



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μοριακός χαρακτηρισμός χονδροκυττάρων προερχόμενων από  
επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα»**

Ελένη Νίντου  
Μοριακός Βιολόγος

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ασπασία Τσέζου  
Τραχανά Βαρβάρα  
Δήμας Κων/νος

ΛΑΡΙΣΑ, 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

**«Molecular characterization of chondrocytes generated from  
induced pluripotent stem cells**

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	7
1.1. ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ .....	10
1.1.1. Φυσιολογική Δομή .....	10
1.1.2. Αρθρικός χόνδρος στην Οστεοαρθρίτιδα .....	11
1.2. ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ .....	12
1.2.1. Λειτουργία των χονδροκυττάρων και δομή .....	12
1.2.2. Υπερτροφικός φαινότυπος .....	14
1.2.3. Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση .....	15
1.3. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ .....	17
1.3.1. Γενικά .....	17
1.3.2. Ενήλικα βλαστοκύτταρα .....	17
1.3.3. Μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών και χονδρογενετική διαφοροποίηση .....	18
1.4. Εμβρυϊκά και Επαγόμενα βλαστοκύτταρα .....	20
1.4.1. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα .....	21
1.4.2. Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells) .....	21
1.4.2.1. iPSCs και MSCs .....	25
1.4.2.2. Μετατροπή των iPSCs σε χονδροκύτταρα .....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ .....	30
“ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ” .....	30
2.1. Κατηγορίες Δειγμάτων .....	31
2.2. Κυτταροκαλλιέργειες .....	31
2.3. Από το RNA στο DNA .....	34
2.3.1. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	34
2.4. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL10A1, MMP-13, RUNX-2, SOX-9 με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) .....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ .....	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	39
3.1. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου της MMP-13 .....	40
3.2. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου Κολλαγόνο Χ .....	41
3.3. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου SOX-9 και του γονιδίου RUNX-2 .....	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ .....	43
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	45

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας στις ανεπτυγμένες χώρες και μια από τις βασικές αιτίες αναπηρίας του ενήλικου πληθυσμού και χαρακτηρίζεται από σταδιακή αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Μεταξύ των επιβαρυντικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου συγκαταλέγεται το μηχανικό φορτίο, η παχυσαρκία, το φύλο, η ηλικία, οι τραυματισμοί των αρθρώσεων καθώς και η γενετική προδιάθεση.

Η αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου οφείλεται στη διαταραχή του φυσιολογικού μεταβολισμού των χονδροκυττάρων, του μοναδικού κυτταρικού τύπου που απαντάται στον αρθρικό χόνδρο. Αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής είναι να επικρατούν οι καταβολικές διεργασίες μέσω της αύξησης της παραγωγής διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-13) και αγγρεκανασών (ADAMTS-5) που οδηγούν στην σταδιακή αποδόμηση των κυρίων συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας όπως του κολλαγόνου τύπου II και των αγγρεκανών και αντικατάστασή τους με άλλες όπως το κολλαγόνο X. Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως η αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικό μέσω της δράσης μεταγραφικών παραγόντων (SOX-9 και RUNX-2) και πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών παίζει καταλυτικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν εστιάσει στη χρήση των βλαστικών κυττάρων για την αναδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες : α) τα ενήλικα βλαστοκύτταρα, τα οποία είναι πολυδύναμα και εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του ανθρωπίνου σώματος στην ενήλικη ζωή και β) τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (hES), που είναι ολοδύναμα και εμφανίζονται στην πρώιμη εμβρυογένεση.

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υποκατηγορίες με βάση τη δυνατότητα διαφοροποίησής τους: τα αιμοποιητικά και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Τα ενήλικα βλαστικά μεσεγχυματικής προέλευσης (MSCs) μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλαστική, χονδρογενική και λιπώδη κυτταρική σειρά, για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα. Σημαντικό πλεονέκτημά τους είναι ότι απομονώνονται σχετικά εύκολα και δεν συνδέονται με ογκογένεση. Παρόλα αυτά η μικρή δυνατότητα αυτο-ανανέωσης τους και η μείωση της αναγεννητικής και διαφοροποιητικής ικανότητάς τους με την ηλικία, αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων.

Στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, εκτός των ολοδύναμων κυττάρων που λαμβάνονται στο στάδιο της βλαστοκύστης, ανήκουν και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). Τα iPSCs προέρχονται από ώριμα κύτταρα τα οποία με την ταυτόχρονη εισαγωγή των γονιδίων

μεταγραφικών παραγόντων (Oct4 και Sox2) και πρωτοογκογονιδίων (c-Myc και Klf4) επαναπρογραμματίζονται και αποκτούν χαρακτηριστικά των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων μέσω της έκφρασης ειδικών γονιδίων των hES κυττάρων και διατήρησης του δυναμικού διαφοροποίησης τους προς παράγωγα και των 3 αρχικών βλαστικών στιβάδων. Τα iPSCs θεωρούνται ιδανικοί παράγοντες για θεραπευτικά σχήματα συγκριτικά με MSCs καθώς έχουν τη δυνατότητα για απεριόριστο πολλαπλασιασμό, είναι ειδικά για κάθε ασθενή, δε προκαλούν ανοσοαπόκριση και εκφράζουν υψηλά επίπεδα τελομεράσης.

Πολλές έρευνες που στη συνέχεια οδήγησαν σε κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα MSCs μπορούν να βελτιώσουν την οστεοαρθρική άρθρωση. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα χονδροκύτταρα προερχόμενα από MSCs αποκτούν τον υπερτροφικό φαινότυπο. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν δείξει πως τα χονδροκύτταρα μπορούν να αποτελέσουν πηγή για την παραγωγή iPSCs και την ανάπλαση της άρθρωσης και ότι τα iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν με επιτυχία σε χονδροκύτταρα. Η διαδικασία με το μεγαλύτερο ποσοτό επιτυχίας περιλαμβάνει τη μετατροπή των iPSCs προερχόμενων από το μυελό των οστών σε μεσεγχυματικά και στη συνέχεια σε χονδροκύτταρα. Επίσης έχει πραγματοποιηθεί η επιτυχής παραγωγή iPSCs προερχόμενων από ασθενείς με OA, τα οποία εμφάνισαν δυναμικό διαφοροποίησης ανάλογο των άλλων βλαστοκυττάρων.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η έκφραση του MMP-13 και του COL10, του RUNX2 και του SOX-9, τα οποία είναι δείκτες του καταβολισμού, της χονδρογένεσης και του αναβολισμού αντίστοιχα. Σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα επίπεδα του MMP-13, του COL10, του RUNX2 είναι αυξημένα, ενώ τα επίπεδα του SOX-9 διατηρούνται υψηλά στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και από τις κυτταροκαλλιέργειες απομονώθηκε RNA. Το RNA χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των MMP-13, του SOX-9, του RUNX2 του COL10, με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Τα χονδροκύτταρα προερχόμενα από hiPSCs παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μορίων-δεικτών της υπερτροφίας (MMP-13, κολλαγόνο X και Runx-2) σε σχέση με εκείνα των χονδροκυττάρων που προήλθαν από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του δείκτη SOX-9. Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα hiPSCs ίσως αποτελούν καλύτερη πηγή χονδροκυττάρων σε σχέση με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση των διαφορών αυτών.

## ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common type of arthritis in the modern countries and one of the one of the leading causes of disability among adults. OA basic characteristic is the gradual degradation of articular cartilage. Among the causes of OA are the gender, obesity, injuries in the area of the joints and genetic background. The degradation of articular cartilage happens due to the loss of balance of normal metabolism of the chondrocytes, the only cell type resident in the articular cartilage. As a result of this imbalance the catabolic events outnumber anabolism, through the increase of the production of MMP-13, ADAMTS-5 and similar molecules, leading to the degradation of basic components of ECM such as Collagen 2A and aggrecans followed by their replacement by others such as collagen X. It is also known that the change of phenotype of chondrocytes through transcriptional factors (eg SOX-9 and RUNX-2) and multiple signaling pathways plays a crucial role in OA.

Lately, an increasing number of scientific groups focuses on the use of stem cells for the reconstruction of articular cartilage. Stem cells are divided into two large groups: a) adult stem cells, which are multipotent and localize in several points of the human body during adult life and b) embryonic stem cells that are totipotent and can be found early in embryogenesis.

Adult stem cells can be subdivided into two categories based on their potential for differentiation, haemopoietic and mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs can give rise to osteogenic, chondrogenic and adipogenic cell lines. An important advantage is the fact that they can be easily isolated and have not been related to oncogenesis. Nevertheless their low potential for self renewal and their age-related decrease of the potential of differentiation are major drawbacks in their use for medical engineering. In embryonic stem cells, apart from the cells obtained from the blastocyst, belong also the induced pluripotent stem cells (iPSCs). These cells are generated from adult cells with the use of the injection of 2 transcriptional factors (Oct4 και Sox2) and 2 oncogenes (c-Myc and Klf-4), the adult cells are reprogrammed and finally obtain the features of embryonic stem cells having also the ability to differentiate to all cell types. iPSCs are considered to be ideal candidates for therapeutic use since they do not cause immune-reaction, can be from autologous source and are able of infinite proliferation.

According to several clinical studies it seems that the use of MSCs can indeed improve the osteoarthritic articular cartilage. The major problem is that the chondrocytes coming from MSCS

have the tendency to become hypertrophic. On the other hand, several studies have resulted in the fact that chondrocytes can be a real good source for the regeneration of the joint. The most viable solution is reprogramming adult cells to iPSCs, then to MSCs and finally to chondrocytes and not directly to chondrocytes. There has been also successful iPSCs production from cells obtained by OA patients.

In this project it has been studied the expression of MMP-13 and of COL10, of RUNX2 and of SOX-9, which are indicators of catabolism, chondrogenesis and anabolism respectively.

It is known that in hypertrophic chondrocytes, in contrast to the normal ones, the levels of MMP-13, COL10 and RUNX2 are elevated. On the contrary the levels of SOX-9 are higher in the normal chondrocytes than in the hypertrophic ones. The cells (MSCs, Chondrocytes-MSCs, iPSCs, Chondrocytes- iPSCs) have come from healthy donors (n=4) and have been cultured for one passage and then RNA was isolated, which was used for the detection of the expression levels of the following genes: MMP-13, SOX-9, RUNX-2, COL10.

According to the results of real time PCR, it seems that chondrocytes produced by iPSCs have lower expression of the hypertrophic indicators (MMP-13, RUNX-2, COL10) compared to the ones coming from MSCs. On the contrary, Chondrocytes coming from iPSCs have higher levels of SOX-9. Based on the results, the conclusion is that iPSCs are possibly a better source for chondrocytes production and it is essential to have more research towards this direction.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1. ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ

### 1.1.1. Φυσιολογική Δομή

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας εξειδικευμένος ιστός που σχηματίζει τη λεία και ολισθηρή επιφάνεια των διαρθρικών αρθρώσεων. Είναι ένας ιστός χωρίς αγγεία και με απουσία νευρών και λέμφου, ο οποίος συντίθεται από τα αραιά κατανεμημένα σε αυτόν χονδροκύτταρα, που αποτελούν και το μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό στον αρθρικό χόνδρο. Προέρχεται από τον υαλώδη χόνδρο κατά τη δημιουργία της αναπτυξιακής πλάκας και αντιπροσωπεύει το μόνο κατάλοιπο αυτής που συναντάται στην ενήλικη ζωή. (C. Anthony Poole, J. Anat. (1997) 191 pp. 1–13)

Ο χόνδρος αποτελείται από την εξωκυττάρια ουσία και από τα χονδροκύτταρα. Η εξωκυττάρια ουσία είναι ένα δίκτυο που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου 2 και σε μικρότερη ποσότητα από άλλους τύπους κολλαγόνου, με βασικότερους το κολλαγόνο τύπου IX και τύπου XI. Το κολλαγόνο τύπου VI έχει εντοπιστεί μόνο στην περικυττάρια ουσία, η οποία περιβάλλει άμεσα το χονδροκύτταρο. (Mary B. Goldring and Steven Goldring, J. Cell. Physiol. (2007) 213: 626–634)

Με βάση τη σύνθεσή του δομείται σε τέσσερα οριζόντια στρώματα: το επιφανειακό, το μεσαίο, το βαθύ και το ασβεστοποιημένο στρώμα. (C. Anthony Poole, J. Anat. (1997) 191 pp. 1–13). Το κάθε στρώμα διαφέρει από το άλλο ως προς τη σύστασή του σε κολλαγόνο τύπου II και σε πρωτεογλυκάνες, καθώς και ως προς το σχήμα και την τοποθέτηση των χονδροκυττάρων σε αυτό. Στην επιφανειακή ζώνη, οι ίνες κολλαγόνου II και IX βρίσκονται πακεταρισμένες σφιχτά και ευθυγραμμισμένες παράλληλα με την αρθρική επιφάνεια και υπάρχει μεγάλος αριθμός πεπλατυσμένων χονδροκυττάρων. Αμέσως μετά την επιφανειακή ζώνη, ακολουθεί η μεσαία ζώνη, που περιέχει πρωτεογλυκάνες και παχύτερες ίνες κολλαγόνου. Στο στρώμα αυτό το κολλαγόνο είναι οργανωμένο λοξά και τα χονδροκύτταρα είναι σφαιρικά και σε μικρότερη πυκνότητα. Η “εν τω βάθει” ή βαθειά ζώνη έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πρωτεογλυκάνες και οι ίνες κολλαγόνου έχουν μεγαλύτερο διάμετρο και είναι οργανωμένες κάθετα στην επιφάνεια της άρθρωσης και κατανεμημένες ακτινωτά. Στη ζώνη αυτή, παρατηρείται πολύ χαμηλή συγκέντρωση νερού, ενώ τα χονδροκύτταρα συναντώνται σε στήλες παράλληλα με τις ίνες κολλαγόνου και κάθετα στη γραμμή της άρθρωσης. (Alice J. Sophia Fox et al, Sports Health (2009 Nov); 1(6): 461–468 ). Ο ασβεστοποιημένος χόνδρος είναι η ενδάμεση επιφάνεια μεταξύ του μη ασβεστοποιημένου χόνδρου και του οστού και έχει μοναδική σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας, με τα χονδροκύτταρά του να εκφράζουν δείκτες υπερτροφίας και να παρουσιάζουν αγγείωση και νεύρωση προερχόμενη από το υποχόνδριο οστό, που σχετίζεται με την αύξηση της ηλικίας. (Mary B. Goldring, Ther Adv Musculoskelet Dis. 2012 August; 4(4): 269–285 ).

Ταυτόχρονα με τον οριζόντιο διαχωρισμό του αρθρικού χόνδρου υπάρχει και περιφερειακή διαφοροποίηση των συστατικών του σε περικυττάρια, τοπικό και διατοπικό στρώμα που περιβάλλει κάθε χονδροκύτταρο. Η περικυττάρια ουσία είναι εμπλουτισμένη με πρωτεογλυκάνες υαλουρονικό και μια ποικιλία γλυκοπρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων της συνδετικής πρωτεΐνης, της φιβρονεκτίνης και της λαμινίνης. Η κατανομή και οργάνωση του κολλαγόνου είναι διαφοροποιημένη μέσα σε αυτές τις τρεις ομόκεντρες υποδιαίρεσεις. Πλησιέστερα στο κύτταρο λεπτές ίνες κολλαγόνου δημιουργούν ένα σφιχτό δίκτυο, πυκνά συμπιεσμένο στο περίβλημα κάθε χονδροκυττάρου, ενώ παχύτερες ίνες στον περιφερειακό υμένα διαμορφώνουν ακτινωτές δέσμες χωρισμένες από περιοχές πλούσιες σε πρωτεογλυκάνες. Οι μεγαλύτερες ίνες κολλαγόνου κυριαρχούν στην έσω διατοπική περιοχή, όπου η συμπυκνωμένη και ακτινωτή οργάνωσή τους ορίζει τις κλασσικές “στοές κολλαγόνου”. (C. Anthony Poole, J. Anat. (1997) 191 pp. 1–13)



### **1.1.2. Αρθρικός χόνδρος στην Οστεοαρθρίτιδα**

Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο η ισορροπία της ομοιόστασης του υγιούς χόνδρου διαταράσσεται και οδηγεί στην εκδήλωση της ΟΑ. Έχει αποδειχθεί πως υφίσταται άμεση σχέση μεταξύ της βλάβης στο χόνδρο με την αυξημένη παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), όπως MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13, και αγκρεκανασών, ιδιαίτερα της ADAMTS-5. (Cawston and Wilson, 2006; Plaas et al., 2007).

Η πρωτεολυτική αποδόμηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας θέτει σε κίνδυνο τις φυσικές ιδιότητες του χόνδρου συμπεριλαμβανομένης της ελαστικότητάς του, της αντοχής στην πίεση και της δύναμης για έκταση. Δύο πρωτεΐνες “κλειδιά” που αποτελούν στόχο των ενζύμων αποδόμησης είναι το κολλαγόνο τύπου II και μια πρωτεογλυκάνη, η αγκρεκάνη, τα βασικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Το κολλαγόνο τύπου II είναι βασικό υπόστρωμα της MMP-13, ενώ η αγκρεκάνη είναι μια πρωτεογλυκάνη με αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών, που αποδομείται από τις αγκρεκανάσες της οικογένειας των ADAMTS, ADAMTS4 και 5. Μέχρι την πλήρη αποδόμηση του πρωτεογλυκανικού περιβλήματος, το δίκτυο κολλαγόνου προστατεύεται από τη δράση των

κολλαγενασών, MMP-1 και MMP-13. Όταν αρχίσει όμως η αποδόμηση του δικτύου του κολλαγόνου τότε αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη εξέλιξης της αποδόμησης του χόνδρου. (The Adv Musculoskelet Dis. 2012 August; 4(4): 269–285.)

## 1.2.ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

### 1.2.1. Λειτουργία των χονδροκυττάρων και δομή

Τα χονδροκύτταρα είναι ο μοναδικός τύπος κυττάρων στον αρθρικό χόνδρο, τα οποία παράγουν και διατηρούν την εξωκυττάρια ουσία. Τα χονδροκύτταρα είναι κύτταρα πλήρως διαφοροποιημένα και έχουν ενεργό και κεντρικό ρόλο στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση καθορίζοντας το ρυθμό της ανάπτυξης του οστού. (TheLinh T. T. Le et al. ARTHRITIS & RHEUMATISM, (August 2013) Vol. 65, No. 8, , pp 1963–1974)

Τα χονδροκύτταρα στον αρθρικό χόνδρο βρίσκονται σε ένα δυναμικό και πολύπλοκο περιβάλλον που δημιουργείται ως αποτέλεσμα συμπίεσης, διατμητικής τάσης, υδροστατικής πίεσης, ωσμωτικής πίεσης και έντονης έκτασης. Η βασική λειτουργία του ιστού, δηλαδή η αντοχή στην πίεση οφείλεται στην εξωκυττάρια ουσία (ECM). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα χονδροκύτταρα, βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας και βασική τους λειτουργία είναι να διατηρούν σε φυσιολογικά επίπεδα την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. (Cheng Chen et al., American Journal of Physiology - Cell Physiology(2013), Vol. 305 no. 12)

Η σύνθεση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας στις διάφορες ζώνες του αρθρικού χόνδρου ελέγχεται από παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες, αλλά και από το μικροπεριβάλλον της εξωκυττάριας ουσίας. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν οι PTHrp, TGFβ οικογένεια. Indian hedgehog, FGFs και οι Wnts και απορρύθμιση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή του φυσιολογικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων, με επακόλουθο το σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

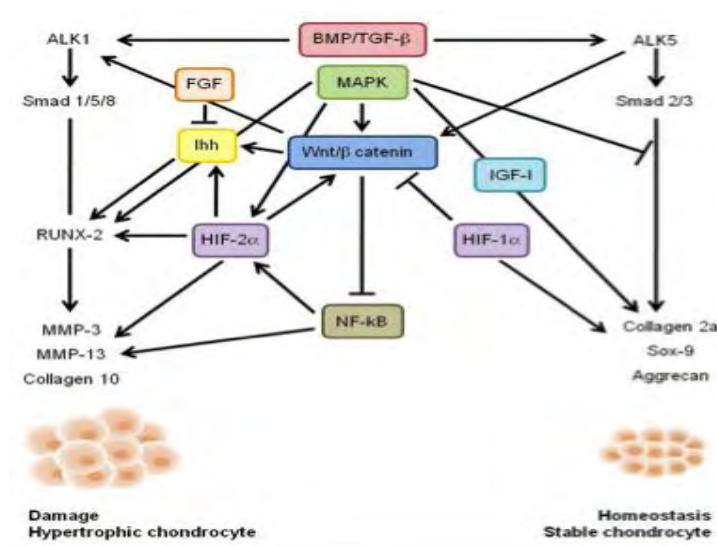
Σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης των παραγόντων οι οποίοι διατηρούν τον φυσιολογικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SOX9. Κατά το σχηματισμό του αρθρικού χόνδρου, ο μεταγραφικός παράγοντας SOX9 έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης και είναι απαραίτητος για τη δημιουργία συσσωματωμάτων και για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Στα αρχικά στάδια της χονδρογένεσης, ο SOX9 αλληλεπιδρώντας

άμεσα με τους SOX5 και SOX6, ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων χαρακτηριστικών της ECM του αρθρικού χόνδρου, όπως των COL2A1, ACAN, και COMP, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες χαρακτηριστικές της εξωκυττάριας ουσίας και του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων στον αρθρικό χόνδρο. (Yokoyama, et al, ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY (2015), Vol. 67., pp 302–314)

Παράλληλα με την ενεργοποίηση γονιδίων που διατηρούν το φυσιολογικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων, ο Sox9 καταστέλλει άμεσα την έκφραση του Col10a1. (Alice Jo et al, Genes Dis. (2014), 1(2):149-161).

Με δεδομένο ότι η χονδρογένεση περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα διαδικασία κατά την οποία καταλυτικό ρόλο παίζουν τα miRNAs, μια σειρά μελετών κάποιες έρευνες προσανατολίστηκαν στην ταυτοποίηση ύπαρξης miRNAs τα οποία συμμετέχουν στη διαδικασία της χονδρογένεσης. Το miR-140 είναι θετικός ρυθμιστής της χονδρογένεσης κατά την κρανιοεγκεφαλική ανάπτυξη και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση σε ποντικούς μέσω καταστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών του HDAC4 και του BMP, τα οποία συνεισφέρουν και στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων από τα MSCs μπορεί να ρυθμιστεί αρνητικά από τα miR-449, το οποίο έχει ως στόχο τον LEF-1, που είναι βασικός μεταγραφικός παράγοντας του Wnt-μονοπατιού. Στα MSCs που παρατηρείται αναστολή του LEF-1 από το miR-449, παρατηρείται επίσης μειωμένη έκφραση δεικτών χαρακτηριστικών των χονδροκυττάρων, όπως το Col2a1 και το SOX-9, και μείωση της παραγωγής πρωτεογλυκανών. Συνεπώς, είναι πιθανή η ενίσχυση της χονδρογένεσης με τη καταστολή του miR-449 στα κύτταρα στόχο, στοιχείο που αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης. Σε μια άλλη έρευνα αναφέρθηκε πως η μείωση του miR-29a είναι απαραίτητη για την επιτυχή διαφοροποίηση των MSCs σε χονδροκύτταρα. (S.-G. Ong, et al., Adv. Drug Deliv. Rev. (2015))

## 1.2.2. Υπερτροφικός φαινότυπος



Εικόνα 2 (Signaling pathways in Cartilage repair)

Κατά τη γήρανση, στις εκφυλιστικές ασθένειες της άρθρωσης και στους τραυματισμούς του χόνδρου η ομοιοστασία διαταράσσεται και ενεργοποιούνται τα καταβολικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ένα καθολικό ορόσημο του εκφυλισμένου χόνδρου είναι η αλλαγή στη κατάσταση διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, όπου ο φαινότυπος των χονδροκυττάρων μετατρέπεται σε υπερτροφικό, προσομοιάζοντας τα γεγονότα που συμβαίνουν στην αυξητική πλάκα κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. (Erminia Mariani et al., Int J Mol Sci. May 2014; 15(5): 8667–8698.)

Τα χονδροκύτταρα από ασθενείς με ΟΑ παρουσιάζουν “φαινοτυπική πλαστικότητα” παρόμοια με αυτή των μεσεγχυματικών κυττάρων που υπόκεινται χονδρογένεση επαναφέροντας χαρακτηριστικά της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων (Mary B. Goldring, Ther Adv Musculoskelet Dis. 2012 August; 4(4): 269–285 ).

Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το σχηματισμό συσσωματωμάτων και αυξημένη παραγωγή τόσο πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όσο και πρωτεϊνών που την αποδομούν. Χαρακτηρίζονται αφενός από την έκφραση τελικών δεικτών διαφοροποίησης σε υπερτροφικά, όπως ο Runx-σχετιζόμενος μεταγραφικός παράγοντας 2 (RUNX-2) και το κολλαγόνο X και αφετέρου από την έκφραση καταβολικών μορίων που προκαλούν αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η MMP-13. Ταυτόχρονα ο προστατευτικός μηχανισμός του χόνδρου, με τη συμμετοχή του Dickkopf (Dkk-1) που καταστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του Wnt, μειώνει την έκφραση γονιδίων σχετικών με τον υπερτροφικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων.

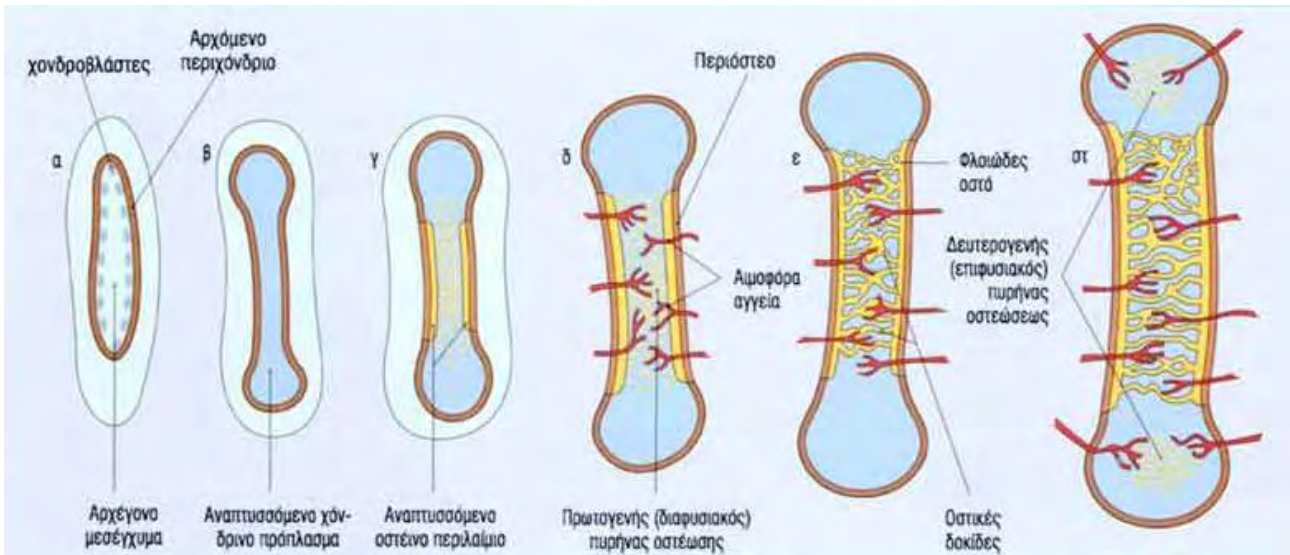
Η τύχη των χονδροκυττάρων, που παραμένουν στον χόνδρο ή υποβάλλονται σε ωρίμανση προς



υπερτροφικά πριν την οστεοποίηση, καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών των FGF, TGF-β, BMP και Wnt. Συγκεκριμένα, η σηματοδότηση του FGF επιταχύνει την τελική υπερτροφική διαφοροποίηση, ενώ οι BMPs φαίνεται πως αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στη διαδικασία. Για το λόγο αυτό η σηματοδότηση των FGF και BMP δρα ανταγωνιστικά και ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του Ihh. Η έκφραση του Wnt/β-catenin ρυθμίζει αρνητικά τον NF-β, ενώ αντίθετα το κανονικό μονοπάτι του Wnt οδηγεί στη σηματοδότηση των TGF-β/BMP προς τα Alk1, Smad 1-5-8. Το μονοπάτι Wnt/β-catenin αλληλεπιδρά με τη σηματοδότηση του Ihh και όλα αυτά τα μονοπάτια συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του RUNX-2 και στην έκφραση του καθοδικών γονιδίων στόχων (MMP13, MMP3, and Collagen X), προωθώντας τον υπερτροφικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων. Πολλές έρευνες ταυτοποίησαν πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια της ECM και μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων όπως τα GDF-5, asporin, secreted frizzled-related protein 3, deiodinase 2, Smad3 και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των TGFβ, BMP και Wnt. Επίσης, επιγενετικοί μηχανισμοί όπως μεθυλίωση του DNA, αλλαγές στη διαμόρφωση των ιστονών και στη δομή της χρωματίνης, αλλά και microRNAs φαίνεται να παίζουν κύριο ρόλο στη διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων στον ΟΑ χόνδρο (Erminia Mariani et al., Int J Mol Sci. (2014); 15(5): 8667–8698)

### **1.2.3 Ενδοχόνδρια Οστεοποίηση**

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που πραγματοποιείται στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, αρχίζοντας στο δεύτερο μήνα και με την οποία σχηματίζονται όλα τα οστά κάτω από τη βάση του κρανίου, με το οστό να αναπτύσσεται από τον υαλώδη χόνδρο. Η διαδικασία ξεκινά με το σχηματισμό του οστικού κολάρου γύρω από την διάφυση από οστεοβλάστες που βρίσκονται εσωτερικά του περιόστεου και αποτελούν το πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης. Στη συνέχεια ο χόνδρος ασβεστοποιείται στα πρωτογενή κέντρα οστεοποίησης, όπου με την απόπτωση των κυττάρων σχηματίζονται κοιλότητες οι οποίες προσφέρουν στην κατασκευή σταθερότητα, ενώ σε άλλα σημεία ο χόνδρος αυξάνεται. Ακολούθως σχηματίζεται σπογγώδες οστό στις κοιλότητες όπου πραγματοποιείται περιοστικός ενοφθαλμισμός με εισβολή αγγείων, νεύρων, λεμφοκυττάρων. Στο επόμενο στάδιο παρατηρείται ο σχηματισμός της κοιλότητας του μυελού των οστών και παράλληλα στις επιφύσεις δημιουργούνται τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με το σχηματισμό σπογγώδους οστού στα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης αφήνοντας στο τέλος μόνο ένα μικρό κομμάτι υαλώδους χόνδρου στο σημείο όπου βρίσκεται ο αρθρικός χόνδρος και στη επιφυσιακή πλάκα. (Αρχές



Η ωρίμανση των χονδροκυττάρων στην εμβρυική αυξητική πλάκα σχηματίζει διαφορετικές ζώνες πολλαπλασιασμού, υπερτροφίας και σχηματισμού οστού με διάταξη από την επίφυση προς την διάφυση. Η διαρκής προώθηση των κυττάρων από τη μία ζώνη στην άλλη οδηγεί στην αντικατάσταση της αυξητικής πλάκας και στην επιμήκη αύξηση του κάθε οστού. (Fanxin Long and David M.Ornitz, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Jan; 5).

Στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών καθορίζουν το φαινότυπο των χονδροκυττάρων. Μετά το σχηματισμό του πρωτογενούς χόνδρου, τα χονδροκύτταρά του πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό, ώστε να αναπτυχθούν όλα τα τμήματα του σκελετού, και σταδιακά ωριμάζουν. Ακολουθεί η έξοδός τους από τον κυτταρικό κύκλο, η απόκτηση του υπερτροφικού φαινοτύπου συνοδευόμενη από την έκφραση μορίων δεικτών όπως το κολλαγόνο X (Poole 1991) και η MMP13, και τέλος η απόπτωσή τους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν στην οστεϊκή κοιλότητα εισβάλλουν αγγεία και νεύρα και τα έσω κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες που εκκρίνουν τα απαραίτητα μόρια για το σχηματισμό του οστικού κολλάρου. (Caplan and Pechak 1987).



## **1.3.ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ**

### **1.3.1. Γενικά**

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός που λόγω της περιορισμένης ικανότητας επιδιόρθωσης του πολλές έρευνες έχουν στραφεί στην αναζήτηση πηγών για την ανάπλασή του. Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν μια ελκυστική εναλλακτική μεθοδο για θεραπεία σε εκφυλιστικές ασθένειες του χόνδρου, όπως η οστεοαρθρίτιδα, εξαιτίας την σχετικής αφθονίας τους και της ικανότητας τους για διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα (χονδρογένεση). (Olivia S. Beane<sup>1</sup> and Eric M. Darling, *Ann Biomed Eng.* 2012 Oct; 40(10): 2079–2097.) Τα βλαστοκύτταρα με βάση το δυναμικό διαφοροποίησής τους διακρίνονται σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα, που είναι ολοδύναμα, και σε ενήλικα βλαστοκύτταρα, που είναι πολυδύναμα. Μια κατηγορία ακόμη, που ουσιαστικά αποτελεί υποκατηγορία των ενήλικων βλαστοκυττάρων είναι τα βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από το έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης και κατά τον τοκετό. Τέλος, τα πιο πρόσφατα βλαστοκύτταρα, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs), που παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, κατατάσσονται στην ίδια κατηγορία με αυτά.

### **1.3.2. Ενήλικα βλαστοκύτταρα**

Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα αποτελούν κυτταρική πηγή για την ανάπλαση του χόνδρου, λόγω της πολυδυναμικότητάς του, της ευκολίας απομόνωσης τους και της δυνατότητας για αυτόλογη μεταμόσχευση, η οποία και απαλείφει τον κίνδυνο απόρριψης του μοσχεύματος. Συγκρινόμενα με άλλες πηγές όπως τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα ή τα επαγόμενα, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, ενώ σημαντικό μειονέκτημά τους είναι το γεγονός ότι με την αύξηση της ηλικίας παρατηρείται μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους και του δυναμικού διαφοροποίησής τους. Επιπρόσθετα σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν εμφανίσει παρόμοια χαρακτηριστικά εκφυλισμού με τους νοσούντες ασθενείς από τους οποίους προήλθαν.(Olivia S. Beane<sup>1</sup> and Eric M. Darling, *Ann Biomed Eng.* 2012 Oct; 40(10): 2079–2097.)

Τα ενήλικα βλαστικά διακρίνονται σε 2 βασικές κατηγορίες, στα αιμοποιητικά και στα μεσεγχυματικά, όπου τα πρώτα διαφοροποιούνται προς κύτταρα του αιμοποιητικού και τα δεύτερα που χαρακτηρίζονται από την απουσία αιμοποιητικών δεικτών (MSCs). Πρώτη φορά περιγράφηκαν από τον Fridenstein το 1976, ως κύτταρα κλωνικά, που προσκολλώνται σε πλαστικό και ως πηγή για το σχηματισμό οστεοβλαστών, λιποκυττάρων και χονδροκυττάρων.

Τα MSCs μπορούν να απομονωθούν από πολλά σημεία από το ανθρώπινο σώμα και ανάλογα με το σημείο απομόνωσης τους έχουν και διαφορετικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν περισσότερο ή λιγότερο κατάλληλα για την ανάπλαση του χόνδρου. Υπάρχουν MSCs προερχόμενα από το μυελό των οστών (BMSCs), από το λιπώδη ιστό (ASCs), από το αρθρικό υγρό (SDSCs) και μυϊκής προέλευσης (MDSCs). Τα ASCs είναι άμεσα διαθέσιμα στο λιπώδη ιστό, απομονώνονται εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα και παρουσιάζουν κάποιους δείκτες διαφορετικούς σε σχέση με τα BMSCs. Από την άλλη τα SDSCs υπερέχουν σε επίπεδο χονδρογενετικής ικανότητας και ικανότητας πολλαπλασιασμού σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους, ενώ τέλος τα PBMSCs απαντώνται σε πολύ μικρή ποσότητα στον αρθρικό πληθυσμό.

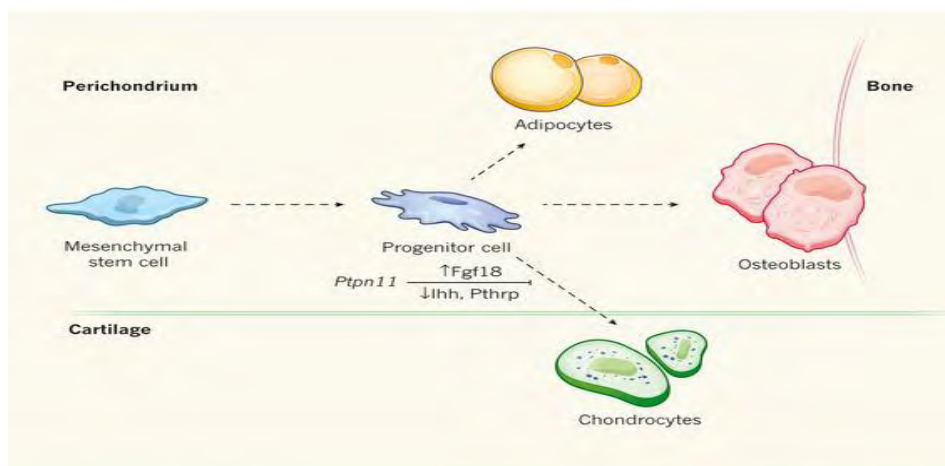
Στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα ανήκουν επίσης τα εμβρυικά που προέρχονται από το αίμα του ομφάλιου λώρου (Wharton's jelly), τις χοριακές λάχνες του πλακούντα (PMSCs), το αμνιακό υγρό (AFSCs), το εμβρυϊκό ήπαρ, τον πνεύμονα και τα νεόγυλα δόντια. (Sylwia Bobis et al., *Folia Histochemica at Cytobiologica*, Vol 44, No4, 2006 pp 216-130 ). Τα Wharton's jelly βλαστοκύτταρα, παρόλο που εμφανίζουν αξιοσημείωτη παραγωγή μορίων της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου, υπάρχουν σε μικρές ποσότητες, ενώ η μελέτη των AFSCs βρίσκεται ακόμα σε πολύ πρώιμα στάδια. Τέλος σε ότι αφορά στα PMSCs, έχει δειχθεί έως τώρα μόνο η ικανότητά τους για χονδρογενετική διαφοροποίηση. (Olivia S. Beane1 and Eric M. Darling, *Ann Biomed Eng.* 2012 Oct; 40(10): 2079–2097.)

### ***1.3.3. Μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών και χονδρογενετική διαφοροποίηση***

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από το μυελό των οστών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς και ενώ παλιότερα υπήρχε η υπόθεση ότι ανακύπτει μονοκλωνικός πληθυσμός από ένα κύτταρο, με κοινό φαινότυπο, πιο πρόσφατα καταγράφηκε η ύπαρξη δυο πληθυσμών, τα μικρά με ταχύτερη αυτοανανέωση και τα μεγάλα με μικρότερο ρυθμό αυτοανανέωσης. Ένας τρίτος πληθυσμός περιγράφηκε, ο οποίος αποτελείται από μικρά, γρήγορης αυτοανανέωσης κύτταρα με τη μεγαλύτερη δυναμική διαφοροποίησης. (Sylwia Bobis et al., *Folia Histochemica at Cytobiologica*, Vol 44, No4, 2006 pp 216-130 ).

Αρκετές έρευνες εστιάζουν στην επαγωγή της χονδρογένεσης από τα κύτταρα αυτά και στην απαλοιφή των προαναφερθέντων μειονεκτημάτων των MSCs γεγονός που έχει οδηγήσει σε συνεχή αλλαγή και βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας και του συνδυασμού παραγόντων που

χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση τους.



Συνοψίζοντας, τα BM-MSCs είναι καλά χαρακτηρισμένα κύτταρα, έχουν μορφολογία ιστοειδική και ο κίνδυνος εμφάνισης τερατώματος είναι πολύ χαμηλός. Η απομόνωση και καλλιέργειά τους είναι σχετικά εύκολη, δεν προκαλούν συχνά ανοσοαπόκριση και μπορούν να προέλθουν από τον ίδιο τον ασθενή. Όμως, εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα και περιορισμούς στη χρήση τους, όπως είναι η μικρή δυνατότητα πολλαπλασιασμού, η περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης, η ιστοειδικότητα, τα χαμηλά επίπεδα τελομεράσης, η πρόωρη απόπτωση, η πρόκληση σε κάποιες περιπτώσεις ανοσοαπόκρισης και τέλος η ετερογένεια του πληθυσμού, που περιγράφηκε προηγουμένως. (Ewelina Augustyniak et al., Stem Cells International Volume 2013 (2013))

Στηριζόμενες στα πλεονεκτήματα των BM-MSCs πολλές έρευνες προσανατολίζονται στην εύρεση θεραπείας βασισμένης στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Οι Murphy et al. πρότειναν τη ενδοαρθρική εισαγωγή MSCs ως θεραπεία σε ένα μοντέλο ζώων OA. Η OA προκλήθηκε με έσω μηνισκεκτομή και πρότερη διατομή προσθίου χιαστού συνδέσμου (ACLT) για 6 εβδομάδες και εισήχθησαν BM-MSCs με υαλουρονικό νάτριο. Είκοσι εβδομάδες μετά την εισαγωγή ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, ο σχηματισμός οστεοφύτων και η πάχυνση του υποχόνδριου οστού μειώθηκε στις αρθρώσεις που υποβλήθηκαν σε θεραπεία. Σε παρόμοια διαδικασία έγχυσης αυτόλογων BM-MSCs σε μοντέλο κουνελιού, στο οποίο είχε προκληθεί OA με ACLT, τρεις έως έξι μήνες μετά την έγχυση, παρατηρήθηκε σημαντική αναγέννηση του χόνδρου. Στις αρθρώσεις που χορηγήθηκαν BM-MSCs αυξήθηκε η έκφραση του κολλαγόνου τύπου II και ταυτόχρονα

παρατηρήθηκαν μειωμένα τα ένζυμα αποδόμησης του χόνδρου, όπως οι MMP-1 και MMP-3. (Grigolo B. et al., *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, 15: 647–658). Οι επιτυχημένες προκλινικές δοκιμές οδήγησαν στην έναρξη πολλών κλινικών δοκιμών με αυτόλογη μεταμόσχευση BM-MSCs.

Τα υπάρχοντα στοιχεία υποδεικνύουν πως τα hMSCs επιδιορθώνουν τον τραυματισμένο χόνδρο μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του Indian hedgehog (Horie M et al., *Osteoarthr Cartilage*, 2012, 20: 1197–1207). Σε MSCs από φυσιολογικό χόνδρο και χόνδρο με OA εντοπίστηκε εκτός από το Ihh, η έκφραση του Notch-1. (Hiraoka K et al., *Biorheology*, 2006, 43: 447–454). Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η σηματοδότηση του Notch υπερεκφράζεται κατά την εξέλιξη της OA και ότι η θεραπεία με φυσιολογικά MSCs μειώνει την έκφραση στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch. Πιο πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν πως σε μοντέλα ζώων η ενδοαρθρική ένεση μειώνει τη διάβρωση του αρθρικού χόνδρου αναστέλλοντας την έκφραση των MMP-13, TNF-β, and IL-1β. (Sato M. et al, *Arthritis Res Ther*, 2012, 14: R31, // Desando G et al., *Arthritis Res Ther*, 2013). Με βάση τις παραπάνω έρευνες οι Wang W, et al. οδηγούνται στο συμπέρασμα πως εφόσον τα MMP-13, TNF-β, and IL-1β σχετίζονται με τη σηματοδότηση των Wnt /β-catenin, MAPK, και BMP, τα μονοπάτια αυτά καθορίζουν τις επιπτώσεις της θεραπείας με MSC στην OA. (Wang W, et al., *Sci China Life Sci*, June (2014) Vol.57 No.6). Τα προβλήματα που προέκυψαν από την μεταμόσχευση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων αφορούν στην κακή ποιότητα του χόνδρου (ινώδης) που δημιουργήθηκε μετά τη μεταμόσχευση και στην πιθανότητα οστεοποίησης του αρθρικού χόνδρου. Ο βασικότερος όμως περιορισμός στη χρήση χονδροκυττάρων προερχόμενων από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι η διαφοροποίησή τους του φαινοτύπου τους προς τον παθολογικό υπερτροφικό φαινότυπο. (Catherine Baugé, Karim Boumediene, *Stem Cells Int*. 2015; 2015: 438026)

#### **1.4. Εμβρυικά και Επαγόμενα βλαστοκύτταρα**

Ολοδύναμο θεωρείται ένα κύτταρο όταν μπορεί να παράγει όλα τα κύτταρα ενός ζωντανού οργανισμού. Τα κύτταρα που έχουν αυτο το χαρακτηριστικό, τα βλαστοκύτταρα, αποτελούν θέμα μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος τόσο για την κατανόηση των αναπτυξιακών μηχανισμών, όσο και για την θεραπευτική δυναμική τους. Αυτό είναι και το βασικό χαρακτηριστικό της δεύτερης μεγάλης κατηγορίας βλαστοκυττάρων στην οποία ανήκουν τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs) και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs).

### **1.4.1. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα**

Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα απομονώνονται από την εσω μάζα της βλαστοκύστης και μπορούν να καλλιεργηθούν *αέναα* ως ολοδύναμα κύτταρα και να διαφοροποιηθούν προς όλους κυτταρικούς τύπους. Από τη δυνατότητα τους να διαφοροποιηθούν προς τα τρία αρχικά στρώματα, ενδόδερμα, μεσόδερμα και εκτόδερμα, μπορεί να προκύψουν περισσότεροι από 220 διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι ενήλικων κυττάρων. Η χρησιμοποίησή τους στην αναγεννητική ιατρική όμως, παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν, είναι αντικείμενο αντιπαράθεσης, καθώς από τη μία υπάρχει το ενδεχόμενο ανοσοδιέγερσης και σχηματισμού τερατωμάτων και από την άλλη δημιουργείται ηθικό ζήτημα που αφορά στη δημιουργία εμβρύων με αποκλειστικό σκοπό την απομόνωση των ESCs. (S.-G. Ong, et al., MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2015))

### **1.4.2. Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells)**

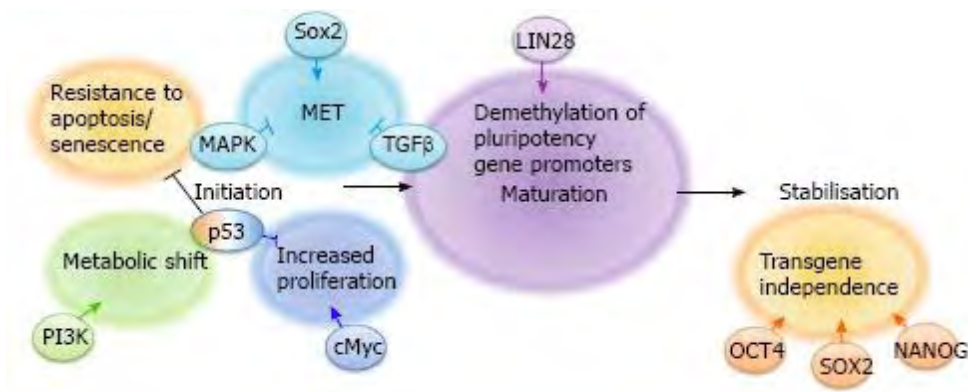
Στα τέλη του 1990 οι Wilmut et al. μετέφεραν τον πυρήνα ενός κυττάρου, από μια εμβρυϊκή κυτταρική σειρά, σε ενήλικα σωματικά κύτταρα αρνιού, παράγοντας έτσι έναν βιώσιμο απόγονο. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα ο Takahashi, μια δεκαετία αργότερα, ερεύνησε παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επάγουν αυτό το φαινόμενο. Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται, γνωστοί και ως “Yamanaka factors” (παράγοντες OSKM), *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *cMyc* εκφράστηκαν με τη χρήση ρετροϊών που ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα ινοβλαστών αρχικά ποντικών. Δημιούργησε επιτυχώς πολυδύναμα κύτταρα από εμβρυϊκούς και ενήλικους ινοβλάστες ποντικού, τα οποία ονομάστηκαν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. (iPSCs). Μετέπειτα, ο Yu et al αναπαρήγαγε αυτά τα αποτελέσματα σε ινοβλάστες ανθρώπου και ήταν ο πρώτος που ανέφερε την πολυδυναμικότητα στα κύτταρα, που είχαν επαναπρογραμματιστεί να εκφράζουν OCT4, SOX2, NANOG και LIN28. Η μέθοδος είχε χαμηλό ρυθμό επιτυχίας και οδήγησε στην εξερεύνηση νέων επιλογών όπως η χρήση microRNAs και η δημιουργία νέων φορέων. Τα iPS κύτταρα έχουν πλέον κατασκευαστεί και με τη χρήση επισωματικών πλσμιδίων, ιών Sendai και piggyBac τρανσποζονίων, που μεταφέρουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού και ακόμα και πρωτεΐνες ή άλλα μόρια.

Τόσο στα επαγόμενα, όσο και στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού κυριαρχεί και ρυθμίζει την πολυδυναμικότητα ένα “κύκλωμα-πυρήνας” των μεταγραφικών παραγόντων *Oct4*, *Sox2* and *Nanog*. Οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται *in vivo* στην έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (ICM) και *in vitro*, σε ολοδύναμα κύτταρα και αλληλεπιδρούν στενά μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα, οι *fOct4* και *Sox2* αποδείχθηκε ότι σχηματίζουν ετεροδιμερές σύμπλοκο μεταγραφής και όλοι οι τρεις παράγοντες έχουν κοινά γονίδια στόχους. Το “κύκλωμα-πυρήνας” είναι αυτορρυθμιζόμενο, καθώς και οι τρεις παράγοντες φαίνεται πως ρυθμίζουν ο ένας την έκφραση του άλλου, αλλά και ο καθένας τη δική του. Η διατήρηση της εύθραυστης κατάστασης ολοδυναμικότητας διασφαλίζεται μέσω του πολύπλοκου μηχανισμού της δοσοεξάρτησης μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων και προκαλεί έκπληξη πως η συνέκφραση τεσσάρων μόνο παραγόντων σε σωματικά κύτταρα τα επάγει σε ολοδύναμα βλαστοκύτταρα. (Loh YH et al., Nat Genet. 2006;38:431–440)

Παράγοντες επαναπρογραμματισμού	Human/mouse	Ref.
Oct 4	Human/Mouse	Takahashi et al
Sox-9	Human/Mouse	Takahashi et al
c-Myc	Human/Mouse	Takahashi et al
Klf4	Human/Mouse	Takahashi et al
Nanog	Human	Yu et al
Esrrb	Mouse	Feng et al
Glis1	Human/Mouse	Maekawa et al
E-cadherin	Mouse	Redmaer et al
shp53	Human/Mouse	Hanna et al
Lin28	Human/Mouse	Hanna et al
UTX	Human/Mouse	Mansour et al

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό των iPS κυττάρων και έχει γίνει αποδεκτό το μοντέλο των Samavarchi-Tehrani et al, σύμφωνα με το οποίο ο επαναπρογραμματισμός αποτελείται από 3 φάσεις: την έναρξη, την ωρίμανση και τη σταθεροποίηση. Κατά τη μετατροπή των κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα σημειώνονται πολλές αλλαγές, όχι μόνο στον κυτταρικό φαινότυπο,

αλλά και στην έκφραση γονιδίων και μη κωδικών μορίων RNA, στην επιγενετική κατάσταση και στο μεταβολισμό.



Η φάση της έναρξης περιλαμβάνει επιτυχώς όλο τον κυτταρικό πληθυσμό και χαρακτηρίζεται από απενεργοποίηση σωματικών γονιδίων μέσω μεθυλίωσης, αύξηση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενεργοποίηση της γλυκόλυσης και απενεργοποίηση της μεταβολικής διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, επανενεργοποίηση της τελομεράσης και μεσεγχυματο-επιθηλιακή μετάβαση (MET). Η MET χαρακτηρίζεται από την απώλεια των μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών και την απόκτηση επιθηλιακών χαρακτηριστικών, όπως η πολικότητα των κυττάρων και η έκφραση του μορίου προσκόλλησης E-CADHERIN, εξηγώντας και γιατί θα μπορούσε η E-CADHERIN να αντικαταστήσει τον Oct4 στη διαδικασία επαναπρογραμματισμού. Η MET και η EMT αποτελούν σημεία κλειδιά στην εμβρυογένεση, την μετάσταση και τη διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.

Οι Tanabe et al ταυτοποίησαν πρόσφατα το στάδιο ωρίμανσης του επαναπρογραμματισμού των iPS ως το σημείο στο οποίο πιθανόν να οφείλεται η χαμηλή επιτυχία της διαδικασίας. Απέδειξαν ότι ο LIN28, αλλά όχι οι NANOG, shp53 ή η CYCLIN D1, προάγουν την ωρίμανση των iPS κυττάρων. Κατά την ωρίμανση οι επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν επιτρέπουν την έκφραση των πρώτων γονιδίων σχετιζόμενων με την ολοδυναμικότητα. Σ' αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια Fbxo15, Sall4, Oct4, Nanog and Esrrb, με το Esrrb να επαρκεί για τον επαναπρογραμματισμό των MEFs σε συνεργασία με τα Sox2 και Oct4.

Στο τελικό στάδιο της σταθεροποίησης μόνο το 1% των αρχικών κυττάρων καταλήγει με επιτυχία και αυτό μπορεί να εξηγηθεί μέσω της παρατήρησης των Golipour et al, ότι δεν είναι όλα τα κύτταρα επαρκή για σταθεροποίηση. Η ομάδα των Golipour et al αναγνώρισε ένα χαρακτηριστικό γονιδιακό προφίλ των κυττάρων που μπαίνουν στο τρίτο στάδιο και το οποίο τα διακρίνει από όσα δεν τα καταφέρνουν, ενώ παράλληλα έδειξε ότι τα υπόλοιπα κύτταρα χρειάζονται διαγονιδιακή

καταστολή για να εισέλθουν στα τελικό αυτό στάδιο. Το στάδιο σταθεροποίησης χαρακτηρίζεται από διαγονιδιακή ανεξαρτησία, καθώς μόνο κύτταρα με ενεργή ενδογενή έκφραση γονιδίων ολοδυναμικότητας μπορούν να διατηρήσουν την ολοδυναμικότητα σε αυτή την μεταγενέστερη φάση. Η έκφραση των γονιδίων αυτών επιτυγχάνεται με απομεθυλίωση των υποκινητών τους. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί πολλοί καταστολείς μεθυλοτρανφερασών DNA και ιστονών επιταχύνουν τον επαναπρογραμματισμό των iPS .

Ορισμένες ερευνητικές ομάδες με βάση τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στα 3 αυτά στάδια προτείνουν την ύπαρξη φάσματος ολοδυναμικότητας. Με βάση αυτή τη θεωρία, ο ενδεδειγμένος έλεγχος και η μελέτη των διαφορετικών σταδίων του επαναπρογραμματισμού, μπορεί να διευκάνει τα μονοπάτια που συμμετέχουν και που ενεργοποιούνται σε κάθε στιγμή. Ένα προτεινόμενο μοντέλο από τους Hawkins et al με βάση όσα γνωρίζουμε ως τώρα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

(Hawkins K et al, CMB. (2014))

Πρόσφατα έγιναν μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή των μικρών RNAs (miRNAs) στη διαδικασία της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των ESCs και iPSCs. Αποτελέσματα από μεταλλαγές στα Dicer και Dgcr-8, τα οποία είναι σημαντικά ένζυμα για την ωρίμανση των miRNAs, υποδεικνύουν ότι ενέχουν σημαντικό ρόλο τόσο στη διαφοροποίηση όσο και στην αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων.

Τα iPSCs είναι παρόμοια αλλά όχι ταυτόσημα με τα ESCs μιας και παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης miR. Με δεδομένο ότι οι σύγχρονες τεχνικές κατασκευής των iPSCs είναι έως



ένα βαθμό ανεπαρκείς έχουν προταθεί εναλλακτικές για τη παρασκευή τους μεταξύ των οποίων είναι και η χρήση των miRs. Εφόσον στα ESCs η υπερ-οικογένεια των miRs-290 παρουσιάζεται “εμπλουτισμένη”, δοκιμάστηκε ο συνδυασμός των παραγόντων OSK με την υπερέκφραση των miR-291—3p, miR-294 και 295 και παρατηρήθηκε αύξηση της αποτελεσματικότητας του επαναπρογραμματισμού της τάξης του 75% σε σχέση με τον επαναπρογραμματισμό μόνο με τους OSK. Επίσης, η αύξηση της έκφρασης των miR-106 και miR-93 ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού μέσω επίδρασης στη μεσεγχυματο-επιθηλιακή μετάβαση, εξαιτίας της επίδρασής τους στον υποδοχέα II του TGF-β. Από την άλλη η μείωση της έκφρασης κάποιων miRs που είναι ιστοειδικά μπορεί να συνεισφέρει στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Για παράδειγμα η διαγραφή των miR-21 και -29a, που είναι από τα πιο συχνά στα MEFs, ενισχύει την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού μειώνοντας την έκφραση του p53. (S.-G. Ong, et al, Adv. Drug Deliv. Rev. (2015))

#### **1.4.2.1.iPSCs και MSCs**

Τα ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (BM-MSCs) έχουν απομονωθεί και έχουν χρησιμοποιηθεί ως αυτόλογες πηγές για την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου [Chen and Tuan, 2008]. Η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό και χονδρογένεση όμως δεν είναι επαρκής καθώς σύμφωνα με in vitro μελέτες και με μελέτες σε μοντέλα ζώων η δυνατότητά τους για διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλικία του δότη, γεγονός που αποτελεί σημαντικό περιορισμό στη χρήση τους [Baxter et al., 2004; Sethe et al., 2006; Steinert et al., 2007; Stolzing et al., 2008]. Η δημιουργία BM-MSCs προερχόμενων από iPSCs αποτέλεσε μια νέα προοπτική προς τη κατεύθυνση της αναγέννησης του χόνδρου. Σε πρόσφατες μελέτες, συγκρίθηκε το δυναμικό χονδρογένεσης μεταξύ MSCs προερχόμενων από iPSCs και iPSCs και τα αποτελέσματα αναδεικνύουν καλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης για τα MSCs-iPSCs. Συγκρινόμενα με τα iPSCs, τόσο τα MSCs-iPSCs, όσο και τα BM-MSCs, παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση του Sox9, ενώ ο ανοσοφαινότυπος των iPSC-MSC κυττάρων παρουσίαζε μεγάλη ομοιότητα με τον ανοσοφαινότυπο των BM-MSCs. Ο βαθμός διαφοροποίησης (“ωρίμανσης”) των χονδροκυττάρων και η ετερογένεια του πληθυσμού που προκύπτει από την καλλιέργεια των iPSC, μπορεί να περιοριστεί με το ενδιάμεσο στάδιο των μεσεγχυματικών κυττάρων. (Rosa M. Guzzo et al., Journal of Cellular Biochemistry 114:480–490 (2013))

### **1.4.2.2. Μετατροπή των iPSCs σε χονδροκύτταρα**

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των iPSCs, έγινε εφικτή η διαφοροποίηση iPSCs προερχόμενων από ασθενείς προς πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των καρδιομυοκυττάρων, νευρώνων και ηπατοκυττάρων.

Τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν επίσης σε χονδροκύτταρα και οι μέθοδοι με τις οποίες γίνεται αυτό μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες, καθεμία από τις οποίες παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα έναντι της άλλης. Οι μέθοδοι αυτές είναι:

1) Συν-καλλιέργεια iPSCs με χονδροκύτταρα. Τα χονδροκύτταρα εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες οι οποίοι επάγουν τη διαφοροποίηση των iPSCs σε χονδροκύτταρα. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ποικίλει ανάλογα με τα αρχικά χονδροκύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί.

2) Προετοιμασία εμβρυονικών σωματιδίων ακολουθούμενη από τη διαφοροποίηση των μεσοδερμικών κυττάρων στα σωματίδια σε χονδροκύτταρα μέσω επίδρασης με αυξητικούς παράγοντες. Βασικό μειονέκτημα είναι ο μικρός αριθμός των κυττάρων που προκύπτουν.

3) Επαγωγή μεσεγγυματικών κυττάρων από iPSCs και ακόλουθη διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα με επίδραση χονδρογενετικών παραγόντων. Ο περιορισμός της μεθόδου σχετίζεται με τη δυσκολία δημιουργίας λειτουργικών μεσεγγυματικών κυττάρων.

4) Διαφοροποίηση των iPSCs σε χονδροκύτταρα με ενδιάμεσους πλήθυσμούς σε στάδια μεσενδοδερματος, μεσοδέρματος και χονδροκυττάρου υπό την επίδραση των κατάλληλων παραγόντων. Η μέθοδος αυτή παράγει κυτταρικό πληθυσμό, ο οποίος σε ποσοστό 74-79% είναι θετικός για έκφραση του Sox9. Η δυσκολία της μεθόδου έγκειται στην εύρεση και στο καθορισμό των ιδανικών συνδυασμών και των συγκεντρώσεων των παραγόντων διαφοροποίησης.

Στο σύνολό τους οι έρευνες που αφορούν στις παραπάνω μεθόδους αναφέρουν ότι τα χονδροκύτταρα προερχόμενα από iPSCs εκφράζουν χονδροκυτταρικούς δείκτες, αλλά δεν έχει γίνει εφικτή η κατασκευή υαλώδους χόνδρου χωρίς τη βοήθεια ικριωμάτων. (Noriyuki Tsumaki et al., Bone 70 (2015) 48–54)

Οι Wei et al κατάφεραν πρώτοι τη χονδρογενετική διαφοροποίηση iPS από ασθενείς με OA με ακόλουθη *in vitro* και *in vivo* εκτίμηση. *In vitro*, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με TGF-β1 σε συνκαλλιέργεια με χονδροκύτταρα και βρέθηκε ότι τα επίπεδα του κολλαγόνου τύπου II και των

GAGs είναι συγκρινόμενα με των χονδροκυττάρων και διπλάσια από εκείνα των iPSCs που καλλιεργήθηκαν απουσία χονδροκυττάρων. Μετά από 2 εβδομάδες διαφοροποίησης *in vitro*, οι “κατασκευές” μεταμοσχέθηκαν υποδορίως σε μοντέλο ποντικού. Μετεγχειρητική εκτίμηση, έξι εβδομάδες αργότερα, επιβεβαίωσε την επίτευξη της χονδρογένεσης μέσω της αύξησης του κολλαγόνου τύπου II.(Olivia S. Beane<sup>1</sup> and Eric M. Darling, *Ann Biomed Eng.* 2012 Oct; 40(10): 2079–2097)

Τα αποτελέσματα της έρευνας των Ji-Yun Ko ανέδειξαν την επιτυχή επαγωγή της χονδρογένεσης και την εν δυνάμει επιδιόρθωση βλαβών του χόνδρου με hiPSCs. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι τα hiPSCs παρουσιάζουν καλύτερη ποιότητα χονδρογεννητικής διαφοροποίησης *in vitro* σε σύγκριση με τα hBMMSCs και το απέδειξε με την ιστολογική εμφάνιση και την αυξημένη έκφραση των δεικτών χονδρογένεσης, συμπεριλαμβανομένων των GAG, SOX-9, COL2A1 και της αγκρεκάνης. Ένα άλλο σημείο που συνηγορεί στο παραπάνω συμπέρασμα είναι η πολύ χαμηλή έκφραση δεικτών υπερτροφίας, όπως οι COL10A1 και Runx-2 στα hiPSCs, σε αντίθεση με τα hBMMSCs όπου η έκφραση του COL10A1 αυξήθηκε αξιοσημείωτα με την επαγωγή χονδρογένεσης. Οι υποκινητές του COL10A1 στα hiPSCs βρέθηκαν υπερμεθυλιωμένοι σε σχέση με εκείνους στα hBMMSCs, υποδεικνύοντας την επιγενετική ρύθμιση ως την αιτία της διαφοράς ως προς την υπερτροφία.

Η απουσία υπερτροφικού φαινοτύπου στα hiPSCs που διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο, καθώς η υπερτροφία ήταν ως τώρα άρρηκτα συνδεδεμένη με τη χονδρογένεση των ενήλικων βλαστοκυττάρων.(Ji-Yun Ko et al.,*Biomaterials* 35 (2014)).

Ο επαναπρογραμματισμός χονδροκυττάρων από τραυματισμένους αρθρικούς χόνδρους οδήγησε στη δημιουργία c-iPSC κλωνικών σειρών με φυσιολογικό καρυότυπο και χωρίς την απόκτηση ενθέσεων ή ελλείψεων κατά τη διαδικασία επαναπρογραμματισμού. Κάθε μία από τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκε είχε δυναμικό διαφοροποίησης ως προς τη χονδρογενετική σειρά. Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης βρέθηκε ότι ήταν το ίδιο με το προφίλ ώριμων χονδροκυττάρων. Ένας κυτταρικός κλώνος παρόλα αυτά είχε μεγαλύτερη δυνατότητα διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα με αυξημένη δυνατότητα σχηματισμού εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου. Η διαφορά αυτή μπορεί εξηγηθεί από το γεγονός ότι η διαδικασία προγραμματισμού μπορεί να μην είναι ακριβώς ίδια μεταξύ των κλώνων και πως κάποιοι κλώνοι έχουν μνήμη του αρχικού κυττάρου από το οποίο προήλθαν, το οποίο οφείλεται πιθανόν στο κοκτέιλ επαναπρογραμματισμού ή να είναι αποτέλεσμα της ετερογένειας των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια. Σε κάθε περίπτωση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη επιγενετικής μνήμης την οποία ανέφεραν και προηγούμενες έρευνες. (Cecilia Borestrom, *Stem cells translational Medicine*, 2014;3:433–447)

*Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης μορίων-δεικτών της υπερτροφίας σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από MSCs και σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από iPSCs*



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**

### **“ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ”**

## 2.1.Κατηγορίες Δειγμάτων

Για τη εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και από μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών.

Απομονώθηκαν μεσεγγυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών (BM-MSCs) από τέσσερις φυσιολογικούς- δότες, ( $n=4$ ). Ένα τμήμα από τα μεσεγγυματικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως έχουν, κάποια από τα BM-MSCs διαφοροποιήθηκαν απευθείας σε χονδροκύτταρα, ενώ ένα άλλο τμήμα τους επαναπρογραμματίστηκε σε iPSCs. Από τα iPSCs στην συνέχεια ορισμένα διαφοροποιήθηκαν σε χονδροκύτταρα.

Οι διαδικασίες της απομόνωσης του μυελού των οστών και της δημιουργίας των iPSCs πραγματοποιήθηκαν στο Νοσοκομείο Παιδων Αγία Σοφία, στο εργαστήριο Μεταμοσχεύσεων με διευθυντή τον κ. Γουσέτη.

## 2.2.Κυτταροκαλλιέργειες

Σκοπός των καλλιεργειών κυττάρων είναι να διατηρηθούν *in vitro* τα κύτταρα βιώσιμα μακριά από τον φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίο προήλθαν. Από την πρώτη περιγραφή καλλιέργειας ιστού το 1907 ως την ανάπτυξη της πρώτης συνεχούς ανθρώπινης σειράς καρκινικών κυττάρων, HeLa, το 1952, οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν εξελιχθεί σε ένα απαραίτητο ερευνητικό εργαλείο (<http://www.bio.uth.gr>--Μπαλατσός Ν., Λιαδάκη Κ.) Η καλλιέργειας παρέχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα για να φτάσουν σε ικανοποιητικό αριθμό που θα επιτρέπει την απομόνωση μεγάλου αριθμού κυττάρων.

Τα δείγματα παρελήφθησαν σε φλάσκες των 15cm. Από κάθε φλάσκα απομονώθηκαν τα κύτταρα και μοιράστηκαν σε 3 νέες φλάσκες (15cm) μια για την ανακαλλιέργειά τους, μια για την αποθήκευσή τους καθώς και μια για την απομόνωση RNA. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και η ανάπτυξή τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, δηλαδή θερμοκρασία 37 βαθμών Κελσίου, κατάλληλη υγρασία και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% διοξείδιο του άνθρακα. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής, για την αποφυγή μολύνσεων, ενώ η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Για την απομόνωση των κυττάρων απαιτείται η προσεκτική αποκόλλησή τους, η οποία γίνεται με τη θρυψίνη που είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με τη επιφάνεια προσκόλλησής τους, τα κύτταρα αποκολλώνται και τελικά μπορούν να συλλεχθούν. Για τη βέλτιστη δράση της τα κύτταρα τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο (37oC) για όσο χρόνο χρειαστεί και στο χρονικό διάστημα αυτό γίνεται παρατήρηση των κυττάρων ανά μικρά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο ώστε να παρακολουθείται η δράση της θρυψίνης. Μόλις τα κύτταρα αποκολληθούν προστίθεται σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό, καθώς είναι καταστολέας της θρυψίνης, η οποία μετά την αποκόλληση των κυττάρων γίνεται τοξική για το κύτταρο. Ακολουθούν πλύσεις των κυττάρων με ακόλουθες φυγοκεντρήσεις, ώστε στο τέλος να συλλεχθεί το ίζημα που αποτελείται από κύτταρα χωρίς προσμίξεις θρεπτικού υλικού ή θρυψίνης.

Στη συνέχεια το ίζημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για ανακαλλιέργεια των κυττάρων και επέκτασή τους, είτε για αποθήκευση των κυττάρων και μελλοντική χρήση, είτε για απομόνωση πρωτεϊνών, RNA κ.α.

*Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των κυττάρων:*

- ◆ Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, UK). Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), ο οποίος περιέχει τους παράγοντες που απαιτούνται για την κυτταρική ανάπτυξη και για το κυταρικό πολλαπλασιασμό. Δεν προστέθηκαν αντιβιοτικά.
- ◆ PBS(HyClone)
- ◆ Θρυψίνη (Life Technologies)

### ***Πρωτόκολλο απομόνωσης κυττάρων***

- 1.Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με PBS (5ml)
- 2.Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση στους 37oC για 1-3 λεπτά
- 3.Προσθήκη 4ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- 4.Μεταφορά σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml
- 5.Φυγοκέντρηση για 7λεπτά στις 2o00rpm, σε θερμοκρασία δωματίου
- 6.Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 5 ml PBS
- 7.Φυγοκέντρηση για 7'λεπτά στις 2000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου
- 8.Αφαίρεση υπερκειμένου

*Απομόνωση RNA από κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργεια*



Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης γίνεται σε επίπεδο mRNA και για το λόγο αυτό από το σύνολο των δειγμάτων έγινε απομόνωση RNA. Στα χονδροκύτταρα που προέρχονται από επαγόμενα βλαστοκύτταρα και από μεσεγχυματικά του μυελού των οστών η διαδικασία της απομόνωσης RNA περιγράφηκε παραπάνω. Για τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως αυτή περιγράφεται παρακάτω:

#### *Υλικά για την απομόνωση RNA από επαγόμενα βλαστοκύτταρα*

- ◆ Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, UK). Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), ο οποίος περιέχει τους παράγοντες που απαιτούνται για την κυτταρική ανάπτυξη και για το κυταρικό πολλαπλασιασμό.
- ◆ Trizol (Life Technologies)
- ◆ Χλωροφόρμιο (Merck)
- ◆ Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amresco)
- ◆ 70% αιθανόλη (Scharlau)
- ◆ Rnase-free water (Qiagen)
- ◆ PBS(HyClone)
- ◆ Θρυψίνη (Life Technologies)

#### *Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA*

Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με PBS (5ml)

Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση στους 37°C για 1-3 λεπτά

Προσθήκη 4ml πλήρους θρεπτικού υλικού

Μεταφορά σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml

Φυγοκέντρηση για 7λεπτά στις 2000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου

Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 5 ml PBS

Φυγοκέντρηση για 7λεπτά στις 2000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου

Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 1ml Trizol,

Επώαση για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 15-30°C

Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε ml Trizol

Ανάδευση σε vortex για 15-20 sec

Επώαση για 2-3 λεπτά σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 15-30°C

Φυγοκέντρηση για 15min στις 12000rpm, στους 2-8°C

Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf των 2ml  
Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε ml Trizol  
Επώαση για 10min σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 15-30oC  
Φυγοκέντρηση στις 12000rpm, για 10 min, σε θερμοκρασία 2-8oC  
Αφαίρεση υπερκειμένου  
Προσθήκη 1ml 70%κ.ο. αιθανόλης, ανάδευση (vortex) και μεταφορά σε νέο eppendorf  
Φυγοκέντρηση στις 1000rpm για 10 λεπτά στους 2-8oC και αφαίρεση υπερκειμένου  
Τοποθέτηση δειγμάτων στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης  
Επαναδιάλυση του RNA σε Rnase-free water (περίπου 50μl)  
Αποθήκευση στους -80oC

## **2.3.Από το RNA στο DNA**

### **2.3.1.Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Στη συνέχεια το ολικό ώριμο RNA που έχει απομονωθεί μετατρέπεται σε cDNA για την ανάλυση κυρίως επειδή το DNA είναι πιο σταθερό μόριο σε σχέση με το RNA. Με μήτρα το mRNA συντίθεται συμπληρωματικό προς αυτό μονόκλωνο DNA, με ενζυμική διάσπαση απομακρύνεται η αλυσίδα του RNA και στη συνέχεια συντίθεται νέα συμπληρωματική ως προς το DNA αλυσίδα. Χρησιμοποιήθηκαν 5gr RNA κάθε δείγματος και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl.

*Υλικά για τη σύνθεση cDNA*

- ◆ Random hexamers (2,97μg/μl, Invitrogen)
- ◆ Κιτ αντίστροφης μεταγραφάσης Super Script III (200U/μl, Invitrogen)
- ◆ Δεοξυροβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen)
- ◆ Δις απεσταγμένο νερό (DEMO s.a.)

*Κατασκευή cDNA*

- 1) Επαναδιάλυση του RNA σε ddH<sub>2</sub>O και προσθήκη 1μl Random Primers, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15μl

2) Τοποθέτηση του δείγματος στους 70C για 10 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν τα δευτεροταγείς δομές του RNA

3) Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες:

Ρυθμιστικό διάλυμα 5x:	4 μl
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl <sub>2</sub> ):	2 μl
DTT:	2μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια:	2μl
Super Script III:	0,5μl

4) Το διάλυμα αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω διάγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):

20oC, 10 λεπτά

42oC, 45 λεπτά

99oC, 3 λεπτά

18oC, 5 λεπτά

*τελική θερμοκρασία: 4oC*

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της αλληλουχίας που αντιστοιχεί σε ένα μετάγραφο γονιδίου αναφοράς, ενός γονισίου δηλαδή που εκφράζεται πάντα στο υπό μελέτη δείγμα. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το mRNA του γονιδίου GAPDH. Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ευικούς εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς.

**Forward:** 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'

**Reverse:** 5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (AmpIriTaq Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

cDNA:	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x:	12,5μl
Εκκινητής Forward:	1μl
Εκκινητής Reverse:	1μl
Δις απεσταγμένο νερό:	7,5μl

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στον κυκλοποιητή ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95oC, 10 λεπτά
- 40 κύκλοι όπου πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας στα εξής επαναλαμβανόμενα

στάδια:



*αποδιάταξη στους 95οC, 30 δευτερόλεπτα*

*υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60οC, 30 δευτερόλεπτα*

*επιμήκυνση στους 72οC, 1 λεπτό*

➤ Τελική επιμήκυνση στους 72οC, 7 λεπτά

Το τελικό προϊόν ελέγχθηκε για τη παρουσία ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών 100bp (Fermentas).

#### **2.4. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL10A1, MMP-13, RUNX-2, SOX-9 με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)**

Για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Το cDNA που κατασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η Real Time PCR είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς (ειδικού ή μη για συγκεκριμένη αλληλουχία) σε κάθε κύκλο της αντίδρασης PCR.

Η real-time PCR ή PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Η real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι- σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα

φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA. Η πρώτη σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος της PCR (CT – κύκλος - κατώφλι) που παρατηρούμε σχετίζεται με την αρχική ποσότητα της μήτρας (ποσοτικοποίηση).

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως baseline ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται επί 10 φορές της κανονικής παρέκκλισης από το μέσο σήμα της χρωστικής της baseline.

Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατώφλι κύκλου (Ct) για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος. Σε αυτή τη γραφική παράσταση η ενιαία γραμμή τέμνει το κατώφλι στον PCR κύκλο 18, ενώ η κηλιδωτή καμπύλη στον κύκλο 20, υπάρχει δηλαδή μία διαφορά 2 κύκλων μεταξύ αυτών των δύο δειγμάτων ή διαφορά  $Ct = 2$ . Εξαιτίας της εκθετικής φύσης της μεθόδου PCR, η τιμή Ct μετατρέπεται σε μία γραμμική μορφή του 2 ή σε τετραπλάσια διαφορά. Αυτός ο υπολογισμός χρησιμοποιείται κατά τη σχετική ποσοτική αναλυτική μέθοδο. (Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantification PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30(2002) 503-512.)

Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis).

Το φθορίζον μόριο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης στα δείγματα της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η SYBR Green, ο φθορισμός της οποίας ενισχύεται δραματικά μετά την πρόσδεσή της σε δίκλωνο DNA. Στη φάση της επιμήκυνσης αυξανόμενη ποσότητα SYBR Green προσδένεται στο συσσωρευόμενο προϊόν της PCR μετά από κάθε κύκλο. Καθώς η αντίδραση προχωρά τα επίπεδα του φθορισμού που ανιχνεύεται αυξάνονται συνεχώς. Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. (van der Velden VH, et al. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34))

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη *real-time PCR*:

- ◆ cDNA
- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα με SYBR Green και ROX (Fermentas)
- ◆ Εκκινητές (5μM) των γονιδίων
- ◆ Διπλά απεσταγμένο νερό (DEMOs.a.)

Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε τα εξής:

cDNA κάθε δείγματος:	2μl
SYBRgreen I:	5μl
Εκκινητής Forward:	0,3μl
Εκκινητή Reverse :	0,3μl
ddH <sub>2</sub> O:	2,4μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή Forward	Αλληλουχία εκκινητή Reverse
COL10A1	CAGGCATAAAAAGGCCAC	GTGGACCAGGAGTACCTTGC
MMP-13	TGGCATTGCTGACATCATGA	GCCAGAGGGCCCATCAA
RUNX-2	AGGCCACCACAAGCCTTT	AGAAGTTTGCACCGCACTT
SOX-9	TACGACTACACCGACCAC	TCAACGTCGAGTGAGCTGTC
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων είναι οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95oC, 10 λεπτά
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση του στόχου στα 3 επαναλαμβανόμενα στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95oC, 15 δευτερόλεπτα
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60oC, 30 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 72oC, 30 δευτερόλεπτα
- Τελική επιμήκυνση στους 72oC, 10 λεπτά

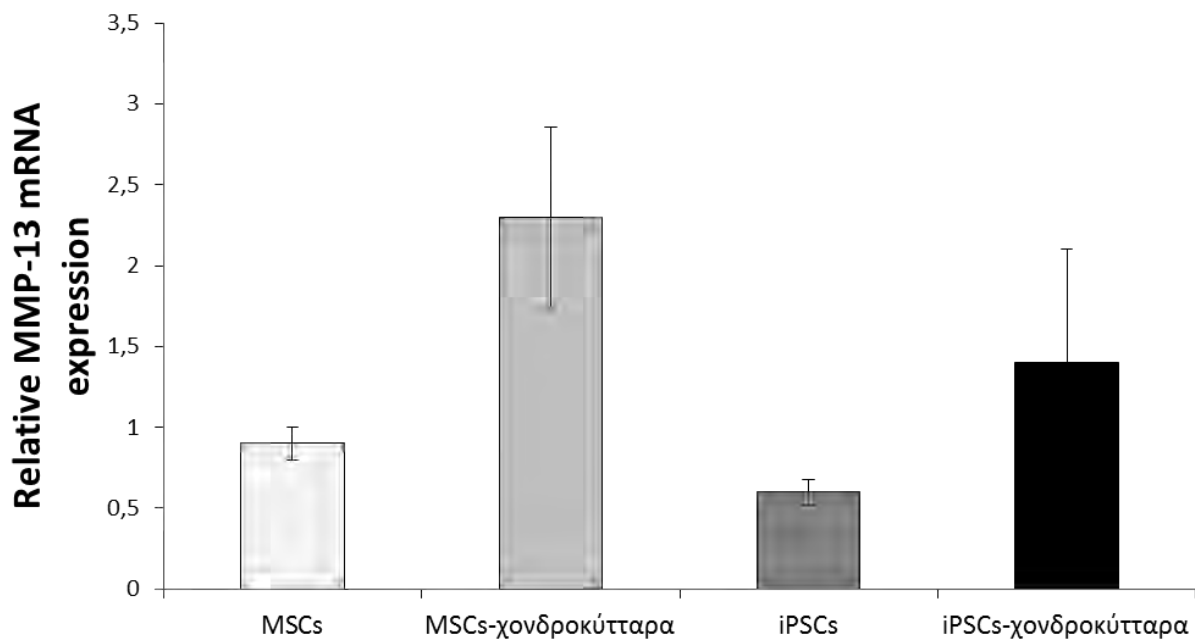
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου της MMP-13

Αρχικά συγκρίθηκε ο αριθμός των mRNA μεταγράφων του γονιδίου MMP-13 μεταξύ των MSCs και των χονδροκυττάρων προερχόμενων από MSCs και παρατηρήθηκε σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση και πιο συγκεκριμένα αύξηση των mRNA μεταγράφων στα MSCs-χονδροκύτταρα. Ακολούθησε η σύγκριση του αριθμού των mRNA μεταγράφων του ίδιου γονιδίου μεταξύ των iPSCs και των χονδροκυττάρων προερχόμενων από αυτά και παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στα iPSCs- χονδροκύτταρα. Στο τέλος, συγκρίνοντας τα MSCs- χονδροκύτταρα με τα iPSCs- χονδροκύτταρα παρατηρείται μειωμένη έκφραση του γονιδίου στα iPSCs- χονδροκύτταρα σε σχέση με τα MSCs- χονδροκύτταρα.

Πίνακας1. Μειωμένη έκφραση του γονιδίου MMP-13 στα iPSCs- χονδροκύτταρα σε σχέση με τα MSCs- χονδροκύτταρα.

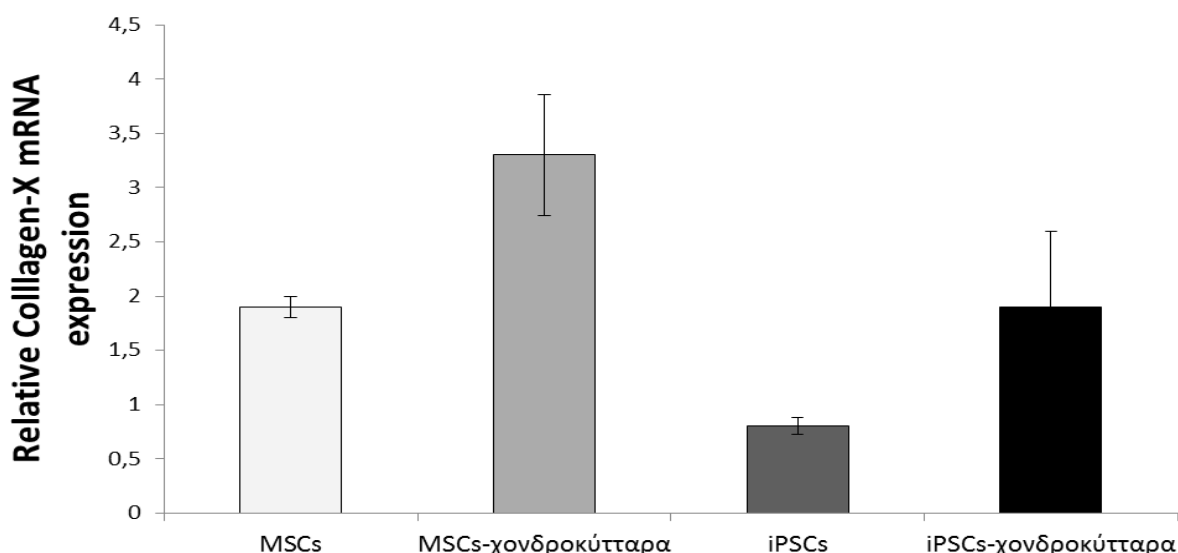




### 3.2. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου Κολλαγόνο X.

Για το γονίδιο του κολλαγόνου 10 (κολλαγόνο X), πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των MSCs και των χονδροκυττάρων που προέρχονται από τα MSCs και παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης στα MSCs- χονδροκύτταρα σε σχέση με τα MSCs. Ακολούθως συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κολλαγόνου 10 στα iPSCs και στα χονδροκύτταρα που προήλθαν από τα iPSCs και εντοπίστηκε επίσης αύξηση στην έκφραση στα χονδροκύτταρα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τα MSCs- χονδροκυττάρους με τα αποτελέσματα των iPSCs- χονδροκυττάρων παρατηρήθηκε μείωση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου στα iPSCs- χονδροκύτταρα, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2. Μειωμένη έκφραση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου κολλαγόνο 10 στα iPSCs- χονδροκύτταρα συγκρινόμενα με τα MSCs- χονδροκύτταρα .

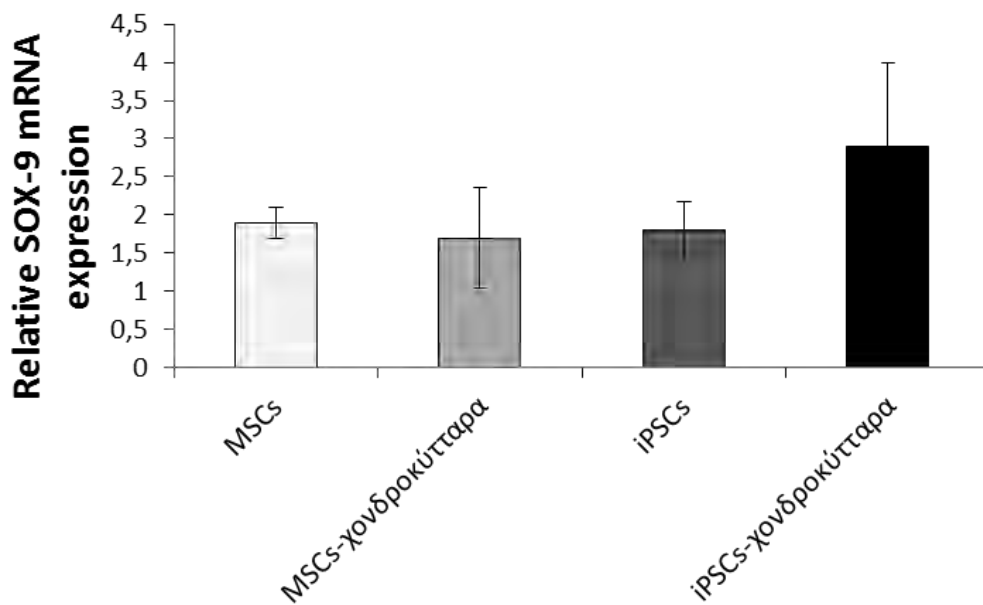


### 3.3. Μελέτη του αριθμού των mRNA μεταγράφων του γονιδίου SOX-9 και του γονιδίου RUNX-2

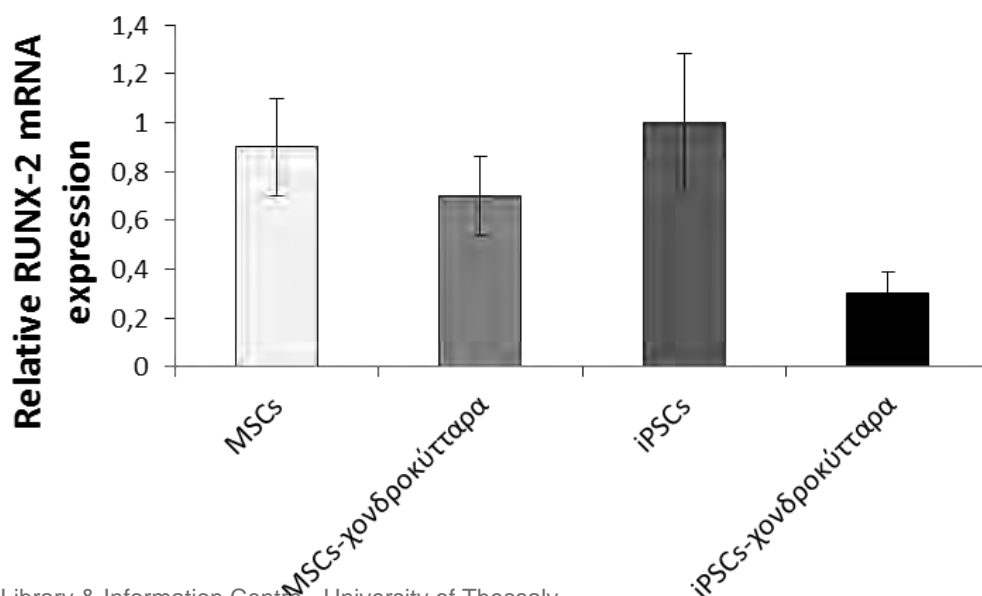
Σε ότι αφορά στα mRNA μεταγράφα του γονιδίου SOX-9, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των MSCs και των MSCs- χονδροκυττάρων και παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασής του στα MSCs- χονδροκύτταρα. Επίσης για το γονίδιο του SOX-9 συγκρίθηκε ο αριθμός μεταγράφων μεταξύ των χονδροκυττάρων και των iPSCs- χονδροκυττάρων. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της έκφρασης στα iPSCs χονδροκύτταρα σε σχέση με τα iPSCs . Τέλος,

συγκρινόμενα με τα MSCs- χονδροκύτταρα, στα iPSCs χονδροκύτταρα παρουσιάζεται αυξημένη έκφραση του SOX-9. Αντίθετα, τα mRNA μεταγράφα του γονιδίου RUNX-2 είναι μειωμένα στα MSCs- χονδροκύτταρα σε σχέση με τα MSCs, ενώ σημαντικά μειωμένη εμφανίζεται η έκφραση του RUNX-2 στα iPSCs χονδροκύτταρα σε σχέση τόσο με τα iPSCs, όσο και με τα MSCs- χονδροκύτταρα.

Πίνακας 3. Αυξημένη έκφραση του SOX-9 στα iPSCs χονδροκύτταρα σε σχέση με τα iPSCs και με τα MSCs- χονδροκύτταρα



Πίνακας 4. Μείωση της έκφρασης του γονιδίου RUNX-2 στα iPSCs χονδροκύτταρα σε σχέση με τα MSCs- χονδροκύτταρα.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ**

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην ΟΑ ο αρθρικός χόνδρος εκφυλίζεται και στα χονδροκύτταρά του εντοπίζεται μείωση δεικτών χαρακτηριστικών του υγιούς χόνδρου. όπως το κολλαγόνο τύπου ΙΙ και το SOX-9, και αύξηση της

έκφρασης των γονιδίων που είναι χαρακτηριστικά των υπερτροφικών χονδροκυττάρων και φυσιολογικά εντοπίζονται κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, όπως η MMP-13, το COL10A1 και ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX-2 .

Με την δημιουργία των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων έχει βρεθεί μια νέα πηγή διαθέσιμων κυττάρων για τη μελέτη ασθενειών, για την ανακάλυψη φαρμάκων και για την δημιουργία κυττάρων για αυτόλογη μεταμόσχευση.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα έχει αποδειχθεί ότι τόσο μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών όσο και ότι τα τα hiPSCs (human iPSCs) μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα. Είναι επίσης γνωστό ότι τα χονδροκύτταρα προερχόμενα από BM-MSCs διαφοροποιούνται σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα, γεγονός που τα καθιστά λιγότερο αποτελεσματικά για αντικατάσταση του αρθρικού χόνδρου σε περιπτώσεις εκφύλισής του, όπως η OA. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Claudia Loebel et al υποστηρίζουν επίσης ότι ο λόγος Runx2/Sox9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο της οστεοποιητικής ικανότητας των hMSCs.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, στη συγκεκριμένη εργασία συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μορίων δεικτών του υπερτροφικού φαινοτύπου (MMP-13, COL10A1, RUNX-2) καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox9, που είναι χαρακτηριστικός των μόνιμων χονδροκυττάρων του αρθρικού χόνδρου, σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα και από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Ο σκοπός της σύγκρισης ήταν να αναδειχθούν πιθανόν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των μορίων δεικτών και να αποτιμηθεί η πιθανότητα απόκτησης του υπερτροφικού φαινοτύπου από τις δυο κατηγορίες κυττάρων.

Τα χονδροκύτταρα προερχόμενα από hiPSCs παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μορίων-δεικτών της υπερτροφίας (MMP-13, κολλαγόνο X και Runx-2 ) σε σχέση με τα χονδροκύτταρα που προήλθαν από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του SOX9.

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασε και η ερευνητική ομάδα των Ji-Yun Ko *et al* , οι οποίοι επίσης μελέτησαν την ύπαρξη δεικτών χονδρογένεσης και υπερτροφίας σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από hiPSCs και hBMMSCs υγιών ατόμων. Επιπλέον, όμως, εντόπισαν σημαντικά μεγαλύτερη μεθυλίωση σε πολλές CpG νησίδες στον υποκινητή του γονιδίου του COL10A1 στα hiPSCs σε σχέση με τα hBMMSCs, γεγονός που υποδηλώνει την συμμετοχή επιγενετικών τροποποιήσεων στη διαφορά στην έκφραση των δεικτών υπερτροφίας.

*(In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells ,Ji-Yun Ko, Kyung-Il Kim, Siyeon Park, Gun-Il Im, Biomaterials Volume 35, Issue 11, April 2014, Pages 3571–3581 ).*

Η περαιτέρω διερεύνηση επιγενετικών διαφορών σε γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της

χονδρογένεσης σε χονδροκύτταρα που προέρχονται από τη διαφοροποίηση επαγόμενων βλαστοκυττάρων και μεσεγχαματικών βλαστοκυττάρων ίσως αποτελεί πιθανή συνέχεια της συγκεκριμένης εργασίας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Mary B. Goldring and Steven R. Goldring. **"Osteoarthritis"**. *J. Cell. Physiol.*, 2007, 213: 626–634
2. Anna Litwic, Mark Edwards, Elaine Dennison, and Cyrus Cooper. **"Epidemiology and Burden of Osteoarthritis"**. *Br Med Bull.*, 2013 ; 105: 185–199
3. Walter Greene. **"Netter's Orthopaedics"**. Chapter: Arthritic Disorders, p.73
4. Alice J. Sophia Fox, Asheesh Bedi and Scott A. Rodeo. **"The Basic Science of Articular Cartilage, Structure, Composition, and Function."**. *Sports Health*, 2009 Nov; 1(6): 461–468.
5. Mary B. Goldring **"Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis."**. *Ther Adv Musculoskelet Dis.*, 2012 August; 4(4): 269–285
6. C. Anthony Poole. **"Articular cartilage chondrons: form, function and failure."**. *J. Anat.*, (1997) 191 pp. 1–13
7. Linh T. T. Le, Tracey E. Swingle, and Ian M. Clark. **"The Role of MicroRNAs in Osteoarthritis and Chondrogenesis"**. *Arthritis Rheum.* 2013 Aug; 65(8): 1963–74.
8. Cheng Chen, Dhananjay T. Tambe, Linhong Deng, Liu Yang. **"Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte."**, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, December 2013; Vol. 305 no. 12
9. Masahiro Iwamoto, Yoichi Ohta, Colleen Larmour, and Motomi Enomoto-Iwamoto. **"Towards Regeneration of Articular Cartilage"**. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013 September ; 99(3): 192–202.
10. Erminia Mariani, Lia Pulsatelli and Andrea Facchini. **"Signaling Pathways in Cartilage Repair"**. *Int J Mol Sci.* May 2014; 15(5): 8667–8698
11. Yokohama K., Ikeya M., Umeda K., Oda H., Nodomo S., Matsumoto Y., Izawa K., Horigome K., Kusaka T., Tanaka T., Saito MK., Yasumi T., Nishikomori R., Ohara O., Nakayama N., Nakahata T., Heike T., Toguchida J., **"Enhanced Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease Occurs via the Caspase 1–Independent cAMP/Protein Kinase A/CREB Pathway"**. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jan; 67(1): 302–14.
12. Olivia S. Beanel and Eric M. Darling. **"Isolation, Characterization and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration."** *Ann Biomed Eng.*, 2012 Oct; 40(10): 2079–2097
13. Bobis S, Jaricha D, Majka M. **"Mesenchymal stem cells- characteristics and clinical applications"**. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2006; Vol 44, No 4, pp 216–13
14. Mone Zaidi & Simón Méndez-Ferrer. **"Cell biology: Tumour stem cells in bone"**. *Nature*, July 2013; 499, 414–416

- 15.S.-G. Ong, et al. **“MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells”** Adv. Drug Deliv. Rev., 2015
- 16.Ewelina Augustyniak, Tomasz Trzeciak, Magdalena Richter, Jacek Kaczmarczyk, Wiktoria Suchorska. **“The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration.”** Int Orthop., 2015 May;39(5):995-1003
- 17.Grigolo B, Lisignoli G, Desando G, Cavallo C, Marconi E, Tschon M, Giavaresi G, Fini M, Giardino R, Facchini A., **“Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit.”** Tissue Eng Part C Methods, 2009, 15: 647–658
- 18.Sato M, Uchida K, Nakajima H, Miyazaki T, Guerrero AR, Watanabe S, Roberts S, Baba H. **“Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis.”** Arthritis Res Ther, 2012, 14: R31
- 19.Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, Fini M, Giardino R, Facchini A, Grigolo B. **“Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model.”** Arthritis Res Ther, 2013, ;15(1):R22
- 20.Wang W, Cao W, **“Treatment of osteoarthritis with mesenchymal stem cells”** Sci China Life Sci. 2014 Jun;57(6):586-95
- 21.Kate Hawkins, Shona Joy, and Tristan McKay. **“Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming”**. World J Stem Cells, 2014 Nov 26; 6(5): 620–628.
- 22.Brian O. Diekman<sup>a,b</sup>, Nicolas Christoforou<sup>b,c</sup>, Vincent P. Willarda, Haosi Suna<sup>b</sup>, Johannah Sanchez-Adams<sup>a</sup>, Kam W. Leong<sup>b</sup>, and Farshid Guilaka. **“Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells.”** Proc Natl Acad Sci U S A, 2012 Nov 20;109(47):19172-7.
- 23.Noriyuki Tsumaki <sup>a,b,□</sup>, Minoru Okada <sup>a</sup>, Akihiro Yamashita. **“iPS cell technologies and cartilage regeneration”**. Bone, 2015 Jan;70:48-54
- 24.Olivia S. Beanel and Eric M. Darling. **“Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration”**. Ann Biomed Eng. ,2012 Oct; 40(10): 2079–2097
- 25.Ji-Yun Ko, Kyung-Il Kim, Siyeon Park, Gun-Il Im. **“In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells”**. Biomaterials, 2014 Apr;35(11):3571-81
- 26.Yamasita A. ,Liu S, Woltjen K., Thomas B, Meng G, Hotta A., Takahashi K., Ellis J., Yamanaka S., Rancourt De. **“Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells.”** Sci Rep., 2013;3:1978.
- 27.Boestrom C, Simonsson S, Enochson L, Bigdeli N., Brantsing C, Ellerstrom C, Hyllner J, Lindahl

A. **“Footprint-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells From Articular Cartilage With Redifferentiation Capacity: A First Step Toward a Clinical-Grade Cell Source”** Stem Cells Transl Med., 2014 Apr;3(4):433-47.

28.Μπαλατσός Ν., Λιαδάκη Κ. <http://www.bio.uth.gr>

29.Ginzinger DG.”**Gene quantification using real-time quantification PCR: An emerging technology hits the mainstream”**. Experimental Hematology, 30(2002) 503-512.

30.van der Leiden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szezepanski T, Gabert J, van Dongen JJ.

**“Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, a, approaches, and laboratory aspects”**.Leukemia. 2003;17(6):1013-34)