



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS ΣΕ
ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ»

Καμπούρη Σταυρούλα

Τριμελής Επιτροπή

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ: Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Λάρισα, 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«EFFECT OF OXIDATIVE STRESS IN OSTEoARTHRITIC
CHONDROCYTES »***

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής & Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα μου, κ. Τραχανά Βαρβάρα, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και διέθεσε χρόνο για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Τσέζου Ασπασία για τη συνεχή βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας και την άποψη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δήμα Κων/νο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και την επίβλεψη στην εργασία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων μου, τις χρήσιμες συμβουλές τους και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	8
1. Γενικό μέρος	10
1.1 Οστεοαρθρίτιδα.....	10
1.2 Αρθρικός χόνδρος.....	12
1.3 Χονδροκύτταρα.....	14
1.4 Οξειδωτικό στρες	15
1.5 Αντιοξειδωτικά.....	19
1.6 Οξειδωτικό στρες, caveolin-1 και οστεοαρθρίτιδα.....	20
1.7 Σκοπός	22
2. Ειδικό μέρος	23
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.2 Συλλογή δειγμάτων	23
2.3 Καλλιέργεια χονδροκυττάρων.....	23
2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας.....	25
2.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).....	29
2.6 Ανοσοϊστοχημεία.....	31
2.7 Επίδραση με H ₂ O ₂ σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων.....	33
3. Αποτελέσματα	34
3.1 Τα ΟΑ χονδροκύτταρα αδυνατούν να επιδιορθώσουν τις οξειδωτικές βλάβες.....	34
3.2 Η caveolin-1 εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά στα ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα έπειτα από το οξειδωτικό στρες.....	38
4. Συζήτηση	40
Βιβλιογραφία	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων που χαρακτηρίζεται από τη βαθμιαία φθορά του αρθρικού χόνδρου, την καταστροφή του υποχόνδριου οστού και την ανάπτυξη νέου οστού με την μορφή των οστεοφύτων, μικρών οστέινων προεκτάσεων. Πρωτογενή συμπτώματα της ΟΑ είναι πόνος στις αρθρώσεις, διόγκωση και παραμόρφωση των αρθρώσεων, δυσκαμψία και περιορισμός της κίνησης. Η εξέλιξη της νόσου είναι συνήθως αργή, αλλά μπορεί τελικά να οδηγήσει σε αναπηρία που απαιτεί χειρουργική επέμβαση. Η ΟΑ μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε άρθρωση, αλλά πιο συχνά επηρεάζει τα γόνατα, τα ισχία, τα χέρια, και τις αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Τέτοιοι παράγοντες είναι η παχυσαρκία, η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα αλλά και γενετικοί παράγοντες. Η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να ταξινομηθεί σε πρωτογενή ή σε δευτερογενή, ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι μία αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία. Η θεραπευτική αντιμετώπιση της ΟΑ διακρίνεται σε μη φαρμακευτική, όπως φυσικοθεραπείες και απώλεια βάρους, φαρμακευτική, όπως αναλγητικά ή αντιφλεγμονώδη και βέβαια μπορεί να αντιμετωπιστεί και με χειρουργική επέμβαση.

Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται ως μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούνται. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι μόρια που έχουν χάσει ένα ηλεκτρόνιο και άρα είναι εξαιρετικά δραστικά επειδή έχουν την τάση να δεσμεύουν άλλα άτομα ή μόρια. Είναι φυσιολογικά προϊόντα του μεταβολισμού του οξυγόνου, και απαραίτητες για την άμυνα του οργανισμού. Όταν όμως τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια, τότε ο ευεργετικός τους ρόλος αναιρείται και γίνονται καταστροφικές για τον οργανισμό. Οι κυριότεροι παράγοντες που ευθύνονται για την επιτάχυνση του οξειδωτικού στρες και τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού είναι το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ηλικία και διάφορων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η λήψη τροφών φτωχών σε αντιοξειδωτικά, καθώς και διάφορα φάρμακα.

Το οξειδωτικό στρες έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την εμφάνιση ή την επιδείνωση διάφορων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένου μεταξύ αυτών και της αρθρίτιδας.

Σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, έχει παρατηρηθεί ότι οι παθήσεις των αρθρώσεων, όπως η οστεοαρθρίτιδα, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ROS. Αυξημένα επίπεδα ROS, όπως NO και ONOO⁻, έχουν βρεθεί σε ανθρώπινους οστεαρθρικούς χόνδρους. Η φλεγμονή και η σωματική καταπόνηση, που

λειτουργούν ως παράγοντες κινδύνου για την ΟΑ, έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα των ROS. Τα ROS μπορεί να μεταβάλλουν τη φυσιολογία των χονδροκυττάρων, επηρεάζοντας την έκφραση των κυτοκινών, τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών, την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών αλλά και προωθώντας την απόπτωση τους. Πειράματα οξειδωτικού στρες που έγιναν με οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα από χοίρους έδειξαν αυξημένες βλάβες στο πυρηνικό DNA σε σχέση με μη οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα ROS απορυθμίζουν την έκφραση των προ-φλεγμονωδών γονιδίων στα χονδροκύτταρα. Επιπλέον σε πειράματα που έγιναν με αρθρικό χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, παρατηρήθηκε ότι το οξειδωτικό στρες ευθύνεται για την τελομερική αστάθεια και τη γήρανση των χονδροκυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι τη σημαντική εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στον εκφυλισμό του χόνδρου και την ανάπτυξη της νόσου. Συνεπώς αντιοξειδωτικοί παράγοντες ή/και παρεμβάσεις, που αποσκοπούν στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης στον αρθρικό χόνδρο, πιθανόν να είναι αποτελεσματικοί στην πρόληψη της εκδήλωσης και της εξέλιξης της ΟΑ.

Εκτός από τις βλάβες στα κύτταρα και τον αρθρικό χόνδρο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες και σε μοριακούς στόχους όπως λιπίδια, DNA, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Τέτοιο στόχο φαίνεται να αποτελεί η caveolin-1, είναι μεμβρανική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στις παθήσεις που σχετίζονται με την ηλικία και επηρεάζεται από οξειδωτικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως το H_2O_2 . Σε ΟΑ χονδροκύτταρα ανθρώπου και αρουραίου, βρέθηκε ότι η caveolin-1 σχετίζεται θετικά με την εκφύλιση του χόνδρου. Έχει παρατηρηθεί ακόμη ότι συμμετέχει στην πρόωρη γήρανση των χονδροκυττάρων και στην καταστροφή του υποχόνδριου οστού, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά της παθολογίας της ΟΑ.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του εξωγενούς ήπιου οξειδωτικού στρες σε χονδροκύτταρα ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα σε σύγκριση με επιπτώσεις του ίδιου στρες σε χονδροκύτταρα υγιών ατόμων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών με πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος και δεν είχαν ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσε άτομο χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, το οποίο είχε υποστεί χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος. Μελετήθηκαν κύρια οι βλάβες που προέκυψαν στο πυρηνικό DNA έπειτα από επίδραση H_2O_2 , μέσω ανοσοϊστοχημικού πρωτοκόλλου σήμανσης της ιστόνης $\gamma H_2A\chi$, η οποία αποτελεί γνωστό δείκτη θραύσεων της διπλής έλικας του DNA. Η ανάλυση των βλαβών έγινε στο οπτικό μικροσκόπιο. Επιπλέον μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της caveolin-1 αλλά και ο κυτταρικός εντοπισμός της.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες, επάγει αυξημένα επίπεδα βλαβών στο DNA στα ΟΑ χονδροκύτταρα, σε σχέση με τα χονδροκύτταρα των υγιών.

Οι βλάβες αυτές δείχθηκε ότι μπορούν να επιδιορθωθούν στην περίπτωση των φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από ένα διάστημα ανάκαμψης, ενώ τα χονδροκύτταρα των οστεοαρθρικών αδυνατούν να τις επιδιορθώσουν και οδηγούνται σε θάνατο, πιθανόν μέσω μαζικής απόπτωσης. Επιπλέον, όσον αφορά την caveolin-1, μετά την έκθεση των χονδροκυττάρων σε H_2O_2 , σημειώθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της στα OA χονδροκύτταρα με την πάροδο των ωρών, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία τέτοια μεταβολή στα χονδροκύτταρα των φυσιολογικών. Ο κυτταρικός εντοπισμός της διέφερε επίσης σημαντικά ανάμεσα στα OA χονδροκύτταρα και τα φυσιολογικά: πριν από την επίδραση του οξειδωτικού στρες η caveolin-1 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα υγιών και OA χονδροκυττάρων. Εντούτοις, 1h έπειτα από την επίδραση H_2O_2 στα χονδροκύτταρα των φυσιολογικών παρατηρείται μια ξεκάθαρη μετατόπιση της caveolin-1 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ενώ αυτό δεν συμβαίνει στα OA χονδροκύτταρα σε καμία χρονική στιγμή. Επιπλέον, καθώς τα χονδροκύτταρα των φυσιολογικών ανακάμπτουν από τις οξειδωτικές βλάβες η caveolin-1 επιστρέφει στον κανονικό πυρηνικό-κυτταροπλασματικό εντοπισμό της.

Η παρούσα εργασία συνεπώς αφενός καταδεικνύει την αδυναμία των OA χονδροκυττάρων να επιδιορθώνουν τις οξειδωτικές βλάβες στο DNA, γεγονός που μπορεί να οδηγεί σε εκτεταμένη δυσλειτουργία τους ή/και θανάτωση τους και ως εκ τούτου εκφυλισμό του χόνδρου. Αφετέρου παρέχονται ενδείξεις για συμμετοχή της caveolin-1 στην απόκριση των χονδροκυττάρων στο ήπιο εξωγενές οξειδωτικό στρες. Η διαφοροποίηση δε στα επίπεδα και τον κυτταρικό εντοπισμό της που παρατηρείται στα OA χονδροκύτταρα υποδεικνύει πιθανή εμπλοκή της στην παθογένεια της OA.

ABSTRACT

The Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease characterized by progressive degradation of articular cartilage, changes in subchondral bone structure and new bone formation (osteophytes). Primary symptoms of OA include joint pain, stiffness and limitation of movement. Disease progression is usually slow, but can ultimately lead to joint failure with pain and disability, that requires surgery. OA may develop in any joint, but most commonly affects the knees, hips, hands, and the joints of the spine. Epidemiological studies have revealed the existence of risk factors, which have been associated with OA, including obesity, aging, sex, ethnicity and genetic predisposition. Osteoarthritis can be classified into primary or secondary, depending on whether or not there are identifiable causes. Treatment of OA is divided into non-drug therapy, such as physiotherapy and weight loss, drug therapy, such as anti-inflammatory drugs, and of course surgical treatment.

Oxidative stress reflects an imbalance between the systemic manifestation of ROS (reactive oxygen species) and a biological system's ability to readily detoxify the reactive intermediates or to repair the resulting damage. Oxygen free radicals are molecules that have lost an electron and therefore are highly reactive because they tend to bind other atoms or molecules. They are normal oxygen metabolism products, and they are necessary for the body's defenses. But when the levels of free radicals overdraw the normal range, then the beneficial role is undermined and become destructive to the body. The main factors which are responsible for oxidative stress are smoking, alcohol, air pollution, solar and various types of electromagnetic radiation, food poor in antioxidants and various drugs.

Oxidative stress is thought to be involved in the development of various diseases, such as arthritis.

In many studies has been observed that joint disease such as osteoarthritis are associated with elevated levels of ROS. Elevated levels of ROS, such as NO and ONOO-, have been found in human osteoarthritic cartilage. Inflammation and physical stress, which serve as risk factors for OA, have also been associated with increased levels of ROS. This increased regulation of ROS can result in many different effects on chondrocytes, such as, in the expression of the cytokine, the synthesis of proteoglycans, the activation of metalloproteinases and the apoptosis of chondrocytes. Recent experiments with oxidative stress in osteoarthritic chondrocytes from pigs showed increased damages of nuclear DNA compared to non-osteoarthritic chondrocytes. It has also been observed that ROS down regulate the expression of pro-inflammatory genes in chondrocytes. In addition in experiments with articular cartilage of patients with osteoarthritis, it has been observed that oxidative stress is responsible for the telomeric instability and aging of the chondrocytes. This indicates the significant involvement of oxidative stress in the degradation of cartilage and the development of disease. The antioxidants which are

aimed to reduce the oxidative damage in articular cartilage may be effective to prevent the development and progression of OA.

Oxidative stress has been shown to cause damage in molecular targets such as lipids, DNA, carbohydrates and proteins affecting therefore their structure and function. Caveolin-1, a membrane protein that has been correlated with ageing diseases is such a molecular target. In human and rat OA chondrocytes, caveolin-1 positively correlated with the degeneration of cartilage. It has even been also observed to be involved in the premature aging of the chondrocytes and the destruction of the subchondral bone, which are features of the pathogenesis of OA.

Based on all the above, the purpose of the present thesis is the study of the effect of exogenous oxidative stress in chondrocytes of OA patients in comparison with the effects on chondrocytes of healthy individuals.

Articular cartilage was obtained from patients with primary osteoarthritis undergoing total knee replacement surgery. Patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune disease were excluded from the study. Normal cartilage was obtained from individuals undergoing fracture repair surgery and/or amputation, with no history of joint disease. Chondrocytes were cultivated in the presence of H₂O₂ known to cause oxidative stress to the cells. We studied DNA damage through immunohistochemistry of γ H2A χ , known indicator of DNA double strand breaks after the administration of H₂O₂ and after different periods of recovery. Analysis was performed with the optical microscope. Furthermore, the protein expression of caveolin-1 was studied as well its subcellular localization in the same time points.

The results showed that oxidative stress induces increased levels of DNA damages in OA chondrocytes, as compared to healthy chondrocytes. Importantly, in the case of normal chondrocytes these damages could be repaired after a short period of recovery, whereas osteoarthritic chondrocytes seem unable to repair the damages and this leads to their death, possibly via apoptosis.

Furthermore, a few hours after the treatment with H₂O₂, the protein levels of caveolin-1 were significantly reduced in OA chondrocytes whereas no such decrease was observed in normal chondrocytes. Its subcellular localization was also significantly different: before H₂O₂ was added, caveolin-1 localized both in the nucleus and in the cytoplasm of healthy and OA chondrocytes. One hour after oxidative treatment there was a clear translocation of caveolin-1 to the cytoplasm only in normal chondrocytes. In OA chondrocytes there was no change in the localization of caveolin-1. Furthermore, when normal chondrocytes repair most of the oxidative DNA damage, 24h after the treatment, caveolin-1 returns to its normal distribution both in the nucleus and in the cytoplasm.

The present study therefore demonstrates the inability of OA chondrocytes to repair oxidative DNA damage, a fact that could lead to their dysfunctionality and/or their death and contributes to the destruction of the cartilage. Moreover, novel data are provided here regarding the role of caveolin-1 in exogenous oxidative

stress response of chondrocytes. The differences in levels and localization observed in OA chondrocytes after oxidative treatment suggest a possible role of caveolin-1 in the pathogenesis of the disease.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Οστεοαρθρίτιδα

Γενικά

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) (η πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας), είναι μια εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα και χαρακτηρίζεται από διάβρωση του χόνδρου και αλλοιώσεις στους ιστούς που τον περιβάλλουν. Εκτός από την φθορά και απώλεια του αρθρικού χόνδρου, παρατηρείται υπερτροφία του υποχόνδριου οστού, σχηματισμός οστεοφύτων, χαλαρότητα συνδέσμων, αποδυνάμωση του περιαρθρικού μυός, και σε ορισμένες περιπτώσεις, φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Εικόνα 1). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να συμβούν ως αποτέλεσμα ανισορροπίας μεταξύ των βλαβών της επιδιόρθωσης των ιστών της άρθρωσης (Hutton, 1989). Πρωτογενή συμπτώματα της ΟΑ περιλαμβάνουν πόνο στις αρθρώσεις, δυσκαμψία και περιορισμό της κίνησης. Η εξέλιξη της νόσου είναι συνήθως αργή, αλλά μπορεί τελικά να οδηγήσει σε αναπηρία που απαιτεί χειρουργική επέμβαση (Anna Litwic et al, 2013).



Εικόνα 1: <http://www.oikologoi.gr/uploads/news/54.jpg>

Η οστεοαρθρίτιδα ταξινομείται είτε σε πρωτοταγή είτε σε δευτεροταγή ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι μία αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία. Η πρωτογενής ΟΑ είναι ο πιο συχνός τύπος και δεν έχει αναγνωρίσιμη αιτία ή προδιαθεσικό παράγοντα. Η δευτερογενής ΟΑ δεν διαφέρει παθολογικά από την πρωτοπαθή. Τα πιο συχνά αίτια είναι διάφορα νοσήματα όπως αλκαπτονουρία, συγγενείς

διαταραχές αρθρώσεων, διαβήτης, νόσος Wilson, φλεγμονώδεις ασθένειες καθώς και όλες οι χρόνιες μορφές αρθρίτιδας ή είναι επακόλουθο λοιμώξεων (Cesare et al, 2005).

Η ΟΑ μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε άρθρωση, αλλά πιο συχνά επηρεάζει τα γόνατα, τα ισχία, τα χέρια, τις αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης και τα πόδια (Felson DT, 2006), (Εικόνα 2). Το 2005, υπολογίστηκε ότι πάνω από 26 εκατομμύρια άνθρωποι στις ΗΠΑ είχαν κάποια μορφή ΟΑ. Ο επιπολασμός της ΟΑ, όμως, ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τον ορισμό που χρησιμοποιείται, την ηλικία, το φύλο και τη γεωγραφική περιοχή μελέτης. Η συχνότητα εμφάνισης ΟΑ στο χέρι, στο ισχίο και στο γόνατο αυξάνει με την ηλικία, και οι γυναίκες έχουν υψηλότερα ποσοστά από ότι οι άνδρες, ιδίως μετά την ηλικία των 50 χρόνων (Anna Litwic et al, 2013).



Εικόνα 2: <http://www.tosomasoumilaei.gr>

Πολλοί παράγοντες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την εξέλιξη της ΟΑ. Οι παράγοντες αυτοί διαχωρίζονται σε κατηγορίες που περιλαμβάνουν, κληρονομικούς παράγοντες, μηχανικούς παράγοντες, καθώς και επιπτώσεις της γήρανσης (Goldring et al, 2007). Αποτελέσματα από επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες διδύμων δείχνουν ότι η κληρονομική προδιάθεση είναι ένας παράγοντας κινδύνου. Μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων έχουν αποκαλύψει πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και μόρια σηματοδότησης, που μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνα στην εμφάνιση της ΟΑ (Valdes et al, 2006).

Μια σειρά από συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβανομένων, της αστάθειας της άρθρωσης και κακής ευθυγράμμισης, παχυσαρκίας και μεταβολικών ασθενειών, ηλικίας, φύλου, εθνικότητας, γενετικής, διατροφής, καπνίσματος, οστικής πυκνότητας και λειτουργίας των μυών, έχουν συσχετιστεί με την οστεοαρθρίτιδα.

Η παχυσαρκία είναι ένας από τους ισχυρότερους και καλύτερα εδραιωμένους παράγοντες κινδύνου της ΟΑ. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν

ότι η ΟΑ συνδέεται με το μεταβολικό σύνδρομο, υποδηλώνοντας έναν κοινό παθογόνο μηχανισμό που περιλαμβάνει μεταβολικές ανωμαλίες και συστηματική φλεγμονή. Σε μια μελέτη που έγινε διαπιστώθηκε ότι υπάρχει 5,26 φορές αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου σε άτομα με ΟΑ ηλικίας 43,8 ετών και άνω (Puenratom et al, 2009). Αρκετές μελέτες διαπίστωσαν σχέση μεταξύ του διαβήτη και της ΟΑ, μια σημαντική υπόθεση μάλιστα που έχει προταθεί, είναι ότι η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης που παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) και προχωρημένη γλυκοζυλίωση των τελικών προϊόντων του προκαλεί εκφύλιση του χόνδρου (Puenratom et al, 2009).

Η ηλικία αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Η επίπτωση της ΟΑ αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας τόσο για την συμπτωματική όσο και για την ασυμπτωματική ΟΑ. Σε ηλικία άνω των 75 ετών το ποσοστό της ΟΑ ξεπερνά το 80% (Cesare et al, 2005). Με την πρόοδο της ηλικίας, η περιεκτικότητα του χόνδρου σε νερό μειώνεται ως αποτέλεσμα μειωμένου πρωτεογλυκανικού περιεχομένου, με αποτέλεσμα ο χόνδρος να είναι λιγότερο ελαστικός. Χωρίς τις προστατευτικές επιδράσεις των πρωτεογλυκανών, οι κολλαγόνες ίνες του χόνδρου μπορεί να γίνουν ευαίσθητες στην αποικοδόμηση και έτσι να επιδεινωθεί ο εκφυλισμός του (Sharma et al, 2006). Επιπλέον οι φυσικοί και μηχανικοί παράγοντες που προστατεύουν την άρθρωση αλλοιώνονται με την πάροδο των ετών. Επιπλέον, βασικοί κυτταρικοί μηχανισμοί που διατηρούν την ομοιότητα των ιστών μειώνονται με τη γήρανση, οδηγώντας σε ανεπαρκή απόκριση στο στρες ή κάκωση της άρθρωσης και την επακόλουθη καταστροφή της άρθρωσης του ιστού και την απώλεια του (Mariely Nieves, 2014). Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την προχωρημένη ηλικία με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος και χειρών (Lawrence et al, 1966). Η συσχέτιση μεταξύ ΟΑ ισχίου και μεγάλης ηλικίας έχει και αυτή υποστηριχθεί από δύο μεγάλες μελέτες στην Σκανδιναβία (Danielsson et al, 1997),(Jorring, 1980). Αν και πρόκειται για πάθηση της προχωρημένης ηλικίας, η ΟΑ δεν αποτελεί αναπόφευκτη αιτία της γήρανσης. Η συχνότητα εμφάνισης ΟΑ γόνατος, ισχίου, και χεριού είναι υψηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες και στις γυναίκες αυξάνει δραματικά γύρω από τη χρονική περίοδο της εμμηνόπαυσης (Velandai et al, 2005). Το τελευταίο εύρημα έχει οδηγήσει ερευνητές να υποθέσουν ότι ορμονικοί παράγοντες μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στην ανάπτυξη του ΟΑ, αλλά τα αποτελέσματα των κλινικών και επιδημιολογικών μελετών δεν το έχουν επιβεβαιώσει αυτό (Klerk et al, 2009).

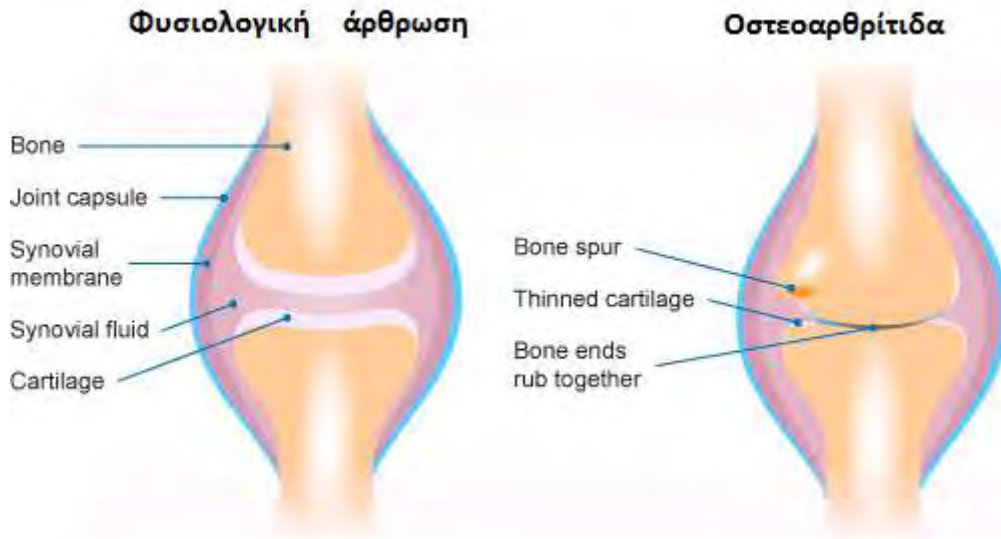
1.2 Αρθρικός Χόνδρος

Ο χόνδρος είναι ένας αδιαφανής, ελαστικός, λείος και υγρός συνδετικός ιστός που βρίσκεται στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα. Εντοπίζεται στα αυτιά, στους σπονδύλους, στη μύτη, στον αγκώνα, στο θωρακικό κλωβό και στις

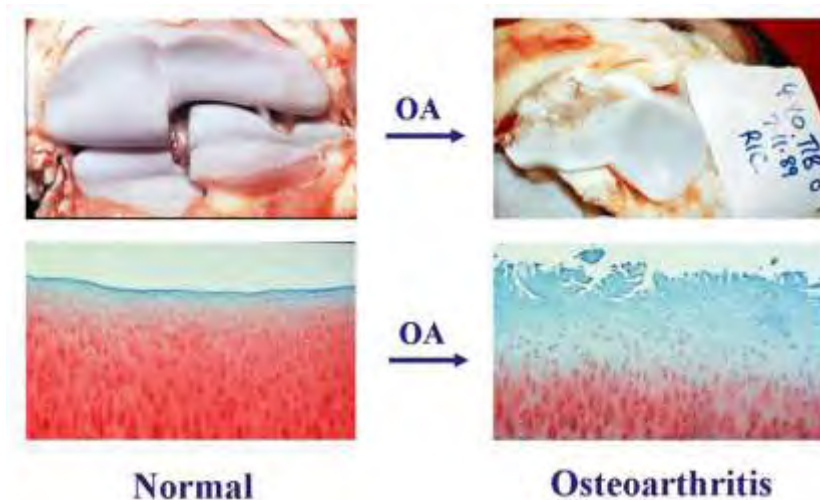
αρθρώσεις μεταξύ των οστών, όπου και μιλάμε για αρθρικό χόνδρο.

Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος αποτελείται από νερό σε ποσοστό 70% και από εξωκυττάρια ουσία (Extracellular Matrix, ECM). Η εξωκυττάρια ουσία συντίθεται από συγκεκριμένα κύτταρα που ονομάζονται χονδροβλάστες, από κολλαγόνο και από πρωτεογλυκάνες. Κάθε χονδροβλάστης υφίσταται μια ή δυο περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις για το σχηματισμό μιας μικρότερης ομάδας ώριμων κυττάρων. Τα ώριμα κύτταρα του χόνδρου είναι γνωστά ως χονδροκύτταρα. Η θρέψη του χόνδρου και η πρόσληψη των απαραίτητων συστατικών για τα χονδροκύτταρα, σε αντίθεση με τους άλλους ιστούς, δεν γίνεται με αιμοφόρα αγγεία, αλλά με διάχυση, που επιταχύνεται με την πίεση του χόνδρου, καθώς ο αρθρικός χόνδρος στερείται αγγείωσης. Τα χονδροκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, και παράγουν τόσο τα δομικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας όσο και τα ένζυμα που την αποικοδοούν (Hag et al, 2003). Το γεγονός ότι δεν έχει αιμοφόρα αγγεία εξηγεί γιατί θεραπεύεται τόσο αργά. Υπάρχουν τρία είδη χόνδρων που διαφέρουν ως προς τη σύστασή τους: ο υαλώδης χόνδρος, ο ελαστικός χόνδρος και ο ινώδης χόνδρος. (Martinez et al, 2008).

Στην οστεοαρθρίτιδα παρατηρείται διάβρωση του αρθρικού χόνδρου και απώλεια της ακεραιότητας του ιστού. Αποδομείται η εξωκυττάρια ουσία, αναστέλλεται η σύνθεση της και έτσι επιταχύνεται η διάβρωση του χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα προσπαθούν να επιδιορθώσουν την κατεστραμμένη εξωκυττάρια ουσία αλλά διαθέτουν μικρή αναγεννητική και διορθωτική ικανότητα (Guangyi et al, 2013). Επομένως αυξάνεται η οσμωτική πίεση σε εκείνο το σημείο και έτσι προκύπτει η διόγκωση της άρθρωσης (Ulrich-Vinther et al, 2003). Μειώνεται το πάχος του κολλαγόνου και απελευθερώνονται πρωτεογλυκάνες από τη θεμέλια ουσία. Παρατηρείται ακόμη και δημιουργία οστεόφυτων. Ο χόνδρος χάνει σιγά σιγά την ακεραιότητα του και οδηγείται στην καταστροφή. Όσο ο χόνδρος καταστρέφεται, τόσο εκτίθεται το οστό και φθείρεται και προκύπτουν διάφορα μικροκατάγματα. Το αρθρικό υγρό εισέρχεται στα κατάγματα και έτσι έχουμε υποχόνδριες κύστες (Felson et al, 2004), (εικόνα 3, 4).



Εικόνα 3: <http://www.aihw.gov.au/osteoarthritis>

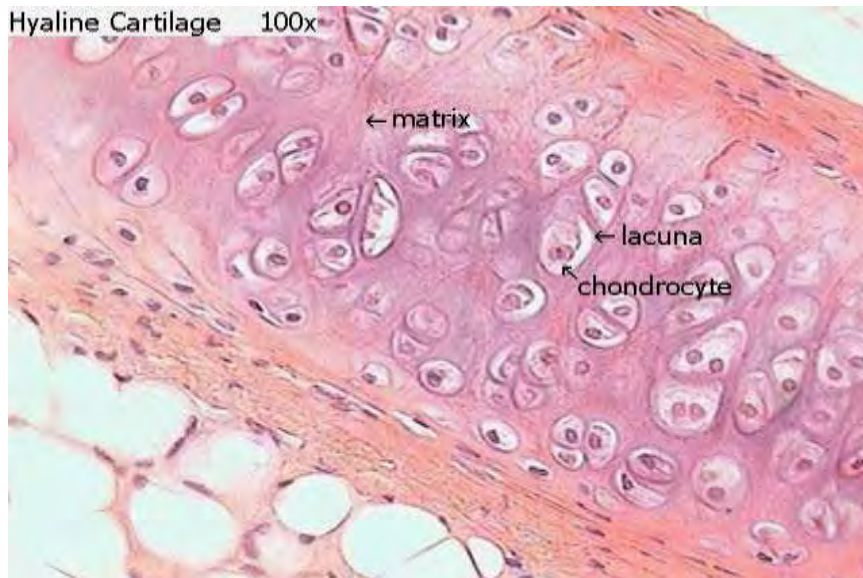


Εικόνα 4: <http://www2.ca.uky.edu/gluck>

1.3 Χονδροκύτταρα

Τα χονδροκυττάρα, είναι ο μόνος τύπος κυττάρου που εντοπίζεται στο χόνδρο. Έχουν χαμηλή μεταβολική και αναγεννητική ικανότητα, επιβιώνουν κάτω από σχετικώς υποξικές συνθήκες και υπό την απουσία αγγειακού εφοδιασμού. Τα κύτταρα αυτά, έχουν την τελική ευθύνη για την αναδιαμόρφωση και τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του χόνδρου (Goldring et al, 2007). Τα πλήρως ώριμα χονδροκύτταρα τείνουν να είναι στρογγυλά, και μπορούν να συγκεντρωθούν μαζί σε μικρές ομάδες μέσα στο δίκτυο του χόνδρου. Μπορούν να οργανωθούν με διάφορους τρόπους σχηματίζοντας έτσι και διαφορετικούς τύπους

χόνδρου. (Karlsson et al, 2007). Στην ΟΑ αν και η κυτταρική απόκριση των χονδροκυττάρων είναι πολύπλοκη, ωστόσο περιλαμβάνει κυρίως, πολλαπλασιασμό και απόπτωση των κυττάρων, καθώς και αλλαγές στη συνθετική και αποικοδομητική τους δραστηριότητα. Επιπλέον παρατηρείται μια γενική αλλαγή στο φαινότυπο τους, και σχηματισμός οστεόφυτων (Sandell et al, 2001).



Εικόνα 5: <http://imgarcade.com/hyaline-cartilage>

Όπως ήδη προαναφέρθηκε μεταξύ των προδιαθεσικών παραγόντων που συμβάλουν στην ανάπτυξη ΟΑ είναι και η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), και η προχωρημένη γλυκοζυλίωση των τελικών προϊόντων του προκαλεί εκφύλιση και καταστροφή του χόνδρου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου.

1.4 Οξειδωτικό στρες

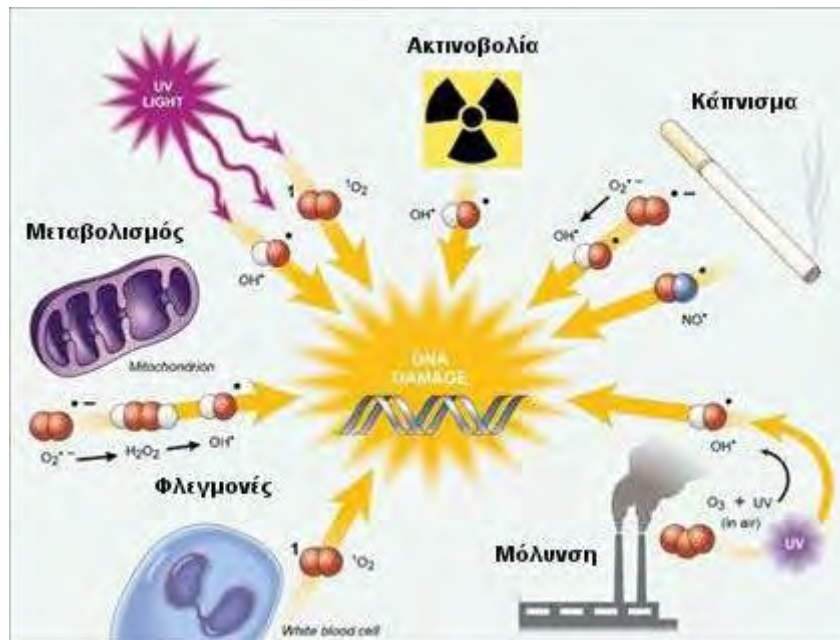
Το οξειδωτικό στρες επέρχεται σαν αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών, όταν η αντιοξειδωτική ικανότητα και λειτουργία του οργανισμού είναι φυσιολογικές, ή σαν αποτέλεσμα φυσιολογικής παραγωγής ελεύθερων ριζών αλλά μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ωστόσο μπορεί να οφείλεται στο συνδυασμό και των δυο αυτών συνθηκών καθώς και στην ανισορροπία διαφορετικών μεταξύ τους αντιοξειδωτικών συστατικών (Deaton et al, 2003). Με τον όρο ελεύθερη ρίζα εννοείται οποιαδήποτε χημική ουσία, που έχει χάσει ένα ηλεκτρόνιο και για αυτό το λόγο γίνεται εξαιρετικά δραστική επειδή έχει την τάση να δεσμεύει άλλα άτομα ή μόρια. Οι περισσότεροι γνωστές δραστικές ελεύθερες

ρίζες είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου (Yiannakopoulou, 2009), (Valko et al, 2007).

<u>Ονοματολογία</u>	<u>Μοριακός τύπος</u>
<u>Δραστικές μορφές οξυγόνου</u>	
$O_2^{\cdot -}$	Ανιόν σουπεροξειδίου
OH^{\cdot}	Ρίζα υδροξυλίου
ROO^{\cdot}	Ρίζα υπεροξειδίου
HOO^{\cdot}	Ρίζα υδροϋπεροξειδίου
RO_2^{\cdot}	Ρίζα υπεροξυλίου
RO^{\cdot}	Ρίζα αλκοξειδίου
HOCL	Υποχλωριώδες οξύ
HOBr	Υποβρωμιώδες οξύ
O_2	Μοριακό οξυγόνο
H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
<u>Δραστικές μορφές αζώτου</u>	
NO^{\cdot}	Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NO_2^{\cdot}	Ρίζα διοξειδίου του αζώτου
$ONOO^-$	Υπεροξεινιτρώδες

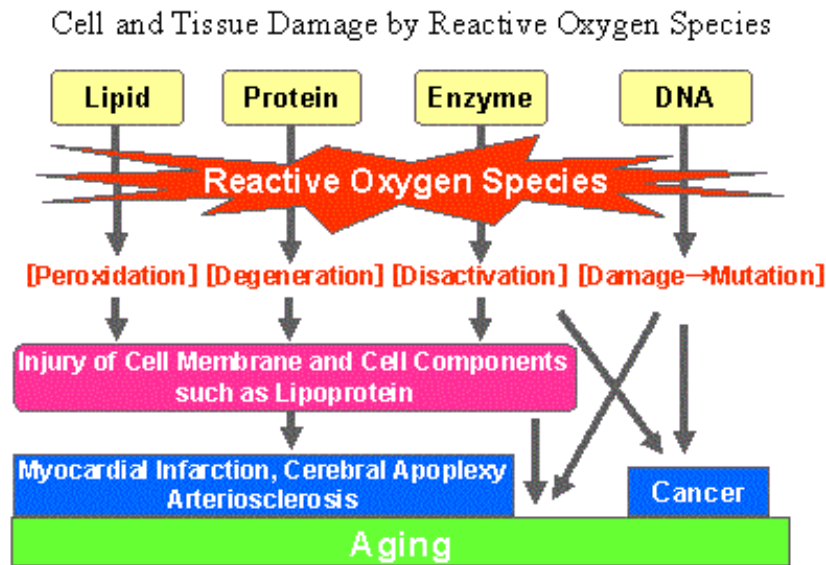
Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

Οι ελεύθερες ρίζες είναι τα φυσιολογικά προϊόντα του μεταβολισμού του οξυγόνου, και είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμεύουν στην άμυνα καθώς οι δραστικές ρίζες οξυγόνου ενισχύουν την βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων. Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό (ιδιαίτερα το H_2O_2), την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Linnane et al. 2004). Όταν όμως ο οργανισμός βρεθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες και τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια, τότε ο ευεργετικός τους ρόλος αναιρείται και γίνονται καταστροφικές για τον οργανισμό. Οι κυριότεροι παράγοντες που ευθύνονται για την επιτάχυνση του οξειδωτικού στρες και τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού είναι το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ηλιακή ακτινοβολία και διάφορων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η λήψη τροφών φτωχών σε αντιοξειδωτικά, καθώς και διάφορα φάρμακα.



Εικόνα 6: <http://kardiologika.blogspot.gr/2013>

Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου καθώς και από το βαθμό του οξειδωτικού στρες και περιλαμβάνουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προσαρμογή του κυτταρικού οργανισμού με ρύθμιση των αμυντικών συστημάτων, κυτταρικό θάνατο καθώς και διαδικασία γήρατος. Ακόμη παρατηρείται και βλάβη σε όλους ή κάποιους μοριακούς στόχους όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και υδατάνθρακες. (Halliwell, 2007). Το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών και κατά συνέπεια αλλαγές στις βιολογικές ιδιότητες της μεμβράνης, διαταράσσοντας τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και αυξάνοντας την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμη το οξειδωτικό στρες μπορεί να μεταβάλει το επίπεδο της δομής των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλάνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $\text{OH}\cdot$, το $\text{RO}\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι περισσότερες βλάβες είναι μη αναστρέψιμες με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών (Dalle-Donne et al, 2006). Στην περίπτωση του DNA, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες), όσο και στην D-ριβόζη του μορίου, θραύσεις στο DNA, καθώς και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Halliwell et al, 2007).



Εικόνα 7: <http://www.cosmobio.co.jp/export>

Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και κατέχει κάποιο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια διάφορων παθολογικών καταστάσεων. Μερικές από τις πιο σημαντικές ασθένειες που συνδέονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και σημαντικές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία είναι η γήρανση, η παχυσαρκία, η υπέρταση, ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Parkinson, Alzheimer, Huntington), η αθηροσκλήρυνση, το AIDS, η ηπατίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, και η οστεοαρθρίτιδα (Valko et al, 2007).



Εικόνα 8: <http://www.newswire.com>

1.5 Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία έχει την ικανότητα να επιβραδύνει ή να εμποδίζει την οξείδωση άλλων μορίων. Τα αντιοξειδωτικά δρουν δανείζοντας ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παρέχουν μια θωράκιση στο σώμα μας (μια δηλαδή αντιοξειδωτική προστασία). Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Συγκεκριμένα ασκούν αντικαρκινική δράση, μπλοκάρουν δηλαδή ή εμποδίζουν την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιούν καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα και επιβραδύνουν τους μηχανισμούς καρκινογένεσης. Ακόμη διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου. Τέλος δρουν καρδιοπροστατευτικά και αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών (Halliwell B. 2001).

Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Στα αντιοξειδωτικά με ενζυμικούς μηχανισμούς δράσης περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως: η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η

υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Στα αντιοξειδωτικά που δρουν με μη ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν μόρια τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες όπως: η βιταμίνη E, η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, η β-καροτίνη, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 (σαρδέλα, σόγια) και το σελήνιο (Halliwell B. 2001).

1.6 Οξειδωτικό στρες, caveolin-1 και οστεοαρθρίτιδα

Σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, έχει παρατηρηθεί ότι οι παθήσεις των αρθρώσεων, όπως η οστεοαρθρίτιδα, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ROS. Η φλεγμονή και η σωματική καταπόνηση, που λειτουργούν ως παράγοντες κινδύνου για την ΟΑ, έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένη ρύθμιση των επιπέδων ROS. Η αυξημένη αυτή ρύθμιση των ROS μπορεί να οδηγήσει σε πολλές διαφορετικές επιπτώσεις στα χονδροκύτταρα, και στην αποδόμηση του χόνδρου (Christoph et al, 2010). Ελεύθερες ρίζες όπως το NO έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση των χονδροκυττάρων. Σε πείραμα μάλιστα που έγινε στην Ισπανία, μεταξύ οστεοαρθρικών και υγιών ατόμων, παρατηρήθηκε ότι τα χονδροκύτταρα των ασθενών εμφάνιζαν πυρηνικές και κυτταροπλασματικές αλλαγές, που είναι χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Παρατηρήθηκε ότι ο αρθρικός χόνδρος των ασθενών είχε υψηλότερο ποσοστό αποπτωτικών χονδροκυττάρων από ότι των φυσιολογικών ατόμων (Blanco et al, 1998). Σε άλλη μελέτη, η οποία συνέκρινε οστεοαρθρικούς ασθενείς με υγιή άτομα της ίδιας ηλικιακής ομάδας, παρατηρήθηκε στους ασθενείς, αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως φάνηκε από τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα των TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) και σημαντική μείωση αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως της βιταμίνης C, της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) (Maneesh et al, 2005).

Το οξειδωτικό στρες βρέθηκε ακόμη να συσχετίζεται και με τελομερική αστάθεια και κυτταρική γήρανση σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (Brandl et al, 2010). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε μάλιστα σε μελέτη που έγινε σε πανεπιστήμιο της Ιαπωνίας, στην οποία ελήφθησαν δείγματα αρθρικού χόνδρου από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα και υγιή άτομα. Στους ασθενείς, κατά τη διάρκεια της συνεχούς καλλιέργειας των χονδροκυττάρων και υπό την επίδραση ελεύθερων ριζών οξυγόνου, παρατηρήθηκε μείωση του μήκους των τελομερών και της παραγωγής γλυκοζαμινογλυκάνης (GAG), γήρανση και δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων. Οι επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στον πολλαπλασιασμό και τη βιολογία των τελομερών ήταν μάλιστα πιο έντονες σε γηρασμένα κύτταρα. Αντίθετα υπό την επίδραση αντιοξειδωτικών παραγόντων παρατηρήθηκε επιμήκυνση του μήκους των τελομερών και αύξηση της αντιγραφής των χονδροκυττάρων (Kazuo et al, 2005). Η δυσλειτουργία και η απόπτωση των

χονδροκυττάρων, και η υπεροξειδωση των λιπιδίων, παρατηρήθηκαν επίσης και μετά από έκθεση μοσχευμάτων αρθρικού χόνδρου από ώριμα βοοειδή, σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), (Khan et al, 2007). Επιπλέον πειράματα που έγιναν σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα χοίρου έδειξαν αυξημένη καταστροφή του πυρηνικού DNA και του χόνδρου, σε σχέση με μη οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, υποδεικνύοντας έτσι για άλλη μια φορά τη σημαντική εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου και στην ανάπτυξη της νόσου (Chen et al, 2008). Επομένως αντιοξειδωτικοί παράγοντες και παρεμβάσεις, που αποσκοπούν στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης στον αρθρικό χόνδρο, πιθανόν να είναι αποτελεσματικοί στην πρόληψη, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

Πέρα από τις διαφορετικές επιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί το οξειδωτικό στρες στα χονδροκύτταρα και στην αποδόμηση του χόνδρου, οι επιδράσεις του παρατηρήθηκαν και σε επίπεδο πρωτεϊνών. Παράγοντες οξειδωτικού στρες μπορούν να μεταβάλλουν τη δομή αλλά και τη λειτουργία διάφορων πρωτεϊνών (Dalle-Donne et al, 2006). Αρκετές μάλιστα από αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται να σχετίζονται και με την εκδήλωση της ΟΑ. Μια από τις πρωτεΐνες αυτές η caveolin-1.

Η caveolin-1 αποτελεί ένα από τρία μέλη της οικογένειας των καβεολινών που περιλαμβάνει ακόμη τις caveolin-2 και 3. Όλα τα μέλη είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες με παρόμοια δομή. Η caveolin-1 σχηματίζει ολιγομερή και συνδέεται με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια σε ορισμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας στο σχηματισμό των μικροσπηλαίων. Η caveolin-1 είναι το κύριο δομικό συστατικό των μικροσπηλαίων της μεμβράνης, απαραίτητη για τη δομική ακεραιότητα και τη λειτουργία τους. Φυσιολογικά η caveolin-1 κινείται μέσω των μικροσπηλαίων σε κυστίδια πολλαπλών εσωτερικών διαμερισμάτων και έπειτα ανακυκλώνεται πίσω προς την επιφάνεια του κυττάρου (Pingsheng et al, 2002).

Σε ΟΑ χονδροκύτταρα ανθρώπου και αρουραίου, βρέθηκε ότι η caveolin-1 σχετίζεται θετικά με την εκφύλιση του χόνδρου. Η caveolin-1 έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου διάφορων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αρθρικών χονδροκυττάρων. Επιπλέον, η caveolin-1 έχει προταθεί ότι μεσολαβεί στην επαγόμενη από το στρες πρόωρη γήρανση, σε ινοβλάστες ποντικού αλλά και σε ανθρώπινα αρθρικά χονδροκύτταρα μετά από απόκριση σε οξειδωτικό στρες (Heathfield et al, 2008). Το H_2O_2 υπέρ-ρυθμίζει τα επίπεδα RNA και πρωτεΐνης της caveolin-1 ενώ είναι γνωστό ότι επίδραση H_2O_2 προκαλεί έντονη έκφραση γηρασμένων φαινοτύπων, όπως: αλλοίωση κυτταρικής μορφολογίας, διακοπή κυτταρικής ανάπτυξης, διάβρωση τελομερών, και ειδική γήρανση που σχετίζεται με τη δράση της β-γαλακτοσιδάσης. Η επίδραση δε με antisense-ολιγονουκλεοτίδιο, καταστέλλει τη δράση της caveolin-1 και αναστέλλει την προκαλούμενη από το οξειδωτικό στρες πρόωρη γήρανση. Τα ευρήματά αυτά υποδηλώνουν ότι το

οξειδωτικό στρες επάγει χαρακτηριστικά της πρόωρης γήρανσης στα χονδροκύτταρα, με τη μεσολάβηση, τουλάχιστον εν μέρει, της caveolin-1. Η εμπλοκή αυτή της caveolin-1 καθιστά πιθανή την συμμετοχή της στην παθογένεια της OA (Sheng-Ming et al, 2006).

1.7 Σκοπός

Σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του ήπιου εξωγενούς οξειδωτικού στρες στην φυσιολογία των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων και η πιθανή εμπλοκή της caveolin-1 στην απόκριση τους σε αυτό. Για το σκοπό αυτό έγινε επίδραση με H_2O_2 σε χονδροκύτταρα ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα και σύγκριση με χονδροκύτταρα υγιών. Μελετήθηκαν συγκεκριμένα:

- Οι βλάβες στο DNA έπειτα από επίδραση H_2O_2 μέσω του ανοσοϊστοχημικού πρωτοκόλλου σηματοδότησης της ιστόνης $\gamma H_2A\chi$, γνωστού δείκτη θραύσεων της διπλής έλικας του DNA.
- Η πρωτεϊνική έκφραση της caveolin-1 μέσω Western καθώς και ο κυτταρικός εντοπισμός της μέσω ανοσοϊστοχημικού πρωτοκόλλου σηματοδότησης με κατάλληλο αντίσωμα.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.2 Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα οστεοαρθρικού αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ελήφθησαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω οστεοαρθρίτιδας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Όλα τα δείγματα χαρακτηρίζονταν από την παρουσία οστεόφυτων και η λήψη του δείγματος πραγματοποιήθηκε από την περιοχή γύρω από τα οστεόφυτα. Από κάθε δείγμα ΟΑ χόνδρου έγινε απομόνωση χονδροκυττάρων και καλλιέργεια αυτών. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 1 δείγμα από ασθενή με οστεοαρθρίτιδα και 1 δείγμα-control από υγιή αρθρικό χόνδρο. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως χονδροδυσπλασία, ΟΑ μετά από σηπτική αρθρίτιδα και μετά-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

2.3 Καλλιέργεια χονδροκυττάρων

Η απομόνωση και η 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 των δειγμάτων από το χειρουργείο, ο ιστός υπεβλήθη σε ενζυμική κατεργασία προκειμένου να απελευθερωθούν τα χονδροκύτταρα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε προνάση, η οποία διασπά τις πρωτεογλυκάνες ώστε να απελευθερωθούν οι ίνες του κολλαγόνου, και κατόπιν κολλαγενάση, η οποία οδηγεί σε διάσπαση των κολλαγόνων ινών και απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει. Για την καλλιέργεια των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες των 25cm³ και θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK), το οποίο διατηρείται στους 4°C. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο, ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Πιο αναλυτικά η διαδικασία είναι η εξής:

Υλικά απομόνωσης και καλλιέργειας των χονδροκυττάρων

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Στο θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, ο οποίος παρέχει παράγοντες που συμβάλλουν στον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM.

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (HyClone)
- Προνάση (Roche)
- Κολλαγενάση (Roche)

Πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας χονδροκυττάρων

- Ξέπλυμα του ιστού με PBS για απαλλαγή από υπολείμματα του χειρουργείου
- Τεμαχισμός του ιστού για απελευθέρωση των κυττάρων
- Μεταφορά των κομματιών σε plates
- Προσθήκη 5mg/ml προνάσης μαζί με 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 5mg/ml κολλαγενάσης μαζί με 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 90 λεπτά
- Απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των κολλαγόνων ινών
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon, φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 7 λεπτά
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm³ μαζί με 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο.

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 48 ώρες προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και αποκτούν πεπλατυσμένο, πολυγωνικό σχήμα. Όταν τα χονδροκύτταρα αύξησαν τον πληθυσμό τους και κάλυψαν την επιφάνεια της φλάσκας, τότε γινόταν είτε ανακαλλιέργεια, είτε χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA, πρωτεϊνών, υλικού για CHIP και για την πραγματοποίηση των επιδράσεων με διάφορες χημικές ουσίες.

Η ανακαλλιέργεια των χονδροκυττάρων γινόταν μετά από 7 ημέρες περίπου ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και των αριθμό των κυττάρων που είχαν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από μία έως δυο ανακαλλιέργειες γινόταν και κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των χονδροκυττάρων απαιτούνταν η αποκόλληση τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ και κατόπιν προσθήκη 1ml θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησης τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμειναν στον κλίβανο για 5 λεπτά μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο συνεχώς, και στη συνέχεια για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από τη θρυψίνη και ακολούθως γίνονταν

διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς συλλογή των κυττάρων. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο σε πλάκα Newbauer. Αναμιγνύονταν 20μl από το κυτταρικό ελαιώρημα 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 αυτόν τον τρόπο υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού ελαιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση $1-2 \times 10^6$ κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους -20°C για 4 ώρες και κατόπιν στους -80°C για 24 ώρες και τελικά στους -150°C .

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξη τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C και άμεσα μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το σωληνάριο στη συνέχεια 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 κλίβανο.

2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας

Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)
30mM Tris (Invitrogen)
10% Glycerol (Invitrogen)
150mM NaCl (Sharlau)
1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών (Roche)
- Αναστολείς φωσφατασών (Roche)

Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης
- Επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά του περιεχομένου σε 15ml falcon
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 4 λεπτά

- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml παγωμένου PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3000 στροφές για 5 λεπτά
- Προσθήκη 30ml διάλυμα λύσης* και διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 30 λεπτά καθώς και ανάδευση αυτής κάθε 5 λεπτά σε vortex
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο erpendorf
- Φωτομέτρηση της πρωτεΐνης και αποθήκευση στους -80 °C

*Διάλυμα λύσης (Lysis buffer):

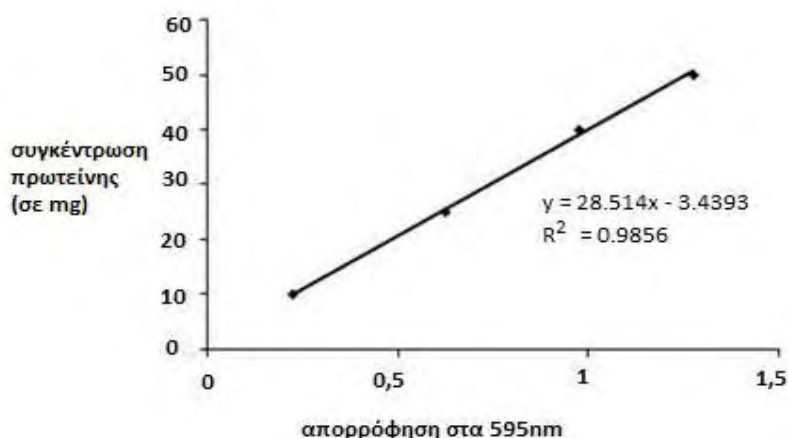
- 10mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 1mM EDTA
- 0,5mM EGTA
- 1% Triton X-100
- 0,1% sodium deoxycholate
- 0,1% SDS
- 140mM NaCl

Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών-μέθοδος Bradford

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκε έγινε με τη χρήση υλικών της εταιρίας Bio-Rad (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. Πιο συγκεκριμένα:

- Ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl dH₂O
- Κατόπιν προστέθηκαν 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα πρωτεΐνης
- Το μίγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Τέλος έγινε μεταφορά σε κυβέττα για φωτομέτρηση στα 595nm
- Από τις τιμές των απορροφήσεων των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ



Εικόνα 9: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες άγνωστης συγκέντρωσης, ποσότητα 5μl από την πρωτεΐνη προστέθηκε σε 495μl διαλύματος Bradford (5%) και ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου- SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA, θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μιας 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 δυο λόγους. Καταρχάς η πηκτή καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας- απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό και 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 μεθυλενοδιακρυλαμιδίου, στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Σε μια 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 κύριες 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.

Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρώσης μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO_{S.A})

Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάζονται με την προσθήκη 5μl διαλύματος χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen) και 2μl 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 στη πηκτή μεταδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό θετικό φορτίο και έτσι κατευθύνεται 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 95°C
- Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στην αριστερή άκρη φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βάρων (Precision Plus Protein Stan-darts, Bio-Rad)
- Παράλληλα με τη θέρμανση των δειγμάτων προετοιμάζουμε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen) το οποίο θα τοποθετεί στη συσκευή. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης δημιουργεί ένα πρότυπο μετακίνησης των πρωτεϊνών. Η οξειδωση των πρωτεϊνών εμποδίζεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικού (NuPage Antioxidant, Invitrogen).
- Τέλος ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 120V για 35 περίπου λεπτά
- Στη διάρκεια αυτή προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά για την ανασοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot).

2.5 Ανασοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Η ανασοαποτύπωση των πρωτεϊνών βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μια ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθάει τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο. Μια ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X, η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

Υλικά ανασοαποτύπωσης

- Διάλυμα μεταφοράς
5% Transfer buffer (Nu Page Transfer buffer, Invitrogen)
1% μεθανόλη (Applichem)
0,1% αντιοξειδωτικό (Invitrogen)
- Χαρτί Whitman
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Biosciences)
- Σφουγγαράκια
- Χρωστική μεμβράνης (Ponseau Sigma)
- Διάλυμα πλύσης TBS-Tween

- 50mM Tris (Invitrogen)
- 150mM NaCl (Scharlau)
- 1mM EDTA (Scharlau)
- 0,05% Tween (Bio-Rad)
- Σκόνη μπλοκαρίσματος (Blotting Grade Blocker, Bio-Rad)
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
- Developer buffer
- Φιλμ ακτίνων X
- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare)
- Πρώτο αντίσωμα για τα υπό μελέτη γονίδια
Caveolin-1
GAPDH
- Δεύτερο αντίσωμα
Goat anti-mouse HRP (Invitrogen)

Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

- Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε transfer buffer τα εξής υλικά:
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (5cm * 8cm)
Σφουγγαράκια
Χαρτιά Whitman (5cm * 8cm)
Πηκτή πολυακρυλαμιδίου
- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται στιβάδα από: 3 σφουγγαράκια → χαρτί Whitman → πηκτή πολυακρυλαμιδίου → μεμβράνη νιτροκυτταρίνης → χαρτί Whitman → 3 σφουγγαράκια
- Τοποθέτηση της στο κουτί Xcell Blot Module και στη συσκευή Xcell Surelock με διάλυμα μεταφοράς στη μέση και δις απεσταγμένο νερό γύρω-γύρω.
- Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών στα 30V και στα 200mM για 1 ώρα και 40 λεπτά
- Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5 gr σκόνης μπλοκαρίσματος σε 50ml TBST) ή σε BSA 5% αν το αντίσωμα αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Επώαση στους 4°C με ολονύκτια ανάδευση.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση

- Επώαση της μεμβράνης στο κατάλληλο πρώτο αντίσωμα στους 4°C με ολονύκτια ανάδευση (το αντίσωμα διαλύεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 15 λεπτά και επιπλέον 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση
- Επώαση της μεμβράνης στο κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα με ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 1 λεπτό σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10μl 3% H₂O₂ και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη 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. Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης, 3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης, 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης και 3 λεπτά στο νερό.

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

2.6 Ανοσοϊστοχημεία

Η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας είναι μια τεχνική κατά την οποία ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς το ειδικό αντιγόνο-στόχο και κατόπιν ένα δεύτερο σσημασμένο με χρωμογόνο αντίσωμα καθιστά ορατό το σύμπλεγμα στο μικροσκόπιο. Η ανίχνευση των συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος βασίστηκε σε σηματοδοτούμενα με HRP δευτερογενή αντισώματα.

Υλικά ανοσοϊστοχημείας

- Formaldehyde 3,7%
- 1% Triton X-100
- PBS/0,02%Tween²⁰

- PBS/0,02%Tween²⁰/ 1% BSA
- Διάλυμα πλυσσης TBS pH= 7.6
50mM Tris (Invitrogen)
150mM NaCl (Scharlau)
1mM EDTA (Scharlau)
- BSA (Sigma)
- Πρώτο αντίσωμα: A11008 Alexa Fluor 488 (red) goat anti-mouse (1:500)→
γH₂AX
- Δεύτερο αντίσωμα: A21203 Alexa Fluor 594 (green) donkey anti-mouse
(1:500) →cav-1

Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml TBS
- Προσθήκη 250μl formaldehyde 3,7% για 20 λεπτά σε θερμοκρασία
δωματίου
- Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα TBS για 1 λεπτό (τρεις φορές)
- Προσθήκη 150μl 1% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά
- Ξέπλυμα με 1ml PBS/0,02%Tween²⁰ για 5 λεπτά
- Επώαση των κυττάρων με 1ml PBS/0,02%Tween²⁰/ 1% BSA για 10
λεπτά
- Επώαση των κυττάρων με 100μl από το πρωτογενές αντίσωμα
(αραίωση 1:500) σε 500μl PBS/0,02%Tween²⁰/ 1% BSA για 45 λεπτά
- Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα TBS για 1 λεπτό (τρεις φορές)
- Επώαση των κυττάρων με 100μl από το δευτερογενές αντίσωμα
(αραίωση 1:500) σε 500μl PBS/0,02%Tween²⁰/ 1% BSA για 45 λεπτά
στο σκοτάδι
- Ξέπλυμα με 1ml PBS/0,02%Tween²⁰ για 5 λεπτά
- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS για 5 λεπτά
- Αφυδάτωση των κυττάρων και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε
πλακάκια με τη βοήθεια κόλλας
- Τέλος ακολουθεί παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και
εξαγωγή συμπερασμάτων
- Φύλαξη των δειγμάτων στους 4⁰C στο σκοτάδι

2.7 Επίδραση με H₂O₂ σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων

Φυσιολογικά τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν με τη διαδικασία που αναλύθηκε προηγουμένως και είχαν καλύψει το 60-80% της φλάσκας τοποθετήθηκαν σε πλάκα 6 πηγαδιών, προκειμένου να γίνει η επίδραση με το H₂O₂, το οποίο προκαλεί κύρια βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα θράυσεις στη μια ή/και στις δύο αλυσίδες της έλικας.

Η μεταφορά από τη φλάσκα στα six well plates ήταν η εξής:

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- Προσθήκη στη φλάσκα 1ml θρυψίνης και επώαση 3-4 λεπτά στον κλίβανο ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (8-10ml), ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά σε falcon και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 10ml PBS στο ίζημα
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 2000 στροφές
- Αφαίρεση του PBS και προσθήκη θρεπτικού υλικού (5ml)
- Μοίρασμα στα six well plates

Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 70-80% της επιφάνειας της καλλιέργειας έγινε επίδραση με 200μM H₂O₂ για 1 ώρα και στη συνέχεια αφού απομακρύνθηκε το H₂O₂, τα κύτταρα αφέθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό για να ανακάμψουν. Η ανάκαμψη των κυττάρων μελετήθηκε μέσω της επιδιόρθωσης των βλαβών έπειτα από 1ώρα(h), 3h, 6h, 24h, και 48h. Η μελέτη έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας για όλες τις χρονικές στιγμές, ακολουθώντας τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Το χρονοδιάγραμμα των επιδράσεων με το H₂O₂ ήταν το εξής:

Control (καμία επίδραση-διατήρηση στο φυσιολογικό θρεπτικό μέσο)	1 (H ₂ O ₂ για 1 ώρα, αφαίρεση και προσθήκη φυσιολογικού θρεπτικού μέσου για 1 ώρα)	2 (H ₂ O ₂ για 1 ώρα, αφαίρεση και προσθήκη φυσιολογικού θρεπτικού μέσου για 3 ώρες)
3 (H ₂ O ₂ για 1 ώρα, αφαίρεση και προσθήκη φυσιολογικού θρεπτικού μέσου για 6 ώρες)	4 (H ₂ O ₂ για 1 ώρα, αφαίρεση και προσθήκη φυσιολογικού θρεπτικού μέσου για 24 ώρες)	5 (H ₂ O ₂ για 1 ώρα, αφαίρεση και προσθήκη φυσιολογικού θρεπτικού μέσου για 48 ώρες)

Μετά τη λήξη των διαφορετικών χρονικών στιγμών, ακολούθησαν οι διαδικασίες της ανοσοϊστοχημείας και της απομόνωσης των πρωτεϊνών, που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

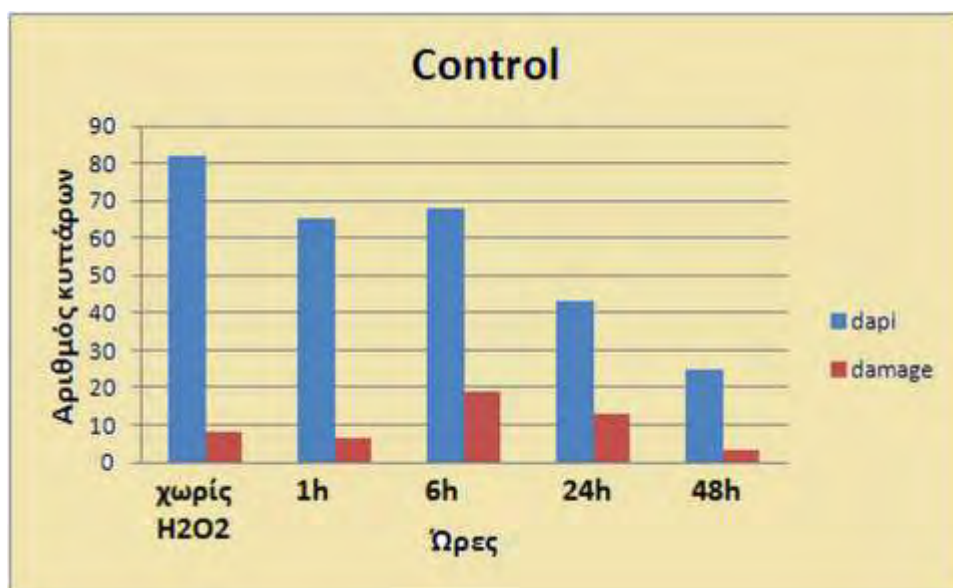
3. Αποτελέσματα

3.1 Τα OA χονδροκύτταρα αδυνατούν να επιδιορθώσουν τις οξειδωτικές βλάβες.

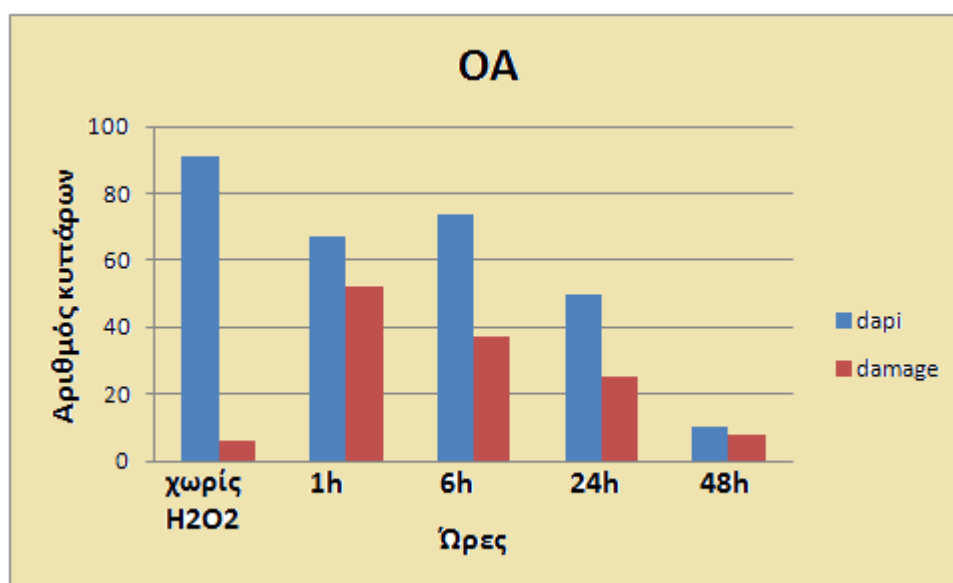
Παράγοντες οξειδωτικού στρες όπως το H_2O_2 φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της OA. Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η συσχέτιση έγινε επίδραση με 200 μ M H_2O_2 για 1h σε καλλιέργεια φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό για 1, 3, 6, 24 και 48 ώρες.

Ακολούθησε μελέτη των βλαβών στο DNA μέσω της χρώσης με γH2Ax ιστόνη, η οποία όπως αναφέρθηκε αποτελεί δείκτη θραύσης της διπλής έλικας του DNA. Στο οπτικό μικροσκόπιο μετρήθηκαν τα κύτταρα που είχαν βλάβες αμέσως μετά την επίδραση του H_2O_2 και έπειτα από 1, 3, 6, 24, 48 ώρες ανάκαμψης τόσο των φυσιολογικών όσο και των OA χονδροκυττάρων. Η μελέτη έδειξε σημαντικές διαφορές στην ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα OA χονδροκύτταρα. (Εικόνα 10). Τα φυσιολογικά και τα κύτταρα OA δεν έχουν μεγάλες διαφορές στο επίπεδο των βλαβών υπό φυσιολογικές συνθήκες (πριν από την επίδραση του H_2O_2 - control). Αντίθετα έπειτα από μια ώρα επίδρασης με τον οξειδωτικό παράγοντα τα μεν χονδροκύτταρα του OA ασθενή δείχνουν εκτεταμένες βλάβες ενώ τα χονδροκύτταρα των φυσιολογικών ακριβώς έπειτα από τη 1 ώρα επίδρασης δεν φαίνεται να έχουν αυξημένες βλάβες σε σχέση με τη συνθήκη control. Μετά από 6 ώρες τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν ένα επίπεδο βλαβών αλλά πολύ χαμηλότερο από το επίπεδο των OA χονδροκυττάρων. Έπειτα από 24 ώρες υπάρχει πολύ μικρός αριθμός φυσιολογικών κυττάρων με βλάβες γεγονός που υποδεικνύει την επιδιόρθωση των βλαβών από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Αντίθετα στα κύτταρα OA οι βλάβες παραμένουν ενώ μειώνεται σημαντικά ο αριθμός των κυττάρων. Μετά από 48 ώρες λίγα OA κύτταρα απομένουν γεγονός που υποδεικνύει κυτταρικό θάνατο, πιθανά μέσω απόπτωσης, λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης των βλαβών (Εικόνα 11).

A



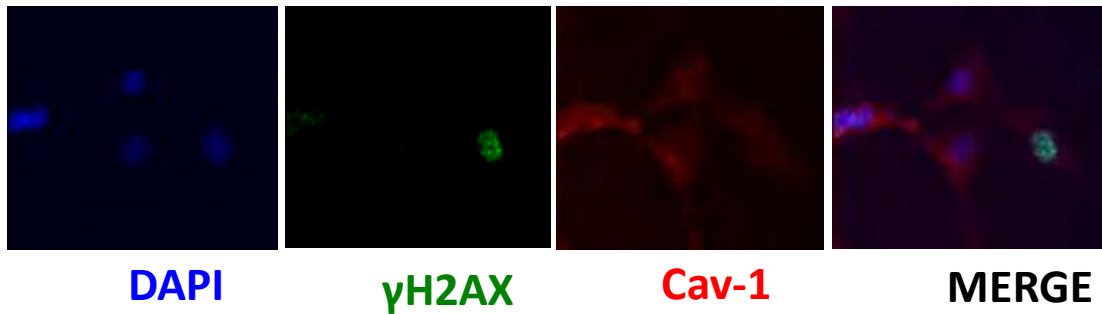
B



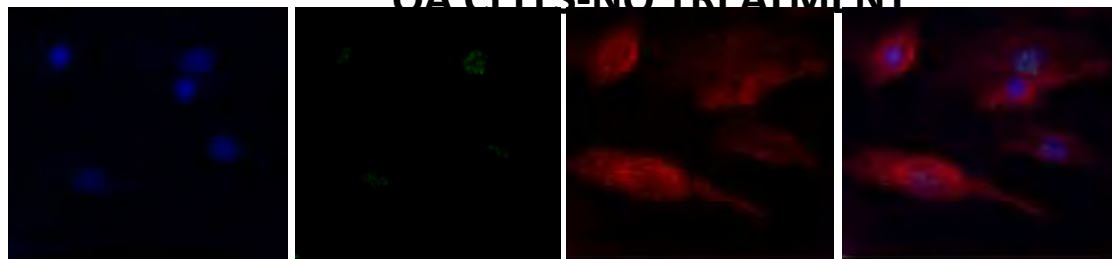
Εικόνα 10: **A.** Αριθμός κυττάρων και βλάβες που έχουν υποστεί φυσιολογικά χονδροκύτταρα. **B.** Αριθμός κυττάρων και βλάβες που έχουν υποστεί OA χονδροκύτταρα.

A

CONTROL CELLS-NO TREATMENT

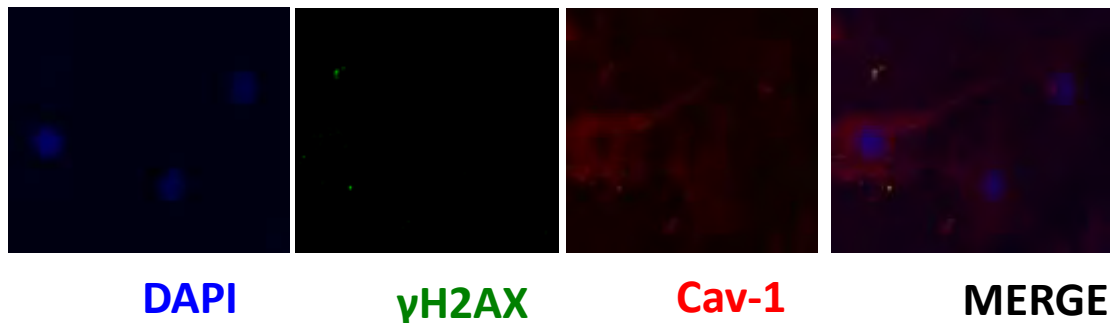


OA CELLS-NO TREATMENT

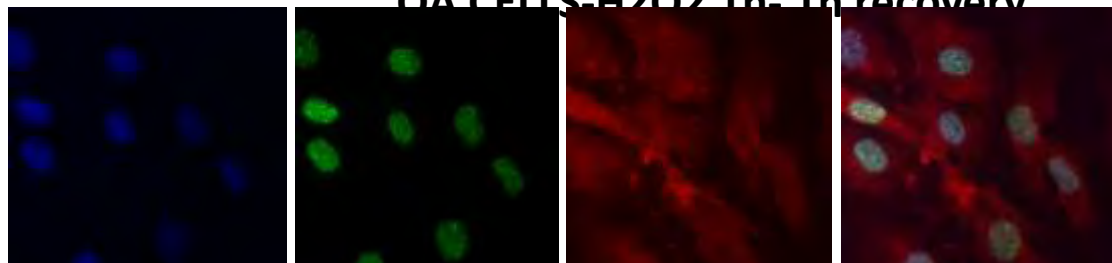


B

CONTROL CELLS-H2O2 1h- 1h recovery

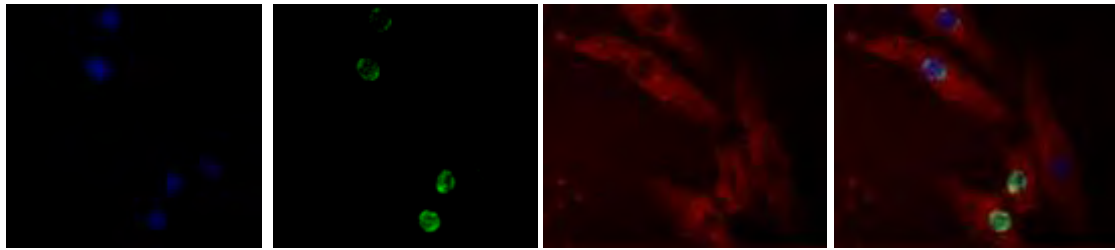


OA CELLS-H2O2 1h- 1h recovery



Γ

CONTROL CELLS-H2O2 1h- 6h recovery



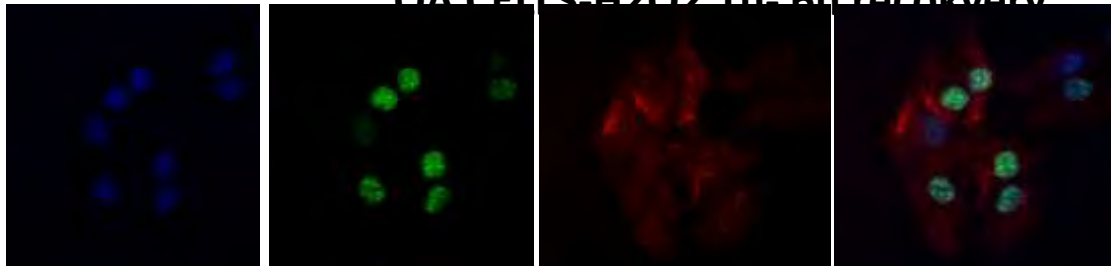
DAPI

γ H2AX

Cav-1

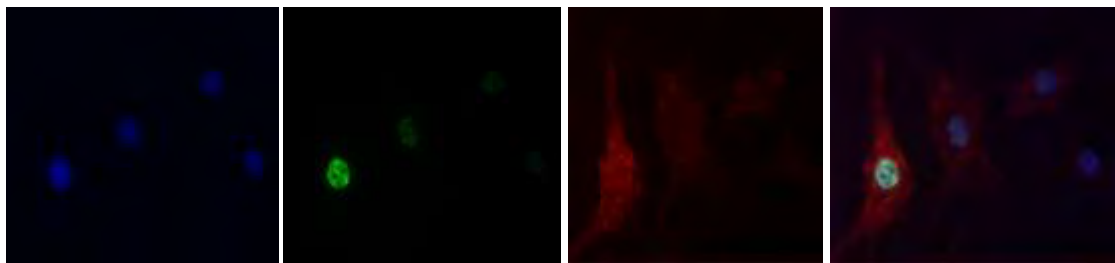
MERGE

OA CELLS-H2O2 1h- 6h recovery



Δ

CONTROL CELLS-H2O2 1h- 24h recovery



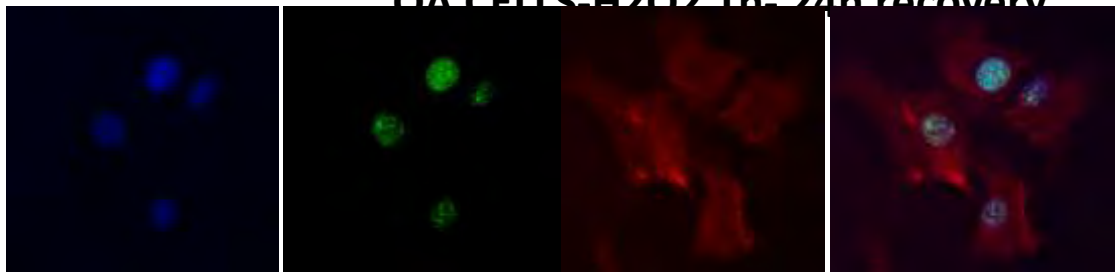
DAPI

γ H2AX

Cav-1

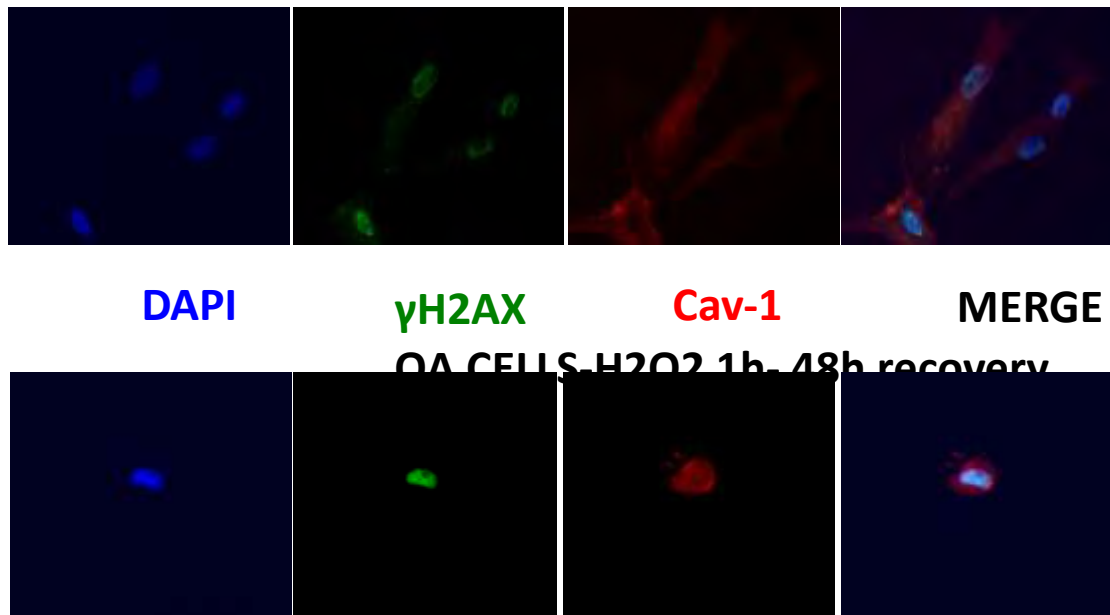
MERGE

OA CELLS-H2O2 1h- 24h recovery



E

CONTROL CELLS-H2O2 1h- 48h recovery

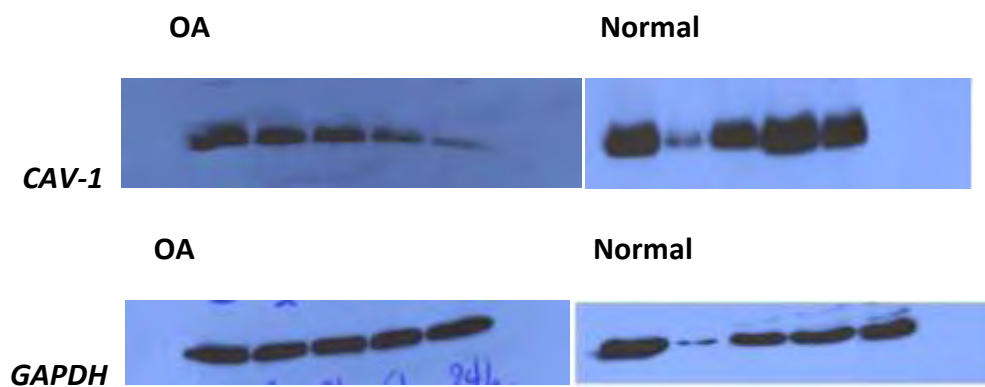


Εικόνα 11: Κυτταρική κατανομή της CAV-1 στα OA και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. **A.** Φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα χωρίς καμία επίδραση με H₂O₂. **B.** Φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα μετά από 1 ώρα επίδραση με H₂O₂ και 1 ώρα ανάρρωση σε θρεπτικό υλικό. **Γ.** Φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα μετά από 1 ώρα επίδραση με H₂O₂ και 6 ώρες ανάρρωση σε θρεπτικό υλικό. **Δ.** Φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα μετά από 1 ώρα επίδραση με H₂O₂ και 24 ώρες ανάρρωση σε θρεπτικό υλικό. **E.** Φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα μετά από 1 ώρα επίδραση με H₂O₂ και 48 ώρες ανάρρωση σε θρεπτικό υλικό.

3.2 Η caveolin-1 εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά στα OA σε σχέση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα έπειτα από το οξειδωτικό στρες.

Έπειτα από την επίδραση του οξειδωτικού στρες σε καλλιέργειες OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Caveolin-1. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα της στα OA χονδροκύτταρα έπειτα από την επίδραση του H₂O₂. Στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα η ποσότητα της πρωτεΐνης ήταν η ίδια σε όλες τις χρονικές περιόδους ενώ στα OA η ποσότητα της πρωτεΐνη μειώνονταν συνεχώς με την αύξηση των ωρών (εικόνα 12). Επιπλέον όπως φαίνεται στην εικόνα 11, διαφορετικός ήταν και ο κυτταρικός εντοπισμός της caveolin-1 έπειτα από την επίδραση του στρες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες εμφανίζει κυτταροπλασματική και

πυρηνική κατανομή τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα OA χονδροκύτταρα. Μία ώρα μετά την επίδραση του στρες μετατοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των OA. Η μετατόπιση αυτή στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών κυττάρων συμπίπτει χρονικά με την αποκατάσταση των οξειδωτικών βλαβών ενώ όταν αυτές έχουν εν πολλοίς αποκατασταθεί η caveolin-1 επιστρέφει στο φυσιολογικό πυρηνικό-κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Στα OA χονδροκύτταρα όπου όπως δείχθηκε δεν γίνεται αποκατάσταση των οξειδωτικών βλαβών δεν παρατηρείται και μετατόπιση της caveolin-1.



Εικόνα 12: Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της CAV-1 ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς GAPDH σε OA και σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα

4. Συζήτηση

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων με σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 15 εκατομμύρια περίπου νέα περιστατικά ΟΑ στην Ευρώπη και 21 εκατομμύρια στην Αμερική (Lawrence et al, 2008). Πρόκειται για μια ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες που οδηγούν στην ολική αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου.

Παρόλο που η ΟΑ δεν απειλεί τη ζωή, υποβαθμίζει σημαντικά την ποιότητα της, αποτελώντας μια από τις σημαντικότερες αιτίες αναπηρίας του ανθρώπινου πληθυσμού. Οι ασθενείς με ΟΑ αντιμετωπίζουν προβλήματα κινητικότητας, πόνου και δυσκολίας στη μετακίνηση και στην εκτέλεση των καθημερινών δραστηριοτήτων τους. Αν και υπάρχουν φάρμακα που ανακουφίζουν τον πόνο των ασθενών, αρκετοί από αυτούς καταλήγουν στην χειρουργική επέμβαση για την αντιμετώπιση του προβλήματος τους. Το κόστος ωστόσο της επέμβασης και ειδικά της ολικής αρθροπλαστικής γόνατος είναι πολύ μεγάλο, υπολογίζεται μάλιστα ότι στην Ευρώπη ανέρχεται στα δυο δισεκατομμύρια ευρώ, καθιστώντας άμεση ανάγκη την ανεύρεση δεικτών κατάλληλων για την πρόγνωση της νόσου. Η παχυσαρκία, οι τραυματισμοί, η καθημερινή κόπωση και η γενετική προδιάθεση φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου αλλά ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος (Goldring et al, 2007, Suri et al, 2012).

Στην ΟΑ έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στον αρθρικό χόνδρο αλλά και στο προφίλ των χονδροκυττάρων του αρθρικού χόνδρου. Παρατηρείται επανεκκίνηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων και υπερτροφική διαφοροποίηση, στα πλαίσια της οποίας συμμετέχουν ποικίλοι μεταγραφικοί και αυξητικοί παράγοντες, καθώς και ένζυμα, ορμόνες και κυτοκίνες (Drissi et al, 2005). Αρκετοί μάλιστα αυξητικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου. Πολλές ερευνητικές ομάδες μάλιστα έχουν εστιάσει τις μελέτες τους στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης των ανωτέρων αυτών παραγόντων, προκειμένου να βρεθούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι και φάρμακα για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Tchetina et al, 2011).

Σε διάφορες μελέτες δε έχει παρατηρηθεί ότι οι παθήσεις των αρθρώσεων, και συγκεκριμένα η οστεοαρθρίτιδα, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξειδωτικού στρες (ROS) που προκαλούν οξειδωτικό στρες (Deaton et al, 2003). Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες είναι πολλές και περιλαμβάνουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρικό θάνατο καθώς και πρόωρη κυτταρική γήρανση. Ακόμη παρατηρείται βλάβη σε όλους ή κάποιους μοριακούς στόχους όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και υδατάνθρακες. (Halliwell, 2007).

Μετά από επιδράσεις με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε χονδροκύτταρα ασθενών με ΟΑ, εμφανίστηκαν πυρηνικές και κυτταροπλασματικές αλλαγές στα κύτταρα, που είναι χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι ο χόνδρος των ασθενών είχε υψηλότερο ποσοστό αποπτωτικών χονδροκυττάρων από ότι ο χόνδρος των φυσιολογικών ατόμων (Blanco et al, 1998). Επιπλέον σε πειράματα μεταξύ ασθενών με ΟΑ και υγιών ατόμων, βρέθηκε ότι το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται και με τελομερική αστάθεια και κυτταρική γήρανση στους ασθενείς (Brandl et al, 2010). Η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της ΟΑ επιβεβαιώθηκε και σε άλλη μελέτη που έγινε σε χονδροκύτταρα αρθρικού χόνδρου ασθενών με ΟΑ και σε κύτταρα υγιών ατόμων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ιστολογικά με ανοσοϊστοχημεία για νιτροτυροσίνη, η οποία θεωρείται ότι είναι ο κατασκευαστής της οξειδωτικής βλάβης. Έγινε επίδραση με αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS 0,1 μmol/l H₂O₂) και με αντιοξειδωτικό παράγοντα (ασκορβικό οξύ: 100,0 μmol/l). Τα ευρήματά έδειξαν σαφώς την παρουσία του οξειδωτικού στρες στον εκφυλισμό του χόνδρου, τη διάβρωση των τελομερών και τη δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων *in vitro* και *in vivo*, υποδηλώνοντας έτσι ένα σημαντικό ρόλο για το οξειδωτικό στρες στην ανάπτυξη της ΟΑ. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αντιοξειδωτικές ουσίες είναι αποτελεσματικές στο να εμποδίζουν τη επίδραση του οξειδωτικού στρες που προκαλεί εκφυλισμό του χόνδρου. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι η συσσώρευση του οξειδωτικού στρες οδηγεί σε μείωση της παραγωγικής ικανότητας της αντιοξειδωτικής δράσης στον αρθρικό χόνδρο, με αποτέλεσμα τη διάβρωση των τελομερών των χονδροκυττάρων, ανεξάρτητα από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Kazuo et al, 2005). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμμετέχει λοιπόν ενεργά στη διάβρωση των τελομερών, στην κυτταρική γήρανση των χονδροκυττάρων και στην επακόλουθη αποδόμηση του χόνδρου, όπως δείχνουν σαφώς τα ευρήματά από διάφορες μελέτες. Θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί υπεύθυνο για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΟΑ. Για αυτό το λόγο νέες στρατηγικές και παρεμβάσεις που αποσκοπούν στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης στον αρθρικό χόνδρο θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην πρόληψη και την εξέλιξη της ΟΑ.

Παράγοντες οξειδωτικού στρες προκαλούν βλάβες και στη δομή και τη λειτουργία διάφορων πρωτεϊνών. Αρκετές μάλιστα από αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται να σχετίζονται και με την εκδήλωση της ΟΑ. Η caveoline-1 είναι μια από αυτές τις πρωτεΐνες, που εμπλέκεται στις παθήσεις που σχετίζονται με την ηλικία και επηρεάζονται από στρεσογόνους παράγοντες, όπως το H₂O₂ (Pingsheng et al, 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχει στην πρόωρη γήρανση των χονδροκυττάρων και στην εκφύλιση του χόνδρου, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά της παθογένειας της ΟΑ. Το H₂O₂ έχει βρεθεί ότι υπέρ-ρυθμίζει τα επίπεδα RNA και πρωτεϊνών της caveolin-1, η οποία όταν υπερεκφράζεται, μειώνει την ικανότητα των χονδροκυττάρων να παράγουν κολλαγόνο II και αγγρεκάνη

(Sheng-Ming et al, 2006).

Τα αποτελέσματά της συγκεκριμένης μελέτης ενισχύουν τις ενδείξεις της εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στην παθογένεια της ΟΑ. Καταδείχθηκε η αδυναμία των ΟΑ χονδροκυττάρων να αποκαθιστούν τις βλάβες γεγονός που υποδηλώνει είτε δυσλειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών είτε γενικότερα της σηματοδότησης-απόκρισης στο οξειδωτικό στρες. Ο χόνδρος του ασθενή με ΟΑ είχε υψηλότερο ποσοστό αποπτωτικών χονδροκυττάρων από ότι ο χόνδρος του φυσιολογικού ατόμου. Επιπλέον παρατηρήθηκε, έπειτα από την επίδραση με H_2O_2 , μείωση στην ποσότητα της caveolin-1 στα ΟΑ χονδροκύτταρα, γεγονός που δεν συμβαίνει στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ακόμη τα φυσιολογικά κύτταρα αντιδρούν στο στρες μετατοπίζοντας την caveolin-1 αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που δεν παρατηρείται στα ΟΑ χονδροκύτταρα. Οι ενδιαφέρουσες αυτές διαφορές στην λειτουργία της caveolin-1 καθιστούν πιθανή την εμπλοκή της στην ελαττωματική απόκριση στο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στα ΟΑ χονδροκύτταρα. Με άλλα λόγια ενισχύονται οι ενδείξεις ενεργή συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην εξέλιξη της νόσου παρέχοντας ταυτόχρονα νέα στοιχεία για την συμμετοχή της caveolin-1 στο μηχανισμό αυτό.

Σύμφωνα με τα τρέχοντα ευρήματα, μετά την επίδραση με H_2O_2 , φανερώθηκε η ύπαρξη της caveolin-1 και στον φυσιολογικό χόνδρο, αλλά και στον παθολογικό ΟΑ χόνδρο. Υπήρξε χαμηλότερη έκφραση της caveolin-1 με την πάροδο των ωρών στα ΟΑ χονδροκύτταρα που συνοδεύονταν από αλλαγή της μορφολογίας τους αλλά και μείωση του αρχικού αριθμού τους. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι παράγοντες οξειδωτικού στρες, συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, προκαλώντας βλάβες και απόπτωση των χονδροκυττάρων. Επίσης η ύπαρξη και η κυτταρική τοποθέτηση της caveolin-1 μπορεί να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του αρθρικού χόνδρου στα ΟΑ χονδροκύτταρα.

Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είχε αρκετούς περιορισμούς. Το μέγεθος του δείγματος δεν ήταν αρκετά μεγάλο για να καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα. Κύρια απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ΟΑ δειγμάτων αλλά και υγιών ατόμων. Επιπλέον χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διαλευκανθεί αφενός ο μηχανισμός απόκρισης των ΟΑ χονδροκυττάρων στους παράγοντες του οξειδωτικού στρες και αφετέρου ο ρόλος της caveolin-1 στον μηχανισμό αυτό, που ενδέχεται να συμβάλλει στην παθογένεια και στην εξέλιξη της νόσου.

Βιβλιογραφία

1. Antonia F, Davies Catrin M, Ming De Lin, B.S.3, and Beverley Fermor, *Oxidative DNA damage in osteoarthritic porcine articular cartilage*, *J Cell Physiol*. 2008 December ; 217(3): 828–833. doi:10.1002/jcp.21562.
2. Blanco FJ¹, Guitian R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology*, *Arthritis Rheum*. 1998 Feb 41(2):284-9
3. Brandl Anita, Andreas Hartmann,² Volker Bechmann,¹ Bernhard Graf,¹ Michael Nerlich,² Peter Angele², *Oxidative Stress Induces Senescence in Chondrocytes*, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany, Received 18 September 2010; accepted 9 December 2010
4. Christoph Ziskoven,^{1,2} Marcus Jäger,¹ Christoph Zilkens,¹ Wilhelm Bloch,² Klara Brixius,² and Rüdiger Krauspe, *Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation*, *Orthop Rev (Pavia)*. 2010 Sep 23; 2(2): e23.
5. Dalle-Donne I¹, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A *Clin Chem*. *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. 2006 Apr 52(4):601-23. Epub 2006 Feb 16.
6. Danielsson L, Lindberg H, *Prevalence of coxarthrosis in an urban population during four decades, 1997*.
7. Deaton Christopher M. and Marlin David J. *Exercise-associated oxidative stress*, *Clinical techniques in equine practice*, Volume 2, Issue 3, Pagew 278-291, (2003).
8. Di Cesare PE, Abramson SB. *Pathogenesis of Osteoarthritis*, in *Kelley's Textbook of Rheumatology*, ed. ED Harris, JR et al. Elsevier Science, USA, 2005
9. Drissi H¹, Zuscik M, Rosier R, O'Keefe R., *Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis*, 2005.
10. Felson DT, Neogi T., *Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone*, *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):341-4.
11. Felson DT. 2006. *Clinical practice. Osteoarthritis of the knee*. *N Engl J Med* 354:841–848.
12. Goldring Mary B. and Steven R. Goldring, *Osteoarthritis*, *Laboratory for Cartilage Biology, Research Division, The Hospital for Special Surgery, Weill College of Medicine of Cornell University, New York*, 2007
13. Guangyi Li^{1,2}, Jimin Yin¹, Junjie Gao², Tak S Cheng², Nathan J Pavlos², Changqing Zhang^{1*} and Ming H Zheng² *Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes*, *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:223

14. Halliwell, *Biochemistry of oxidative stress* B., (2007), Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, 8 Medical Drive, MD7 Level 2, Singapore 117597, Singapore
15. Halliwell B, Gutteridge JMC, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 11: 416-493, 188-266, 2007.
16. Halliwell B., *Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease*, *Encyclopedia of Life Science*, 2001
17. Haq I¹, Murphy E, Dacre J, *Osteoarthritis*, *Postgrad Med J*. 2003 Jul;79(933):377-83.
18. Heathfield Sarah Kathleen, Christine Lyn Le Maitre and Judith Alison Hoyland¹, *Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration*, *Arthritis Research & Therapy* 2008, 10:R87 (doi:10.1186/ar2468)
19. Hutton CW. *Osteoarthritis: the cause not result of joint failure*, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1989; 48(11):958–961. [PubMed: 2688566]
20. Jorring K, *Osteoarthritis of the hip. Epidemiology and clinical role*. *Acta Orthop Scand*. 1980 Jun 51(3):523-30.
21. Karlsson C¹, Brantsing C, Svensson T, Brisby H, Asp J, Tallheden T, Lindahl A. *J Orthop Res. Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors* 2007 Feb;25(2):152-63.
22. Kazuo Yudoh^{*}, Nguyen van Trieu, Hiroshi Nakamura, Kayo Hongo-Masuko, Tomohiro Kato and Kusuki Nishioka, *Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function*, 2005, 7:R380-R391 doi:10.1186/ar1499
23. Khan I. M. Ph.D.y, S. J. Gilbert Ph.D.y, B. Caterson Ph.D.y, L. J. Sandell Ph.D.z and C. W. Archer Ph.D.y, *Oxidative stress induces expression of osteoarthritis markers procollagen IIA and 3B3(L) in adult bovine articular cartilage*, 2007 *Osteoarthritis Research Society International Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.joca.2007.10.004*
24. Klerk BM, Schiphof D, Groeneveld FP, Koes BW, van Osch GJ, van Meurs JB, Bierma-Zeinstra SM. *No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review*. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48:1160–1165.
25. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. *Osteo-arthritis, prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes*. *Ann Rheum Dis* 1966; 25: 1-23
26. Lawrence, MPH,¹ David T. Felson, MD, MPH,² Charles G. Helmick, MD,³ Lesley M. Arnold, MD,⁴ Hyon Choi, MD, DrPH,⁵ Richard A. Deyo, MD, MPH,⁶ Sherine Gabriel, MD, MSc,⁷ Rosemarie Hirsch, MD, MPH,⁸ Marc C. Hochberg, MD,

- MPH,⁹ Gene G. Hunder, MD,⁷ Joanne M. Jordan, MD, MPH,¹⁰ Jeffrey N. Katz, MD,¹¹ Hilal Maradit Kremers, MD, MSc,⁷ and Frederick Wolfe, MD¹², *Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States, Part II, 2008.*
27. Litwic A et al., *Epidemiology and Burden of Osteoarthritis, 2013*
 28. Linnane A, Hayden Eastwood, *Cellular redox poise modulation; the role of coenzyme Q10, gene and metabolic regulation, (2004), Centre for Molecular Biology and Medicine, Epworth Medical Centre, 185-187 Hoddle Street, Richmond 3121, Melbourne, Australia*
 29. Maneesh M, H Jayalekshmi*, T Suma*, S Chatterjee*, A Chakrabarti** and T A Singh*, *EVIDENCE FOR OXIDATIVE STRESS IN OSTEOARTHRITIS, Indian Journal of Clinical Biochemistry, (2005), 20 (1) 129-130* *Dept of Biochemistry, **Dept of Pharmacology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, Gangtok
 30. Min Tu, Sheng Li Yu, Cheng Chao, Tian Jian, Gao Shu Guang, *Correlation between osteopontin and caveolin-1 in the pathogenesis and progression of osteoarthritis, 2015, Pages: 2059-2064 DOI: 10.3892/etm.2015.2433*
 31. Muir H, *The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays. 1995 Dec;17(12):1039-48.*
 32. Pingsheng Liu, Michael Rudick§ and Richard G. W. Anderson, *Multiple Functions of Caveolin-1, November 1, 2002 The Journal of Biological Chemistry, 277, 41295-41298.*
 33. Puenpatom RA, Victor TW. *Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. Postgrad Med. 2009; 121:9–20.*
 34. Sandell LJ¹, Aigner T, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res. 2001;3(2):107-13. Epub 2001 Jan 22*
 35. Sharma L, Kapoor D, Issa S, *Epidemiology of osteoarthritis: an update, Curr Opin Rheumatol. 2006 Mar 18(2):147-56.*
 36. Sheng-Ming Dai,¹ Zheng-Zheng Shan,¹ Hiroshi Nakamura,² Kayo Masuko-Hongo,² Tomohiro Kato,² Kusuki Nishioka,² and Kazuo Yudoh², *Catabolic Stress Induces Features of Chondrocyte Senescence Through Overexpression of Caveolin 1, 2006, American College of Rheumatology*
 37. Suri P¹, Morgenroth DC, Hunter DJ., *Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities, 2012.*
 38. Tchetina Elena V., *Review Article, Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis, 2011.*
 39. Ulrich-Vinther M¹, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. *Articular cartilage biology, J Am Acad Orthop Surg. 2003 Nov-Dec;11(6):421-30*

40. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, Spector TD. 2006. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 54:533–539.
41. Valko M¹, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. *Int J Biochem Cell Biol*. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. 2007 39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4
42. Velandai K, Srikanth, Jayne L, Fryer, Guangju Zhai, Tania M. Winzenberg, David Hosmer, Graeme Jones, A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis, 2005.
43. Yiannakopoulou E, Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications, Department of Basic Medical Science, Faculty of Health and Caring Professions, Technological Educational Institute, Athens, Greece *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23–35
44. <http://www.oikologoi.gr/uploads/news/54.jpg>
45. <http://www.tosomasoumilaei.gr>
46. <http://www.ca.uky.edu/gluck>
47. <http://www.aihw.gov.au/osteoarthritis>
48. <http://www.newswire.com>
49. <http://www.cosmobio.co.jp/export>
50. <http://kardiologika.blogspot.gr/2013>
51. <http://imgarcade.com/hyaline-cartilage>