιστρογονικός υποδοχέας ESR1, η οστεοπροτεγερίνη και η πρωτεΐνη CILP [94]. Επίσης μία πρόσφατη μελέτη ανέδειξε 76 προϊόντα γονιδίων με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ οστεοαρθρικού και φυσιολογικού χόνδρου μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται ο μεταγραφικός παράγοντας SOX11, ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης GDF15 και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών FGF23 [95].

Τέλος ένα παράδειγμα γονιδίου με διαφοροποιημένη έκφραση αποτελεί το γονίδιο ASPN, όπως αναφέρθηκε και στις μελέτες συσχέτισης. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ASPN επηρεάζει την έκφραση δομικών πρωτεϊνών του χόνδρου, της αγγρεκάνης AGC1 και του COL2A1 [78, 79]. Οι πρωτεΐνες αυτές επάγονται φυσιολογικά από τον TGFβ, ο οποίος εμφανίζει χονδροπροστατευτική δράση. Συνεπώς η ASPN αλληλεπιδρά με τον TGFβ και επηρεάζει την έκφραση της AGC1 και του COL2A1[78].

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Ρόλος
BMP2, Bone morphogenetic protein 2	20p12.3	Εμφάνιση OA
CD36, trombospondin and collagen receptor	7q21.11	Εμφάνιση OA
COX2, cyclooxygenase	1q25	Εμφάνιση OA
NCOR2, nuclear receptor co-repressor	12q24.31	Εμφάνιση OA
CILP, cartilage intermediate-layer protein	15q22.31	Εξέλιξη OA
OPG, osteoprotegerin	8q24.12	Εξέλιξη OA
TNA, tetranectin	1p21.31	Εξέλιξη OA
ESR1, estrogen receptor α	6q25.1	Εξέλιξη OA
ADAM12, metalloproteinase	10q26.2	Εμφάνιση και Εξέλιξη OA

Πίνακας 1. Γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ή/και εξέλιξη της OA όπως προέκυψε από μελέτες έκφρασης [96].

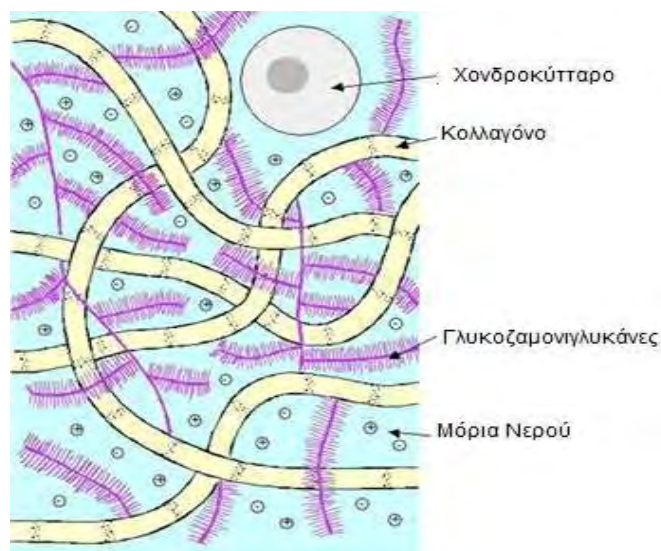
A.1.6 Δομή του αρθρικού χόνδρου

Ο φυσιολογικός χόνδρος ενήλικα ατόμου στερείται αγγείωσης και λέμφου και αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο πρωτεογλυκανών (12%) και κολλαγόνου (15-22%), το οποίο δημιουργεί την εξωκυττάρια ουσία, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα χονδροκύτταρα (5%). Το υπόλοιπο 65-80% αποτελείται από νερό [97] (Εικόνα 5).

Η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου II, το οποίο συνδέεται με τις πρωτεογλυκάνες. Η αγγρεκάνη (aggrecan) αποτελεί την χαρακτηριστική πρωτεογλυκάνη, εκφράζεται πρωταρχικά στα χονδροκύτταρα και συνδέεται στο N-τελικό της άκρο με το υαλουρονικό οξύ [98]. Το κολλαγόνο τύπου II δημιουργεί ένα πολύ στενό δίκτυο ινών αλληλεπιδρώντας με το κολλαγόνο IX και XI (σε αναλογία 1:10 συγκριτικά με το κολλαγόνο II), το οποίο περιβάλλεται από τις πρωτεογλυκάνες συνιστώντας τη δομή του χόνδρου. Οι πρωτεογλυκάνες είναι σύνθετα μακρομόρια με ένα πρωτεϊνικό κέντρο στο οποίο συνδέονται αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών, όπως θειική χονδροϊτίνη και θειική κερατίνη. Ο εγκλωβισμός των πρωτεογλυκανών στο δίκτυο ινών του κολλαγόνου προσφέρει στον ιστό μοναδικές μηχανικές ιδιότητες. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι αρνητικά φορτισμένα

μόρια και είναι υπεύθυνες για την ενυδάτωση του ιστού [97, 99]. Το αρνητικό φορτίο που δημιουργούν στον ιστό έχει σαν αποτέλεσμα την προσέλκυση κατιόντων και την αύξηση της οσμωτικής πίεσης του χόνδρου. Στη συνέχεια προσελκύνονται μόρια νερού και ελαττώνεται η οσμωτικότητα του ιστού. Το νερό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του αρθρικού χόνδρου. Προσδίδει υψηλή υδροστατική πίεση και έτσι ο χόνδρος μπορεί να υποστεί την επίδραση μεγάλων μηχανικών δυνάμεων. Επίσης, κατά τη συστολή της άρθρωσης, ένα στρώμα νερού εξέρχεται και καλύπτει την επιφάνεια του χόνδρου, ελαττώνοντας ακόμα περισσότερο τις τριβές και διευκολύνει τη ολίσθηση των δύο αρθρικών επιφανειών.

Επομένως, ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός που δέχεται υψηλές πιέσεις, αλλά το δίκτυο του κολλαγόνου ενεργεί αντισταθμιστικά στην οσμωτική πίεση αποτρέποντας τη διόγκωση. Έτσι ο αρθρικός χόνδρος προσφέρει μία επιφάνεια με ελάχιστες τριβές και μεγάλη ανθεκτικότητα αλλά μικρή αναγεννητική ικανότητα [97].



Εικόνα 5. Δομικά συστατικά του υαλώδους χόνδρου

A.1.7 Μεταβολισμός του αρθρικού χόνδρου

Ο αρθρικός χόνδρος στερείται αγγείωσης με αποτέλεσμα τα χονδροκύτταρα να προσλαμβάνουν το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά από το αρθρικό υγρό με απλή διάχυση. Επίσης οι ενεργειακές απαιτήσεις των χονδροκυττάρων καλύπτονται μέσω της γλυκοζυλίωσης, όπου η γλυκόζη μετατρέπεται αναερόβια σε λακτόζη [97]. Τα χονδροκύτταρα συνδέονται με το εξωκυττάριο στρώμα μέσω πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, τις ιντεγκρίνες, και αποκρίνονται σε μηχανικές φορτίσεις. Ομοίως τα χονδροκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για ποικίλους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες και ρυθμίζουν τόσο

αναβολικές όσο και καταβολικές διεργασίες σε απόκριση αυτών των παραγόντων [97]. Στα πλαίσια του φυσιολογικού μεταβολισμού του χόνδρου, τα χονδροκύτταρα παράγουν τόσο τα δομικά συστατικά του στρώματος (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες) όσο και τα ένζυμα που τα αποικοδομούν [97].

Ο μεταβολισμός του χόνδρου περιλαμβάνει δύο φάσεις. Μία βιοσυνθετική ή αναβολική, κατά την οποία τα χονδροκύτταρα, προσπαθούν να διατηρήσουν το φυσιολογικό φαινότυπο του ιστού ή να αποκαταστήσουν την κατεστραμμένη εξωκυττάρια ουσία, και μία καταβολική ή εκφυλιστική φάση, κατά την οποία τα χονδροκύτταρα παράγουν ένζυμα που αποικοδομούν την εξωκυττάρια ουσία ενώ παράλληλα αναστέλλεται και η σύνθεσή της (εικόνα 6). Σε φυσιολογικές συνθήκες τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αναβολισμού-καταβολισμού [97].

Η επίδραση του μηχανικού φορτίου αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που συμμετέχει στο μεταβολισμό του χόνδρου. Κατά τη διάρκεια της συστολής της άρθρωσης, το ενδιάμεσο υγρό, το οποίο περιέχει κύτταρα και απαραίτητους μεταβολίτες του ιστού, διαχέεται ανάμεσα στο στρώμα κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών. Με την άρση του φορτίου το υγρό αποσύρεται. Αυτό έχει σαν επακόλουθο αλλαγές στην υδροστατική πίεση οι οποίες αλλάζουν και τη μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων και τελικά επάγουν την παραγωγή νέου στρώματος. Η παραγωγή νέου στρώματος εξαρτάται από τη συχνότητα και το μέγεθος του μηχανικού φορτίου που εφαρμόζεται [100].



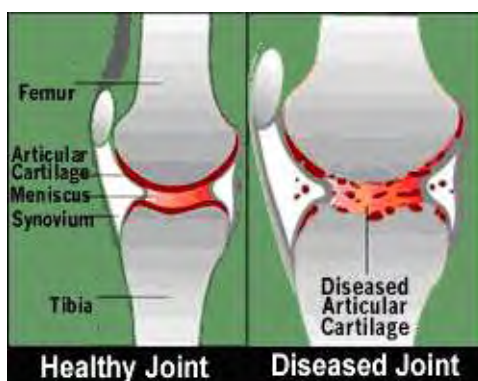
Εικόνα 6. Μεταβολισμός αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα διατηρούν την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού στον αρθρικό χόνδρο [101].

A.1.8 Αρθρικός χόνδρος και οστεοαρθρίτιδα

Η απώλεια της ακεραιότητας του χόνδρου και της διασύνδεσης του κολλαγόνου με τις πρωτεογλυκάνες αποτελούν χαρακτηριστικά των πρώτων σταδίων της ΟΑ (εικόνα 7). Σε περιπτώσεις που η ισορροπία του μεταβολισμού του χόνδρου διαταράσσεται, η αναβολική δραστηριότητα δεν μπορεί να εξισορροπήσει την καταβολική με συνέπεια την έναρξη της αποδόμησης του χόνδρου [102-105].

Τόσο η σύνθεση του κολλαγόνου όσο και της αγγρεκάνης αυξάνονται με σκοπό να αποκαταστήσουν τη βλάβη. Ο ρυθμός βιοσύνθεσής τους όμως δεν μπορεί να υπερβεί αυτό της αποικοδόμησής τους με αποτέλεσμα να αυξάνεται η οσμωτική πίεση στην περιοχή και έτσι προκύπτει η διόγκωση της άρθρωσης. Από τη στιγμή που θα ξεκινήσει ο εκφυλισμός του χόνδρου, μηχανικοί και βιολογικοί παράγοντες συμμετέχουν στην εξέλιξή του [106].

Έχει βρεθεί ότι ένα σύνολο βιολογικών μορίων οδηγούν στη σταδιακή αποικοδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Τα γεγονότα που προκαλούν τη διαταραχή της ομοιοστασίας στο περιβάλλον της άρθρωσης μπορεί να οφείλονται σε τραυματισμό της άρθρωσης, σε κληρονομικούς ή άλλους παράγοντες. Καθώς ο χόνδρος αρχίζει να εκφυλίζεται, αναβολικά μόρια τα οποία προσπαθούν να αποκαταστήσουν τη βλάβη δημιουργούν περιοχές ασβεστοποίησης (συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} και Pi) στα κατεστραμμένα σημεία του χόνδρου και της υποκείμενης οστικής επιφάνειας. Οι δομικοί αυτοί σχηματισμοί ονομάζονται οστεόφυτα ή καλύτερα, οστεοχονδρόφυτα (osteophytes, osteochondrophytes) [106]. Τα οστεόφυτα διεισδύουν στο υποκείμενο υποχόνδριο οστό και το τραυματίζουν, ενώ παράλληλα εναποτίθενται στην επιφάνειά του και αυξάνουν το μέγεθός του. Πολλές φορές ο σχηματισμός τους συνοδεύεται και από το σχηματισμό αγγείων και νευρικών ινών, λόγω των αιμοφόρων αγγείων που διεισδύουν στην περιοχή της βλάβης, τα οποία συνοδεύονται από αισθητικές νευρικές ίνες. Σε αυτό το λόγο θα μπορούσε να αποδοθεί ο έντονος και επίμονος πόνος για τον οποίο διαμαρτύρονται οι ασθενείς, αλλά απαιτείται διερεύνηση [107].



Εικόνα 7. Στα αριστερά φαίνεται μία φυσιολογική άρθρωση, ενώ στα δεξιά μία άρθρωση με οστεοαρθρίτιδα, στην οποία έχει αρχίσει η καταβολική διαδικασία του χόνδρου.

A.1.9 Χονδροκύτταρα και οστεοαρθρίτιδα

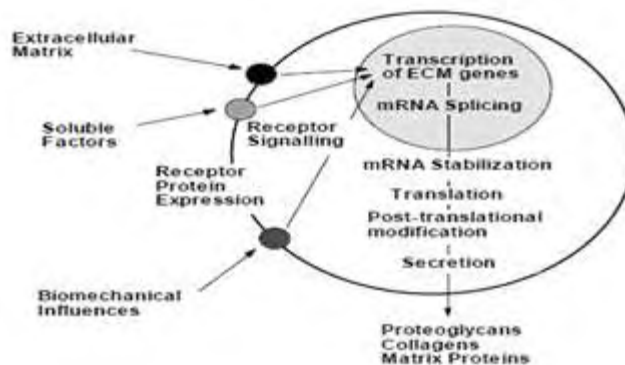
Ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου που παρατηρείται στην ΟΑ οφείλεται σε έναν πολύπλοκο συνδυασμό περιβαλλοντικών, μεταβολικών και βιοχημικών παραγόντων. Στην ΟΑ, τα χονδροκύτταρα, αλλά επίσης και κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης και όλων των ιστών της άρθρωσης ενεργοποιούνται λόγω

περιβαλλοντικών αλλαγών, μηχανικής επιφόρτισης, φλεγμονωδών κυτοκινών και προϊόντων αποικοδόμησης, με αποτέλεσμα τη διαταραχή του μεταβολισμού των χονδροκυττάρων [108]. Η μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων, επαγωγή της απόπτωσης και έκφραση καταβολικών και φλεγμονωδών γονιδίων [109].

Ο αρθρικός χόνδρος απελευθερώνει στο αρθρικό περιβάλλον μόρια φλεγμονής όπως η IL-1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (Tumor Necrosis Factor α, TNF-α), καθώς και πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία διαπερνούν την αρθρική μεμβράνη και αποικοδομούν τον αρθρικό χόνδρο [110]. Οι πιο καλά μελετημένες κυτοκίνες στον αρθρικό χόνδρο είναι ο TNF-α και η IL-1β, οι οποίες εκφράζονται κυρίως στα πρώιμα και τελικά στάδια της νόσου. [6, 111, 112]. Στην ΟΑ άρθρωση τα χονδροκύτταρα εκφράζουν την IL-1β και τον TNF-α, τα οποία δρουν αυτοκρινώς και παρακρινώς και επάγουν μόνα τους την παραγωγή τους μέσω θετικής ανατροφοδότησης [113, 114]. Επίσης, εμπλέκονται στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων, διαταράσσοντας την ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών μέσω ενίσχυσης των καταβολικών μονοπατιών [111, 115, 116]. Στη δράση τους συγκαταλέγεται επίσης η επαγωγή αποικοδομητικών ενζύμων όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες (metalloproteinases, MMPs), αγγρακενάσες, συνθάση επαγόμενη από το οξειδίο του νατρίου (inducible nitric oxide synthase, iNOS), κυκλοξυγενάση (cyclooxygenase 2, COX-2), καθώς περιορίζουν επίσης τη σύνθεση του ιστικού αναστολέα μεταλλοπρωτεϊνών (tissue inhibitor metalloproteinases, TIMP) [117-124]. Η φλεγμονώδης διεργασία προωθείται από την IL-1β και τον TNF-α μέσω επαγωγής και άλλων κυτοκινών όπως IL-8 και IL-6, οξειδίου του νατρίου (NO) και της παραγωγής προσταγλανδίνης E₂ (prostaglandin E₂) [6, 125-127]. Τα χονδροκύτταρα στον ΟΑ χόνδρο υπερεκφράζουν επίσης τον υποδοχέα της IL-1 (IL-1 receptor, IL-1R), τις μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1, MMP-3, MMP-8 και MMP-13, σε περιοχές όπου παρατηρείται διάβρωση του ECM και επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την αναδιαμόρφωσή του [128] (εικόνα 8).

Η διάβρωση των συστατικών του ECM, δηλαδή του κολλαγόνου II και των πρωτεογλυκανών από αποικοδομητικά ένζυμα αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων της ΟΑ. Τα χονδροκύτταρα στην προσπάθειά τους να επαναφέρουν την ισορροπία στο ECM, ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό τους, τη σύνθεση COL2A1 και πρωτεογλυκανών [113, 129]. Τελικά, στην επιφανειακή στιβάδα του αρθρικού χόνδρου, η σύνθεση COL2A1 περιορίζεται και δημιουργείται ένα νέο εξωκυττάριο στρώμα που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου III και ινονεκτίνη, διαβρώνεται με ευκολία και σταδιακά αποδομείται [130, 131]. Σε αντίθεση, τα χονδροκύτταρα της μεσαίας και των βαθύτερων στιβάδων

παρουσιάζουν φυσιολογικό μεταβολισμό και παράγουν μόρια ECM που προέρχονται από τον χόνδρο [113].



Εικόνα 8. Επίδραση παραγόντων του ECM στην έκφραση γονιδίων στα χονδροκύτταρα [132]

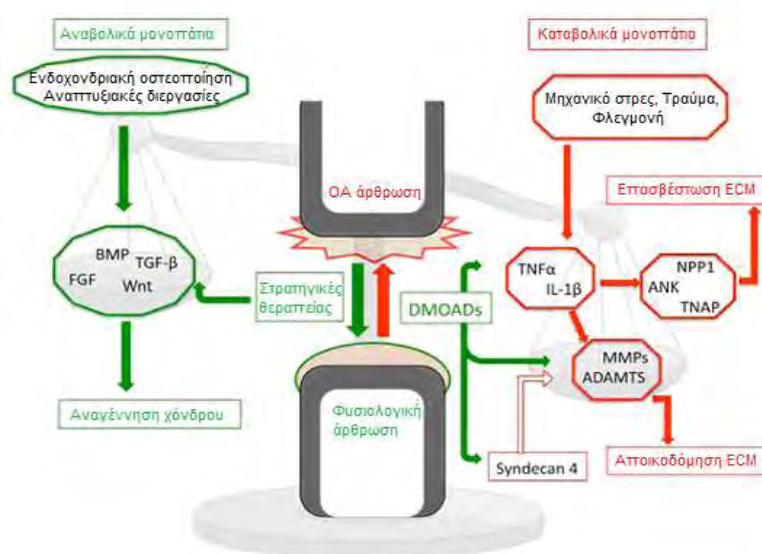
Η δράση των μεταλλοπρωτεϊνών περιλαμβάνει την αποικοδόμηση όλων των ειδών των πρωτεϊνών του εξωκυττάρου στρώματος και την μετατροπή πρόδρομων ανενεργών μορίων σε δραστικά μόρια. Είναι ενδοπεπτιδάσες, ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών και συμμετέχουν στην αποκοπή υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, στην απελευθέρωση αποπτωτικών μορίων πρόσδεσης (FAS ligand) και στην ενεργοποίηση-απενεργοποίηση χημοκινών (chemokines). Οι MMPs παίζουν σπουδαίο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση-προσκόλληση κυττάρων, την απόπτωση, διαφοροποίηση και αγγειογένεση, ενώ εμφανίζουν ανοσολογική δράση. Το επίπεδο ενεργοποίησης των MMPs σχετίζεται με την εμφάνιση των πρώτων σταδίων της ΟΑ, ενώ κατά την εξέλιξη της νόσου παρατηρείται ενισχυμένη ενεργοποίηση [133-135] (εικόνα 9). Με την απελευθέρωση των MMPs, εκφράζονται συγχρόνως οι TIMPs, προκειμένου να ρυθμίσουν την πρωτεολυτική και βιολογική τους δράση. Τόσο οι TIMPs όσο και οι MMPs παράγονται από τα χονδροκύτταρα. Σε φυσιολογικό αρθρικό περιβάλλον, η δράση των TIMPs είναι ελαφρώς ενισχυμένη συγκριτικά με αυτή των MMPs, συμμετέχοντας στην ομοιοστασία του ECM. Αντίθετα στον ΟΑ χόνδρο, η ισορροπία μεταξύ TIMPs-MMPs, τείνει προς τις MMPs, με αποτέλεσμα την σταδιακή αποδόμηση του ECM [136]. Στο αρθρικό περιβάλλον οι κολλαγενάσες MMP-1, MMP-8 και MMP-13 διασπούν το κολλαγόνο, οι στρομελυσίνες MMP-3, MMP-10 και MMP-11 τις πρωτεογλυκάνες, η MMP-3 συμμετέχει επίσης στη μετατροπή των πρόδρομων μορφών (pro-MMPs) σε ενεργές στις περισσότερες MMPs, ενώ οι γελατινάσες MMP-2 και MMP-9, έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου [137-140]. Από τις κολλαγενάσες, η MMP-13 είναι υπεύθυνη για τη υδρόλυση του κολλαγόνου II στον ΟΑ χόνδρο κατά δέκα φορές περισσότερο απ' ό,τι η MMP-1 ή MMP-8. Επιπλέον η MMP-13 διασπά την αγγρεκάνη,

εμφανίζοντας διπλό ρόλο στον καταβολισμό του ECM στην ΟΑ [141]. Αντίθετα, η MMP-1 εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση για τη διάσπαση του κολλαγόνου III, ενώ η MMP-8 για το κολλαγόνο I. Εφόσον στα θηλαστικά το δίκτυο ινών κολλαγόνου αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο II, η MMP-13 αποτελεί την κύρια κολλαγενάση του καταβολισμού του κολλαγόνου στην ΟΑ [142].

Στην αποδόμηση του ECM του αρθρικού χόνδρου, σημαντικό ρόλο εμφανίζει και μία άλλη κατηγορία ενζύμων, οι αγγρακενάσες (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs, ADAMTs) (εικόνα 9). Σε αντίθεση με τις κολλαγενάσες, οι ADAMTs ευθύνονται για τη διασπάση της αγγρεκάνης, της κύριας πρωτεογλυκάνης του ECM του αρθρικού χόνδρου. Η διάσπαση της αγγρεκάνης αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων της ΟΑ, οδηγώντας στη λειτουργική και δομική διαταραχή του ECM και ακολούθως στην απώλεια των ινών κολλαγόνου [143]. Από όλες τις ADAMTs, η ADAMT-4 και η ADAMT-5, εμφανίζουν τη μεγαλύτερη εξειδίκευση προς τη διάσπαση της αγγρεκάνης. Επίσης, εκφράζονται διαρκώς από τα χονδροκύτταρα και επάγονται από τις κυτοκίνες που προωθούν τη φλεγμονή, όπως IL-1 β και TNF- α [119, 144, 145]. Στον ΟΑ χόνδρο ανθρώπου εκφράζεται τόσο η ADAMT-4 όσο και η ADAMT-5 και συμβάλουν στη διάσπαση του ECM κατά την εξέλιξη της νόσου [134].

Στη διαταραχή του μεταβολισμού των χονδροκυττάρων συμβάλει και η απώλεια της λειτουργίας αυξητικών παραγόντων. Τα χονδροκύτταρα του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου συνθέτουν και εκκρίνουν πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες που εμφανίζουν αυτοκρινή δράση (εικόνα 9). Ένας από τους πιο σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες με χονδροπροστατευτική δράση είναι ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor β , TGF- β). Ο TGF- β προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των χονδροκυττάρων και ενεργοποιεί ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια για την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Μεταλλάξεις στον γονίδιο του υποδοχέα του TGF- β οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του υποδοχέα του και έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση πρώιμης οστεοαρθρίτιδας [146]. Επίσης, ποντίκια που δεν διαθέτουν τον μεταγραφικό παράγοντα Smad3, ο οποίος ενεργοποιείται μόνο από τον TGF- β , εμφανίζουν πρόωρη οστεοαρθρίτιδα [147]. Σε άλλες μελέτες τέλος, φαίνεται ότι ο TGF- β επάγει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου ενώ αναστέλλει την αποικοδόμηση του στρώματος και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [148]. Στην υπεροικογένεια των TGF- β ανήκει και η οικογένεια των μορφογενετικών πρωτεϊνών του οστού BMP (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) – εκτός της BMP-1. Μερικές BMPs έχει βρεθεί ότι προάγουν την χονδρογένεση και επάγουν τη σύνθεση πρωτεογλυκανών *in vitro*, συμβάλλοντας στην διατήρηση του υγιούς φαινότυπου των χονδροκυττάρων [149].

Άλλοι αυξητικοί παράγοντες που εμφανίζουν αναβολική δράση στον αρθρικό χόνδρο είναι ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (Insulin – like growth factor 1, IGF-1). Ο IGF-1 παράγεται από τα χονδροκύτταρα και σε συνεργασία με την επίδραση του μηχανικού φορτίου, αυξάνει τη σύνθεση τόσο του κολλαγόνου όσο και των πρωτεογλυκανών [150]. Σε χονδροκύτταρα OA χόνδρου ο IGF-1 εμφανίζει μειωμένη έκφραση, ενώ αυξάνεται η έκφραση των πρωτεϊνών που τον δεσμεύουν (IGF-1 Binding Proteins), με αποτέλεσμα την ελάττωση της βιοδιαθεσιμότητάς του στον αρθρικό χόνδρο και την ενίσχυση της καταβολικής διεργασίας. Η γήρανση είναι ένας παράγοντας στον οποίο οφείλεται η παραγωγή μειωμένων επιπέδων IGF-1 από τα χονδροκύτταρα [151].



Εικόνα 9. Μόρια που εμπλέκονται στις αναβολικά και καταβολικά μονοπάτια της OA άρθρωσης. Διαταραχές στη λειτουργία των χονδροκυττάρων οδηγούν σε ανισορροπία μεταξύ των αναβολικών και καταβολικών διεργασιών με αποτέλεσμα την ενισχυμένη αποδόμηση και επασβεστώση του ECM, καθώς και την αναστολή της σύνθεσής του. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται τα αναβολικά μονοπάτια και με κόκκινο τα καταβολικά [108].

Σημαντικό ρόλο στον εκφυλισμό του OA χόνδρου διαδραματίζει η απόπτωση των χονδροκυττάρων. Η γήρανση αποτελεί ένα φυσικό αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση OA, όπου παρατηρείται αυξημένη απώλεια χονδροκυττάρων που οδηγεί σταδιακά στον εκφυλισμό του χόνδρου και οφείλεται στην αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα [152, 153]. Τα χονδροκύτταρα που αποπύπτουν δημιουργούν αποπτωτικά σωμάτια τα οποία συγκεντρώνουν ιόντα Pi και Ca^{2+} , μετατρέπονται σε κυστίδια εξωκυττάρου στρώματος (matrix vesicles, MV), τα οποία ευθύνονται για τη δημιουργία περιοχών επασβεστώσης στον OA χόνδρο [154]. Οι μηχανισμοί και τα μόρια τα οποία μεσολαβούν στην επαγωγή της απόπτωσης των χονδροκυττάρων δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι αλλά *in vitro*

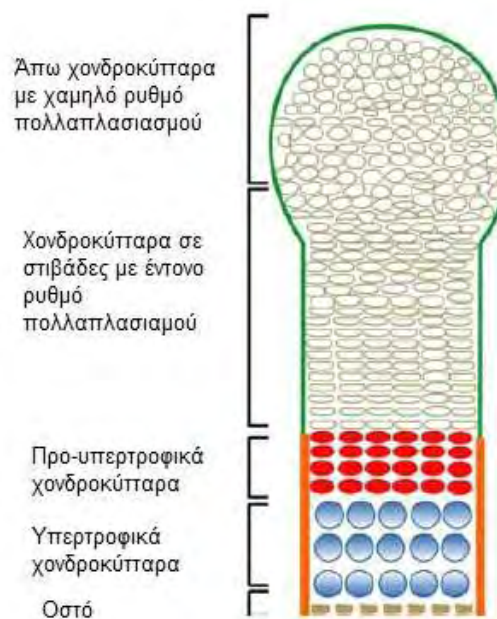
μελέτες έως τώρα υποστηρίζουν τη συμβολή του οξειδίου του νατρίου, (nitric oxide, NO), του TNF-α και των πρωτο-ογκογονιδίων Bcl-2/Bax [155-157]

A.2 Υπερτροφία και Επασβέστωση των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα

Παρά το γεγονός ότι στην ΟΑ μεταβάλλεται το πρότυπο έκφρασης πολλών γονιδίων και διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών, οι κυτταρικές αποκρίσεις που λαμβάνουν χώρα μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες. Αλλαγές που συμβαίνουν στον αριθμό των κυττάρων και οφείλονται είτε στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ή νέκρωση, είτε στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μεταβολές της αναγεννητικής ή αποικοδομητικής ικανότητας των χονδροκυττάρων, και τέλος αλλαγές που σχετίζονται με την υπερτροφία, η οποία αποτελεί φυσιολογική πορεία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων [158].

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση (ΕΟ) είναι μία από τις δύο απαραίτητες διαδικασίες της εμβρυϊκής ανάπτυξης του σκελετικού συστήματος των θηλαστικών και αποτελεί καθοριστικό στάδιο για τη δημιουργία του αρθρικού χόνδρου. Διαφοροποιείται από την ενδομεμβρανική οστεοποίηση διότι είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και αύξηση των μακρών οστών και τη φυσική επανόρθωση των καταγμάτων [159, 160]. Στα πρώτα στάδια της ΕΟ πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα συναθροίζονται,

διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα και δημιουργούν το χόνδρο που θα αντικατασταθεί στην πορεία από οστό. Στο οστικό ικρίωμα που δημιουργείται, τα διαφοροποιημένα κύτταρα του χόνδρου περνούν σε διαφορετικές καταστάσεις των τελικών σταδίων διαφοροποίησης που περιλαμβάνουν διαδοχικά, πολλαπλασιασμό των κυττάρων, πολλαπλά στάδια ωρίμανσης και τη δημιουργία υπερτροφικών χονδροκυττάρων (εικόνα 10). Τα περισσότερα από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα αποτίπτουν λόγω της εισβολής αιμοφόρων αγγείων από το υπόχονδριο οστό με αποτέλεσμα τη



Εικόνα 10. Ζώνες χονδροκυττάρων στην αναπτυξιακή πλάκα

μετατροπή του αρθρικού χόνδρου σε σπογγώδες οστό [161]. Επομένως, τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας και του αρθρικού χόνδρου μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο (εικόνα 10). Παρόλο που οι διεργασίες ωρίμανσης και διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, την υπερτροφία, την αναδιαμόρφωση και επασβέστωση του ECM, την εισβολή αιμοφόρων αγγείων και τον αποπτωτικό θάνατο των χονδροκυττάρων, τα χονδροκύτταρα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου δεν υιοθετούν τους μηχανισμούς της αναπτυξιακής πλάκας παρά μόνο εάν γίνουν οστεοαρθρικά. Τα ανθρώπινα χονδροκύτταρα ΟΑ χόνδρου μετατρέπονται συνήθως σε υπερτροφικά, αποπίπτουν και ακολουθεί η επασβέστωση του χόνδρου [162]. Επιπλέον, εκφράζουν μία πληθώρα μορίων του ECM, ενζύμων, μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων όπως κολλαγόνο Χ, MMP-13, MMP-9, την πρωτεΐνη Indian hedgehog (Ihh), το μεταγραφικό παράγοντα Runx-2 (Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)), τον αυξητικό παράγοντα ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF) και την οστεοποντίνη, (OPN), τα οποία εμπλέκονται επίσης στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των κυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας [163-170]. Στο στάδιο της επασβέστωσης, τα χονδροκύτταρα τόσο του ΟΑ χόνδρου όσο και της αναπτυξιακής πλάκας, εκφράζουν κολλαγόνο Ι, οστεοκαλσίνη (OC) και αλκαλική φωσφατάση (ALP), όπως και την αποπτωτική πρωτεΐνη, κασπάση-3 [168]. Ιδιαίτερα το κολλαγόνο Χ, η MMP-13 και η ALP είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένοι δείκτες των υπερτροφικών χονδροκυττάρων [171].

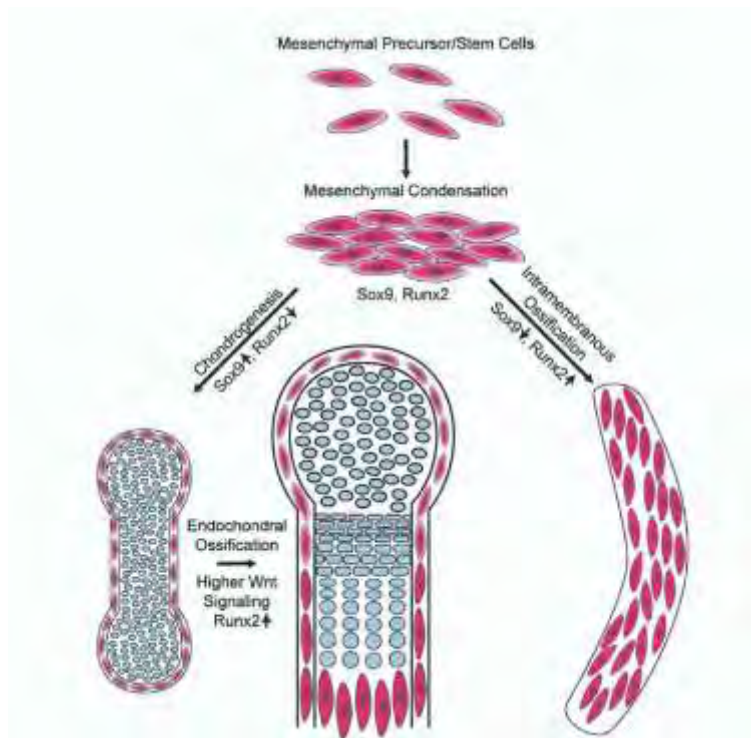
A.2.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX-2 στον υπερτροφικό φαινότυπο στην ΟΑ

Τα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της δομής και των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων του ECM. Η διατήρηση της ακεραιότητας των χονδροκυττάρων και του ECM βασίζεται στην έκφραση γονιδίων του ECM, όπως COL2A1, COL9A1, COL11A2, αγγρεκάνη και το γονίδιο της πρωτεΐνης σύνδεσης του χόνδρου (cartilage link protein, CRLT1), τα οποία υπόκεινται στον έλεγχο αναβολικών και καταβολικών μεταγραφικών παραγόντων [172]. Το γονίδιο SOX-9 κωδικοποιεί για έναν αναβολικό μεταγραφικό παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια SOX (Sry-related high mobility group box) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την χονδρογένεση, μέσω ενεργοποίησης βασικών δομικών γονιδίων του χόνδρου, COL2A1, COL11A2 και αγγρεκάνη [172-175]. Το SOX-9 εκφράζεται στα χονδροκύτταρα και σε άλλους ιστούς όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα και το ουρογεννητικό σύστημα [176-179]. Επίσης, το γεγονός ότι σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση SOX-9 συγκριτικά με φυσιολογικά χονδροκύτταρα ενήλικου ατόμου, υποδηλώνει τη

συμμετοχή του στη διατήρηση του φυσιολογικού φαινοτύπου του αρθρικού χόνδρου, ενώ η απουσία του συμβάλει στην προώθηση του παθολογικού φαινοτύπου [131].

Η έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να καθορίσει τη μοίρα των χονδροκυττάρων στην αναπτυξιακή πλάκα αλλά και σε μη φυσιολογικές περιπτώσεις, όπως στην ΟΑ όπου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Μηχανισμοί όπως η αναδιομόρφωση του χόνδρου, πολλαπλασιασμός και απόπτωση των χονδροκυττάρων σχετίζονται με την εξέλιξη της ΟΑ και είναι χαρακτηριστικοί της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων και της υπερτροφίας της αναπτυξιακής πλάκας [180-182]. Ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX-2 συμμετέχει στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, οδηγώντας τα χονδροκύτταρα σε υπερτροφία κατά την οποία χάνουν την ικανότητα περεταίρω πολλαπλασιασμού και σταδιακά αποπίπτουν (εικόνα 11). Συνεπώς, αναστέλλεται η αναγεννητική ικανότητα του χόνδρου, ενώ ταυτόχρονα ενισχύεται ο εκφυλισμός του. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν ταυτοποιηθεί ως θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων σε μοντέλα ποντικών είναι τα Shox/Shox2, Dix5, MEF2C [183-186]. Αρχικά ο RUNX-2, χαρακτηρίστηκε για την ικανότητα του να επάγει τη μεταγραφή της οστεοκαλσίνης, ειδικό γονίδιο των οστεοβλαστών [187-189]. Στον οστεοαρθρικό χόνδρο παρατηρείται αυξημένη έκφραση του RUNX-2 και επάγει την έκφραση του COL10A1 και της αλκαλικής φωσφατάσης, τα οποία επίσης εμφανίζονται αυξημένα στην ΟΑ [163, 190-192].

Με βάση τις προηγούμενες μελέτες συνεπάγεται ότι ο RUNX2 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας και μπορεί να ευθύνεται για τη διαταραχή του μεταβολισμού των χονδροκυττάρων και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων που συνδέονται με την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΟΑ [193]. Η δράση του στην αναπτυξιακή πλάκα γίνεται προς την κατεύθυνση της υπερτροφίας σε αντίθεση με τη δράση του SOX-9, ο οποίος διατηρεί τα χονδροκύτταρα στη φάση του πολλαπλασιασμού (εικόνα 11). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την αρνητική μεταγραφική ρύθμιση που ασκεί ο SOX-9 στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των χονδροκυττάρων προς την υπερτροφική φάση, μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του RUNX2 [194].



Εικόνα 11. Προτεινόμενο μοντέλο του μοριακού μηχανισμού που καθορίζει το σχηματισμό οστεοβλαστών και χονδροκυττάρων κατά την ενδοχόνδρια και ενδομεμβρανική οστεοποίηση [195].

A.2.2 Οι αυξητικοί παράγοντες στον υπερτροφικό φαινότυπο στην ΟΑ: ο ρόλος του FGF23

Διάφοροι τοπικά παραγόμενοι παράγοντες, όπως BMPs, αυξητικοί παράγοντες ινοβλαστών (Fibroblast growth factors, FGFs), TGF β , Wnts-πρωτεΐνες και η Indian Hedgehog (Ihh), καθώς και πεπτιδία και ρετινοειδή που σχετίζονται με την παραθυροειδή ορμόνη (PTH) επηρεάζουν τη διαδικασία της ΕΟ και καθορίζουν τη μοίρα των χονδροκυττάρων [171].

Η οικογένεια αυξητικών παραγόντων TGF- β αποτελείται από 35 μέλη και περιλαμβάνει τις TGF- β πρωτεΐνες και τις BMPs. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών μέσω ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της μετανάστευσης των κυττάρων, αλλά και του μεταβολισμού του ECM [196]. Η δράση του ασκείται μέσω σύνδεσης σε ειδικούς υποδοχείς τύπου I και τύπου II. Η σύνδεση στους υποδοχείς προκαλεί τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων και την ενεργοποίηση του μονοπατιού που ελέγχουν, το οποίο περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad. Οι τελευταίες δημιουργούν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες Smad και μεταναστεύουν στον πυρήνα, όπου δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες [197-199]. Μέλη της οικογένειας του TGF- β θεωρούνται κύριοι επαγωγείς του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων και της ομοιοστασίας του ECM του αρθρικού χόνδρου. Η προσθήκη του TGF- β 1 και -2 σε μοντέλα ζώων με ΟΑ αυξάνει την έκφραση της αγγρεκάνης και του κολλαγόνου

από τον αρθρικό χόνδρο, ενώ η αναστολή του υποδοχέα του TGF- β 2 οδηγεί σε εκτεταμένη απώλεια των πρωτεογλυκανών και ελαττώνει την πυκνότητα του χόνδρου [199-201].

Παρά την προτεινόμενη χονδροπροστατευτική δράση των πρωτεϊνών TGF- β , υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την αντίθετη δράση τους. Παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή του TGF- β 1 με αδενοϊό σε φυσιολογική άρθρωση γόνατος ποντικών, που οδήγησε στην δημιουργία οστεοφύτων και την ίνωση της άρθρωσης, τα οποία συνδέονται με την υπερτροφία του χόνδρου και την εξέλιξη της OA [202]. Επιπλέον, ο TGF- β 1 επάγει τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης αλλά και τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων στον αρθρικό χόνδρο αρουραίων, γεγονός που ενισχύει την ποικιλία δράσης του TGF- β ανάλογα με το είδος, το στάδιο διαφοροποίησης των κυττάρων και τη συγκέντρωσή του [171].

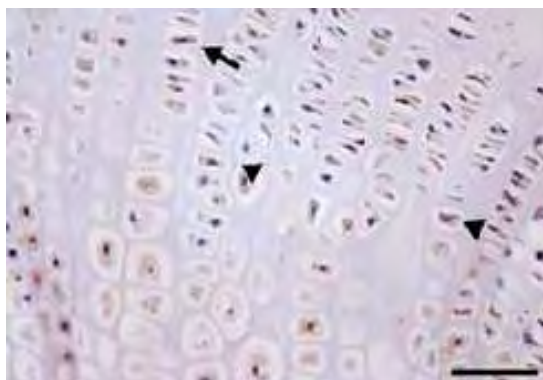
Άλλη κατηγορία αυξητικών παραγόντων είναι η οικογένεια Wnt, της οποίας τα μέλη εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια της ΕΟ. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 19 γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια Wnt που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που προσδέονται στους υποδοχείς Frizzled (FZD) και LRP-5/6 και ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το κανονικό μονοπάτι Wnt (canonical Wnt-pathway) το οποίο εμπλέκεται στις κυτταρικές αποκρίσεις μέσω ρύθμισης των επιπέδων της β -κατενίνης (b-catenin) [203]. Όταν ενεργοποιείται το μονοπάτι, η β -κατενίνη μεταφέρεται στον πυρήνα των χονδροκυττάρων, όπου αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες Tcf/Lef και ρυθμίζει την έκφραση ποικίλων γονιδίων όπως c-jun, c-myc, MMP-7 και MMP-26 [204]. Σε περίπτωση που δεν ενεργοποιείται το κανονικό μονοπάτι Wnt, η β -κατενίνη προωθείται προς το πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση. Εναλλακτικά του κανονικού μονοπατιού, υπάρχει το μη κανονικό μονοπάτι Wnt το οποίο είναι ανεξάρτητο της β -κατενίνης και περιλαμβάνει τα Wnt/calcium και Wnt/JNK [205]. Το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης συμβάλει στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας. Στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης, κατά τη διάρκεια της συνάθροισης των μεσεγχυματικών κυττάρων, προωθεί τη διαφοροποίηση προς οστεοβλάστες αλλά αναστέλλει τη χονδρογένεση, ενώ στα τελευταία στάδια είναι απαραίτητο για τη τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Μελέτες έχουν αναδείξει τη συμμετοχή του Wnt/ β -κατενίνη μονοπατιού στην υπερτροφία στον OA χόνδρο. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα FZD3 σχετίζονται με την εμφάνιση OA ισχίου σε γυναίκες. Επίσης η αναστολή του Frzb σε ποντίκια σχετίζεται με την αποδόμηση του χόνδρου που παρατηρείται στην OA, λόγω αυξημένης ενεργοποίησης του Wnt μονοπατιού και ενισχυμένης έκφρασης και δραστηριότητας της MMP-3 [73]. Πρόσφατα, η ομάδα μας ανέδειξε τη συμμετοχή του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνη στην υπερτροφία των OA χονδροκυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με τον συν-υποδοχέα LRP-5 [206].

Όλες οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν το βασικό ρόλο του μονοπατιού Wnt στις μεταβολικές αλλαγές των χονδροκυττάρων.

Σημαντικό ρόλο στην υπερτροφία στην ΟΑ διαδραματίζει η οικογένεια αυξητικών παραγόντων FGFs, οι οποίοι ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες της οικογένειας των BMPs. Οι πρωτεΐνες FGFs ασκούν τη δράση τους μέσω σύνδεσης σε μία από τις τέσσερις ισομορφές υποδοχέων FGFs (FGF Receptors), FGFR1 έως FGFR4, οι οποίοι είναι τύπου I διαμεμβρανικοί υποδοχείς τυροσίνης-κινάσης και η ενεργοποίησή τους έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που στοχεύουν σε διαφορετικά γονίδια ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο [207]. Μία από τις χαρακτηριστικές πρωτεΐνες της οικογένειας των FGFs είναι ο FGF-2, ο οποίος αναστέλλει την ανάπτυξη των επίμηκων οστών της αναπτυξιακής πλάκας μέσω τριών μηχανισμών: της μείωσης του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας, μείωση της υπερτροφίας των κυττάρων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί αναστολή της σύνθεσης του ECM. Οι ανωτέρω δράσεις σχετίζονται με τη μη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών των ασθενών με αχονδροπλασία και με σκελετικές ανωμαλίες [208]. Ο FGF-2 εμφανίζει διαφοροποιημένη δράση στον ενήλικα χόνδρο από αυτήν της αναπτυξιακής πλάκας. Σε περίπτωση τραυματισμού του ιστού, ο FGF-2 απελευθερώνεται από το ECM και επάγει την έκφραση της MMP-13, η οποία ακολούθως συμβάλει στην αποδόμηση του χόνδρου [193, 209]. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο FGF-2 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ και συνδέεται στον FGFR1, ο οποίος εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά [210].

Μία εξίσου σημαντική πρωτεΐνη της ίδιας οικογένειας είναι ο FGF-23, ο οποίος ταυτοποιήθηκε αρχικά ως φωσφατουρικός παράγοντας στην αυτοσωμική κυρίαρχη υποφωσφαταιμική ραχίτιδα (autosomal dominant hypophosphatemic rickets, ADHR), στην οστεομαλακία επαγόμενη από όγκο (Tumor Induced osteomalacia, TIO) και στο σύνδρομο McCune-Albright, το οποίο χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό πολυοστικής ινώδους δυσπλασίας (PFD), πρόωρης ήβης, *cafe au lait* κηλίδων και άλλων ενδοκρινοπαθειών λόγω υπερδραστηριότητας διαφόρων ενδοκρινικών αδένων. [211-214]. Η κύρια λειτουργία του FGF-23 είναι η διατήρηση της ομοιοστασίας του φωσφόρου και του μεταβολισμού της 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) μέσω καταστολής της δραστηριότητας της 1α-υδροξυλάσης στους νεφρούς [212, 214], γεγονός που τον διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς του. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον FGF-23 εδράζεται στο χρωμόσωμα 12p13 και παράγει μία πρωτεΐνη 37-kD [215]. Ο FGF23 εκφράζεται κυρίως στα οστεοκύτταρα, στα κύτταρα που περιβάλλουν τον φλεβικές κοιλότητες στο μυελό των οστών, στο θύμο και τους λεμφαδένες. Λόγω της κυρίαρχης

έκφρασης του στα οστεοκύτταρα και εφόσον τα τελευταία αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία κυττάρων του οστού, θεωρείται ότι τα επίπεδα του FGF23 στον ορό προέρχονται από το οστό [216]. Επίσης, το γεγονός ότι τα οστεοκύτταρα συμβάλλουν στη ρύθμιση της λειτουργίας των οστεοβλαστών και στην επασβεστωση του ECM, υποδηλώνουν τη λειτουργική σημασία του FGF23 σε αυτά [216]. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε οστά αρουραίων ενισχύουν την άποψη ότι ο FGF-23 εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε κύτταρα τα οποία επασβεστώνουν το ECM που τα περιβάλλει, όπως οστεοβλάστες, οδοντοβλάστες αλλά και στα χονδροκύτταρα και στους οστεοκλάστες, και εμφανίζει διαφοροποιημένη έκφραση και δράση πριν και μετά την επασβεστωση [217]. Επιπλέον, η έκφραση του FGF-23 στα χονδροκύτταρα συμβάλει σημαντικά στη διαφοροποίησή τους, εφόσον αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της χονδρογένεσης και επάγει την πρόωμη μετάβαση των χονδροκυττάρων από τη φάση του πολλαπλασιασμού σε αυτήν της υπερτροφίας [218]. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν την έκφραση του FGF-23 σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας και τη συμβολή του στην ωρίμανσή τους [219] (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Κυτταρική κατανομή του FGF-23 σε τομή οστού ενήλικων ποντικών. Τα βέλη δείχνουν ανίχνευση του FGF-23 σε προ-υπερτροφικά χονδροκύτταρα [217].

A.2.2.1 Σύνδεση του FGF-23 σε υποδοχείς και ο ρόλος των συμπαράγοντων

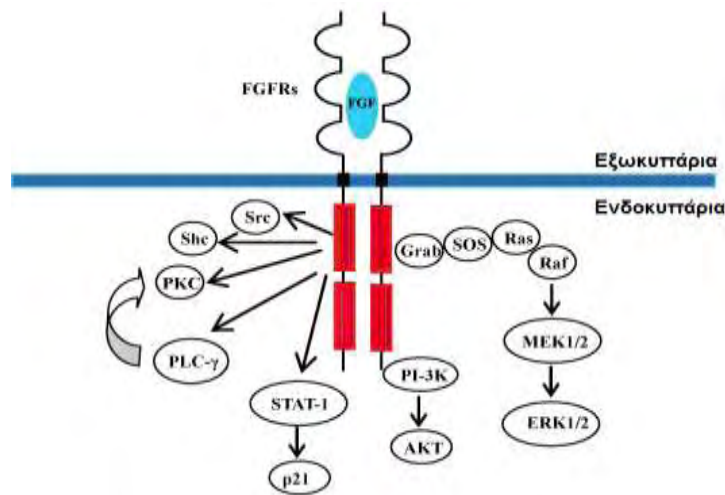
Ο FGF-23 ασκεί τη δράση του δεσμευόμενος στους ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I, FGFR1 - FGFR4, και προκαλεί την ενεργοποίησή τους στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Μελέτες υποδεικνύουν ότι ο FGF-23 προσδένεται στους FGFR1c, 3c και 4c, ενώ εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τον FGFR1c, ο οποίος εκφράζεται σε χονδροκύτταρα. Για την πρόσδεσή του απαιτεί την παρουσία συμπαράγοντων, τύπου πρωτεογλυκανών θειικής ηπαρίνης (heparin sulfate proteoglycans, HSPG). Ως συμπαράγοντας στο σύμπλοκο FGF-23/FGFR1c λειτουργεί το προϊόν του γονιδίου Klotho, το οποίο εκφράζεται κυρίως σε ιστούς που συμμετέχουν στη ρύθμιση ασβεστίου/φωσφόρου [220, 221]. Επίσης εκφράζεται πρωτογενώς στους νεφρούς και στον εγκέφαλο αλλά παρατηρήθηκε και ελάχιστη έκφραση στην υπόφυση, τον πλακούντα, τους

σκελετικούς μύες, ουροδόχο κύστη, αορτή, πάγκρεας, όρχεις, ωοθήκη, παχύ έντερο και θύμο αδένες. Επιπλέον, εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού και τις ρυθμίζει, με σημαντικότερες τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιόντων μετάλλων, την αντι-αποπτωτική δράση, καταστολή του οξειδωτικού στρες και την ανάπτυξη και τη διατήρηση των οστών [220]. Η σημαντική δράση του Klotho στην πρόσδεση του FGF-23 στον FGFR1c, καθιστά απαραίτητη την παρουσία του στους ιστούς που εκφράζεται ο FGF-23. Έχει παρατηρηθεί σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τα γονίδια Klotho και FGF-23, ότι προκαλείται ένας συστηματικός φαινότυπος γήρανσης. Συνεπώς μπορεί η παραγωγή του Klotho να γίνεται από συγκεκριμένα όργανα αλλά η εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης κόβεται πρωτεολυτικά και εισέρχεται στο αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), κυκλοφορεί και η δράση της δεν περιορίζεται σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Επίσης, ο κοινός συστηματικός φαινότυπος γήρανσης υποδηλώνει ότι το Klotho και ο FGF-23 μπορεί να δρουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι και να ελέγχουν τις ίδιες διεργασίες [222-224].

Στο γονίδιο Klotho έχουν ταυτοποιηθεί πολυμορφισμοί που η εμφάνισή τους σχετίζεται με τη μικρή διάρκεια ζωής, την εμφάνιση οστεοπόρωσης, στεφανιαία νόσο και εγκεφαλικά επεισόδια [225-228]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συσχέτιση τεσσάρων πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) στο γονίδιο Klotho, οι οποίοι εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ΟΑ χεριού στην Καυκάσια φυλή, και τεσσάρων SNPs με την ΟΑ γόνατος στον Ελληνικό πληθυσμό, υποδεικνύοντας τη συμβολή του Klotho στην παθοφυσιολογία της ΟΑ [229, 230].

A.2.2.2 Η σύνδεση του FGF-23 στον FGFR1c προκαλεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας FGF και οι υποδοχείς τους παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των οστών, ενώ η συμβολή τους στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων αναφέρθηκε από την ομάδα του *Cancedda et al., 1995* [161]. Οι FGFs αλληλεπιδρούν με το ECM και συγκεκριμένα με αλύσους θειικής ηπαρίνης της κυτταρικής επιφάνειας καθώς και με πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης του ECM. Η πρόσδεση των FGFs στους FGFRs με τους κατάλληλους συμπαραγόντες έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των FGFRs και την επαγωγή ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτώμενα από τον κυτταρικό τύπο και το στάδιο διαφοροποίησης (εικόνα 13). Μεταλλάξεις στους υποδοχείς των FGFRs, συγκεκριμένα στον FGFR3 οδηγούν σε ποικίλους φαινότυπους, όπως υποχονδροπλασία [231] έως θανατηφόρα δυσπλασία [232, 233]



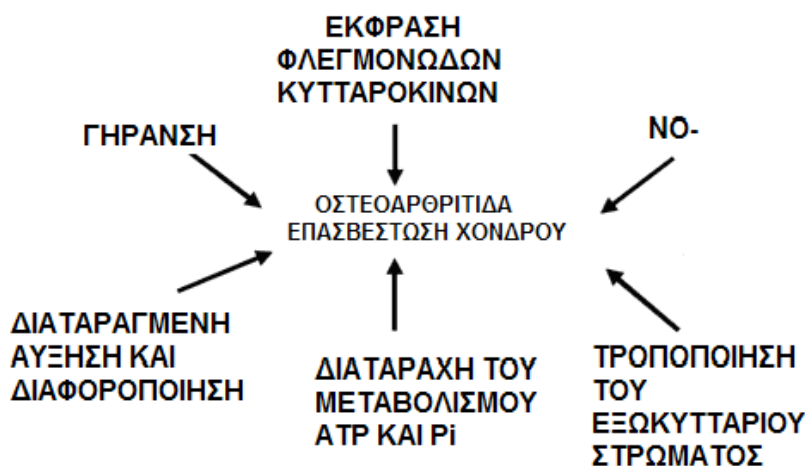
Εικόνα 13 Δομή των τύπου I διαμεμβρανικών υποδοχών τυροσίνης-κινάσης FGFRs και των κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν οι FGFs. Οι FGFRs περιλαμβάνουν μία εξωκυτάρια περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη FGF, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία αρκετά συντηρημένη ενδοκυτάρια περιοχή. Όταν ενεργοποιείται ο υποδοχέας (κόκκινα ορθογώνια) επάγει μονοπάτια όπως το PLC-γ, της κινάσης Ras-MAP και της κινάσης PI3-AKT, ανάλογα τον κυτταρικό τύπο και το στάδιο διαφοροποίησης [234].

Η πρόσδεση του FGF23 στον FGFR1c με την υποχρεωτική παρουσία του Klotho, οδηγεί στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, ο οποίος στη συνέχεια επάγει τη φωσφορυλίωση του FGFR υποστρώματος 2α (FRS2α) και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP-κινάσων [220, 235]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP-κινάσων περιλαμβάνει τέσσερις εναλλακτικές σημαντικές πορείες: 1) την ενεργοποίηση της ERK1/2, 2) της p38-MAPK, 3) της Janus-Kinase (JNK) και 4) της ERK5. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP-κινάσων καταλήγει στην έκφραση του εμπλεκόμενου στην πρώιμη ανάπτυξη μεταγραφικού παράγοντα EGR1 (Early growth response factor-1) [236, 237]. Πολλές από τις λειτουργίες που διαδραματίζει ο FGF-23 περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των MAP-κινάσων. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την ενεργοποίηση της ERK1/2 και της p38 από τον FGF-23 σε καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου του νεφρού (kidney proximal tubule epithelial cells) προκειμένου να ρυθμίσει την επαναρόφηση του Na μέσω της MEK/ERK1/2 και αυξάνει την έκφραση του *egr1* στο νεφρό [220, 238].

A.3 Η συμβολή του φωσφόρου στην υπερτροφία και την επασβέστωση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων

Η υπερτροφία των χονδροκυττάρων, παρόλο που είναι μία απαραίτητη φυσιολογική διαδικασία για την ωρίμανσή τους στην αναπτυξιακή πλάκα, όπως έχει

ήδη αναφερθεί, παρατηρείται και στα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου, όπου ενέχεται στη διαταραχή της ισορροπίας της αναδιαμόρφωσης του ECM, μέσω έκφρασης κολλαγόνου τύπου X αντί για κολλαγόνο τύπου II και στην αύξηση της έκφρασης των MMPs [169, 170, 239-241]. Επιπλέον, τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα του ΟΑ χόνδρου, υφίστανται επασβέστωση, ανάλογη της φυσιολογικής μεταλλοποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυσσόμενης πλάκας στο τελικό στάδιο ωρίμανσής τους [170, 239-241].



Εικόνα 14. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και εξέλιξη της Οστεοαρθρίτιδας [242].

Κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία τόσο της επασβέστωσης των ΟΑ χονδροκυττάρων όσο και της μεταλλοποίησης των χονδροκυττάρων της αναπτυσσόμενης πλάκας διαδραματίζει ο φώσφορος (εικόνα 14), ο οποίος αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τα οστά και για κάθε ενζυματική διαδικασία και για αυτό το λόγο τα επίπεδά του ρυθμίζονται αυστηρά στον ορό [243]. Το μεγαλύτερο ποσοστό (80-90%) του ανόργανου φωσφόρου (inorganic phosphate, Pi) του ανθρώπινου σώματος βρίσκεται στα οστά με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Το υπόλοιπο 10-20% εντοπίζεται στους μαλακούς ιστούς (μύες και εσωτερικά όργανα), στα εξωκυττάρια υγρά και στα ερυθροκύτταρα. Στους μαλακούς ιστούς, ο φώσφορος συνιστά το 0,1-0,3% του νωπού τους βάρους και περιέχεται ενδοκυττάρια ως συστατικό των νουκλεϊκών οξέων, των φωσφορυλιωμένων σακχάρων, φωσφολιπιδίων, φωσφοπρωτεϊνών και ως ελεύθερο Pi. Η συμμετοχή του στην ομοιοστασία των κυττάρων των θηλαστικών είναι πολύ σημαντική, εφόσον, η απώλειά του οδηγεί σε υποφωσφαταιμία και βλάβη των ιστών [244].

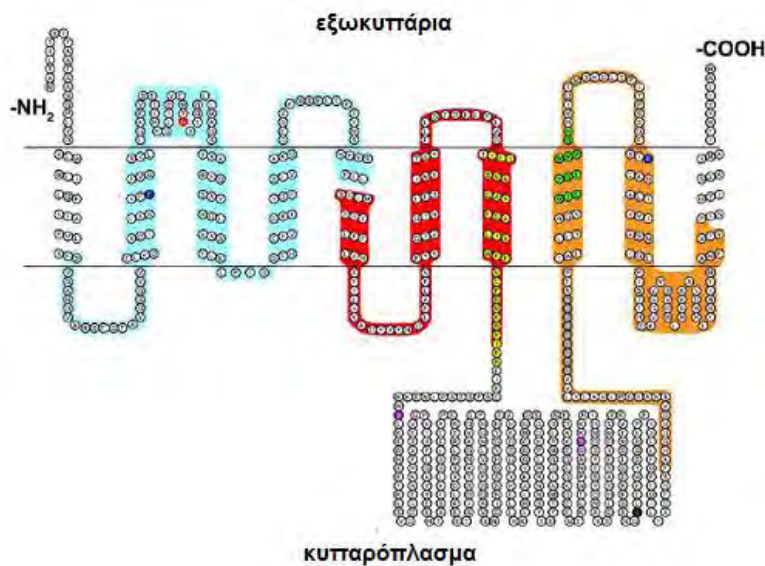
Στους ιστούς που υφίστανται μεταλλοποίηση, όπως ο αρθρικός χόνδρος της αναπτυσσόμενης πλάκας, ο φώσφορος εντοπίζεται στο ECM μέσα σε ειδικούς σχηματισμούς, τα μεμβρανικά κυστίδια (matrix, vesicles, MV). Τα τελευταία είναι εξωκυττάρια οργανίδια τα οποία δημιουργούνται από εγκοιλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των χονδροκυττάρων και στη συνέχεια αποκόπτονται και αποτελούν

ξεχωριστούς σχηματισμούς. Τα μεμβρανικά κυστίδια συσσωρεύουν στο εσωτερικό τους ιόντα Ca^{2+} και P_i , τα οποία όταν ξεπεράσουν το φορτίο που μπορεί να συσσωρευτεί, δημιουργούν βασικούς κρυστάλλους φωσφορικού ασβεστίου (basic calcium phosphate crystals, BSP crystals) (κρυστάλλοι υδροξυαπατίτη) στο εσωτερικό των κυστιδίων και εξέρχουν από αυτά σαν «βελόνες» [245]. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται καθιζάνουν στο εξωκυττάριο στρώμα του χόνδρου, απελευθερώνονται στο μεσοαρθρικό διάστημα και δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για περεταίρω συσσώρευση ιόντων μετάλλων, έως ότου σπάσει η μεμβράνη των μεμβρανικών κυστιδίων και απελευθερωθεί το περιεχόμενό τους στο ECM [246, 247]. Στην περιοχή αυτή υπάρχει περίσσεια Ca^{2+} και P_i , τα οποία συντηρούν το σχηματισμό κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και οδηγούν στην επασβέστωση του ιστού. Στο σημείο αυτό αρχίζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κρυστάλλων, των κυττάρων της αρθρικής μεμβράνης και των ουδετερόφιλων, οι οποίες προκαλούν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως είναι η σύνθεση μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και προσταγλαδίνης E_2 (PGE_2), ενώ προκαλούν επιπλέον μηχανικό τραύμα στην άρθρωση και τελικά οδηγούν στον εκφυλισμό του χόνδρου [248]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι σε περιπτώσεις που διαταράσσεται η ισορροπία στο μεταβολισμό του P_i , τα μεμβρανικά κυστίδια συσσωρεύουν περίσσεια P_i και οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη ευθύνονται για την απόδομηση του χόνδρου σε OA αρθρώσεις [249].

A.3.1 Η είσοδος του P_i στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω αντλιών εξαρτώμενων από Na^+

Η ενδοκυττάρια μεταφορά του φωσφόρου πραγματοποιείται μέσω δύο μονοπατιών, του Na^+ -εξαρτώμενου και του ανεξάρτητο του Na^+ . Λίγα δεδομένα είναι γνωστά μέχρι στιγμής όσον αφορά στο ανεξάρτητο του Na^+ μονοπάτι. Παρόλα αυτά ένα μεγάλο ποσοστό του ενδοκυττάρου P_i θεωρείται ότι οφείλεται σε αυτό. Αντίθετα το Na^+ -εξαρτώμενο μονοπάτι περιλαμβάνει ειδικές αντλίες μεταφοράς φωσφόρου εξαρτώμενες από το νάτριο (sodium depended phosphate transporter, NaPis) που είναι παρούσες στη μεμβράνη των κυττάρων και κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες [250, 251]. Η λειτουργία της οικογένειας Na^+/P_i τύπου I αφορά στη μεταφορά οργανικών ιόντων [252, 253]. Μεταφορείς φωσφόρου της οικογένειας Na^+/P_i τύπου II είναι παρούσες στο νεφρό και στο λεπτό έντερο [254]. Η οικογένεια Na^+/P_i τύπου III περιλαμβάνει δύο μεταφορείς ανόργανου φωσφόρου, τους Pit-1 (phosphate inorganic transporter-1, SLC20A1) (εικόνα 15) και Pit-2 (phosphate inorganic transporter-2, SLC20A2) που εμφανίζουν περίπου 60% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία τους, διαφέρουν από τα μέλη των υπόλοιπων οικογενειών Na^+/P_i [252] και εκφράζονται σε οστεογενή κύτταρα

(οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα) και λεία μυϊκά κύτταρα. Μελέτες υποστηρίζουν την έκφραση των αντλιών Na^+/P_i τύπου III στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας, υποδεικνύοντας το βασικό ρόλο του P_i στην επασβέστωση του ECM [255]. Διαταραχές στην ομοιοστασία του P_i στο οστό και στον αρθρικό χόνδρο έχουν ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική επασβέστωση η οποία σχετίζεται με την υποφωσφαταιμική ραχίτιδα (μείωση της σωληναριακής επαναρρόφησης του φωσφόρου από τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών) και την οστεομαλακία (λέπτυνση και εξασθένηση των οστών). Επίσης, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν την ενισχυμένη έκφραση των Pit-1 και Pit-2 στην παθολογική επασβέστωση μαλακών ιστών και την υπερέκφραση του Pit-1 στον OA χόνδρο [256, 257].



Εικόνα 15. Δομή της ανθρώπινης αντλίας μεταφοράς φωσφόρου Pit-1 [258]

Στη διατήρηση της ομοιοστασίας του P_i εμπλέκονται ποικίλοι παράγοντες μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και ο FGF-23. Μελέτες υποστηρίζουν ότι ο FGF-23, το P_i και η βιταμίνη D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) δημιουργούν ένα δίκτυο αλληλεπίδρασης με σκοπό τη διατήρηση της φυσιολογικής επασβέστωσης, όπου η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και το P_i ασκούν άμεση ή έμμεση ρύθμιση στον FGF-23 και ο τελευταίος μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης ρυθμίζει την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και το P_i [259-261]

A.3.2 Η συμβολή του FGF23 στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του φωσφόρου

Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του P_i στο ECM επάγουν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν ως αποτέλεσμα την διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των χονδροκυττάρων και των οστεοβλαστών. Συγκεκριμένα στα χονδροκύτταρα παρατηρείται ενεργοποίηση των μιτοχονδριακών αποπτωτικών πρωτεϊνών, κασπάση-9 και κασπάση-3 και αύξηση της έκφρασης της

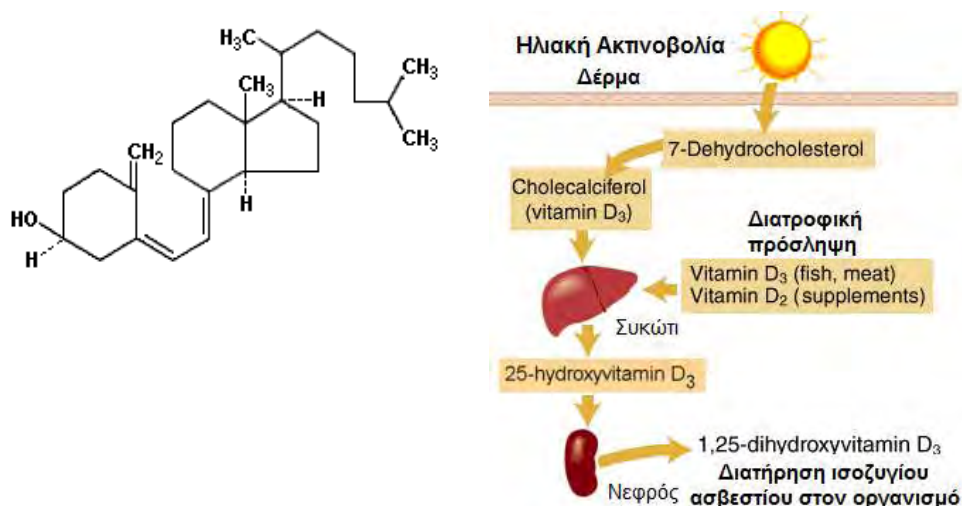
οστεοποντίνης (OPN) [262, 263]. Τα αυξημένα επίπεδα του Pi έχουν μελετηθεί στη διαδικασία της επασβέστωσης του αγγειώδους ιστού όπου προέκυψε ότι προκαλούν την *in vitro* επαγωγή της έκφρασης γονιδίων – ειδικών των οστεοβλαστών - όπως RUNX2, OPN και OC, μέσω του συµµεταφορέα Na^+/Pi , Pit-1 [264-266]. Οι προηγούμενες μελέτες κατέληξαν, με βάση τα γονίδια που επηρεάζονται από το Pi, ότι η απόκριση στα αυξημένα επίπεδα Pi πραγματοποιείται σε ποικίλους ιστούς συμπεριλαμβάνων των κυττάρων-στόχων της σηματοδότησης του FGF-23 [267].

Ο ακριβής µηχανισµός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αλληλεπίδραση του Pi µε τον FGF-23 µε στόχο την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη µεταλλοποίηση των µαλακών ιστών περιγράφεται από τα αποτελέσµατα *in vitro* µελετών στη κυτταρική σειρά ανθρώπινων εµβρυικών κυττάρων του νεφρού, HEK293. Τα αυξηµένα επίπεδα Pi προκαλούν τη φωσφορύλιωση και εποµένως την ενεργοποίηση του υποδοχέα του FGF-23, FGFR1, κατά παρόµοιο τρόπο µε την ενεργοποίηση που προκαλεί η πρόσδεση του FGF-23 στον FGFR1. Την ενεργοποίηση του FGFR1 ακολουθεί η φωσφορυλίωση της κινάσης ERK1/2 του μονοπατιού των MAP-κινασών (Raf/MEK/ERK), ενώ δεν εμπλέκονται οι κινασες AKT, p38MAPK και JNK. Επιπλέον, στις κυτταρικές σειρές των οστεοβλαστών MC3T3 και των χονδροκυττάρων ATDC5, η αύξηση του Pi επάγει τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 µε στόχο την αύξηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην επασβέστωση [268, 269]. Στη κυτταρική σειρά HEK293, η ενεργοποίηση των MAP-κινασών από το Pi µέσω του FGFR1 είχε σαν αποτέλεσµα την ενίσχυση της έκφρασης του µεταγραφικού παράγοντα EGR1, ο οποίος αποτελεί µεταγραφικό στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού του FGF-23. Η χορήγηση φωσφονοφορμικού οξέος (phosphonoformic acid, PFA), ενός συνθετικού αναστολέα των συµµεταφορέων Na^+/Pi , είχε ως αποτέλεσµα την παρακώλυση των δράσεων τόσο του Pi όσο και του FGF-23, γεγονός που αφενός επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση του Pi και του FGF-23, αφετέρου ανέδειξε τη συµµετοχή του Pit-1 και του Pit-2 στις δράσεις που διενεργούνται από το Pi. Αν και ο FGF-23 έχει την ικανότητα να ρυθµίζει αρνητικά του συµµεταφορείς Na^+/Pi τύπου II στους νεφρούς και το λεπτό έντερο, ο τρόπος µε το οποίο ρυθµίζει τους συµµεταφορείς Na^+/Pi τύπου III (Pit-1, Pit-2), παραµένει άγνωστος [267, 270]. Μία πρόσφατη µελέτη υποστηρίζει ότι τα αυξηµένα επίπεδα Pi στον ορό διαγονιδιακών ποντικών (transgenic, Tg) (το γονίδιο Pit-1 εισήχθη στο γενετικό τους υλικό) σχετίζονται µε απώλεια της οστικής µάζας, ενώ σε κυτταρικό επίπεδο προκαλούν ενισχυµένη έκφραση του Pit-1 στους οστεοβλάστες και αυξηµένη είσοδο του Pi ενδοκυττάρια. Επιπλέον τα αποτελέσµατα της µελέτης αυτής, ανέδειξαν µία αρνητική σχέση µεταξύ του FGF-23 και του Pi, κατά την οποία τα αυξηµένα επίπεδα Pi στον ορό

των Tg ποντικών οφείλονται σε μειωμένη παραγωγή του FGF-23 από τους οστεοβλάστες [271]. Αν και οι προηγούμενες μελέτες προτείνουν την εμπλοκή του Pit-1 στην επασβέστωση του οστού, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο διενεργείται χρήζει περαιτέρω μελέτης.

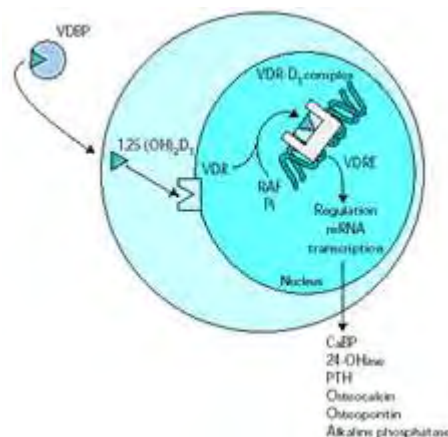
A.4 Ο μεταβολισμός της βιταμίνη D₃

Η βιταμίνη D είναι μία από τις ορμόνες που ρυθμίζουν την ομοιοστασία των ιόντων Ca²⁺ και Pi. Η παραγωγή της εντοπίζεται στα φυτά και τους ζυμομύκητες ως βιταμίνη D₂, ενώ στα ψάρια και τα θηλαστικά παράγεται η βιταμίνη D₃, οι οποίες παρά τις μικρές δομικές διαφορές τους δεν εμφανίζουν διαφοροποιημένη λειτουργία ή μεταβολισμό. Η βιταμίνη D₃ παράγεται στο δέρμα των ζώων μετά από έκθεση στον ήλιο με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, είτε παραλαμβάνεται από την τροφή (εικόνα 16). Προκειμένου να αποκτήσει την ενεργή μορφή της και να είναι ικανή να διατηρήσει την ομοιοστασία του Ca²⁺ και Pi, πρέπει να υποστεί δύο μεταβολικές τροποποιήσεις [272]. Αρχικά συντίθεται σε μία πρόδρομη μορφή, την προβιταμίνη D, η οποία είναι βιο-ανενεργή αλλά με τη βοήθεια μίας ειδικής πρωτεΐνης δέσμησης της βιταμίνης D₃ (Vitamin D binding protein, VDBP), που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταφέρεται πρώτα στο συκώτι [273]. Εκεί υφίσταται πρωτεολυτική ενεργοποίηση με την προσθήκη μία υδροξυλομάδας από την 25-υδροξυλάση και τη δράση των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (CYP27A1 και/ή CYP2R1) και παράγεται η 25-υδροξυβιταμίνη (25-hydroxyvitamin D, 25-(OH)D) [274, 275]. Η ανενεργή ακόμα 25-(OH)D εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος, δεσμεύεται από τη VDBP και μεταφέρεται στο νεφρό προκειμένου να υδροξυλιωθεί στη θέση 1α αυτή τη φορά από την 1α-υδροξυλάση (1α-hydroxylase, 1α(OH)ase, CYP27B1) του κυτοχρώματος και να μετατραπεί στην ενεργή 1α,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D₃, 1,25D) [272, 274].



Εικόνα 16. Η δομή της βιταμίνης D₃ (αριστερά) και ο μεταβολισμός της (δεξιά).

Η ενεργή πλέον $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, εφόσον μεταφερθεί σε κάποιο όργανο-στόχο, δεσμεύεται στον ειδικό υποδοχέα της (vitamin D receptor, VDR), δημιουργούν σύμπλοκο και ελέγχουν τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων, υπεύθυνων για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του Ca^{2+} και του P_i [276, 277] (εικόνα 17). Εκτός από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, εκλεκτική ενεργότητα εμφανίζει και η ενδιάμεση μορφή $25-(\text{OH})\text{D}$, η οποία προωθεί την απορρόφηση του Ca^{2+} από το έντερο.



Εικόνα 17. Μηχανισμός δράσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [278]

A.4.1 Ρύθμιση των ιόντων Ca^{2+} και P_i από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Η κυρία λειτουργία της ενεργής μορφής της βιταμίνης D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, είναι η διατήρηση της ομοιοστασίας του Ca^{2+} . Η λειτουργία αυτή πραγματοποιείται σε τρεις σημαντικούς ιστούς: στο έντερο (απορρόφηση του Ca^{2+}), στους νεφρούς (έκκριση Ca^{2+}) και στον σκελετό (αποθήκευση Ca^{2+}) και περιλαμβάνει τη συμμετοχή διαφόρων μορίων, όπως της παραθυρομόνης (parathyroid hormone, PTH), της $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$, του FGF-23, των επιπέδων P_i και Ca^{2+} αλλά και της ίδιας της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [279].

Τα μειωμένα επίπεδα Ca^{2+} στον ορό του αίματος, πυροδοτούν την έκκριση της PTH από τους παραθυροειδείς αδένες, η οποία επάγει την έκφραση της $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ στους νεφρούς και έτσι η $25-(\text{OH})\text{D}$, που είναι το προϊόν της πρώτης υδροξυλίωσης της βιταμίνης D_3 , μετατρέπεται σε $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Στη συνέχεια η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ δρα είτε μόνη της ή μαζί με την PTH στο έντερο προκαλώντας την αύξηση της απορρόφησης του Ca^{2+} και του P_i . Συγκεκριμένα η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ αλληλεπιδρά με τον VDR στα κύτταρα του λεπτού εντέρου και επάγει την έκφραση του επιθηλιακού καναλιού ασβεστίου TRPV6 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6). Παράλληλα, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα προωθούν την κίνηση ασβεστίου από τον εντερικό αυλό στην κυκλοφορία, όπως η πρωτεΐνη καλβινδίνη (calbindin, D9k) [280]. Όσον αφορά στο

φώσφορο, τα μειωμένα επίπεδά του στην κυκλοφορία επάγουν τη σύνθεση $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, η οποία στη συνέχεια ενισχύει την απορρόφησή του από τα εντεροκύτταρα [281].

Η λειτουργία της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα οστά περιλαμβάνει αρχικά τη διαφοροποίηση πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοκλάστες που προκαλούν οστική επαναρρόφηση με στόχο την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου και τελικά την αύξηση της συγκέντρωσή τους στην κυκλοφορία. Αντίθετα, σε περίπτωση που τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα ξεπεράσουν τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις, απελευθερώνεται η καλσιτονίνη (calcitonin) η οποία προωθεί την απόθεση ασβεστίου και φωσφόρου στα οστά (μεταλλοποίηση). Επιπλέον αλληλεπιδρά με τη PTH και καταστέλλει τη δράση της. Όταν τα επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} και P_i επανέλθουν στις φυσιολογικές τιμές, τότε μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και το Ca^{2+} καταστέλλουν τη δράση της PTH είτε έμμεσα, όπου το Ca^{2+} αναστέλλει την έκκριση της PTH ή άμεσα μέσω μεταγραφικής ρύθμισης του υποκινητή της PTH στον παραθυροειδή αδένα από το σύμπλοκο της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ με τον υποδοχέα της VDR [279, 280].

Επιπλέον, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ έχει την ικανότητα να αυτορυθμίζεται, προάγοντας στα κύτταρα-στόχους την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο 24-υδροξυλάση (24-hydroxylase, CYP24A1), το οποίο κόβει την υδροξυλομάδα από τη θέση 1 και την τοποθετεί στη θέση 24, καθιστώντας την βιταμίνη ανενεργή [282, 283].

A.4.2 Ορμονικές και γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D_3 στα χονδροκύτταρα

Η βιταμίνη D δεν αλληλεπιδρά μόνο με τους υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά επίσης αλληλεπιδρά και με τους πυρηνικούς υποδοχείς της βιταμίνης D, VDR, και μέσω αυτών επηρεάζει την μεταγραφή των γονιδίων. Πυρηνικοί υποδοχείς για την βιταμίνη D έχουν βρεθεί σε περισσότερα από 30 όργανα όπως στα οστά, το έντερο, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, τους μύες και το δέρμα αλλά και σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και κύτταρα του μυελού των οστών [284, 285].

Η παρουσία του VDR έχει εντοπιστεί επίσης και στα χονδροκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει τη δράση της βιταμίνης D και σε αυτόν τον τύπο κυττάρων. Διάφορες *in vitro* μελέτες αναφέρουν ότι οι μεταβολίτες της βιταμίνης D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση τόσο αναβολικών όσο και καταβολικών γονιδίων σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων [284, 286]. Συγκεκριμένα, μεταβολίτες της βιταμίνης D εμπλέκονται στη σύνθεση διαφορετικών τύπου κολλαγόνου, πρωτεογλυκανών, την έκφραση MMPs από τα

χονδροκύτταρα καθώς και την επαγωγή κυττάρων φλεγμονής, όπως φαγοκύτταρα [287-291].

Η απόκριση των χονδροκυττάρων στη βιταμίνη D και στον VDR εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησής τους και το σημείο του αρθρικού χόνδρου από το οποία προέρχονται [286, 292]. Τα προ-υπερτροφικά και υπερτροφικά χονδροκύτταρα, τα οποία εδράζουν στη «αυξητική ζώνη» (growth zone) του αρθρικού χόνδρου αποκρίνονται στη δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, η οποία προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης, του κολλαγόνου τύπου X – χαρακτηριστικών γονιδίων της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων-, καταβολικών MMPs, σύνθεση πρωτεογλυκανών, ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC) [293-295].

Η πρόσδεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον VDR αναφέρεται στη γενωμική δράση της βιταμίνης D και διάφοροι μελετητές επιχείρησαν τη διερεύνηση της σηματοδότησης που ενεργοποιεί η δημιουργία αυτού του συμπλόκου στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (εικόνα 18). Ο Masuyama και η ομάδα του (2006) προκάλεσαν την απενεργοποίηση του γονιδίου του VDR σε χονδροκύτταρα ποντικών και παρατήρησαν μειωμένη έκφραση κολλαγόνου τύπου II (βασικής δομικής πρωτεΐνης του ECM των πολλαπλασιαζόμενων χονδροκυττάρων), αύξηση της οστικής μάζας λόγω μειωμένης δραστηριότητας των οστεοκλαστών, ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του προσδέτη ενεργοποίησης του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κB (receptor activator nuclear factor κB ligand, RANKL), που ελέγχουν την είσοδο αγγείων και την αναρρόφηση του οστού αντίστοιχα. Μελέτες στις οποίες επέδρασαν με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με απενεργοποιημένο το γονίδιο του VDR, παρατήρησαν ότι τα χονδροκύτταρα δεν αποκρίνονται σε αυτό το ερέθισμα, γεγονός που τους οδήγησε στην υπόθεση ότι οι γενωμικές δράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα κύτταρα που εκφράζουν τον VDR εξαρτώνται από την δημιουργία συμπλόκου μεταξύ τους [296, 297]. Επιπλέον, διερευνήθηκαν όλες οι φαινοτυπικές επιπτώσεις της αναστολής του VDR σε ποντίκια μετά από βιοχημική ανάλυση των επιπέδων της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στο αίμα τους. Παραδόξως, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και φωσφόρου στην κυκλοφορία, παρόλο που η αναστολή του VDR ήταν στοχευμένη στα χονδροκύτταρα και δεν θα έπρεπε να επηρεάσει την ενδοκρινή λειτουργία της βιταμίνης D. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ένας παράγοντας που μεσολαβεί τις ενδοκρινείς δράσεις της βιταμίνης D και αυτός είναι ο φωσφατουρικός παράγοντας FGF-23, ο οποίος καταστέλλει τη δράση του ενζύμου 1α-υδροξυλάση και τη λειτουργία της αντλίας Na^+/P_i στους νεφρούς. Μέχρι τότε η έκφραση του FGF-23 από τα

χονδροκύτταρα είχε αποκλειστεί, κι έτσι πρότειναν ένα μηχανισμό δράσης της βιταμίνης D στα οστά, ο οποίος απαιτούσε τη σηματοδότηση του VDR από τα χονδροκύτταρα, τη μεσολάβηση ενός «άγνωστου» παράγοντα που εκκρίνεται από τα χονδροκύτταρα και επάγει την έκφραση του FGF-23 από τους οστεοβλάστες προκειμένου να επιτευχθεί φυσιολογική ανάπτυξη οστών και να διατηρηθεί η ομοιοστασία του φωσφόρου στα οστά [296].

Όσον αφορά στη σχέση μεταξύ FGF-23 και $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν μία αλληλεπίδραση αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (αλλαγές προκαλούν αντίδραση προς την αντίθετη κατεύθυνση). Η χορήγηση FGF-23 ή η επαγωγή της έκφρασης του FGF-23 στα πειραματόζωα είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, μέσω καταστολής της έκφρασης της 1α-υδροξυλάσης στα εγγύ εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών [298-301]. Επίσης, σε ποντίκια που έγινε απαλοιφή του γονιδίου του FGF-23, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον ορό των ποντικών [302]. Αντίθετα, η χορήγηση $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του FGF-23 στον ορό φυσιολογικών ποντικών, στην απορρόφηση του Pi στο έντερο και τη καταστολή της PTH [303]. Σε ποντίκια που είχαν υποστεί εκτομή του θυροειδούς και του παραθυροειδούς αδένου και κατά 5/6 εκτομή των νεφρών η αύξηση των επιπέδων του FGF-23 από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ δεν αναστάλθηκε, υποδηλώνοντας ότι η δράση αυτή είναι ανεξάρτητη της PTH [261]. Τέλος, μελέτες σε ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου του VDR έδειξαν μειωμένα επίπεδα FGF-23 [261, 304, 305]. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών συνηγορούν υπέρ της αμοιβαίας ρύθμισης μεταξύ FGF-23 και $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ με τη μεσολάβηση του VDR.

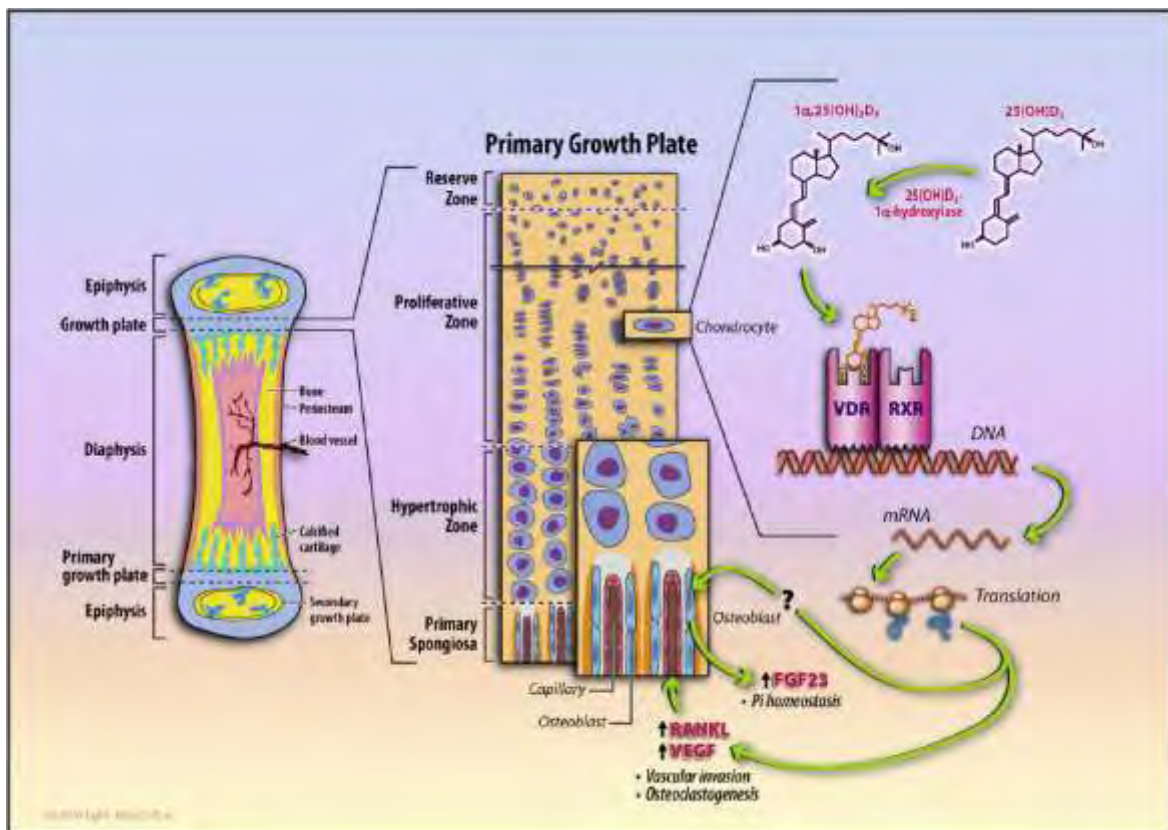
Η ρύθμιση του FGF-23 από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης του συμπλόκου $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR στον υποκινητή του FGF-23. Μελέτες επαγωγής με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σε καλλιέργειες οστεοβλαστών από ποντίκια είχαν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της δραστηριότητας του υποκινητή του FGF-23 και υποστηρίζουν την ύπαρξη ειδικών θέσεων δέσμευσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (vitamin D response elements, VDREs). Επιπλέον, η PTH είχε ανασταλτική δράση στη μεταγραφή του FGF-23, ενώ ο φώσφορος ή το ασβέστιο δεν είχαν κάποια επίδραση [306]. Όταν ο φώσφορος χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες των οστεοβλαστών συνδυαστικά με την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προέκυψε ένα αθροιστικό αποτέλεσμα όσον αφορά στην μεταγραφή του FGF-23 [261]. Το συμπέρασμα αυτών των μελετών ήταν ένας μηχανισμός ρύθμισης, κατά τον οποίο αφενός η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προκαλεί την κύρια επαγωγή του FGF-23 στα οστά με σκοπό την ισορροπία στην απορρόφηση του Pi στο έντερο και αφετέρου ο FGF23 προκαλεί την απομάκρυνση του Pi από το ουροποιητικό.

Οι δράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα χονδροκύτταρα περιλαμβάνουν την αναστολή της σύνθεσης του DNA των προ-υπερτροφικών και υπερτροφικών χονδροκυττάρων, την ελάττωση της σύνθεσης των πρωτεογλυκανών, την αύξηση της παραγωγής της αλκαλικής φωσφατάσης και την έκφραση των MMPs στα μεμβρανικά κυστίδια [288, 307, 308]. Επιπλέον η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προκαλεί απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας των μεμβρανικών κυστιδίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων Pi/Ca^{2+} καθώς και των ενζύμων MMPs που αποικοδομούν το ECM. Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ αυξάνει τον ρυθμό και το μέγεθος της αποκοδόμησης του ECM στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα [309]. Υπάρχουν παράγοντες που ενισχύουν τη δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυσσόμενης πλάκας, με κυριότερο το φώσφορο. Κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, το Pi λειτουργεί ως σηματοδότηση για την φυσιολογική μεταλλοποίηση των χονδροκυττάρων, μία διαδικασία απαραίτητη για την ανάπτυξη των μακρών οστών [263, 310]. Η σειρά με την οποία συμβαίνουν τα γεγονότα στην αναπτυσσόμενη πλάκα, περιλαμβάνουν τη δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα μεμβρανικά κυστίδια στα οποία επάγει την έκφραση των MMPs, προκαλεί τη λύση της μεμβράνης τους και κατ' επέκταση την απελευθέρωση Pi και MMPs στο ECM. Στη συνέχεια, αντλίες Na^+/Pi που υπάρχουν στη μεμβράνη των χονδροκυττάρων (όπως Pit-1, Pit-2) επιτρέπουν την είσοδο του Pi ενδοκυττάρια και την ενεργοποίηση της απόπτωσης από τα μιτοχόνδρια [218, 311]. Μελέτες σε ποντίκια υποστηρίζουν ότι τα μειωμένα επίπεδα Pi στα χονδροκύτταρα αναστέλλουν την απόπτωση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων της αναπτυσσόμενης πλάκας με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών, όπως ραχίτιδα [312]. Επιπλέον, η επαγωγή με Pi σε καλλιέργειες υπερτροφικών χονδροκυττάρων νεογέννητων ποντικών προκαλεί την αύξηση των μιτοχονδριακών κασπασών-9 και -3 με τη μεσολάβηση του μονοπατιού των MAP-κινάσων καθώς και τη φωσφορύλιση της κινάσης ERK1/2 [313].

A.4.3 Προέλευση βιταμίνης D₃

Εφόσον ήταν πλέον γνωστή η δράση της σηματοδότησης του VDR στα χονδροκύτταρα και η ικανότητα παραγωγής όλων των απαραίτητων ενζύμων του μεταβολισμού της βιταμίνης D σε αυτόν τον τύπο κυττάρων, προέκυπτε το ερώτημα της προέλευσης της βιταμίνης D, εάν προέρχεται από την κυκλοφορία ή συντίθεται τοπικά [314, 315]. Στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα οστά στερούνται αγγείων, επομένως θα πρέπει να συμβαίνει τοπική σύνθεση της βιταμίνης D προκειμένου να συμβάλει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της λειτουργίας των χονδροκυττάρων της αναπτυσσόμενης πλάκας. Όπως συμβαίνει με τις φυλετικές ορμόνες, οιστρογόνα και ανδρογόνα, παρά την

«κεντρική» στεροειδογένεση που πραγματοποιείται στις γονάδες, παρατηρείται και η τοπική σύνθεση και δράση τους στο δέρμα και το λιπώδη ιστό όπου ρυθμίζουν τη λειτουργία τους [316, 317]. Προκειμένου να απαντήσουν στο ερώτημα της προέλευσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ανέστειλαν το γονίδιο της 1α -υδροξυλάσης στα χονδροκύτταρα ποντικών και παρατήρησαν ότι διαταράσσεται η οστεοκλαστογένεση και η έκφραση βασικών γονιδίων της αναπτυξιακής πλάκας, προτείνοντας τη αυτοκρινή/παρακρινή δράση της βιταμίνης D στα χονδροκύτταρα [296].



Εικόνα 18. Άμεση γενωμική δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σηματοδότησης στα χονδροκύτταρα. Παρουσιάζεται η μορφολογία των μακριών οστών με μεγενθυμένη την αναπτυξιακή πλάκα. Τα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα εκφράζουν το γονίδιο 1α -υδροξυλάση καθώς και για τον VDR. Η πρόσδεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στο διμερές VDR/RXR ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων, όπως τα VEGF που ελέγχει την είσοδο αγγείων και του RANK που επάγει την οστεοκλαστογένεση στο σημείο ένωσης του χόνδρου με το οστό. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ρυθμίζει την έκφραση του FGF-23 με τη μεσολάβηση ενός παράγοντα “?” [318]

Η τοπική σύνθεση και δράση της βιταμίνης D έχει υποστηριχτεί και από άλλους ερευνητές που μελέτησαν αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σηπτική νέκρωση και οστεοαρθρίτιδα [319]. Στο αρθρικό υγρό ασθενών με διαταραχές σε αρθρώσεις γόνατος έχουν ανιχνευθεί οι μεταβολίτες της βιταμίνης D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ καθώς και η πρωτεΐνη δέσμευσης, VDBP, σε συγκεντρώσεις 50% αυτών του ορού. Η παρουσία αυτών των μεταβολιτών και της VDBP στο αρθρικό υγρό δικαιολογείται από το γεγονός ότι το αρθρικό υγρό

δημιουργείται από τον ορό εμπλουτισμένο με υαλουρονικό οξύ και γλυκοπρωτεΐνες που το καθιστούν παχύρευστο [320]. Στην παρούσα μελέτη παρατήρησαν ότι κύτταρα του αρθρικού υγρού υπό την επίδραση της φλεγμονώδους ιντερφερόνης- γ είναι ικανά να συνθέτουν την ενεργή μορφή της βιταμίνης D_3 , $1,25(OH)_2D_3$. Η τοπική σύνθεση της πραγματοποιείται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκφράζουν τον VDR και είναι παρόντα στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα και οστεοαρθρίτιδα και η δράση τους έχει ιδιαίτερη σημασία όταν αυτά εντοπίζονται κοντά στα σημεία διάβρωσης της άρθρωσης. Συνεπάγεται ότι η $1,25(OH)_2D_3$ εμφανίζει σύνθετες παρακρινείς/αυτοκρινείς και ανοσορυθμιστικές λειτουργίες στην αρθρίτιδα [319].

Στην οστεοαρθρίτιδα παρατηρείται σταδιακός εκφυλισμός του χόνδρου εν μέρει λόγω της έντονης δραστηριότητας των καταβολικών ενζύμων, MMPs. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση τόσο μεταγραφικά όσο και πρωτεϊνικά των ενζύμων μεταλλοπρωτεΐνάση-1, -13, -9 και -3 ενδοκυττάρια αλλά και στο ECM OA χόνδρου [121, 227, 321, 322]. Η παρουσία των καταβολικών αυτών ενζύμων ήταν έντονη σε χονδροκύτταρα που εκφράζουν τον VDR (VDR^+) υποδηλώνοντας την εμπλοκή της $1,25(OH)_2D_3$ στην παραγωγή των MMPs, προσταγλανδίνης E_2 και TNF- α στα σημεία διάβρωσης του OA χόνδρου. Η επαγωγή της έκφρασης των καταβολικών και φλεγμονωδών μορίων από την $1,25(OH)_2D_3$, εξαρτάται από την έκφραση του VDR στα OA χονδροκύτταρα, η οποία έχει αναφερθεί ότι είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με τα φυσιολογικά [121].

A.5 Σχεδιασμός μελέτης – Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην υπερτροφία και την επασβέστωση του οστεοαρθρικού χόνδρου, η ανεύερση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους καθώς και η αναστολή της έκφρασης τους, για στοχεύοντας στην αναστροφή του υπερτροφικού ΟΑ φαινότυπου σε φυσιολογικό.

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν:

- η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση γονιδίων, χαρακτηριστικών της υπερτροφίας, της επασβέστωσης και του καταβολισμού, όπως τα COL10A1, OPN, OC και MMP-13 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- η έκφραση και ο κυτταρικός εντοπισμός του VDR, υποδοχέα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, καθώς και η έκφραση των συμμεταφορέων Na^+/Pi , Pit-1 και Pit-2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- η έκφραση και ο ρόλος μεταγραφικών και αυξητικών παραγόντων όπως οι RUNX2 και FGF-23 καθώς και ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους με τον VDR στην υπερτροφία σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- η έκφραση του υποδοχέα του FGF23, FGFR1c, και η μοριακή σηματοδότηση που ενεργοποιείται από την σύνδεσή τους σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα,
- ο ρόλος της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στην επαγωγή της υπερτροφίας και επασβέστωσης των ΟΑ χονδροκυττάρων και η ανάδειξη του μηχανισμού που μεσολαβεί τις δράσεις τους.
- η αναστολή της έκφρασης του VDR και των αντλιών Pit-1, Pit-2 σε ΟΑ χονδροκύτταρα με στόχο την αναστροφή του υπερτροφικού φαινότυπου των ΟΑ χονδροκυττάρων.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από όλους τους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ελήφθη επίσης αρθρικό υγρό υπό άσηπτες συνθήκες στο χώρο του χειρουργείου καθώς και περιφερικό αίμα.

Όλα τα δείγματα αρθρικού χόνδρου χαρακτηρίζονταν από τη παρουσία οστεοφύτων. Τα οστεόφυτα είναι οστικές προεκβολές που σχηματίζονται στο σημείο εκφυλισμού του χόνδρου λόγω της αναβολικής δραστηριότητας των χονδροκυττάρων, στην προσπάθειά τους να αποκαταστήσουν τη βλάβη. Στην υποκείμενη και παρακείμενη περιοχή των οστεοφύτων τα χονδροκύτταρα μετατρέπονται σε υπερτροφικά [106]. Η λήψη του δείγματος πραγματοποιήθηκε από την περιοχή γύρω από τα οστεόφυτα. Από κάθε δείγμα ΟΑ χόνδρου έγινε άμεσα απομόνωση mRNA και ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, προκειμένου η μελέτη έκφρασης των γονιδίων να αντικατοπτρίζει την in vivo κατάσταση. Επίσης, ακολούθησε καλλιέργεια των χονδροκυττάρων από κάθε δείγμα αρθρικού χόνδρου.

Στη μελέτη τελικά συμπεριλήφθηκαν 48 δείγματα οστεοαρθρικού χόνδρου γόνατος (8 άνδρες/40 γυναίκες). Το εύρος ηλικίας, το βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως χονδροδυσπλασία, ΟΑ μετά από σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Στοιχεία ασθενών	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	68.9556	77.6818	30.0190
Μέγιστος	91.00	110.00	44.28
Τυπική απόκλιση	6.87537	13.79041	5.07717
Ελάχιστος	56.00	50.00	22.68
Σύνολο δειγμάτων	48	48	48

Πίνακας 2. Αναλυτικά στοιχεία ασθενών που αποτέλεσαν το υπό εξέταση σύνολο δειγμάτων.

Την ομάδα ελέγχου την αποτελούσαν 10 άτομα (5 άνδρες/5 γυναίκες). Το εύρος ηλικίας ήταν από 48 έως 60 με μέσο όρο 54 ± 7.6 και BMI 22.57- 25.97 με μέσο όρο 24.55 ± 1.43 (Πίνακας 3), χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία χειρουργήθηκαν για λόγους επανόρθωσης κατάγματος ή λόγω τραυματισμού.

Στοιχεία ομάδας ελέγχου	Ηλικία	Βάρος	BMI
Μέσος όρος	54	65	24.55
Μέγιστος	60	80	25.97
Τυπική απόκλιση	7.6	3.2	1.43
Ελάχιστος	48	50.00	22.57
Σύνολο δειγμάτων	10	10	10

Πίνακας 3. Αναλυτικά στοιχεία ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Αναλυτικά κλινικά δεδομένα από κάθε ασθενή συμπληρώθηκαν σε ειδική φόρμα που αφορούσαν το βαθμό της φυσικής τους κατάστασης, τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), τη παρουσία πόνου, δυσκαμψίας, διόγκωσης της άρθρωσης, την παρουσία οστεοφύτων και την παρουσία άλλων νοσημάτων. Πριν οι ασθενείς υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence [323]. Από το σύνολο των ασθενών, 8 εμφάνισαν βαθμολογία 3 στην κλίμακα Kellgren-Lawrence και 42 βαθμολογήθηκαν με 4.

B.1.2. Καλλιέργεια χονδροκυττάρων

Η απομόνωση και καλλιέργεια των χονδροκυττάρων έγινε από τμήμα αρθρικού χόνδρου στο οποίο είχαν σχηματιστεί οστεόφυτα και ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Μετά την παραλαβή του δείγματος από το χειρουργείο έγινε έκπλυση του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα Hanks' Balanced Salt Solution χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (HBSS w/o, GIBCO BRL, UK), ώστε να απαλλαγεί από υπολείμματα του χειρουργείου και παράλληλα να διατηρηθεί σταθερό το pH του.

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

περιβάλλει. Για την καλλιέργεια των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 5% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει αναγκαίους αναπτυξιακούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S, Roche) σε αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4° C.

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

Αναλυτική διαδικασία:

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού σε τριβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος HBSS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (σε θερμοκρασία δωματίου, room temperature, RT)
- Ξέπλυμα του ιστού 2-3 φορές (απομάκρυνση υπολειμμάτων του χειρουργείου και διατήρηση του pH σταθερό)
- Τεμαχισμός του ιστού με αποστειρωμένο νυστέρι για την απελευθέρωση των κυττάρων
- Μεταφορά των τεμαχίων σε 6 well plates (χωράει 2ml θρεπτικού υλικού το κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche) 5mg/ml μαζί με 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου με αποστειρωμένη πλαστική πιπέτα Pasteur μιας χρήσης.
- Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche) 5mg/ml μαζί με 2ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 90 λεπτά (ανάδευση υπερκειμένου ανά 15 λεπτά)
- Με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μηχανική υποβοήθηση στην απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των κολλαγόνων ινών
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon), φυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 2000rpm για 7min σε RT, απόρριψη του

υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές

- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm³ μαζί με 5 ml πλήρες θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂)

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 48ώρες προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και αποκτούν πεπλατυσμένο, πολυγωνικό σχήμα. Στην εικόνα 19 φαίνονται οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα μετά από καλλιέργεια 7 ημερών.



Εικόνα 19. Οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε καλλιέργεια 7 ημερών (20x μεγέθυνση)

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

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως γινόταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς συλλογή των κυττάρων. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με πλάκα Neubauer: 20μl από το

κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20μl Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση 1-2 x10⁶ κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση 4-5 x 10⁶/ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους -20° C για 4 ώρες, κατόπιν στους -80° C για 24ώρες και τελικά στους -150° C.

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37° C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25ml και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

B.1.3 Απομόνωση RNA από φρέσκο αρθρικό χόνδρο και από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα

Ο αρθρικός χόνδρος χαρακτηρίζεται από μικρή κυτταρική συγκέντρωση (1-2% της μάζας του) και μεγάλη συγκέντρωση εξωκυττάριας ουσίας υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεογλυκάνες. Η κύρια πρωτεογλυκάνη, η αγγρεκάνη, έχει την τάση να συναπομονώνεται με το RNA καθώς πρόκειται για ένα μεγάλο σε μέγεθος και ισχυρά αρνητικά φορτισμένο μακρομόριο. Για το λόγο αυτό, εκτός από την απομόνωση mRNA από καλλιέργειες χονδροκυττάρων έπειτα από επίδραση ουσιών, η διερεύνηση της μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε mRNA που απομονώθηκε αμέσως μετά τη λήψη του αρθρικού χόνδρου από το χειρουργείο.

Οι φρέσκοι ιστοί (εντός μίας ώρας από το χειρουργείο) τεμαχίστηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι No11 και ένα τμήμα του κομμένου ιστού χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση RNA, ενώ το δεύτερο για την απομόνωση χονδροκυττάρων. Σε

πρώτη φάση ο ιστός ομογενοποιήθηκε έτσι ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα μεταξύ τους.

I. Ομογενοποίηση.

Η ομογενοποίηση έγινε με προσθήκη 1600μl Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) και 160 μl χλωροφόρμιο (Scharlau) στα κύτταρα και διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα, με χρήση ομογενοποιητή (IKA-WERKE) και Vortex με στόχο την λύση των κυττάρων.

II. Διαχωρισμός φάσεων.

Μετά την ομογενοποίηση, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 15 λεπτά, κάθε δείγμα χόνδρου μεταγγίστηκε σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA.

III. Κατακρήμνιση

Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml όπου πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης, καλή ανάδευση και στη συνέχεια τοποθέτηση του δείγματος στους -20°C όπου και μπορεί να παραμείνει έως 10 ημέρες.

IV. Έκπλυση

Μετά από παραμονή του δείγματος στους -20°C για τουλάχιστον 24 ώρες, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml κρύας αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στις 12000rpm στους 4°C και επανάληψη των δύο προηγούμενων βημάτων.

V. Επαναδιάλυση

Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά (το σωληνάριο βρίσκεται σε πάγο με ανοιχτό καπάκι και προστατευμένο με τρυπημένη μεμβράνη) διαλυτοποιείται. Η διάλυση γίνεται με προσθήκη 80-100μl ddH₂O.

VI. Καθαρισμός του RNA

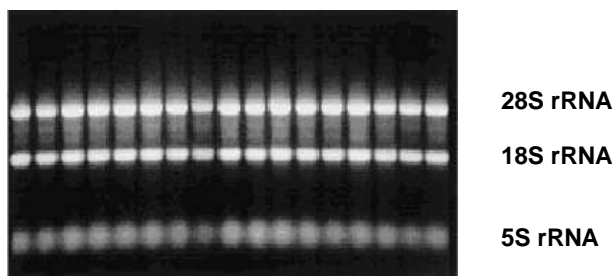
Ο καθαρισμός του διαλύματος γίνεται με ειδικό kit (RNeasy Protect Mini Kit, Qiagen). Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης η οποία δεσμεύει επιλεκτικά το RNA, ενώ είναι διαπερατή από τα λοιπά μόρια που μπορεί να επιμολύνουν το RNA.

VII. Φωτομέτρηση – Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA με βάση τον τύπο: συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD_{260} x 40 (mgr/ml)

VIII. Ηλεκτροφόρηση – Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 20).



Εικόνα 20. Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%

Η απομόνωση RNA από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα γίνεται με την προσθήκη Trizol στο ίζημα που προκύπτει μετά από την φυγοκέντρηση αποκολλημένων από τη φλάσκα χονδροκυττάρων σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί.

B.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα RNA που απομονώθηκαν από τα καλλιεργημένα και μη χονδροκύτταρα, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl). Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την αντίδραση σύνθεσης cDNA για όγκο RNA αντιστοιχεί σε 1μgr περιέχει:

➤ RNA	→	1	μgr
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x	→	4	μl
➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/ml)	→	3	μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	→	2	μl
➤ MMLV RT (200U/μl)	→	1	μl
➤ δισ απεσταγμένο νερό	→	μέχρι τελικού όγκου 20μl	

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
 - Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH₂O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
 - Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.
 - Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 37°C , 60 λεπτά
 - 65°C , 10 λεπτά
 - τελική θερμοκρασία: 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RAR α (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του προϊόντος, το cDNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RAR α cDNA (RAR6/RAR8). Οι εκκινητές για το γονίδιο RAR α είναι:

RAR6: 5' GGTGCCTCCCTACGCCTTCT 3'

RAR8: 5' GGCGCTGACCCCATAGTGGT 3'

- Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου RAR α περιέχει:

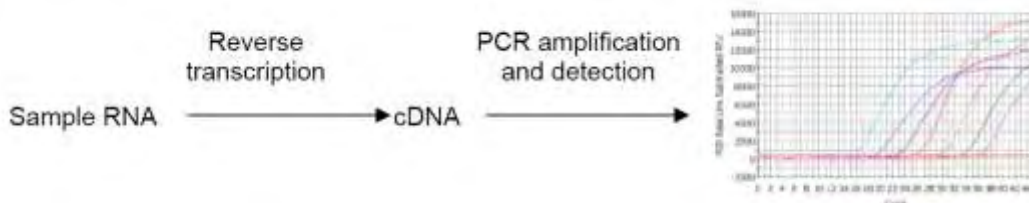
➤ cDNA	→	3	μl
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	→	5	μl
➤ MgCl ₂ (50mM)	→	3	μl
➤ Εκκινητής RAR6 (50p/mol)	→	1.5	μl
➤ Εκκινητής RAR8 (50p/mol)	→	1.5	μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	→	0.5	μl
➤ DNA πολυμεράση	→	0.4	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	35.1	μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
 - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
 - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 53°C για 1 λεπτό
 - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
 - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

B.1.5 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του VDR, Pit-1, Pit-2, RUNX2, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP-13, OPN, OC με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)

I. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time polymerase chain reaction), είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA –στόχου. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά το τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού, σε πραγματικό χρόνο (real time) (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής μπορεί να γίνει είτε σε ξεχωριστή αντίδραση (two step RT-PCR) και το παραγόμενο cDNA να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την real-time PCR, είτε σε μία συνδυασμένη αντίδραση χρησιμοποιώντας θερμοανθεκτική DNA εξαρτώμενη πολυμεράση (one-step RT-PCR). Όλα τα υπόλοιπα στάδια διεξάγονται από τη συσκευή της Real-time PCR (thermal cycler/detector) και τα ποσοτικά αποτελέσματα προωθούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Υπάρχουν τέσσερις τεχνικές που ανιχνεύουν το πολλαπλασιαζόμενο προϊόν με την ίδια περίπου ευαισθησία και βασίζονται στην χρησιμοποίηση φθορίζοντων χρωστικών:

Μοριακοί σηματοδότες (molecular beacon): πρόκειται για μόρια υβριδισμού (hybridization probes) συμπληρωματικά με αλληλουχία του αναμενόμενου μετάγραφου (amplicon). Στο ένα άκρο τους φέρουν φθορίζον μόριο και στο άλλο άκρο τους μόριο που εμποδίζει το φθορισμό του πρώτου (quencher). Στο διάλυμα

τα ελεύθερα μόρια του σηματοδότη λαμβάνουν διαμόρφωση φουρκέτας με αποτέλεσμα η επαφή των δύο άκρων τους να εμποδίζει το φθορισμό. Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing), παρουσία συμπληρωματικής αλληλουχίας του μορίου στόχου, υφίστανται αλλαγή της διαμόρφωσής τους, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των άκρων τους και το φθορισμό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο με αποτέλεσμα η ένταση του φθορισμού να αντικατοπτρίζει το ποσό του ενισχυμένου προϊόντος στο τέλος του προηγούμενου κύκλου. Πλεονέκτημα είναι η υψηλή ειδικότητα ενώ μειονέκτημα η δυσκολία στο σχεδιασμό του σηματοδότη.

Μόρια υβριδισμού (hybridization probes): βασίζεται στην παρουσία δύο μορίων συμπληρωματικών με την αλληλουχία του αναμενόμενου μετάγραφου (amplicon). Το πρώτο φέρει στο 3' άκρο φθορίζον μόριο δότη (fluorescein donor) και το δεύτερο μόριο δέκτη (fluorophore acceptor). Στο διάλυμα τα ελεύθερα μόρια είναι απομακρυσμένα και εκπέμπεται φθορισμός χαμηλού μήκους κύματος (background fluorescence). Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing) προσδένονται στη συμπληρωματική αλληλουχία του μορίου στόχου διαδοχικά (με διαμόρφωση κεφαλής-ουράς) με αποτέλεσμα οι δύο χρωστικές να έρχονται σε επαφή και να εκπέμπεται φθορισμός υψηλότερου μήκους κύματος. Η παρουσία δυο ανεξάρτητων μορίων υβριδισμού αυξάνει την ειδικότητα της μεθόδου και καθιστά πιο ευέλικτο το σχεδιασμό των μορίων υβριδισμού.

Υδρολυόμενα μόρια (hydrolysis probes): βασίζεται στην ιδιότητα της 5' νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία υδρολύει ειδικό μόριο (hybridization probe) που προσδένεται στο μετάγραφο. Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing) – που συμβαίνει στην ίδια θερμοκρασία με το στάδιο πολυμερισμού (extension)- εκτός από τους ειδικούς εκκινητές (primers) προσδένεται και ένα τρίτο μόριο (hybridization probe). Το μόριο αυτό φέρει στο 5' άκρο του μία φθορίζουσα χρωστική (fluorescent reporter dye) και στο 3' άκρο ένα μόριο που εμποδίζει το φθορισμό της χρωστικής (quencher). Η πολυμεράση εκτοπίζει και υδρολύει το σημασμένο μόριο με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής από το μόριο που εμποδίζει το φθορισμό και την ανίχνευση φθορισμού. Το σήμα που λαμβάνεται είναι ευθέως ανάλογο του αριθμού των μορίων που υπάρχουν στο τέλος του προηγούμενου κύκλου ή την αρχή του επόμενου. Η μέθοδος έχει μεγάλη ειδικότητα αλλά είναι πιο δύσκολη στο σχεδιασμό.

Χρωστικές προσδεόμενες στο DNA (DNA-binding dyes): βασίζεται στην ανίχνευση ειδικής φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green) που προσδένεται στο δίκλωνο μόριο DNA. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα, ενώ κατά το στάδιο επιμήκυνσης (elongation) αυξανόμενα ποσά χρωστικής προσδένονται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την αύξηση

στην ανίχνευση του φορίζοντος σήματος. Το σήμα αυτό μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation). Συνεπώς η ανίχνευση του σήματος στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου είναι εκείνη που καταγράφει το αυξανόμενο ποσό του DNA. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ειδικότητα καθορίζεται αποκλειστικά από τους εκκινητές. Αφού η παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου μόριου DNA εκπέμπει φθορισμό, η μέθοδος δεν είναι πιο ειδική από τη συμβατική RT-PCR. Ωστόσο η ειδικότητα των προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί δημιουργώντας την καμπύλη τήξεως ή αποδιάταξης (melting curve or dissociation curve) του προϊόντος. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας το φθορισμό που λαμβάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως (T_m) του πολλαπλασιαζόμενου μορίου (amplicon). Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση, είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

σχεδιασμό φθορίζοντων μορίων (probes) ειδικών έναντι του μορίου στόχου που πολλαπλασιάζεται. Στην παρούσα μελέτη επελέγη η μέθοδος ανίχνευσής τους με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής SYBR GREEN.

II. Σχεδιασμός του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA

Το βέλτιστο μήκος του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA (μορίου-στόχου) για την Real-time PCR είναι μικρότερο από 100 ζεύγη βάσεων (bp). Τα μικρότερα μόρια πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη απόδοση και είναι πιο ανθεκτικά στις συνθήκες της αντίδρασης.

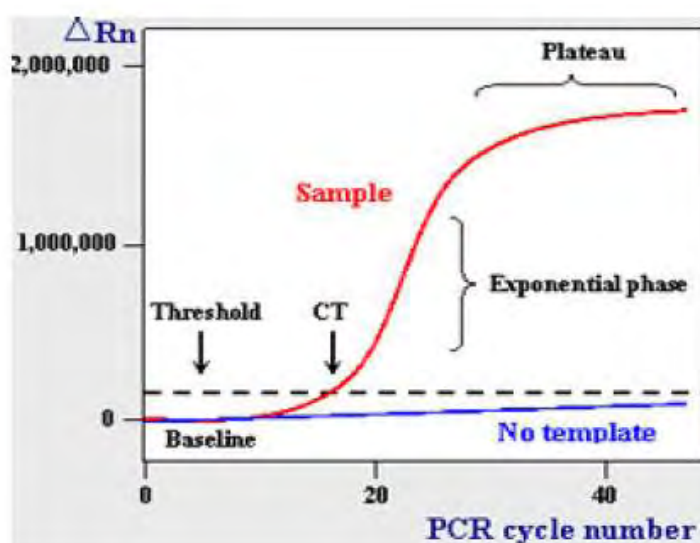
III. Σχεδιασμός των ειδικών εκκινητών

Οι ειδικοί εκκινητές θα πρέπει να προσδένονται στην ένωση δύο εξονίων προκειμένου να αποφεύγονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό γενομικού DNA που έχει επιμολύνει το δείγμα. Ο σχεδιασμός τους βασίζεται στην εκτιμώμενη θερμοκρασία τήξεως τους (T_m), στην προτίμηση για πολλαπλασιαζόμενα τμήματα DNA μικρού μεγέθους καθώς και στη θέση πρόσδεσης των probes. Το βέλτιστο μήκος τους είναι περίπου 15-20 βάσεις και η περιεκτικότητά τους σε βάσεις γουανίνης/κυτοσίνης (G/C) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-70%. Η θερμοκρασία τήξης τους δε θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 1-2°C, με ελάχιστη και μέγιστη τους 58°C και 60°C αντίστοιχα. Η παρουσία τους σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προάγει τη λανθασμένη πρόσδεσή τους (mispriming) και τη συσσώρευση μη ειδικού προϊόντος. Αντίθετα η χαμηλή συγκέντρωσή τους σπάνια αποτελεί πρόβλημα για τη Real-Time PCR διότι τα αντίγραφα του μορίου στόχου έχουν συνήθως υπολογιστεί πριν εξαντληθεί η ποσότητα των εκκινητών. Υπάρχουν διάφορα προγράμματα σχεδιασμού ειδικών

εκκινητών. Αυτό που χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών στην παρούσα μελέτη είναι το λογισμικό Primer 3.

IV. Ποσοτικοποίηση

Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει μία αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) στην οποία φαίνονται οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται κατά την ποσοτικοποίηση (εικόνα 22). Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι το γράφημα του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης.



Εικόνα 22. Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) που προκύπτει κατά τη Real-time PCR (αναλυτικά στο κείμενο).

Στους αρχικούς κύκλους της PCR παρατηρείται μια μικρή αλλαγή στο σήμα φθορισμού. Αυτή η φάση αντιστοιχεί στο αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού (baseline) του γραφήματος. Οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο είναι το αρχικό ποσό του μορίου-στόχου (template) κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται προκειμένου να φτάσει η αντίδραση στο σημείο εκείνο που το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού [324]. Αυτό το σημείο ορίζεται ως Ct (threshold cycle) και εντοπίζεται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού (plateau). Το ΔRn (delta Rn) είναι το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR. Η ένταση του εκπεμπόμενου

φθορισμού της χρωστικής διαιρούμενη από την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μιας χρωστικής αναφοράς αποτελεί το Rn (normalized reporter). Αυτή η χρωστική αναφοράς (passive reference dye) είναι απαραίτητη για την διόρθωση διακυμάνσεων που αφορούν αλλαγές στη συγκέντρωση ή τον όγκο και συμπεριλαμβάνεται σε όλα τα SDS kits της αντίδρασης PCR.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην real-time PCR μπορεί να είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Η **απόλυτη** ποσοτικοποίηση γίνεται όταν είναι αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του RNA στόχου, και πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης (absolute standard curve). Αυτό προϋποθέτει τη συμβολή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Η **σχετική** ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με πρότυπη καμπύλη ή με την συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT method). Και οι δύο μέθοδοι δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα. Όσον αφορά την πρότυπη καμπύλη, η ποσότητα του μορίου-στόχου εκφράζεται σε σχέση με ένα δείγμα που λέγεται ρυθμιστής (calibrator). Η ζητούμενη ποσότητα καθορίζεται από την πρότυπη καμπύλη και διαιρείται από την ποσότητα του ρυθμιστή. Έτσι ο ρυθμιστής αποτελεί το 1× δείγμα και όλες οι άλλες ποσότητες εκφράζονται ως n-φορές σε σχέση με αυτόν. Επειδή ακριβώς η ποσότητα του δείγματος διαιρείται με την ποσότητα του ρυθμιστή, η γνώση της απόλυτης τιμής των πρότυπων δειγμάτων (standards) που θα δημιουργήσουν την καμπύλη δεν είναι αναγκαία. Στην περίπτωση κατά την οποία η ποσότητα του δείγματος μας κανονικοποιείται ως προς ένα εσωτερικό μάρτυρα (endogenous control), οι πρότυπες καμπύλες δημιουργούνται τόσο για το μόριο-στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα. Για κάθε δείγμα το ποσό του στόχου και του εσωτερικού μάρτυρα καθορίζεται από την κατάλληλη πρότυπη καμπύλη, και από τον λόγο τους προκύπτει η κανονικοποιημένη τιμή του μορίου-στόχου (normalized target value). Κάθε κανονικοποιημένη τιμή στη συνέχεια διαιρείται από την κανονικοποιημένη τιμή του calibrator και έτσι προκύπτει το σχετικό επίπεδο έκφρασης ως προς αυτόν που, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί το 1×δείγμα.

Η δεύτερη μέθοδος, η συγκριτική CT μέθοδος (comparative CT method), είναι παρόμοια με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης αλλά βασίζεται σε αριθμητικούς τύπους για να επιτύχει το ίδιο αποτέλεσμα σχετικής ποσοτικοποίησης. Το ποσό του μορίου-στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο-ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Το πλεονέκτημα της συγκριτικής C_T μεθόδου είναι ακριβώς ότι δεν υπάρχει ανάγκη δημιουργίας πρότυπης καμπύλης και αποφεύγονται τα λάθη κατά την αραίωση των δειγμάτων για τη δημιουργία της. Επίσης επιτρέπει να παραμείνουν

αχρησιμοποίητα αρκετά πηγαδάκια (wells) εξοικονομώντας χώρο για μεγαλύτερο προς μελέτη αριθμό δειγμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα συγκεκριμένα πειράματα όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι μεγάλος και κάθε δείγμα ελέγχεται δύο φορές σε κάθε αντίδραση. Για τους παραπάνω λόγους στην παρούσα μελέτη επελέγη η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με την συγκριτική μέθοδο (comparative CT method).

V. Κανονικοποίηση- Επιλογή εσωτερικού μάρτυρα

Κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι δυνατό να προκύψουν σφάλματα που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού του υλικού DNA ή RNA μεταξύ των δειγμάτων. Η διόρθωση αυτής της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού μάρτυρα (endogenous control) ως προς τον οποίο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, θα κανονικοποιηθεί στη συνέχεια το δείγμα. Ο ιδανικός εσωτερικός μάρτυρας θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφόρων ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης, και θα πρέπει να παραμένει ανεπηρέαστος από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης θα πρέπει να εκφράζεται αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι η β-ακτίνη, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και άλλα RNAs. Στην παρούσα μελέτη ως εσωτερικός μάρτυρας επελέγη η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Αποτελεί ένα από τα πρώτα RNA που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό. Εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας.

VI. Βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση two step RT- PCR. Αυτό σημαίνει ότι προηγήθηκε σε ξεχωριστό στάδιο η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και στη συνέχεια το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση της real-time PCR. Για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το σφάλμα που προκύπτει από διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης RT, όλα τα δείγματα cDNA παρασκευάστηκαν μαζί χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια και τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια συσκευή PCR. Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της αντίδρασης real-time PCR κάθε δείγμα «έτρεξε» στη αντίδραση εις διπλούν (duplicates). Στην ίδια αντίδραση τα ίδια δείγματα ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας και εκκινήτες που ανίχνευαν τον εσωτερικό μάρτυρα GAPDH. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν δυο είδη αντιδράσεων control:

αντιδράσεις με όλα τα συστατικά εκτός του cDNA και αντιδράσεις με όλα τα συστατικά στα οποία αντί του cDNA προστίθεται το προϊόν της αντίδρασης control της αντίστροφης μεταγραφής και για τα δύο είδη εκκινητών (του εκάστοτε γονιδίου και της GAPDH). Τέλος χρησιμοποιήθηκε και δείγμα που εκφράζει τα υπό μελέτη γονίδια και αποτέλεσε τον ρυθμιστή (calibrator) ως προς τον οποίο εκφράστηκαν τα ποσοτικά αποτελέσματα των γονιδίων.

Για κάθε δείγμα το μηχάνημα της real-time PCR μας δίνει την τιμή Ct, καθώς και τις γραφικές παραστάσεις πολλαπλασιασμού (amplification plot) και τις καμπύλες τήξεως ή αποδιάταξης (melting curve or dissociation curve) των προϊόντων και σύμφωνα με τα παραπάνω υπολογίζεται για κάθε δείγμα το $2^{-\Delta\Delta CT}$. Το σύνολο των τιμών επεξεργάζεται στη συνέχεια με στατιστικό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στους διαφορετικούς πληθυσμούς μελέτης.

VII. Σχεδιασμός και προετοιμασία της αντίδρασης

Πριν την αντίδραση, στο cDNA κάθε δείγματος έγινε αραιώση 1:10 και χρησιμοποιήθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 1 μ g RNA. Ως calibrator χρησιμοποιήθηκε cDNA από ιστούς ανθρώπου ή κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τα γονίδια ενδιαφέροντος, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες-δείγματα χωρίς cDNA και RNA.

Για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων VDR, Pit-1, Pit-2, RUNX2, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP-13, OPN, OC χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα SYBR Green PCR Master Mix της Applied Biosystems στη συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems Foster, CA), ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές καθώς και οι εκάστοτε συνθήκες αναφέρονται στον Πίνακα 4.

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

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 72°C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας,

καθώς ο κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

Γονίδιο		Εκκινητές	Μεγεθος Προϊόντος (bp)	Tm	Κύκλοι
RUNX2	F	5'-GATGACACTGCCACCTCTGAC-3'	120	58	35
	R	5'-GGGATGAAATGCTTGGGAAC-3'			
COL10A1	F	5'-CAGGCATAAAAGGCCCACTA-3'	107	59	35
	R	5'-GTGGACCAGGAGTACCTTGC-3'			
MMP-13	F	5'-TGGCATTGCTGACATCATGA-3'	75	56	35
	R	5'-GCCAGAGGGCCCATCAA-3'			
OPN	F	5'-TGAAACGAGTCAGCTGGATG-3'	162	60	35
	R	5' TGAAATTCATGGCTGTGGAA-3'			
OC	F	5'-AGAGTCCAGCAAAGGTGCAG-3'	171	55	35
	R	5'-TCAFCCAACCTCGTCACAGTC-3'			
FGF23	F	5'-TGCTGGCTTTGTGGTGATTA-3'	99	60	40
	R	5'-TTCTCCGGGTGCAAATAGTG-3'			
FGFR1c	F	5'-AACCTGCCTTATGTCCAGATCT-3'	208	65	35
	R	5'-AGGGGCGAGGTCATCACTGC-3'			
Pit-1	F	5'- AGCGTGGACTTGAAAGAGGA-3'	161	60	40
	R	5'- TACAGGCCGGAATCCTTATG-3'			
Pit-2	F	5'- GGGAGCTCACAAGTGCTTTC-3'	216	60	40
	R	5'- AGGGTGGGAGACAGACAATG-3'			
VDR	F	5'-GCCCACCATAAGACCTACGA-3'	202	60	40
	R	5'-GATTGGAGAAGCTGGACGAG-3'			
GAPDH	F	5'-ACCACTGTCCACGCCATCAC-3'	185	60	40
	R	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'			

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική RT-PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των αναφερθέντων γονιδίων καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων, τα Tm των εκκινητών και οι κύκλοι ενίσχυσης της RT-PCR. Το stock διάλυμα των εκκινητών είχε συγκέντρωση 100pmol ενώ η συγκέντρωση στην τελική αντίδραση ήταν 20pmol.

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

➤ cDNA	→	2	μl
➤ SYBR Green	→	12	μl
➤ Εκκινητής Forward (20p/mol)	→	1	μl
➤ Εκκινητής Reverse (20p/mol)	→	1	μl

- δις απεσταγμένο νερό → 4 μl
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
 - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
 - x κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature, T_m) του κάθε εκκινητή για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα
 - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

B.1.6 Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα

Η απομόνωση του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα χονδροκύτταρα γίνεται με σκοπό τον έλεγχο και τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer) το οποίο προστίθεται στο κυτταρικό ίζημα σε ποσότητα ανάλογη του ιζήματος. Τα διάλυμα λύσης αποτελείται από:

- Tris –HCl 1M, pH=8
- EDTA 0,5M
- NaCl 1M
- Γλυκερόλη 100%
- Triton X-100 100%
- Δις απεσταγμένο νερό

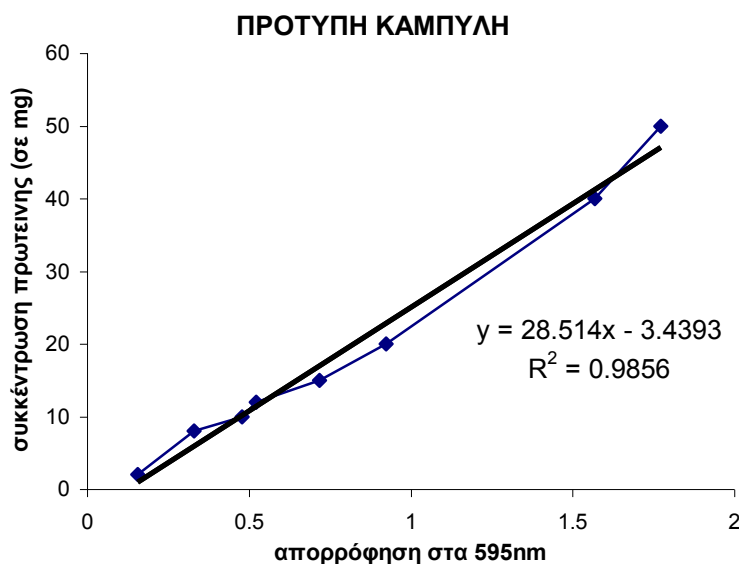
Στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται και αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free της Roche) πριν από το διάλυμα λύσης. Οι πρωτεάσες σερίνης ή ενδοπεπτιδάσες σερίνης είναι ένζυμα με ένα κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό τους κέντρο που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και έτσι το μόριο χάνει την ενεργότητα του. Η προσθήκη των αναστολέων πρωτεασών παρέχει προστασία στις πρωτεΐνες που απομονώνονται από τα χονδροκύτταρα από τη δράση αυτών των πρωτεασών.

Τα στάδια της απομόνωσης πρωτεϊνών είναι ως εξής:

- Συλλογή κυττάρων από φλάσκες 25cm³, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο.
- Αναλόγως του αριθμού των κυττάρων προστίθεται 10-30μL αναστολείς πρωτεασών και 200μL διαλύματος λύσης. Επαναδιάλυση του ιζήματος.

- Ακολουθεί μηχανική ανάδευση σε vortex που εναλλάσσεται με δεκάλεπτη παραμονή των δειγμάτων στον πάγο, για 40 λεπτά συνολικά και φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο
- Ακολουθεί φωτομέτρηση για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής ποσότητας

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη χρήση Bio-Rad Protein Assay. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250), όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Καταρχήν, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού βόας (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl dH₂O. Κατόπιν, προστέθηκαν 200μl χρωστικής, το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, αναδεύτηκε ήπια αρκετές φορές, μεταφέρθηκε σε κυβέττα και φωτομετρήθηκε στα 595 nm (BECKMAN DU520). Από τις τιμές των απορροφήσεων των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες άγνωστης συγκέντρωσης, ποσότητα 5μl από το διάλυμα προστέθηκε σε 495μl διαλύματος Bradford και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη των απομονωθέντων δειγμάτων.

B.1.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου –SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο φαινόμενο ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA, θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f):

$$u = Ez/f$$

Η σταθερά τριβής εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή και όχι σε υγρό, κυρίως για δύο λόγους. Καταρχήν η πηκτή καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας – απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον, η πηκτή λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής κινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμότερες για ηλεκτροφόρηση, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, ενώ οι πόροι της πηκτής μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν, επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου, στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού τους βάρους. Το δωδεκακυλοθειϊκό (SDS) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κυρίες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο απ' ό,τι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως αυτό το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο ηλεκτροφόρησης η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου - SDS

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS.

- Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάζονται με την προσθήκη 5μl διαλύματος χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample Buffer, Invitrogen) και 2 μl αναγωγικού διαλύματος (Reducing buffer, Invitrogen) σε όγκο δείγματος που αντιστοιχεί σε 25μg πρωτεΐνης. Το διάλυμα της χρωστικής βοηθάει στην ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά τον διαχωρισμό τους στην πηκτή. Το διάλυμα αυτό είναι αδρανές και δεν επηρεάζει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Καθώς το δείγμα φθάνει στο τέλος του πηκτώματος, το μπλε χρώμα της χρωστικής γίνεται κίτρινο. Το αναγωγικό διάλυμα έχει την ιδιότητα να ανάγει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (μετατρέπει τους δισουλφιδικούς δεσμούς σε ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες). Συνεπώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάση του μοριακού τους βάρους. Το SDS που υπάρχει στην πηκτή μεταδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό θετικό φορτίο και έτσι κατευθύνονται από το πάνω μέρος της συσκευής προς τον αρνητικά φορτισμένο κάτω πόλο. Αφού προστεθούν τα δύο αυτά διαλύματα, προστίθεται επίσης δις απεσταγμένο νερό μέχρι να φθάσει ο τελικός όγκος τα 20μl.
- Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση για 10 λεπτά στους 75°C
- Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στην αριστερή άκρη της πηκτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (Precision plus Protein Standards, Bio-Rad).
- Παράλληλα με τη θέρμανση των δειγμάτων προετοιμάζουμε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Nu Page Mes Running Buffer, Invitrogen) που θα τοποθετηθεί στη συσκευή. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης δημιουργεί ένα πρότυπο μετακίνησης των πρωτεϊνών. Η οξειδωση των πρωτεϊνών εμποδίζεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικού (Nu Page antioxidant, Invitrogen).
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 120V για 30-40 λεπτά.
- Στη διάρκεια αυτή προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot).

B.1.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών RUNX2, FGF23, FGFR1c, VDR, Pit-1, Pit-2, COL10A1, MMP-13, OPN, OC, total-ERK, phospho-ERK1/2, κασπάση-9, με την τεχνική Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και

δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο (π.χ. αντίσωμα αίγας που αναγνωρίζει αντίσωμα ποντικού). Μία ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μία σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιόγραμμα).

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) και η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL)

Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απομακρύνεται η πηκτή από τη θήκη της προσεκτικά και ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη. Αναλυτικότερα:

- Διάλυμα μεταφοράς (Nu Page Transfer Buffer, Invitrogen)
- Φύλο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Amersham) επωάζεται σε διάλυμα μεταφοράς.
- 6 σφουγγαράκια (Invitrogen) επωάζονται σε διάλυμα μεταφοράς
- χαρτί Whitman (Bioline) τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς.
- Κατασκευάζεται στιβάδα με: 3 σφουγγαράκια → χαρτί Whitman → πηκτή → μεμβράνη → χαρτί Whitman → 3 σφουγγαράκια
- Τοποθέτηση στο κουτί Xcell Blot Module (Invitrogen)
- Το κουτί που περιέχει τη στιβάδα με την πηκτή τοποθετείται στη συσκευή Xcell Surelock με διάλυμα μεταφοράς στη μέση και δισ απεσταγμένο νερό γύρω-γύρω.
- Ακολουθεί μεταφορά για 1h και 30-40min στα 30Volt και 210mA
- Αφού τελειώσει η μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, αφαίρεση της μεμβράνης και χρώση με διάλυμα Ponceau S (Sigma) μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα, για να διαπιστωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων και η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.
- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα πλύσης TBS που περιέχει PBS και 1% Tween-20 (BioRad) για 10 λεπτά και επανάληψη του σταδίου 2 φορές.
- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα κορεσμού 5% (Blotting Grade Blocker, BioRad) για 1,5-2h για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με TBS για 10min.
- Αμέσως μετά η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε αντίσωμα (Πίνακας 5) στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C

- Απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος
- Επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS για 10min.
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

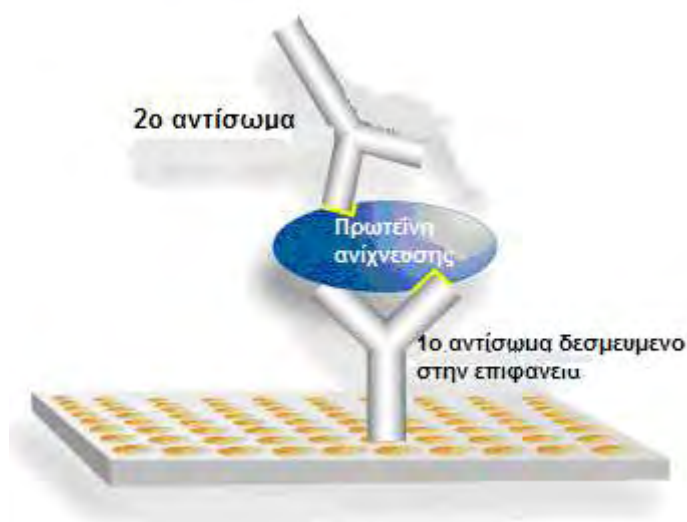
Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξειδίο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image Quant 6. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μία διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία συγκρίνει τη σχετική ένταση διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα ενός πηκτώματος ή μεμβράνης. Συνεπώς, οι μεμβράνες σαρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ένταση των ζωνών πάνω στην εικόνα για όλες τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

B.1.9 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων του FGF23 στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειών χονδροκυττάρων με την ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέθοδο – ELISA

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία ανοσομέτρηση στερεάς φάσης για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων διαφόρων πρωτεϊνών, στον ορό, τα ούρα και κυτταρικά εκχυλίσματα, με χρήση ειδικών για την πρωτεΐνη αντισωμάτων. Αναλυτικά, το αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει,

σταθεροποιείται σε ένα πολυμερές υπόστρωμα, όπως μία επιφάνεια πολυβινυλοχλωριδίου. Μία σταγόνα κυτταρικού εκχυλίσματος ή δείγματος ορού ή ούρων τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια και ξεπλένεται μετά τη δημιουργία ενός συμπλόκου αντισώματος – αντιγόνου. Μετά προστίθεται αντίσωμα ειδικό για μία άλλη θέση του αντιγόνου και η επιφάνεια ξαναξεπλένεται. Το δεύτερο αντίσωμα φέρει μία ραδιενεργό ή φθορίζουσα σήμανση, έτσι ώστε να ανιχνεύεται με υψηλή ευαισθησία. Το ποσό του δεύτερου αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια είναι ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Η ευαισθησία της μέτρησης μπορεί να αυξηθεί ακόμα περισσότερο αν το δεύτερο αντίσωμα είναι δεσμευμένο με ένα ένζυμο, όπως η αλκαλική φωσφατάση. Αυτό το ένζυμο μπορεί γρήγορα να μετατρέψει ένα άχρωμο υπόστρωμα που προστίθεται σε ένα νέο προϊόν με έντονο φθορισμό (εικόνα 21). Με μια τέτοια μέτρηση που ονομάζεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική, και είναι γρήγορη και εύκολη, μπορεί να μετρηθεί άμεσα ακόμα και λιγότερο από 1ng μίας πρωτεΐνης.



Εικόνα 23. Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση – ELISA

Αναλυτικότερα, παραγματοποιήθηκε αποκόλληση των χονδροκυττάρων από καλλιέργειες ΟΑ και φυσιολογικών όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 15 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρησης συλλέγεται το υπερκείμενο και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να αναλυθεί, αλλά όχι παραπάνω από 3 εβδομάδες.

Η συγκέντρωση του FGF23 στο κυτταρικό υπερκείμενο φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων προσδιορίστηκε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit (Immunotopics, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέτρηση του FGF23 έγινε εις διπλούν για το κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο τιμών. Ο ενδο- και δια-πειραματικός συντελεστής διακύμανσης (intra- and inter-assay coefficients of variation) ήταν 5%

και 7,3% αντίστοιχα ενώ το κατώτερο όριο ανίχνευσης (detection limit) ήταν ≤ 3 U/mL.

Πρωταρχικά Αντισώματα	Εταιρεία	Species	Molecular Weight, MW (kDa)	Αραίωση
RUNX2	Santa Cruz (sc-8566)	Goat	48	1:1000
VDR	R&D (PP-H4537-00)	Mouse	50	1:1000
FGF23	R&D (MAB2604)	Mouse	26-27	1:1000
FGFR1c	Abcam (ab31324)	Goat	75	1:1000
MMP-13	Abcam (ab39012)	Rabbit	54	1:3000
COL10A1	Abcam (ab49945)	Mouse	66	1:1000
OPN	Santa Cruz (sc-20788)	Rabbit	66	1:1000
OC	Santa Cruz (sc-30044)	Rabbit	35-37	1:1000
total-ERK	Abcam (ab82525)	Mouse	44	1:10000
phospho-ERK1/2	Abcam(50011)	Mouse	42-44	1:2000
caspase-9	Santa Cruz (sc-7885)	Rabbit	46	1:500
SLC20A1(Pit-1)	Abcam (ab58181)	Mouse	74	1:1000
SLC20A2(Pit-2)	Abcam (ab64412)	Rabbit	70	1:1000
GAPDH	Santa Cruz (sc-166545)	Mouse	38	1:500
Actin	Santa Cruz (sc-1616)	Goat	43	1:1000
Δεύτερα Αντισώματα	Εταιρεία	Σύζευξη	Molecular Weight, MW (kDa)	Αραίωση
Mouse-anti-goat	Santa Cruz (sc-2354)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-rabbit	Zymed (65-6120)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-mouse	Zymed (81-6520)	HRP	-	1:5000
Goat-anti-rabbit	Santa Cruz (sc-2012)	FITC	-	1:150

Πίνακας 5. Αναλυτικά στοιχεία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών RUNX2, FGF23, FGFR1c, VDR, Pit-1, Pit-2, COL10A1, MMP-13, OPN, OC, total-ERK, phospho-ERK1/2, caspase-9, caspase-3

B.1.10 Ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Protein Immunoprecipitation, IP) FGF23-FGFR1c και VDR-RUNX2 σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα

Με την ανοσοκατακρήμνιση είναι δυνατή η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από εκχυλίσματα κυττάρων με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της εν λόγω

πρωτεΐνης. Το αντίσωμα που έχει δεσμεύσει την πρωτεΐνη μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (Protein A-Sepharose), λόγω της ικανότητας της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στην σταθερή περιοχή των IgG αντισωμάτων. Έτσι με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνουμε τον εξειδικευμένο διαχωρισμό/καθαρισμό μιας πρωτεΐνης μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Επίσης είναι δυνατόν κάτω από κατάλληλα διαμορφωμένες συνθήκες εφαρμογής της τεχνικής, να συγκαθαριστούν και πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται ισχυρά πάνω στην πρωτεΐνη-στόχο (υποστρώματα, ρυθμιστές, κ.α.), προσφέροντας μια γενική εικόνα των αλληλεπιδράσεων στο φυσιολογικό περιβάλλον της πρωτεΐνης.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών FGF23, FGFR1c, VDR και RUNX2. Τα σφαιρίδια (Protein A or G Agarose/Sepharose, am s Biotechnology, Europe Ltd) εξισορροπούνται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμία, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.15 M NaCl και 2 μ M MgCl₂ και παραλαμβάνονται μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, με απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος. Παράλληλα κατάλληλος όγκος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα (ανάλογα με το πείραμα) επωάζονται με 5-10 μ l αντιορού, υπό ανακίνηση για χρονικό διάστημα 2 ωρών στους 4° C ώστε να αλληλεπιδράσουν τα αντισώματα με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν. Μετά το πέρας της διαδικασίας στα σωληνάκια προστίθενται τα εξισορροπημένα σφαιρίδια Protein A-G Agarose/Sepharose. Η δέσμευση του αντισώματος στα σφαιρίδια διαρκεί 4 ή 16 ώρες και ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 λεπτών με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να αποφευχθούν οι τυχόν ασθενείς αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλύονται σε αναγωγικό διάλυμα, θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 95°C, αναλύονται με SDS-PAGE και ακολουθεί ανοσοαποτύπωση. Αναλυτικότερα εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Συλλογή κυτάρων από μία γεμάτη φλάσκα (75ml) με προσθήκη κρύου διαλύματος λύσης (1ml) με ανάλογη ποσότητα αναστολέων πρωτεασών (10 μ l).
- Αποκόλληση κυτάρων και επώαση 20 λεπτά στον πάγο.
- Συλλογή κυτάρων σε φιαλίδιο των 2ml, έντονη ανάδευση για να σπάσουν οι μεμβράνες και φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο, προσθήκη του 1^{ου} αντισώματος (Πίνακας 5) (10 μ l : θέλουμε 0,2-10 μ g/ μ l) και τοποθέτηση του δείγματος σε συσκευή περιστροφής (rotator) για 2 ώρες στους 4 °C.
- Με την ολοκλήρωση της επώασης ακολουθεί προσθήκη 20 μ l A-G agarose/sepharose beads για κάθε 500 μ l δείγματος. Προηγείται πολύ καλή ανάδευση των σφαιριδίων. Είναι απαραίτητο να γίνει τομή του ρύγχους της

πιπέτας 1-2cm, γιατί το διάλυμα των σφαιριδίων είναι παχύρευστο. Ρυθμίζουμε την πιπέτα μερικά ml παραπάνω.

- Επώαση ολονύκτια στους 4°C στη συσκευή περιστροφής για 4-16 ώρες και φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Αφαίρεση υπερκλειμένου με αποφυγή λήψης σφαιριδίων, προσθήκη 1ml διαλύματος έκπλυσης (διάλυμα λύσης με αναστολείς πρωτεασών) και περιστροφή στη συσκευή για 15 λεπτά στους 4°C. Επανάληψη του σταδίου 2 φορές.
- Αφαίρεση υπερκλειμένου και συλλογή ιζήματος με τα σφαιρίδια.
- Προσθήκη ίσου όγκου αναγωγικού διαλύματος με χρωστική (Reducing Sample Buffer, RSB) πάνω στην επιφάνεια των σφαιριδίων και ήπια ανάδευση με το χέρι.
- Ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών με western blot όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αντιπρός IgG ίδιου είδους με τα αντισώματα που εξετάστηκαν (IgG Mouse και IgG Goat).

B.1.11 Ανίχνευση της πρωτεΐνης VDR με ανοσοφθορισμό

Η πρωτεϊνική έκφραση του VDR στα ανθρώπινα χονδροκύτταρα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Στον ανοσοφθορισμό γίνεται χρήση σημασμένων ειδικών αντισωμάτων έναντι του υπό εξέταση μορίου (πρωτογενές αντίσωμα – primary antibody) καθώς και ενός δευτέρου αντισώματος (secondary antibody) το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσες χρωστικές, σχεδιασμένο ώστε να ανιχνεύει και να ενώνεται με το πρωτογενές αντίσωμα.

Στη μελέτη μας έγινε χρήση ενός ειδικού πρωταρχικού αντισώματος έναντι των αμινοξέων 91-210 του VDR (PP-H4537-00, R&D Systems, UK & Europe) (Πίνακας 5). Σαν δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα αντι-ποντικού IgG συνδεδεμένο με FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc) καθώς και το σταθεροποιητικό Mounting Medium (UltraCruz™ Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Επίσης παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

- 0.2M και 0.1M pH:7.4 Διάλυμα διαπερατότητας (permeabilization buffer, PB)
- 2% pH:7.4 παραφορμαλδεΐδη, (paraformaldehyde, PFA)
- 0.1 M TBS pH:7.4

Τα χονδροκύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών αναπτύχθηκαν επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες είχαν προσαρμοστεί σε ειδικά τρυβλία διαμέτρου 10cm². Έγινε έκπλυση των πλακών δύο φορές για 2 λεπτά η κάθε μία, αρχικά με 0.1M TBS και κατόπιν με 0.1M PB. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 2% PFA σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, και

ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα 0.1M TBS (δύο φορές x 2 λεπτά). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε 3.3% φυσιολογικό ορό αίγας (Normal Goat Serum, NGS) σε 0.1M TBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθως έγινε έκπλυση με 0.1M TBS (3 φορές x 3 λεπτά) και στη συνέχεια ολονύκτια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα ορού αλβουμίνης βόως 1% (Bovine Serum Albumin, BSA) σε PBS, σε ειδική δεξαμενή για τη διατήρηση υγρασίας. Την επόμενη ημέρα, αφού πρώτα έγινε έκπλυση με 0.1M TBS (3 φορές x 3 λεπτά), τα κύτταρα επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα για 90 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση με 0.1M TBS (δύο φορές x 2 λεπτά) και σταθεροποίηση με 40μl Mounting Medium. Η παρατήρηση έγινε σε ειδικό μικροσκόπιο (Zeiss axioPlan fluorescence microscope) σε σκοτεινό θάλαμο και οι εικόνες φωτογραφήθηκαν με ειδική ψηφιακή κάμερα.

B.1.12 Επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις hrFGF23, 1,25(OH)₂D₃, φωσφόρου, φωσφονοφορμικού οξέος

Οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα, καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο που ήδη περιγράφηκε, όμως για το σκοπό των πειραματικών επιδράσεων τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 6 πηγαδάκια (six-well plates). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 100% του χώρου (confluent plate), το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς FBS και εκεί έγινε η επίδραση με τις συνθήκες και τις ουσίες που ακολουθούν. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Με το πέρας του κάθε χρονικού διαστήματος επίδρασης ακολούθησε συλλογή των κυττάρων, απομόνωση RNA και κυτταρικού εκχυλίσματος όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

I. Επιδράσεις με αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (hrFGF23) σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων

Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (20, 50 και 100 ng/ml) με ανασυνδυασμένο αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (human recombinant Fibroblast Growth Factor, hrFGF-23) που προέκυψαν από σειριακή αραίωση του αρχικού (hrFGF-23, CYT-374, Biosupply, Bradford, UK) και η επώαση διήρκεσε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (24h και 48h).

II. Επίδραση με 1,25(OH)₂D₃ σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων

Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 10⁻⁷, 10⁻⁶M) 1,25(OH)₂D₃ που προέκυψαν από σειριακή αραίωση του αρχικού (1,25(OH)₂D₃, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) και η επώαση διήρκεσε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (24h, 48h, και 72h).

III. Επιδράσεις με φωσφονοφορμικό οξύ σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων

Σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 10, 50, 100, 1000μM) φωσφονοφορμικού οξέος (Phosphonoformic acid, PFA) που προέκυψαν από σειριακή διάλυση του αρχικού (PFA, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) και η επώαση διήρκησε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (48h).

IV. Επιδράσεις με φώσφορο και φωσφονοφορμικού οξέος σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων

Σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου (1, 3, 5, 7mM) που προέκυψαν από σειριακή αραίωση του αρχικού (NaH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, Missouri, USA) και η επώαση διήρκεσε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (48h). Επειδή η πραγματική συγκέντρωση φωσφόρου στο θρεπτικό υλικό (χωρίς FBS) ήταν 1mM, η τιμή αυτή υπολογίστηκε ως η συγκέντρωση ελέγχου (control concentration).

Το πείραμα επαναλήφθηκε με την προσθήκη PFA, το οποίο αποτελεί έναν ισχυρό ανταγωνιστικό αναστολέα της αντλίας Na/Pi τύπου III, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα προκαλούμενα από το φώσφορο αποτελέσματα, απαλείφονται παρουσία του αναστολέα του. Οι συνθήκες του πειράματος ήταν ακριβώς ίδιες, μόνο που σε κάθε συγκέντρωση φωσφόρου προστέθηκε 1mM PFA, δηλαδή (1, 3, 5, 7mM Pi + 1mM PFA).

B.1.13 Ανίχνευση στοιχείων δέσμευσης του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D receptor Responsive Elements, VDREs) στους υποκινητές των γονιδίων FGF23 και RUNX2 με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης

Ο προσδιορισμός των στοιχείων δέσμευσης του VDR στους υποκινητές των FGF23 και πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay kit) (Upstate Inc., Charlottesville, VA, USA).

Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, τα κύτταρα μονιμοποιούνται έτσι ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να παραμείνουν προσκολλημένοι στον υποκινητή. Τα κύτταρα υφίστανται λύση, το DNA τους κόβεται σε τμήματα των 200-1000 βάσεων, στη συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση των μεταγραφικών παραγόντων με τα αντίστοιχα αντισώματα, απομόνωση DNA στα δείγματα και έλεγχος της

παρουσίας ή μη του τμήματος του υποκινητή με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων υποκινητών.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία είναι η εξής:

1. Φυσιολογικά χονδροκύτταρα (περίπου 10^6) στα οποία έχει γίνει επίδραση με 10^{-6} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και OA χονδροκύτταρα στα οποία έγινε αναστολή του VDR, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αποκολλώνται από τη φλάσκα με τη βοήθεια θρυψίνης. Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη δεκαπλάσιας ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκεντρώνται στις 2000 στροφές για 7 λεπτά.
2. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml προθερμασμένου στους 37°C πλήρους θρεπτικού υλικού, στο οποίο προστίθενται 270μl φορμαλδεΐδης 37%. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στους 37°C για 10 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση των κυττάρων και η μονιμοποίηση των ιστονών και των υπόλοιπων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.
3. Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 800 στροφές.
4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με παγωμένο PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Οι αναστολείς των πρωτεασών προστίθενται στο PBS λίγο πριν από τη χρησιμοποίηση του διαλύματος για το ξέπλυμα των κυττάρων, καθώς η διάρκεια ημίσειας ζωής τους είναι περίπου 30 λεπτά μέσα σε υδατικά διαλύματα. Τα πλυσίματα των κυττάρων συνοδεύονται από φυγοκεντρήσεις των 2000 στροφών για 7 λεπτά.
5. Μετά από την τελευταία φυγοκέντρηση, τα κύτταρα διαλύονται σε 200μl ζεστού διαλύματος λύσης των κυττάρων που περιέχει SDS και το οποίο εμπεριέχεται στο kit.
6. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν στους -80°C και να αποθηκευτούν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.
7. Ακολουθεί κατάτμηση του DNA με τη χρήση υπερήχων. Χρησιμοποιείται για το λόγο αυτό συσκευή παραγωγής υπερήχων (UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). Ανάλογα με τις δυνατότητες της συσκευής, διαφέρει ο αριθμός των επαναλήψεων καθώς και η ένταση των υπερήχων και η διάρκεια της επίδρασης. Αυτό το στάδιο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και πρέπει να επαναπροσδιορίζεται για τον κάθε τύπο κυττάρων. Για το λόγο αυτό, το δείγμα, χρειάστηκε να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου κατάτμησης του DNA με την εφαρμογή υπερήχων, ώστε μετά από απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου (η οποία

περιγράφεται πιο κάτω) και μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%, το DNA έχει κοπεί σε τμήματα των 200-1000 βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων στα δείγματα, προκαλεί θέρμανση αυτών, για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διατήρηση των δειγμάτων στον πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της επίδρασης των υπερήχων. Για τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ένα σύνθητες πρωτόκολλο υπερήχων που εφαρμόστηκε ήταν 15 επαναλήψεις διάρκειας 15 δευτερολέπτων.

8. Μετά από την εφαρμογή των υπερήχων και την κατάτμηση του DNA, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά, στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C.
9. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml.
10. Για τη μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστίθενται 75 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry) το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο kit, και τα φιαλίδια τοποθετούνται στους 4°C, με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
11. Τα φιαλίδια φυγοκεντρώνται στις 1000 στροφές για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο
12. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για την ανοσοκατακρήμνιση. Το αντίσωμα, καθώς και η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 2 µl anti-VDR (R&D Systems, UK & Europe)
13. Τα φιαλίδια επωάζονται ολονύκτια στους 4°C με ήπια ανάδευση. Προκειμένου να υπάρχει αρνητικό δείγμα ελέγχου, σε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατακρήμνιση χωρίς προσθήκη αντισώματος. Το υπερκείμενο αυτού του δείγματος επωάζεται μόνο με 60 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry), για μία ώρα στους 4°C με ήπια ανάδευση και η διαδικασία για το δείγμα αυτό συνεχίζεται στο σημείο 15.
14. Μετά το πέρας της επώασης, στα δείγματα προστίθενται 60 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry), και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 4°C με ήπια ανάδευση ώστε να δημιουργηθούν σύμπλοκα αντισωμάτων και πρωτεϊνών.
15. Η αγαρόζη κατακρημνίζεται τόσο για τα δείγματα που επωάζονται με αντίσωμα όσο και για το αρνητικό δείγμα ελέγχου, με φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει μη συνδεδεμένο, μη ειδικό DNA, απομακρύνεται προσεκτικά. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης A αγαρόζης/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ξεπλένεται για 3 λεπτά με ήπια ανάδευση με 1 ml από τα ακόλουθα διαλύματα τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο kit:

- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος LiCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE, 2 πλυσίματα

Μετά από αυτό το στάδιο, τα δείγματα βρίσκονται στη μορφή πρωτεΐνης A/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ή ιστόνης/DNA.

16. Προετοιμάζεται το διάλυμα αποδέσμευσης (1% SDS, 0.1M NaHCO₃).
17. Τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται στις 1000 στροφές για ένα λεπτό, το ρυθμιστικό διάλυμα TE απομακρύνεται προσεκτικά και στα φιαλίδια προστίθενται 250 μl από το διάλυμα αποδέσμευσης. Τα φιαλίδια αναδεύονται για μερικά δευτερόλεπτα σε vortex και επωάζονται για 15 λεπτά σε συσκευή περιστροφής σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Επακολουθεί κατακρήμνιση της αγαρόζης με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 1000 στροφές και το υπερκείμενο του κάθε φιαλιδίου μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο. Η διαδικασία της αποδέσμευσης επαναλαμβάνεται και τα υπερκείμενα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο σε τελικό όγκο 500 μl.
19. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθενται 20 μl 5M NaCl και τα φιαλίδια επωάζονται στους 65°C για 4 ώρες με στόχο την αποδέσμευση του DNA από τις ιστόνες ή τους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αυτό το στάδιο, μετά την επώαση, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.
20. Στο κάθε δείγμα προστίθενται 10 μl 0.5M EDTA, 20μl 1M Tris-HCl και 2μl πρωτεϊνάσης K με συγκέντρωση 10 mg/ml, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο kit, και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 45°C.
21. Επακολουθεί απομόνωση του κατακρημνισμένου DNA με τη μέθοδο φαινόλης χλωροφορμίου, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια :
 - Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, ενώ ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε vortex.
 - Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
 - Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
 - Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
 - Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.

- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
 - Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
 - Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
 - Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
 - Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται διπλάσιος όγκος παγωμένης αιθανόλης 100% και 1/10 του όγκου CH₃COONa.
 - Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
 - Την επόμενη ημέρα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C.
 - Αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο των φιαλιδίων απομακρύνεται και στα φιαλίδια απομένει μικρό λευκό ίζημα.
 - Στα φιαλίδια προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%, για ξέπλυμα του DNA και τα φιαλίδια φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
 - Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά, τα φιαλίδια καλύπτονται με τρυπημένο parafilm και τοποθετούνται στους 4°C, μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η εναπομένουσα αιθανόλη.
 - Στα δείγματα προστίθεται ddH₂O για τη διαλυτοποίηση του DNA, σε ποσότητα ανάλογη με την ποσότητα του ιζήματος.
 - Για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 260 και 280 nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του DNA ως εξής:
 - συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD₂₆₀ x 50 (mgr/ml)
 - Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.
22. Στα δείγματα επακολουθεί αντίδραση PCR για τους υποκινητές των γονιδίων του FGF23 και RUNX2. Επιλέχθηκαν 2 από τα πιο συντηρημένα VDREs της βιβλιογραφίας και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σχεδιάστηκαν σε 4 ζεύγη και με μικρές επικαλύψεις νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε να καλύπτουν όλο τον υποκινητή του κάθε γονιδίου. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η οστεοκαλσίνη, η οποία είναι γνωστό ότι αποτελεί στόχο του συμπλόκου 1,25(OH)₂D₃ - VDR. Οι

αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε υποκινητή ήταν οι εξής φαίνονται στον πίνακα 6.

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε το kit Multiplex PCR της εταιρείας Qiagen για τη ενίσχυση δύο ή παραπάνω τμημάτων DNA στην ίδια αντίδραση. Συγκεκριμένα για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν :

- 12,5 µl 2x Multiplex PCR Master Mix
 - 3 µl δις απεσταγμένο νερό
 - 1 µl Forward primer A
 - 1 µl Reverse primer A
 - 1 µl Forward primer B
 - 1 µl Reverse primer B
 - 2,5µl 5x Q solution
 - 3 µl από το DNA
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
- Αρχική αποδιάταξη 95°C για 15 λεπτά
 - Αποδιάταξη 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στη θερμοκρασία του Tm των εκκινητών για 90 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση 72°C για 10 λεπτά, ότι μονόκλωνο τμήμα DNA έχει απομείνει μετατρέπεται σε δίκλωνο
- Για την οστεοκαλσίνη:
- Αρχική αποδιάταξη 95°C για 15 λεπτά
 - Αποδιάταξη 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 20 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα.
 - τελική επιμήκυνση 72°C για 10 λεπτά, ότι μονόκλωνο τμήμα DNA έχει απομείνει μετατρέπεται σε δίκλωνο

Γονίδιο	Εκκινητές	Μέγεθος Προϊόντος (bp)	Tm °C
FGF23	1 F 5'-TTCGGGTGTGTGTTCCAGTA-3'	172	60
	R 5'-ACAGGGTGTCCCCACATTTA-3'		
	2 F 5'-AGGCAGATGGCATCCTCTAA-3'	234	60
	R 5'-TTGCCCTCGATAGTCCAAAC-3'		
3	F 5'-TCTGCCTGATGGTGTCTATGT-3'	248	60
	R 5'-CACTCTGGGCTGTCTGTTGA-3'		
4	F 5'-AGCGTTGGCTTGAAATTGAG-3'	215	60
	R 5'-TGCAAGTAGCTGGTGTGAGG-3'		
RUNX2	1 F 5'- AGGCCTTACCACAAGCCTTT -3'	247	60
	R 5'- AGAAAGTTTGCACCGCACTT -3'		
OC	1 F 5'- CCTTTCTCCTGTCCGGATG-3'	215	60
	R 5'- GCGGGGATCAGAGACCTAA-3'		

Πίνακας 6. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων DNA για την ανίχνευση στοιχείων πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDREs) στους υποκινητές των γονιδίων FGF23, RUNX2. Η οστεοκαλσίνη (OC) χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς

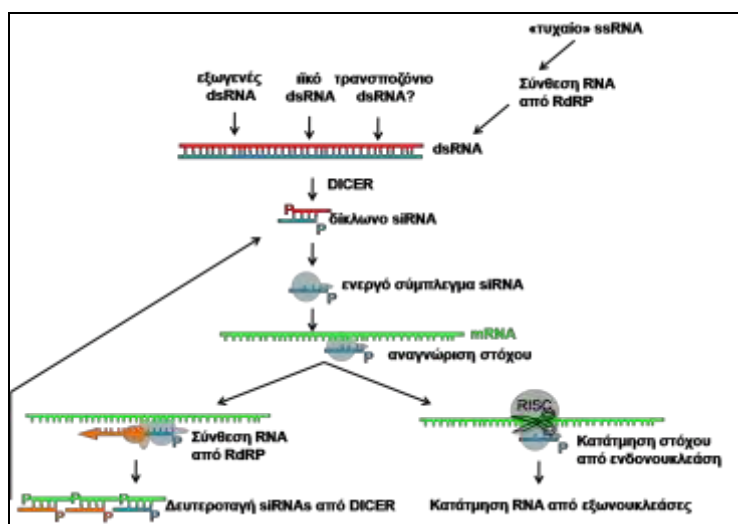
B.1.14 Αποσιώπηση του mRNA των γονιδίων VDR και FGF23

Η εξειδικευμένη καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη σύγχρονη έρευνα. Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν πειραματικές μεθοδολογίες που στηρίζονται σε βιολογικές διαδικασίες, όπως η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (postranscriptional gene silencing, RNAi), καθώς και η τεχνολογία παρεμβατικών μορίων RNA (RNA interference), οι οποίες επιτρέπουν την εξειδικευμένη παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης. Αν και η φυσιολογική λειτουργία των μηχανισμών αυτών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ιδιαίτερα η RNAi χρησιμοποιείται πρόσφατα ευρέως για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας [325-329]. Ο μηχανισμός της RNAi είναι συντηρημένος μεταξύ των ειδών (φυτά, μύκητες, ζώα) και πιθανολογείται ότι λειτουργεί ως το “ανοσοποιητικό σύστημα” του γονιδιώματος ενάντια στην εισβολή εξωγενούς γενετικού υλικού, εφόσον παρουσιάζει δύο βασικά χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού, δηλαδή την ικανότητα να διακρίνει το δικό του από το ξένο και την υψηλότερη εξειδίκευση [330].

Η διαδικασία της RNAi ενέχει την παρουσία δίκλωνου RNA (dsRNA) το οποίο τεμαχίζεται ενζυμικά σε μικρότερα κομμάτια μεγέθους 20-25 νουκλεοτιδίων, τα πρωτογενή siRNAs (short interfering RNAs), τα οποία μεσολαβούν στην εξειδικευμένη αναγνώριση του μονόκλωνου RNA στόχου (mRNA). Το ένζυμο που

είναι υπεύθυνο για τον τεμαχισμό του αρχικού dsRNA ονομάζεται Dicer και πρόκειται για μια εξειδικευμένη RNAάση III.

Τα siRNAs είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές, ενώ στο 3' άκρο τους έχουν προεξέχουσες, μονόκλωνες αλληλουχίες (2-3 ουρακίλες). Στη συνέχεια ο μη πληροφοριακός κλώνος των siRNAs συνεργαζόμενος με κυτταρικές πρωτεΐνες σχηματίζει το ενεργό siRNA σύμπλεγμα το οποίο αναγνωρίζει το mRNA στόχο. Με τη βοήθεια του ενεργού συμπλέγματος και με μόριο-εκκινητή το siRNA συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος (για μερικές εκατοντάδες bp) από μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase). Στο δίκλωνο αυτό κομμάτι RNA επιδρά και πάλι η Dicer και το τεμαχίζει στα δευτερογενή siRNAs (transitive RNA interference). Εκτός όμως από αυτή τη διαδικασία, η σύνδεση του ενεργού συμπλέγματος στο mRNA στόχο μπορεί να προκαλέσει και τη σύνδεση στην περιοχή του υβριδισμού ενός συμπλέγματος RISC (dsRNA induced silencing complex) το οποίο επάγει την κατάτμηση του mRNA από κάποια ενδονουκλεάση και την περαιτέρω αποικοδόμησή του από εξωνουκλεάσες. Οι παραπάνω διαδικασίες μπορούν να επαναληφθούν για πολλούς συνεχόμενους κύκλους (ξεκινώντας ακόμα και από πολύ μικρή ποσότητα dsRNA) με μεγάλη σταθερότητα και γι' αυτό η RNAi χαρακτηρίστηκε και ως “αποικοδομητικό PCR” [325, 326, 328, 331]. Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται το μοντέλο που συνοψίζει τα μοριακά βήματα στο μηχανισμό της RNAi.



Εικόνα 24. Μοντέλο μοριακών βημάτων της RNA interference [330]

Ο μηχανισμός που περιγράφηκε έχει παρατηρηθεί σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, η απόδειξη όμως μιας τέτοιου είδους απόκρισης στα κύτταρα των θηλαστικών παρεμποδίζεται από την ύπαρξη επαγόμενων από δίκλινα RNA μονοπατιών, τα οποία επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση με μη ειδικό τρόπο. Τα πιο καλά καθορισμένα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από dsRNA στα θηλαστικά είναι: i) η dsRNA εξαρτώμενη κινάση PKR και το μονοπάτι της ιντερφερόνης το

οποίο οδηγεί σε γενικευμένη καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και απόπτωση [332], ii) η dsRNA επαγόμενη σύνθεση 2'-5' πολυαδενυλικού οξέος το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της μη εξειδικευμένης RNAάσης L [325, 332].

Ωστόσο, τα δύο προηγούμενα μονοπάτια δεν ενεργοποιούνται από dsRNA μικρότερο από 30 νουκλεοτίδια και έτσι με βάση αυτό το δεδομένο οι τελευταίες έρευνες στρέφονται στη χρήση μικρών συνθετικών μονόκλωνων ή δίκλωνων RNA (που είναι πιο αποτελεσματικά και σταθερά), είτε ακόμα στη χρήση πλασμιδίων που εκφράζουν μικρά dsRNA ή shRNA (short hairpin RNA), ώστε να αποφεύγονται τα μη ειδικά μονοπάτια [333-337].

Η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με siRNAs για τα γονίδια των FGF23, VDR, έγινε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη (Invitrogen). Η λιποφεκταμίνη είναι μία ουσία που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα και προσφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα :

- Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά είδη καλλιέργειας (φλάσκες, πλάκες με ειδικές υποδοχές κ.ο.κ.)
- Τα σύμπλοκα νουκλεϊκών οξέων και λιποφεκταμίνης μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στο θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα, παρουσία ή απουσία ορού.
- Δεν είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν τα σύμπλοκα ή να αλλαχθεί το θρεπτικό υλικό μετά από τη διαμόλυνση, ωστόσο τα σύμπλοκα μπορούν να απομακρυνθούν μετά από 4-6 ώρες.

Το πρώτο στάδιο στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης είναι ο προσδιορισμός της ιδανικής συγκέντρωσης του siRNA που πρέπει να χορηγηθεί στον κάθε τύπο κυττάρου, προκειμένου να επιτευχθεί ταυτόχρονα η μέγιστη δυνατή αποσιώπηση και η ελάχιστη δυνατή τοξικότητα για τα κύτταρα. Ο έλεγχος του ποσοστού αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος γίνεται αφενός με ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων του γονιδίου μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση, καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western της πρωτεΐνης που προκύπτει από το συγκεκριμένο μετάγραφο mRNA μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση. Και στις δύο περιπτώσεις, η χορήγηση του siRNA πρέπει να συμπίπτει με μείωση των μεταγράφων mRNA καθώς και της πρωτεΐνης. Σε περιπτώσεις όπου ο κύριος τρόπος ρύθμισης της ποσότητας μίας πρωτεΐνης στο κύτταρο είναι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση, τότε η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA δεν καθιστά αποτελεσματικό τρόπο αποσιώπησης και

ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση PTGS (postranscriptional gene silencing).

Στις περιπτώσεις των γονιδίων VDR (HSS187669, Invitrogen) και FGF23 (s15590, Ambion) που αποσιωπήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ο προσδιορισμός της ιδανικής ποσότητας από το siRNA που θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί στα κύτταρα της μελέτης έγινε μετά από χορήγηση 3 διαφορετικών δόσεων από το siRNA σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλάκες με 6 πηγαδάκια. Η επιλογή αυτών των πλακών έγινε με στόχο να διαμολυνθούν αρκετά σε αριθμό κύτταρα, προκειμένου να μπορέσουν να εκχυλισθούν από αυτά ικανοποιητικές ποσότητες mRNA και πρωτεϊνών, προς επιβεβαίωση της επιτυχούς διαμόλυνσης. Σε αυτές τις πλάκες οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα κύτταρα από το κάθε siRNA ήταν 100, 300 και 500 pmol με συν-χορήγηση 5, 15 και 25 μl λιποφεκταμίνης αντίστοιχα.

Αναλυτικά, η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με siRNA που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής:

1. Μία ημέρα πριν από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε πλάκες ή φλάσκες, ανάλογα με το πείραμα, σε πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, έτσι ώστε η περιεκτικότητα των πηγαδιών της πλάκας ή των καλλιεργητικών φλασκών να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50% τη στιγμή της διαμόλυνσης. Η χαμηλή συγκέντρωση των κυττάρων κατά τη χρονική στιγμή της διαμόλυνσης επιτρέπει τη μεσολάβηση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος μεταξύ διαμόλυνσης και συλλογής των κυττάρων. Επιπλέον περιορίζει τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από υπεραύξηση των κυττάρων.
2. Για το κάθε δείγμα, τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς προετοιμάζονται ως εξής:
 - Η ποσότητα από το siRNA που πρόκειται να χορηγηθεί στα κύτταρα διαλύεται σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) χωρίς προσθήκη ορού εμβρύου βοός. Επακολουθεί ήπια ανάδευση.
 - Η λιποφεκταμίνη αναδεύεται καλά πριν από τη χρήση της και διαλύεται επίσης σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Επακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Τα δύο ανωτέρω διαλύματα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο, αναδεύονται ήπια και επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς.

3. Τα σύμπλοκα προστίθενται στα κύτταρα και ακολουθεί καλή ανάδευση της πλάκας ή της φλάσκας ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογενής διασπορά τους.
4. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C. Το θρεπτικό τους αλλάζεται 6 ώρες μετά από τη διαμόλυνση, και αντικαθίσταται από πλήρες θρεπτικό υλικό, χωρίς αντιβιοτικά.

Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται δείγματα στα οποία χορηγούνται ακριβώς οι ίδιες ποσότητες από τα ίδια αντιδραστήρια και υπό τις ίδιες συνθήκες, με μόνη εξαίρεση την αντικατάσταση του siRNA από Stealth RNAi Negative Control Duplex (Invitrogen). Το RNA αυτό είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να έχει παρόμοιο περιεχόμενο σε βάσεις GC με το siRNA που χρησιμοποιούμε. Η οποιαδήποτε μείωση σε ποσοστά έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών, καθώς και οι αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων, στα δείγματα στα οποία έχει χορηγηθεί siRNA, γίνονται σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου, το οποίο με τη σειρά του, δε θα πρέπει να έχει μεγάλες έως και καθόλου διαφορές στα επίπεδα έκφρασης και βιωσιμότητας σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί τίποτα. Υπό αυτές τις συνθήκες και εφόσον τα ποσοστά αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος είναι υψηλά μετά από τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης siRNA, η μέθοδος θεωρείται επιτυχής.

Οι ποσότητες siRNA, λιποφεκταμίνης και θρεπτικού υλικού που χορηγούνται στα κύτταρα, ανάλογα με το μέγεθος των πηγαδιών της πλάκας ή της φλάσκας, ενδεικτικά για τη συγκέντρωση των 100 pmol (για τη διαμόλυνση 6-well plates) φαίνονται στον πίνακα 7.

Καλλιεργητικό μέσο	Επιφάνεια καλλιεργητικού μέσου	Όγκος θρεπτικού υλικού	Όγκος θρεπτικού υλικού για διάλυση αντιδραστηρίων	Όγκος θρεπτικού υλικού για siRNA	Όγκος λιποφεκταμίνης
96-well	0,3 cm ²	100 μl	2x25 μl	5 pmol	0,25 μl
24-well	2 cm ²	500 μl	2x50 μl	20 pmol	1,0 μl
12-well	4 cm ²	1 ml	2x100 μl	40 pmol	2,0 μl
6-well	10 cm ²	2 ml	2x250 μl	100 pmol	5 μl
60-mm	20 cm ²	5 ml	2x0,5 ml	200 pmol	10 μl
10-cm	60 cm ²	15 ml	2x1,5 ml	600 pmol	30 μl

Πίνακας 7. Αναλυτικός πίνακας όγκων θρεπτικού υλικού, siRNA και λιποφεκταμίνης ανάλογα με το καλλιεργητικό μέσο και την επιφάνειά του.

B.1.15 Έλεγχος της απόπτωσης των χονδροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Για τη μελέτη της απόπτωσης των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (Annexin V-FITC/ 7-AAD kit, Beckman Coulter, France). Ο

προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση, είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό ενδοκυττάρων φαινομένων, όπως διαταραχές στη δομή της μεμβράνης, συμπύκνωση χρωματίνης και κατάτμηση του κυτταρικού DNA. Η Annexin V επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στην κυτταρική μεμβράνη που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της διαδικασίας απόπτωσης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στην αρχική φάση της απόπτωσης, η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται από την έσω πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στην εξωτερική. Πρόκειται για μια διαδικασία καθοριστική για τον γρήγορο εντοπισμό των κυττάρων που εισέρχονται σε φάση απόπτωσης από τα μακροφάγα του οργανισμού, επιτρέποντας έτσι την ταχεία φαγοκυττάρωσή τους. Η ικανότητα της Annexin V να συνδέεται με την φωσφατιδυλοσερίνη είναι μεν αντιστρεπτή αλλά ιδιαίτερα σταθερή κάνοντας την ιδανική για την ανίχνευση μεμβρανικών αλλαγών που συνδέονται με την απόπτωση.

Συγκεκριμένα, η μελέτη της απόπτωσης σε χονδροκύτταρα με δοκιμασία ανεξίνης πραγματοποιήθηκε για τις εξής περιπτώσεις:

- οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε αναστολή του υποδοχέα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR
- οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με PFA, αναστολέα της αντλίας Na/Pi τύπου III (όπως έχει ήδη περιγραφεί)
- οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε αναστολή του VDR και ταυτόχρονη επίδραση με PFA (όπως έχει ήδη περιγραφεί)
- φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με Pi , (όπως έχει ήδη περιγραφεί)
- φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με Pi ταυτόχρονα με PFA (όπως έχει ήδη περιγραφεί)

Αναλυτικότερα, το κυτταρικό ίζημα διαλύθηκε σε 100μl διαλύματος και προστέθηκαν 10μl φθορίζουσας Annexin V σημασμένης με ισοθειοκυανικό (για την ανίχνευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση απόπτωσης) και 10μl 7-αμινοακτινομυκίνη (7-AAD) (για χρώση των νεκρών κυττάρων) και ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι. Η ανάλυση έγινε σε μετρητή EPICS XL-MCL Counter (Beckman Coulter, USA) και η ανάλυση των στοιχείων έγινε με τη χρήση ειδικού λογισμικού CellQuest data acquisition and analysis software. Τα στοιχεία που αναλύθηκαν προέκυψαν από τουλάχιστον 10.000 συμβάντα για κάθε δείγμα.

B.1.16 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS Statistics 17 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες: unpaired t test, paired t test, Mann Whitney U test, ANOVA (analysis of variance) με Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ως post hoc test. Οι δοκιμασίες συσχέτισης έγιναν με υπολογισμό του Pearson rank correlation και του Spearman rank correlation. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόλιση (mean + standard deviation, SD).

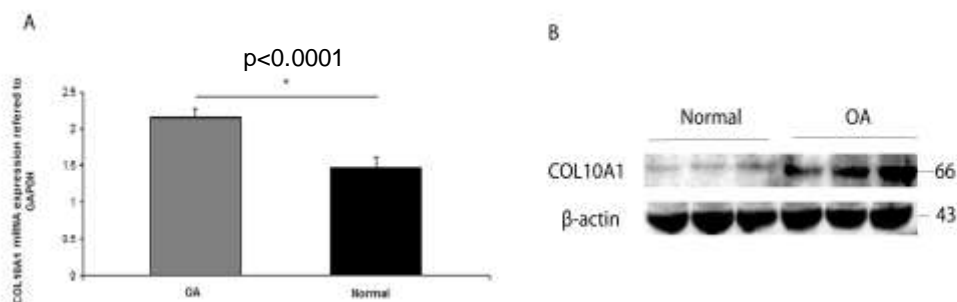
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.2.1 Δείγματα αρθρικού χόνδρου

Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών με ΟΑ γόνατος είχαν K/L score ≥ 3 , ενώ όλα τα δείγματα των φυσιολογικών αρθρικών χόνδρων είχαν K/L score = 0. Σε όλα τα δείγματα οστεοαρθρικού χόνδρου υπήρχαν οστεόφυτα.

B.2.2 Ταυτοποίηση της υπερτροφίας στα οστεοαρθρικά δείγματα χόνδρου με μελέτη της έκφρασης του COL10A1

Προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι στη μελέτη μας συμπεριλήφθησαν αποκλειστικά υπερτροφικά χονδροκύτταρα από ΟΑ χόνδρο, εκτός από την μακροσκοπική ταυτοποίηση της υπερτροφίας με τη παρατήρηση οστεοφύτων, η λήψη του αρθρικού χόνδρου έγινε από την υποκείμενη περιοχή όπου υπήρχε το οστεόφυτο. Από τα δείγματα απομονώθηκε RNA και πρωτεΐνη και μελετήθηκε η έκφραση του COL10A1 μεταγραφικά και πρωτεϊνικά. Παρατηρήθηκε ότι το COL10A1 εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου ($p < 0.0001$) (εικόνα 25).



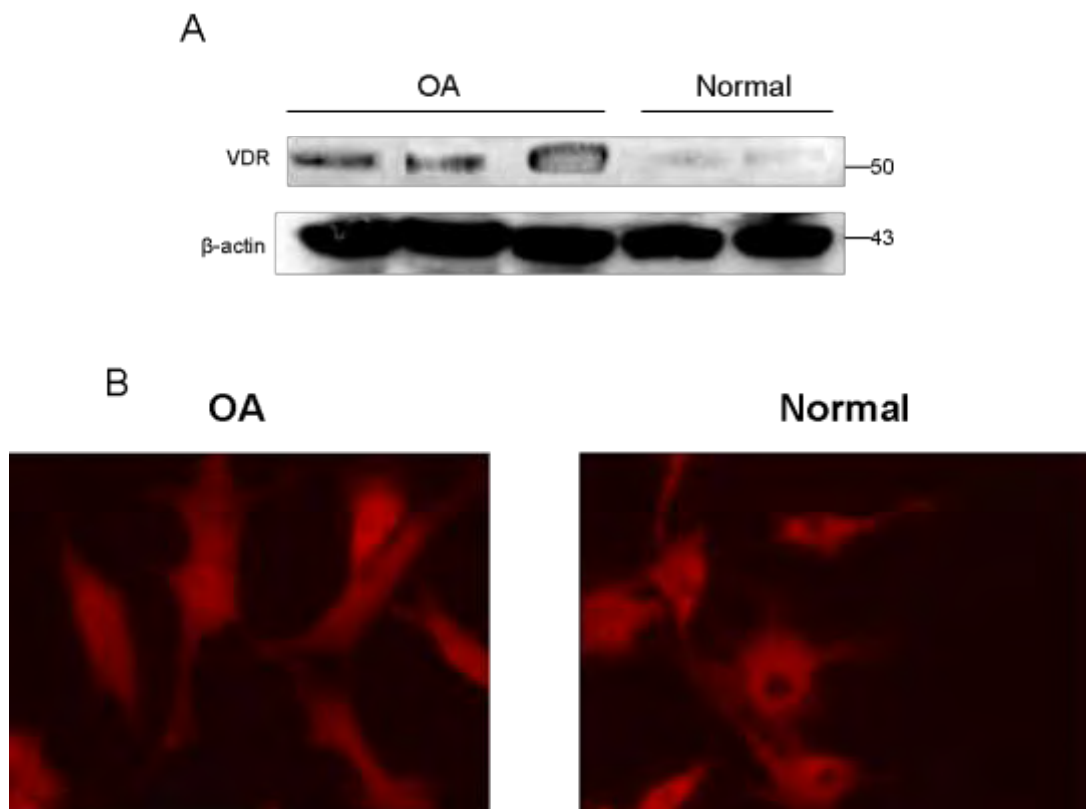
Εικόνα 25. Τα επίπεδα έκφρασης **A.** του mRNA ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH και **B.** της πρωτεΐνης του COL10A1 ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης β-actin, μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων.

B.2.3 Μελέτη της έκφρασης του VDR και του κυτταρικού εντοπισμού του σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην υπερτροφία στα ΟΑ χονδροκύτταρα με τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του VDR σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι ο VDR εμφανίζει σημαντικά

μεγαλύτερη πρωτεϊνική έκφραση στα ΟΑ χονδροκύτταρα απ' ό τι στα φυσιολογικά (εικόνα 26A).

Επιπλέον με την τεχνική του ανοσοφθορισμού μελετήθηκε η κατανομή του VDR στα ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν ότι ο VDR εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα ΟΑ χονδροκυττάρων, ενώ στα φυσιολογικά η έκφραση του περιορίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδεικνύει αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του VDR στα ΟΑ χονδροκύτταρα (εικόνα 26B).

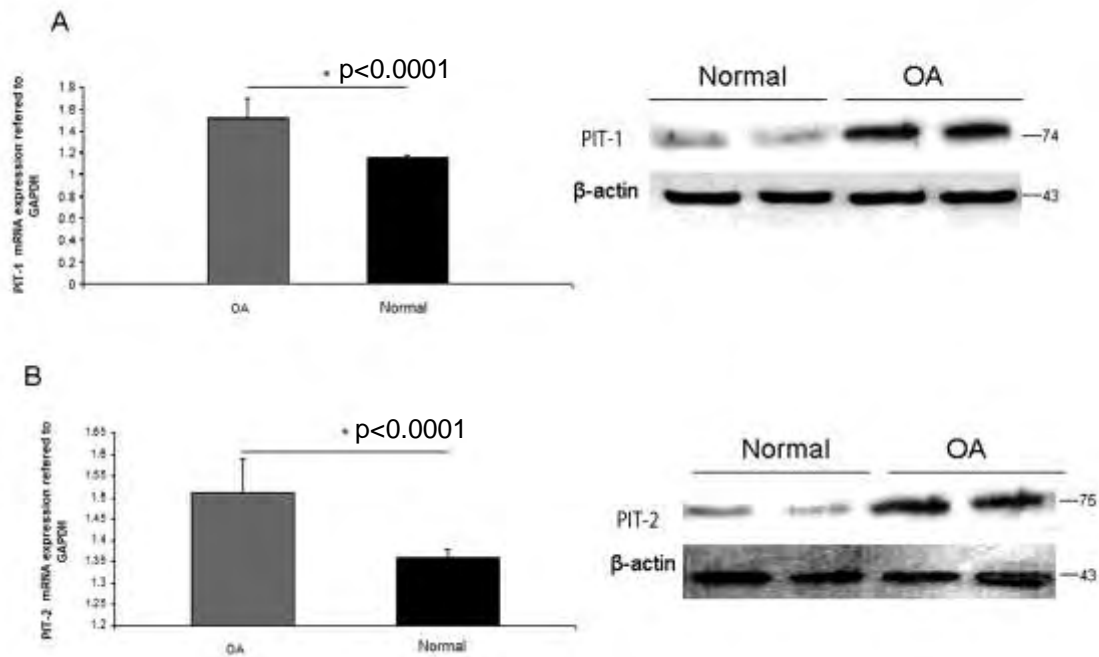


Εικόνα 26. Πρωτεϊνική έκφραση και κυτταρική κατανομή του VDR στα ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. **A.** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του VDR ομαλοποιημένα ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β -actin. **B.** Εντοπισμός του VDR στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Έγινε χρήση ειδικού αντισώματος κατά του VDR που φθορίζει με κόκκινο χρώμα και το σήμα ελήφθη από ειδικό φίλτρο μικροσκοπίου φθορισμού και αποτυπώθηκε με ψηφιακή κάμερα.

B.2.4 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων PiT-1 και PiT-2 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

Γνωρίζοντας ότι στη μεμβράνη των χονδροκυττάρων εκφράζονται οι αντλίες PiT-1 και PiT-2 και το Pi εισέρχεται στα χονδροκύτταρα μέσω αυτών η μελέτη συνεχίστηκε με τη διερεύνηση της έκφρασης των PiT-1 και PiT-2 σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν την

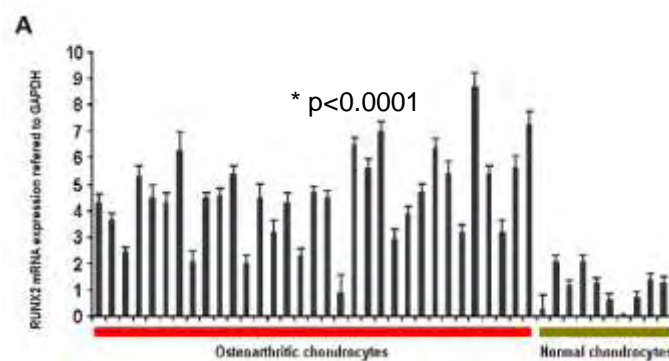
ενισχυμένη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των PiT-1 και PiT-2 στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά ($p < 0.0001$) (εικόνα 27A-B).



Εικόνα 27. Μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των PiT-1 και PiT-2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Επίπεδα μεταγραφικής (αριστερά) και πρωτεϊνικής (δεξιά) έκφρασης **A**. του PiT-1 και **B**. του PiT-2. Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων PiT-1 και PiT-2 είναι ομολογημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης είναι ομολογημένα ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β -actin.

B.2.5 Μελέτη της έκφρασης του RUNX2 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά και χονδροκύτταρα

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 που κατευθύνει τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας στην υπερτροφία στα OA και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εκφράζουν στατιστικώς σημαντικά υψηλά επίπεδα mRNA του RUNX2 σε σχέση με τα φυσιολογικά ($p < 0.0001$) (εικόνα 28).



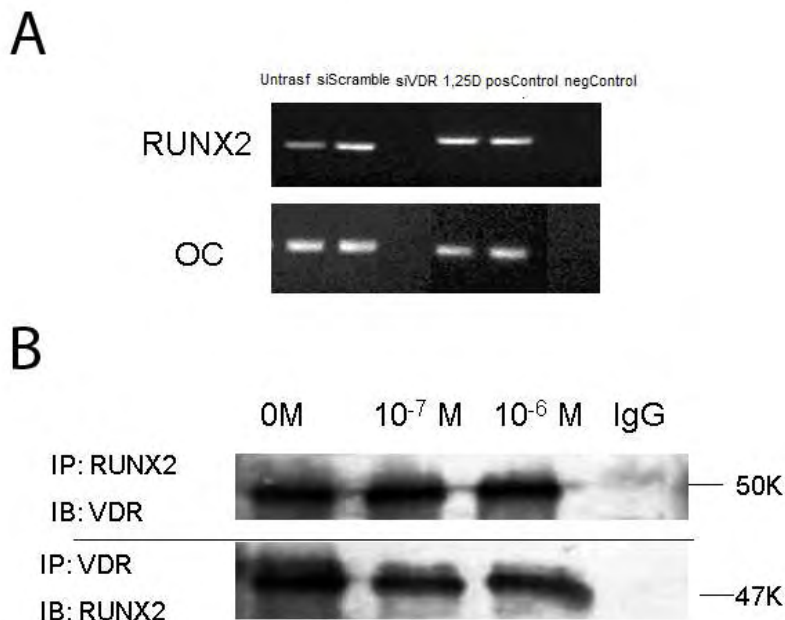
Εικόνα 28. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του RUNX2 ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH συγκρίθηκαν μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Τα

ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν την αύξηση ή μείωση της μεταγραφικής έκφρασης του RUNX2 στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά.

B.2.6. Μελέτη της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του RUNX2 και του VDR

Στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταγραφική και πρωτεϊνική αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων RUNX2 και VDR στα OA χονδροκύτταρα και η συμμετοχή τους στην υπερτροφία. Στα OA χονδροκύτταρα στα οποία προήγηθηκε αναστολή του VDR ή σε φυσιολογικά στα οποία έγινε επίδραση με 10^{-6} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ακολούθησε ανάλυση του υποκινητή του RUNX2 για την ανεύρεση ενός διατηρημένου VDRE. Παρατηρήθηκε ότι απουσία του VDR δεν ανιχνεύεται ο υποκινητής του RUNX2, ενώ παρουσία $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ παρατηρείται πρόσδεση του VDR στον υποκινητή και κανονική ενίσχυση της περιοχής που εδράζει το VDRE (εικόνα 29A).

Επιπλέον διερευνήθηκε η πρωτεϊνική τους αλληλεπίδρασης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία προηγήθηκε επίδραση με 10^{-7} M ή 10^{-6} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και διαπιστώθηκε ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ενισχύεται η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του VDR και RUNX2 (εικόνα 29B).



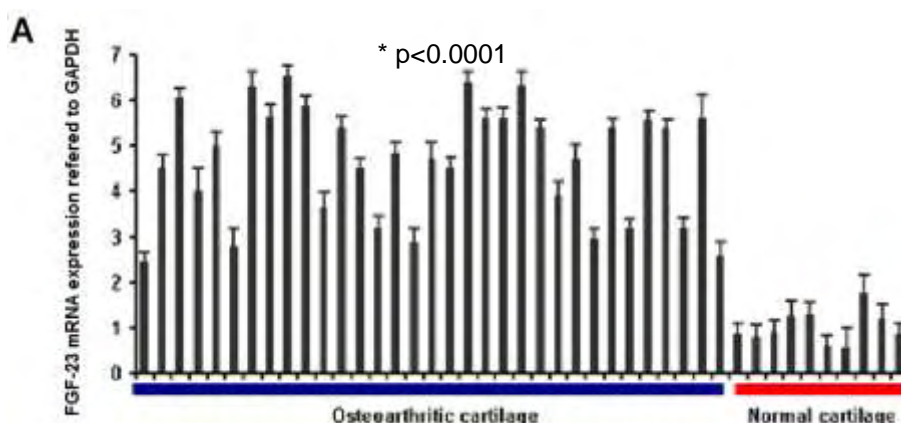
Εικόνα 29. **A.** Ανάλυση του υποκινητή του RUNX2 για την παρουσία VDREs με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης τα χρωματίνης (ChIP) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε αναστολή του VDR και σε φυσιολογικά στα οποία έγινε επίδραση με 10^{-6} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Η περιοχή πρόσδεσης ανιχνεύθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος κατά του VDR και ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση των θραυσμάτων DNA με την τεχνική PCR. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της OC, στον οποίο υπάρχουν VDREs, ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό αντίσωμα για τις ανοσοσφαιρίνες IgG. Στην πρώτη γραμμή απεικονίζεται μία περιοχή με

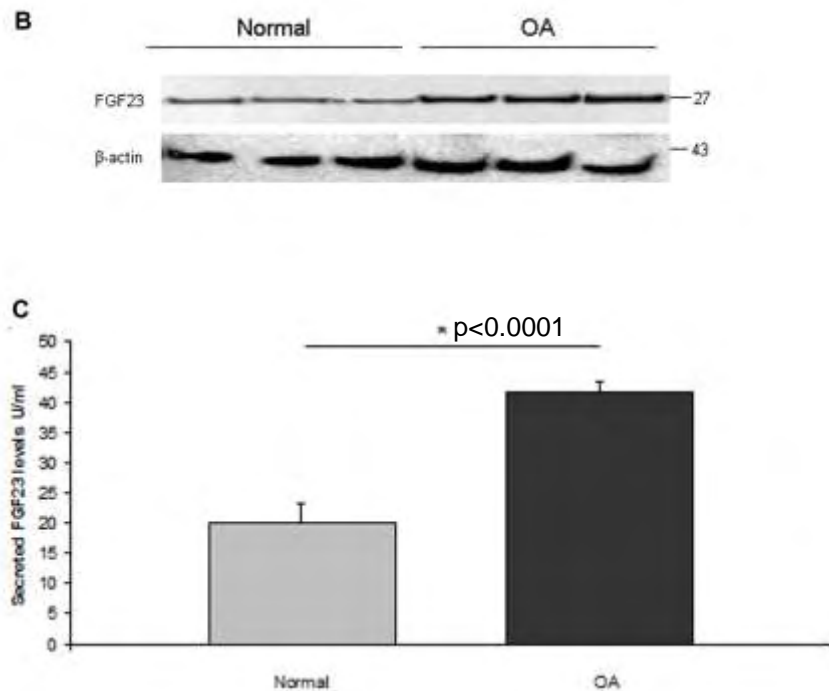
VDREs στον υποκινητή του RUNX2 Στη δεύτερη γραμμή απεικονίζεται μία γνωστή περιοχή με VDREs στον υποκινητή της OC στη θέση -547 και εξυπηρετεί ως θετικό δείγμα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Όπως φαίνεται στη τρίτη στήλη, απουσία του VDR δε ανιχνεύεται ο υποκινητής του RUNX2, ενώ παρουσία $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ παρατηρείται πρόσδεση του VDR στον υποκινητή και κανονική ενίσχυση του θραύσματος. **B.** Δημιουργία συμπλόκου μεταξύ VDR και του RUNX2 σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Στην πρώτη γραμμή η ανοσοκατακρήμνιση (IP) έγινε με αντίσωμα ειδικό για το RUNX2 και η ανοσοαποτύπωση (IB) με αντίσωμα ειδικό για τον VDR. Στη δεύτερη γραμμή η ανοσοκατακρήμνιση (IP) έγινε με αντίσωμα ειδικό για τον VDR και η ανοσοαποτύπωση (IB) με αντίσωμα ειδικό για τον RUNX2. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες IgG.

B.2.7 Μελέτη της έκφρασης του FGF23 και προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων του σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά και χονδροκύτταρα

Με δεδομένο ότι ο FGF23 είναι ένας αυξητικός παράγοντας που επάγει την πρώιμη είσοδο των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας στη φάση της υπερτροφίας, προσδιορίστηκε η έκφραση του σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του FGF23 στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($p < 0.001$) (εικόνα 30A-B).

Λόγω του ότι ο FGF23 είναι ένας φωσφατουρικός παράγοντας που εκκρίνεται από τα κύτταρα, μελετήθηκε επιπλέον η πρωτεϊνική έκφραση της εκκρινόμενης μορφής του στο θρεπτικό υλικό από καλλιέργειες οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Προέκυψε ότι τα εκκρινόμενα επίπεδα του FGF23 είναι αυξημένα στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($p < 0.001$) (εικόνα 30C).



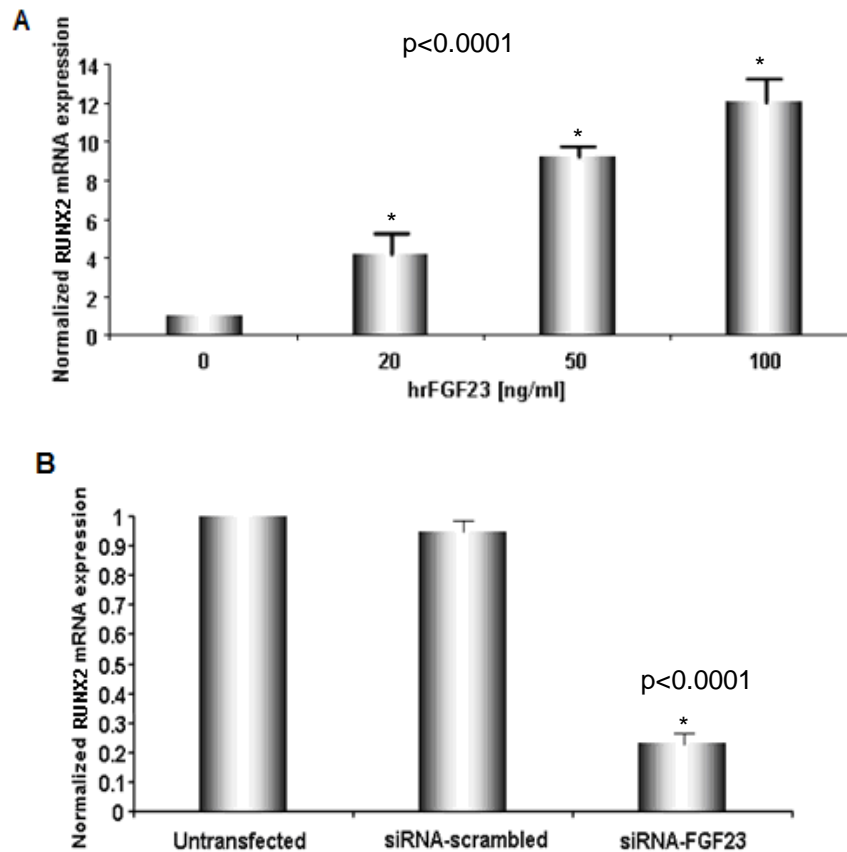


Εικόνα 30. **A.** Επίπεδα έκφρασης του mRNA του FGF-23 ομαλοποιημένα ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH σε OA και φυσιολογικά χονδροκυττάρια **B.** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του FGF23 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα ομολοποημένα ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β -actin και **C.** σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειών οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων.

B.2.8 Μελέτη της σχέσης ρύθμισης μεταξύ του FGF23 και του RUNX2

Με βάση το εύρημα ότι η έκφραση του FGF23 είναι χαμηλότερη στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα και προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση του αυξητικού παράγοντα FGF-23 με τον μεταγραφικό παράγοντα RUNX2, έγινε επαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων (20ng/ml, 50ng/ml και 100ng/ml), ανθρώπινης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (human recombinant FGF-23, hrFGF23) για 48 ώρες σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων hrFGF23 είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφικής έκφρασης του RUNX2 στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη σχέση μεταξύ hrFGF23 και RUNX2, με μέγιστη αύξηση των mRNA επιπέδων του RUNX2 μετά από επίδραση με 100ng/ml hrFGF23 ($p < 0.0001$) (εικόνα 31A).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ρύθμιση που ασκεί ο FGF-23 στην έκφραση του RUNX2, επιλέχθηκαν καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων στις οποίες έγινε αναστολή του FGF-23 με ειδικό siRNA κατά του FGF-23 για 48 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του FGF23 είχε σαν αποτέλεσμα την έως και 80% αναστολή της έκφρασης του RUNX2 ($p < 0.0001$) (εικόνα 31B).



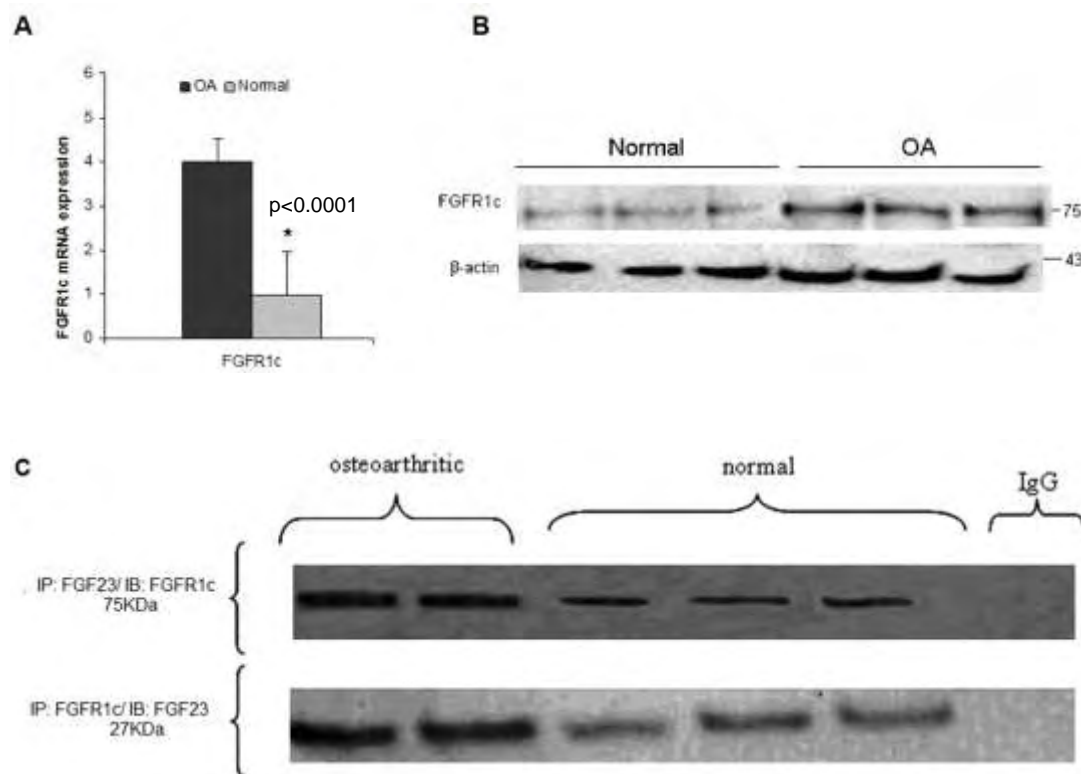
Εικόνα 31. Τα επίπεδα mRNA του RUNX2 ομολοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH **A.** έπειτα από 0, 20, 50 και 100ng/ml hrFGF23 σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων για 48 ώρες. **B.** έπειτα από 48ωρή αναστολή του FGF23 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στις οποίες δεν έγινε αναστολή (untransfected) και καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε siRNA-scrambled.

B.2.9 Μελέτη της έκφρασης του FGFR1c και της δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ FGF23 και FGFR1c

Γνωρίζοντας τη διαφοροποίηση της έκφρασης του FGF23 μεταξύ φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων από προηγούμενα πειράματα, ήταν σκόπιμο να διερευνηθεί η έκφραση του υποδοχέα του FGFR1c στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου και από την τεχνική western blot υποδεικνύουν αυξημένη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του FGFR1c στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($p < 0.05$) (εικόνα 32A-B).

Ο FGF23 έχει την ικανότητα να προσδένεται με μεγάλη ικανότητα στον FGFR1c και η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών στα κύτταρα στόχους με σκοπό τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που ενέχονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του φωσφόρου. Με βάση τα παραπάνω και με κίνητρο τις διαφορές που προέκυψαν στην έκφραση των FGF23 και FGFR1c

μεταξύ οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκύτταρων η μελέτη συνεχίστηκε με τη διερεύνηση της δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ FGF23 και FGFR1c στα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Με τη μέθοδο της πρωτεϊνικής ανοσοκατακρήμνισης σε κυτταρικό εκχύλισμα φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων προέκυψε ότι ο FGF23 και ο FGFR1c δημιουργούν σύμπλοκο στα χονδροκύτταρα και η ικανότητα πρόσδεσης του FGF23 στον υποδοχέα του είναι ισχυρότερη στα οστεοαρθρικά συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα (εικόνα 32C).



Εικόνα 32. **A.** Μεταγραφική και **B.** πρωτεϊνική έκφραση του FGFR1c σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH ($p < 0.001$) και ως πρωτεΐνη αναφοράς η β -actin. **C.** Δημιουργία συμπλόκου μεταξύ FGF23 και FGFR1c στα οστεοαρθρικά συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Στην πρώτη γραμμή η ανοσοκατακρήμνιση (IP) έγινε με αντίσωμα ειδικό για τον FGF23 και η ανοσοαποτύπωση (IB) με αντίσωμα ειδικό για τον FGFR1c. Στη δεύτερη γραμμή η ανοσοκατακρήμνιση (IP) έγινε με αντίσωμα ειδικό για τον FGFR1c και η ανοσοαποτύπωση (IB) με αντίσωμα ειδικό για τον FGF23. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες IgG.

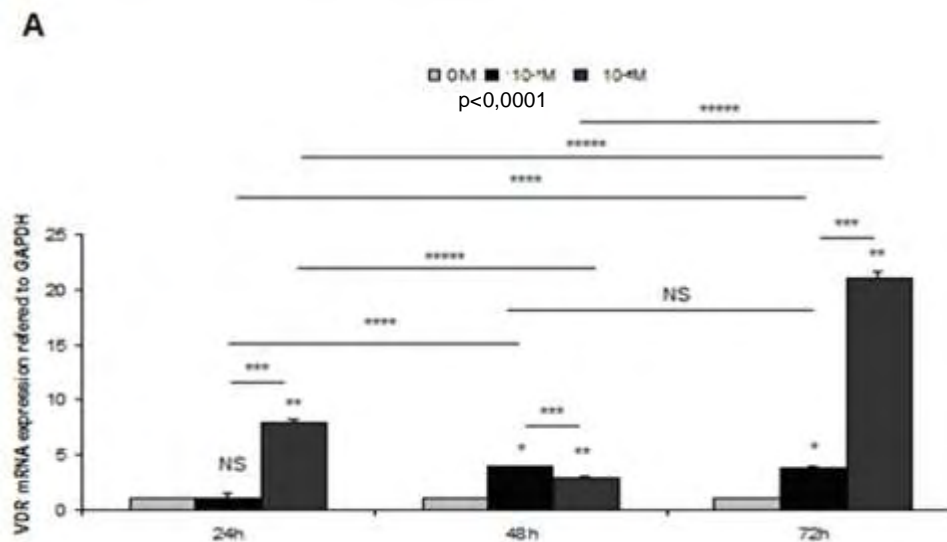
B.2.10 Επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

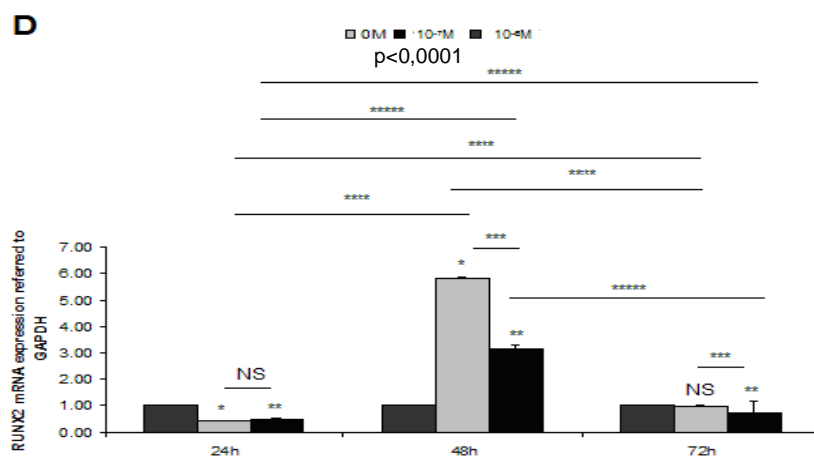
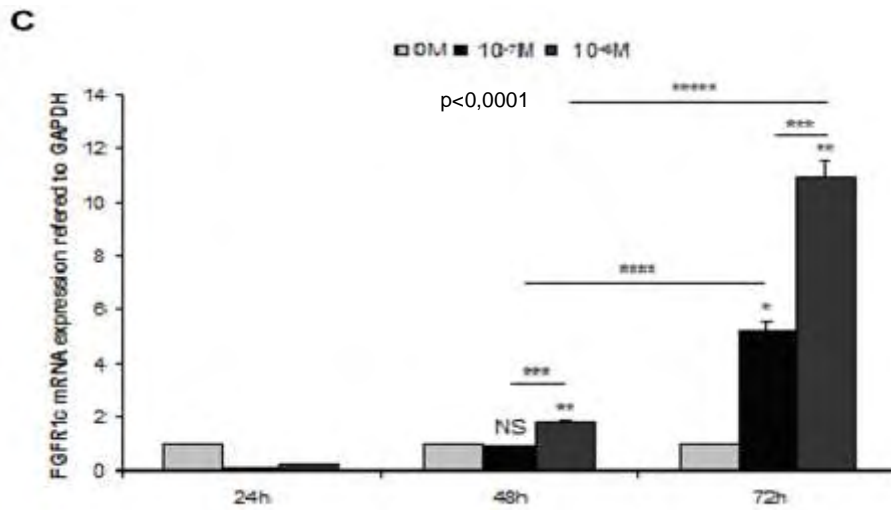
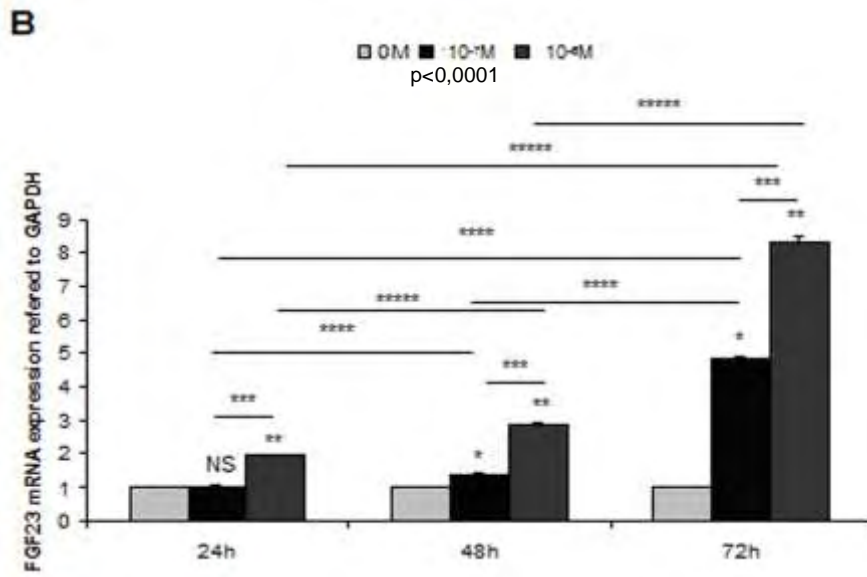
Η επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων έγινε με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της:

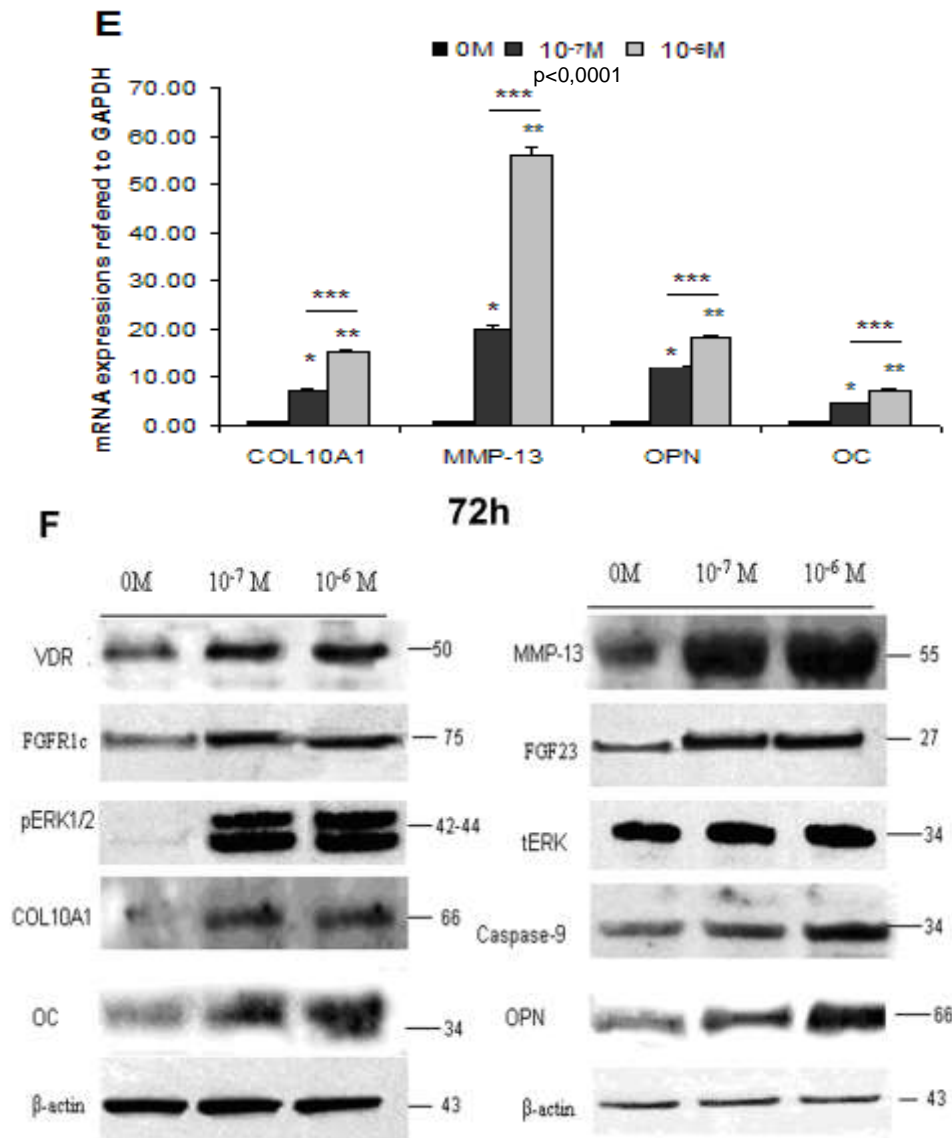
- στην έκφραση του υποδοχέα της VDR,

- στην έκφραση του FGF23 και του FGFR1c και την επαγωγή του μονοπατιού των MAP κινασών με τον έλεγχο των φωσφορυλιωμένων επιπέδων της κινάσης ERK1/2,
- στη ρύθμιση της έκφρασης καταβολικών ενζύμων όπως η MMP-13,
- στην έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τον υπερτροφικό φαινότυπο των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων όπως RUNX2, COL10A1, OPN και OC,
- στην επαγωγή αποπρωτικών μορίων όπως η κασπάση-9.

Σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων έγινε επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7}M , 10^{-6}M) σε τρεις χρονικές περιόδους, 24h, 48h, 72h, και διερευνήθηκε η έκφραση των VDR, FGF23, FGFR1c, RUNX2, COL10A1, MMP13, OPN και OC και των πρωτεϊνών ERK1/2 και κασπάση-9. Παρατηρήθηκε ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης των VDR, FGF23, FGFR1c, RUNX2, COL10A1, MMP13, OPN και OC καθώς και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 και της κασπάσης-9 (εικόνα 33 A-E). Η ενίσχυση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων συμβαίνει με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και εμφανίζουν μέγιστη ενίσχυση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 10^{-6}M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στις 72h, με εξαίρεση του RUNX2 το οποίο αποκτά τη μέγιστη έκφραση στις 48h ($p < 0.001$).





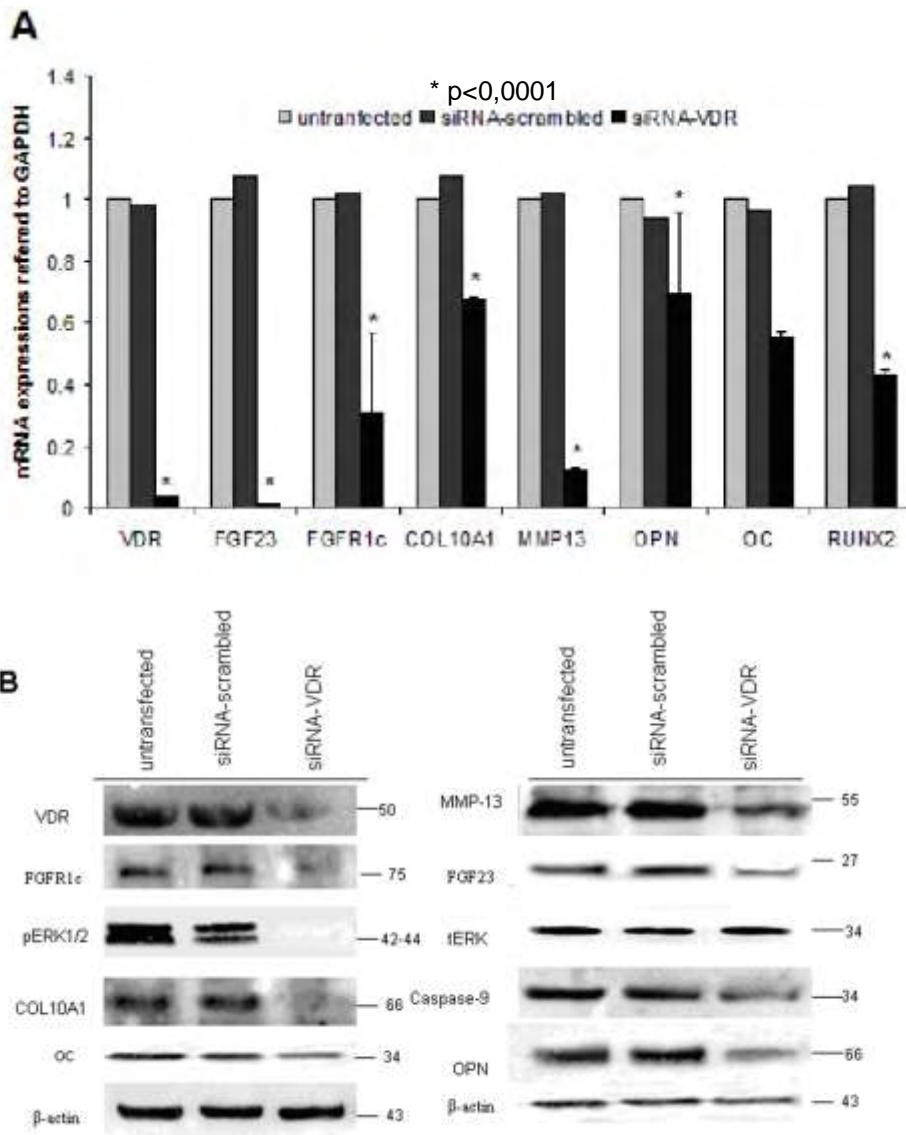


Εικόνα 33. Επίπεδα mRNA των **A.** VDR, **B.** FGF23, **C.** FGFR1c, **D.** RUNX2 **E.** COL10A1, MMP13, OPN και OC μετά από επίδραση 10⁻⁷M ή 10⁻⁶M 1,25(OH)₂D₃ σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων για 24, 48 και 72 ώρες ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η 0M συγκέντρωση της 1,25(OH)₂D₃. **F.** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των VDR, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP13, OPN, OC και κασπάση-9 ομαλοποιημένα ως προς την πρωτεΐνη β-actin και πρωτεϊνικά επίπεδα της pERK1/2 ομαλοποιημένα ως προς τη tERK1/2 μετά από επίδραση 10⁻⁷M ή 10⁻⁶M 1,25(OH)₂D₃ σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων για 72 ώρες. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η 0M συγκέντρωση της 1,25(OH)₂D₃.

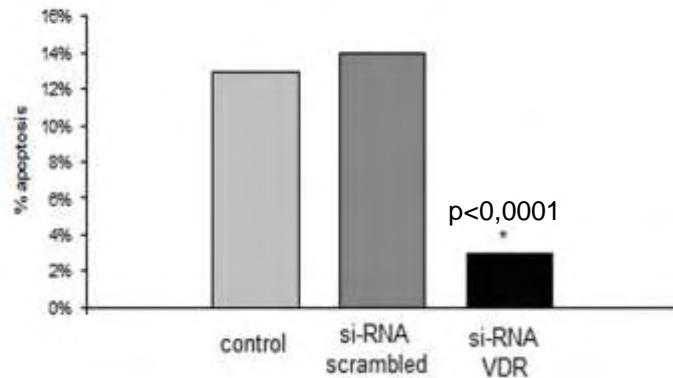
B.2.11 Αναστολή της έκφρασης του VDR σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επίδραση της 1,25(OH)₂D₃ σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα ακολούθησε αναστολή της έκφρασης του VDR σε OA χονδροκύτταρα με τη τεχνολογία των siRNAs και τη χρήση λιποφεκταμίνης. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η επιτυχία αναστολής του VDR με

έλεγχο της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής του έκφρασης. Η χρήση siRNA κατά του VDR οδήγησε σε 97% μείωση των επιπέδων mRNA και 38% των πρωτεϊνικών επιπέδων του VDR στα OA χονδροκύτταρα (εικόνα 34A-B). Στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση του FGF23 και του FGFR1c και διαπιστώθηκε ότι η αναστολή του VDR σε OA χονδροκύτταρα οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής τους έκφρασης ($p < 0.0001$). Κατ' επέκταση διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 ελαττώθηκαν σχεδόν 100% σε σχέση με την ολική μορφή της. Επιπλέον εξετάστηκαν ο μεταγραφικός παράγοντας και οι δείκτες υπερτροφίας RUNX2, COL10A1, OPN, OC και η αποπτωτική πρωτεΐνη κασπάση-9 και διαπιστώθηκε ότι η αναστολή του VDR οδήγησε σε μειωμένη έκφραση όλων των ανωτέρω δεικτών στα OA χονδροκύτταρα (εικόνα 34A-B). Τέλος, παρατηρήθηκε με κυτταρομετρία ροής και με τη δοκιμασία ανεξίνης, μειωμένος αποπτωτικός ρυθμός στα OA χονδροκύτταρα τα οποία παράγαν μειωμένες ποσότητες VDR ($p < 0.0001$) (εικόνα 34C).



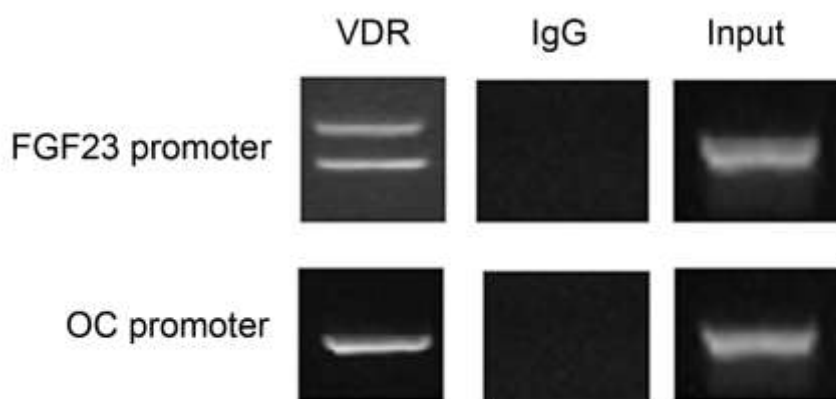
C



Εικόνα 34. Αναστολή της έκφρασης του VDR σε OA χονδροκύτταρα με τη χρήση ειδικού siRNA κατά του VDR. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων στις οποίες δεν έγινε αναστολή (untransfected) και καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε siRNA-scrambled. **A.** Μεταγραφική έκφραση των VDR, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP13, OPN, OC και RUNX2, ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. **B.** Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των VDR, FGF23, FGFR1c, COL10A1, MMP13, OPN, OC και της κασπάσης-9 ομαλοποιημένα ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β-actin και πρωτεϊνικά επίπεδα της pERK1/2 ομαλοποιημένα ως προς την tERK1/2. **C.** Ποσοστό απόπτωσης έπειτα από 48 ώρες αναστολής του VDR στα OA χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα προέκυψαν με τη δοκιμασία ανεξίνης V σε κυτταρόμετρο ροής.

B.2.12 Ανάλυση του υποκινητή του FGF23 για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης της βιταμίνης D

Η διερεύνηση για την ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης για τη βιταμίνη D (VDREs) στον υποκινητή του FGF23 έγινε με στόχο τη μελέτη της άμεσης επαγωγής της έκφρασης του από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με ειδικό αντίσωμα για τον VDR. Παρατηρήθηκε ότι στον υποκινητή του FGF23 υπάρχουν τουλάχιστον δύο περιοχές που αναγνωρίζουν το σύμπλοκο $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – VDR στις περιοχές –589 έως –823 και –921 έως –1092 από το κωδικόνιο έναρξης ATG. Για την αποτελεσματικότητα και εγκυρότητα της μεθόδου έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου οστεοκαλσίνη, το οποίο είναι γνωστό ότι διαθέτει ειδικά στοιχεία πρόσδεσης του συμπλόκου $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – VDR και επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση του συμπλόκου στη θέση –547 (εικόνα 35).



Εικόνα 35. Ανάλυση του υποκινητή του FGF23 για την παρουσία VDREs με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης τα χρωματίνης (ChIP) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Οι περιοχές πρόσδεσης ανιχνεύθηκαν με τη χρήση ειδικού αντισώματος κατά του VDR και ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση των θραυσμάτων DNA με την τεχνική PCR. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της OC, στον οποίο υπάρχουν VDREs, ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό αντίσωμα για τις ανοσοσφαιρίνες IgG. Στην πρώτη γραμμή απεικονίζονται δύο περιοχές με VDREs στον υποκινητή του FGF23 και αναπαριστώνται στη φωτογραφία με δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις περιοχές -589 έως -823 και -921 έως -1094 από το κωδικόνιο έναρξης ATG. Στη δεύτερη γραμμή απεικονίζεται μία γνωστή περιοχή με VDREs στον υποκινητή της OC στη θέση -547 και εξυπηρετεί ως θετικό δείγμα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου.

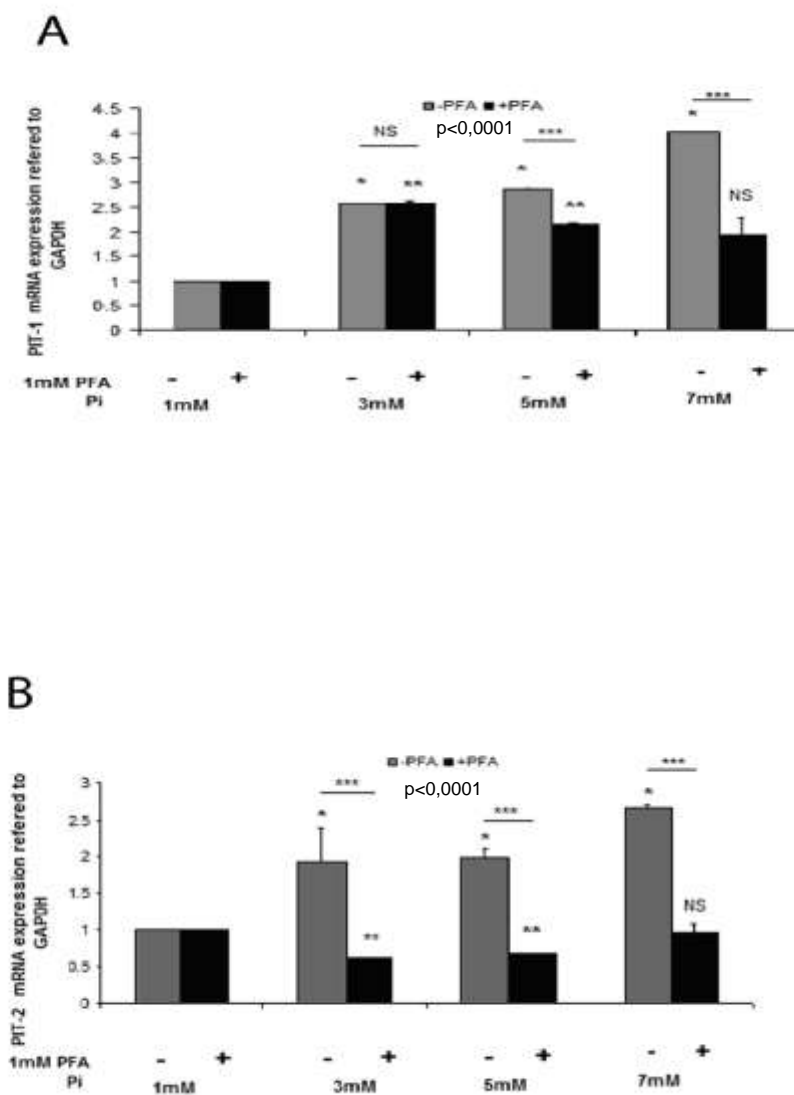
B.2.13 Επίδραση σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων με Pi ή/και PFA

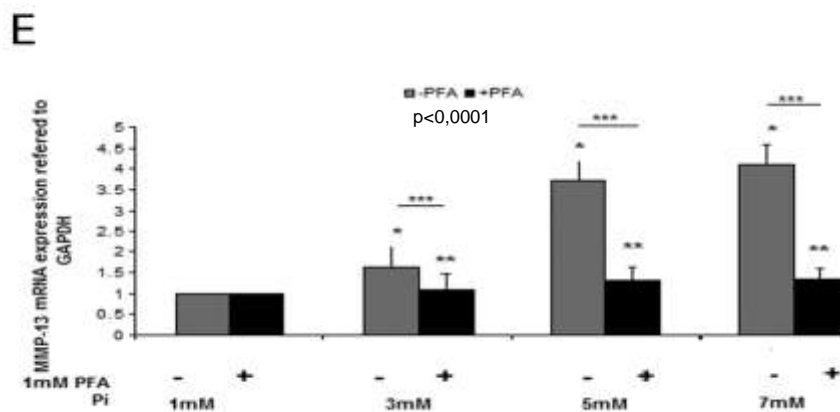
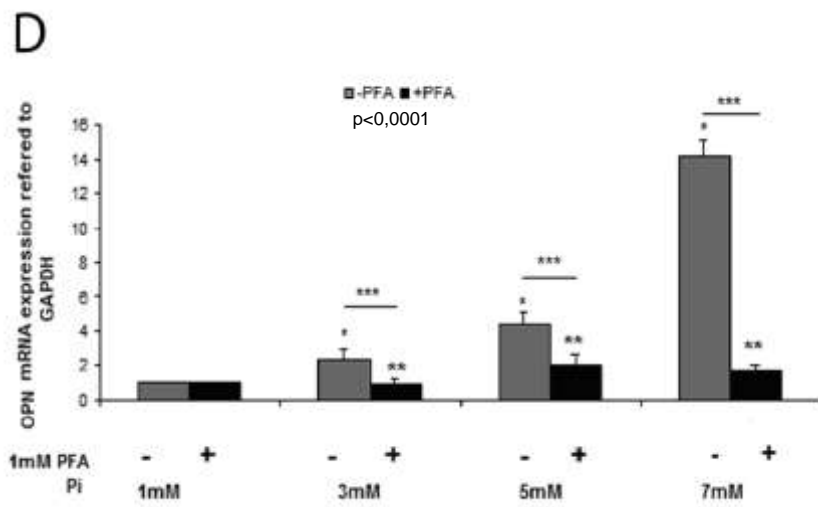
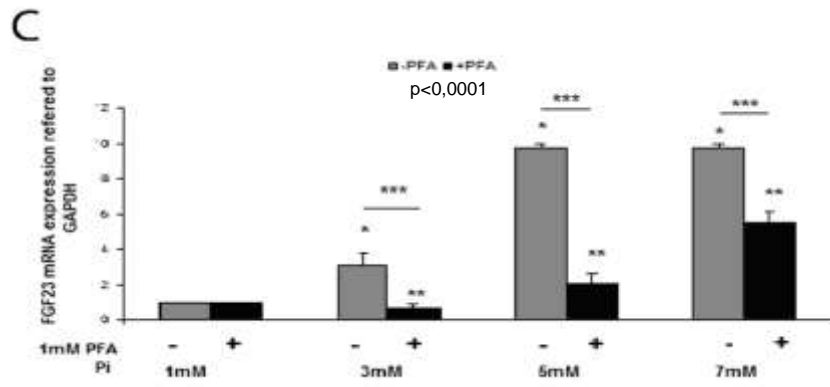
Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθούν οι δράσεις του Pi στα χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε επίδραση με 3, 5 και 7mM Pi και 3, 5 και 7mM Pi μαζί με 1mM PFA, σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων για 48h και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν συγκριτικά με τη συγκέντρωση ελέγχου που ήταν 1mM Pi. Ο PFA αποτελεί αναστολέα των αντλιών Pi/Na⁺ τύπου III (PiT-1 και PiT-2) και η χρήση του μαζί με Pi έγινε προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν οφείλονταν αποκλειστικά στο Pi. Διαπιστώθηκε ότι η επίδραση με 3, 5 και 7mM Pi σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων οδηγεί σε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης των PiT-1 και PiT-2 και η δράση αυτή αναστάληκε μετά την επίδραση με PFA ($p < 0.0001$) (εικόνα 36A-B, F).

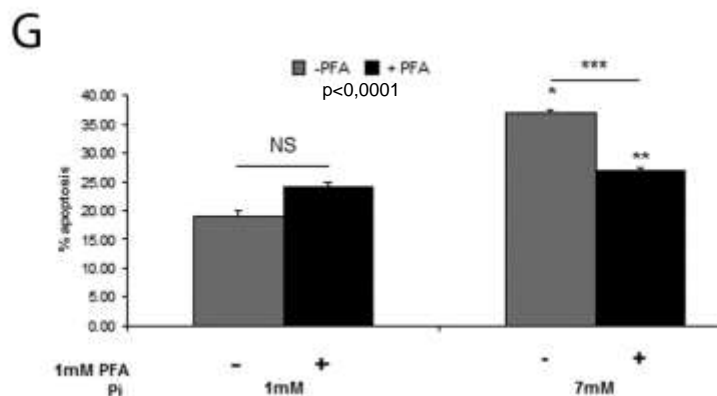
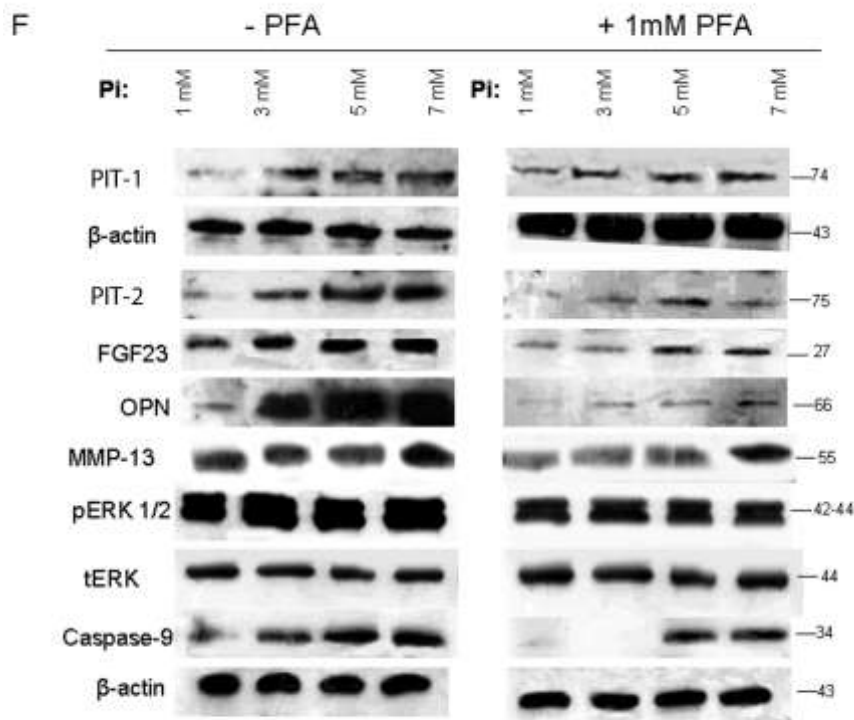
Στη συνέχεια διερευνήθηκε η έκφραση του FGF23 και παρατηρήθηκε ότι τόσο τα μεταγραφικά όσο και τα πρωτεϊνικά του επίπεδα ενισχύονται υπό την επίδραση με 3, 5 και 7mM Pi στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ($p < 0.0001$). Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς την έκφραση του FGF23 μετά από επίδραση με 5 και 7mM Pi (εικόνα 36C,F).

Η επίδραση 3, 5 και 7mM Pi στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα οδήγησε σε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της MMP-13 και της OPN, καθώς και των πρωτεϊνών κασπάση-9 και φωσφορυλιωμένη ERK1/2 ($p < 0.0001$) (εικόνα 36D-F).

Τέλος, η δοκιμασία ανεξίνης V έδειξε ότι η επίδραση με 7mM Pi προκάλεσε αύξηση του αποπτωτικού ρυθμού στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα ($p < 0.0001$). Η θετική ρύθμιση που εμφάνισε το Pi στα παραπάνω μόρια αναστάληκε υπό την παρουσία του PFA ($p < 0.0001$) (εικόνα 36G).







Εικόνα 36. Επίδραση με 3, 5, 7mM Pi μαζί ή χωρίς 1mM PFA σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των **A.** Pit-1, **B.** Pit-2, **C.** FGF23, **D.** OPN και **E.** MMP-13 ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Ως συγκέντρωση ελέγχου χρησιμοποιήθηκε 1mM Pi. **F.** Πρωτεϊνική έκφραση των Pit-1, Pit-2, FGF23, OPN, MMP-13 και κασπάσης-9 ομαλοποιημένη ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β-actin και πρωτεϊνικά επίπεδα της pERK ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα της tERK1/2. Ως συγκέντρωση ελέγχου χρησιμοποιήθηκε 1mM Pi. **G.** Ποσοστό απόπτωσης μετά από επίδραση με 7mM Pi μαζί ή χωρίς 1mM PFA σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα προέκυψαν με τη δοκιμασία ανεξίνης V σε κυτταρόμετρο ροής.

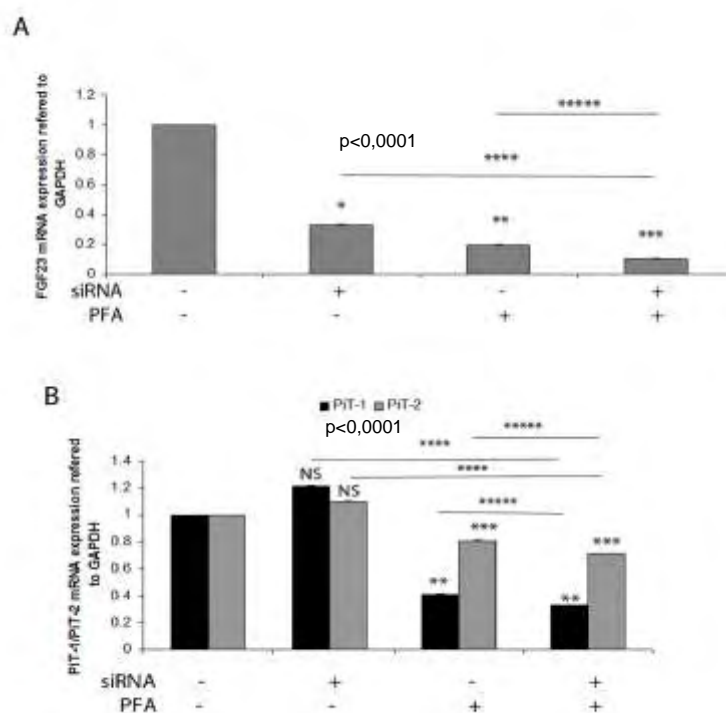
B.2.14 Συνεργιστική δράση του Pi και της 1,25(OH)₂D₃ στην ενεργοποίηση του μονοπατιού FGF23

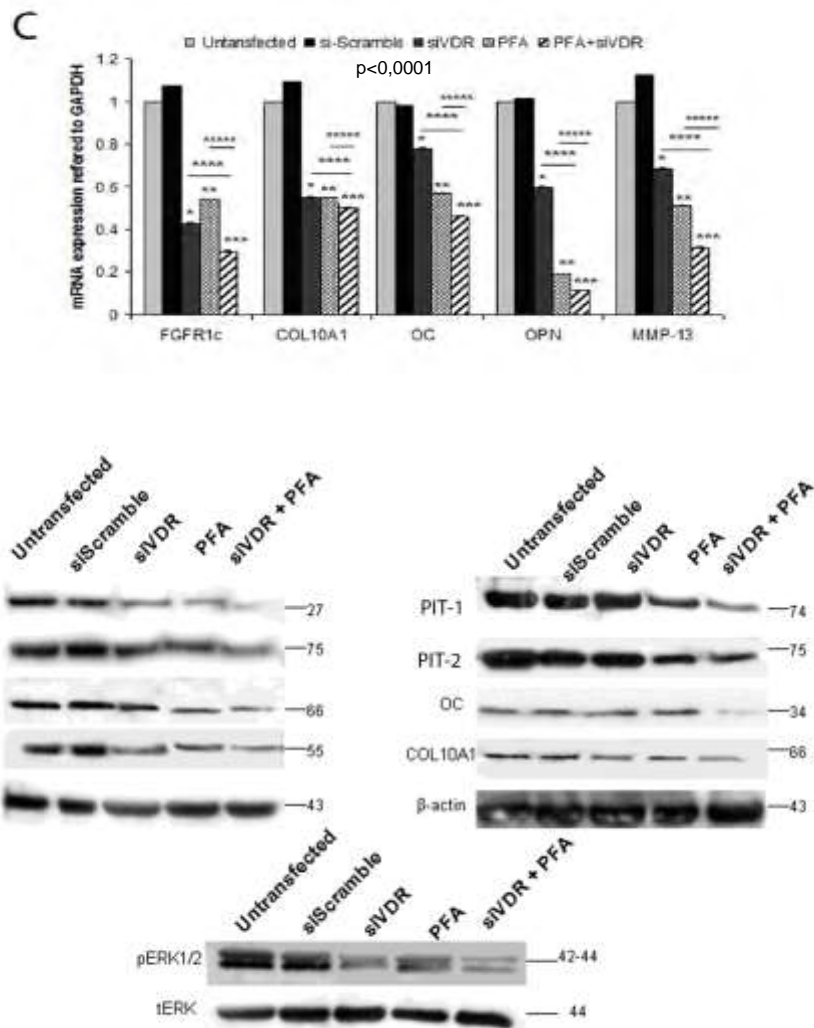
Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο VDR και το Pi ασκούν τη δράση τους στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με στόχο την εμπλοκή τους στην υπερτροφία και

επασβέστωση στην ΟΑ και στο οποίο μεσολαβεί η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του FGF23, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα αναστολή της έκφρασης του VDR και της λειτουργίας των αντλιών Pit-1, Pit-2, με τη μεθοδολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων siRNAs και επίδραση με τον αναστολέα των αντλιών Na⁺/Pi τύπου III, PFA αντίστοιχα, σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του VDR οδήγησε σε μείωση στην μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του FGF23 κατά 3 φορές, η επίδραση με PFA σε μείωση κατά 5.26 φορές, ενώ ο συνδυασμός της αναστολής του VDR και των αντλιών Na⁺/Pi οδήγησε σε μείωση των επιπέδων του FGF23 κατά 10 φορές ($p < 0.0001$) (εικόνα 37A, D).

Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της έκφρασης του VDR δεν επηρέασε την έκφραση των Pit-1 και Pit-2, μεταγραφικά και πρωτεϊνικά. Αντίθετα η επίδραση με PFA σε ΟΑ χονδροκύτταρα οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων των Pit-1 και Pit-2, με μεγαλύτερη μείωση να εμφανίζει το Pit-1 ($p < 0.0001$) (εικόνα 37B, D).

Επιπλέον εξετάστηκε η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων FGFR1c, COL10A, OC, OPN και MMP-13, καθώς και των φωσφορυλιωμένων επιπέδων της ERK1/2 και παρατηρήθηκε σημαντικότερη μείωση των επιπέδων τους μετά από τη συνδυαστική δράση του siRNA-VDR και του PFA στα ΟΑ χονδροκύτταρα ($p < 0.0001$) (εικόνα 37C,D).





Εικόνα 37. Συνεργιστική δράση της αναστολή του VDR και της επίδρασης με PFA σε OA χονδροκύτταρα. Μεταγραφική έκφραση των **A.** FGF23, **B.** PiT-1 και PiT-2, **C.** FGFR1c, COL10A1, OC, OPN και MMP-13 ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH και **D.** Πρωτεϊνική έκφραση των FGF23, PiT-1, PiT-2, FGFR1c, COL10A1, OC, OPN και MMP-13 ομαλοποιημένη ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς β-actin. Πρωτεϊνική έκφραση της pERK1/2 ομαλοποιημένη ως προς την tERK1/2. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων στις οποίες δεν έγινε ούτε επίδραση (untransfected) και καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε siRNA-scrambled αντί για siRNA-VDR.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων, με σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Σε πολλές περιπτώσεις, μελέτες υποστηρίζουν ότι πρόκειται για γενικευμένη διαταραχή με συμμετρική πολυαρθρική εντόπιση [338]. Πρόκειται για μία ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες να οδηγούν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου.

Το προϊόν διαφοροποίησης και ωρίμανσης της αναπτυξιακής πλάκας είναι ο μόνιμος αρθρικός χόνδρος, ο οποίος είναι έτσι δομημένος ώστε να υποστηρίζει την άρθρωση σε όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου. Τα χονδροκύτταρα του μόνιμου χόνδρου, φυσιολογικά, δεν υφίστανται πολλαπλασιασμό ή υπερτροφική διαφοροποίηση και δεν αποπίπτουν σε αντίθεση με τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας, τα οποία υφίστανται διαρκώς φαινοτυπικές μεταβολές. Παρόλα αυτά, στην οστεοαρθρίτιδα, παρατηρούνται αλλαγές στο προφίλ των χονδροκυττάρων του μόνιμου χόνδρου που προσομοιάζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται επανεκκίνηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και υπερτροφική διαφοροποίηση, στα πλαίσια της οποίας πρωταγωνιστούν ποικίλοι μεταγραφικοί και αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα, ορμόνες και κυτοκίνες [162]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η καταστολή του SOX9, του κολλαγόνου τύπου II και της αλκαλικής φωσφατάσης, η επαγωγή της καταβολικής MMP-13 και του κολλαγόνου τύπου X, η διαταραχή της ομοιοστασίας των ιόντων Ca^{2+}/P_i και η απόπτωση των χονδροκυττάρων. Η διαταραχή των παραπάνω παραγόντων συνδέεται με την αύξηση της αποικοδόμησης του χόνδρου, τη μείωση της βιοσύνθεσής του - μεταβολικές αλλαγές οι οποίες οδηγούν την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την απώλεια της ακεραιότητας της άρθρωσης [158, 162].

Αναλυτικότερα, η υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων του οστεοαρθρικού χόνδρου ταυτοποιείται με την ανίχνευση του κολλαγόνου τύπου X, το οποίο αποτελεί ένα δείκτη υπερτροφίας [169, 190]. Επιπλέον, άλλοι δείκτες υπερτροφίας είναι η OC, το γονίδιο Indian Hedgehog (IHH) και η αλκαλική φωσφατάση, οι οποίοι παρατηρούνται αυξημένοι στα ΟΑ χονδροκύτταρα [166, 168]. Αξίζει να αναφερθεί, ότι τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα στην ΟΑ δεν εμφανίζουν αυξημένο μέγεθος όπως τα αντίστοιχα της αναπτυξιακής πλάκας, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρά της ομοιότητές τους, υπάρχουν και βασικές διαφορές όσον αφορά στην κυτταρική δομή τους. Πρόσφατες μελέτες, συνδέουν την υπερτροφία στην ΟΑ και με άλλες φαινοτυπικές μεταβολές, όπως την επασβέστωση του χόνδρου, όπου και έχει προταθεί μία ισχυρή σχέση μεταξύ της επασβέστωσης του χόνδρου, της κλινικής διαβάθμισης της ΟΑ και της έκφρασης

του κολλαγόνου τύπου X και υποστηρίζεται ότι η υπερτροφία των χονδροκυττάρων οδηγεί στην επασβέστωση του χόνδρου, η οποία αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό της OA [339].

Με το δεδομένο ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την OA, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης OA. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι αφενός η διερεύνηση μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών και μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης ομάδων γονιδίων που εμπλέκονται στην υπερτροφία και την επασβέστωση στην OA, οδηγώντας στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου και αφετέρου η αναστολή των εμπλεκόμενων γονιδίων με στόχο την ανάδειξη νέων μορίων στόχων για πιθανή θεραπευτική παρέμβαση.

Σημαντικό ρόλο στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων διαδραματίζει η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, η οποία αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μέσω σύνδεσης με τον ειδικό υποδοχέα της VDR συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην υπερτροφία και την επασβέστωση. Επιπλέον συμβάλει στη δημιουργία υπερτροφικών χονδροκυττάρων κυρίως κοντά στις περιοχές του χόνδρου που έχουν επασβεστωθεί και στη δημιουργία κυστιδίων εξωκυττάρου στρώματος πλούσιων σε Ca^{2+} . Τα τελευταία οδηγούν στο σχηματισμό κρυστάλλων ασβεστίου (CPPD, BCP) οι οποίοι διαβρώνουν το χόνδρο και σχετίζονται με την εξέλιξη της OA [340, 341]. Στη διαδικασία της υπερτροφίας και της επασβέστωσης του χόνδρου συμμετέχει επιπλέον ο αυξητικός παράγοντας FGF23, ο οποίος αποτελεί έναν φωσφατουρικό παράγοντα που επάγει την πρόωρη μετατροπή των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας σε υπερτροφικά. Η παραγωγή του εντοπίζεται κυρίως στα οστεοκύτταρα και θεωρείται ότι τα επίπεδα του FGF23 στον ορό προέρχονται από το οστό. Ο FGF23 προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς FGFRs και ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια στα κύτταρα στόχους. Ιδιαίτερα, η πρόσδεση του FGF23 στον υποδοχέα FGFR1c προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP-κινασών στα χονδροκύτταρα [220, 238]. Όσον αφορά στη λειτουργία του, συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιόντων Ca^{2+}/Pi και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, μέσω καταστολής της δραστηριότητας της 1 α -υδροξυλάσης στους νεφρούς [212-214, 303]. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε αρουραίους υποστηρίζουν ότι ο FGF23 εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε κύτταρα τα οποία επασβεστώνουν το ECM, όπως οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα, και η έκφρασή του διαφοροποιείται πριν και μετά την επασβέστωση [217]. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επασβέστωσης διαδραματίζουν επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα Pi. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αγγειώδη ιστό υποστηρίζουν ότι η

εξωκυττάρια αύξηση του Pi προκαλεί την *in vitro* επαγωγή της έκφρασης γονιδίων όπως τα RUNX2, OPN και OC, και πραγματοποιείται μέσω του συµµεταφορέα Na^+/Pi , Pit-1 [264-266]. Με βάση τα προηγούμενα, στη μελέτη μας διερευνήθηκε ο ρόλος της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στη επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην υπερτροφία και την επασβέστωση των ΟΑ χονδροκυττάρων, καθώς μελετήθηκε και ο µηχανισµός δράσης τους μέσω αναστολής της έκφρασής τους.

Στην παρούσα διατριβή, ο υπερτροφικός φαινότυπος επιβεβαιώθηκε σε όλα τα ΟΑ δείγµατα αρθρικού χόνδρου, καθώς υπήρχαν αφ' ενός οστεόφυτα και αφετέρου παρατηρήθηκε στατιστικά σηµαντική αύξηση της έκφρασης του COL10A1 στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά µε τα φυσιολογικά. Το COL10A1 µαζί µε την αλκαλική φωσφατάση αποτελούν τους πιο καλά χαρακτηρισµένους δείκτες υπερτροφίας [163, 168].

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην υπερτροφία και την επασβέστωση του ΟΑ χόνδρου. Προκειµένου η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ να εκδηλώσει τη γενωµική της δράση στα κύτταρα-στόχους, απαιτεί τη δηµιουργία συμπλόκου µε τον ειδικό υποδοχέα της VDR. Εποµένως, αρχικά διερευνήσαµε την έκφραση του VDR στα χονδροκύτταρα και διαπιστώσαµε στατιστικά σηµαντική µεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά µε τα φυσιολογικά. Τα αποτελέσµατά µας συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής του VDR στη διαδικασία της επασβέστωσης και της υπερτροφίας των ΟΑ χονδροκυττάρων. Επίσης, η ενισχυµένη έκφραση που παρατηρήσαµε στα ΟΑ χονδροκύτταρα ενδεχοµένως οφείλεται στην τοπική σύνθεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στο περιβάλλον της βλάβης της άρθρωσης. Μελέτες ανοσοϊστοχηµείας αναφέρουν την παρουσία του VDR σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα από ΟΑ γόνατος συγκριτικά µε φυσιολογικά χονδροκύτταρα, τα οποία ήταν αρνητικά για τον VDR [342]. Η έκφραση του VDR στα ΟΑ χονδροκύτταρα είναι απαραίτητη προκειµένου η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ να εκδηλώσει το ρυθµιστικό της ρόλο [343, 344]. Επίσης, η δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στο ECM των χονδροκυττάρων ανθρώπινου ΟΑ χόνδρου, έχει αναφερθεί σε άλλες µελέτες που υποστηρίζουν την επαγωγή της καταβολικής MMP-13, συµβάλλοντας στον εκφυλισµό του χόνδρου [121].

Εκτός από τη µελέτη της έκφρασης του VDR, διερευνήσαµε τον κυτταρικό εντοπισµό του σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και διαπιστώσαµε ότι στα ΟΑ χονδροκύτταρα ο VDR εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασµα όσο και στον πυρήνα. Αντίθετα στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα περιορίζεται στο κυτταρόπλασµά τους. Καθώς η µεταγραφή των γονιδίων πραγµατοποιείται στον πυρήνα των κυττάρων, το εύρηµα αυτό υποστηρίζει την ενισχυµένη µεταγραφική δραστηριότητα του VDR στα ΟΑ χονδροκύτταρα, η οποία επάγεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και εμπλέκεται άµεσα στη µεταγραφική ρύθµιση γονιδίων που συµµετέχουν στην υπερτροφική

διαφοροποίηση και την επασβέστωση του ΟΑ χόνδρου. Προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν την κατανομή του VDR σε χόνδρο αρουραίων υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και την επασβέστωση του ECM του χόνδρου η οποία προκαλεί την πρωτεϊνική αύξηση του VDR και την μεταφορά του στον πυρήνα των χονδροκυττάρων για να εκδηλώσει τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στις ανωτέρω διεργασίες [345].

Με δεδομένο το ρόλο των αντλιών Na^+/Pi στη μεταφορά του Pi στο εσωτερικό των κυττάρων, όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, στη συνέχεια της μελέτης μας, διερευνήσαμε την έκφραση των αντλιών Na^+/Pi τύπου III, Pit-1 και Pit-2. Παρατηρήσαμε ότι τόσο το Pit-1 όσο και το Pit-2 εμφανίζουν ενισχυμένη έκφραση στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, υποδηλώνοντας την αυξημένη είσοδο του Pi στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων, το οποίο κατ' επέκταση επάγει διεργασίες όπως η απόπτωση. Όπως έχει βρεθεί στο παρελθόν, οι αντλίες Na^+/Pi τύπου III, όπου ανήκουν το Pit-1 και το Pit-2, κατανέμονται ευρέως μεταξύ ποικίλων ιστών, όπως τα οστά και τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας, υποδεικνύοντας την εξελικτικά διατηρημένη λειτουργία τους στην ομοιοστασία του Pi [256, 346, 347]. Επίσης πρόσφατες μελέτες στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων χονδροκυττάρων CH-8 ανέδειξαν την ενισχυμένη έκφραση των Pit-1 και Pit-2 στην παθολογική επασβέστωση μαλακών ιστών και την υπερ-έκφραση του Pit-1 σε ανθρώπινο ΟΑ χόνδρο γόνατος [256, 257].

Εφόσον στόχος της αλληλεπίδρασης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ με τον υποδοχέα της είναι η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην υπερτροφία και την επασβέστωση των χονδροκυττάρων, επιλέχθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX2 και ο αυξητικός παράγοντας FGF23 με σκοπό τη διερεύνηση της έκφρασής τους στα ΟΑ χονδροκύτταρα, τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, αλλά και τη ρύθμισή τους από τη $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Αρχικά διερευνήθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX2 λόγω του γεγονότος ότι συμμετέχει στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων προωθώντας τα σε υπερτροφία. Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν την υπερ-έκφραση του RUNX2 στα ΟΑ δείγματα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Ο καθοριστικός ρόλος του RUNX2 στην υπερτροφία έχει αναδειχθεί στο παρελθόν σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, στα οποία η επαγωγή της έκφρασης του RUNX2 προωθεί την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας σε υπερτροφικά, ενώ η απαλοιφή του αναστέλλει ή σταματάει τελείως αυτή τη διαδικασία [348, 349]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες κατά τις οποίες ο RUNX2 εμφανίζει αυξημένη έκφραση

στον οστεοαρθρικό χόνδρο και επάγει την έκφραση του COL10A1 και της αλκαλικής φωσφατάσης [163, 190-192].

Συνεχίσαμε με τη διερεύνηση της έκφρασής του αυξητικού παράγοντα FGF23. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την υπερ-έκφραση του FGF23 σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο, στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, με γνώμονα το γεγονός ότι ο FGF23 λειτουργεί ως φωσφατουρική ορμόνη, η οποία εκκρίνεται και ρυθμίζει το μεταβολισμό του Ρi στα κύτταρα-στόχους, ήταν σκόπιμο να προσδιοριστούν τα εκκρινόμενα επίπεδα του FGF23 στα OA και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του FGF23 που εκκρίνονται από OA χονδροκύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών χονδροκυττάρων και υποδηλώνουν την αυξημένη δραστηριότητα του FGF23 στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των OA χονδροκυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη μας υποστηρίζονται από προηγούμενες μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης, οι οποίες αναφέρουν την διαφοροποιημένη έκφραση του FGF23 μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων [95].

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την αλληλεπίδραση του FGF23 με τον RUNX2. Ο FGF-23 ακολουθεί το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τον RUNX2, μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων, δηλαδή ενισχυμένη έκφραση στον OA και μειωμένη στο φυσιολογικό χόνδρο. Όταν σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα έγινε επίδραση με FGF23 παρατηρήσαμε ότι προκαλεί επαγωγή της έκφρασης του RUNX2. Επιπλέον σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε αναστολή της έκφρασης του FGF23, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του RUNX2. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποστηρίζουν τη θετική σχέση ρύθμισης μεταξύ του FGF23 και του RUNX2 και υποδηλώνουν την εμπλοκή του FGF23 στην υπερτροφική διαφοροποίηση των OA χονδροκυττάρων. Με βάση προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα, ο FGF23 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της χονδρογένεσης, αναγκάζοντας τα χονδροκύτταρα της αναπτυσσόμενης πλάκας να εγκαταλείψουν νωρίς τη φάση πολλαπλασιασμού και να περάσουν στη φάση της υπερτροφίας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία βραχύτερων οστών [219]. Επίσης προηγούμενες μελέτες σε οστεοβλάστες, υποστηρίζουν τη θετική ρύθμιση του RUNX2 μέσω σηματοδότησης επαγόμενης από προσδέτες FGFs [350]. Επιπλέον, η επαγωγή του FGF23 σε διαγονιδιακά ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του RUNX2 [351].

Είναι γνωστό ότι η δράση του FGF23 περιλαμβάνει την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, η οποία εξαρτάται από την πρόσδεση του FGF23 στον κατάλληλο υποδοχέα του και από τη δράση του κατάλληλου συμπάραγοντα. [161]. Ο FGFR1c αποτελεί τον υποδοχέα του FGF23 με τη μεγαλύτερη ικανότητα

σύνδεσης [352] υπό την παρουσία του συμπαράγοντα Klotho. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του FGFR1c και παρατηρήθηκε ότι υπερ-εκφράζεται στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με φυσιολογικά και μάλιστα στα ίδια επίπεδα με τον FGF23. Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στη διερεύνηση δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ του FGF23 και του FGFR1c στα χονδροκύτταρα, από την οποία προέκυψε για πρώτη φορά, ότι σχηματίζουν σύμπλοκο με μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Η σύνδεση του FGF23 στον FGFR1c επιτρέπει την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών στα κύτταρα-στόχους, μεταξύ των οποίων είναι το μονοπάτι των MAP-κινασών [238].

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ρύθμιση του FGF23 από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και το Pi στα χονδροκύτταρα. Σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων έγινε επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ή Pi και παρατηρήθηκε ότι ενισχύεται η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του VDR ή των Pit-1 και Pit-2, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τόσο η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όσο και το Pi προκαλούν επαγωγή της έκφρασης του FGF23 στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τόσο η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όσο και το Pi προκάλεσαν αύξηση της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα, υποστηρίζοντας τον κεντρικό ρόλο του μονοπατιού των MAP-κινασών στη σηματοδότηση επαγόμενη από το FGF23 στα χονδροκύτταρα. Μελέτες σε οστεοβλάστες ποντικών ανέδειξαν στο παρελθόν την επαγωγή του FGF23 από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και την αρνητική ρύθμιση που ασκεί ο FGF23 με τη σειρά του στην $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [353]. Επίσης, έχει περιγραφεί από προηγούμενες μελέτες ότι το Pi προκαλεί την ενεργοποίηση του FGF23 και του μονοπατιού των MAP-κινασών στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων του νεφρού HEK293 [268]. Επιπλέον, μελέτες σε ποντίκια ανέδειξαν την εμπλοκή του μονοπατιού MAPK και τη φωσφορυλίωση της ERK στην ωρίμανση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων [354, 355]. Τέλος, μελέτες στην κυτταρική σειρά οστεοβλαστών MC3T3 και χονδροκυττάρων ATDC5 αναφέρουν ότι η εξωκυττάρια αύξηση του Pi επάγει τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 προκειμένου να ενισχύσει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εναπόθεση ιόντων μετάλλων στους ιστούς [269, 356].

Με βάση τα προηγούμενα, επόμενος στόχος μας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων που συμμετέχουν στις διαδικασίες της υπερτροφίας, της επασβέσωσης, της αποππτωσης και του καταβολισμού του OA χόνδρου και του εάν υπόκεινται στον έλεγχο της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi. Επιλέχθηκαν γονίδια χαρακτηριστικά της υπερτροφίας όπως COL10A1, RUNX2 και OC, γονίδια που συνδέονται με το μεταβολισμό του Pi, όπως OPN, η αποππτική πρωτεΐνη κασπάση-9 καθώς και το καταβολικό ένζυμο MMP-13. Έτσι, μετά από επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ή Pi μελετήθηκε η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση

των παραπάνω μορίων και διαπιστώθηκε ότι τόσο η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όσο και το Pi προκαλούν δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασής τους. Επιπλέον μελετήθηκε η απόπτωση των φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από επίδραση με Pi και διαπιστώθηκε αύξηση του αποπτωτικού ρυθμού τους. Με βάση τα προηγούμενα συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR επάγει την έκφραση των παραπάνω γονιδίων, αλλά υποδηλώνει και τη συμμετοχή τους στο μεταβολικό δίκτυο της ορμόνης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε επίδραση φωσφόρου μαζί με τον ειδικό χημικό αναστολέα των αντλιών Na^+/Pi τύπου III, φωσφονοφορμικό οξύ (PFA) σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων και παρατηρήθηκε αναστολή της δράσης του Pi στα κύτταρα αυτά, αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνει ότι η δράση του φωσφόρου στα χονδροκύτταρα είναι ειδική και εξαρτάται από την είσοδο του μέσω των αντλιών Pit-1 και Pit-2. Επειδή τα γονίδια που επηρεάζει ο Pi αποτελούν και στόχους του FGF23, συμπεραίνεται ότι το Pi δρα στα κύτταρα-στόχους της σηματοδότησης του FGF-23. Τα αποτελέσματά μας για την ενεργοποίηση των γονιδίων δεικτών, υποστηρίζονται από προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν την ύπαρξη στοιχείων VDREs, μέσω των οποίων διενεργείται η μεταγραφική ρύθμιση από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, στον υποκινητή της MMP-13 και της OC [290, 296, 307, 309]. Επίσης έχει αναφερθεί η συμβολή του Pi στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών στους οστεοβλάστες και στα χονδροκύτταρα ποντικών τα οποία επάγουν την κασπάση-9 και την OPN [262, 263]. Επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα του Pi έχουν μελετηθεί στη διαδικασία της επασβέστωσης του αγγειώδους ιστού και προκαλούν την *in vitro* επαγωγή της έκφρασης των RUNX2, OPN και OC μέσω των αντλίας Pit-1 [264-266].

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επίδραση $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα και να διαπιστωθεί η συμβολή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην υπερτροφία, την επασβέστωση, τον καταβολισμό και την απόπτωση των OA χονδροκυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με τον VDR, ακολούθησε η αναστολή του γονιδίου του VDR, με τη χρήση ειδικού siRNA εναντίον του VDR, σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του VDR στα OA χονδροκύτταρα έχει ως αποτελέσματα σημαντικά μειωμένη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του FGF23 και του FGFR1c καθώς και μείωση των φωσφορυλιωμένων επιπέδων της κινάσης ERK1/2. Επίσης, προσδιορίστηκαν τα mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων COL10A1, RUNX2, OPN, OC και κασπάση-9, ίδιων με αυτά που μελετήθηκαν μετά από την επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής τους έκφρασης. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μέσω της δράσης του VDR, εμπλέκεται στην

μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που ενέχονται στην υπερτροφική διαφοροποίηση και την επασβέσωση του ΟΑ χόνδρου, οδηγούν στον σταδιακό εκφυλισμό του και ενοχοποιούνται για την παθοφυσιολογία της ΟΑ. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι γενωμικές δράσεις τις $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στα χονδροκύτταρα εξαρτώνται από την έκφραση του VDR και τη δημιουργία συμπλόκου με την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, προκειμένου να εκδηλώσουν μεταγραφική ρύθμιση σε γονίδια που εμπλέκονται στη ομοιοστασία του μεταβολισμού του χόνδρου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν σε διάφορα όργανα-στόχους, όπως λιπώδης ιστός, μύες, μυελός των οστών και καρκινικά κύτταρα, αναφέρουν τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του VDR και της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ με στόχο τον έλεγχο της μεταγραφής πολυάριθμων γονιδίων, υπεύθυνων για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του Ca^{2+} και Pi [276, 277]. Επίσης είναι γνωστή η παρουσία των VDRs σε περισσότερα από 30 όργανα, μεταξύ των οποίων το έντερο, ο θυροειδής και ο νεφρός, και σε πολλούς κυτταρικούς τύπους μεταξύ των οποίων οι οστεοβλάστες και τα χονδροκύτταρα [284, 285].

Επόμενος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε εάν η επαγωγή της έκφρασης του FGF23 από το σύμπλοκο $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR είναι άμεση, μέσω πρόσδεσης σε ειδικές περιοχές στον υποκινητή του FGF23 ή έμμεση με τη μεσολάβηση ενός επιπλέον παράγοντα. Για το σκοπό αυτό, ο υποκινητής του FGF23 αναλύθηκε για την ύπαρξη περιοχών δέσμευσης της βιταμίνης D (VDREs) και διαπιστώθηκε για πρώτη φορά, η ύπαρξη τουλάχιστον δύο VDREs, που τοποθετούνται στις περιοχές -589 έως -823 και -921 έως -1094. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν την άμεση δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μέσω του VDR στη μεταγραφική ρύθμιση του FGF23 σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα και τη εμπλοκή της στην υπερτροφική διαφοροποίηση του ΟΑ χόνδρου. Προηγούμενες μελέτες σε οστεοβλάστες ποντικών ανέδειξαν τη ρύθμιση του FGF23 από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μέσω πρόσδεσης του συμπλόκου $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR στον υποκινητή του FGF23 σε ειδικές θέσεις δέσμευσης [306].

Επιπλέον θεωρήθηκε σκόπιμο, να μελετηθεί η άμεση μεταγραφική ρύθμιση του RUNX2 από τον VDR καθώς και οι πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις. Επομένως μετά από επίδραση $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα ή αναστολή της έκφρασης του VDR σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, αναλύθηκε ο υποκινητής του RUNX2 και προέκυψε ότι απουσία του VDR, ο υποκινητής του RUNX2 είναι ανενεργός και δεν μεταγράφεται. Αντίθετα, η επίδραση με $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του RUNX2 και αύξηση της OC, η οποία αποτελεί μεταγραφικό στόχο του RUNX2. Επιπλέον μελετήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του RUNX2 και του VDR παρουσία της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Προέκυψε ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ενισχύει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του RUNX2 και του VDR, και αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει την συνεργασία μεταξύ των δύο μεταγραφικών παραγόντων στην μεταγραφική ρύθμιση

γονιδίων που εμπλέκονται στην υπερτροφική διαφοροποίηση των ΟΑ χονδροκυττάρων. Ο RUNX2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων, ανάλογα με ποιον άλλον μεταγραφικό παράγοντα αλληλεπιδρά και την ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου [357]. Ο RUNX2 επιπλέον επάγεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όπως υποστηρίζουν μελέτες στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων οστεοβλαστών MG-63 [358]. Επιπλέον, η δημιουργία συμπλόκου του RUNX2 με το VDR μελετήθηκε στο παρελθόν σε οστεοβλάστες και υποστηρίζεται ότι οι πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις ενισχύουν το μεταγραφικό σύμπλοκο πάνω στους υποκινητές γονιδίων-στόχων, όπως ο δείκτης υπερτροφικής διαφοροποίησης OC, και η μεταγραφική του δραστηριότητα συμβάλει στην οστεογένεση [359].

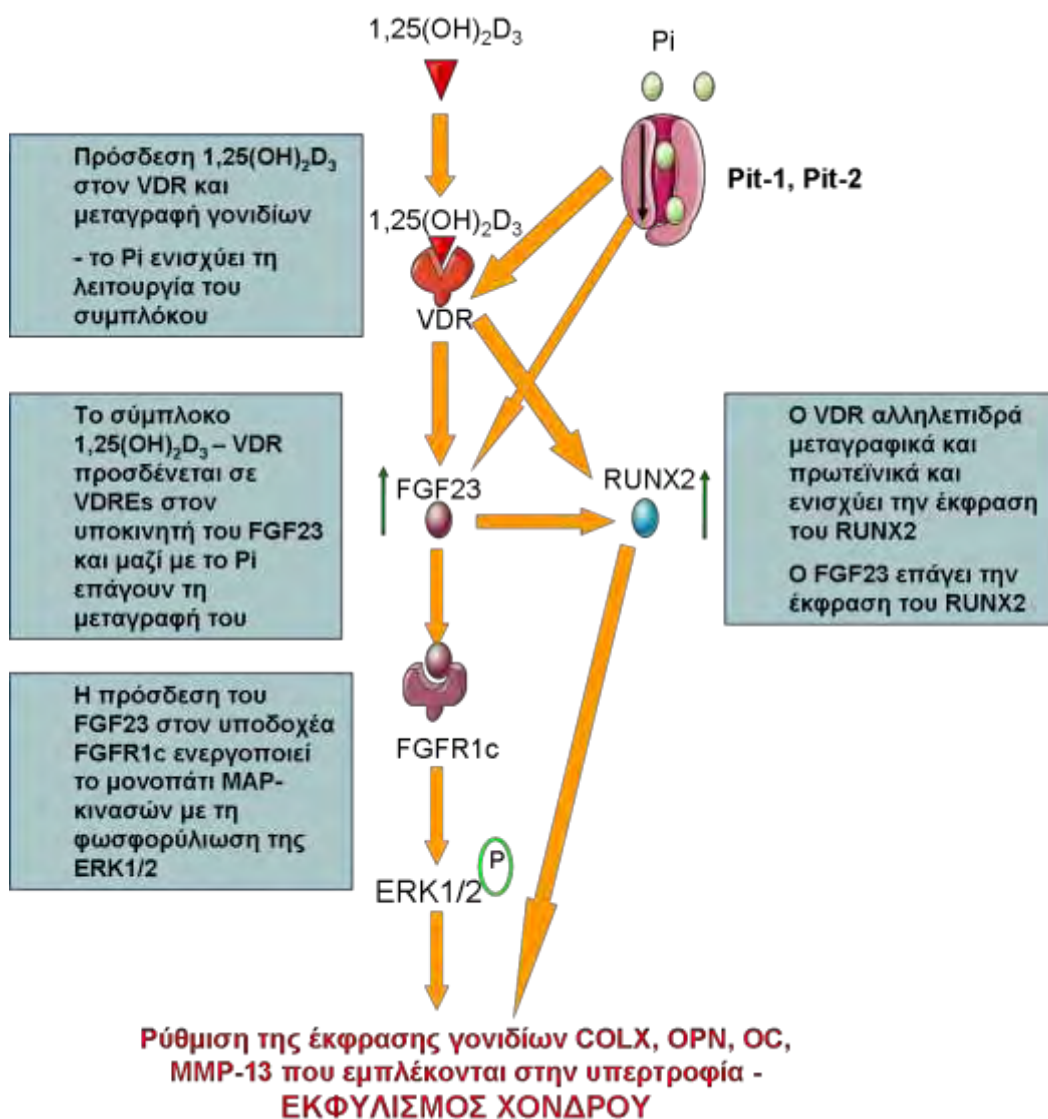
Τελικός στόχος της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στα πλαίσια ενός κοινού μοριακού μηχανισμού στα χονδροκύτταρα. Έτσι, έπειτα από ταυτόχρονη αναστολή της έκφρασης του VDR με χρήση ειδικού siRNA και αναστολή της λειτουργίας των Pit-1 και Pit-2 με επίδραση με PFA στα ΟΑ χονδροκύτταρα, ακολούθησε ανάλυση της έκφρασης του FGF23 και του FGFR1c, καθώς και της φωσφορυλίωσης της ERK1/2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων των FGF23 και FGFR1c σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τη μεμονωμένη αναστολή του VDR ή των Pit-1, Pit-2. Επίσης μεγαλύτερη απώλεια στη φωσφορυλίωση της ERK1/2 προέκυψε από το συνδυασμό της επίδρασης με siRNA-VDR και PFA. Στη συνέχεια των πειραμάτων μας βρέθηκε ότι η αναστολή των VDR και των Pit-1, Pit-2 προκάλεσε αθροιστικό αποτέλεσμα και οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση όλων των γονιδίων-δεικτών (COL10A1, OPN, OC, MMP-13) στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποστηρίζουν την άποψη ότι τόσο η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όσο και το Pi αλληλεπιδρούν και εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΟΑ. Το αθροιστικό αποτέλεσμα της δράσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του φωσφόρου στην μεταγραφή του FGF-23 έχει περιγραφεί σε μελέτες σε καλλιέργειες οστεοβλαστών ποντικών ή αρουραίων, αλλά όχι σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα [261]. Στα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας, ο φώσφορος λειτουργεί ενισχυτικά στη δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, που σημαίνει ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ δεν εξαρτάται από το φώσφορο για να εκδηλώσει τις δράσεις, αλλά η παρουσία του φωσφόρου ενισχύει τη δραστηριότητά της στα κύτταρα αυτά [263, 310]. Επίσης προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει μία σχέση ρύθμισης μεταξύ της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στην αναπτυξιακή πλάκα, κατά την οποία η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προκαλεί την απελευθέρωση του Pi από τα μεμβρανικά κυστίδια στο ECM, το οποίο στη συνέχεια δρα στα χονδροκύτταρα και επάγει την απόπτωσή τους, προκειμένου να

ολοκληρωθεί η ενδοχόνδρια οστεοποίηση [360]. Μελέτες σε ποντίκια υποστηρίζουν ότι τα μειωμένα επίπεδα Pi στα χονδροκύτταρα αναστέλλουν την απόπτωση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων της αναπτυξιακής πλάκας με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών, όπως ραχίτιδα [312]. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι τη μεγαλύτερη μείωση μεταξύ των γονιδίων δεικτών την εκδήλωσε η OPN. Μελέτες σε ποντίκια υποστηρίζουν τον καταλυτικό ρόλο της φωσφοπρωτεΐνης OPN στα τελικά στάδια διαφοροποίησης των υπερτροφικών χονδροκυττάρων, η οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μονοπατιού MAP-ERK και τη σηματοδότηση από το Pi [356].

Η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού των χονδροκυττάρων και φαίνεται να εμπλέκονται διεργασίες που αποτελούν χαρακτηριστικά στάδια της αναπτυξιακής πλάκας για τη δημιουργία φυσιολογικών οστών και χόνδρου. Οι διαδικασίες αυτές, και συγκεκριμένα η υπερτροφία και η επασβέστωση του χόνδρου, αποτέλεσαν το κύριο αντικείμενο της μελέτης μας. Σε κάθε φάση της αναπτυξιακής πλάκας, μόρια – κλειδιά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πορεία της φυσιολογικής ανάπτυξης. Μελετήθηκε ο ρόλος της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi στα OA χονδροκύτταρα μέσω του FGF23 και της ενεργοποίησης του μονοπατιού των MAP-κινασών. Προτείνεται επομένως το ακόλουθο μοντέλο που περιλαμβάνει το συμπλόκο $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR, η δράση του οποίου στα OA χονδροκύτταρα ενισχύεται περαιτέρω από τα αυξημένα επίπεδα Pi και οδηγεί στην ενισχυμένη έκφραση του FGF23, ο οποίος με τη σειρά του, αφενός προσδένεται στο υποδοχέα του FGFR1c και ενεργοποιεί το μονοπάτι MAP-κινασών και συγκεκριμένα τη φωσφορυλίωση της ERK1/2, αφετέρου αλληλεπιδρά με τον RUNX2 προκειμένου να τον ρυθμίσει θετικά. Το μονοπάτι των MAP-κινασών οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης δεικτών της υπερτροφίας και της επασβέστωση του ECM με τελικό αποτέλεσμα τον εκφυλισμό του χόνδρου. Επιπλέον το σύμπλοκο $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR ασκεί άμεση θετική ρύθμιση μεταγραφικά και πρωτεϊνικά στον μεταγραφικό παράγοντα της υπερτροφίας RUNX2, ο οποίος εμπλέκεται τελικά στον εκφυλισμό του χόνδρου (εικόνα 38).

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η βιταμίνη D είναι μία ορμόνη και στα πλαίσια της ενδοκρινούς της δράσης συμμετέχει σε ποικίλες διεργασίες σε διαφορετικά όργανα-στόχους. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τη χρήση μεταβολιτών της βιταμίνης D ($25(\text{OH})_2\text{D}_3$) στον ορό των ασθενών ως δείκτες για τη διάγνωση οστεοαρθρίτιδας και συγκεκριμένα υποστηρίζουν ότι η ανεπάρκεια της $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σχετίζεται με την εμφάνιση της OA [361]. Αν και το κύριο όργανο παραγωγής της βιταμίνης D είναι ο νεφρός, μελέτες αναφέρουν την τοπική σύνθεση της ενεργής μορφής της, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ από μακροφάγα στο σημείο βλάβης της άρθρωσης. Στη οστεοαρθρίτιδα ως γνωστών παρατηρείται μία χρόνια

φλεγμονώδης διαδικασία και η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ εμπλέκεται στην πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης στο σημείο της άρθρωσης. Με βάση τα προηγούμενα αναδεικνύεται η κλινική σημασία των αποτελεσμάτων μας, η οποία έγκειται στον καθορισμό του VDR ως πιθανό θεραπευτικό στόχο στην υπερτροφική οστεοαρθρίτιδα.



Εικόνα 38. Πιθανό μοντέλο δράσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και του Pi το οποίο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του FGF23 και τη συμμετοχή του μονοπατιού των MAP-κινασών στην υπερτροφία στην ΟΑ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Applegate WV, Buckwalter NR: **Microanatomy of the structures contributing to abdominal cutaneous nerve entrapment syndrome.** *J Am Board Fam Pract* 1997, **10**(5):329-332.
2. Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ: **Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis.** *Instr Course Lect* 2000, **49**:481-489.
3. Buckwalter JA, Martin J: **Degenerative joint disease.** *Clin Symp* 1995, **47**(2):1-32.
4. Buckwalter JA, Saltzman CL: **Ankle osteoarthritis: distinctive characteristics.** *Instr Course Lect* 1999, **48**:233-241.
5. Cesare PE AS: **Pathogenesis of Osteoarthritis.** In: *Kelley's Textbook of Rheumatology.* Edited by ED Harris JR RB, GS Firestein, et al, 7th edn. USA: Elsevier; 2005.
6. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(6):1237-1247.
7. Elders MJ: **The increasing impact of arthritis on public health.** *J Rheumatol Suppl* 2000, **60**:6-8.
8. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM: **Costs of osteoarthritis: estimates from a geographically defined population.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**:23-25.
9. Reginster JY: **The prevalence and burden of arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2002, **41 Suppl 1**:3-6.
10. **NIH Consensus Statement on total knee replacement December 8-10, 2003.** *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86-A**(6):1328-1335.
11. Muirden KD: **Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world.** *Curr Opin Rheumatol* 2005, **17**(2):153-156.
12. Felson DT: **The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham Osteoarthritis Study.** *Semin Arthritis Rheum* 1990, **20**(3 Suppl 1):42-50.
13. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB: **Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach.** *J Rheumatol* 2004, **31**(3):594-597.
14. Reyes Llerena GA, Guibert Toledano M, Hernandez Martinez AA, Gonzalez Otero ZA, Alcocer Varela J, Cardiel MH: **Prevalence of musculoskeletal complaints and disability in Cuba. A community-based study using the COPCORD core questionnaire.** *Clin Exp Rheumatol* 2000, **18**(6):739-742.
15. Farooqi A, Gibson T: **Prevalence of the major rheumatic disorders in the adult population of north Pakistan.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**(5):491-495.
16. Haq SA, Darmawan J, Islam MN, Uddin MZ, Das BB, Rahman F, Chowdhury MA, Alam MN, Mahmud TA, Chowdhury MR *et al*: **Prevalence of rheumatic diseases and associated outcomes in rural and urban communities in Bangladesh: a COPCORD study.** *J Rheumatol* 2005, **32**(2):348-353.
17. Zeng QY, Chen R, Darmawan J, Xiao ZY, Chen SB, Wigley R, Le Chen S, Zhang NZ: **Rheumatic diseases in China.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**(1):R17.
18. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, Pantelidou KV, Vafiadou EV, Dantis PC: **Prevalence of**

- symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 2006, **33**(12):2507-2513.
19. Buckwalter KC: **What's hot, what's not, in dementia drugs. Part II.** *J Gerontol Nurs* 1997, **23**(12):46-47.
 20. Dieppe PA: **Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints.** *Osteoarthritis Cartilage* 1995, **3**(2):73-77.
 21. Dennison EM, Hindmarsh PC, Kellingray S, Fall CH, Cooper C: **Growth hormone predicts bone density in elderly women.** *Bone* 2003, **32**(4):434-440.
 22. Cooper C, Inskip H, Croft P, Campbell L, Smith G, McLaren M, Coggon D: **Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity.** *Am J Epidemiol* 1998, **147**(6):516-522.
 23. McKinley TO, Bay BK: **Trabecular bone strain changes associated with cartilage defects in the proximal and distal tibia.** *J Orthop Res* 2001, **19**(5):906-913.
 24. McKinley TO, Callendar PW, Bay BK: **Trabecular bone strain changes associated with subchondral comminution of the distal tibia.** *J Orthop Trauma* 2002, **16**(10):709-716.
 25. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y *et al*: **Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors.** *Ann Intern Med* 2000, **133**(8):635-646.
 26. Mandelbaum B, Waddell D: **Etiology and pathophysiology of osteoarthritis.** *Orthopedics* 2005, **28**(2 Suppl):s207-214.
 27. Arden N, Nevitt MC: **Osteoarthritis: epidemiology.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(1):3-25.
 28. Dieppe PA, Lohmander LS: **Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis.** *Lancet* 2005, **365**(9463):965-973.
 29. Felson DT, Zhang Y: **An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(8):1343-1355.
 30. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF: **Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study.** *Ann Intern Med* 1988, **109**(1):18-24.
 31. Hart DJ, Doyle DV, Spector TD: **Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(1):17-24.
 32. Juhakoski R, Heliovaara M, Impivaara O, Kroger H, Knekt P, Lauren H, Arokoski JP: **Risk factors for the development of hip osteoarthritis: a population-based prospective study.** *Rheumatology (Oxford)* 2009, **48**(1):83-87.
 33. Cicuttini FM, Spector TD: **What is the evidence that osteoarthritis is genetically determined?** *Baillieres Clin Rheumatol* 1997, **11**(4):657-669.
 34. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, Levy D: **The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(10):1500-1505.
 35. Martin JA, Buckwalter JA: **Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001, **56**(4):B172-179.

36. Martin JA, Buckwalter JA: **Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis.** *Biogerontology* 2002, **3**(5):257-264.
37. Martin JA, Buckwalter JA: **The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair.** *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A Suppl 2**:106-110.
38. Lawrence J: **Rheumatism in Populations.** London: William Heinemann; 1977.
39. Brandt KD FD: **Osteoarthritis.** In: *Prognosis in the Rheumatic Diseases.* Edited by Bellamy N, vol. 11. Luncaster, UK: Kluwer Academic; 1991.
40. Forman M: **The epidemiology of osteoarthritis of the knee.** In: *Epidemiology of Osteoarthritis.* Edited by Peyron J, vol. 243. Paris: Giba-Geigy; 1980.
41. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F: **Osteo-arthrosis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes.** *Ann Rheum Dis* 1966, **25**(1):1-24.
42. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF: **The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**(8):914-918.
43. Dillon CF, Rasch EK, Gu Q, Hirsch R: **Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94.** *J Rheumatol* 2006, **33**(11):2271-2279.
44. Odding E, Valkenburg HA, Algra D, Vandenouweland FA, Grobbee DE, Hofman A: **Associations of radiological osteoarthritis of the hip and knee with locomotor disability in the Rotterdam Study.** *Ann Rheum Dis* 1998, **57**(4):203-208.
45. Danielsson L, Lindberg H, Nilsson B: **Prevalence of coxarthrosis.** *Clin Orthop Relat Res* 1984(191):110-115.
46. Jorring K: **Osteoarthritis of the hip. Epidemiology and clinical role.** *Acta Orthop Scand* 1980, **51**(3):523-530.
47. Kallman DA, Wigley FM, Scott WW, Jr., Hochberg MC, Tobin JD: **The longitudinal course of hand osteoarthritis in a male population.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**(9):1323-1332.
48. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Plato CC, Wigley FM, Tobin JD: **Factors associated with osteoarthritis of the hand in males: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging.** *Am J Epidemiol* 1991, **134**(10):1121-1127.
49. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA: **Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations.** *Ann Rheum Dis* 1989, **48**(4):271-280.
50. Sowers MF, Hochberg M, Crabbe JP, Muhich A, Crutchfield M, Updike S: **Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of the hand and knee in premenopausal women.** *Am J Epidemiol* 1996, **143**(1):38-47.
51. Pereira D, Peleteiro B, Araujo J, Branco J, Santos RA, Ramos E: **The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review.** *Osteoarthritis Cartilage* 2011.
52. Fytily P, Giannatou E, Papanikolaou V, Stripeli F, Karachalios T, Malizos K, Tsezou A: **Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta, and androgen receptor genes with knee osteoarthritis.** *Clin Genet* 2005, **68**(3):268-277.

53. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S: **Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(6):560-566.
54. Ushiyama T, Inoue K, Nishioka J: **Expression of estrogen receptor related protein (p29) and estradiol binding in human arthritic synovium.** *J Rheumatol* 1995, **22**(3):421-426.
55. Anderson JJ, Felson DT: **Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work.** *Am J Epidemiol* 1988, **128**(1):179-189.
56. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ: **Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study.** *Ann Intern Med* 1992, **116**(7):535-539.
57. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM: **Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee.** *Epidemiology* 1999, **10**(2):161-166.
58. Toda Y, Toda T, Takemura S, Wada T, Morimoto T, Ogawa R: **Change in body fat, but not body weight or metabolic correlates of obesity, is related to symptomatic relief of obese patients with knee osteoarthritis after a weight control program.** *J Rheumatol* 1998, **25**(11):2181-2186.
59. Reijman M, Pols HA, Bergink AP, Hazes JM, Belo JN, Lieveense AM, Bierma-Zeinstra SM: **Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip: the Rotterdam Study.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(2):158-162.
60. Hart DJ, Spector TD: **The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study.** *J Rheumatol* 1993, **20**(2):331-335.
61. Loughlin J: **Genetic epidemiology of primary osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2001, **13**(2):111-116.
62. Leppavuori J, Kujala U, Kinnunen J, Kaprio J, Nissila M, Heliovaara M, Klinger N, Partanen J, Terwilliger JD, Peltonen L: **Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**(4):1060-1067.
63. Forster T, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Loughlin J: **Finer linkage mapping of primary osteoarthritis susceptibility loci on chromosomes 4 and 16 in families with affected women.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(1):98-102.
64. Spector TD, MacGregor AJ: **Risk factors for osteoarthritis: genetics.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S39-44.
65. Goldring MB: **The role of the chondrocyte in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(9):1916-1926.
66. Demissie S, Cupples LA, Myers R, Aliabadi P, Levy D, Felson DT: **Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(4):946-952.
67. Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA, Aliabadi P, Felson DT: **A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(8):2489-2496.
68. Loughlin J: **Genome studies and linkage in primary osteoarthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2002, **28**(1):95-109.
69. Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE: **Association of the interleukin-1 gene cluster with**

- radiographic signs of osteoarthritis of the hip.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(4):1179-1186.
70. Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, Sims JE, Doherty M, Spector TD, Bidwell JL: **Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis.** *Genes Immun* 2004, **5**(6):451-460.
71. Forster T, Chapman K, Loughlin J: **Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis.** *Hum Genet* 2004, **114**(4):391-395.
72. Stefansson SE, Jonsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jonsson HH, Olafsdottir G, Palsdottir E, Stefansdottir G, Sveinbjornsdottir G, Frigge ML *et al*: **Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**(6):1448-1459.
73. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Ferreira A, Ciesielski C, Carson DA, Corr M: **Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(26):9757-9762.
74. Jones SE, Jomary C: **Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns.** *Bioessays* 2002, **24**(9):811-820.
75. Enomoto-Iwamoto M, Kitagaki J, Koyama E, Tamamura Y, Wu C, Kanatani N, Koike T, Okada H, Komori T, Yoneda T *et al*: **The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis.** *Dev Biol* 2002, **251**(1):142-156.
76. Southam L, Chapman K, Loughlin J: **Genetic association analysis of BMP5 as a potential osteoarthritis susceptibility gene.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**(7):911-912.
77. Hull R, Pope FM: **Osteoarthritis and cartilage collagen genes.** *Lancet* 1989, **1**(8650):1337-1338.
78. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S *et al*: **An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis.** *Nat Genet* 2005, **37**(2):138-144.
79. Kaliakatsos M, Tzetis M, Kanavakis E, Fytily P, Chouliaras G, Karachalios T, Malizos K, Tsezou A: **Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(6):609-611.
80. Poulou M, Kaliakatsos M, Tsezou A, Kanavakis E, Malizos KN, Tzetis M: **Association of the CALM1 core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of Greek origin.** *Genet Test* 2008, **12**(2):263-265.
81. Mototani H, Mabuchi A, Saito S, Fujioka M, Iida A, Takatori Y, Kotani A, Kubo T, Nakamura K, Sekine A *et al*: **A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**(8):1009-1017.
82. Mototani H, Iida A, Nakamura Y, Ikegawa S: **Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population.** *J Bone Miner Metab* 2010, **28**(5):547-553.
83. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ: **Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(17):6565-6568.

84. Knowlton RG, Katzenstein PL, Moskowitz RW, Weaver EJ, Malesud CJ, Pathria MN, Jimenez SA, Prockop DJ: **Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia.** *N Engl J Med* 1990, **322**(8):526-530.
85. Jakkula E, Melkonieni M, Kiviranta I, Lohiniva J, Raina SS, Perala M, Warman ML, Ahonen K, Kroger H, Goring HH *et al*: **The role of sequence variations within the genes encoding collagen II, IX and XI in non-syndromic, early-onset osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(6):497-507.
86. Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD: **Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(8):1444-1449.
87. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, Birkenhager JC, van Leeuwen JP, Pols HA: **Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee.** *J Clin Invest* 1997, **100**(2):259-263.
88. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Ohkubo I, Hukuda S: **Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis.** *J Rheumatol* 1998, **25**(1):134-137.
89. Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, Chitnavis J, Bailey A, Sykes B, Chapman K: **Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis.** *J Rheumatol* 2000, **27**(3):779-784.
90. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, van Leeuwen JP, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Pols HA: **Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(7):1913-1922.
91. Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, Hong MS, Park HJ, Yoon SH, Kim BS *et al*: **Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**(5):R415-421.
92. Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, Wright MO: **Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes.** *Clin Orthop Relat Res* 2001(391 Suppl):S49-60.
93. Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA, Adler RA, Rao TP, Disler D, Moxley G: **Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**(6):394-402.
94. Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD: **Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(8):2497-2507.
95. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A: **Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks.** *PLoS One* 2008, **3**(11):e3740.
96. Loughlin J: **The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status.** *Expert Rev Mol Med* 2005, **7**(9):1-12.

97. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ: **Articular cartilage biology**. *J Am Acad Orthop Surg* 2003, **11**(6):421-430.
98. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB: **Structure and function of aggrecan**. *Cell Res* 2002, **12**(1):19-32.
99. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J: **The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage**. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994, **32**(4):249-257.
100. Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD: **Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli**. *Arch Biochem Biophys* 1994, **311**(1):1-12.
101. Oesser S, Seifert J: **Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen**. *Cell Tissue Res* 2003, **311**(3):393-399.
102. Adams ME, Grant MD, Ho A: **Cartilage proteoglycan changes in experimental canine osteoarthritis**. *J Rheumatol* 1987, **14 Spec No**:107-109.
103. Howell DS: **Pathogenesis of osteoarthritis**. *Am J Med* 1986, **80**(4B):24-28.
104. Meachim G, Allibone R: **Topographical variation in the calcified zone of upper femoral articular cartilage**. *J Anat* 1984, **139 (Pt 2)**:341-352.
105. Hamerman D: **The biology of osteoarthritis**. *N Engl J Med* 1989, **320**(20):1322-1330.
106. Menkes CJ, Lane NE: **Are osteophytes good or bad?** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S53-54.
107. Ghosh P, Cheras PA: **Vascular mechanisms in osteoarthritis**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001, **15**(5):693-709.
108. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J: **Cartilage biology, pathology, and repair**. *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**(24):4197-4211.
109. Sandel LJ HD, Hering TM: **Biochemistry, and Molecular Biology of Articular Cartilage in Osteoarthritis**. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*. Edited by Moskowitz RW AR, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM. Philadelphia:: Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 73-106.
110. Haringman JJ, Ludikhuizen J, Tak PP: **Chemokines in joint disease: the key to inflammation?** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**(10):1186-1194.
111. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology**. *Biorheology* 2002, **39**(1-2):237-246.
112. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR: **Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage**. *Arthritis Rheum* 2005, **52**(1):128-135.
113. Sandell LJ, Aigner T: **Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis**. *Arthritis Res* 2001, **3**(2):107-113.
114. Attur MG, Dave M, Cicolletta C, Kang P, Goldring MB, Patel IR, Abramson SB, Amin AR: **Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention**. *J Biol Chem* 2000, **275**(51):40307-40315.
115. Goldring SR, Goldring MB: **The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis**. *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl):S27-36.

116. Aigner T, Soeder S, Haag J: **IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration.** *Eur Cell Mater* 2006, **12**:49-56; discussion 56.
117. Morgan MP, Whelan LC, Sallis JD, McCarthy CJ, Fitzgerald DJ, McCarthy GM: **Basic calcium phosphate crystal-induced prostaglandin E2 production in human fibroblasts: role of cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, and interleukin-1beta.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(5):1642-1649.
118. Mort JS, Billington CJ: **Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation.** *Arthritis Res* 2001, **3**(6):337-341.
119. Pratta MA, Scherle PA, Yang G, Liu RQ, Newton RC: **Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(1):119-133.
120. Richardson DW, Dodge GR: **Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes.** *Am J Vet Res* 2000, **61**(6):624-630.
121. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: **Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(3):585-594.
122. Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E: **The role of nitric oxide in osteoarthritis.** *Scand J Rheumatol* 2007, **36**(4):247-258.
123. Burrage PS, Brinckerhoff CE: **Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors.** *Curr Drug Targets* 2007, **8**(2):293-303.
124. Abramson SB, Attur M: **Developments in the scientific understanding of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(3):227.
125. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B: **Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(9):1263-1267.
126. Hyc A, Osiecka-Iwan A, Jozwiak J, Moskalewski S: **The morphology and selected biological properties of articular cartilage.** *Ortop Traumatol Rehabil* 2001, **3**(2):151-162.
127. Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**:109-114.
128. Goldring MB, Otero M: **Inflammation in osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2011, **23**(5):471-478.
129. Goldring MB, Goldring SR: **Osteoarthritis.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(3):626-634.
130. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S *et al*: **Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(1):154-163.
131. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E: **Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(11):3533-3544.
132. Hering TM: **Regulation of chondrocyte gene expression.** *Front Biosci* 1999, **4**:D743-761.

133. Fosang AJ, Little CB: **Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, **4**(8):420-427.
134. Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, Fosang AJ: **Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair.** *J Clin Invest* 2007, **117**(6):1627-1636.
135. Murphy G, Nagase H: **Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, **4**(3):128-135.
136. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr.: **Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.** *J Clin Invest* 1989, **84**(2):678-685.
137. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis.** *Front Biosci* 2006, **11**:529-543.
138. Malemud CJ: **Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.** *Front Biosci* 2006, **11**:1696-1701.
139. Nagase H, Woessner JF, Jr.: **Matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 1999, **274**(31):21491-21494.
140. Visse R, Nagase H: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circ Res* 2003, **92**(8):827-839.
141. Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage!** *Br J Rheumatol* 1996, **35**(9):818-820.
142. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H *et al*: **Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**(7):1534-1545.
143. Watanabe H, Yamada Y, Kimata K: **Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function.** *J Biochem* 1998, **124**(4):687-693.
144. Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, Newton RC, Arner E: **Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4).** *Matrix Biol* 2002, **21**(6):499-511.
145. Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T: **Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(10):2648-2657.
146. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL: **Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis.** *J Cell Biol* 1997, **139**(2):541-552.
147. Li TF, Gao L, Sheu TJ, Sampson ER, Flick LM, Konttinen YT, Chen D, Schwarz EM, Zuscik MJ, Jonason JH *et al*: **Aberrant hypertrophy in Smad3-deficient murine chondrocytes is rescued by restoring transforming growth factor beta-activated kinase 1/activating transcription factor 2 signaling: a potential clinical implication for osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(8):2359-2369.
148. Trippel SB: **Growth factor actions on articular cartilage.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**:129-132.

149. Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA: **Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture.** *J Orthop Res* 1996, **14**(6):937-945.
150. Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Frank EH, Davila SG, Bhaktav NR, Trippel SB: **The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I.** *J Orthop Res* 2001, **19**(1):11-17.
151. Tavera C, Aribat T, Reboul P, Dore S, Brazeau P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: **IGF and IGF-binding protein system in the synovial fluid of osteoarthritic and rheumatoid arthritic patients.** *Osteoarthritis Cartilage* 1996, **4**(4):263-274.
152. Adams CS, Horton WE, Jr.: **Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals.** *Anat Rec* 1998, **250**(4):418-425.
153. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F: **Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(2):284-289.
154. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M: **Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(6):3094-3099.
155. Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC: **Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha.** *J Orthop Res* 2001, **19**(5):785-796.
156. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: **Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide.** *Am J Pathol* 1995, **146**(1):75-85.
157. Feng L, Precht P, Balakir R, Horton WE, Jr.: **Evidence of a direct role for Bcl-2 in the regulation of articular chondrocyte apoptosis under the conditions of serum withdrawal and retinoic acid treatment.** *J Cell Biochem* 1998, **71**(2):302-309.
158. Pitsillides AA, Beier F: **Cartilage biology in osteoarthritis-lessons from developmental biology.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(11):654-663.
159. Brighton CT, Sugioka Y, Hunt RM: **Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells.** *J Bone Joint Surg Am* 1973, **55**(4):771-784.
160. Brighton CT, Hunt RM: **Histochemical localization of calcium in the fracture callus with potassium pyroantimonate. Possible role of chondrocyte mitochondrial calcium in callus calcification.** *J Bone Joint Surg Am* 1986, **68**(5):703-715.
161. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P: **Chondrocyte differentiation.** *Int Rev Cytol* 1995, **159**:265-358.
162. Drissi H, Zuscik M, Rosier R, O'Keefe R: **Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis.** *Mol Aspects Med* 2005, **26**(3):169-179.
163. Gebhard PM, Gehrsitz A, Bau B, Soder S, Eger W, Aigner T: **Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes.** *J Orthop Res* 2003, **21**(1):96-101.
164. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K: **The control of chondrogenesis.** *J Cell Biochem* 2006, **97**(1):33-44.
165. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW: **Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells.** *Endocrinology* 1988, **122**(4):1224-1230.

166. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B: **Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.** *Calcif Tissue Int* 2000, **67**(3):230-240.
167. Tchetina E, Mwale F, Poole AR: **Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**(5):844-851.
168. Tchetina EV, Squires G, Poole AR: **Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions.** *J Rheumatol* 2005, **32**(5):876-886.
169. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, Stoss H: **Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**(7):806-811.
170. Wu CW, Tchetina EV, Mwale F, Hasty K, Pidoux I, Reiner A, Chen J, Van Wart HE, Poole AR: **Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization.** *J Bone Miner Res* 2002, **17**(4):639-651.
171. Dreier R: **Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(5):216.
172. Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B: **Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis.** *Dev Dyn* 1997, **209**(4):377-386.
173. Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrughe B: **Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer.** *J Biol Chem* 1998, **273**(24):14998-15006.
174. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B: **SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(4):2336-2346.
175. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M: **SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6.** *J Biol Chem* 2000, **275**(15):10738-10744.
176. Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P: **A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination.** *Development* 1996, **122**(9):2813-2822.
177. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R: **Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds.** *Nat Genet* 1996, **14**(1):62-68.
178. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P: **The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos.** *Nat Genet* 1995, **9**(1):15-20.
179. Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P: **SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse.** *Dev Biol* 1997, **183**(1):108-121.

180. Aigner T, Kim HA: **Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(8):1986-1996.
181. Shum L, Nuckolls G: **The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton.** *Arthritis Res* 2002, **4**(2):94-106.
182. Fukui N, Purple CR, Sandell LJ: **Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury.** *Curr Rheumatol Rep* 2001, **3**(6):496-505.
183. Arnold MA, Kim Y, Czubryt MP, Phan D, McAnally J, Qi X, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: **MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development.** *Dev Cell* 2007, **12**(3):377-389.
184. Chin HJ, Fisher MC, Li Y, Ferrari D, Wang CK, Lichtler AC, Dealy CN, Kosher RA: **Studies on the role of Dlx5 in regulation of chondrocyte differentiation during endochondral ossification in the developing mouse limb.** *Dev Growth Differ* 2007, **49**(6):515-521.
185. Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, Muneoka K, Chen Y: **Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton.** *Dev Biol* 2007, **306**(2):549-559.
186. Solomon LA, Berube NG, Beier F: **Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008, **84**(2):123-130.
187. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T: **Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation.** *J Biol Chem* 2000, **275**(12):8695-8702.
188. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S: **Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1.** *Mech Dev* 1999, **80**(2):159-170.
189. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K *et al*: **Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes.** *J Cell Biol* 2001, **153**(1):87-100.
190. Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford RP, Grant ME, Freemont AJ: **Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage.** *Bone Miner* 1991, **15**(2):151-163.
191. Nah HD, Swoboda B, Birk DE, Kirsch T: **Type IIA procollagen: expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage.** *Dev Dyn* 2001, **220**(4):307-322.
192. Pfander D, Swoboda B, Kirsch T: **Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes.** *Am J Pathol* 2001, **159**(5):1777-1783.
193. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH: **Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**(12):963-973.
194. Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B: **Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(50):19004-19009.
195. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y: **Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis.** *Dev Cell* 2005, **8**(5):739-750.

196. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D: **Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors.** *Trends Biotechnol* 2009, **27**(5):307-314.
197. de Caestecker M: **The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**(1):1-11.
198. Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L: **Tgf-Beta signaling in development.** *Sci STKE* 2007, **2007**(399):cm1.
199. Roberts AB: **TGF-beta signaling from receptors to the nucleus.** *Microbes Infect* 1999, **1**(15):1265-1273.
200. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE: **The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit.** *Bone* 1995, **16**(5):521-527.
201. Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints.** *Lab Invest* 1998, **78**(2):133-142.
202. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, Richards CD, van den Berg WB: **Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**(2):128-136.
203. Clevers H: **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.** *Cell* 2006, **127**(3):469-480.
204. Kawano Y, Kypta R: **Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 13):2627-2634.
205. Willert K, Jones KA: **Wnt signaling: is the party in the nucleus?** *Genes Dev* 2006, **20**(11):1394-1404.
206. Papatheanasiou I, Malizos KN, Tsezou A: **Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) expression in human osteoarthritic chondrocytes.** *J Orthop Res* 2010, **28**(3):348-353.
207. Ornitz DM: **FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development.** *Bioessays* 2000, **22**(2):108-112.
208. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A: **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation.** *Dev Cell* 2002, **3**(3):439-449.
209. Vincent T, Hermansson M, Bolton M, Wait R, Saklatvala J: **Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(12):8259-8264.
210. Yan D, Chen D, Cool SM, van Wijnen AJ, Mikecz K, Murphy G, Im HJ: **Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(4):R130.
211. **Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23.** *Nat Genet* 2000, **26**(3):345-348.
212. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(11):6500-6505.
213. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ *et al*: **FGF-23 in fibrous**

- dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 2003, **112**(5):683-692.**
214. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ: **Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23.** *Kidney Int* 2001, **60**(6):2079-2086.
215. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N: **Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **277**(2):494-498.
216. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J: **Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.** *FASEB J* 2005, **19**(13):1842-1844.
217. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N: **Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23.** *Bone* 2007, **40**(6):1565-1573.
218. Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB: **Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(27):9637-9642.
219. Sanchez CP, He YZ: **Bone growth during daily or intermittent calcitriol treatment during renal failure with advanced secondary hyperparathyroidism.** *Kidney Int* 2007, **72**(5):582-591.
220. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.** *Nature* 2006, **444**(7120):770-774.
221. Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, Zhang F, Davis SI, Garringer HJ, Linhardt RJ, Ornitz DM, Mohammadi M, White KE: **Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23.** *Endocrinology* 2005, **146**(11):4647-4656.
222. Kurosu H, Kuro-o M: **The Klotho gene family and the endocrine fibroblast growth factors.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008, **17**(4):368-372.
223. Razzaque MS, Lanske B: **Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice.** *Trends Mol Med* 2006, **12**(7):298-305.
224. Nabeshima Y: **The discovery of alpha-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(20):3218-3230.
225. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC: **Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity.** *Circ Res* 2005, **96**(4):412-418.
226. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H *et al*: **Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women.** *J Bone Miner Res* 2002, **17**(10):1744-1751.
227. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro OM, Kawaguchi H: **Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women.** *Bone* 2002, **31**(1):37-42.

228. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H: **Association of polymorphisms of the androgen receptor and klotho genes with bone mineral density in Japanese women.** *J Mol Med (Berl)* 2005, **83**(1):50-57.
229. Zhang F, Zhai G, Kato BS, Hart DJ, Hunter D, Spector TD, Ahmadi KR: **Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(6):624-629.
230. Tsezou A, Furuichi T, Satra M, Makrythanasis P, Ikegawa S, Malizos KN: **Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population.** *J Orthop Res* 2008, **26**(11):1466-1470.
231. Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, Greenhaw GA, Hecht JT, Francomano CA: **A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia.** *Nat Genet* 1995, **10**(3):357-359.
232. Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselín C, Delezoide AL, Munnich A, Bonaventure J: **Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia.** *J Biol Chem* 1998, **273**(21):13007-13014.
233. Delezoide AL, Lasselín-Benoist C, Legeai-Mallet L, Brice P, Senee V, Yayon A, Munnich A, Vekemans M, Bonaventure J: **Abnormal FGFR 3 expression in cartilage of thanatophoric dysplasia fetuses.** *Hum Mol Genet* 1997, **6**(11):1899-1906.
234. Su N, Du X, Chen L: **FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases.** *Front Biosci* 2008, **13**:2842-2865.
235. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW *et al*: **Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.** *J Biol Chem* 2006, **281**(10):6120-6123.
236. Lim CP, Jain N, Cao X: **Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1.** *Oncogene* 1998, **16**(22):2915-2926.
237. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N: **Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression.** *Blood* 2001, **98**(5):1429-1439.
238. Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE: **Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(5):955-960.
239. Ishikawa Y, Valhmu WB, Wuthier RE: **Induction of alkaline phosphatase in primary cultures of epiphyseal growth plate chondrocytes by a serum-derived factor.** *J Cell Physiol* 1987, **133**(2):344-350.
240. Johnson KA, van Etten D, Nanda N, Graham RM, Terkeltaub RA: **Distinct transglutaminase 2-independent and transglutaminase 2-dependent pathways mediate articular chondrocyte hypertrophy.** *J Biol Chem* 2003, **278**(21):18824-18832.
241. Kirsch T, Swoboda B, Nah H: **Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**(4):294-302.
242. Terkeltaub RA: **What does cartilage calcification tell us about osteoarthritis?** *J Rheumatol* 2002, **29**(3):411-415.
243. Gattineni J, Baum M: **Regulation of phosphate transport by fibroblast growth factor 23 (FGF23): implications for disorders of phosphate metabolism.** *Pediatr Nephrol* 2010, **25**(4):591-601.

244. Hettleman BD, Sabina RL, Drezner MK, Holmes EW, Swain JL: **Defective adenosine triphosphate synthesis. An explanation for skeletal muscle dysfunction in phosphate-deficient mice.** *J Clin Invest* 1983, **72**(2):582-589.
245. Anderson HC: **Matrix vesicles and calcification.** *Curr Rheumatol Rep* 2003, **5**(3):222-226.
246. Rosenthal AK, Mandel N: **Identification of crystals in synovial fluids and joint tissues.** *Curr Rheumatol Rep* 2001, **3**(1):11-16.
247. Swain LD, Schwartz Z, Boyan BD: **Regulation of matrix vesicle phospholipid metabolism is cell maturation-dependent.** *Bone Miner* 1992, **17**(2):192-196.
248. Cheung HS: **Role of calcium-containing crystals in osteoarthritis.** *Front Biosci* 2005, **10**:1336-1340.
249. Solomon DH, Browning JA, Wilkins RJ: **Inorganic phosphate transport in matrix vesicles from bovine articular cartilage.** *Acta Physiol (Oxf)* 2007, **190**(2):119-125.
250. Biber J, Custer M, Magagnin S, Hayes G, Werner A, Lotscher M, Kaissling B, Murer H: **Renal Na/Pi-cotransporters.** *Kidney Int* 1996, **49**(4):981-985.
251. Tenenhouse HS: **Phosphate transport: molecular basis, regulation and pathophysiology.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, **103**(3-5):572-577.
252. Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC: **Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **293**(3):F643-654.
253. Busch AE, Schuster A, Waldegger S, Wagner CA, Zempel G, Broer S, Biber J, Murer H, Lang F: **Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in Xenopus oocytes permeable for organic and inorganic anions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(11):5347-5351.
254. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H: **Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective.** *Kidney Int* 2006, **70**(9):1548-1559.
255. Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J: **In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development.** *Bone* 1999, **24**(1):1-7.
256. Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, Liu-Bryan R: **Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(1):144-154.
257. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H: **Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin.** *Circ Res* 2005, **96**(7):717-722.
258. Gonzalez M, Martinez R, Amador C, Michea L: **Regulation of the sodium-phosphate cotransporter Pit-1 and its role in vascular calcification.** *Curr Vasc Pharmacol* 2009, **7**(4):506-512.
259. Fukumoto S: **Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism--pivotal role of fibroblast growth factor 23.** *Intern Med* 2008, **47**(5):337-343.
260. Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE: **Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?** *Bone* 2004, **35**(5):1192-1199.
261. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: **Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo.** *J Biol Chem* 2005, **280**(4):2543-2549.

262. Beck GR, Jr., Zerler B, Moran E: **Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(15):8352-8357.
263. Beck GR, Jr.: **Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation.** *J Cell Biochem* 2003, **90**(2):234-243.
264. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: **Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.** *Circ Res* 2000, **87**(7):E10-17.
265. Li X, Yang HY, Giachelli CM: **Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification.** *Circ Res* 2006, **98**(7):905-912.
266. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, Negi S, Kinugasa E, Ooshima A, Koshikawa S *et al*: **Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism.** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(4):911-916.
267. Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T: **Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells.** *J Cell Biochem* 2010, **111**(5):1210-1221.
268. Beck GR, Jr., Moran E, Knecht N: **Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2.** *Exp Cell Res* 2003, **288**(2):288-300.
269. Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J: **Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway.** *Endocrinology* 2007, **148**(2):530-537.
270. Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H: **Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23.** *Ther Apher Dial* 2005, **9**(4):331-335.
271. Suzuki A, Ammann P, Nishiwaki-Yasuda K, Sekiguchi S, Asano S, Nagao S, Kaneko R, Hirabayashi M, Oiso Y, Itoh M *et al*: **Effects of transgenic Pit-1 overexpression on calcium phosphate and bone metabolism.** *J Bone Miner Metab* 2010, **28**(2):139-148.
272. DeLuca HF: **Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.** *Am J Clin Nutr* 2004, **80**(6 Suppl):1689S-1696S.
273. Haddad JG: **Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, **53**(1-6):579-582.
274. Ohyama Y, Yamasaki T: **Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism.** *Front Biosci* 2004, **9**:3007-3018.
275. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW: **De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase.** *J Biol Chem* 2003, **278**(39):38084-38093.
276. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** *J Bone Miner Res* 1998, **13**(3):325-349.
277. Norman AW: **Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor.** *Endocrinology* 2006, **147**(12):5542-5548.
278. Holick MF: **Evolution and function of vitamin D.** *Recent Results Cancer Res* 2003, **164**:3-28.

279. Lieben L, Carmeliet G, Masuyama R: **Calcemic actions of vitamin D: effects on the intestine, kidney and bone.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011, **25**(4):561-572.
280. Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A, Peng X: **Vitamin D target proteins: function and regulation.** *J Cell Biochem* 2003, **88**(2):238-244.
281. Portale AA, Halloran BP, Morris RC, Jr.: **Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men.** *J Clin Invest* 1989, **83**(5):1494-1499.
282. Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G: **Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation.** *Biochem J* 1989, **262**(1):173-180.
283. Omdahl JL, Bobrovnikova EA, Choe S, Dwivedi PP, May BK: **Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway.** *Steroids* 2001, **66**(3-5):381-389.
284. Walters MR: **Newly identified actions of the vitamin D endocrine system.** *Endocr Rev* 1992, **13**(4):719-764.
285. Binderup L: **Immunological properties of vitamin D analogues and metabolites.** *Biochem Pharmacol* 1992, **43**(9):1885-1892.
286. Dean DD, Schwartz Z, Muniz OE, Arsenis CH, Boyan BD, Howell DS: **Interleukin-1alpha and beta in growth plate cartilage are regulated by vitamin D metabolites in vivo.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**(10):1560-1569.
287. Boyan BD, Posner GH, Greising DM, White MC, Sylvia VL, Dean DD, Schwartz Z: **Hybrid structural analogues of 1,25-(OH)₂D₃ regulate chondrocyte proliferation and proteoglycan production as well as protein kinase C through a nongenomic pathway.** *J Cell Biochem* 1997, **66**(4):457-470.
288. Dean DD, Boyan BD, Muniz OE, Howell DS, Schwartz Z: **Vitamin D metabolites regulate matrix vesicle metalloproteinase content in a cell maturation-dependent manner.** *Calcif Tissue Int* 1996, **59**(2):109-116.
289. Gerstenfeld LC, Kelly CM, Von Deck M, Lian JB: **Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on induction of chondrocyte maturation in culture: extracellular matrix gene expression and morphology.** *Endocrinology* 1990, **126**(3):1599-1609.
290. Grumbles RM, Shao L, Jeffrey JJ, Howell DS: **Regulation of rat interstitial collagenase gene expression in growth cartilage and chondrocytes by vitamin D₃, interleukin-1 beta, and okadaic acid.** *J Cell Biochem* 1996, **63**(4):395-409.
291. Lacraz S, Dayer JM, Nicod L, Welgus HG: **1,25-dihydroxyvitamin D₃ dissociates production of interstitial collagenase and 92-kDa gelatinase in human mononuclear phagocytes.** *J Biol Chem* 1994, **269**(9):6485-6490.
292. Boyan BD, Schwartz Z, Carnes DL, Jr., Ramirez V: **The effects of vitamin D metabolites on the plasma and matrix vesicle membranes of growth and resting cartilage cells in vitro.** *Endocrinology* 1988, **122**(6):2851-2860.
293. Schwartz Z, Dean DD, Walton JK, Brooks BP, Boyan BD: **Treatment of resting zone chondrocytes with 24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃] induces differentiation into a 1,25-(OH)₂D₃-responsive phenotype characteristic of growth zone chondrocytes.** *Endocrinology* 1995, **136**(2):402-411.
294. Swain LD, Schwartz Z, Caulfield K, Brooks BP, Boyan BD: **Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)₂D₃ and**

- 24,25-(OH)2D3 is dependent on cell maturation.** *Bone* 1993, **14**(4):609-617.
295. Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R, Boyan BD: **Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures.** *J Cell Physiol* 1993, **157**(2):271-278.
296. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G: **Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts.** *J Clin Invest* 2006, **116**(12):3150-3159.
297. Takamoto M, Tsuji K, Yamashita T, Sasaki H, Yano T, Taketani Y, Komori T, Nifuji A, Noda M: **Hedgehog signaling enhances core-binding factor a1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene expression in chondrocytes.** *J Endocrinol* 2003, **177**(3):413-421.
298. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo.** *Endocrinology* 2002, **143**(8):3179-3182.
299. Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC: **The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency.** *J Biol Chem* 2003, **278**(11):9843-9849.
300. Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: **Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 production.** *J Biol Chem* 2003, **278**(4):2206-2211.
301. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**(2):409-414.
302. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T: **Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism.** *J Clin Invest* 2004, **113**(4):561-568.
303. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: **FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis.** *J Bone Miner Res* 2004, **19**(3):429-435.
304. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T *et al*: **Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**(5):F1088-1095.
305. Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB, White KE: **Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations.** *Bone* 2005, **36**(6):971-977.
306. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD: **Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(5):1305-1315.
307. Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z, Muniz OE, Carreno MR, Maeda S, Howell DS: **Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-**

- dihydroxyvitamin D3 on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo.** *Endocrine* 2001, **14**(3):311-323.
308. Schwartz Z, Sylvia VL, Luna MH, DeVeau P, Whetstone R, Dean DD, Boyan BD: **The effect of 24R,25-(OH)(2)D(3) on protein kinase C activity in chondrocytes is mediated by phospholipase D whereas the effect of 1alpha,25-(OH)(2)D(3) is mediated by phospholipase C.** *Steroids* 2001, **66**(9):683-694.
309. Schwartz Z, Pedrozo HA, Sylvia VL, Gomez R, Dean DD, Boyan BD: **1alpha,25-(OH)2D3 regulates 25-hydroxyvitamin D3 24R-hydroxylase activity in growth zone costochondral growth plate chondrocytes via protein kinase C.** *Calcif Tissue Int* 2001, **69**(6):365-372.
310. Foster BL, Nociti FH, Jr., Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, Zhang P, Somerman MJ: **Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro.** *Calcif Tissue Int* 2006, **78**(2):103-112.
311. Teixeira CC, Costas AP, Nemelivsky Y: **Apoptosis of growth plate chondrocytes occurs through a mitochondrial pathway.** *Angle Orthod* 2007, **77**(1):129-134.
312. Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, Shapiro IM: **Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **281**(3):C833-839.
313. Miedlich SU, Zalutskaya A, Zhu ED, Demay MB: **Phosphate-induced apoptosis of hypertrophic chondrocytes is associated with a decrease in mitochondrial membrane potential and is dependent upon Erk1/2 phosphorylation.** *J Biol Chem* 2010, **285**(24):18270-18275.
314. Hugel U, Weber L, Reichrath J, Mehls O, Klaus G: **Rat growth plate chondrocytes express low levels of 25-hydroxy-1alpha-hydroxylase.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **89-90**(1-5):143-147.
315. Turner RT, Puzas JE, Forte MD, Lester GE, Gray TK, Howard GA, Baylink DJ: **In vitro synthesis of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol by isolated calvarial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(10):5720-5724.
316. Chen W, Thiboutot D, Zouboulis CC: **Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives.** *J Invest Dermatol* 2002, **119**(5):992-1007.
317. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Belanger A: **Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease.** *J Mol Endocrinol* 2000, **25**(1):1-16.
318. St-Arnaud R: **The direct role of vitamin D on bone homeostasis.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**(2):225-230.
319. Hayes ME, Denton J, Freemont AJ, Mawer EB: **Synthesis of the active metabolite of vitamin D, 1,25(OH)2D3, by synovial fluid macrophages in arthritic diseases.** *Ann Rheum Dis* 1989, **48**(9):723-729.
320. Fairney A, Straffen AM, May C, Seifert MH: **Vitamin D metabolites in synovial fluid.** *Ann Rheum Dis* 1987, **46**(5):370-374.
321. Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA: **Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific.** *Ann Rheum Dis* 1997, **56**(9):542-549.
322. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human**

- chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**(9):2011-2019.
323. Kellgren JH, Lawrence JS, Bier F: **Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis.** *Ann Rheum Dis* 1963, **22**:237-255.
324. Gibson UE, Heid CA, Williams PM: **A novel method for real time quantitative RT-PCR.** *Genome Res* 1996, **6**(10):995-1001.
325. Caplen NJ: **A new approach to the inhibition of gene expression.** *Trends Biotechnol* 2002, **20**(2):49-51.
326. Hannon GJ: **RNA interference.** *Nature* 2002, **418**(6894):244-251.
327. Hudson DF, Morrison C, Ruchaud S, Earnshaw WC: **Reverse genetics of essential genes in tissue-culture cells: 'dead cells talking'.** *Trends Cell Biol* 2002, **12**(6):281-287.
328. Sharp PA: **RNA interference--2001.** *Genes Dev* 2001, **15**(5):485-490.
329. Sullenger BA, Gilboa E: **Emerging clinical applications of RNA.** *Nature* 2002, **418**(6894):252-258.
330. Plasterk RH: **RNA silencing: the genome's immune system.** *Science* 2002, **296**(5571):1263-1265.
331. Lipardi C, Wei Q, Paterson BM: **RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs.** *Cell* 2001, **107**(3):297-307.
332. Jagus R, Joshi B, Barber GN: **PKR, apoptosis and cancer.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**(1):123-138.
333. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.** *Science* 2002, **296**(5567):550-553.
334. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K: **Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 24):4557-4565.
335. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS: **Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.** *Genes Dev* 2002, **16**(8):948-958.
336. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y: **A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(8):5515-5520.
337. Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL: **RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(9):6047-6052.
338. Chaisson CE, Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Aliabadi P, Naimark A, Levy D, Felson DT: **Radiographic hand osteoarthritis: incidence, patterns, and influence of pre-existing disease in a population based sample.** *J Rheumatol* 1997, **24**(7):1337-1343.
339. Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, Rutsch F, Schafer FK, Niggemeyer O, Steinhagen J *et al*: **Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(9):2694-2703.
340. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M: **Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes.** *J Cell Biol* 1997, **137**(5):1149-1160.
341. Ryan JM, McCarthy GM, Plunkett PK: **Regional intravenous calcium--an effective method of treating hydrofluoric acid burns to limb peripheries.** *J Accid Emerg Med* 1997, **14**(6):401-402.

342. Tetlow LC, Woolley DE: **Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**(5):423-431.
343. Tetlow LC, Woolley DE: **The effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on matrix metalloproteinase and prostaglandin E(2) production by cells of the rheumatoid lesion.** *Arthritis Res* 1999, **1**(1):63-70.
344. Schmitz JP, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Calderon F, Boyan BD: **Vitamin D3 regulation of stromelysin-1 (MMP-3) in chondrocyte cultures is mediated by protein kinase C.** *J Cell Physiol* 1996, **168**(3):570-579.
345. Balmain N, Hauchecorne M, Pike JW, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H: **Distribution and subcellular immunolocalization of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in rat epiphyseal cartilage.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1993, **39**(3):339-350.
346. Kavanaugh MP, Kabat D: **Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family.** *Kidney Int* 1996, **49**(4):959-963.
347. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD: **Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(15):7071-7075.
348. Kawaguchi H: **Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models.** *Mol Cells* 2008, **25**(1):1-6.
349. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G *et al*: **Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(8):2462-2470.
350. Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT: **Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2.** *J Biol Chem* 2002, **277**(39):36181-36187.
351. Hollberg K, Marsell R, Norgard M, Larsson T, Jonsson KB, Andersson G: **Osteoclast polarization is not required for degradation of bone matrix in rachitic FGF23 transgenic mice.** *Bone* 2008, **42**(6):1111-1121.
352. Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD: **FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23.** *J Am Soc Nephrol* 2008, **19**(12):2342-2350.
353. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK: **1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **289**(6):G1036-1042.
354. Canadillas S, Canalejo R, Rodriguez-Ortiz ME, Martinez-Moreno JM, Estepa JC, Zafra R, Perez J, Munoz-Castaneda JR, Canalejo A, Rodriguez M *et al*: **The up-regulation of the parathyroid VDR expression by extracellular calcium is mediated by the ERK1/2-MAPK signaling pathway.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2010.
355. Provot S, Nachtrab G, Paruch J, Chen AP, Silva A, Kronenberg HM: **A-raf and B-raf are dispensable for normal endochondral bone development, and parathyroid hormone-related peptide suppresses extracellular**

- signal-regulated kinase activation in hypertrophic chondrocytes. *Mol Cell Biol* 2008, **28**(1):344-357.**
356. Beck GR, Jr., Knecht N: **Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent.** *J Biol Chem* 2003, **278**(43):41921-41929.
357. Komori T: **Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors.** *J Cell Biochem* 2005, **95**(3):445-453.
358. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Sato S, Kubota E, Hata R: **Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor.** *Matrix Biol* 2006, **25**(1):47-58.
359. Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, Stein JL *et al*: **Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(20):8847-8861.
360. Denison TA, Koch CF, Shapiro IM, Schwartz Z, Boyan BD: **Inorganic phosphate modulates responsiveness to 24,25(OH)2D3 in chondrogenic ATDC5 cells.** *J Cell Biochem* 2009, **107**(1):155-162.
361. Heidari B, Heidari P, Hajian-Tilaki K: **Association between serum vitamin D deficiency and knee osteoarthritis.** *Int Orthop* 2011, **35**(11):1627-1631.