



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



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
Διευθύντρια: Α. Τσέζου, Αν. Καθηγήτρια Ιατρ. Γενετικής

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Κ.Ν. Μαλίζος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής

---

**ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΑΡΘΡΙΚΟ ΧΟΝΔΡΟ**  
**ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ**

**ΣΙΜΟΠΟΥΛΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ**  
Ιατρός

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

0

© 2010 Θεοδώρα Σιμοπούλου

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

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

κα. Νταϊλιάννα Ζώη

κ. Σακελλαρίδης Νικόλαος

κα. Τσέζου Ασπασία

Επίκουρη Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής

Καθηγητής Φαρμακολογίας

Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

(επιβλέπουσα)

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

κ. Γιαννούκας Αθανάσιος

κ. Μαλίζος Ν. Κωνσταντίνος

κα. Νταϊλιάννα Ζώη

κ. Σακελλαρίδης Νικόλαος

κ. Σακκάς Λάζαρος

κ. Τρυποσκιάδης Φίλιππος

κα. Τσέζου Ασπασία

Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής

Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Επίκουρη Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής

Καθηγητής Φαρμακολογίας

Καθηγητής Παθολογίας – Ρευματολογίας

Καθηγητής Καρδιολογίας

Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	σελ. 6
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>A.1 Οστεοαρθρίτιδα</b>	σελ. 10
A.1.1 Ταξινόμηση	σελ. 11
A.1.2 Επιδημιολογία της οστεοαρθρίτιδας	σελ. 11
A.1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες	σελ. 11
A.1.3α Ηλικία	σελ. 12
A.1.3β Φύλο	σελ. 12
A.1.3γ Βάρος σώματος	σελ. 13
A.1.3δ Γενετική προδιάθεση και ΟΑ: τύποι μελετών	σελ. 14
A.1.4. Παθογένεια	σελ. 17
A.1.4α Σύνθεση του αρθρικού χόνδρου	σελ. 17
A.1.4β Ο αρθρικός χόνδρος στην οστεοαρθρίτιδα	σελ. 18
A.1.4γ Τα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα	σελ. 20
<b>A.2 Η Οστεοαρθρίτιδα και η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων</b>	σελ. 23
<b>A.3 Το γονίδιο <i>ob</i> και η πρωτεΐνη λεπτίνη</b>	σελ. 28
<b>A.4 Ο μεταβολισμός των λιπιδίων σε κυτταρικό επίπεδο</b>	σελ. 31
A.4.1 Είσοδος χοληστερόλης στα κύτταρα – ο ρόλος της οξειδωμένης LDL και του υποδοχέα της LOX-1	σελ. 32
A.4.2 Έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα	σελ. 34
<b>A.5 Σκοπός της διατριβής</b>	σελ. 37

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>B.1 Υλικά και μέθοδοι</b>	σελ. 39
B.1.1 Συλλογή δειγμάτων	σελ. 39
B.1.2 Μακροσκοπική και ιστολογική αξιολόγηση των δειγμάτων	σελ. 41
B.1.3 Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων	σελ. 44
B.1.4 Απομόνωση RNA από φρέσκο αρθρικό χόνδρο και από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα	σελ. 47
B.1.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	σελ. 48
B.1.6 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων της λεπτίνης, Ob-Rb, Ob-Ra, LOX1, ApoA1, ABCA1, LXRA και LXRβ με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)	σελ. 50
B.1.7 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)	σελ. 51
B.1.8 Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα	σελ. 55
B.1.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS	σελ. 57
B.1.10 Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών λεπτίνη, Ob-Rb, ApoA1, ABCA1, MMP9 και MMP13 – μέθοδος Western Blot	σελ. 59
B.1.11 Ανίχνευση του πρωτεϊνικού υποδοχέα LOX-1 με ανοσοφθορισμό	σελ. 62
B.1.12 Επιδράσεις με λεπτίνη, οξειδωμένη LDL, ασκορβικό οξύ και συνθετικό LXR αγωνιστή σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων	σελ. 63
B.1.13 Ποσοτικός προσδιορισμός λεπτίνης, οξειδωμένης LDL, IL-1β και NO στο κυτταρικό εκχύλισμα καλλιέργειας χονδροκυττάρων, τον ορό αίματος και το αρθρικό υγρό ασθενών με OA με τη μέθοδο της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφθητικής μέτρησης – ELISA	σελ. 64
B.1.14 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας των χονδροκυττάρων με τη μέθοδο MTT	σελ. 66
B.1.15 Έλεγχος απόπτωσης των χονδροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής	σελ. 67
B.1.16 Μέτρηση ραδιοσημασμένης χοληστερόλης που εξέρχεται από τα χονδροκύτταρα	σελ. 67
B.1.17 Χρώση των ενδοκυττάρων λιπιδίων με χρώση Oil red O	σελ. 68
B.1.18 Στατιστική ανάλυση	σελ. 68

<b>B.2 Αποτελέσματα</b>	σελ. 70
B.2.1 Ανίχνευση της λεπτίνης στον ορό και στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ	σελ. 70
B.2.2 Έκφραση mRNA λεπτίνης και των υποδοχέων της Ob-Rb και Ob-Ra	σελ. 70
B.2.3 Πρωτεϊνική έκφραση λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα	σελ. 74
B.2.4 Συσχέτιση των επιπέδων mRNA της λεπτίνης με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) των ασθενών	σελ. 75
B.2.5 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του υποδοχέα Ob-Rb σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα παρουσία και απουσία λεπτίνης	σελ. 76
B.2.6 Επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων	σελ. 77
B.2.7 Μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων λεπτίνης σε καλλιεργημένα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Η δράση της λεπτίνης στην ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και στην παραγωγή NO	σελ. 78
B.2.8 Πρωτεϊνική έκφραση MMP-9 και MMP-13 στα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα μετά από επίδραση λεπτίνης	σελ. 79
B.2.9 Προσδιορισμός των επιπέδων της οξειδωμένης LDL στο αρθρικό υγρό και τον ορό ασθενών με ΟΑ	σελ. 80
B.2.10 Έκφραση του υποδοχέα της oxLDL, LOX-1, στον αρθρικό χόνδρο	σελ. 81
B.2.11 Επίδραση της oxLDL στη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων	σελ. 83
B.2.12 Επίδραση του αντιοξειδωτικού, ασκορβικού οξέος, σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων	σελ. 85
B.2.13 Έκφραση των ApoA1, ABCA1, LXRA και LXRβ στα χονδροκύτταρα	σελ. 87
B.2.14 Επίδραση του συνθετικού αγωνιστή LXR στην έκφραση των γονιδίων ApoA1 και ABCA1 καθώς και στην έκφραση καταβολικών και αναβολικών γονιδίων	σελ. 89
B.2.15 Επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή στην ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων	σελ. 91
B.2.16 Επίδραση του LXR αγωνιστή στην έξοδο της χοληστερόλης από τα χονδροκύτταρα	σελ. 93
B.2.17 Επίδραση του LXR αγωνιστή στην απόπτωση των χονδροκυττάρων	σελ. 93
<b>B.3 Συζήτηση</b>	σελ. 95
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	σελ. 107
<b>SUMMARY</b>	σελ. 111
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	σελ. 115

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία ετερογενής και πολυπαραγοντική νόσος, με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες να οδηγούν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Η ηλικία αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, ανάγοντάς τη σε ένα μείζων ιατρικό και κοινωνικό πρόβλημα δεδομένης της γήρανσης του πληθυσμού και της επιμήκυνσης των ορίων ηλικίας.

Επιδημιολογικές παρατηρήσεις έχουν συνδέσει την ΟΑ με την αθηρωμάτωση. Ο παραλληλισμός των δύο παθήσεων δεν βασίζεται μόνο στο ότι πρόκειται για νοσήματα των οποίων ο επιπολασμός αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, καθώς και στο ότι θεωρούνται μια κατάσταση χρόνιας, ήπιας φλεγμονής, αλλά φαίνεται να έχουν και κοινή μοριακή βάση. Μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι άτομα με ΟΑ διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο από ότι ο γενικός πληθυσμός για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας, που από δεκαετίες έχει συσχετισθεί και με την αθηρωμάτωση, αποτελεί ο μεταβολισμός των λιπιδίων, δεδομένης και της συσχέτισης της παχυσαρκίας και με τα δύο νοσήματα. Αρκετές μελέτες υποστήριξαν τους μηχανικούς παράγοντες ως κύριους μεσολαβητές της σχέσης παχυσαρκίας και ΟΑ, πιθανότατα μέσω αναδιανομής του αυξημένου σωματικού φορτίου στις υποβαστάζουσες το βάρος του σώματος αρθρώσεις. Ωστόσο, η αυξημένη επίπτωση της ΟΑ χεριών σε παχύσαρκους, ενισχύει την άποψη ενός πιθανού μεταβολικού παθογενετικού μηχανισμού. Στα πλαίσια της θεώρησης αυτής, η διαλεύκανση του ρόλου της λεπτίνης στην ΟΑ ήταν πρωταρχικής σημασίας, αρχικά μέσω μελέτης της έκφρασής της στο φυσιολογικό και στον οστεοαρθρικό χόνδρο και κατόπιν μέσω της επίδρασής της σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων. Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με την καταβολική δράση της λεπτίνης στην εξέλιξη της ΟΑ ενισχύουν το σενάριο που θέλει την ΟΑ να αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο με μηχανικές και μεταβολικές συνιστώσες μεταξύ των οποίων ο μεταβολισμός των λιπιδίων να παίζει σημαντικό ρόλο.

Η εμπλοκή όμως των λιπιδίων στην ΟΑ δεν περιορίζεται στη συμμετοχή του λιπιδώδους ιστού. Η εναπόθεση λιπιδίων παρατηρείται πρώιμα στην ΟΑ, πριν την εμφάνιση ιστολογικών αλλαγών, καταδεικνύοντας την εμπλοκή των λιπιδίων στην παθογένεια της νόσου. Η διερεύνηση της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης και της έκφρασης του υποδοχέα της, LOX-1, στον αρθρικό χόνδρο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα αποτέλεσε τον δεύτερο στόχο της έρευνας. Για την πιο

ολοκληρωμένη προσέγγιση του θέματος έγινε επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με οξειδωμένη LDL καθώς και με αντιοξειδωτικές ουσίες.

Η συσσώρευση λιπιδίων, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς στην αθηρωμάτωση, είναι μία διαδικασία που δυνητικά μπορεί να συμβεί σε όλα τα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να εκφράσουν υποδοχείς, όπως ο LOX-1, με την ιδιότητα να συνδέονται με τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη ενώ για την αποφυγή της συσσώρευσης των λιπιδίων στα χονδροκύτταρα απαραίτητη είναι η λειτουργία ενός μηχανισμού ισορροπίας μεταξύ της εισόδου χοληστερόλης και της εξόδου της από τα κύτταρα. Αφού λοιπόν μελετήσαμε τα φαινόμενα που σχετίζονται με την είσοδο της χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα μέσω του υποδοχέα LOX-1, στη συνέχεια στοχεύσαμε στη διερεύνηση της μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα, όπως η ABCA1 (ATP binding cassette A1), μια πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση ενισχύεται με την ενεργοποίηση παραγόντων όπως οι πυρηνικοί υποδοχείς LXRs (liver X receptors). Η διερεύνηση της εμπλοκής των παραγόντων αυτών στην ΟΑ αποτέλεσε άλλον έναν από τους σκοπούς της μελέτης αυτής, όπως επίσης και η διερεύνηση της επίδρασης συνθετικών αγωνιστών των LXR σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με σκοπό την ανάδειξη πιθανών θεραπευτικών μορίων για την οστεοαρθρίτιδα.

Το υλικό μας αποτέλεσαν χόνδρινοι ιστοί από 56 ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και από 13 ενήλικες που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και υπεβλήθησαν στην Ορθοπαιδική Κλινική σε επεμβάσεις επανόρθωσης κατάγματος. Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων και το εργαστηριακό σκέλος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ασπασίας Τσέζου.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, κα. Ασπασία Τσέζου για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Κωνσταντίνο Ν. Μαλίζο για την άψογη συνεργασία μας και τη συμβολή του στη εργασία. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, κα Ζωή Νταϊλιάνα καθώς και τον καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη για την επίβλεψη της διατριβής.



Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Γεώργιο Κουκούλη καθώς και την κα. Μαρία Ιωάννου (Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής) για την ιστολογική ταυτοποίηση των δειγμάτων του αρθρικού χόνδρου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα. Λουκία Παπαθεοδώρου και τον κ. Λάζαρο Πουλτσίδα για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς και του Ινστιτούτου Βιοιατρικής Έρευνας και Τεχνολογίας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά και ιδιαίτερα την Παγώνα Οικονόμου, Μαρία Σάτρα, Νίκο Στεφάνου, Βασίλη Παπανικολάου, Stephanie Dubos, Φωτεινή Κωστοπούλου, Κλέλια Ορφανίδου και Ιωάννα Παπαθανασίου, καθώς και την Ματίνα Τασσιούδη. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Ηλιόπουλο με τον οποίο συνεργάστηκα σε ένα τμήμα της συγκεκριμένης διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας – Ρευματολογίας κ. Λάζαρο Σακκά καθώς και όλους τους συναδέλφους της Ρευματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θεοδώρα Σιμοπούλου

Ιατρός

Λάρισα, 2010

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## A.1 Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μια εκφυλιστική πάθηση των αρθρώσεων, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα, και χαρακτηρίζεται από διάβρωση του αρθρικού χόνδρου, υπερτροφία του υποχόνδριου οστού και δημιουργία οστεοφύτων (εικόνα 1), υποχόνδρια σκλήρυνση καθώς και μια σειρά από βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές στον αρθρικό υμένα και τον αρθρικό θύλακα, ενώ στα τελικά στάδια της ΟΑ εμφανίζονται επίσης φλεγμονώδεις αλλοιώσεις και εστιακή αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Τυπικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου αποτελούν ο πόνος και η δυσκαμψία της άρθρωσης, ιδιαίτερα μετά από παρατεταμένη δραστηριότητα [1].



Εικόνα 1. Ακτινολογική εικόνα φυσιολογικού γόνατος (αριστερά) και οστεοαρθρικού (δεξιά) όπου διακρίνονται τα επιχείλια οστεόφυτα (bone spur) και η στένωση του μεσαρθρίου διαστήματος (narrow joint space).

Στις βιομηχανοποιημένες κοινωνίες η ΟΑ αποτελεί την πρώτη αιτία σωματικής αναπηρίας, ενώ ευθύνεται και για σημαντική αύξηση στο κόστος παροχής υπηρεσιών υγείας. Δεδομένης της γήρανσης του πληθυσμού καθώς και της αυξημένης επίπτωσης παχυσαρκίας, που αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου για τη νόσο, εκτιμάται ότι σύμφωνα με τα Ηνωμένα Έθνη το 25% του πληθυσμού στη Δύση ηλικίας άνω των 65 ετών θα πάσχει από ΟΑ το 2010 και ότι η επίπτωση της νόσου θα διπλασιαστεί μέχρι το 2020 [2, 3]. Παρά την αυξημένη συχνότητα της νόσου, η κατανόηση της ακριβούς αιτιολογίας, της παθογένειας και της εξέλιξης της ΟΑ παραμένει ελλιπής, κυρίως λόγω των παραγόντων συνοσηρότητας στις επιδημιολογικές μελέτες, όπως επίσης και λόγω της φτωχής συσχέτισης ανάμεσα στα συμπτώματα της ΟΑ και στην ακτινολογική εικόνα, καθώς και εξαιτίας της αδυναμίας ανίχνευσης πρώιμης νόσου. Επιπροσθέτως, ο ανθρώπινος ιστός ο οποίος χρησιμοποιείται στην έρευνα της νόσου συνήθως προέρχεται από χειρουργεία ασθενών με προχωρημένης μορφής ΟΑ, με αποτέλεσμα να μην έρχονται στο φως όλες εκείνες οι βιοχημικές και παθολογικές αλλαγές οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα αρχικά στάδια της νόσου. Χωρίς μία σαφή εικόνα του πως η ΟΑ εξελίσσεται σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, αρκετοί θα συνεχίσουν να την θεωρούν ως το αποτέλεσμα φυσιολογικής φθοράς, μια αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης [1].

### **A.1.1 Ταξινόμηση**

Η ΟΑ μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή ανάλογα με την αιτία ή τον κύριο προδιαθεσικό παράγοντα. Η πρωτοπαθής ΟΑ είναι ο πιο κοινός τύπος και δεν έχει ανιχνεύσιμη αιτία ή προδιαθεσικό παράγοντα. Η δευτεροπαθής ΟΑ, αν και έχει σαφή αιτία, δεν διαφέρει παθολογικά από την πρωτοπαθή. Τα συχνότερα αίτια δευτεροπαθούς ΟΑ είναι τραύματα, συστηματικά νοσήματα (αιμοχρωμάτωση, νόσος Wilson, ακρομεγαλία, υπερπαραθυρεοειδισμός, εναπόθεση κρυστάλλων ασβεστίου), ανατομικές αιτίες (ανισοσκελία, συγγενές εξάρθημα ισχίου), ή είναι επακόλουθο λοιμώξεων (σηπτική αρθρίτιδα) [1].

### **A.1.2 Επιδημιολογία της οστεοαρθρίτιδας**

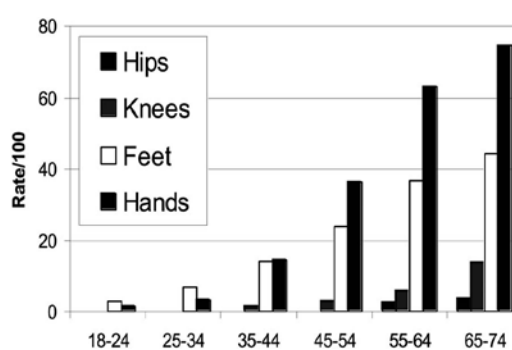
Η ΟΑ είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων στις αναπτυγμένες χώρες [4-6]. Η επίπτωσή της έχει αναφερθεί ότι είναι 4.14% στην Βραζιλία [7], και 11.7% στην Κούβα [8]. Στην Ασιατική ήπειρο η επίπτωση της ΟΑ γόνατος κυμαίνεται μεταξύ 3.1-4.6% στο Πακιστάν [9], 7.5-10.6% στο Μπαγκλαντές [10] και 5.1-12.2% στην Ινδία [11]. Δεκατρείς μελέτες που αφορούσαν 29.621 ενήλικες από διάφορες επαρχίες της Κίνας ανέφεραν ότι η συχνότητα συμπτωματικής ΟΑ έφτανε το 20.8% [5]. Πιθανές εξηγήσεις για αυτές τις επιδημιολογικές διαφορές αποτελούν οι γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών καθώς και οι διαφορές στις συνθήκες διαβίωσης, την ηλικία, την επαγγελματική δραστηριότητα αλλά και τον ορισμό της ΟΑ στις διάφορες μελέτες. Στη μελέτη Framingham (ΗΠΑ) ένα στα τέσσερα άτομα στην ηλικία των 60 ετών παρουσίαζε ακτινολογικές αλλοιώσεις οστεοαρθρίτιδας ενώ το ποσοστό αυτό ξεπερνούσε το 50% στον πληθυσμό άνω των 80 ετών [12].

### **A.1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες**

Η μελέτη Framingham ανέδειξε μια σειρά μείζονων παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη ΟΑ όπως η ηλικία, το φύλο, η παχυσαρκία, γεωγραφικοί παράγοντες, γενετικοί παράγοντες καθώς και μηχανικοί παράγοντες, τραύματα, χονδρασβέστωση και ύπαρξη κρυστάλλων στο αρθρικό υγρό [13].

### A.1.3α Ηλικία

Η ηλικία αποτελεί τον ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΟΑ (Εικόνα 2). Η επίπτωση της νόσου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας τόσο για την συμπτωματική όσο και για την ασυμπτωματική ΟΑ [13]. Στην ηλικία άνω των 75 ετών το ποσοστό της ΟΑ ξεπερνά το 80% [1]. Ο αρθρικός χόνδρος με την πρόοδο της ηλικίας εμφανίζει αλλαγές στην λειτουργία των χονδροκυττάρων και στην απόκρισή τους στις κυτοκίνες και

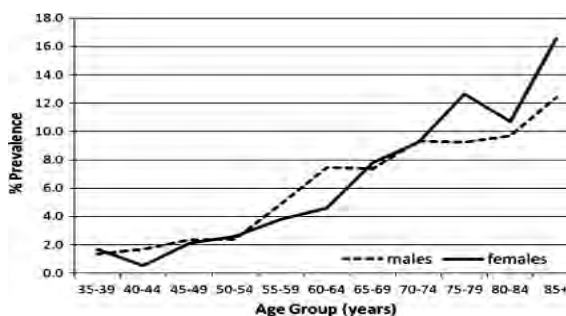


Εικόνα 2: Επίπτωση των ακτινολογικών αλλοιώσεων ΟΑ στο ισχίο, γόνατο, άκρο πόδα και άκρο χέρι. Οι οστεοαρθρικές αλλοιώσεις αυξάνουν με την ηλικία σε όλες τις ομάδες αρθρώσεων, είναι όμως συχνότερες στα χέρια.

στους αυξητικούς παράγοντες [14]. Επιπροσθέτως, οι φυσικοί και μηχανικοί παράγοντες που προστατεύουν την άρθρωση όπως η μυϊκή ισχύς και η ιδιοδεκτικότητα, αλλοιώνονται με την πάροδο των ετών [15, 16]. Η ανάπτυξη οστεοφύτων στην άρθρωση του γόνατος αυξάνει κατά 20% για κάθε 5ετή αύξηση της ηλικίας [17]. Οι οστεοαρθρικές ακτινολογικές αλλοιώσεις αυξάνονται με την πρόοδο της ηλικίας [18], αν και αυτές οι αλλαγές δεν συνδυάζονται πάντα με κλινική συμπτωματολογία [19, 20]. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την προχωρημένη ηλικία με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των Lawrence και συν. [21], και των μελετών Framingham [13], NHANES I [22] και Zoetermeer [23]. Η συσχέτιση μεταξύ ΟΑ ισχίου και μεγάλης ηλικίας έχει υποστηριχθεί σε δύο μεγάλες Σκανδιναβικές μελέτες [24, 25], καθώς και στις μελέτες Zoetermeer [23] και NHANES I [26]. Η μεγάλη ηλικία έχει συσχετισθεί και με την ανάπτυξη ΟΑ χεριών όπως φάνηκε στις μελέτες των Lawrence και συν [21], BLSA [27, 28], Zoetermeer [23] καθώς και στη μελέτη Michigan Bone Health [29]. Αν και εμφανώς πρόκειται για πάθηση της μεγάλης ηλικίας, η ΟΑ δεν αποτελεί αναπόφευκτη αιτία της γήρανσης.

### A.1.3β Φύλο

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος σε σύγκριση με τους άνδρες [30]. Στην μελέτη NHANES I η αμφοτερόπλευρη



Εικόνα 3. Η επίπτωση της ΟΑ ισχίου σε άνδρες και γυναίκες διαφόρων ηλικιακών ομάδων [31].

ΟΑ γόνατος ήταν δύο φορές πιο συχνή στις γυναίκες από ότι στους άνδρες, ενώ δεν αναφέρθηκαν διαφορές για την ετερόπλευρη ΟΑ [32]. Η ΟΑ ισχίου έχει παρατηρηθεί ότι είναι πιο συχνή στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες στις μεγάλες ηλικίες (Εικόνα 3), αλλά οι διαφορές αυτές είναι μικρότερες από τις παρατηρούμενες για την ΟΑ γόνατος. Οι Jorging και συν. αναφέρουν αναλογία γυναικών : ανδρών 3:2 [25], ενώ οι Danielsson και συν. δεν διαπίστωσαν διαφορές μεταξύ των δύο φύλων για την ΟΑ ισχίου [24]. Στη μελέτη Framingham αναφέρθηκε ότι η ΟΑ ισχίου είχε μεγαλύτερη επίπτωση στους άνδρες [33]. Στη μελέτη Zoetermeer στις ηλικίες 55-64 η ΟΑ ισχίου ήταν συχνότερη στους άνδρες, ενώ στις ηλικίες άνω των 65 ήταν συχνότερη στις γυναίκες [23]. Στις γυναίκες έχει αναφερθεί μεγαλύτερη συμπτωματική ΟΑ με μεγαλύτερο αριθμό προσβεβλημένων αρθρώσεων, εντονότερο άλγος και αυξημένη συχνότητα ΟΑ χεριών [34]. Στη μελέτη Tecumseh οι γυναίκες παρουσίαζαν 2.6 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ χεριών [35]. Στη Θεσσαλία, σε μικρότερο πληθυσμιακό δείγμα, έχει βρεθεί ότι η αναλογία γυναικών : ανδρών είναι πολύ υψηλή 5:1, πιθανόν λόγω της ενασχόλησης των γυναικών με τις αγροτικές εργασίες και την επακόλουθη επιβάρυνση των αρθρώσεων [36]. Είναι πάντως σαφές ότι στις γυναίκες υπάρχει μία σημαντική αύξηση της επίπτωσης της ΟΑ μετά από την ηλικία των 50 ετών, πιθανότατα ως αποτέλεσμα μετεμμηνοπαυσιακής οιστρογονικής ένδειας [37]. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης με μικρότερο από τον αναμενόμενο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος και ισχίου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [38-40].

### **A.1.3γ Βάρος σώματος**

Ισχυρή συσχέτιση έχει αναφερθεί μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος (body mass index, BMI) και της ΟΑ γόνατος [17]. Στους συμμετέχοντες στη μελέτη Framingham με μέση ηλικία τα 37 έτη το σωματικό βάρος προέβλεπε την παρουσία ΟΑ γόνατος μετά από 36 χρόνια [33]. Επιπροσθέτως, η απώλεια βάρους έχει αναφερθεί ως αποτελεσματική στρατηγική αποφυγής της εξέλιξης της νόσου [41]. Ωστόσο, αυτή η θετική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας και της εμφάνισης ΟΑ δεν έχει αναφερθεί μόνο για αρθρώσεις που υποβαστάζουν το βάρος του σώματος, όπως τα γόνατα και τα ισχία, αλλά και για τα χέρια [42]. Είναι επίσης σαφές πως η θεωρία που υποστηρίζει ότι η συμπτωματική ΟΑ οδηγεί σε μειωμένη φυσική δραστηριότητα που προδιαθέτει με τη σειρά της σε αύξηση του σωματικού βάρους, δεν επαληθεύεται από μελέτες. Μετά από ανάλυση των δεδομένων της μελέτης NHANES I δεν διαπιστώθηκε μεγαλύτερη συσχέτιση μεταξύ BMI και ΟΑ γόνατος σε όσους ανέφεραν κλινικά συμπτώματα [22]. Στη μελέτη Framingham σε γυναίκες η συσχέτιση του βάρους με την ΟΑ γόνατος ήταν ισχυρότερη στις ασθενείς που δεν

είχαν συμπτώματα σε σύγκριση με όσες είχαν συμπτωματική νόσο [33]. Η θεωρία η οποία υποστηρίζει ότι υπάρχει μεταβολική συνιστώσα στη συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και ΟΑ ενισχύεται και από τη μελέτη Chingford όπου η ΟΑ γόνατος, ετερόπλευρη και αμφοτερόπλευρη, συσχετίστηκε με την υπέρταση, την υπερχοληστερολαιμία και τα επίπεδα γλυκόζης αίματος ανεξάρτητα από την παχυσαρκία [17].

### **A.1.35 Γενετική προδιάθεση και ΟΑ: τύποι μελετών**

Ήδη από το 1941 ο Strecher έδειξε ότι τα οζίδια Heberden ήταν τρεις φορές πιο συχνά στις αδελφές ατόμων με οζίδια [43], ενώ την δεκαετία του '60 ο Kellgren παρατήρησε ότι η γενικευμένη ΟΑ, η οποία περιελάμβανε οζίδια Heberden και ΟΑ γονάτων, είχε διπλάσιες πιθανότητες εμφάνισης μεταξύ συγγενών πρώτου βαθμού από ότι στο γενικό πληθυσμό [44]. Πληθυσμιακές μελέτες σε ασθενείς με ακτινολογικά ευρήματα ΟΑ ανέδειξαν ξεκάθαρα τη γενετική συνεισφορά στην ανάπτυξη ΟΑ, με στοιχεία για πολυπαραγοντική σχέση που αποδόθηκε είτε στη δράση πολλαπλών γονιδίων είτε στην αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον [45, 46]. Σε μελέτες διδύμων φάνηκε ότι η κληρονομική συνιστώσα της ΟΑ ήταν 65% για τη στένωση του μεσαρθρίου διαστήματος και 58% για την ΟΑ συνολικά [47]. Γενετική επιβάρυνση διαπιστώθηκε επίσης όταν μελετήθηκε η εξέλιξη της ΟΑ σε μελέτες διδύμων με χρόνο παρακολούθησης τα 7 έτη, όπου υπολογίστηκε σε 69% για τα οστεόφυτα και 80% για τη στένωση του μεσαρθρίου διαστήματος [48]. Αρκετές μελέτες στράφηκαν στον καθορισμό διαφορών στη γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη ΟΑ μεταξύ διαφορετικών αρθρώσεων [49, 50].

Αργότερα η έρευνα στράφηκε στον καθορισμό των γονιδίων που ενέχονται στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου [51]. Χωρίς προηγούμενες μελέτες σύνδεσης που να τους καθοδηγούν σε συγκεκριμένους χρωμοσωμικούς τόπους, αρκετοί γενετιστές βασίστηκαν στην κατανόηση των μηχανισμών που συμβαίνουν στην ΟΑ ώστε να επιλέξουν τα υποψήφια γονίδια. Αρχικά, μελετήθηκαν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις βασικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Αυτά περιλαμβάνουν το COL2A1, το οποίο κωδικοποιεί την α1 πολυπεπτιδική αλυσίδα του COL2A1, του κύριου κολλαγονικού συστατικού του αρθρικού χόνδρου. Επίσης, μελετήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν το κολλαγόνο IX και XI, καθώς και γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μη κολλαγονικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας όπως η αγγρεκάνη (AGC) και η cartilage oligomeric matrix protein (COMP). Συνολικά, οι μελέτες αυτές δεν παρείχαν επαρκή στοιχεία για το ρόλο μεταλλάξεων σε γονίδια δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας στη δημιουργία της ΟΑ [52, 53], ενώ οι πολυμορφισμοί του κολλαγόνου τύπου II βρέθηκε ότι συνδέονταν περισσότερο με

την ανάπτυξη χονδροδυσπλασιών παρά με OA [54, 55]. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι οι μεταλλάξεις που μπορεί να ανιχνευθούν στην αλληλουχία των γονιδίων αυτών δεν έχουν μεγάλη συχνότητα ώστε να αποτελούν παράγοντα κινδύνου στο γενικό πληθυσμό [56].

Συγχρόνως με την ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες του χόνδρου, η έρευνα στράφηκε και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την οστική πυκνότητα. Η σκέψη αυτή προήλθε από την παρατήρηση της σκλήρυνσης του υποχόνδριου οστού που παρατηρείται πρώιμα στην OA και της επακόλουθης υπόθεσης ότι η σκλήρυνση αυτή είναι επιβλαβής για το χόνδρο αφού επηρεάζει τη μεταφορά του μηχανικού φορτίου. Τα γονίδια του υποδοχέα της βιταμίνης D (vitamin D receptor, VDR) και του οιστρογονικού υποδοχέα α (estrogen receptor α, ESRα) έχουν μελετηθεί από διάφορες ομάδες [36, 57-59]. Ωστόσο, οι συσχετίσεις αυτές δεν επιβεβαιώθηκαν από όλες τις μελέτες [52, 53], κάτι που είναι αναμενόμενο για ένα τόσο συχνό και σύνθετο νόσημα όσο η OA.

Μία τρίτη κατηγορία γονιδίων είναι αυτή των κυτοκινών. Παρόλο που η OA δεν ορίζεται ως μία φλεγμονώδης νόσος, στην πορεία της αναγνωρίζεται μία κατάσταση χρόνιας φλεγμονής. Τα κυρίαρχα γονίδια σε αυτή την κατηγορία είναι το γονίδιο της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) καθώς και ο υποδοχέας της [60]. Σε μία μελέτη των Loughlin και συν. οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν φάνηκε να συσχετίζονται με την OA γόνατος αλλά όχι με την OA ισχίου, δείχνοντας έτσι τη γενετική ετερογένεια της πάθησης [61].

Οι μελέτες υποψήφιων γονιδίων φώτισαν μερικώς τη γενετική προδιάθεση της OA, όμως η ελλιπής γνώση της βιολογίας της πάθησης συνετέλεσε στην εσφαλμένη επιλογή γονιδίων. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ένας περισσότερο συστηματικός τρόπος μελέτης, συμπεριλαμβανομένων των αναλύσεων σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος.

Τέσσερις μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες στη Φιλανδία [62], το Ηνωμένο Βασίλειο [63, 64], την Ισλανδία [65, 66] και τις ΗΠΑ [67, 68] πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή υποψήφιων γενετικών τόπων στην OA. Οι μελέτες ανέδειξαν γενετικούς τόπους σε αρκετά χρωμοσώματα όπως 2,4,6,7,11,16 και X (Πίνακας 1). Σε αυτές τις περιοχές εδράζονται γονίδια που κωδικοποιούν κυτοκίνες όπως η

Country	Locus	Gene	Strata
UK	2q24.3-q31.1	FRZB	Female hip
	4q13.1-q13.2	-	Female hip
	6p12.3-q13	-	Female hip
	11q13.4-q14.3	-	Female hip
	16p12.3-p12.1	IL4R	Female hip
	16q22.1-q23.1	-	Females
Finland	2q12-q21	IL1 cluster	Hand (DIP <sup>+</sup> ), knee and hip
	4q26-q27	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	7p15-p21	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	Xcen	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
Iceland	2p24.1	MATN2	Hand (CMC <sup>+</sup> and DIP <sup>+</sup> )
	3p13-p12.3	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
USA	4q32.1-q32.2	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	1p32.1-p22.1	-	Hand <sup>+</sup>
	2p24.2-p21	-	Hand <sup>+</sup>
	7p14.1-p12.3	-	Hand <sup>+</sup>
	7q36-q36.1	-	Hand (DIP <sup>+</sup> )
	9q21.13-q21.33	-	Hand <sup>+</sup>
	11q13.2-q14.2	-	Hand <sup>+</sup>
	12q24.33	-	Hand <sup>+</sup>
	13q14.11-q14.3	-	Hand <sup>+</sup>
	15q22.31-q26.1	-	Hand (CMC <sup>+</sup> )
19q13-q13.33	-	Hand <sup>+</sup>	

Πίνακας 1. Γενετικοί τόποι που φαίνεται ότι σχετίζονται με την OA. Αποτελέσματα 4 μεγάλων πολυκεντρικών μελετών.



ιντερλευκίνη 1 στο χρωμόσωμα 2 (2q11.2-q13) [52, 53, 62, 69, 70], η ιντερλευκίνη 4 στο χρωμόσωμα 16 (16p12.1) [63, 71] και το κολλαγόνο IX στο χρωμόσωμα 6 (6q13) [72], όμως αναδείχθηκαν και άγνωστα μέχρι τότε γονίδια. Σε αυτά συγκαταλέγονται το MATN3 (2p24.1) το οποίο κωδικοποιεί για τη δομική πρωτεΐνη στο χόνδρο matrilin-3 [66] και το γονίδιο FRZB (2q32.1) του χονδρογενετικού ρυθμιστή της εκκρινόμενης και σχετιζόμενης με θηλιά πρωτεΐνης 3 (chondrogenic regulator secreted frizzled-related protein 3), η οποία είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται από τον αρθρικό χόνδρο των ενηλίκων και δρα ως ανταγωνιστής στους προσδέτες για το μονοπάτι Wnt [73, 74]. Ένα ακόμα γονίδιο είναι αυτό της BMP5 το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 6p12.1 και κωδικοποιεί για τη μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 5 (bone morphogenetic protein 5) που ανήκει στην υπερικογένεια του TGFβ (transforming growth factor β) [72]. Από πρόσφατες μεταanalύσεις μελετών από 14 ερευνητικές ομάδες από όλο τον κόσμο προέκυψαν ενδείξεις ισχυρής συσχέτισης της ΟΑ γόνατος με πολυμορφισμούς του γονιδίου GDF5 (growth differentiation factor 5), ενώ δεν αναδείχθηκε ανάλογη συσχέτιση με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου FRZB [75].

Οι μελέτες σύνδεσης έρχονται να αντικατασταθούν από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος. Τέτοιες μελέτες έχουν αναδείξει συσχετίσεις μεταξύ του γονιδίου της asporin (ASPN) [76] και της καλμοδουλίνης (CALM1) [77, 78] και της ΟΑ. Η ASPN είναι ένα μακρομόριο της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου που ανήκει στην οικογένεια των μικρών πρωτεογλυκανών πλούσιων σε λευκίνη (small leukine-rich proteoglycan, SLRP) [79, 80]. Οι ερευνητές αποκάλυψαν ότι η ASPN εκφράζεται στον οστεοαρθρικό χόνδρο και ότι αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων της αγγρεκάνης (AGC) και του κολλαγόνου τύπου II (COL2A1) που κωδικοποιούν για τα βασικά δομικά συστατικά του αρθρικού χόνδρου [76]. Η καλμοδουλίνη (CALM1) είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου και αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών [81, 82] και παίζει επίσης ρόλο στην έκφραση των γονιδίων AGC και COL2A1 [78]. Τα προαναφερθέντα γονίδια έχουν μελετηθεί και στον ελληνικό πληθυσμό και έχει δειχθεί η συσχέτισή τους με την οστεοαρθρίτιδα γόνατος [83-85].

Μια εναλλακτική στρατηγική στη μελέτη της γενετικής συνιστώσας της ΟΑ είναι η ανίχνευση γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξάνεται ή μειώνεται σημαντικά στον οστεοαρθρικό ιστό σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό. Οι μελέτες έκφρασης μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για το συσχέτισμό των γονιδίων με την ανάπτυξη ή την εξέλιξη της πάθησης όπως έγινε με μια μελέτη από το Λονδίνο, η οποία χρησιμοποίησε τέσσερις βάσεις δεδομένων συμπληρωματικού DNA (cDNA libraries) από φυσιολογικό και οστεοαρθρικό χόνδρο και υμένα και ανέδειξε 54

γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση [86]. Οι ερευνητές στη συνέχεια στόχευσαν 12 από αυτά με κριτήριο τη δυνατότητα θεραπευτικής παρέμβασης, διάλεξαν δηλαδή γονίδια που κωδικοποιούσαν υποδοχείς, ένζυμα και διαλυτά μόρια. Οι μελέτες έκφρασης αποτελούν μια εναλλακτική συστηματική προσέγγιση στην ανίχνευση γονιδίων που ενέχονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

#### A.1.4 Παθογένεια

Η ΟΑ διέπεται από μία παθολογία που αντικατοπτρίζει την ανισοροπία μεταξύ των αναβολικών και των καταβολικών διεργασιών που συμβαίνουν σε όλη την άρθρωση και ιδιαίτερα στον αρθρικό χόνδρο και δευτεροπαθώς την ανάπτυξη φλεγμονωδών αλλοιώσεων ιδιαίτερα στον αρθρικό υμένα αλλά και στον αρθρικό χόνδρο [87]. (Εικόνα 4)



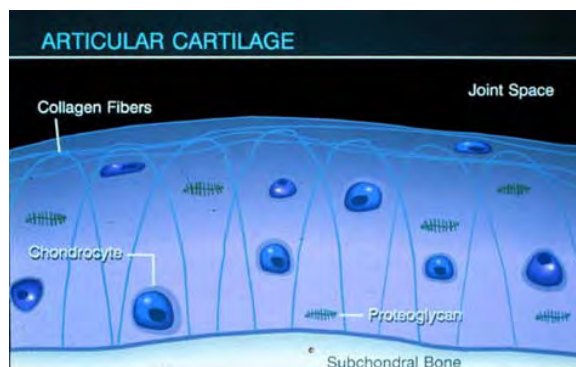
Εικόνα 4. Μεταβολισμός αρθρικού χόνδρου. Φυσιολογικά τα χονδροκύτταρα διατηρούν την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού στον αρθρικό χόνδρο.

##### A.1.4α. Σύνθεση του αρθρικού χόνδρου

Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος αποτελείται από ύδωρ σε ποσοστό 70% και από εξωκυτάρια ουσία (Extracellular Matrix, ECM), η οποία συντίθεται και διατηρείται από έναν μικρό πληθυσμό εξειδικευμένων κυττάρων, τα χονδροκύτταρα [88]. Στον αρθρικό χόνδρο ενηλίκων αυτά τα κύτταρα καταλαμβάνουν περίπου το 2-5% του συνολικού όγκου του ιστού, ενώ δεν υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα [89]. Καθώς ο αρθρικός χόνδρος στερείται αγγείωσης, τα χονδροκύτταρα προσλαμβάνουν το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά από το αρθρικό υγρό με απλή διάχυση που ευοδώνεται με τις κινήσεις της άρθρωσης [88]. Τα χονδροκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για διάφορους αυξητικούς παράγοντες και

κυτοκίνες και ρυθμίζουν τόσο αναβολικές όσο και καταβολικές διεργασίες σε απόκριση αυτών των παραγόντων. Στα πλαίσια του φυσιολογικού μεταβολισμού του χόνδρου τα χονδροκύτταρα παράγουν τόσο τα δομικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας όσο και τα ένζυμα που την αποικοδομούν [90].

Η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο (ιδιαίτερα τύπου II) και πρωτεογλυκάνες, με προεξάρχουσα την αγγρεκάνη, η οποία είναι ευμεγέθης πρωτεΐνη που συνδέεται με το υαλουρονικό οξύ [90, 91]. Οι διάφοροι τύποι κολλαγόνων, II, IX και XI συνδυάζονται για να σχηματίσουν



Εικόνα 5. Δομή του αρθρικού χόνδρου.

ένα δίκτυο ινών που προσδίδει το δομικό πλαίσιο και το οποίο είναι περικυκλωμένο από τις πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεογλυκάνες είναι σύνθετα μακρομόρια με ένα πρωτεϊνικό κέντρο στο οποίο συνδέονται άλυσιοι γλυκοζαμινογλυκανών, κυρίως θειϊκή χονδροϊτίνη και θειϊκή κερατάνη. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια και είναι υπεύθυνες για την ενυδάτωση του ιστού [90-92]. Η ισχύς του χόνδρου προέρχεται από το δίκτυο του κολλαγόνου, ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο που ενεργεί αντισταθμιστικά στην οσμωτική πίεση που επάγεται από τα υδρόφιλα μονομερή της αγγρεκάνης. Έτσι, ο αρθρικός χόνδρος προσφέρει μία επιφάνεια με ελάχιστες τριβές και μεγάλη ανθεκτικότητα, όμως με μικρή αναγεννητική ικανότητα [90]. (Εικόνα 5)

#### A.1.4β Ο αρθρικός χόνδρος στην οστεοαρθρίτιδα

Στα πρώτα στάδια εμφάνισης της ΟΑ χαρακτηριστικό αποτελεί η απώλεια της ακεραιότητας του ιστού. Η εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου περιλαμβάνει δύο φάσεις: μία εκφυλιστική – καταβολική φάση στην οποία η δραστηριότητα των ενζύμων που παράγονται από τα χονδροκύτταρα αποδομεί την εξωκυττάρια ουσία, η σύνθεσή της αναστέλλεται και επιταχύνεται η συνεπακόλουθη διάβρωση του χόνδρου και μια δεύτερη βιοσυνθετική φάση κατά τη διάρκεια της οποίας τα χονδροκύτταρα προσπαθούν να επιδιορθώσουν την κατεστραμμένη εξωκυττάρια ουσία. Η αναβολική όμως δραστηριότητα δεν μπορεί να εξισορροπήσει την καταβολική με αποτέλεσμα την αποδόμηση του χόνδρου [93]. Σαν επακόλουθο αυξάνεται η οσμωτική πίεση στην περιοχή και έτσι προκύπτει η διόγκωση της άρθρωσης [90]. Η αύξηση της περιεκτικότητας του αρθρικού χόνδρου σε νερό, η διάσπαση του δικτύου του

κολλαγόνου και η ευκολότερη διαφυγή πρωτεογλυκανών από τη θεμέλιο ουσία αποτελούν τις πρώιμες αλλοιώσεις όταν ο χόνδρος είναι μορφολογικά ακέραιος [94]. Καθώς ο χόνδρος χάνει την ακεραιότητά του, αυξάνονται τα φορτία που επιδρούν στο δίκτυο του κολλαγόνου, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο ο οποίος οδηγεί στην καταστροφή του ιστού. Όταν ο αρθρικός χόνδρος χάσει την ακεραιότητα του, τα φορτία μεταφέρονται στο υποχόνδριο οστόν, με αποτέλεσμα την εστιακή απορρόφηση των δοκίδων και το σχηματισμό κύστεων, καθώς και την αντιδραστική σκλήρυνση στην περιοχή που δέχεται τα μεγαλύτερα φορτία (Εικόνα 6). Οι αρθρικές επιφάνειες σταδιακά αποδιοργανώνονται, η άρθρωση γίνεται ασταθής, ο χόνδρος στην περιφέρεια της άρθρωσης υποστρέφεται σε πρωιμότερο ιστολογικό στάδιο και αναπτύσσεται αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα και ενδοχόνδρινη οστεοποίηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οστεόφυτων [95, 96]. Τα οστεόφυτα – ή καλύτερα οστεοχονδρόφυτα – θεωρούνται ως μια απάντηση προσαρμογής της άρθρωσης για την αντιμετώπιση της αστάθειας. Τα οστεόφυτα ναρθηκοποιούν την άρθρωση και μπορούν να παίζουν έναν αντισταθμιστικό ρόλο στην αναδιανομή των δυνάμεων που ασκούνται στο χόνδρο με σκοπό την προστασία του. Φαίνεται λοιπόν ότι στα τελικά στάδια της ΟΑ των κάτω άκρων τα οστεόφυτα μπορεί να είναι ωφέλιμα σταθεροποιώντας την άρθρωση [97].



Εικόνα 6. Μαγνητική τομογραφία γόνατος με γαδολίνιο όπου φαίνονται πολλαπλές αλλοιώσεις τυπικές οστεοαρθρίτιδας – υμενίτιδα (λευκά βέλη), οστικό οίδημα (μαύρα βέλη) και οστικές κύστες (λεπτό μαύρο βέλος) [98].

#### **A.1.4γ Τα χονδροκύτταρα στην οστεοαρθρίτιδα**

Σε μοριακό επίπεδο, η κυτταρική απόκριση των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα μπορεί να συνοψισθεί στις ακόλουθες λειτουργίες: (I) πολλαπλασιασμός και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση), (II) αλλαγές στη συνθετική δραστηριότητα, (III) αλλαγές στην αποδομητική δραστηριότητα, που συνολικά οδηγούν σε αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων [93]. Στις διαδικασίες αυτές σημαντικός είναι και ο ρόλος φλεγμονωδών μορίων, παρότι η ΟΑ παραδοσιακά θεωρείται ως μια μη φλεγμονώδης αρθροπάθεια [99].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι στον οστεοαρθρικό χόνδρο υπάρχει ικανότητα πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων, ενώ στο φυσιολογικό χόνδρο πρακτικά δεν παρατηρείται τέτοια δραστηριότητα [100, 101]. Αυτό μπορεί να οφείλεται αφενός στην αυξημένη πρόσβαση αυξητικών παραγόντων από το αρθρικό υγρό εξαιτίας της χαλάρωσης του δικτύου των κολλαγόνων ινών ή εξαιτίας αυτής καθαυτής της βλάβης του δικτύου κολλαγόνου [102]. Σε κ ~~ε~~ περίπτωση, ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων είναι πιθανώς η βιολογική εξήγηση των συσσωματωμάτων που παρατηρείται στην ΟΑ.

Αρκετοί ερευνητές θεωρούν ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι το προεξάρχον στοιχείο στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου [103-105] ωστόσο, σε άλλες μελέτες το ποσοστό των αποπτωτικών χονδροκυττάρων είναι σχετικά μικρό ώστε η επίπτωση της απόπτωσης στην παθογένεια της ΟΑ να θεωρείται μηδαμινή [93]. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι καθώς τα αποπτωτικά κύτταρα δεν μπορούν να απομακρυνθούν επαρκώς από τον αρθρικό χόνδρο, τα προϊόντα του κυτταρικού θανάτου όπως το πυροφωσφορικό ασβέστιο μπορεί να συνεισφέρουν στην περαιτέρω αποδόμηση του ιστού [93].

Ένας αριθμός βιοχημικών μελετών έχουν δείξει αυξημένη σύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας στον οστεοαρθρικό χόνδρο [106-108]. Τα χονδροκύτταρα αντιδρούν στην καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας αυξάνοντας τον αναβολισμό τους και προσπαθώντας να επιδιορθώσουν την βλάβη. Παρόλα αυτά, η απώλεια συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας είναι από τα χαρακτηριστικότερα ευρήματα σε όλα τα στάδια αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου [93].

Τα χονδροκύτταρα είναι ικανά να συνθέτουν αρκετές μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs) [109, 110]. Οι πρωτεάσες αυτές είναι αυξημένες στην οστεοαρθρίτιδα, είτε εξαιτίας αυξημένης σύνθεσής τους είτε λόγω αυξημένης ενεργοποίησης προενζύμων τους από άλλες MMPs ή εξαιτίας μειωμένης λειτουργίας των αναστολέων τους, όπως του ιστικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών

(tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1) [109]. Η αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου II έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει αναφερθεί ότι η MMP-13 (collagenase-3) είναι το ένζυμο που κυρίως ευθύνεται για την αποδόμηση του δικτύου του κολλαγόνου και κατ' επέκταση του αρθρικού χόνδρου [111]. Επιπροσθέτως, οι MMP-3 (stromelysin) και MMP-9 αφαιρούν τελοπεπτιδία από τα κολλαγόνα τύπου II, IX και XI αποδομώντας έτσι τις συνδέσεις μεταξύ των ινών κολλαγόνου [112]. Σημαντικός για την αποδόμηση του χόνδρου είναι και ο ρόλος μιας άλλης ομάδας ενζύμων, των αγγρεκανασών, που ανήκουν στις οικογένειες των πρωτεϊνών ADAM (A Disintegrin-like And Metalloproteinase-like domain) και ADAM-TS (A Disintegrin-like And Metalloproteinase-like domain plus a Thrombospondin domain) [113].

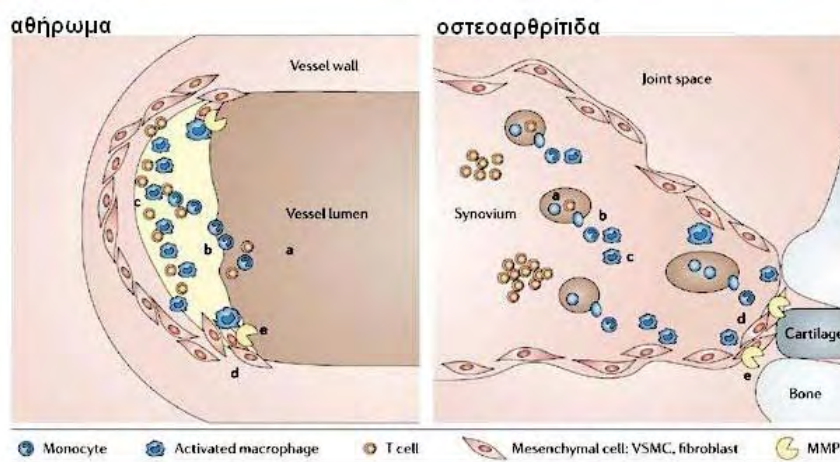
Οι αιτίες της αυξημένης πρωτεόλυσης και της ανεπαρκούς σύνθεσης που παρατηρούνται στην ΟΑ έχουν ερευνηθεί εκτενώς και έχει αναδειχθεί ο ρόλος φλεγμονωδών κυτοκινών καθώς και ανεπάρκειας αυξητικών παραγόντων [99]. Αν και η ΟΑ, σε αντίθεση με την ρευματοειδή αρθρίτιδα, ορίζεται ως μη φλεγμονώδης αρθροπάθεια, φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor α, TNFα), έχουν στοχοποιηθεί ως σημαντικοί μεσολαβητές στην ανάπτυξη της νόσου [114]. Η επίδραση των καταβολικών αυτών παραγόντων δεν εξαρτάται μόνο από την απόλυτη συγκέντρωσή τους αλλά και από την ύπαρξη και άλλων κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη 6, η ιντερλευκίνη 8 και ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (leukemia inhibiting factor, LIF) που συντίθενται σε μεγάλη ποσότητα όταν τα χονδροκύτταρα διεγείρονται από την IL-1β ή τον TNFα [115, 116]. Επιπροσθέτως και άλλες κυτοκίνες, όπως οι IL-17 και IL-18, έχουν προσφάτως αναγνωρισθεί ως επαγωγείς των IL-1β και TNFα [117, 118], ενώ αντίθετα ένας αριθμός κυτοκινών, όπως οι IL-4, IL-10 και IL-13 θεωρούνται αντιφλεγμονώδεις επειδή έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δραστηριότητα προφλεγμονωδών κυτοκινών [119]. Όλο αυτό το πολύπλοκο δίκτυο κυτοκινών φαίνεται να επιδρά στην μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων, ωστόσο ο ακριβής ρόλος κάθε κυτοκίνης βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η αποδόμηση του χόνδρου είναι κυρίως καθοδηγούμενη από την IL-1β, ενώ ο TNFα συμμετέχει στην έναρξη της αρθρίτιδας [120]. Σε ανοσοιστοχημικές μελέτες ο οστεοαρθρικός χόνδρος παρουσιάζει έντονο σήμα για την IL-1β, κυρίως στην επιφανειακή του ζώνη [121], ενώ στην ΟΑ αυξάνει ο αριθμός των υποδοχέων της IL-1β [122] και μειώνεται ο αριθμός των αναστολέων του υποδοχέα της [123]. Η δράση της IL-1β μελετήθηκε σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων μετά από επαγωγή με τη συγκεκριμένη κυτοκίνη. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η IL-1β αυξάνει σημαντικά την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνολυσών, όπως

οι MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 και -13 [124-126], ενώ αναστέλλει την σύνθεση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου [127, 128]. Τα χονδροκύτταρα, σε απάντηση στην IL-1β αυξάνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) και προσταγλαδίνης E2, δύο παραγόντων που έχει δείχθει ότι επάγουν κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με την ανάπτυξη OA, όπως είναι η μείωση της σύνθεσης πρωτεογλυκανών, και η αναστολή της σύνθεσης κολλαγόνου τύπου II [99, 129]. Επιπροσθέτως το NO επάγει την απόπτωση των χονδροκυττάρων η οποία παρατηρείται στην OA [130]. Όσον αφορά στο ρόλο της προσταγλαδίνης E2, αυτός είναι λιγότερο σαφής καθώς έχουν αναφερθεί τόσο προαποπτωτικές δράσεις [131], όσο και ενεργοποίηση της σύνθεσης MMP-3 και αναστολή της παραγωγής του TIMP-1 [132]. Επιπλέον, η προσταγλαδίνη E2 μπορεί να δρα και με αναβολικό τρόπο αυξάνοντας την παραγωγή κολλαγόνου τύπου II και πρωτεογλυκανών στο χόνδρο μέσω αυτοκρινούς δράσης, διεργασίες που ενέχουν και τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης (insulin growth factor 1, IGF-1) [133].

Εκτός από το ρόλο των κυτοκινών, η μείωση αυξητικών παραγόντων έχει προταθεί ως αιτία για την υπερίσχυση του καταβολισμού στην OA και την αποδόμηση του χόνδρου. Ο IGF-1 έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών, ακόμα και παρουσία IL-1β, ενώ εκτός από τον αναβολικό του ρόλο προάγει την έκφραση κολλαγόνου τύπου II και αγγρεκάνης από χονδροκύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση αποδιαφοροποίησης [134-136]. Αν και τα χονδροκύτταρα στον οστεοαρθρικό χόνδρο εκφράζουν τον IGF-1 καθώς και τον υποδοχέα του και μάλιστα σε επίπεδα μεγαλύτερα από ότι ο φυσιολογικός ιστός, φαίνεται ότι υπάρχει μειωμένη απόκριση πιθανώς λόγω αύξησης πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον IGF-1 [137, 138]. Εκτός από τον IGF-1 έχει βρεθεί ότι τα μέλη της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού b (TGFb) καθώς και των μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMP) είναι κύριοι ενεργοποιητές της βιοσύνθεσης από τα χονδροκύτταρα [139]. Πειραματόζωα με απενεργοποιημένη τη λειτουργία του TGFb είτε εκφράζουν έναν λειτουργικά ανενεργό TGFb υποδοχέα [140], είτε παρουσιάζουν διαταραγμένη την ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος αναπτύσσοντας στη συνέχεια μια εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων που ομοιάζει με την OA στους ανθρώπους [141]. Στην υπεροικογένεια των TGFb ανήκει και η οικογένεια των BMP, εκτός της BMP-1. Μερικές BMPs έχει βρεθεί ότι προάγουν την χονδρογένεση και επάγουν τη σύνθεση πρωτεογλυκανών *in vitro* [142].

## A.2 Η οστεοαρθρίτιδα και η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων

Η οστεοαρθρίτιδα, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν, είναι μία ετερογενής και πολυπαραγοντική νόσος με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες να οδηγούν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Πρόκειται για μία νόσο της προχωρημένης ηλικίας η οποία παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με άλλα εκφυλιστικά νοσήματα που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως είναι τα καρδιαγγειακά.



Επιδημιολογικές παρατηρήσεις έχουν συνδέσει την ΟΑ με την αθηρωμάτωση [143]. Στη μελέτη AGES-Reykjavik, με 5764 συμμετέχοντες, διαπιστώθηκε στην ομάδα των γυναικών θετική συσχέτιση μεταξύ της ΟΑ χεριών και της αθηρωμάτωσης στα στεφανιαία αγγεία και στις καρωτίδες και τα αποτελέσματα αυτά παρέμειναν σημαντικά και μετά την προσαρμογή για μεταβλητές όπως η ηλικία, ενώ διαπιστώθηκε ότι η συσχέτιση αυτή ήταν γραμμική, με αυξημένη αγγειακή παθολογία ανάλογα με τη σοβαρότητα της ΟΑ χεριών [143].

Ο παραλληλισμός των δύο παθήσεων δεν βασίζεται μόνο στο ότι πρόκειται για νοσήματα των οποίων ο επιπολασμός αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας καθώς και στο ότι θεωρούνται μια κατάσταση χρόνιας, ήπιας φλεγμονής, αλλά φαίνεται να έχουν και κοινή μοριακή βάση. Η ΟΑ και η αθηρωμάτωση είναι χρόνιες, εκφυλιστικές παθήσεις με μεγάλη επίπτωση στις ανεπτυγμένες κοινωνίες. Αρχικά διαδράμουν σιωπηρά, όταν όμως τα κλινικά συμπτώματα και οι επιπλοκές τους γίνουν εμφανή συνδέονται με μεγάλο οικονομικό κόστος. Η κλινική συσχέτιση της ΟΑ με την αθηρωμάτωση αυξάνει με την πάροδο των ετών, ως συνιστώσα της γήρανσης του πληθυσμού. Φαίνεται ότι εκτός από την κλινική τους συσχέτιση, τα δύο νοσήματα συνδέονται και με κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς που έχουν μεγάλη σπουδαιότητα καθώς προσφέρουν νέους τρόπους θέασης των δύο νοσημάτων με τη μοναδική προοπτική για ανάπτυξη διπλά στοχευμένων θεραπειών που θα



μπορούσαν να μειώσουν την επίπτωση των νόσων στην ποιότητα της ζωής των ασθενών.

Μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι άτομα με ΟΑ διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο θνητότητας από ότι ο γενικός πληθυσμός. Πέρα από τις άμεσες συνέπειες της επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής καθώς και τις καλά τεκμηριωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ), η ΟΑ συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας. Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την άποψη πως οι ασθενείς με ΟΑ βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο από το γενικό πληθυσμό για διάφορες συν-νοσηρές καταστάσεις, και ειδικότερα για καρδιαγγειακά νοσήματα. Σε μια πρόσφατη μελέτη διαστρωμάτωσης από το Hong Kong τα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν πιο συχνά μεταξύ ασθενών με ΟΑ [144]. Οι Cerhan και συν. έδειξαν ότι η αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα ήταν ευθέως ανάλογη της έκτασης της ακτινολογικής οστεοαρθρικής βλάβης (αριθμός προσβεβλημένων αρθρώσεων) σε πληθυσμό γυναικών [145]. Παρόμοια, μια Φιλανδική μελέτη έδειξε ότι η παρουσία προχωρημένης ΟΑ στην πρώτη καρπομετακάρπια άρθρωση σε άνδρες συσχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο ολικής θνητότητας κατά 32% [146]. Ανάλογες μελέτες στις ΗΠΑ έδειξαν ότι οι ενήλικες με ΟΑ είχαν μεγαλύτερη επίπτωση κλασικών παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών συμβαμάτων από ότι ο γενικός πληθυσμός [147], ενώ μια μελέτη σε Αγγλία και Ουαλία, η οποία στόχευε στον καθορισμό παραγόντων συν-νοσηρότητας σε ασθενείς με ΟΑ, ανέδειξε σημαντική συσχέτιση με την ισχαιμική καρδιακή νόσο [148]. Μελέτες σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) σε πληθυσμούς με ΟΑ έδειξαν αυξημένο προφίλ κινδύνου για ΣΝ σε σύγκριση με τον πληθυσμό χωρίς ΟΑ [147, 149], ενώ ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με ΟΑ και χωρίς γνωστή καρδιαγγειακή νόσο είχαν 10ετή κίνδυνο ΣΝ πάνω από 30% [150].

Υπάρχουν αρκετές εξηγήσεις για τις ανωτέρω συσχετίσεις, με τη μειωμένη άσκηση και την παχυσαρκία να αποτελούν τις πιο εμφανείς, ενώ το κοινό γενετικό υπόβαθρο, η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς και η μικροαγγειακή αθηρωμάτωση έχουν επίσης προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη ΟΑ [151]. Οι ασθενείς με ΟΑ εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό αρκετούς από τους επιβεβαιωμένους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου όπως η ηλικία, η παχυσαρκία, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και η δυσλιπιδαιμία [152]. Ταυτόχρονη παρουσία παχυσαρκίας, διαβήτη και υπέρτασης, συγκρινόμενη με πληθυσμό ατόμων που δεν είχε κανένα από τα τρία χαρακτηριστικά, οδήγησε σε αυξημένη επίπτωση ΟΑ χεριών στη μελέτη Rotterdam [153]. Μία πρόσφατη ανάλυση δεδομένων από την National Health and Nutrition Examination Survey III που έγινε σε πάνω από 7000 Αμερικανούς άνω των

18 ετών συνέκρινε την επίπτωση της ΟΑ και των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου που ορίζουν το μεταβολικό σύνδρομο (κοιλιακή παχυσαρκία, υπερτριγλυκεριδαιμία, μειωμένη HDL, υπέρταση και υπεργλυκαιμία) [154]. Στη μελέτη αυτή η ΟΑ συσχετίστηκε με αυξημένη επίπτωση μεταβολικού συνδρόμου, ιδιαίτερα στα νεαρότερα άτομα, – περισσότερο από 2 φορές ανεξαρτήτως φύλου ή φυλής και πάνω από 5 φορές στον πληθυσμό των 40 ετών – υποστηρίζοντας ότι η διάγνωση της ΟΑ θα πρέπει να λειτουργεί ως σήμα κινδύνου για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου με σκοπό την πιο πρώιμη θεραπευτική παρέμβαση [154].

Η εμπλοκή όμως των λιπιδίων στην ΟΑ δεν περιορίζεται στη συμμετοχή του λιπώδους ιστού. Η εναπόθεση λιπιδίων παρατηρείται πρώιμα στην ΟΑ, πριν την εμφάνιση ιστολογικών αλλαγών, καταδεικνύοντας την εμπλοκή των λιπιδίων στην παθογένεια της νόσου [155]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια της επιφανειακής στιβάδας του αρθρικού χόνδρου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας [155, 156]. Οι Adkisson και συν. έδειξαν ότι στο νεαρό χόνδρο υπάρχουν χαμηλά επίπεδα n-6-πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (n-6-PUFA) και υψηλά επίπεδα n-9-λιπαρών οξέων τα οποία με την πάροδο των ετών μειώνονται ενώ αυξάνουν τα n-6-PUFA [157], ενώ η σύνθεση αυτή επηρεάζεται και από τη διαιτητική πρόσληψη σε λιπαρά [158, 159]. Επίσης προτείνεται ότι το 20:3 n-9 λιπαρό οξύ, λόγω χημικής δομής, δεν μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την κυκλοξυγενάση, οπότε και ο χόνδρος προστατεύεται από τις επαγόμενες από την προσταγλαδίνη φλεγμονώδεις αντιδράσεις [157]. Έχει επίσηςδειχθεί ότι ανάλογα με τη βαρύτητα των οστεοαρθρικών αλλοιώσεων αυξάνουν και τα συνολικά επίπεδα των λιπαρών οξέων στον αρθρικό χόνδρο [155].

Η συσχέτιση της υπερχοληστερολαιμίας με την ΟΑ χεριών έχει αναφερθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες σε πληθυσμιακές μελέτες [160]. Στη μελέτη Chingford, η υπερχοληστερολαιμία συσχετίστηκε με την ΟΑ γόνατος σε γυναίκες ανεξάρτητα από την παχυσαρκία και η συσχέτιση αυτή ήταν ισχυρότερη για την αμφοτερόπλευρη ΟΑ [17]. Περαιτέρω ενίσχυση στην υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης ορού αποτελούν ένα συστηματικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΟΑ έδωσε μια μελέτη από την Ulm όπου οι συμμετέχοντες ήταν ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ και στους οποίους διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων χοληστερόλης ορού και ακτινολογικής ΟΑ χεριών [161]. Επίσης, αποτελέσματα από μια μελέτη από την Σαουδική Αραβία έδειξαν συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων χοληστερόλης ορού και ΟΑ γόνατος καθώς και γενικευμένης ΟΑ [162].

Στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία, μια αυτοσωμικά κληρονομούμενη νόσο, που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL, πρώιμη στεφανιαία νόσο και ξανθώματα, περίπου το 40% των ασθενών εμφανίζει και συμπτώματα από τις αρθρώσεις, πέραν από τα χαρακτηριστικά για τη νόσο ξανθώματα στους τένοντες [163, 164] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διαβρώσεις και κυστικές αλλοιώσεις των μεταταρσοφαλαγγικών αρθρώσεων σε γυναίκα 18 ετών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία [164].

Σε μία μελέτη ασυμπτωματικών μεσήλικων γυναικών χωρίς κλινική εικόνα ΟΑ γόνατος, τα επίπεδα χοληστερόλης ορού και τριγλυκεριδίων συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη οστικού οιδήματος σε διάστημα δύο ετών, το οποίο έχει δείχθει ότι αποτελεί ένα δείκτη απώλειας όγκου αρθρικού χόνδρου και εξέλιξης της βλάβης του χόνδρου [165-167].

Πράγματι, πρόσφατα η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίστηκε ως μέρος του μεταβολικού συνδρόμου αποκτώντας έτσι νέα προοπτική στη μελέτη της νόσου και την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών [168].

Η παχυσαρκία αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της ΟΑ [41, 42, 169] καθώς και έναν καλά τεκμηριωμένο παράγοντα για την καρδιαγγειακή νόσο και την αθηρωμάτωση [170, 171]. Ένας αριθμός προοπτικών μελετών έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας, οριζόμενης ως δείκτης μάζας σώματος πάνω από 30, και της ακτινολογικά επιβεβαιωμένης ΟΑ γόνατος, όπως η μελέτη Framingham [172], η μελέτη Chingford [173], η Baltimore Longitudinal Study of Aging [169], η John Hopkins Precursors Study [174] και άλλες μελέτες στην Αγγλία [175] και την Ολλανδία [176]. Για αυτούς τους λόγους η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας δέχεται ότι η ΟΑ είναι συνέπεια της παχυσαρκίας [177].

Ιστορικά, είχε υποθεθεί ότι οι συνέπειες της παχυσαρκίας στην άρθρωση οφείλονται στο αυξημένο μηχανικό φορτίο, σε σχετιζόμενη με αυτό ανακατανομή του βάρους στην άρθρωση και σε συνεπαγόμενες παραμορφώσεις – ραιβότητα, βλαισότητα [178, 179]. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και ΟΑ στις αρθρώσεις που δεν υποβαστάζουν το βάρος του σώματος όπως τα χέρια, προάγει την ιδέα ενός μεταβολικού μεσολαβητή [180]. Μια πρόσφατη 10ετής μελέτη από τη Νορβηγία έδειξε ότι η παχυσαρκία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΟΑ χεριών [181].

Το 1998 οι Toda και συν. καθόρισαν τη μεταβλητή που σχετιζόταν πιο στενά με τη συμπτωματική ανακούφιση στην ΟΑ γόνατος και αυτή ήταν η απάντηση σε ένα πρόγραμμα ελέγχου του σωματικού βάρους που υποστήριζε ότι η μείωση του σωματικού λίπους ήταν σημαντικότερη από την απώλεια βάρους ή από άλλους δείκτες παχυσαρκίας, αν και δεν αναδείχθηκε σαφής σχέση αιτίου – αποτελέσματος [182].

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη με σχεδόν 40.000 συμμετέχοντες, ο κίνδυνος ολικής αρθροπλαστικής γόνατος ή ισχίου λόγω ΟΑ αυξάνει ανάλογα με την μάζα λιπώδους ιστού 10 έως 15 χρόνια μετά από τον αρχικό προσδιορισμό της [183].

Σε μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με ΟΑ γόνατος μείωση του βάρους κατά 10% βελτίωσε την λειτουργική τους ικανότητα κατά 28%. Στην ίδια μελέτη, η υποθερμιδική δίαιτα με 3.4MJ/day φάνηκε να υπερέχει της ισορροπημένης δίαιτας των 5MJ/day καθώς οδηγούσε σε ταχύτερη απώλεια βάρους και σημαντικότερη απώλεια σωματικού λίπους [184].

Σε μία μελέτη όπου συμμετείχαν υγιείς ενήλικες, οι Teichtahl και συν. έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα παχυσαρκίας συσχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο ετήσιας απώλειας του όγκου του χόνδρου της επιγονατίδος. Οι παρεμβάσεις απώλειας βάρους που μείωναν το σωματικό βάρος, ή στόχευαν ειδικά στη μείωση του λίπους, μείωσαν το ρυθμό απώλειας του όγκου του χόνδρου της επιγονατίδος και επομένως τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ της επιγονατιδομηριαίας άρθρωσης [185].

Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς με τους οποίους η παχυσαρκία και τα λιπαρά τα οποία λαμβάνονται μέσω της τροφής σχετίζονται με την ανάπτυξη ΟΑ. Απάντηση στο παραπάνω ερώτημα επιδιώκει να δώσει μια ομάδα ερευνητών από το Ην. Βασίλειο με τη βοήθεια ενός πειραματικού μοντέλου ποντικών [186]. Τα ποντίκια τύπου C57BL/6J όταν τραφούν με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά αναπτύσσουν αλλοιώσεις που ομοιάζουν με την ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου στον άνθρωπο [187]. Είναι όμως γνωστό ότι τα ίδια ποντίκια αναπτύσσουν και πρῶιμη ΟΑ [188]. Στηριζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα οι ερευνητές έδειξαν ότι η διαιτητικά προκαλούμενη παχυσαρκία προκαλεί οστεοαρθρίτιδα μέσω αύξησης των συγκεντρώσεων μιας αντιποκίνης, της λεπτίνης [186].

Η παχυσαρκία σχετίζεται με διαταραγμένο μεταβολισμό λιπιδίων και με την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων, των αντιποκινών – των ορμονικών δηλαδή μορίων που κατά κύριο λόγο παράγονται από το λιπώδη ιστό – και πρωτίστως της λεπτίνης, τα οποία προκαλούν ένα καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση κυτοκινών και άλλων μορίων με τελικό αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την αθηρωμάτωση [189, 190]. Πέρα όμως από το ρόλο τους στην παχυσαρκία, τα

μεταβολικά νοσήματα και την αθηρωμάτωση, πρόσφατα ο ρόλος της λεπτίνης αλλά και άλλων αντιποκινών άρχισε να μελετάται και στην OA [191, 192].

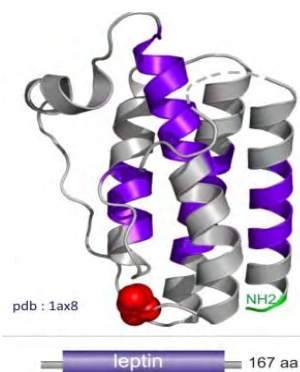
Η συσσώρευση λιπιδίων, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς στην αθηρωμάτωση, είναι μία διαδικασία που δυνητικά μπορεί να συμβεί σε όλα τα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να εκφράσουν υποδοχείς, όπως ο LOX-1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1), με την ιδιότητα να συνδέονται με τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη και να τις μεταφέρουν στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης. Η οξείδωση των λιπιδίων έχει συσχετισθεί στενά με τη δομική αποσταθεροποίηση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου, ενώ οι αναστολείς της οξείδωσης των λιπιδίων φαίνεται πως ασκούν προστατευτική δράση στο χόνδρο [193-195].

Η συσσώρευση χοληστερόλης στα κύτταρα καθορίζεται αυστηρά από μια διαδικασία εισόδου-εξόδου. Για την αποφυγή της συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρα θα πρέπει να λειτουργεί ένας μηχανισμός ισορροπίας μεταξύ της εισόδου χοληστερόλης μέσω υποδοχέων, όπως ο LOX-1, και της εξόδου της από τα κύτταρα μέσω ειδικών μονοπατιών. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι παίζει η ABCA1 (ATP binding cassette A1), μια πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση ενισχύεται με την ενεργοποίηση παραγόντων όπως οι υποδοχείς LXRs (liver X receptors) καθώς και με την επίδραση κυτοκινών και τη συσσώρευση χοληστερόλης στο εσωτερικό των κυττάρων [196].

### **A.3 Το γονίδιο ob και η πρωτεΐνη λεπτίνη**

Στοιχείο κλειδί για την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, που από δεκαετίες έχει συσχετισθεί αναμφίβολα και με την αθηρωμάτωση. Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της OA [33]. Αρκετές μελέτες υποστήριξαν τους μηχανικούς παράγοντες ως κύριους μεσολαβητές αυτής της σχέσης, πιθανότατα μέσω αναδιανομής του αυξημένου σωματικού φορτίου στις υποβαστάζουσες το βάρος του σώματος αρθρώσεις. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και OA στις μη-υποβαστάζουσες το βάρος αρθρώσεις, όπως αυτές των χεριών, ενισχύει την άποψη ύπαρξης ενός μεταβολικού μηχανισμού [35, 42, 180]. Στα πλαίσια της θεώρησης αυτής σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της λεπτίνης.

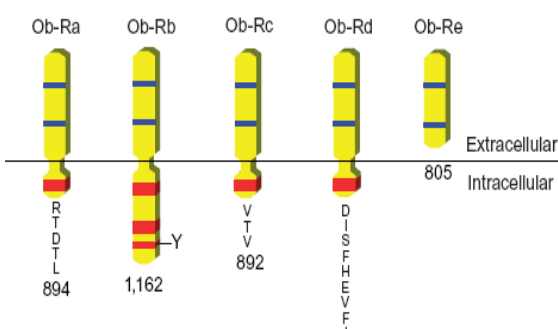
Η λεπτίνη είναι μία μη-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, μεγέθους 16kDa (Εικόνα 8), προϊόν του γονιδίου της παχυσαρκίας (*obese gene, ob*). Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από τον λευκό λιπώδη ιστό και εκκρίνεται στην κυκλοφορία όπου δρα σαν ορμόνη εμφανίζοντας δράση κυτοκίνης [197]. Επηρεάζει την ομοιόσταση του βάρους σώματος μέσω δράσεων στην πρόσληψη τροφής και στην ενεργειακή δαπάνη με αρνητική ανατροφοδότηση στους υποθαλαμικούς πυρήνες, ενώ παράγεται επίσης από μη-λιπώδη κύτταρα και στοχεύει και εξω-υποθαλαμικούς ιστούς [198, 199]. Η λεπτίνη είναι μια πλειοτροπική ορμόνη



Εικόνα 8. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου της λεπτίνης

που εμπλέκεται ως ρυθμιστικό μόριο σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η αιμοποίηση, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η αγγειογένεση, η ωθητική λειτουργία, η αναπαραγωγή και η φλεγμονή [200-205]. Πρόσφατα, έχει διαπιστωθεί ότι η λεπτίνη ενεργεί ως ρυθμιστής της οστικής ανάπτυξης επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών, τη σύνθεση κολλαγόνου και την επιμετάλλωση των οστών και επίσης προάγοντας την ενδοχόνδρια οστεοποίηση [206-210]. Η λεπτίνη ασκεί τη βιολογική της δράση μέσω πρόσδεσης σε ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς (Ob-R) που ανήκουν στην κατηγορία I υποδοχέων κυτοκινών και είναι προϊόντα του γονιδίου μεταγραφής *db* [211]. Στους ανθρώπους, υπάρχουν τουλάχιστον πέντε ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης,

παραγόμενες με εναλλακτικό μάτισμα του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) (Εικόνα 9). Οι υποδοχείς αυτοί είναι γλυκοπρωτεΐνες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και έχουν κυτταροπλασματικές υπομονάδες κυμαινόμενου μήκους (μεγάλου/μικρού μήκους ισομορφές) [212, 213]. Ο μεγάλου μήκους υποδοχέας της λεπτίνης, Ob-Rb, απαιτείται για την



Εικόνα 9. Οι πέντε ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης, όπου διακρίνεται η διαφορά στο ενδοκυττάριο τμήμα τους

ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT (Janus Kinase /signal transducer and activator of transcription). Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι ο Ob-Rb είναι ικανός να μετάγει σήματα με τη χρησιμοποίηση εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών, που συνδέουν τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης με την ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης/αγγειοτενσίνης, αντιπροσωπεύοντας πιθανώς ένα κρίσιμο

βήμα για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων [199, 213, 214]. Οι πιο μικρού μήκους ισομορφές (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd και Ob-Rf) έχουν μικρότερη κυτταροπλασματική περιοχή και εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα μεταγωγής σημάτων [212, 215, 216]. Από τους μικρού μήκους υποδοχείς ο Ob-Ra εκφράζεται άφθονα και είναι ο περισσότερο διατηρημένος ανάμεσα στα είδη, ενώ φαίνεται ότι έχει και ρόλο μεταφορέα [199].

Αυξημένα στοιχεία προτείνουν τη λεπτίνη ως ένα νέο προφλεγμονώδη παράγοντα παραγόμενο από τα λιποκύτταρα ο οποίος λειτουργεί στο δίκτυο κυτοκίνης συνδέοντας τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες με το νευροενδοκρινικό σύστημα [217]. Η προφλεγμονώδης δράση της λεπτίνης μέσω του υποδοχέα της Ob-Rb έχει προταθεί σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα, η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα και άλλες ασθένειες, πιθανώς μέσω της επαγωγής παραγόντων, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF), η ιντερφερόνη γ (INF-γ), η IL-2, και το νιτρικό οξείδιο (NO) [218, 219]. Έχει αποδειχθεί ότι η λεπτίνη μπορεί να επιδείξει προ ή αντιφλεγμονώδεις δράσεις στις αρθρώσεις ανάλογα με την άνοση απάντηση [220, 221]. Τα ποντίκια ob/ob που δεν εκφράζουν λεπτίνη αναπτύσσουν αντίσταση στην πειραματικά προκληθείσα από αντιγόνο αρθρίτιδα σε σύγκριση με τα άγριου-τύπου ποντίκια [221]. Επίσης, η νηστεία που συνδέεται με μειωμένα επίπεδα κυκλοφορούσας λεπτίνης οδηγεί στη μειωμένη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων CD4+ και στην αυξημένη έκκριση IL-4 στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [222]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη αυξάνει τη φλεγμονώδη δράση των φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η INF-γ και η IL-1, ενεργώντας σε συνέργεια στην παραγωγή NO [217, 218]. Η λεπτίνη όμως μπορεί να υποκινήσει και αναβολικές λειτουργίες στα χονδροκύτταρα μέσω της επαγωγής της σύνθεσης αυξητικών παραγόντων, όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) ή ο αυξητικός παράγοντας -1 της ινσουλίνης (IGF-1). Η παραγωγή των αυξητικών αυτών παραγόντων αποτελεί μέρος της προσπάθειας ανάπλασης που παρατηρείται στον οστεοαρθρικό χόνδρο [223, 224].

Ο πιθανός ρόλος της λεπτίνης στην οστεοαρθρίτιδα έχει υποστηριχθεί από τη σχέση μεταξύ της παχυσαρκίας και του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης OA [225]. Αυτή η θετική σχέση έχει παρατηρηθεί όχι μόνο για τις φέρουσες το βάρος του σώματος αρθρώσεις, όπως τα γόνατα, αλλά και για τις μη-φέρουσες βάρος αρθρώσεις, όπως τα χέρια [33, 42, 226]. Περαιτέρω στοιχεία για τη συμμετοχή της λεπτίνης στην OA προέρχονται από την παρατήρηση ότι η λεπτίνη έχει βρεθεί στο αρθρικό υγρό των ασθενών με OA και η συγκέντρωσή της έχει συσχετιστεί με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) [223]. Επιπλέον, σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα

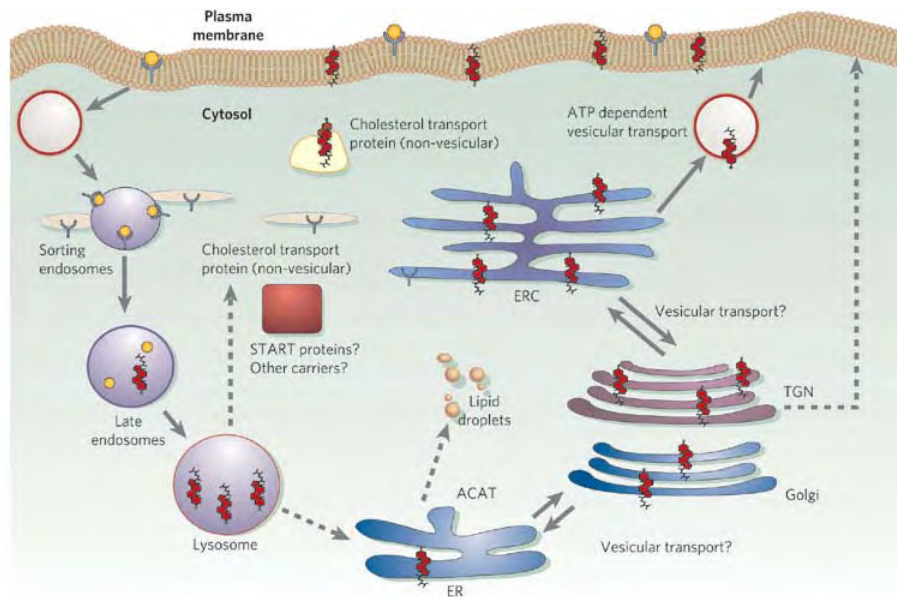
ενήλικων ατόμων έχει βρεθεί ότι εκφράζεται ο λειτουργικός υποδοχέας της λεπτίνης (Ob-Rb) και έπειτα από επίδραση με λεπτίνη παρατηρήθηκε η επαγωγή σύνθεσης θεμέλιας ουσίας [227]. Έχει προταθεί ότι η λεπτίνη έχει μια τοπική επίδραση στον αρθρικό χόνδρο στην ΟΑ, δεδομένου ότι τα επίπεδά της στο αρθρικό υγρό έχει βρεθεί ότι είναι υψηλότερα από εκείνα στον ορό [228].

#### **A.4 Ο μεταβολισμός των λιπιδίων σε κυτταρικό επίπεδο**

Η χοληστερόλη έχει αναγνωρισθεί ως ρυθμιστής κλειδί στη φυσιολογική εμβρυογένεση των σπονδυλωτών [229]. Είναι γνωστό ότι αποτελεί βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, απαραίτητο για την ομαλή κυτταρική λειτουργία, ενώ πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η χοληστερόλη παίζει σημαντικό ρόλο σε συγκεκριμένες διεργασίες κατά την εμβρυονική ανάπτυξη μέσω τροποποίησης των πρωτεϊνών Hedgehog, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κατά μήκος αύξησης των οστών και της χονδρογένεσης στην αυξητική πλάκα [230, 231].

Τα περισσότερα είδη κυττάρων καλύπτουν τις ανάγκες τους σε χοληστερόλη μέσω ενδογενούς σύνθεσης. Όμως ορισμένα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, αποκτούν επίκτητους μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών, όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη, με αρχικό στόχο την προστασία του επιθηλίου από επιβλαβείς τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες. Η συσσωρευμένη ελεύθερη χοληστερόλη στο εσωτερικό των κυττάρων είναι τοξική για τα κύτταρα. Αναλυτικά, διαταράσσεται ο λόγος ελεύθερης χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα να διαταράσσεται και η λειτουργία της μεμβράνης, καθώς και η λειτουργία ζωτικών πρωτεϊνών, όπως η Na-K-ATPάση, η αλκαλική φωσφατάση καθώς και μεταφορείς γλυκόζης, οργανικών ιόντων και θυμιδίνης. Έχει επίσης προταθεί ότι τα υψηλά επίπεδα ελεύθερης χοληστερόλης ευθύνονται για τη διαταραχή της λειτουργίας σηματοδοτικών πρωτεϊνών που εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Άλλοι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας της συσσωρευμένης ενδοκυττάριας χοληστερόλης αποτελούν η κρυσταλλοποίησή της, η δημιουργία οξυστερολών και η πυροδότηση αποπτωτικών μονοπατιών. Η συμβολή των παραπάνω μηχανισμών στην πρόοδο της αθηρωματικής αγγειακής νόσου έχει εκτενώς μελετηθεί, ενώ το αν τα χονδροκύτταρα ανήκουν σε αυτή την κατηγορία των κυττάρων και το αν η οστεοαρθρίτιδα σχετίζεται με διαταραχή των λιπιδίων και σε κυτταρικό επίπεδο δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί [232-234].

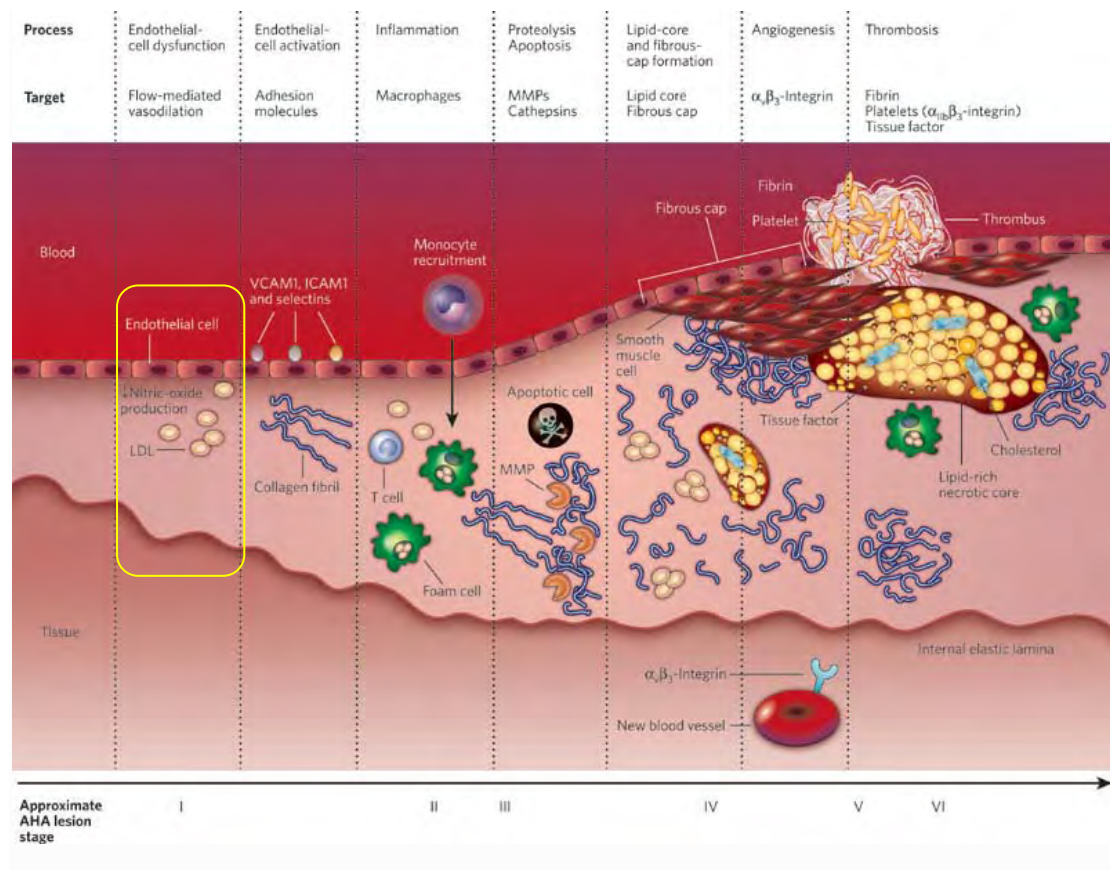




Εικόνα 10. Η LDL χοληστερόλη (κίτρινοι κύκλοι) μεταφέρεται μέσω ειδικών υποδοχών (μπλε Y -σχήματος) εντός του κυττάρου, οι υποδοχείς επιστρέφουν στην μεμβράνη (μέσω του endocytic recycling compartment, ERC) και η χοληστερόλη μεταφέρεται πάλι εκτός κυττάρου μέσω μιας ATP-ανεξάρτητης διαδικασίας. Η χοληστερόλη η οποία συντίθεται από το κύτταρο στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER) μεταφέρεται εκτός κυττάρου μέσω του συστήματος Golgi, είτε εστεροποιείται (lipid droplets). Η πλεονάζουσα χοληστερόλη εστεροποιείται (lipid droplets).

#### A.4.1 Είσοδος χοληστερόλης στα κύτταρα – ο ρόλος της οξειδωμένης LDL και του υποδοχέα της

Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (ox-LDL) είναι ένα μόριο με πολλές βιολογικές λειτουργίες, το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω του θεμελιώδους ρόλου που παίζει στην αθηρογένεση (Εικόνα 11). Όταν η LDL χοληστερόλη βρίσκεται σε περίσσεια στο πλάσμα παγιδεύεται στο αγγειακό τοίχωμα και εκεί οξειδώνεται. Τα μακροφάγα καθώς και άλλα κύτταρα προσλαμβάνουν την ox-LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, που αποτελούν βασικά στοιχεία της αθηρωματικής πλάκας.

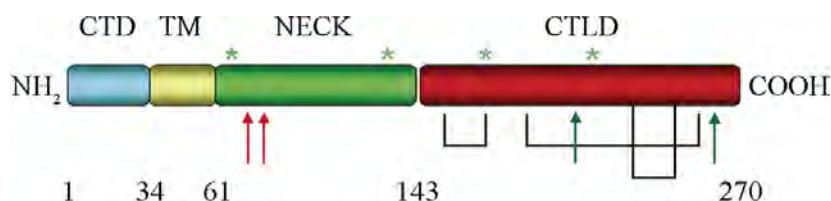


Εικόνα 11. Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας σε ένα απλοποιημένο γράφημα, από το φυσιολογικό αγγείο (αριστερά) στο αγγείο με την αθηρωματική πλάκα και τον θρόμβο (δεξιά), όπου φαίνεται και ο ρόλος της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης (μετά από οξείδωση της LDL από το NO) στα αρχικά στάδια της νόσου.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων επίσης προσλαμβάνουν ox-LDL και ακολούθως εκφράζουν αθηρωματικά μόρια, όπως διάφορα μόρια προσκόλλησης, αλλά και μειώνουν την παραγωγή NO, μειώνοντας έτσι τη φυσιολογικά επαγόμενη από το NO αγγειοδιαστολή. Αν και η οξείδωση της LDL που παρατηρείται στο αγγειακό τοίχωμα είναι αυτή που έχει λάβει και τη μεγαλύτερη προσοχή, φαίνεται ότι η οξείδωση της LDL μπορεί να συμβεί και σε άλλους ιστούς, συνήθως όπου υπάρχει φλεγμονή [235]. Οι λιποπρωτεΐνες στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA) έχει βρεθεί ότι είναι οξειδωμένες και έχει δειχθεί ότι η ox-LDL συσσωρεύεται στο φλεγμαίνοντα αρθρικό υμένα όπως τα αφρώδη κύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα [236, 237]. Η συσχέτιση της παρουσίας των οξειδωμένων λιπιδίων στην άρθρωση με την αποδόμηση του χόνδρου στηρίζεται στην ικανότητα των οξειδωμένων λιπιδίων να προκαλούν δομική αποσταθεροποίηση της θεμέλιας ουσίας του χόνδρου [193]. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι συνεργικά με φόρτιση κυκλικής

τάνυσης (cyclic tensile stretch load) η oxLDL επηρεάζει τη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων και τη σύνθεση πρωτεογλυκανών [238].

Ο υποδοχέας LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor 1) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που ανήκει στην τύπου C οικογένεια των λεκτινών, ένας υποδοχέας σάρωθρο, που μπορεί να δράσει ως υποδοχέας επιφανείας για την ενδοκύττωση της ox-LDL [239]. (Εικόνα 12)



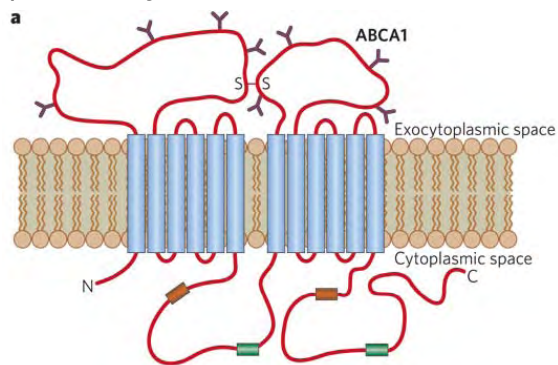
Εικόνα 12. Σχηματικό μοντέλο της δομής του ανθρώπινου υποδοχέα LOX-1. Με αστερίσκο σημειώνονται οι N-γλυκοζυλιωμένες θέσεις, ενώ οι θέσεις των τριών δισουλφιδικών δεσμών υποδεικνύονται με αγκύλες. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τις θέσεις δέσμευσης της οξειδωμένης (LDL CTD: cytoplasmic domain; TM: transmembrane domain; NECK: the neck domain; CTLD: the C type lectin-like domain) [240].

Η έκφραση του LOX-1 και η συσσώρευση της ox-LDL έχει ανιχνευθεί στις αρθρώσεις ενός πειραματικού μοντέλου αρθρίτιδας σε αρουραίους [241]. Σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα αρουραίου η προσθήκη ox-LDL μαζί με IL-1β ενίσχυσε την έκφραση του υποδοχέα LOX-1 [242] και σε καλλιέργειες βόειων χονδροκυττάρων η δέσμευση της ox-LDL από τον LOX-1 ενίσχυσε την παραγωγή ενδοκυττάρων ελεύθερων ριζών οξυγόνου και ενεργοποίησε τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κB αποκαλύπτοντας έτσι κάποιες καταβολικές δράσεις της ox-LDL στον αρθρικό χόνδρο [243]. Η έκφραση του υποδοχέα LOX-1 έχει ανιχνευθεί στον ανθρώπινο αρθρικό χόνδρο σε ασθενείς με PA, ενώ αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί για την έκφρασή του στην OA [244, 245].

#### A.4.2 Έξοδος χοληστερόλης από τα κύτταρα

Είναι καθολικά αποδεκτό ότι η ενδοκυττάρια συσσώρευση χοληστερόλης συμβαίνει μόνο σε κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες μέσω υποδοχέων σάρωθρων (scavenger-type

receptor), όπως ο LOX1 [246]. Καθώς η υπερβολική συσσώρευση χοληστερόλης στο εσωτερικό των κυττάρων είναι τοξική για τα ίδια τα κύτταρα, αυτή προλαμβάνεται μέσω μηχανισμών αυστηρής ρύθμισης της εξόδου [233, 234]. Οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (high-density lipoproteins, HDL) και οι απολιποπρωτεΐνες τους, ειδικά η απολιποπρωτεΐνη α1 (ApoA1), είναι υπεύθυνες για την μεταφορά της χοληστερίνης από τα περιφερικά κύτταρα, μια διαδικασία γνωστή ως “reverse cholesterol transport”. Η ApoA1 είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 28kDa με ρόλο κλειδί στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών καθώς αποτελεί το κύριο συστατικό των HDL [247]. Σημαντική στην ομοίωση της χοληστερόλης είναι και η δράση του μεταφορέα ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1), μιας πρωτεΐνης που εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενεργεί ως αντλία λιπιδίων μεταφέροντας τη χοληστερόλη και τα



Εικόνα 13. Απεικόνιση του διαμεμβρανικού μορίου της ABCA1 [232].

φωσφολιπίδια από το κύτταρο στην ApoA1 και τη HDL χοληστερόλη (Εικόνα 13). Η σημασία του αναγνωρίστηκε όταν ανιχνεύθηκε ως το υπεύθυνο γονίδιο για τη νόσο Tangier, μια αυτοσωμικά κληρονομούμενη νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από πρόωμη αθηρωμάτωση, έλλειψη HDL και συσσώρευση χοληστερινικών εστέρων στα μακροφάγα, και αποτέλεσε το κλειδί για τη διαλεύκανση του ρόλου της ABCA1 στο μηχανισμό εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η ApoA1, ανεξάρτητα από την HDL, έχει προστατευτικές ιδιότητες στην αθηρωμάτωση καθώς αναστέλλει την οξειδωση της LDL χοληστερόλης, και ασκεί και αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την έκκριση της IL-1β και του TNF [248]. Έχει προταθεί ότι η ABCA1 σχετίζεται ενεργά με τις δράσεις αυτές μέσω της ApoA1 [249]. Η ABCA1 έχει δειχθεί ότι μεταφέρει εκλεκτικά την κυτταροτοξική ελεύθερη χοληστερόλη εκτός των κυττάρων, ελέγχοντας έτσι και τα ενδοκυττάρια επίπεδα οξειδωμένων στερολών [248]. Μόρια φλεγμονής, όπως η INF-γ, η IL-1β και ο TNF, μειώνουν την έκφραση της ABCA1 που με την σειρά της οδηγεί σε ανεπαρκή κάθαρση των οξειδωμένων λιπιδίων και κατ' επέκταση σε περαιτέρω συσσώρευση φλεγμονωδών μορίων, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο που έχει ήδη μελετηθεί στην αθηρωμάτωση [248].

Ο σημαντικός ρόλος που παίζει η ABCA1 και η ApoA1 στην ομοίωση της χοληστερόλης επιβάλλει έναν αυστηρό ρυθμιστικό μηχανισμό της έκφρασής τους σε μεταγραφικό επίπεδο. Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες που

ενεργοποιούνται από προσδέτες και που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων – στόχων. Ο liver X receptor (LXR) είναι πυρηνικός υποδοχέας τύπου II, και αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα στη ρύθμιση της ABCA1. Ο LXR αποτελείται από δύο ισομορφές, LXRα και LXRβ, με την πρώτη να αποτελεί την πιο σημαντική στην ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Ο LXRα εκφράζεται σε διάφορους ιστούς όπως στο ήπαρ, το σπλήνα, το λιπώδη ιστό, τον πνεύμονα και την υπόφυση, ενώ ο LXRβ εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Ο LXRα εκφράζεται στα μακροφάγα και είναι σημαντικός στη φυσιολογία της αθηρωματικής πλάκας καθώς φαίνεται ότι είναι ικανός να ενεργοποιεί και να καταστέλλει το γονίδιο ABCA1 ανάλογα με την διαθεσιμότητα του συνδέτη και κύρια των οξυστερολών [250]. Οι LXRs δρουν ως αισθητήρες που ανταποκρίνονται στις αυξημένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης και ενεργοποιούν ένα καταρράκτη γονιδίων που καθορίζουν τη μεταφορά και τον καταβολισμό της χοληστερόλης [248].

Η ενεργοποίηση των LXRs οδηγεί στην έξοδο της χοληστερόλης και σε αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούσας HDL. Έχει επίσης δειχθεί ότι η θεραπεία με LXR αγωνιστές σε μοντέλα πειραματοζώων παρεμποδίζει την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης [251-253]. Οι αντι-αθηρωγόνες δράσεις των LXR αγωνιστών μεσολαβούνται μέσω μεταβολικών ρυθμίσεων, όπως η αύξηση των επιπέδων HDL και η βελτίωση του μεταβολισμού της χοληστερόλης από τα μακροφάγα, ασκούν όμως και άμεση προστατευτική δράση στο τοίχωμα των αγγείων μέσω αναστολής φλεγμονωδών αποκρίσεων ιδιαίτερα στα μακροφάγα [254].

Πρόσφατες μελέτες πρωτεομικής έδειξαν ότι πρωτεΐνες που ενέχονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, υποεκφράζονται στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά [255], ενώ η έρευνα πλέον στρέφεται στην μελέτη της έκφρασης των LXR στον αρθρικό χόνδρο με απώτερο στόχο την ανίχνευση πιθανών μορίων – στόχων για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις στην οστεοαρθρίτιδα.

## A.5 Σκοπός της διατριβής

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων στην οστεοαρθρίτιδα καθώς και πιθανοί μηχανισμοί δράσης τους. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα καθώς και φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος με στόχο να διαλευκανθούν γονίδια που ενέχονται στην εμφάνιση της νόσου και να αναδειχθούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκε:

- Η έκφραση σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο γονιδίων που ενέχονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως της λεπτίνης και των υποδοχέων της Ob-Rb και Ob-Ra, του υποδοχέα της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, LOX-1, καθώς και των γονιδίων ApoA1, ABCA1, LXRA και LXRβ.
- Ο ρόλος της λεπτίνης στο μεταβολισμό του χόνδρου μέσω της επίδρασης λεπτίνης σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων και μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων της, της παραγωγής φλεγμονωδών μορίων (IL-1β, NO), της δράσης της στη βιωσιμότητα των κυττάρων και στην παραγωγή καταβολικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-9 και MMP-13.
- Η επίδραση της παχυσαρκίας στη διαφοροποιημένη έκφραση της λεπτίνης και της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης στο αρθρικό υγρό και το χόνδρο ασθενών με ΟΑ.
- Ο ρόλος και ο μηχανισμός δράσης των γονιδίων που ενέχονται στην είσοδο και έξοδο της χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση του υποδοχέα - σάρωθρου της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, LOX-1, καθώς και η έκφραση των γονιδίων της απολιποπρωτεΐνης A1 (ApoA1) – του κύριου συστατικού της HDL χοληστερόλης, του γονιδίου ABCA1 που δρα ως αντλία λιπιδίων μεταφέροντας τα λιπίδια από το εσωτερικό του κυττάρου προς την ApoA1, και των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων LXRA και LXRβ. Παράλληλα μελετήθηκε η ίδια η συσσώρευση λιπιδίων στο κύτταρο και μετρήθηκε η έξοδός τους από αυτά.
- Η ύπαρξη πιθανών θεραπευτικών μορίων, όπως το αντιοξειδωτικό ασκορβικό οξύ και ο συνθετικός LXR αγωνιστής TO-901317 μέσα από τη μελέτη των δράσεών τους στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων και συγκεκριμένα των επιπτώσεών τους στη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων και την απόπτωση, στην έκφραση αναβολικών και καταβολικών γονιδίων, στη συσσώρευση λιπιδίων και στην έξοδό τους από τα χονδροκύτταρα.

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1.1 Συλλογή δειγμάτων**

Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη ελήφθησαν από τους μηριαίους κονδύλους, το κνημιαίο κύρτωμα και τις μηριαίες κεφαλές ασθενών που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπαιδική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από όλους τους ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ελήφθη επίσης αρθρικό υγρό υπό άσηπτες συνθήκες στο χώρο του χειρουργείου και ορός αίματος αφού είχε προηγηθεί 12ωρη νηστεία.

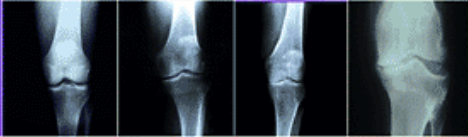
Η συλλογή των δειγμάτων αρθρικού χόνδρου έγινε σταδιακά, καθώς για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται πάντοτε φρέσκος ιστός. Είναι γνωστό ότι η απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων καλής ποιότητας RNA από δείγματα αρθρικού χόνδρου αποτελούσε ένα σημαντικό εμπόδιο στην έρευνα για την παθογένεια νοσημάτων του χόνδρου. Αυτό οφείλεται σε έναν αριθμό παραγόντων που προστίθενται στη δεδομένη δυσκολία της ανεύρεσης ανθρώπινων φυσιολογικών ιστών. Ο αρθρικός χόνδρος χαρακτηρίζεται από μικρή κυτταρική συγκέντρωση (1-2% της μάζας του) και μια μεγάλη συγκέντρωση εξωκυττάριας ουσίας υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεογλυκάνες. Η κύρια πρωτεογλυκάνη, η αγγρεκάνη, έχει την τάση να συναπομονώνεται με το RNA καθώς πρόκειται για ένα μεγάλο σε μέγεθος και ισχυρά αρνητικά φορτισμένο μακρομόριο. Ωστόσο, η λύση της χρησιμοποίησης κυττάρων από καλλιέργειες για τις μελέτες μεταγραφικής έκφρασης δεν αποτελεί πανάκεια, καθώς είναι γνωστό ότι τα χονδροκύτταρα στις κυτταροκαλλιέργειες αλλοιώνουν τον φαινότυπό τους και επομένως και τα επίπεδα του mRNA που μετρώνται δεν αντικατοπτρίζουν απόλυτα την *in vivo* κατάσταση. Επιπροσθέτως, μετά την απομόνωσή τους από το φυσικό τους περιβάλλον – από την μεσοκυττάρια ουσία που τα περιβάλλει – εμφανίζουν μικρό πολλαπλασιασμό, που συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στο φαινότυπό τους: κλασικά τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα σταματούν να εκφράζουν κολλαγόνο τύπου II και αγγρεκάνη και παρουσιάζουν έκφραση κολλαγόνων I και III [256-261]. Με δεδομένο την ταχεία αποδιαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, σε συνδυασμό με τη δυσκολία στην ανεύρεση των δειγμάτων και με τη δυσκολία της απομόνωσης ικανού αριθμού κυττάρων από μία μόνο άρθρωση, για τη διενέργεια της μελέτης αυτής απαιτήθηκε η σταδιακή συλλογή των δειγμάτων, ώστε πάντοτε τα χονδροκύτταρα που χρησιμοποιούνταν να προέρχονταν από φρέσκο ιστό και από καλλιέργειες με 1-2 περάσματα.



Αναλυτικά: 2005-2006 συγκεντρώθηκαν 15 δείγματα οστεοαρθρικού χόνδρου και 5 δείγματα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου, 2007-2008 συγκεντρώθηκαν 30 δείγματα οστεοαρθρικού ιστού και 3 δείγματα φυσιολογικού και μέχρι το 2009 που τελείωσε η συλλογή των δειγμάτων ελήφθησαν άλλα 11 δείγματα οστεοαρθρικού ιστού και 5 φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου. Συνολικά: 56 ασθενείς (16 άνδρες / 40 γυναίκες) συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία, σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 13 άτομα (7 άνδρες / 6 γυναίκες), χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος.

Αναλυτικά κλινικά δεδομένα από κάθε ασθενή συμπληρώθηκαν σε ειδική φόρμα που περιελάμβαναν μεταξύ άλλων την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), τη βαθμολόγηση του άλγους με τη χρήση μιας οπτικοποιημένης αναλογικής κλίμακας 10cm (visual analog scale, VAS) όπου 10 μέγιστος πόνος και 0 ανύπαρκτος), της παρουσίας διόγκωσης και παραμόρφωσης της άρθρωσης. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρους και παχύσαρκους σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση που έχει προταθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) [262] και ισχύει τόσο για άνδρες όσο και για γυναίκες, και ορίζει παχύσαρκα τα άτομα με  $BMI \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$ , υπέρβαρα εκείνα με  $BMI$  μεταξύ  $25.0 - 29.9 \text{ kg/m}^2$  και φυσιολογικού βάρους άτομα με  $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$ . Για την ορθότερη στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων μας, καθώς η πλειοψηφία των ασθενών της μελέτης ήταν υπέρβαροι και παχύσαρκοι, οι ασθενείς χωρίστηκαν και σε τριτημόρια με βάση το BMI. Πριν οι ασθενείς υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική, έγινε ακτινολογικός έλεγχος και οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence [263]. (εικόνα 14)

**Kellgren and Lawrence Radiographic Criteria for Assessment of OA\***



Radlographic grade	0	I	II	III	IV
Classification	Normal	Doubtful	Mild	Moderate	Severe
Description	No features of OA	Minute osteophyte; doubtful significance	Definite osteophyte; normal joint space	Moderate joint-space reduction	Joint space greatly reduced; subchondral sclerosis

\*Radiography does not reliably correlate with symptoms.

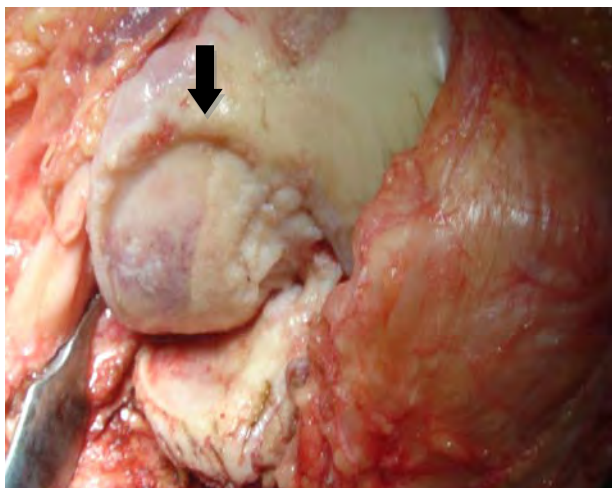
Cooper C et al. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, eds. Osteoarthritis. Oxford, NY: Oxford University Press; 1998:237-249.

Εικόνα 14.

Ακτινολογική ταξινόμηση της ΟΑ με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence, το οποίο χρησιμοποιεί μια κλίμακα 5 βαθμίδων (0-4) όπου: κατηγορία 0 φυσιολογική άρθρωση, I ελάχιστα οστεόφυτα, II σαφή οστεόφυτα, III οστεόφυτα και στένωση μεσαρθρίου διαστήματος, IV οστεόφυτα, στένωση μεσαρθρίου διαστήματος και σκλήρυνση υποχόνδριου οστού

### B.1.2 Μακροσκοπική και ιστολογική αξιολόγηση των δειγμάτων

Από κάθε ασθενή ελήφθησαν δύο δείγματα αρθρικού χόνδρου τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τη μορφολογία τους σε προχωρημένη ΟΑ (max OA) και σε ήπια ΟΑ (min OA). Το πρώτο δείγμα απομονώθηκε από την περιοχή της μέγιστης μηχανικής επιβάρυνσης, όπου υπήρχαν μακροσκοπικά εμφανείς αλλοιώσεις, ενώ το δεύτερο δείγμα απομονώθηκε από παρακείμενη μακροσκοπικά άθικτη περιοχή (εικόνα 15).



Εικόνα 15.

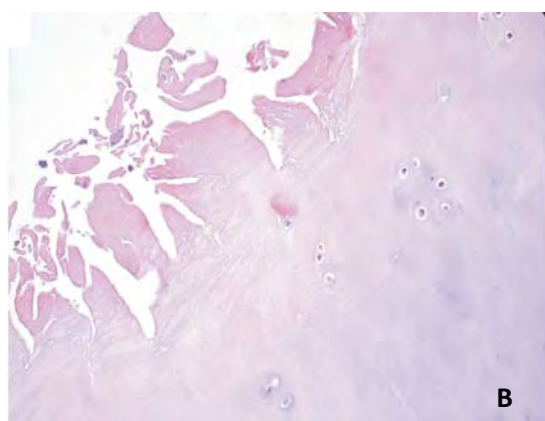
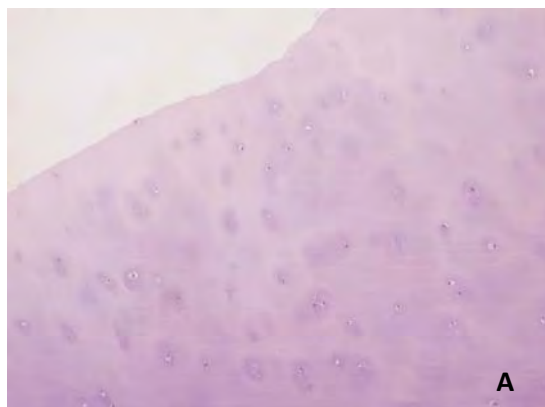
Οστεοαρθρικό γόνατο κατά τη διάρκεια επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής γόνατος. Φαίνεται η πλήρης διάβρωση – απουσία του χόνδρου του έσω μηριαίου κόνδylου (μαύρο βέλος), ενώ ο χόνδρος που καλύπτει τον έξω μηριαίο κόνδυλο μακροσκοπικά είναι ακέραιος.

Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν με ιστολογική μελέτη σε τομές πάχους 5μm και βαθμολογήθηκαν με βάση τη διαβάθμιση Mankin (Πίνακας 2) [264, 265].

Κατηγορία	Υποκατηγορία	Βαθμολόγηση
<b>Δομή</b>	Φυσιολογική	0
	Διαβρώσεις μεμβράνης	1
	Διαβρώσεις μεμβράνης και δημιουργία πάννου	2
	Ρωγμές στη μεταβατική ζώνη	3
	Ρωγμές στην ακτινωτή ζώνη	4
	Ρωγμές στη ζώνη οστέωσης	5
	Πλήρης αποδιοργάνωση	6
<b>Κύτταρα</b>	Φυσιολογικός αριθμός	0
	Διάχυτη κυτταροβρίθεια	1
	Ύπαρξη κλώνου	2
	Μείωση του αριθμού των κυττάρων	3
<b>Χρώση Safranin O</b>	Φυσιολογική	0
	Ήπια μείωση	1
	Μέτρια μείωση	2
	Σοβαρή μείωση	3
	Καθόλου χρώση	4
<b>Ακεραιότητα tidemark</b>	Άθικτη	0
	Διαπερνάται από αγγεία	1
<b>Σύνολο</b>		0-14

Πίνακας 2. Η ιστολογική – ιστοχημική βαθμολόγηση των δειγμάτων αρθρικού χόνδρου μετά από χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης και safranin O, που αναλύει διαταραχές στη δομή, τον κυτταρικό πληθυσμό, την κατανομή της χρώσης safranin O και την ακεραιότητα της στιβάδας που διαχωρίζει τον ασβεστοποιημένο από τον μη ασβεστοποιημένο χόνδρο (tidemark).

Τα δείγματα με πρώιμη ΟΑ παρουσίαζαν 1-4 βαθμό Mankin, ενώ τα δείγματα με προχωρημένη ΟΑ είχαν βαθμό Mankin 10-14. Τα δείγματα των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου είχαν όλα μηδενικό βαθμό Mankin. (Εικόνα 16)



Εικόνα 16

Ήπια ΟΑ (min OA): παρατηρούνται μόνο ελάχιστες διαβρώσεις της επιφανειακής στιβάδας του χόνδρου. Κατανομή των χονδροκυττάρων σε όλο το μήκος και πλάτος του ιστού (χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης) (A)

Προχωρημένη ΟΑ (max OA): ο αρθρικός χόνδρος παρουσιάζει κάθετες ρωγμές ως αποτέλεσμα της διάσπασης των ινών κολλαγόνου στην επιφάνεια του χόνδρου (χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης) (B)

### B.1.3 Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων

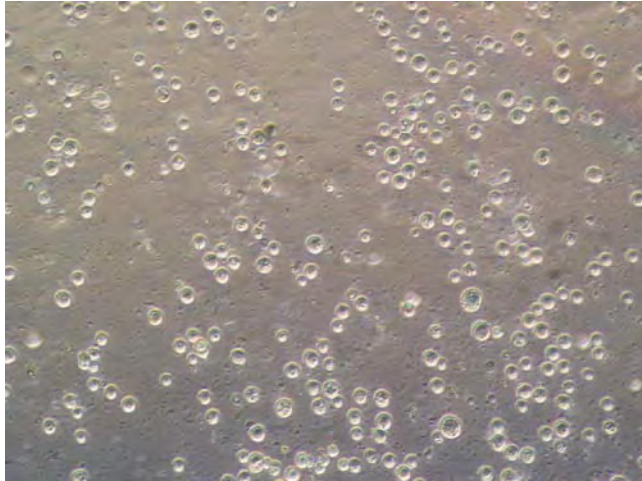
Η απομόνωση και καλλιέργεια των χονδροκυττάρων έγινε από τμήμα αρθρικού χόνδρου που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Μετά την παραλαβή του δείγματος από το χειρουργείο έγινε έκπλυση του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα Hanks' Balanced Salt Solution χωρίς  $\text{CaCl}_2$  και  $\text{MgCl}_2$  (HBSS w/o, GIBCO BRL, UK), ώστε να απαλλαγεί από υπολείμματα του χειρουργείου και παράλληλα να παραμείνει σταθερό το pH του.

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

Αναλυτικότερα:

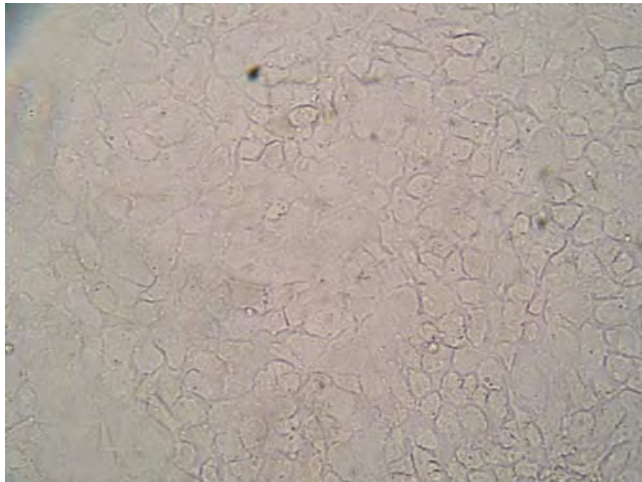
- Τεμαχισμός του ιστού με αποστειρωμένο νυστέρι
- Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche) 5mg/ml και 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur
- Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche) 5mg/ml και 2ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 90 λεπτά
- Με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μηχανική υποβοήθηση στην απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από το δίκτυο των κολλαγόνων ινών
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon), φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 7min σε θερμοκρασία δωματίου, απόρριψη του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των  $25\text{cm}^3$  μαζί με 5 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά 48ώρες προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και αποκτούν πεπλατυσμένο, πολυγωνικό σχήμα. Στην εικόνα 17 φαίνονται χονδροκύτταρα σε καλλιέργειες 48 ωρών και 7 ημερών.



Εικόνα 17

A. Φυσιολογικά  
χονδροκύτταρα σε  
καλλιέργεια 48 ωρών  
(μεγέθυνση 20x)



B. Φυσιολογικά  
χονδροκύτταρα σε  
καλλιέργεια 7 ημερών  
(μεγέθυνση 20x)

Για την καλλιέργεια των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 5% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει αναγκαίους αναπτυξιακούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 0.5% του όγκου του θρεπτικού υλικού.

Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraeus Instruments), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Η ανακαλλιέργεια των χονδροκυττάρων πραγματοποιούνταν κάθε 7 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν, όταν τα χονδροκύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και

είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 1 έως 2 ανακαλλιέργειες γινόταν και κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεντο άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε δεκαπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολούθως γινόταν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις προς απομόνωση των κυττάρων. Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με πλάκα Newbauer: 20μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20μl Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^6$  κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

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

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

## **B.1.4 Απομόνωση RNA από φρέσκο αρθρικό χόνδρο και από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα**

Οι χόνδρινοι ιστοί οι οποίοι ελήφθησαν υπό άσηπτες συνθήκες κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, τεμαχίστηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι no11 και ένα τμήμα του κομμένου ιστού χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση RNA, ενώ το δεύτερο για την απομόνωση χονδροκυττάρων.

### α. Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση έγινε με προσθήκη 2000μl Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) και 200 μl χλωροφόρμιο (Scharlau) στα ιστοτεμάχια και διαδοχικές αναρροφήσεις με αποστειρωμένη πιπέτα και με χρήση ομογενοποιητή (IKA-WERKE) με στόχο τη λύση των κυττάρων.

### β. Διαχωρισμός φάσεων

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

### γ. Κατακρήμνιση

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

### δ. Έκπλυση

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

### ε. Επαναδιάλυση

Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά (το σωληνάριο βρίσκεται σε πάγο με ανοιχτό καπάκι και προστατευμένο με τρυπημένη μεμβράνη) διαλυτοποιείται. Η διάλυση γίνεται με προσθήκη 80-100μl ddH<sub>2</sub>O.

### στ. Καθαρισμός του RNA

Ο καθαρισμός του διαλύματος γίνεται με ειδικό kit (RNeasy Protect Mini Kit, Qiagen). Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτική σιλικόνης η



οποία δεσμεύει επιλεκτικά το RNA ενώ είναι διαπερατή από τα λοιπά μόρια που μπορεί να επιμολύνουν το RNA.

#### ζ. Φωτομέτρηση – Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρώνται στα 260 και 280nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA με βάση τον τύπο: συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 40 (mg/ml).

#### η. Ηλεκτροφόρηση – Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

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

### **B.1.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

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

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

Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA. Στη συνέχεια έγινε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA και μετά την

προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):

- 37°C, 60 λεπτά
- 65°C, 10 λεπτά
- τελική θερμοκρασία 4°C

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

Forward: 5'-GGT GCC TCC CTA CGC CTT CT-3'

Reverse: 5'-GGC GCT GAC CCC ATA GTG GT-3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου RAR $\alpha$  περιέχει:

➤ cDNA	3μl
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5μl
➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3μl
➤ Forward primer (50p/mol)	1.5μl
➤ Reverse primer (50p/mol)	1.5μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	0.5μl
➤ DNA πολυμεράση	0.4μl
➤ δισ απεσταγμένο νερό	35.1μl

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

## **B.1.6 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων της λεπτίνης, Ob-Rb, Ob-Ra, LOX1, ApoA1, ABCA1, LXRα και LXRβ με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)**

### I. Γενικές αρχές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) στηρίζεται στην ενζυμική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA in vitro, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Έτσι, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει: τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα MgCl<sub>2</sub> που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 72°C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs ξεκινώντας από τους εκκινητές

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

### II. Ειδικές συνθήκες PCR για την ανίχνευση του mRNA των υπό μελέτη γονιδίων

Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της **λεπτίνης** και των υποδοχέων της **Ob-Rb** και **Ob-Ra**, του υποδοχέα **LOX-1** της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, της απολιποπρωτεΐνης A1 (**ApoA1**), της **ABCA1** και των **LXRα** και **LXRβ** πραγματοποιήθηκε στις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA (cDNA). Η κατάλληλη

επιλογή των εκκινητών έγινε με βάση το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη περιοχή που υβριδίζονται οι εκκινητές δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη ποικίλων μεταγράφων. Αναλυτικά οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Για την ανίχνευση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας συμπληρωματικό DNA από λιπώδη ιστό ανθρώπου (human adipose tissue cDNA). Για την ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 καθώς και των γονιδίων ApoA1, ABCA1, LXRA, LXRβ χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας συμπληρωματικό DNA από ανθρώπινα ηπατοκύτταρα.

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

### **B.1.7 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων**

#### I. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR).

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος της PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος της PCR και ένα μηχανήμα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Για την παρούσα μελέτη έγινε χρήση δύο συστημάτων καταγραφής, του συστήματος LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) και του συστήματος MJ Mini Opticon Thermal Cycler (BioRad, CA, USA). Πρόκειται για συστήματα ταχείας εκτέλεσης PCR με δυνατότητα καταγραφής και ταυτόχρονης παρακολούθησης της κινητικής της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο, τα οποία

βασίζονται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών και στην ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος από ενσωματωμένο φθορισμόμετρο. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη χρήση τεχνολογίας θερμαινόμενου αέρα, ως μέσον μεταφοράς θερμότητας, για τη διεξαγωγή της PCR. Η διεξαγωγή της PCR και η ανίχνευση του παραγόμενου PCR προϊόντος από το φθορισμόμετρο πραγματοποιείται σε ειδικούς τριχοειδικούς υποδοχείς δειγμάτων. Η ανίχνευση από τη μονάδα του φθορισμόμετρου πραγματοποιείται από οπτικό σύστημα με διαφορετικά φίλτρα που επιτρέπει την ανίχνευση του σήματος, σε διαφορετικά μήκη κύματος ανάλογα με τη φθορίζουσα χρωστική που θα επιλεγεί και την ανίχνευση περισσότερων του ενός σήματος από το ίδιο δείγμα. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης.

## II. Πρωτόκολλα PCR πραγματικού χρόνου

Η ποσοτικοποίηση των mRNA με το σύστημα του Light Cycler εφαρμόζει την ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού. Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο ένας ανιχνευτής (δέκτης) είναι σημασμένος στο 5' άκρο με φθορίζουσα LC Red 640. Ο άλλος ανιχνευτής (δότης) είναι σημασμένος στο 3' άκρο με φθορίζουσα φλουορεσκίνη. Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA, οπότε τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά την διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από το δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα του δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Εκτός από την προαναφερθείσα μέθοδο έγινε κατά περίπτωση χρήση και των SYBR®Green ανιχνευτών (probes). Πρόκειται για την παλαιότερη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου, όπου ο μη ειδικός ανιχνευτής συνδέεται στη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπει φθορισμό όταν διεγείρεται. Οι προαναφερθείσες διαδικασίες οδηγούν σε εκπομπή φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται από την συσκευή κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της PCR. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης υπάρχει η ένταση φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background) και ο ειδικός φθορισμός. Το όριο στο οποίο ο ειδικός φθορισμός υπερβαίνει το background αποτελεί το διαχωριστικό σημείο (cut-off level). Ο κύκλος της PCR στον οποίο για πρώτη φορά ο φθορισμός υπερβαίνει το cut-off level ονομάζεται κύκλος μετάπτωσης, ενώ η τιμή των προϊόντων στον κύκλο αυτό

είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα.

### III. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης της **λεπτίνης** και του **Ob-Rb** εφαρμόστηκε η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού, με τη συσκευή και το λογισμικό του Light Cycler (version 3.5; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) με βάση τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR). Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση για κάθε δείγμα ανάμεσα στο γονίδιο ενδιαφέροντος και σε εκείνο που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγραφών του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγραφών του προς μελέτη γονιδίου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης επαναλήφθηκε δύο φορές για το ίδιο δείγμα και χρησιμοποιήθηκε το συμπληρωματικό DNA (cDNA) του κάθε δείγματος. Από το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1μg cDNA.

Αναλυτικότερα:

- Το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύθηκε μέσω φθορισμού, με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ανιχνευτών, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Οι ανιχνευτές, που αποτελούνται από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια, προσδένονται λόγω συμπληρωματικότητας σε μια εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος κατά την διάρκεια της φάσης της υβριδοποίησης του εκκινητή. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές για τη λεπτίνη, τον Ob-Rb και τον Ob-Ra σχεδιάστηκαν από την εταιρία TIB MOLBIOL (Βερολίνο, Γερμανία), ενώ η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche) που περιέχει το διάλυμα αντίδρασης (Master Mix). Για την ποσοτικοποίηση των mRNA των γονιδίων Ob-Ra, κολλαγόνο II (COL2A1), AGC και MMP-13, LOX1, ApoA1, ABCA1, LXRα και LXRβ χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής SYBR®Green.
- Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το porphobilinogen deaminase (PBGD), το οποίο εδράζει στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11q24.1-q24.2). Το PBGD κωδικοποιεί τη σύνθεση δύο ειδών mRNA, τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς από το ίδιο γονίδιο. Ένα μετάγραφο mRNA εκφράζεται μόνο στα ερυθροποιητικά κύτταρα και κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός ενζύμου που

συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της αίμης. Το μετάγραφο του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στην δική μας μελέτη εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Το προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς χρησιμεύει για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.

Το cDNA κάθε δείγματος ελέγχεται για έκφραση τόσο για τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν όσο και για το PBGD.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στο Light Cycler ήταν:

**Ανιχνευτής λεπτίνης FL:** 5'-GATGAGGGTTTTGGTGTTCARTCTTGGACT-FL

**Ανιχνευτής λεπτίνης LC:** 5'-LC-TTGGATGGGCACAGCTTGGACATAGA-PH

**Εκκινητής λεπτίνης Forward:** 5'-GCTATTTTGGGAAGATGT-3'

**Εκκινητής λεπτίνης Reverse:** 5'-TGCCTGGGCCTCTATCTC-3'

**Ανιχνευτής Ob-Rb FL:** 5'-GGTACTGAGGTAACCTATGAGGCCGAA-FL

**Ανιχνευτής Ob-Rb LC:** 5'-GCCAGAGACAACCCTTTGTAAATACGC-PH

**Εκκινητής Ob-Rb Forward:** 5'-TTCTTGTGGCTTTGGCCCTA-3'

**Εκκινητής Ob-Rb Reverse:** 5'-GAGACTGACTGCGTGTGTGTGAA-3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης της **λεπτίνης** και του **Ob-Rb** περιέχει:

➤ δισ απεσταγμένο νερό	6,4	μl
➤ γλυκοζυλάση (UNG)	1	μl
➤ Διάλυμα ανίχνευσης (Master Mix)	2	μl
➤ MgCl <sub>2</sub>	1.6	μl
➤ Εκκινητής S	1	μl
➤ Εκκινητής A	1	μl
➤ Ανιχνευτής KL-LC	1	μl
➤ Ανιχνευτής KL-FL	1	μl
➤ cDNA	1	μg

▪ Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την **λεπτίνη** ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη 95°C για 10 λεπτά
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα

- υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 55°C για 10 δευτερόλεπτα
- επιμήκυνση στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα.

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για τον **Ob-Rb** ήταν οι εξής:
  - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 10 λεπτά
  - 47 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 58°C για 10 δευτερόλεπτα
    - επιμήκυνση στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα.

Πριν την αντίδραση στο cDNA κάθε δείγματος έγινε αραιώση 1:10. Από το αραιωμένο cDNA χρησιμοποιήθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 1μg cDNA. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε cDNA από λιπώδη ιστό ανθρώπου, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χωρίς cDNA.

Για την ποσοτικοποίηση των Ob-Ra, LOX1, ApoA1, ABCA1, LXRα και LXRβ χρησιμοποιήθηκε η τεχνική με SYBR®Green ανιχνευτές, ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές καθώς και οι εκάστοτε συνθήκες αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Για την πραγματοποίηση της ποσοτικοποίησης κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με βάση δείγματα που περιείχαν  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  και  $10^1$  αντίγραφα του cDNA του PBGD (LightCycler PBGD selection kit, Roche). Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται προσδιορισμός του προϊόντος τη στιγμή της σύνθεσής του και όχι αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της PCR. Τελικά η τιμή που προκύπτει από το λόγο των αντιγράφων του cDNA του γονιδίου ενδιαφέροντος προς τα αντίγραφα του γονιδίου PBGD, αποτελεί την τιμή των υπό μελέτη γονιδίων και είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου ενδιαφέροντος ως προς την έκφραση του PBGD.

### **B.1.8 Απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα**

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



- Tris – HCl (30mM, pH=7.5)
- NaCl 150mM
- Γλυκερόλη 10%
- Igepal CA-630 100%
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)

Στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται και αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitor cocktail tablets EDTA-free της Roche). Οι πρωτεάσες σερίνη και κυστεΐνη είναι ένζυμα που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Η προσθήκη των αναστολέων πρωτεασών έχει ως σκοπό την αναστολή της δράσης τους και την προστασία των πρωτεϊνών που απομονώνονται από τα κύτταρα. Η χρήση ελεύθερων από EDTA ταμπλετών εξασφαλίζει ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δεν καταστρέφονται και παραμένουν ενεργείς.

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη μέθοδο Bradford κατά την οποία μια χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-25, Bio-Rad Protein Assay) όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Καταρχήν, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin-BSA, Bio-Rad Protein Assay) διαλύθηκαν σε 800μl ddH<sub>2</sub>O. Κατόπιν, προστέθηκαν 200μl χρωστικής, το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ακολούθησε ήπια ανάδευση του αρκετές φορές, μεταφορά σε κυβέττα και φωτομέτρηση στα 595nm (BECKMAN DU520). Από τις τιμές των απορροφήσεων των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες άγνωστης συγκέντρωσης, ποσότητα 10μl από το διάλυμα προστέθηκε σε 990μl διαλύματος Bradford και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα απομονωθέντα δείγματα.

## B.1.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS

### I. Αρχή της μεθόδου

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

$$u = Ez/f$$

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

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

## II. Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου - SDS

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (NuPAGE Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen). Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Xcell Surelock (Invitrogen).

- 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 10μg πρωτεΐνης. Το διάλυμα της χρωστικής βοηθάει στην ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους στο πήκτωμα. Το διάλυμα αυτό είναι αδρανές και δεν επηρεάζει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Καθώς το δείγμα φθάνει στο τέλος του πηκτώματος, το μπλε χρώμα της χρωστικής γίνεται κίτρινο. Το αναγωγικό διάλυμα έχει την ιδιότητα να ανάγει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (μετατρέπει τους δισουλφιδικούς δεσμούς σε ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες). Συνεπώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάση του μοριακού τους βάρους. Το SDS που υπάρχει στην πηκτή μεταδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό θετικό φορτίο και έτσι κατευθύνονται από το πάνω μέρος της συσκευής προς τον αρνητικά φορτισμένο κάτω πόλο. Αφού προστεθούν τα δύο αυτά διαλύματα, προστίθεται δις απεσταγμένο νερό μέχρι να φθάσει ο τελικός όγκος τα 20μl.
- Ακολουθεί θέρμανση των πρωτεϊνών για 5 λεπτά στους 75°C.
- Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στην αριστερή άκρη της πηκτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (Precision plus Protein Standards, Bio-Rad).
- Παράλληλα με τη θέρμανση των δειγμάτων προετοιμάζουμε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) που θα τοποθετηθεί στη συσκευή. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 950ml δις απεσταγμένο νερό και 50ml Running buffer (Nu Page Mes Running Buffer, Invitrogen). 600ml του διαλύματος τοποθετούνται στο μπροστινό μέρος της συσκευής και άλλα 200ml τοποθετούνται στο μεσαίο τμήμα της συσκευής, στο οποίο προστίθενται και 200μl αντιοξειδωτικού (Nu Page antioxidant, Invitrogen). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης δημιουργεί ένα πρότυπο μετακίνησης των πρωτεϊνών, ενώ το αντιοξειδωτικό εμποδίζει τις πρωτεΐνες να οξειδωθούν.
- Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση στα 120V για 40 λεπτά.
- Στη διάρκεια αυτή προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot).

### **B.1.10 Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών λεπτίνη, Ob-Rb, ApoA1, ABCA1, MMP9 και MMP13 – μέθοδος Western Blot**

#### I. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθάει τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται αναγνωρίζει την πρωτεΐνη ως αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο (π.χ. αντίσωμα αίγας που αναγνωρίζει αντίσωμα ποντικού). Μία ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μία σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιόγραμμα).

Στην παρούσα μελέτη το δεύτερο αντίσωμα έχει σημαθεί με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) και η ανίχνευση γίνεται χρωματομετρικά με χρήση ειδικού kit (opti-4CN Goat-anti-Rabbit, BioRad). Η χρωματομετρική μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται στην αντίδραση μίας διαλυτής χρωστικής με το ένζυμο HRP. Η αντίδραση αυτή σταθεροποιεί τη χρωστική και αλλάζει το χρώμα της. Το ίζημα της χρωστικής δημιουργείται στο σημείο που βρίσκεται το σύμπλοκο πρωτεΐνη – 1<sup>ο</sup> αντίσωμα – 2<sup>ο</sup> αντίσωμα + HRP και ενσωματώνεται στη μεμβράνη. Η αντίδραση αυτή σταματάει με την απομάκρυνση της εναπομείνουσας διαλυτής χρωστικής.

#### II. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

- Για τη **λεπτίνη**: Αντι-λεπτίνη πρωταρχικό αντίσωμα με αραιώση 1:2000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)
- Για τον υποδοχέα **Ob-Rb**: Αντι-Ob-Rb πρωταρχικό αντίσωμα με αραιώση 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)
- Για την **ApoA1** και **ABCA1**: Αντι-ApoA1 πρωταρχικό αντίσωμα με αραιώση 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), Αντι-ABCA1 πρωταρχικό αντίσωμα με αραιώση 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)
- Για τις μεταλλοπρωτεϊνάσες **MMP9** και **MMP13**: Αντι-MMP9 και αντι-MMP13 πρωταρχικά αντισώματα με αραιώση 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)

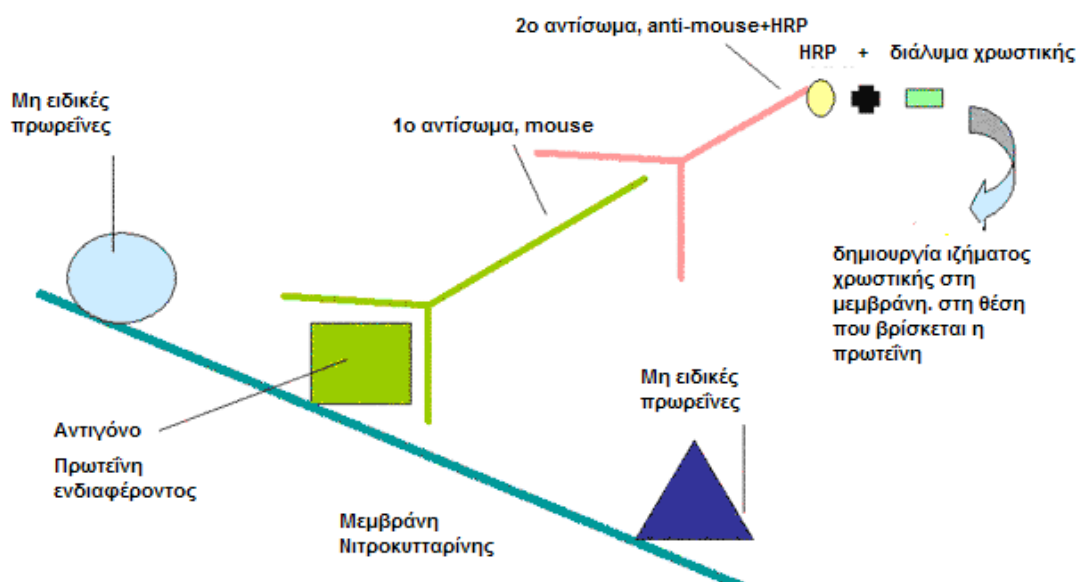
Δεύτερο αντίσωμα: Αίγα-αντι-λαγού με ενσωματωμένο το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας με αραιώση 1:2000 (goat-anti-rabbit HRP, opti-4CN Goat-anti-Rabbit, BioRad)

### III. Αναλυτικό πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης

- Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απομακρύνεται η πηκτή από τη θήκη της προσεκτικά και προετοιμάζονται:
  - Διάλυμα μεταφοράς: 50ml Transfer (Nu Page Transfer Buffer, Invitrogen) + 850ml ddH<sub>2</sub>O + 100ml μεθανόλη (Methanol 100%, Biorline) + 1ml αντιοξειδωτικό
  - Φύλλο μεμβράνης σε διαστάσεις 4.5cm x 7.5cm (BioRad) το οποίο επωάζεται σε μεθανόλη για 30sec και μετά σε διάλυμα μεταφοράς
  - Ειδικά σφουγγαράκια (Invitrogen) που επωάζονται σε διάλυμα μεταφοράς
  - Ειδικό χαρτί Whitman (Biorline) σε διαστάσεις 4.5cm x 7.5cm σε διάλυμα μεταφοράς
- Κατασκευάζονται στιβάδες: 3 σφουγγαράκια → χαρτί Whitman → πηκτή → μεμβράνη → χαρτί Whitman → 3 σφουγγαράκια που τοποθετούνται στο κουτί Xcell Blot Module (Invitrogen) και εν συνεχεία στη συσκευή Xcell Surelock με διάλυμα μεταφοράς στον ενδιάμεσο χώρο και δισ απεσταγμένο νερό στον περιβάλλοντα χώρο
- Επιλέγεται το πρόγραμμα blotting και ακολουθεί μεταφορά για 1h και 30min στα 30Volt και 210mA
- Αφού τελειώσει η μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, βγαίνει το κουτί και αφαιρείται προσεκτικά η μεμβράνη
- Η μεμβράνη βάφεται με ειδική χρωστική Ponceau (Sigma) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη πρωτεϊνικών ζωνών
- Η μεμβράνη εκπλύεται σε διάλυμα πλύσης TPBS που περιέχει PBS και 10% Tween-20 (BioRad) δύο φορές για 5min
- Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δεσμευτικό διάλυμα 5% (Blotting Grade Blocker, BioRad) για 1,5-2h προκειμένου να δεσμευθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης της μεμβράνης και κατόπιν εκπλύεται σε διάλυμα πλύσης TPBS δύο φορές για 5min
- Αμέσως μετά η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C στο κατάλληλο αντίσωμα. Η αραίωση του αντισώματος γίνεται με διάλυση κατάλληλης ποσότητας του αντισώματος σε ορό αλβουμίνης βόου 1% (Bovine Serum Albumin, BSA)
- Το πρώτο αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλύεται με TPBS δύο φορές για 3-5min έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος
- Επωάζεται με κατάλληλη αραίωση (1:3000-1:10000) με το δεύτερο αντίσωμα του GAR-HRP (goat-anti-rabbit horseradish peroxidase, opti-4CN Goat-anti-Rabbit

BioRad) για 1h στους 4°C. Η αραίωση γίνεται με διάλυση κατάλληλης ποσότητας του αντισώματος σε ορό αλβουμίνης βόως 1% (Bovine Serum Albumin, BSA)

- Το δεύτερο αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλύεται με TPBS δύο φορές για 3-5min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια και του δευτέρου αντισώματος
- Η ανίχνευση γίνεται με χρωματομετρική μέθοδο με το kit opti-4CN Goat-anti-Rabbit (BioRad), το οποίο περιέχει Opti-4CN υπόστρωμα (substrate) και Opti-4CN διαλυμένο συμπύκνωμα (diluent concentrate). Σε κάθε μεμβράνη προστίθεται 1ml opti-4CN διαλυμένο με 9ml ddH<sub>2</sub>O και 0.2ml opti-4CN υπόστρωμα και η μεμβράνη επωάζεται με ήπια ανάδευση για 30min. Εκπλύεται στη συνέχεια με ddH<sub>2</sub>O και αποκαλύπτονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Image Quant 6. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μία διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία γίνεται σύγκριση της σχετικής σκοτεινότητας διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα ενός πηκτώματος ή μιας μεμβράνης. Οι μεμβράνες σαρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ένταση των ζωνών πάνω στην εικόνα για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες



Εικόνα 18. Αρχή της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης με τη χρωματομετρική μέθοδο.

### **B.1.11 Ανίχνευση του πρωτεϊνικού υποδοχέα LOX-1 με ανοσοφθορισμό**

Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα LOX-1 στα ανθρώπινα χονδροκύτταρα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Στον ανοσοφθορισμό γίνεται χρήση σημασμένων ειδικών αντισωμάτων έναντι του υπό εξέταση μορίου (πρωτογενές αντίσωμα – primary antibody) καθώς και ενός δευτέρου αντισώματος (secondary antibody) το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσες χρωστικές, σχεδιασμένο ώστε να ανιχνεύει και να ενώνεται με το πρωτογενές αντίσωμα.

Στη μελέτη μας έγινε χρήση ενός ειδικού πρωταρχικού αντισώματος έναντι των αμινοξέων 1-140 που εδράζονται κοντά στο N-άκρο του υποδοχέα LOX-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Σαν δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα όνου αντι-λαγού IgG συνδεδεμένο με FITC καθώς και το σταθεροποιητικό Mounting Medium (UltraCruz™ Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Επίσης παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

- PB 0.2M και 0.1M pH:7.4
- 2% PFA pH:7.4
- 0.1 M TBS pH:7.4

Τα φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών αναπτύχθηκαν επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες είχαν προσαρμοστεί σε ειδικά τρυβλία διαμέτρου 10cm<sup>2</sup>. Έγινε έκπλυση των πλακών δύο φορές για 2 λεπτά η κάθε μία, αρχικά με 0.1M TBS και κατόπιν με 0.1M PB. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 2% PFA σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με διάλυμα 0.1M TBS (2 φορές x 2 λεπτά). Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν σε 3.3% NGS σε 0.1M TBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθως έγινε έκπλυση με 0.1M TBS (3 φορές x 3 λεπτά) και στη συνέχεια ολονύκτια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα Ab-1 (0.5% v/v NGS, 0.3% v/v Triton X-100 σε 0.1M TBS), αραιώση 1:100, σε ειδική δεξαμενή για τη διατήρηση υγρασίας. Την επόμενη ημέρα, αφού πρώτα έγινε έκπλυση με 0.1M TBS (3 φορές x 3 λεπτά), έγινε η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (αραιώση 1:150) για 90 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση με 0.1M TBS (2 φορές x 2 λεπτά) και σταθεροποίηση με 40μl Mounting Medium. Η παρατήρηση έγινε σε ειδικό μικροσκόπιο (Zeiss axoplan fluorescence microscope) σε σκοτεινό θάλαμο και οι εικόνες φωτογραφήθηκαν με ειδική ψηφιακή κάμερα.

## **B.1.12 Επίδρασεις με λεπτίνη, οξειδωμένη LDL, ασκορβικό οξύ και συνθετικό LXR αγωνιστή σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων**

### I. Επίδραση με λεπτίνη σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων

Η επίδραση με λεπτίνη στις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων έγινε με στόχο να διερευνηθεί ο ρόλος της στην έκφραση των υποδοχέων της, καθώς και στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα χονδροκύτταρα. Επίσης, διερευνήθηκε η επίδρασή της στη βιωσιμότητα των κυττάρων και στην παραγωγή καταβολικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-9 και MMP-13.

Τα χονδροκύτταρα, φυσιολογικά και οστεοαρθρικά, καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο που ήδη περιγράφηκε, όμως για το σκοπό των πειραματικών επιδράσεων τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 6 πηγαδάκια (six-well plates). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 100% του χώρου (confluent plate), το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από θρεπτικό υλικό DMEM/HAM-F:12 χωρίς FBS και εκεί έγινε η επίδραση λεπτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml) λεπτίνης που προέκυψαν από σειριακή αραίωση του αρχικού (R&D Systems, Inc, Minneapolis USA) και η επώαση διήρκεσε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (24h, 48h, 72h και 7 ημέρες). Το πείραμα επανελήφθη τρεις φορές.

### II. Επίδρασεις με οξειδωμένη LDL και ασκορβικό οξύ σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων

Τα χονδροκύτταρα, φυσιολογικά και οστεοαρθρικά, που απομονώθηκαν από τα δείγματα αρθρικού χόνδρου τοποθετήθηκαν σε πλάκες με 96 πηγαδάκια καθώς και σε πλάκες με 6 πηγαδάκια και επώαστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων οξειδωμένης LDL (10-40μg/ml) (Intracel, USA) για 24, 48 και 72 ώρες. Επίσης το πείραμα επαναλήφθηκε με την προσθήκη ασκορβικού οξέος (0-100μM) (Sigma, St. Louis, USA) σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων και η επώαση διήρκεσε μέχρι 7 ημέρες. Οι πλάκες με τα 96 πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο του MTT, ενώ από τις υπόλοιπες έγινε εξαγωγή mRNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης του υποδοχέα LOX1.



### III. Επιδράσεις με συνθετικό LXR αγωνιστή TO901317 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων

Φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα επωάστηκαν σε πλάκες με 6 πηγαδάκια σε συγκέντρωση  $1.0 \times 10^5$  κύτταρα/πηγαδάκι με πλήρες θρεπτικό υλικό και όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 100% του χώρου οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς την προσθήκη ορού βοός παρουσία του συνθετικού μη-στεροειδούς LXR αγωνιστή TO-901317 (1 $\mu$ m, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) για 48 ώρες. Πλάκες χωρίς την προσθήκη του TO-901317 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Κάθε δείγμα επωάστηκε σε τρία διαφορετικά πηγαδάκια. Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή RNA και ποσοτικός προσδιορισμός των γονιδίων ApoA1 και ABCA1 με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου, ενώ έγινε και εξαγωγή πρωτεϊνών και ανάλυση της ApoA1 και ABCA1 με ανάλυση Western blot όπως έχει ήδη περιγραφεί. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του αγωνιστή στην έκφραση RNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης 13 (MMP-13) καθώς και στην έκφραση αναβολικών γονιδίων όπως η αγγρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η επίδρασή του στην απόπτωση των χονδροκυττάρων, στην έξοδο ραδιοσημασμένης χοληστερόλης από τα χονδροκύτταρα καθώς επίσης και στη συσσώρευση λιπιδίων σε αυτά με μεθόδους που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

### **B.1.13 Ποσοτικός προσδιορισμός λεπτίνης, οξειδωμένης LDL, IL-1 $\beta$ και NO στο κυτταρικό εκχύλισμα καλλιέργειας χονδροκυττάρων, τον ορό αίματος και το αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ με τη μέθοδο της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής μέτρησης – ELISA.**

#### I. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία ανοσομέτρηση στερεάς φάσης για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων διαφόρων πρωτεϊνών στον ορό και άλλα βιολογικά υλικά καθώς και σε κυτταρικά εκχυλίσματα, με χρήση ειδικών για την πρωτεΐνη αντισωμάτων. Αναλυτικά, το αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει σταθεροποιείται σε ένα πολυμερές υπόστρωμα, όπως μία επιφάνεια πολυβινυλοχλωριδίου. Μία σταγόνα κυτταρικού εκχυλίσματος ή δείγματος ορού τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια και δημιουργείται ένα σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου. Μετά προστίθεται αντίσωμα ειδικό για μία άλλη θέση του αντιγόνου. Το δεύτερο αντίσωμα παρουσιάζει φθορίζουσα ή ραδιενεργό σήμανση έτσι ώστε να ανιχνεύεται με υψηλή ευαισθησία. Το ποσό του δεύτερου αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια είναι ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου στο

δείγμα. Η ευαισθησία της μέτρησης μπορεί να αυξηθεί ακόμα περισσότερο αν το δεύτερο αντίσωμα είναι δεσμευμένο με ένα ένζυμο. Αυτό το ένζυμο μπορεί γρήγορα να μετατρέψει ένα άχρωμο υπόστρωμα που προστίθεται σε ένα νέο προϊόν με έντονο φθορισμό (εικόνα 19). Μια τέτοια μέτρηση, που ονομάζεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική, είναι γρήγορη και εύκολη και με σημαντική ευαισθησία αφού μπορεί να μετρηθεί άμεσα ακόμα και λιγότερο από 1ng μίας πρωτεΐνης.



Εικόνα 19. Αρχή της μεθόδου της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής μέτρησης – ELISA

## II. Ποσοτικοποίηση λεπτίνης, οξειδωμένης LDL, IL-1β, NO

Η συγκέντρωση της **λεπτίνης** στον ορό και στο αρθρικό υγρό, προσδιορίστηκε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit (R&D Systems, Minneapolis, USA), το οποίο χρησιμοποιεί τη μέθοδο της ELISA. Για τη μέτρηση της λεπτίνης στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ έγινε επικοινωνία με την κατασκευάστρια εταιρεία και ακολούθως διενεργήθηκε σειρά πειραμάτων με διαφορετικές αραιώσεις των δειγμάτων. Ο ενδο- και δια-πειραματικός συντελεστής διακύμανσης (intra- and inter-assay coefficients of variation) ήταν 3.16% και 4.36% αντίστοιχα ενώ το κατώτερο όριο ανίχνευσης (detection limit) ήταν 7.8pg/mL.

Η μέτρηση της **οξειδωμένης LDL** στον ορό και στο αρθρικό υγρό έγινε επίσης με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit (Merckodia, Uppsala, Sweden). Σύμφωνα με τους κατασκευαστές το όριο ανίχνευσης για την οξειδωμένη LDL ήταν 0.3 U/l, ενώ ο ενδο- και δια-πειραματικός συντελεστής διακύμανσης (intra- and inter-assay coefficients of variation) ήταν 5.87% και 6.13% αντίστοιχα.

Η **IL-1β και το NO** μετρήθηκαν στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιεργειών με ειδικά, διαθέσιμα στο εμπόριο, kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). Για την IL-1β ο ενδο- και δια-πειραματικός συντελεστής διακύμανσης (intra- and inter-assay

coefficients of variation) ήταν 2.85% και 4.86% αντίστοιχα ενώ το κατώτερο όριο ανίχνευσης (detection limit) ήταν 1pg/mL. Η μέτρηση του NO βασίστηκε στην ενζυμική αναγωγή του νιτρικού σε νιτρώδες και στην χρωματομετρική ανίχνευση του νιτρώδους ως έγχρωμο αζωτούχο προϊόν της αντίδρασης Griess, ενώ ο ενδο- και δια-πειραματικός συντελεστής διακύμανσης ήταν 1.83% και 3.86% αντίστοιχα, ενώ η μέση κατώτατη ανιχνεύσιμη ποσότητα ήταν 0.25μmol/L. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν μετά από αραίωση 10-φορές με ειδικό διάλυμα που παρέχονταν από τον κατασκευαστή.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν για το κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο τιμών.

#### **B.1.14 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας των χονδροκυττάρων με τη μέθοδο του MTT**

Ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων έγινε με τη χρήση του MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (R&D Systems, Minneapolis USA) που επιτρέπει τον εντοπισμό των ζωντανών κυττάρων. Πρόκειται για μία ευαίσθητη, ασφαλή in vitro μέθοδο που έχει πλέον υποκαταστήσει την μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενη μέθοδο της μέτρησης της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, καθώς δεν απαιτεί τη χρήση επικίνδυνων υλικών και είναι εξίσου αξιόπιστη. Συνιστάται στην αναγωγή του 3-[4,5-διμεθυλθιαζολ-2-yl]-2,5-διφαινυλ-τετραζολικού βρωμιδίου (MTT) από μεταβολικά ενεργά κύτταρα, σε αναγωγικά ανάλογα όπως το NADH και το NADPH. Το κίτρινο χρώμα του MTT μετατρέπεται σε ιώδες το οποίο και ανιχνεύεται φασματοσκοπικά. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αντίστροφα, όταν τα μεταβολικά γεγονότα οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση την ανίχνευση της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Τα προς μελέτη κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλάκες με 96 πηγαδάκια (96 well plates) με 100μl θρεπτικό υλικό χωρίς ορό βοός και παρέμειναν στον επωαστικό κλίβανο για 48 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10μl MTT και η πλάκα επανατοποθετήθηκε στον κλίβανο για 2 ώρες ώστε να επιτευχθεί η ενδοκυττάρια αναγωγή του διαλυτού κίτρινου MTT σε αδιάλυτο ιώδες formazan dye. Μετά από αφαίρεση του υλικού, έγινε προσθήκη 200μl DMSO, με συνεχή ανάδευση ώσπου να επιτευχθεί διαλυτό ομοιογενές υλικό πριν την τοποθέτηση της πλάκας σε ειδικό φωτόμετρο για μέτρηση της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 570nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 650nm. Πηγαδάκια που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες – κενά (blanks).

### **B.1.15 Έλεγχος της απόπτωσης των χονδροκυττάρων με κυτταρομετρία ροής**

Για τη μελέτη της απόπτωσης των χονδροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (Annexin V-FITC/ 7-AAD kit, Beckman Coulter, France). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η απόπτωση, είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό ενδοκυττάρων φαινομένων, όπως διαταραχές στη δομή της μεμβράνης, συμπύκνωση χρωματίνης και κατάτμηση του κυτταρικού DNA. Η Annexin V επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στην κυτταρική μεμβράνη που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της διαδικασίας απόπτωσης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στην αρχική φάση της απόπτωσης, η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται από την έσω πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στην εξωτερική. Πρόκειται για μια διαδικασία καθοριστική για τον γρήγορο εντοπισμό των κυττάρων που εισέρχονται σε φάση απόπτωσης από τα μακροφάγα του οργανισμού, επιτρέποντας έτσι την ταχεία φαγοκυττάρωσή τους. Η ικανότητα της Annexin V να συνδέεται με την φωσφατιδυλοσερίνη είναι μεν αντιστρεπτή αλλά ιδιαίτερα σταθερή κάνοντάς την ιδανική για την ανίχνευση μεμβρανικών αλλαγών που συνδέονται με την απόπτωση.

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

### **B.1.16 Μέτρηση της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα χονδροκύτταρα**

Προκείμενου να διερευνηθεί η ποσότητα της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα με και χωρίς την επίδραση ενός LXR αγωνιστή τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες με 6 πηγαδάκια σε συγκέντρωση  $5.0 \times 10^5$  κύτταρα/πηγαδάκι με θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 σε συνθήκες απουσίας ορού και σημάνθηκαν με  $1\mu\text{Ci/ml}$  [1,2(n)- $^3\text{H}$ ] χοληστερόλης. Μετά από 24 ώρες έγινε έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS και επίδραση με  $1\mu\text{M}$  του συνθετικού LXR

αγωνιστή TO-901317 για 48 ώρες. Το υπερκείμενο των καλλιιεργειών συλλέχθηκε και μετρήθηκε η ραδιενέργειά του.

### **B.1.17 Χρώση των ενδοκυττάρων λιπιδίων με χρώση Oil red O**

Η ύπαρξη λιπιδίων μέσα στα χονδροκύτταρα, φυσιολογικά και οστεοαρθρικά, ελέγχθηκε μετά από χρώση τους με τη λιποδιαλυτή χρωστική Oil red O (χρώση ORO), που βασίζεται στη μεγάλη διαλυτότητα που έχει η συγκεκριμένη χρωστική στα λιπίδια. Πριν από τη χρήση, γίνεται αραίωση σε νερό, όπου η διαλυτότητα της χρωστικής είναι ιδιαίτερα μικρή. Όταν στη συνέχεια το διάλυμα έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα, η χρωστική μετακινείται από το διάλυμα προς τα λιπίδια, όπου και η διαλυτότητά της είναι μεγαλύτερη.

Τα προς μελέτη χονδροκύτταρα (που είχαν καλλιεργηθεί σε φλάσκες παρουσία και απουσία TO-901317) αρχικά σταθεροποιήθηκαν με 10% φορμαλίνη για 60 λεπτά και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με 60% ισοπροπανόλη. Στη συνέχεια έγινε η χρώση με Oil Red O (Sigma Aldrich, St Louis, USA) ενώ χρησιμοποιήθηκε και αιματοξυλίνη για δημιουργία αντίθεσης (counterstaining). Η ποσότητα των ενδοκυττάρων λιπιδίων ελέγχθηκε μετά από εξαγωγή με αιθανόλη και φωτομέτρηση στα 540nm.

### **B.1.16 Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 12 και συγκεκριμένα οι ακόλουθες δοκιμασίες: unpaired t test, paired t test, Mann Whitney U test, ANOVA (analysis of variance) με Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ως post hoc test. Οι δοκιμασίες συσχέτισης έγιναν με υπολογισμό του Pearson rank correlation και του Spearman rank correlation ενώ για τις συγκρίσεις μεταξύ των ζευγών αρθρικού υγρού και ορού του ίδιου ασθενούς χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon signed rank test. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$ .

**Πίνακας 3**

Γονίδιο		Αλληλουχίες εκκινήτων	Μέγεθος (bp)	Tm	Κύκλοι
COL2A1	F	5'-ATGACAATCTGGCTCCCAACACTGC-3'	364	60°C	38
	R	5'-GACCGGCCCTATGTCCACACCGAAT-3'			
AGC	F	5'-TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC-3'	357	56°C	38
	R	5'-GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA-3'			
MMP-13	F	5'-TGGCATTGCTGACATCATGA-3'	76	55°C	38
	R	5'-GCCAGAGGGCCCATCAA-3'			
Λεππίνη	F	5'-GCATTGGGGAACCCTGTG-3'	449	58°C	35
	R	5'-AGCACCCAGGGCTGAGGT-3'			
Ob-Rb	F	5'-GCTATTTTGGGAAGATGT-3'	501	58°C	37
	R	5'-TGCCTGGGCCTCTATCTC-3'			
Ob-Ra	F	5'-TGTTGTGAATGTCTTGTGCC-3'	394	57°C	30
	R	5'-TGCTCCAGTCACTCCAGATTCC-3'			
LOX-1	F	5'-TFACTCTCCATGGTGGTGCC-3'	193	58°C	35
	R	5'-AGCTTCTTCTGCTTGTGCC-3'			
ApoA1	F	5'-ATGAAAGCTGCGGTGCTGACC-3'	428	58°C	35
	R	5'-CACCTTCTGGCGGTAGAGCTCC-3'			
ABCA1	F	5'-GGAGGCAATGGCACTGAGGAA-3'	181	58°C	36
	R	5'-CCTGCCTTGTGGCTGGAGTGT-3'			
LXRα	F	5'-CCGCCTGAAGAACTGA-3'	179	57°C	36
	R	5'-CGAAGCCGGTCAGAAAAG-3'			
LXRβ	F	5'-CGCTACAACCACGAGACAGA-3'	70	56°C	36
	R	5'-GTGGAAGTCGTCCTTGCTGT-3'			
RARα	F	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'	250	53°C	40
	R	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT3'.			
PBGD	F	5'-AGAGTGATTGCGGTGGGTACC-3'	282	58°C	36
	R	5'-GGCTCCGATGGTGAAGCC-3'			

Πίνακας 3: Αναλυτικός πίνακας των αλληλουχιών των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια COL2A1, AGC, MMP13, λεππίνη, ObRb, ObRa, LOX1, ApoA1, ABCA1, LXRα, LXRβ, RARα, PBGD.

## **B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **B.2.1 Ανίχνευση της λεπτίνης στον ορό και στο αρθρικό υγρό ασθενών με οστεοαρθρίτιδα**

Όσον αφορά στα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό και στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ( $p < 0.0005$ ). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της λεπτίνης στο αρθρικό υγρό ήταν 3 με 11 φορές υψηλότερα απ' ό τι στον ορό των αντίστοιχων ασθενών (αρθρικό υγρό: μέση συγκέντρωση 139ng/ml, διακύμανση 14.3–167ng/ml, ορός αίματος: μέση συγκέντρωση 27.8ng/ml, διακύμανση 3.3–48.5ng/ml)

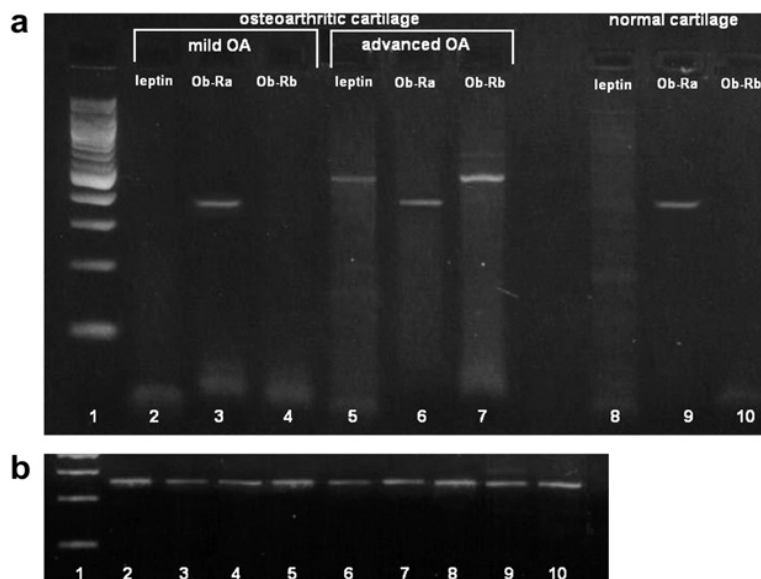
Τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό όπως και στο αρθρικό υγρό ήταν σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες απ' ό τι στους άνδρες ( $p < 0.001$ ).

Στατιστικά σημαντική ήταν και η συσχέτιση των επιπέδων της λεπτίνης μεταξύ αρθρικού υγρού και ορού των ασθενών ( $r = 0.709$ ,  $p < 0.01$ ).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης στον ορό και το αρθρικό υγρό με το BMI των ασθενών ( $r = 0.489$ ,  $p < 0.05$  και  $r = 0.620$ ,  $p < 0.01$  αντίστοιχα).

### **B.2.2 Έκφραση mRNA λεπτίνης και των υποδοχέων της, Ob-Rb και Ob-Ra**

Τα ενήλικα χονδροκύτταρα που προέρχονταν από χόνδρο με προχωρημένη ΟΑ εξέφραζαν λεπτίνη καθώς επίσης και τις δύο ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης, τη μακρά (Ob-Rb) και την κοντή ισομορφή (Ob-Ra), όπως ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR). Με την ίδια μέθοδο διαπιστώθηκε ότι τα χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από τον οστεοαρθρικό χόνδρο με ήπιες αλλοιώσεις, καθώς επίσης και από φυσιολογικό χόνδρο, παρουσίαζαν έκφραση μόνο του υποδοχέα Ob-Ra (εικόνα 20). Τα καλλιιεργημένα χονδροκύτταρα, φυσιολογικά και οστεοαρθρικά, παρουσίαζαν έκφραση λεπτίνης καθώς επίσης και έκφραση mRNA των υποδοχέων Ob-Rb και Ob-Ra.



Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτική πηκτή που παρουσιάζει την έκφραση mRNA λεπτίνης (499bp), Ob-Ra (394bp) και Ob-Rb (501bp) (a) και του γονιδίου RARα (b) που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας στο φυσιολογικό, προχωρημένης OA και ήπιας OA χόνδρο. Λωρίδα 1: δείκτης 100 bp, λωρίδα 2: λεπτίνη στον χόνδρο με ήπια OA, λωρίδα 3: Ob-Ra στον χόνδρο με ήπια OA, λωρίδα 4: Ob-Rb στον χόνδρο με ήπια OA, λωρίδα 5: λεπτίνη στον προχωρημένης OA χόνδρο, λωρίδα 6: Ob-Ra στον προχωρημένης OA χόνδρο, λωρίδα 7: Ob-Rb στον προχωρημένης OA χόνδρο, λωρίδα 8: λεπτίνη στο φυσιολογικό χόνδρο, λωρίδα 9: Ob-Ra στο φυσιολογικό χόνδρο, λωρίδα 10: Ob-Rb στο φυσιολογικό χόνδρο.

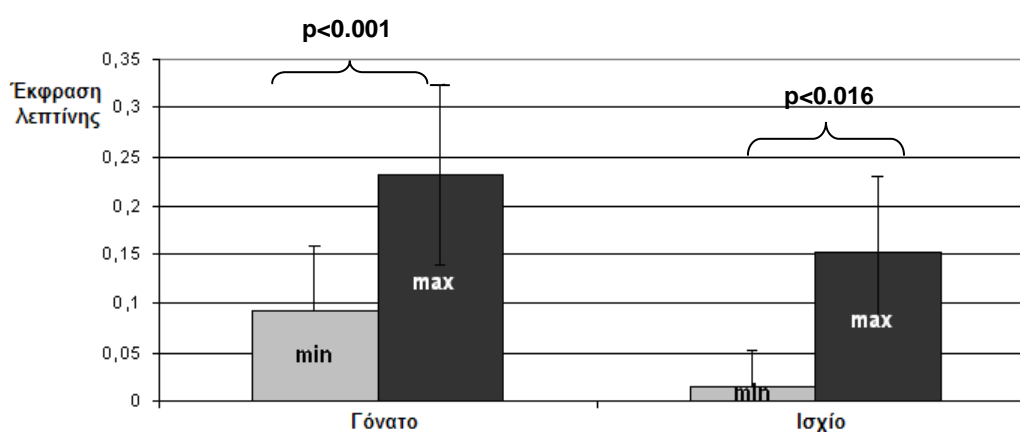
Χρησιμοποιώντας PCR πραγματικού χρόνου επιβεβαιώσαμε τα ευρήματα της RT-PCR και επιπλέον παρατηρήσαμε έκφραση mRNA της λεπτίνης και του Ob-Rb στο φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο και στο χόνδρο με ήπια OA, αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Συνολικά, **η λεπτίνη εκφράστηκε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στον οστεοαρθρικό έναντι του φυσιολογικού χόνδρου** ( $p < 0.001$ ). Δεδομένου ότι δείγματα με ήπιες και προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις είχαν προέλθει από την ίδια άρθρωση εκτελέστηκε στατιστική ανάλυση με τα αντιστοιχημένα ζεύγη δειγμάτων. Συγκρίνοντας το ποσοστό έκφρασης του mRNA της λεπτίνης (αριθμός αντιγράφων της λεπτίνης/ αριθμό αντιγράφων γονιδίου αναφοράς PBGD) μεταξύ των δειγμάτων από τις περιοχές του αρθρικού χόνδρου με την ήπια και προχωρημένη οστεοαρθρική βλάβη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.001$ ). Συγκεκριμένα, υπήρξε μια **στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του mRNA της λεπτίνης μεταξύ του χόνδρου με ήπια OA** ( $0.064 \pm 0.068$  αντίγραφα λεπτίνης / αντίγραφα PBGD) **και του χόνδρου με προχωρημένη OA** ( $0.20 \pm 0.093$



αντίγραφα λεπτίνης/αντίγραφα PBGD) ( $t(15) = 6.798, p < 0.0001$ ). Αυτό το πρότυπο έκφρασης διατηρήθηκε ακόμα και όταν ελέγχθηκε η διαφοροποιημένη έκφραση της λεπτίνης ξεχωριστά για τον αρθρικό χόνδρο γόνατος και ισχίου (πίνακας 4, διάγραμμα 1).

Άρθρωση	Περιοχή λήψης δείγματος	Έκφραση λεπτίνης (αντίγραφα λεπτίνης/αντίγραφα PBGD)	Στατιστική συσχέτιση
Γόνατο και Ισχίο	Ήπια ΟΑ	$0.064 \pm 0.068$	$p < 0.001$
	Προχωρημένη ΟΑ	$0.200 \pm 0.093$	
Γόνατο	Ήπια ΟΑ	$0.093 \pm 0.066$	$p < 0.001$
	Προχωρημένη ΟΑ	$0.232 \pm 0.092$	
Ισχίο	Ήπια ΟΑ	$0.015 \pm 0.037$	$p < 0.016$
	Προχωρημένη ΟΑ	$0.153 \pm 0.076$	

Πίνακας 4. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA της λεπτίνης σε δείγματα αρθρικού χόνδρου από περιοχές με ήπια ΟΑ και με προχωρημένη ΟΑ που προέρχονται από την άρθρωση του γόνατος και του ισχίου, συγκεντρωτικά αλλά και ξεχωριστά για κάθε άρθρωση.



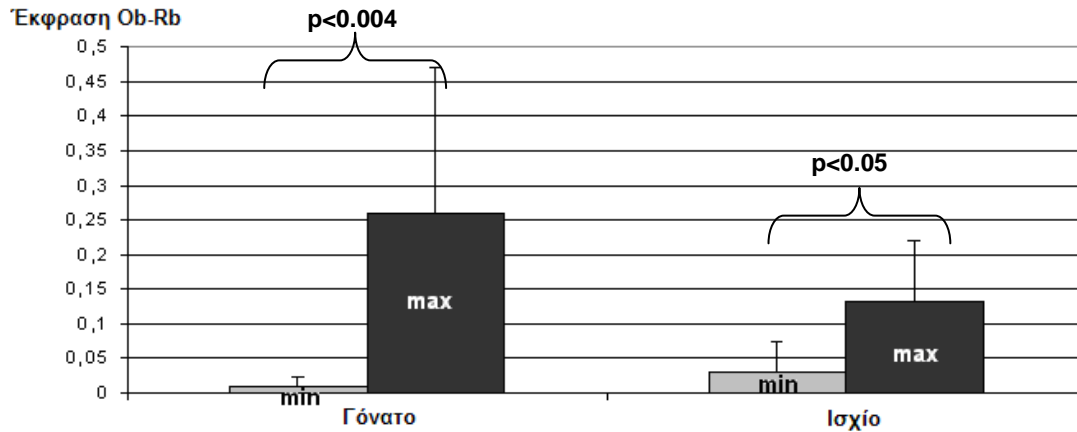
Διάγραμμα 1. Ραβδόγραμμα που δείχνει τη διαφοροποιημένη έκφραση της λεπτίνης στις περιοχές με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις (min) και προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις (max) σε γόνατα και ισχία.

Όσον αφορά στη διαφοροποιημένη έκφραση της λεπτίνης μεταξύ του χόνδρου με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις και του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης mRNA του υποδοχέα της λεπτίνης **Ob-Rb**, παρατηρήθηκε ότι ήταν **στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα στον φυσιολογικό χόνδρο σε σύγκριση με τον οστεοαρθρικό χόνδρο** ( $p < 0.001$ ). Όταν εκτελέστηκε η αντιστοιχημένη κατά ζεύγη ανάλυση των δειγμάτων παρατηρήθηκε μια **στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του Ob-Rb** ( $t(15) = 4.154, p < 0.001$ ) **μεταξύ του χόνδρου με ήπια ΟΑ** ( $0.018 \pm 0.030$  αντίγραφα Ob-Rb /αντίγραφα PBGD) **και του χόνδρου με προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις** ( $0.212 \pm 0.183$  αντίγραφα Ob-Rb /αντίγραφα PBGD). Η διαφοροποιημένη έκφραση του υποδοχέα Ob-Rb διατηρήθηκε όταν μελετήθηκαν ξεχωριστά οι αρθρώσεις γόνατος ( $p < 0.004$ ) και ισχίου ( $p < 0.05$ ) (πίνακας 5, διάγραμμα 2). Συγκρίνοντας την έκφραση του Ob-Rb μεταξύ των δύο αρθρώσεων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0.05$ ).

Άρθρωση	Περιοχή λήψης δείγματος	Έκφραση Ob-Rb (αντίγραφα Ob-Rb/αντίγραφα PBGD)	Στατιστική συσχέτιση
Γόνατο και Ισχίο	Ήπια ΟΑ	<b>0.018±0.030</b>	<b>p&lt;0.001</b>
	Προχωρημένη ΟΑ	<b>0.212±0.183</b>	
Γόνατο	Ήπια ΟΑ	<b>0.010±0.015</b>	<b>p&lt;0.004</b>
	Προχωρημένη ΟΑ	<b>0.260±0.210</b>	
Ισχίο	Ήπια ΟΑ	<b>0.030±0.044</b>	<b>p&lt;0.05</b>
	Προχωρημένη ΟΑ	<b>0.132±0.089</b>	

Πίνακας 5. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA της Ob-Rb σε δείγματα αρθρικού χόνδρου από περιοχές με ήπια ΟΑ και με προχωρημένη ΟΑ που προέρχονται από την άρθρωση του γόνατος και του ισχίου, συγκεντρωτικά αλλά και για κάθε άρθρωση ξεχωριστά.



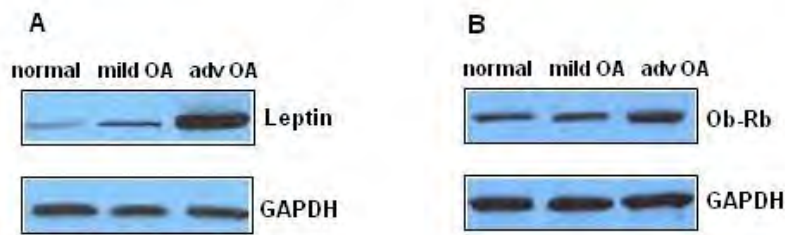
Διάγραμμα 2. Ραβδόγραμμα που δείχνει τη διαφοροποιημένη έκφραση του Ob-Rb στις περιοχές με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις (min) και προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις (max) σε γόνατα και ισχία.

Όσον αφορά την mRNA έκφραση του Ob-Ra δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του φυσιολογικού και οστεοαρθρικού χόνδρου, ούτε μεταξύ των αρθρώσεων του γόνατος και του ισχίου ( $p > 0.05$ ). Η αντιστοιχημένη κατά ζεύγη ανάλυση των δειγμάτων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του ήπια και προχωρημένης ΟΑ χόνδρου που προέρχονταν από την ίδια άρθρωση ( $p > 0.05$ ).

Όταν συγκρίνουμε την mRNA έκφραση της λεπτίνης με τα mRNA επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων της, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb (συσχετισμός Pearson rank  $r = 0.377$ ,  $p < 0.05$ ).

### **B.2.3 Πρωτεϊνική έκφραση λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα**

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης της λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western blot). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποστηρίζουν ότι **τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λεπτίνης ήταν σημαντικά υψηλότερα στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και ιδιαίτερα χαμηλά σε φυσιολογικά καλλιεργημένα χονδροκύτταρα**. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα Ob-Rb σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία που παρουσιάζει την πρωτεϊνική έκφραση της λεπτίνης (A) και του υποδοχέα Ob-Rb (B) σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα (normal), και σε χονδροκύτταρα που προέρχονταν από περιοχή με ήπια OA (mild) και προχωρημένη OA (advanced). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

#### B.2.4 Συσχέτιση των επιπέδων mRNA της λεπτίνης με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) των ασθενών

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της παχυσαρκίας στην οστεοαρθρίτιδα, οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με το BMI: α. φυσιολογικού βάρους, β. παχύσαρκοι και γ. υπέρβαροι. Σύμφωνα με αυτήν την ομαδοποίηση, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του mRNA της λεπτίνης στον οστεοαρθρικό χόνδρο από περιοχές με προχωρημένη OA μεταξύ παχύσαρκων και φυσιολογικού βάρους ασθενών (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση post-hoc υποστηρίζουν σημαντικά **υψηλότερο μέσο όρο έκφρασης του mRNA της λεπτίνης σε παχύσαρκους ασθενείς** ( $0.294 \pm 0.039$  αντίγραφα λεπτίνης/αντίγραφα PBGD)) **απ' ότι σε φυσιολογικού βάρους ασθενείς** ( $0.128 \pm 0.049$  αντίγραφα λεπτίνης/αντίγραφα PBGD), ενώ αντιθέτως δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ παχύσαρκων και υπέρβαρων ασθενών ( $0.2 \pm 0.1$  αντίγραφα λεπτίνης/αντίγραφα PBGD) (διάγραμμα 3). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και όταν έγινε στατιστική ανάλυση με βάση την ταξινόμηση της παχυσαρκίας σύμφωνα με τα τριτημόρια του BMI. Οι συμμετέχοντες στα μέσα και ανώτερα τριτημόρια BMI είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης λεπτίνης έναντι των ασθενών που ανήκαν στο χαμηλότερο τριτημόριο και στο φυσιολογικό πληθυσμό (ANOVA,  $p < 0.05$ ).



Διάγραμμα 3. Απεικόνιση της συσχέτισης της έκφρασης του mRNA της λεπτίνης με το BMI σε ασθενείς με ΟΑ. (\*)  $p < 0.05$

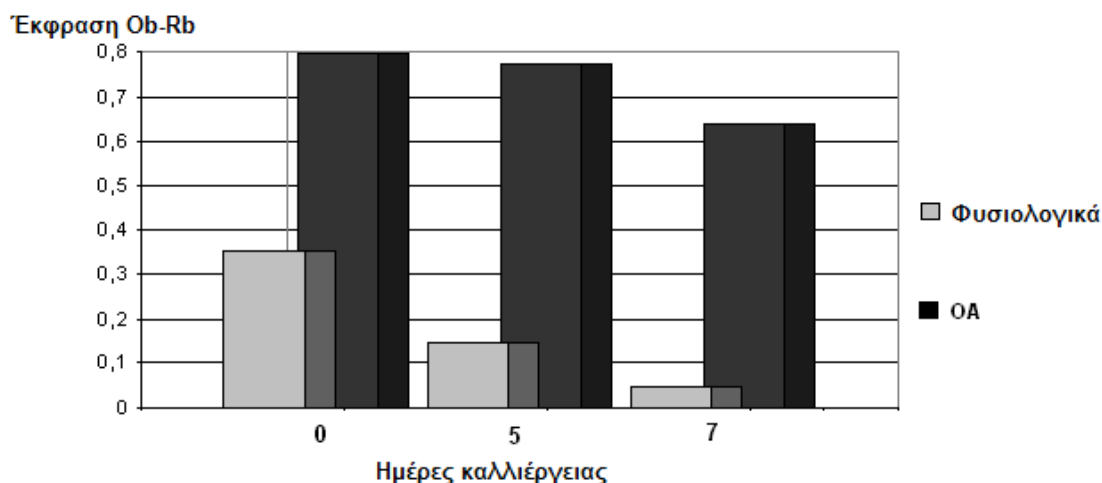
Επιπλέον εξετάστηκε η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του mRNA της λεπτίνης από την περιοχή του αρθρικού χόνδρου προχωρημένης ΟΑ και του δείκτη μάζας σώματος (BMI) ασθενών. Από τη δοκιμασία αυτή προέκυψε **στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $r=0.571$ ,  $p < 0.05$ ) των επιπέδων mRNA της λεπτίνης με το BMI των ασθενών.**

Όσον αφορά στον υποδοχέα Ob-Rb, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων mRNA του Ob-Rb στη σύγκριση μεταξύ των ατόμων φυσιολογικού βάρους, των υπέρβαρων και των παχύσαρκων ασθενών. Ανάλογα, δεν προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA του Ob-Rb και με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) των ασθενών.

### **B.2.5 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του υποδοχέα Ob-Rb σε καλλιεργημένα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα παρουσία και απουσία της λεπτίνης**

Σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων στα οποία έγινε επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις λεπτίνης και ακολούθως απομονώθηκε RNA και έγινε σύνθεση συμπληρωματικού DNA ποσοτικοποιήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα Ob-Rb ως προς το γονίδιο αναφοράς PBGD, με στόχο να διερευνήσουμε την επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση του λειτουργικού υποδοχέα της. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής: τα επίπεδα έκφρασης του Ob-Rb στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα ήταν υψηλότερα από ότι στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. **Η επίδραση της λεπτίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων ανέστειλε την έκφραση του Ob-Rb ενώ στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική**

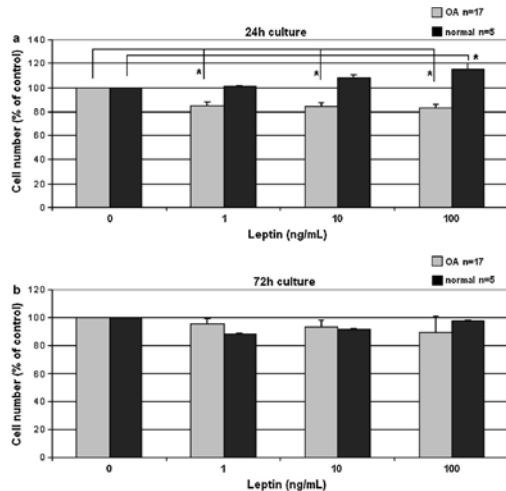
**διαφοροποίηση.** Αναλυτικότερα, συγκεντρώσεις λεπτίνης από 0.1 μέχρι 10ng/ml δεν επηρέασαν την έκφραση του mRNA του Ob-Rb, ενώ επίδραση λεπτίνης στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα με συγκέντρωση 100ng/ml κατέστειλε τα επίπεδα του mRNA του Ob-Rb (7.8 φορές), ενώ δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης του Ob-Rb στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του Ob-Rb μετά από επίδραση 100mg/ml λεπτίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων.

#### B.2.6 Επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων

Η λεπτίνη ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από καλλιέργεια 24 και 48 ωρών, ενώ στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα ο πολλαπλασιασμός μειώθηκε για την ίδια χρονική διάρκεια κυτταροκαλλιέργειας. Σε καλλιέργειες με επίδραση λεπτίνης για 72 ώρες και έως 7 ημέρες, ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων μειώθηκε τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα (διαγράμματα 5α και 5β). Το πείραμα εκτελέστηκε τρεις φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η λεπτίνη μειώνει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων ή αυξάνει την απόπτωση, ή και τα δύο αναλύσαμε το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων στις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων. Δεν ανιχνεύθηκαν αποπτωτικά κύτταρα μετά από 7 ημέρες επίδρασης με λεπτίνη ενώ δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό των ζώντων κυττάρων μεταξύ των κυτταροκαλλιεργειών που επώαστηκαν παρουσία ή απουσία λεπτίνης.

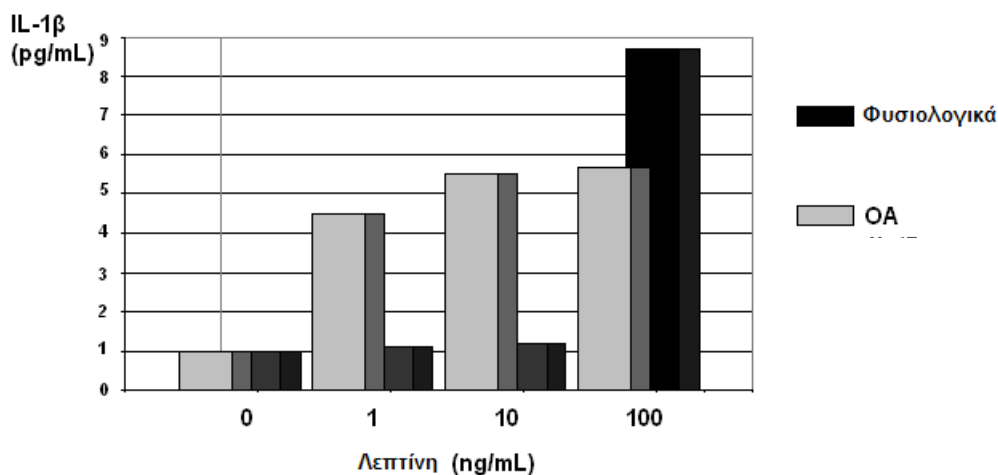


Διαγράμματα 5α και 5β

Επίδραση της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων σε καλλιέργειες 24 ωρών (α) και 72 ωρών (β). Ο αριθμός των κυττάρων εκφράζεται ως το ποσοστό των ζώντων κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια σε σύγκριση με κυτταροκαλλιέργειες που δεν είχαν καθόλου λεπτίνη. Τα στοιχεία παρουσιάζονται σαν μέσος όρος ± τυποποιημένο λάθος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. (\*)  $p < 0.05$

### B.2.7 Μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων λεπτίνης σε καλλιεργημένα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Η δράση της λεπτίνης στην ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και στην παραγωγή NO

Σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων έγινε επίδραση λεπτίνης με συγκεντρώσεις από 0-100ng/ml για 24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες και 7 ημέρες και μετρήθηκε η παραγωγή της κυτταροκίνης ιντερλευκίνη-1β από τα χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδηλώνουν ότι **η λεπτίνη επάγει την παραγωγή IL-1β τόσο από οστεοαρθρικά όσο και από φυσιολογικά χονδροκύτταρα**. Ειδικότερα, 24, 48 και 72 ώρες μετά από επίδραση με 0-100ng/ml λεπτίνης δεν παρατηρήθηκε παραγωγή IL-1β από τα χονδροκύτταρα. Αντιθέτως, μετά από επίδραση λεπτίνης σε καλλιέργειες διάρκειας 7 ημερών, τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παράγαν IL-1β. Αναλυτικότερα, στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής της IL-1β κατά 8.7 φορές μετά από επίδραση 100mg/ml λεπτίνης. Στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σημειώθηκε μικρότερη αύξηση, κατά 4.5 φορές έπειτα από επίδραση 1ng/ml λεπτίνης, η οποία διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα ακόμα και αυξάνοντας τη συγκέντρωση της λεπτίνης (100ng/ml). (διάγραμμα 6)



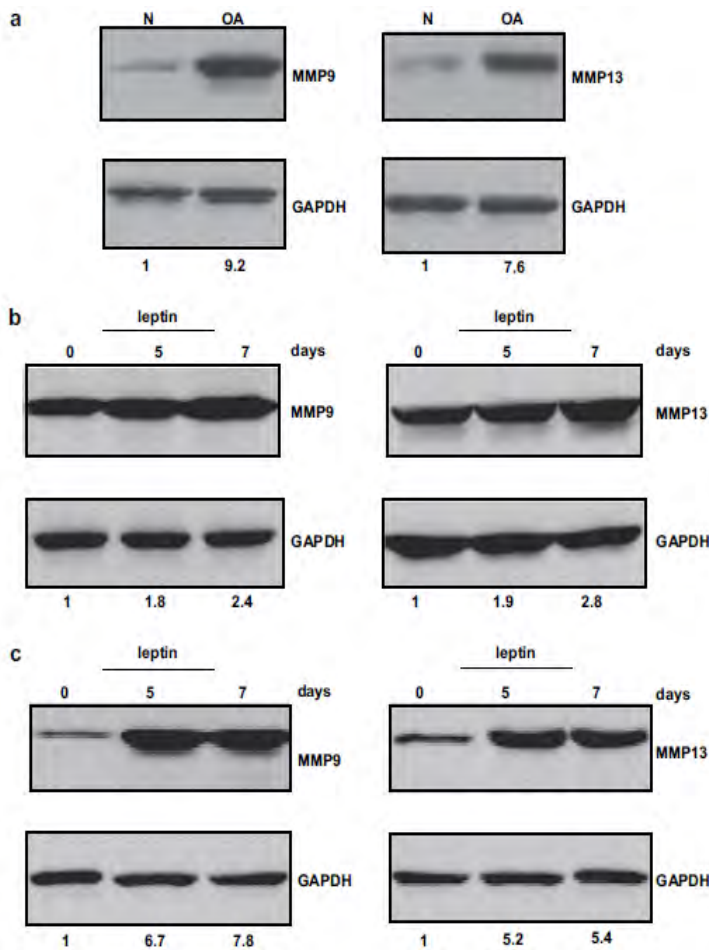
Διάγραμμα 6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της IL-1β μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις λεπτίνης (0-100ng/ml) σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων

Όσον αφορά την παραγωγή του NO, δεν παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμη παραγωγή NO στις καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία λεπτίνης.

### B.2.8 Πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών 9 και 13 (MMP-9 και MMP-13) στα οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα μετά από επίδραση λεπτίνης

Έγινε επώαση οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων για 5 και 7 ημέρες με αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) και στη συνέχεια προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-9 και MMP-13. Οι συγκεντρώσεις 0.1 και 1ng/ml λεπτίνης δεν ήταν ικανές να επάγουν τα επίπεδα των MMP-9 και MMP-13, ενώ **επίδραση 100 ng/ml λεπτίνης αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των MMP9 και MMP13**. Αναλυτικά, η πρωτεϊνική έκφραση των MMP-9 και MMP-13 μετά από την επώαση με 100ng/ml λεπτίνης για 5 ημέρες αυξήθηκε 1.8 φορές και 1.9 φορές στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και 6.7 φορές και 5.2 φορές στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα, αντίστοιχα, ενώ μετά από 7 ημέρες επώασης με λεπτίνη στα οστεοαρθρικά και στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση της MMP-9 (2.4 φορές και 7.8 φορές) και της MMP-13 (2.8 φορές και 5.4 φορές), αντίστοιχα (εικόνα 22).





Εικόνα 22. Η πρωτεϊνική έκφραση των MMP-9 και MMP-13 στα φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.

(a) Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των MMP-9 και MMP-13 είναι πολύ υψηλά στα οστεοαρθρικά (OA) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (N) χονδροκύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος φόρτωσης.

(b) Η πρωτεϊνική έκφραση των MMP-9 και MMP-13 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα μετά από την επεξεργασία με 100ng/ml λεπτίνης για 5 και 7 ημέρες. Τα MMP-9 και MMP-13 μετά από την επεξεργασία λεπτίνης παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασής τους στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.

(c) Η πρωτεϊνική έκφραση των MMP-9 και MMP-13 στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα μετά από την επεξεργασία με 100ng/ml λεπτίνης για 5 και 7 ημέρες.

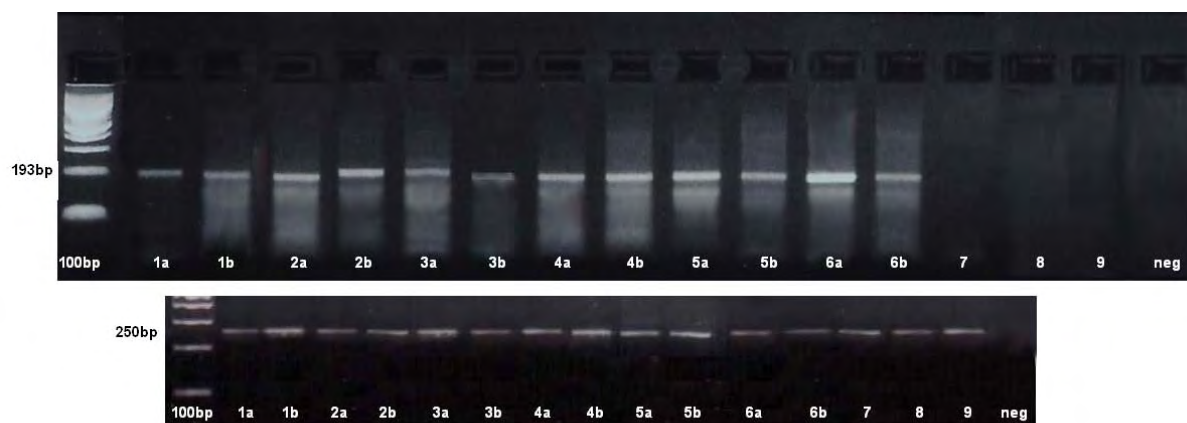
### B.2.9 Προσδιορισμός των επιπέδων της οξειδωμένης LDL στο αρθρικό υγρό και τον ορό ασθενών με OA

Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (oxLDL) ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα αρθρικού υγρού που μελετήθηκαν, με συγκεντρώσεις από 12.3U/l έως 75.85U/l (μέση συγκέντρωση  $34.88 \pm 18.45$ U/l) και οι οποίες ήταν ανάλογες με αυτές που μετρήθηκαν στον ορό. Δεν ανιχνεύτηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της oxLDL στο αρθρικό υγρό και στον ορό, ενώ δεν διαπιστώθηκαν διαφορές που σχετίζονταν με το φύλο ή την ηλικία.

Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος (BMI) των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα και των επιπέδων της oxLDL στο αρθρικό υγρό ( $r=0.881$ ,  $p<0.01$ ).

## B.2.10 Έκφραση του υποδοχέα της oxLDL, LOX-1, στον αρθρικό χόνδρο

Τα ενήλικα χονδροκύτταρα που προέρχονταν από οστεοαρθρικό χόνδρο εμφάνιζαν έκφραση mRNA του υποδοχέα LOX-1, ενώ τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα δεν παρουσίαζαν έκφραση (εικόνα 23). Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του χόνδρου που προέρχονταν από περιοχές με προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις κ α από περιοχές με ήπιες αλλοιώσεις από τον ίδιο ασθενή (πίνακας 6).

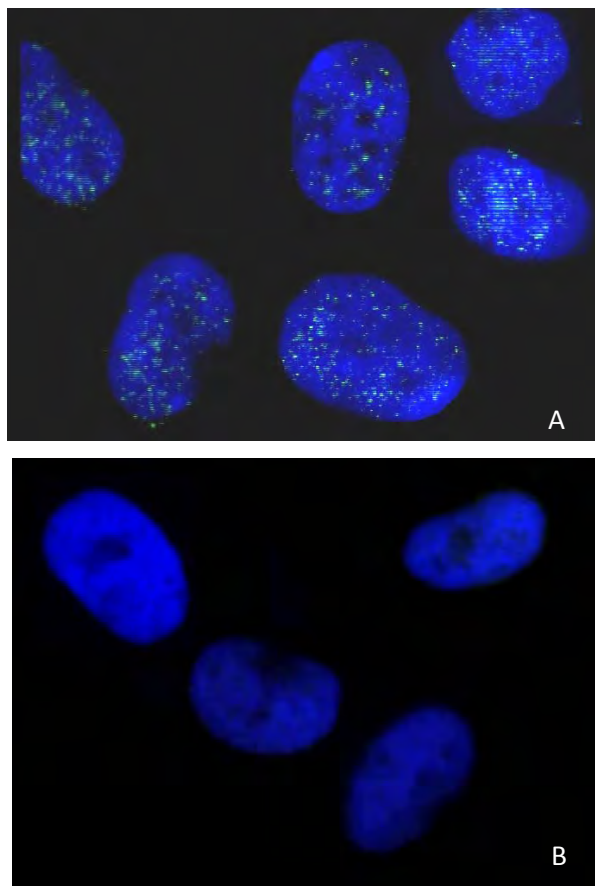


Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτικό πήκτωμα που δείχνει την mRNA έκφραση του υποδοχέα LOX-1 (193bp) και του γονιδίου αναφοράς RARα (250bp) στον οστεοαρθρικό χόνδρο 6 ασθενών τόσο από την περιοχή με προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις (α) όσο και από περιοχή με ήπια OA (β) (στήλες 1-6) καθώς στο φυσιολογικό χόνδρο τριών υγιών ενηλίκων (στήλες 7-9). Στην αρχή του πηκτώματος τοποθετήθηκε δείκτης 100bp.

	Δείγμα		LOX-1 mRNA	RARa mRNA	LOX-1/RARa
OA	1	Προχωρημένη OA	39.831,00	22.817,00	1.745672
		Ήπια OA	55.229,00	44.776,00	1.233451
	2	Προχωρημένη OA	83.293,00	27.308,00	3.050132
		Ήπια OA	83.162,00	34.248,00	2.428229
	3	Προχωρημένη OA	40.794,00	37.709,00	1.081811
		Ήπια OA	36.824,00	27.700,00	1.329386
	4	Προχωρημένη OA	73.260,00	30.606,00	2.393648
		Ήπια OA	104.946,00	44.291,00	2.369466
	5	Προχωρημένη OA	131.883,00	38.322,00	3.441444
		Ήπια OA	88.885,00	47.463,00	1.872722
	6	Προχωρημένη OA	174.015,00	30.613,00	5.68435
		Ήπια OA	68.759,00	22.629,00	3.038535
<b>Φυσιολογικό</b>			0		0
<b>Φυσιολογικό</b>			0		0
<b>Φυσιολογικό</b>			0		0

Πίνακας 6. Ποσοτικοποίηση των στηλών του πηκτώματος της εικόνας 23. Ο λόγος LOX-1/RARa mRNA αντιπροσωπεύει την σχετική έκφραση mRNA του υποδοχέα LOX-1 σε δείγματα αρθρικού χόνδρου τόσο από περιοχές προχωρημένης OA όσο και από περιοχές ήπιας OA που προέρχονται από 6 ασθενείς με OA καθώς και σε δείγματα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου από 3 υγιείς ενήλικες.

Τα ευρήματα της πρωτεϊνικής έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 ήταν σε συμφωνία με τα ευρήματα από τη μελέτη της έκφρασης του mRNA. Η ανάλυση με ανοσοφθορισμό για τον LOX-1 στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έδειξε έκφραση του υποδοχέα, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα δεν ανιχνεύθηκε φθορίζον σήμα κατά τη μικροσκόπηση (εικόνα 24).

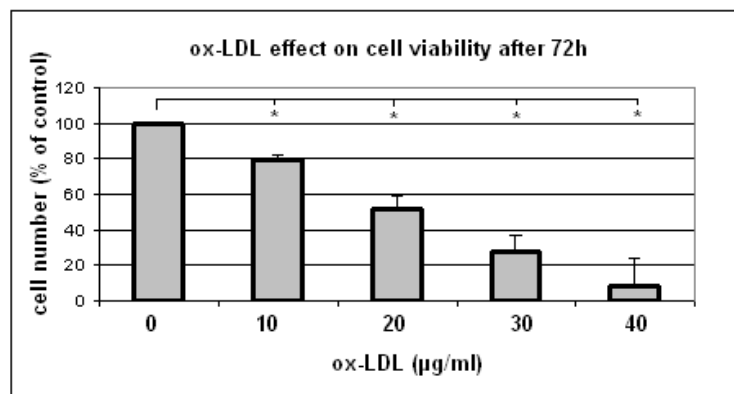
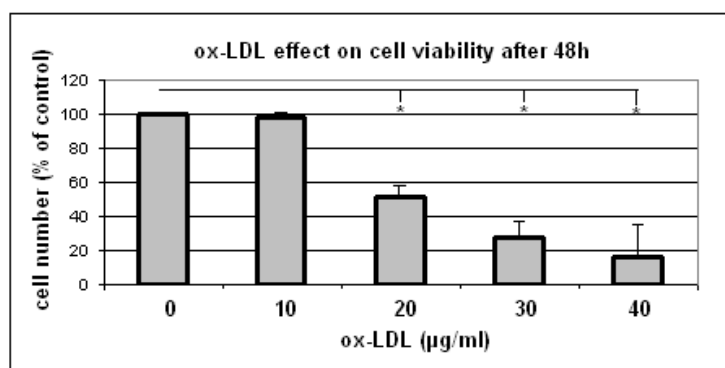
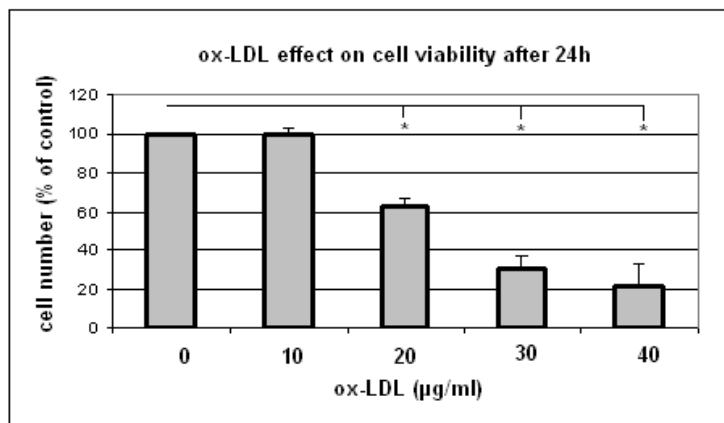


Εικόνα 24. Απεικόνιση της πρωτεϊνικής έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 με ανοσοφθορισμό σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα (A). Οι πράσινες κουκίδες αντιπροσωπεύουν τον υποδοχέα που εκφράζεται στα χρωματισμένα μπλε χονδροκύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν καθόλου φθορισμό (B).

### **B.2.11 Επίδραση της oxLDL στη βιωσιμότητα των φυσιολογικών χονδροκυττάρων**

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της οξειδωμένης LDL (oxLDL) στη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων έγινε επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις oxLDL σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων και στη συνέχεια μελέτη της βιωσιμότητάς τους με τη μέθοδο του MTT μετά από 24, 48 και 72 ώρες. Διαπιστώθηκε ότι η oxLDL μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων δραματικά,

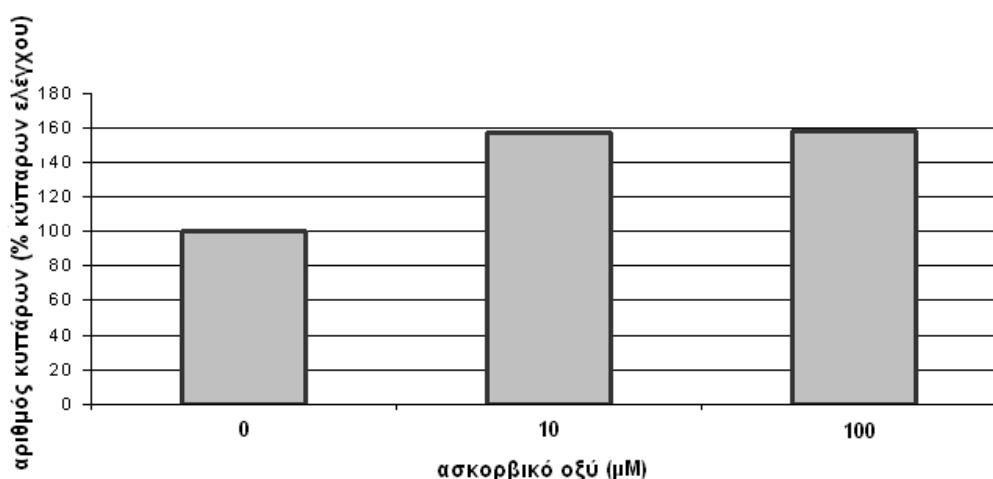
ελαττώνοντας τον αριθμό τους στο μισό μετά από επίδραση 24 ωρών με 20μg/ml (διάγραμμα 7). Τα πειράματα διενεργήθηκαν 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



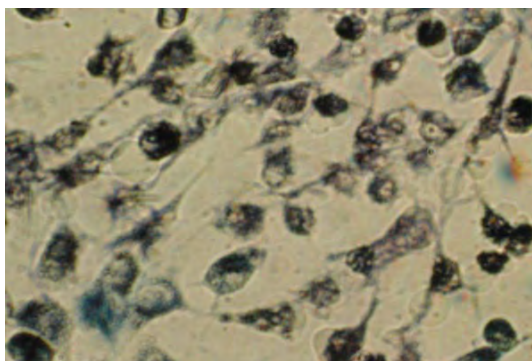
Διάγραμμα 7. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων οξειδωμένης LDL χοληστερόλης (0-40ng/ml) στη βιωσιμότητα των φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από 24, 48 και 72 ώρες. Ο αριθμός των κυττάρων παρουσιάζεται ως το ποσοστό επί των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί επίδραση με ox-LDL. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως μέση τιμή  $\pm$  standard erroro τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. (\*)  $p < 0.05$ .

## B.2.12 Επίδραση του αντιοξειδωτικού, ασκορβικού οξέος, σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων

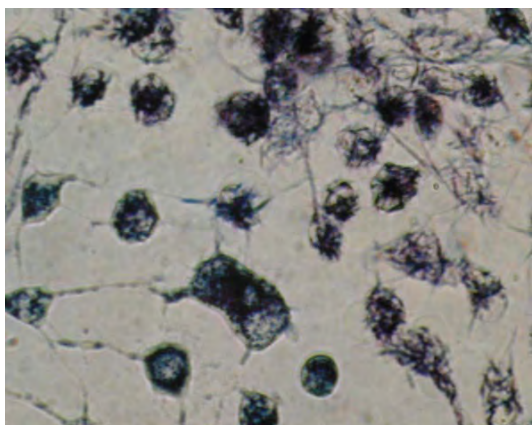
Μελετήθηκε η επίδραση που είχε η προσθήκη ασκορβικού οξέος σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών και φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από επίδραση 24 ωρών, 48 ωρών και 7 ημερών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας, και κατόπιν μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο του MTT. Παρατηρήθηκε ότι **το ασκορβικό οξύ προκαλούσε αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων** στις κυτταροκαλλιέργειες, από τις πρώτες 24ώρες (εικόνα 25), τόσο των οστεοαρθρικών όσο και των φυσιολογικών κυττάρων, που ήταν στατιστικά σημαντική στις επιδράσεις διάρκειας 7 ημερών (διάγραμμα 8).



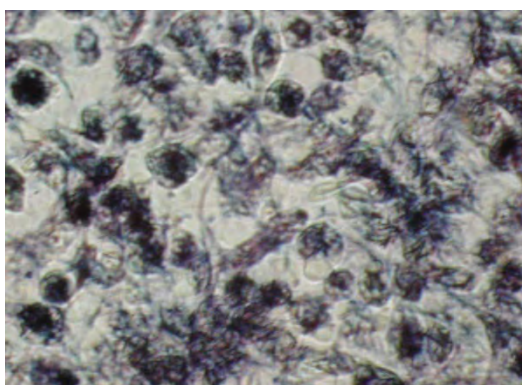
Διάγραμμα 8. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (0-100μM) στη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων διάρκειας 7 ημερών. Ο αριθμός των κυττάρων παρουσιάζεται ως το ποσοστό επί των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί επίδραση. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν τις μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



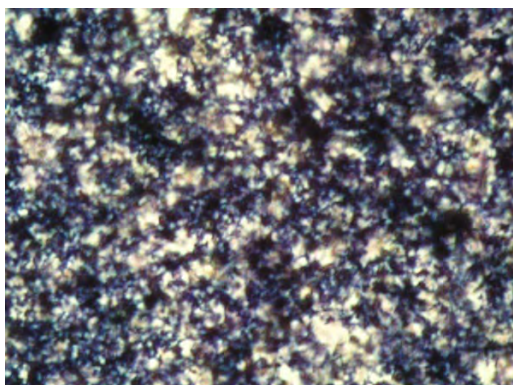
οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα  
χωρίς την επίδραση  
ασκορβικού οξέος



οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα  
με ασκορβικό οξύ 1 μΜ



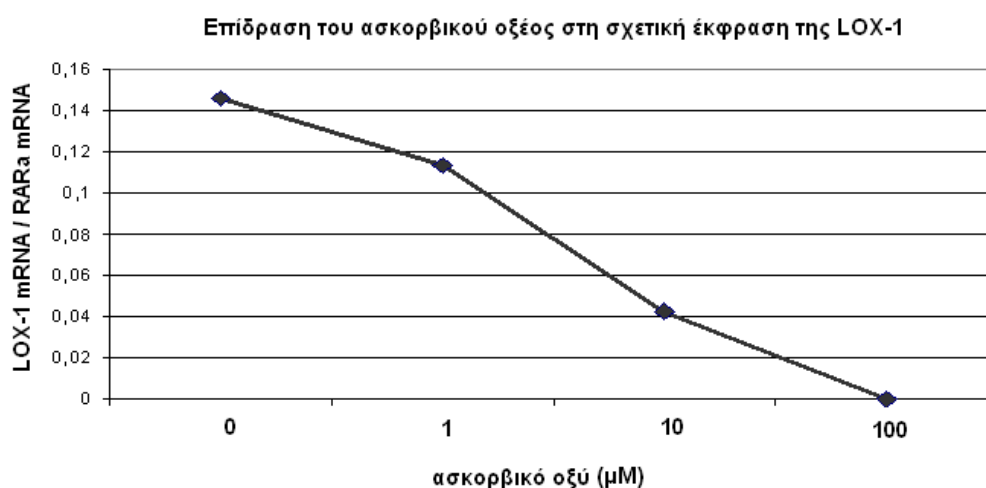
οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα  
με ασκορβικό οξύ 10 μΜ



οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα  
με ασκορβικό οξύ 100 μΜ

Εικόνα 25. Οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα μετά από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (0-100 μΜ) σε καλλιέργειες 24ωρών, όπου φαίνεται η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες που έχουν δεχθεί την επίδραση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων της ουσίας. Μεγέθυνση 20x

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του ασκορβικού οξέος στην έκφραση mRNA του υποδοχέα της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, LOX-1, και βρέθηκε ότι στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα δεν υπήρχε διαφορά. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση LOX-1 από τα χονδροκύτταρα, τόσο σε αυτά που έγινε η επίδραση όσο και σε εκείνα που καλλιεργήθηκαν χωρίς το αντιοξειδωτικό, ενώ στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα με την επίδραση του αντιοξειδωτικού (διάγραμμα 9). Τα πειράματα διενεργήθηκαν 3 φορές με συγκρίσιμα αποτελέσματα.

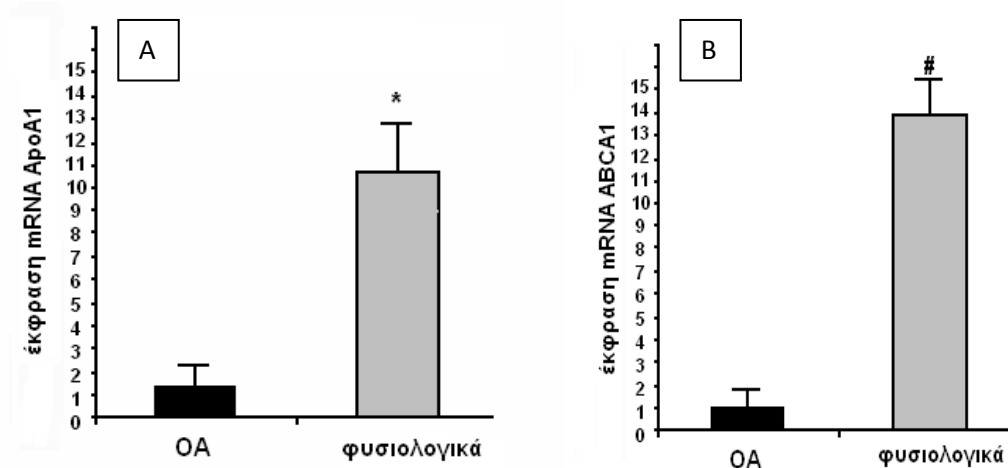


Διάγραμμα 9. Σχηματική παράσταση της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (0=100μM) στη σχετική έκφραση mRNA του γονιδίου LOX-1 (LOX-1/RARα mRNA) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα.

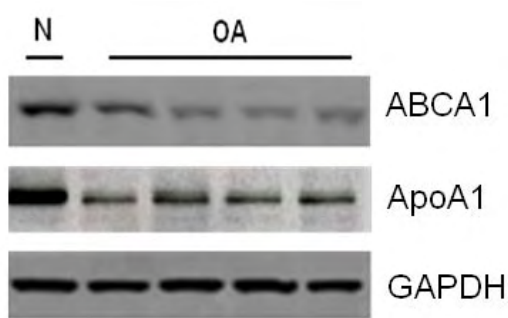
### **B.2.13 Έκφραση των ApoA1, ABCA1, LXR α και LXRβ στα χονδροκύτταρα**

Ανάλυση με PCR πραγματικού χρόνου για τα γονίδια ApoA1 και ABCA1 έδειξαν ότι υπήρχε διαφορετική έκφραση μεταξύ του οστεοαρθρικού και του φυσιολογικού χόνδρου. Τα επίπεδα mRNA των ApoA1 και ABCA1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ( $p < 0.01$  και  $p < 0.001$  αντίστοιχα) (διάγραμμα 10). Ανάλογες διαφορές παρατηρήθηκαν και όταν μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των ανωτέρω γονιδίων (εικόνα 26). Επιπροσθέτως τα επίπεδα mRNA των δύο υποτύπων του πυρηνικού υποδοχέα LXR, LXRα και LXRβ, μετρήθηκαν επίσης σημαντικά χαμηλότερα στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ( $p < 0.05$  και  $p < 0.01$  αντίστοιχα) (διάγραμμα 11).

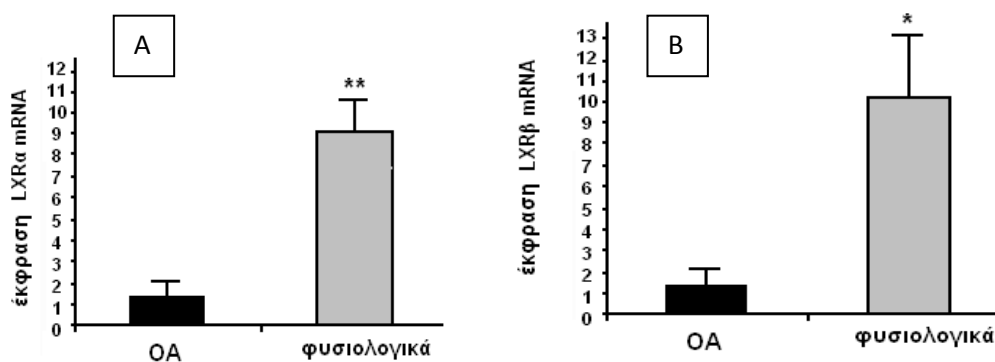




Διάγραμμα 10. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική mRNA έκφραση της ApoA1 (A) (mRNA ApoA1/mRNA PBGD) και του ABCA1 (B) (mRNA ApoA1/mRNA PBGD) σε φυσιολογικό σε οστεοαρθρικό χόνδρο. \* $p < 0.01$ , #  $p < 0.001$



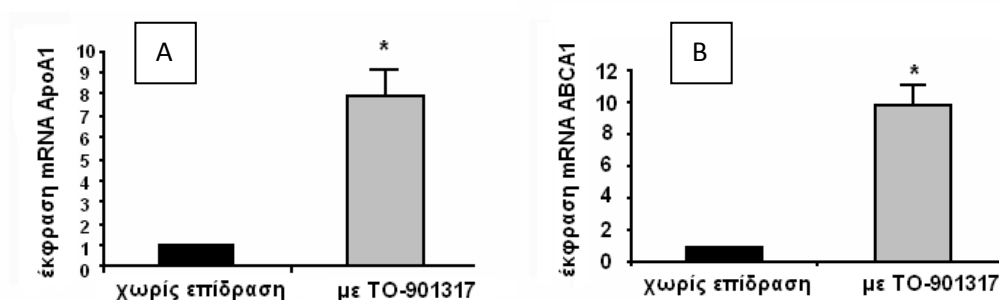
Εικόνα 26. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία που απεικονίζει την πρωτεϊνική έκφραση της ApoA1 και ABCA1 σε οστεοαρθρικά και φυσιολογικά χονδροκύτταρα με ανάλυση Western blot



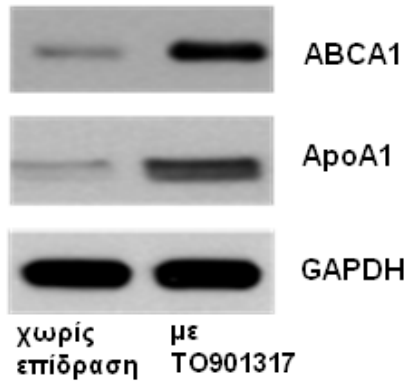
Διάγραμμα 11. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική mRNA έκφραση του LXRα (A) και του LXRβ (B) (mRNA LXRs/mRNA PBGD) σε φυσιολογικό σε οστεοαρθρικό χόνδρο. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$

### B.2.14 Επίδραση του συνθετικού αγωνιστή LXR στην έκφραση των γονιδίων ApoA1 και ABCA1 καθώς και στην έκφραση καταβολικών και αναβολικών γονιδίων

Καθώς τα γονίδια ApoA1 και ABCA1 αποτελούν τα κυριότερα γονίδια στόχους των LXR, επιδράσαμε σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO901317 και μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων. Μετά από επώαση 48 ωρών με τον LXR αγωνιστή μετρήθηκε η έκφραση mRNA των γονιδίων ApoA1 και ABCA1 και βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργούνταν απουσία του αγωνιστή. Συγκεκριμένα, η ανάλυση με PCR πραγματικού χρόνου έδειξε αύξηση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου ABCA1 κατά 10 φορές ( $p < 0.01$ ), ενώ η αύξηση των επιπέδων mRNA για το γονίδιο ApoA1 ήταν 8.2 φορές ( $p < 0.01$ ) (διάγραμμα 12). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και όταν μελετήθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των δύο γονιδίων (εικόνα 27).

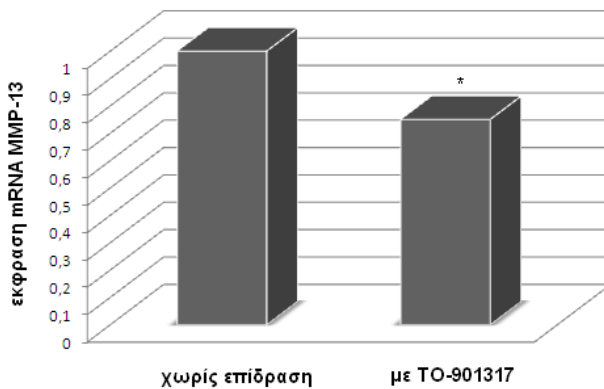


Διάγραμμα 12. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική mRNA έκφραση της ApoA1 (A) (mRNA ApoA1/mRNA PBGD) και του ABCA1 (B) (mRNA ABCA1/mRNA PBGD) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO901317 σε σύγκριση με χονδροκύτταρα στα οποία δεν έγινε επίδραση. \* $p < 0.01$

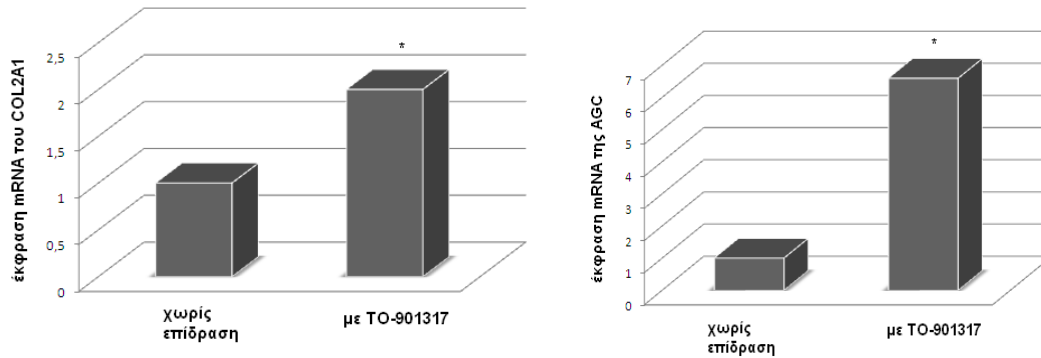


Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία που απεικονίζει την πρωτεϊνική έκφραση (ανάλυση Western blot) της ApoA1 και ABCA1 σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με και χωρίς την επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση που είχε ο συνθετικός LXR αγωνιστής TO901317 στην mRNA έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 13 (MMP-13) και στην έκφραση δύο αναβολικών γονιδίων (COL2A1 και AGC) στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε καλλιέργειες 48 ωρών. Διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης ( $p < 0.01$ ) (διάγραμμα 13), και σημαντική αύξηση κατά 2 και 6.6 φορές στην έκφραση των COL2A1 και AGC αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ) (διάγραμμα 14).



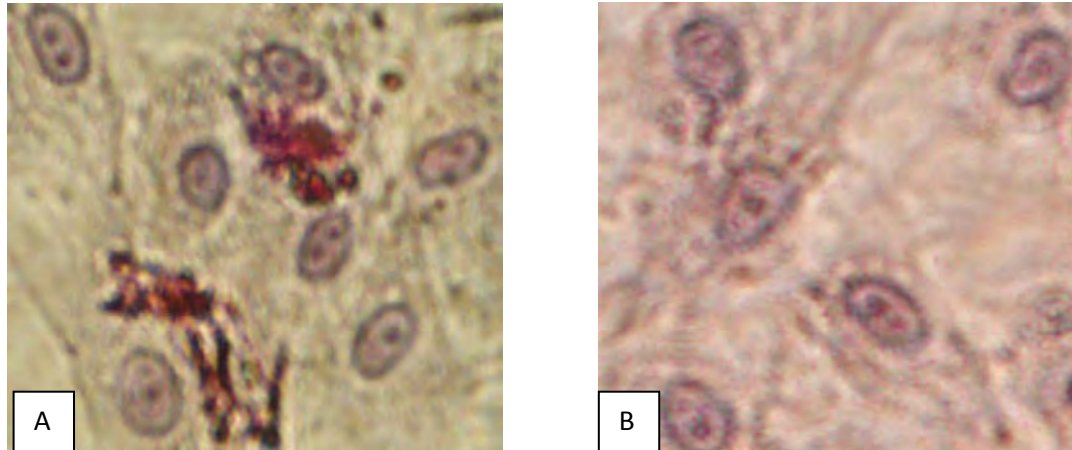
Διάγραμμα 13. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική mRNA έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 13 (mRNA MMP13/mRNA PBGD) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO901317 σε σύγκριση με χονδροκύτταρα στα οποία δεν έγινε επίδραση. \* $p < 0.01$



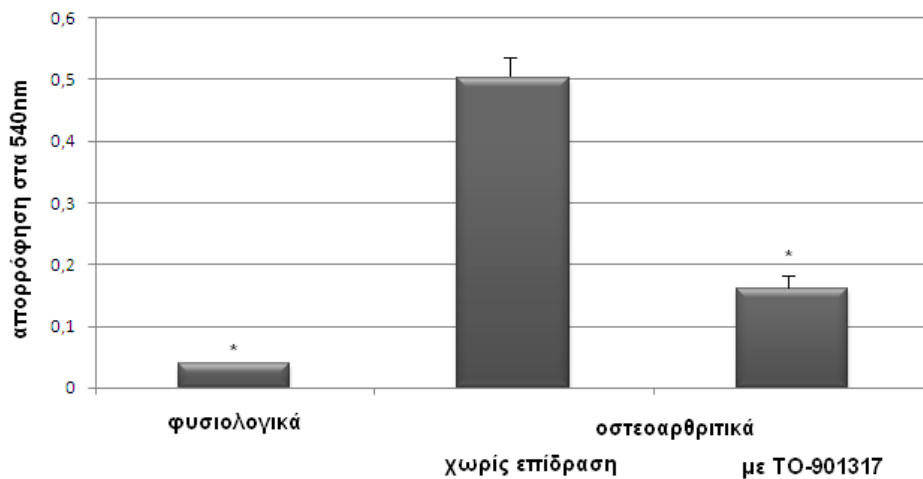
Διάγραμμα 14. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική mRNA έκφραση του COL2A1 (mRNA COL2A1/mRNA PBGD) και της αγγρεκάνης (mRNA AGC/ mRNA PBGD) σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO901317 σε σύγκριση με χονδροκύτταρα στα οποία δεν έγινε επίδραση. \* $p < 0.05$

### **B.2.15 Επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή στην ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων**

Τα ανωτέρω ευρήματα σε συνδυασμό με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας για την παρουσία του υποδοχέα της οξειδωμένης LDL, LOX1, στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, μας παρακίνησε να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο ύπαρξης ενδοκυττάριας συσσώρευσης λιπιδίων στα κύτταρα. Η χρώση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με την λιπόφιλη χρωστική Oil-red-O αποκάλυψε την παρουσία λιπιδίων εντός των κυττάρων, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε (εικόνα 28). Στη συνέχεια, η επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή TO-901317 προκάλεσε μείωση της ενδοκυττάριας συσσώρευσης λιπιδίων, η οποία ποσοτικοποιήθηκε μετά από διάλυση της χρωστικής με αιθανόλη και φωτομέτρηση, και αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ) (διάγραμμα 15).



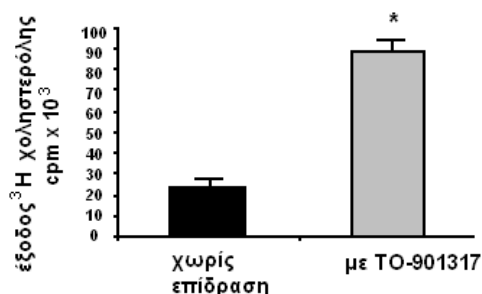
Εικόνα 28. Χονδροκύτταρα τα οποία έχουν σταθεροποιηθεί και βαφεί με χρωστική Oil-red-O για την ανίχνευση εναποθέσεων λιπιδίων εντός των κυττάρων. Τα λιπίδια φαίνονται κόκκινα και οι πυρήνες των κυττάρων μπλε. Μεγέθυνση 40x. Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παρουσιάζουν συσσώρευση λιπιδίων (Α), σε αντίθεση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Μετά από επίδραση σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών κυττάρων με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO-901317 δεν παρατηρούνται λιπίδια εντός των χονδροκυττάρων (Β).



Διάγραμμα 15. Η πυκνότητα του λιπιδιακού περιεχομένου μετρήθηκε μετά από διάλυση της χρωστικής Oil-red-O με αιθανόλη και φωτομέτρηση στα 540nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $p < 0.05$ .

## B.2.16 Επίδραση του LXR αγωνιστή στην έξοδο της χοληστερόλης από τα χονδροκύτταρα

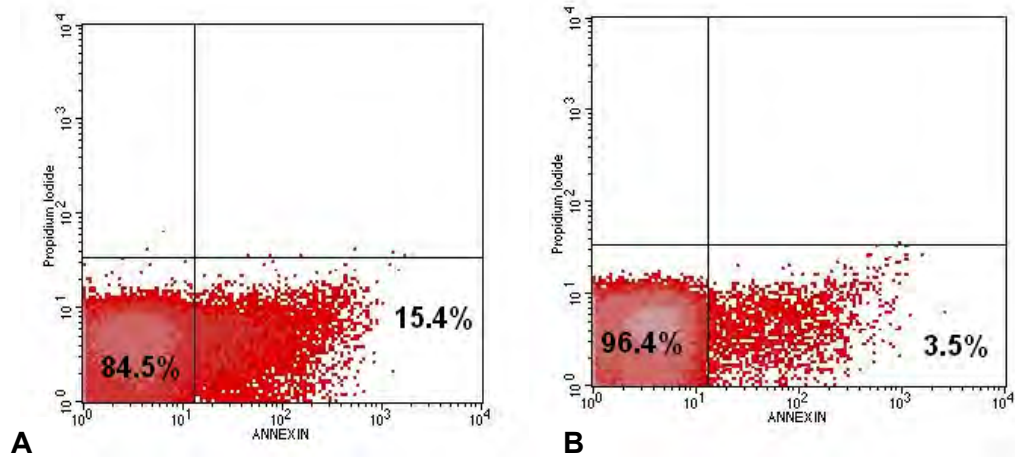
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω την επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή TO-901317 στην διαδικασία εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα, έγινε 24ωρη επώαση των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με ραδιοσημασμένη χοληστερόλη ( $[1,2(n)-^3\text{H}]$ ) και στη συνέχεια επίδραση με τον LXR αγωνιστή και μέτρηση της ραδιοσημασμένης χοληστερόλης που εξήλθε από τα κύτταρα. Παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση (3.8 φορές) στα κύτταρα στα οποία έγινε η επίδραση με τον LXR αγωνιστή σε σύγκριση με εκείνα που επώαστηκαν απουσία του ( $p < 0.05$ ) (διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16.  $5 \times 10^5$  οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα τοποθετήθηκαν και σημάνθηκαν με  $1 \mu\text{Ci/ml}$   $[1,2(n)-^3\text{H}]$  χοληστερόλη και παρέμειναν ολονύκτια χωρίς την παρουσία ορού, ξεπλύθηκαν και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με  $1 \mu\text{M}$  TO-901317 (συνθετικός LXR αγωνιστής). Το υλικό συλλέχθηκε μετά από 48 ώρες και μετρήθηκε η ραδιενέργειά του. Διαπιστώθηκε αύξηση κατά 3.8 φορές της χοληστερόλης που εξέρχεται από τα χονδροκύτταρα τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση του TO-901317.

## B.2.17 Επίδραση του LXR αγωνιστή στην απόπτωση των χονδροκυττάρων

Για την πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την επίδραση του συνθετικού LXR αγωνιστή στον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων, έγινε μελέτη της απόπτωσής τους με κυτταρομετρία ροής μετά από επίδραση 48 ωρών σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των αποπτωτικών χονδροκυττάρων ( $p < 0.005$ ).



Εικόνα 29. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το κυτταρόμετρο ροής δείγματος οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων χωρίς (A) και μετά (B) από επίδραση επί 48 ώρες του συνθετικού αγωνιστή TO-901317. Στο κάτω δεξί τετράγωνο βρίσκονται τα αποπτωτικά κύτταρα, ενώ στο κάτω αριστερό τετράγωνο βρίσκονται τα ζωντανά κύτταρα. Στα επάνω τετράγωνα υπάρχουν νεκρωτικά κύτταρα (λιγότερο από 0.1%) και στους δύο πληθυσμούς. Τα ποσοστά που αναγράφονται μέσα στα τετράγωνα δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων εντός αυτών. Τουλάχιστον 10.000 γεγονότα συλλέχθηκαν για κάθε δείγμα. Σε όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν η χρώση με annexin ήταν μικρότερη στα κύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση του TO-901317.

### B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων, με σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Σε πολλές περιπτώσεις, στοιχεία υποστηρίζουν ότι πρόκειται για γενικευμένη διαταραχή με συμμετρική πολυαρθρική εντόπιση πιο εμφανή στις αρθρώσεις των χεριών [266, 267]. Πρόκειται για μία ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες να οδηγούν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα στράφηκε στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν έναν αριθμό γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στην ΟΑ, μεταξύ των οποίων περισσότερο μελετημένα είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Ωστόσο, αυξανόμενες κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις ενίσχυσαν την θεώρηση της οστεοαρθρίτιδας ως μια μεταβολική νόσο στην παθογένεια της οποίας σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Ως εκ τούτου είναι επόμενο τα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και ιδιαίτερα στις διαταραχές του να αποτελούν σημαντικό ερευνητικό στόχο στην διαλεύκανση του πολύπλοκου αυτού νοσήματος.

Επιδημιολογικές παρατηρήσεις έχουν συνδέσει την ΟΑ με την αθηρωμάτωση [143]. Ο παραλληλισμός των δύο παθήσεων δεν βασίζεται μόνο στο ότι πρόκειται για νοσήματα των οποίων ο επιπολασμός αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, καθώς και στο ότι θεωρούνται μια κατάσταση χρόνιας, ήπιας φλεγμονής, αλλά φαίνεται να έχουν και κοινή μοριακή βάση. Η ΟΑ και η αθηρωμάτωση είναι χρόνιες, εκφυλιστικές παθήσεις με μεγάλη επίπτωση στις ανεπτυγμένες κοινωνίες. Αρχικά διαδράμουν σιωπηρά, όταν όμως τα κλινικά συμπτώματα και οι επιπλοκές τους γίνουν εμφανή συνοδεύονται από μεγάλο οικονομικό κόστος. Η κλινική συσχέτιση της ΟΑ με την αθηρωμάτωση αυξάνει με την πάροδο των ετών, ως συνιστώσα της γήρανσης του πληθυσμού. Φαίνεται ότι εκτός από την κλινική τους συσχέτιση, τα δύο νοσήματα συνδέονται και με κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς που έχουν μεγάλη σπουδαιότητα καθώς προσφέρουν νέους τρόπους θέασης των νοσημάτων με τη μοναδική προοπτική για ανάπτυξη διπλά στοχευμένων θεραπειών που θα μπορούσαν να μειώσουν την επίπτωση των νόσων στην ποιότητα της ζωής των ασθενών.

Μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι άτομα με ΟΑ διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο θνητότητας από ότι ο γενικός πληθυσμός [145-148]. Πέρα από τις άμεσες συνέπειες της επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής καθώς και τις καλά τεκμηριωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ), η



ΟΑ συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας. Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την άποψη πως οι ασθενείς με ΟΑ βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο από το γενικό πληθυσμό για διάφορες συν-νοσηρές καταστάσεις, και ειδικότερα για καρδιαγγειακά νοσήματα. Μελέτες σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) σε πληθυσμούς με ΟΑ έδειξαν αυξημένο προφίλ κινδύνου για ΣΝ σε σύγκριση με τον πληθυσμό χωρίς ΟΑ [147, 149].

Υπάρχουν αρκετές εξηγήσεις για τις ανωτέρω συσχετίσεις, με τη μειωμένη άσκηση και την παχυσαρκία να αποτελούν τις πιο εμφανείς, ενώ το κοινό γενετικό υπόβαθρο, η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων καθώς και η μικροαγγειακή αθηρωμάτωση έχουν επίσης προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη της ΟΑ [151]. Οι ασθενείς με ΟΑ εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό αρκετούς από τους επιβεβαιωμένους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου όπως η ηλικία, η παχυσαρκία, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και η δυσλιπιδαιμία [152]. Ταυτόχρονη παρουσία παχυσαρκίας, διαβήτη και υπέρτασης, συγκρινόμενη με πληθυσμό ατόμων που δεν είχε κανένα από τα τρία χαρακτηριστικά, οδήγησε σε αυξημένη επίπτωση ΟΑ χεριών στη μελέτη Rotterdam [153]. Μία πρόσφατη ανάλυση δεδομένων από την National Health and Nutrition Examination Survey III που έγινε σε πάνω από 7000 Αμερικανούς άνω των 18 ετών συνέκρινε την επίπτωση της ΟΑ και των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου που ορίζουν το μεταβολικό σύνδρομο (κοιλιακή παχυσαρκία, υπερτριγλυκεριδαιμία, μειωμένη HDL, υπέρταση και υπεργλυκαιμία) [154].

Η συσχέτιση της υπερχοληστερολαιμίας με την ΟΑ χεριών έχει αναφερθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες σε πληθυσμιακές μελέτες [160-163]. Στη μελέτη Chingford, η υπερχοληστερολαιμία συσχετίστηκε με την ΟΑ γόνατος σε γυναίκες ανεξάρτητα από την παχυσαρκία και η συσχέτιση αυτή ήταν ισχυρότερη για την αμφοτερόπλευρη ΟΑ [17]. Πρόσφατα, η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίστηκε ως μέρος του μεταβολικού συνδρόμου, αποκτώντας έτσι νέα προοπτική στη μελέτη της νόσου και στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών [168].

Η παχυσαρκία αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της ΟΑ [41, 42, 169] καθώς και έναν καλά τεκμηριωμένο παράγοντα για την καρδιαγγειακή νόσο και την αθηρωμάτωση [170, 171]. Ένας αριθμός προοπτικών μελετών έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας, και της ακτινολογικά επιβεβαιωμένης ΟΑ γόνατος [169, 172-176]. Αρκετές μελέτες υποστήριξαν τους μηχανικούς παράγοντες ως κύριους μεσολαβητές αυτής της σχέσης, πιθανότατα μέσω αναδιανομής του αυξημένου σωματικού φορτίου στις υποβαστάζουσες το βάρος του σώματος αρθρώσεις [178]. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας και της ΟΑ στις μη-υποβαστάζουσες το βάρος αρθρώσεις,

όπως αυτές των χεριών, ενισχύει την άποψη ύπαρξης ενός μεταβολικού μηχανισμού [35, 42,180, 181].

Η παχυσαρκία σχετίζεται με διαταραγμένο μεταβολισμό λιπιδίων και με την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων, των αντιποκινών – των ορμονικών δηλαδή μορίων που κατά κύριο λόγο παράγονται από το λιπώδη ιστό – και πρωτίστως της λεπτίνης, τα οποία προκαλούν ένα καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση κυτοκινών και άλλων μορίων με τελικό αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την αθηρωμάτωση [189, 268]. Πέρα όμως από το ρόλο τους στην παχυσαρκία, τα μεταβολικά νοσήματα και την αθηρωμάτωση, πρόσφατα ο ρόλος της λεπτίνης αλλά και άλλων αντιποκινών άρχισε να μελετάται και στην ΟΑ [191].

Η λεπτίνη είναι μια πρωτεΐνη που κύρια παράγεται από το λιπώδη ιστό και ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας, ενέχεται όμως και σε άλλες διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η ρύθμιση του ανοσιακού συστήματος, η φλεγμονή και η αθηρωμάτωση [197, 198, 268].

Η λεπτίνη φαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός τοπικός και συστηματικός παράγοντας που επηρεάζει την ομοιοστασία τόσο του οστού όσο και του χόνδρου. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η τοπικά παραγόμενη λεπτίνη έχει σημαντικότερη δράση στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού συγκριτικά με την κυκλοφορούσα λεπτίνη. Η ανίχνευση των υποδοχέων της λεπτίνης σε οστεοβλάστες ανθρώπου, υποστηρίζει την άποψη ότι ο επαγόμενος από την λεπτίνη πολλαπλασιασμός των οστεοβλαστών, η σύνθεση κολλαγόνου και η κυτταρική σηματοδότηση που ξεκινά από τη λεπτίνη, συμμετέχουν στο μηχανισμό που επάγει τη φλεγμονή στην άρθρωση [220, 269, 270].

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η λεπτίνη έχει τοπική ή συστηματική δράση στον αρθρικό χόνδρο, πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της σε δείγματα ορού και αρθρικού υγρού του ίδιου ασθενή και παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση λεπτίνης στα δείγματα του αρθρικού υγρού. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την τοπική παραγωγή λεπτίνης στον αρθρικό χόνδρο, και όχι την απλή διάχυση στο αρθρικό υγρό μέσω του αρθρικού υμένα. Άνιση κατανομή λεπτίνης μεταξύ του ορού και αρθρικού υγρού έχει παρατηρηθεί πρόσφατα και σε άλλες μελέτες σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα [228]. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης στο αρθρικό υγρό συσχετίζονται με την ακτινολογική σοβαρότητα της ΟΑ [271].

Η υπόθεση για την τοπική παραγωγή της λεπτίνης ενισχύεται από την ικανότητα των χονδροκυττάρων να εκφράζουν λεπτίνη σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε για πρώτη φορά, η έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της Ob-Rb και Ob-Ra στην οστεοαρθρίτιδα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA της λεπτίνης

και των υποδοχέων της με τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. Ακολούθως προσδιορίστηκε ποσοτικά και η πρωτεϊνική τους έκφραση. Σημειώνεται ότι προκειμένου να εξεταστεί η ενδαρθρική διακύμανση της έκφρασης των mRNA της λεπτίνης και των υποδοχέων της ελήφθησαν δύο διακριτά δείγματα αρθρικού χόνδρου από τον κάθε ασθενή. Το ένα προέρχονταν από την περιοχή με την προχωρημένου βαθμού αλλοίωση, ενώ το δεύτερο από μία παρακείμενη περιοχή, η οποία ήταν μακροσκοπικά και ιστολογικά ανέπαφη. Η προσέγγιση αυτή δίνει το πλεονέκτημα του ελέγχου πάνω σε διάφορες μεταβλητές που περιλαμβάνουν την ηλικία, το γενετικό υπόβαθρο, τις διαφορές λόγω κλινικού χειρισμού και την επιλογή του δείγματος. Ουσιαστικά, όλες οι βασικές συγκρίσεις γίνονται μεταξύ δειγμάτων αρθρικού χόνδρου από τον ίδιο ασθενή. Παρόλα αυτά, είναι λάθος να υποθέσουμε ότι η περιοχή που είναι μακροσκοπικά και ιστολογικά άθικτη είναι συγκρίσιμη με μία εντελώς φυσιολογική καθώς δεν παύει να προέρχεται από μία οστεοαρθρική άρθρωση. Για το λόγο αυτό στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και φυσιολογικά δείγματα. Η μελέτη αποκάλυψε ότι το mRNA της λεπτίνης και του Ob-Rb είναι ιδιαίτερα αυξημένο στον οστεοαρθρικό χόνδρο συγκριτικά με το φυσιολογικό, και ιδιαίτερα αυξημένο παρουσιάζεται στο χόνδρο με προχωρημένη ΟΑ συγκριτικά με το χόνδρο με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις. Παρόλο που η mRNA έκφραση της λεπτίνης στο φυσιολογικό και στον ήπια διαταραγμένο οστεοαρθρικό χόνδρο είναι χαμηλή, είναι ικανή για την παραγωγή της πρωτεΐνης. Η διαφοροποιημένη ενδαρθρική έκφραση της λεπτίνης και του Ob-Rb, μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα λεπτίνης που φθάνουν στα χονδροκύτταρα από το αρθρικό υγρό. Το ποσοστό της λεπτίνης που θα φθάσει στα χονδροκύτταρα εξαρτάται από τον βαθμό της διαταραχής του χόνδρου, τη διάσπαση ή την καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας που ασκεί περαιτέρω επαγωγική δράση στην παραγωγή της λεπτίνης από τα χονδροκύτταρα.

Η έκφραση του υποδοχέα Ob-Ra βρέθηκε να είναι παρόμοια μεταξύ του φυσιολογικού και του οστεοαρθρικού χόνδρου, κάτι που είναι σύμφωνο με την μειωμένη σηματοδοτική ικανότητα του υποδοχέα αυτού. Καθώς ο υποδοχέας Ob-Ra ενέχεται στην ενδοκύτωση και διάσπαση της λεπτίνης, η έλλειψη διαφοροποιημένης έκφρασης μεταξύ του φυσιολογικού και οστεοαρθρικού χόνδρου υποδηλώνει ότι είναι απίθανο ο υποδοχέας αυτός να σχετίζεται ή να επηρεάζει την κάθαρση της λεπτίνης.

Συνολικά, θα μπορούσε να προταθεί ότι η έκφραση της λεπτίνης και του Ob-Rb επάγονται στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα για την ανίχνευση της λεπτίνης και/ή του Ob-Rb περιλαμβάνουν μόνο μεθόδους ανοσοαποτύπωσης σε ανθρώπινο οστεοαρθρικό χόνδρο [223, 272]. Οι

Figenschau και συν. σε καλλιέργειες ενήλικων ανθρώπινων χονδροκυττάρων αποτύπωσαν την έκφραση της λειτουργικής ισομορφής του υποδοχέα της λεπτίνης, Ob-Rb. Επιπλέον σε κύτταρα που επέδρασαν με ανασυνδυασμένη λεπτίνη, παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση των STAT-1 και STAT-5, το οποίο αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη για την άμεση, τοπική δράση της λεπτίνης στα κύτταρα αυτά [227].

Όσον αφορά στη δράση της λεπτίνης στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του υποδοχέα Ob-Rb, αυτό ποσοτικοποιήθηκε σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία και απουσία λεπτίνης. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν σημαντική μείωση στο mRNA του Ob-Rb σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα μετά από επίδραση υψηλής συγκέντρωσης λεπτίνης, υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του υποδοχέα της. Η υπερλεπτιναιμία που παρατηρείται στην παχυσαρκία θεωρείται ότι προκαλεί ανασταλτική ρύθμιση στο σηματοδοτικό μονοπάτι και τελικά στο επίπεδο των υποδοχέων. Παρόμοια ανασταλτική δράση της λεπτίνης στους υποδοχείς της έχει αναφερθεί και σε άλλα περιφερικά κύτταρα όπως στα ηπατοκύτταρα [273].

Μετά από την επιβεβαίωση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στο χόνδρο, ερευνήσαμε την επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην απόπτωση σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Σε βραχείας διάρκειας καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων έχει καταδειχθεί μια διεγερτική επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [227]. Η μελέτη μας έδειξε ότι ενώ η λεπτίνη ενίσχυσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις βραχείας διάρκειας καλλιέργειες των φυσιολογικών χονδροκυττάρων, εντούτοις, στις μακράς διάρκειας καλλιέργειες αυτή η διεγερτική επίδραση χάθηκε. Όταν τα χονδροκύτταρα επωάστηκαν με αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε ενώ καμία αύξηση δεν παρατηρήθηκε στο ποσοστό της απόπτωσής τους έναντι των κυττάρων τα οποία δεν δέχθηκαν την επίδραση της λεπτίνης, δείχνοντας μια μακροπρόθεσμη καταστροφική επίδραση της λεπτίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων αλλά όχι στην απόπτωση. Έχει προταθεί ότι ο άξονας λεπτίνης – υποδοχέα είναι σημαντικός για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλούς ακόμη ιστούς [274-278].

Η λεπτίνη έχει συν θεί με την παχυσαρκία, η οποία αποτελεί κ όιο προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της λεπτίνης και του δείκτη μάζας σώματος των ασθενών με ΟΑ. Παρατηρήθηκε ότι στους παχύσαρκους ασθενείς η έκφραση της λεπτίνης είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους φυσιολογικού βάρους ασθενείς. Επίσης παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του mRNA της λεπτίνης και του BMI των ασθενών. Στον αρθρικό χόνδρο

με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις δεν παρατηρήθηκε καμία τέτοια συσχέτιση, υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση της λεπτίνης στον σοβαρά διαταραγμένο χόνδρο είναι πιθανόν αποτέλεσμα αυξημένου μηχανικού φορτίου. Σε κυτταρικό επίπεδο το αυξημένο φορτίο μπορεί να αλλάξει το φαινότυπο των χονδροκυττάρων. Παρόλα αυτά, οι μηχανικοί παράγοντες από μόνοι τους δεν αρκούν για να εξηγήσουν την σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και οστεοαρθρίτιδας. Φαίνεται ότι η συσχέτιση της παχυσαρκίας με την ΟΑ είναι σύνθετη και ενέχει τόσο μηχανικούς όσο και μεταβολικούς παράγοντες [178].

Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της λεπτίνης στο μεταβολισμό του αρθρικού χόνδρου, μελετήθηκε η δράση της λεπτίνης στην παραγωγή IL-1β και NO. Μετά από 7 ημέρες επίδρασης με λεπτίνη παρατηρήθηκε επαγωγή της παραγωγής IL-1β, γεγονός που υποστηρίζει μια άμεση προ-φλεγμονώδη δράση της λεπτίνης στα χονδροκύτταρα. Ο προ-φλεγμονώδης ρόλος της λεπτίνης υποστηρίχθηκε και σε μία προηγούμενη μελέτη κατά την οποία η λεπτίνη βρέθηκε να ρυθμίζει τις ανοσιακές αποκρίσεις σε επαγόμενη από αντιγόνο αρθρίτιδα [220]. Επίσης, έχειδειχθεί ότι η λεπτίνη αυξάνει σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής, ενώ είναι πλέον καθολικά αποδεκτή η γνώση ότι στην παχυσαρκία παρατηρούνται αυξημένες τιμές λεπτίνης και άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών [220, 221]. Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι η λεπτίνη δεν είχε άμεση επίδραση στα επίπεδα NO. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν προς την κατεύθυνση μιας συνεργικής δράσης της λεπτίνης με την IFN-γ και την IL-1β στην συνθετάση του NO [218, 219].

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της λεπτίνης στον μεταβολισμό του χόνδρου μελετήθηκε η επίδρασή της στην έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-9 και MMP-13. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες που επιλέχθηκαν αποτελούν κύρια ένζυμα που μεσολαβούν την αποδόμηση του χόνδρου και η αυξημένη τους έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο έχει προ ετών αναφερθεί [279-282]. Διαπιστώσαμε ότι η λεπτίνη προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην έκφραση και των δύο μεταλλοπρωτεϊνών στα φυσιολογικά και στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, τονίζοντας έτσι ότι η λεπτίνη παίζει και καταβολικό ρόλο στο μεταβολισμό του χόνδρου. Πειράματα *in vivo* με ενδοαρθρική έγχυση ανασυνδυασμένης λεπτίνης στα γόνατα αρουραίων έδειξαν σημαντική αύξηση της έκφρασης των MMP2, MMP9 καθώς και των ADAMT-4 and -5 και παράλληλα μείωση των πρωτεογλυκανών [283]. Σημαντική είναι και η χρήση μικρών παρεμβατικών μορίων RNA έναντι της λεπτίνης που ευθέως απενεργοποίησαν την MMP13, η οποία κατόπιν αυξήθηκε με επιγενετική επανερργοποίηση του γονιδίου της λεπτίνης [284].

Φαίνεται επομένως ότι η λεπτίνη ενέχεται στην εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας και μπορεί να αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ μηχανικών και μεταβολικών

παραγόντων που ενέχονται στην παθογένεια και εξέλιξη της νόσου. Η ανίχνευση της έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης της λεπτίνης καθώς και του υποδοχέα της Ob-Rb σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα υποδηλώνει ότι αυτή η ορμόνη επιδρά άμεσα στο μεταβολισμό του αρθρικού χόνδρου και πιθανόν σχετίζεται με το βαθμό καταστροφής του. Από τη μελέτη μας μπορεί να υποστηριχθεί ότι στην οστεοαρθρίτιδα υπάρχει ένα μικροπεριβάλλον στον αρθρικό χόνδρο που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, η οποία επάγει την παραγωγή IL-1 $\beta$ , MMP-9 και MMP-13, ενισχύοντας το σενάριο που θέλει τη λεπτίνη να παίζει ρόλο ως προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη με καταβολική δράση στο μεταβολισμό του χόνδρου.

Η εμπλοκή όμως των λιπιδίων στην ΟΑ δεν περιορίζεται στη συμμετοχή του λιπώδους ιστού. Η εναπόθεση λιπιδίων παρατηρείται πρώιμα στην ΟΑ, πριν την εμφάνιση ιστολογικών αλλαγών, καταδεικνύοντας την εμπλοκή των λιπιδίων στην παθογένεια της νόσου. Από την δεκαετία του '60 είχε δειχθεί ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια της επιφανειακής στιβάδας του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας [155, 156]. Η εναπόθεση λιπιδίων, η οποία παρατηρείται αρκετά νωρίς στην εξέλιξη της ΟΑ, πριν από την εμφάνιση των χαρακτηριστικών ιστολογικών αλλοιώσεων της νόσου, θεωρείται ότι αντανάκλα την εμπλοκή των λιπιδίων στην παθογένεια της ΟΑ [155]. Έχει προταθεί ότι η διάχυση των λιπιδίων από το αρθρικό υγρό αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας, ενώ έχει δειχθεί ότι αποτελεί και χαρακτηριστικό φαινόμενο της ΟΑ σε βαθμό που εξαρτάται από τη βαρύτητα της νόσου [155, 156]. Οι εξαρτώμενες από την ηλικία αλλαγές στη λιπιδιακή σύνθεση του αρθρικού χόνδρου θα μπορούσαν να ωθήσουν τη φυσιολογικά παρούσα διαδικασία οξειδωσης των λιπιδίων σε ένα στάδιο μη ελεγχόμενου οξειδωτικού στρες που με τη σειρά του θα οδηγούσε σε οξειδωση των κολλαγόνων ινών και διάσπασή τους, γεγονός που θα άλλαζε τις μηχανικές ιδιότητες των ινών κολλαγόνου κάνοντας τες πιο εύθραυστες και επιρρεπείς στη μηχανική καταπόνηση, ξεκινώντας έτσι τον φαύλο κύκλο της ΟΑ [193].

Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (ox-LDL), η οποία είναι γνωστό ότι συσσωρεύεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, είναι ένα μόριο με πολλές βιολογικές ιδιότητες, προκαλεί συσσώρευση λιπιδίων, προάγει προ-φλεγμονώδεις αλλαγές και επίσης συμμετέχει στη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα [285]. Η ox-LDL έχει ανιχνευθεί στο αρθρικό υγρό και τον αρθρικό υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και πρόσφατα παρουσιάστηκε η συνεργική της δράση με μηχανικά φορτία στη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων και στη σύνθεση των πρωτεογλυκανών [236-238]. Στη μελέτη μας ανιχνεύσαμε την ox-LDL στο αρθρικό

υγρό των ασθενών με OA και βρήκαμε ότι τα επίπεδά της συσχετίζονται σημαντικά με το BMI των ασθενών. Είναι πιθανό το υπερβολικό βάρος, ως παράγοντας αυξημένου μηχανικού στρες, να μπορεί να εξηγήσει το συσχετισμό μεταξύ των επιπέδων ox-LDL και BMI των ασθενών. Σε μια άλλη μελέτη που έγινε την ίδια χρονική περίοδο συσχετίστηκε η ποσότητα της ox-LDL η οποία μετρήθηκε με ειδική ανοσοαντίδραση με το ιστολογικό στάδιο της OA [245].

Η επίδραση σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων με οξειδωμένη LDL χοληστερόλη οδήγησαν σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι η ox-LDL προήγαγε την απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων αρουραίου [242]. Επίσης, η ox-LDL συνεργικά με φορτία κυκλικής τάνυσης σε καλλιέργειες ανθρώπινων και βόειων χονδροκυττάρων οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, καθώς και της σύνθεσης των πρωτεογλυκανών, γεγονός που είχε σημαντική επίπτωση στην πρόοδο της αποδόμησης του χόνδρου [238, 245]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τόνισαν την κυτταροτοξική δράση της ox-LDL στα ανθρώπινα χονδροκύτταρα η οποία θεωρήθηκε ότι είναι δοσοεξαρτώμενη ανάλογα με τη συγκέντρωση της ουσίας στο καλλιεργητικό υλικό.

Ο υποδοχέας της οξειδωμένης LDL, LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor 1, πρωταρχικά αναγνωρίστηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συσχετίστηκε με την παθογένεια της αθηρωμάτωσης [239]. Η έκφραση του υποδοχέα LOX-1 και η συσσώρευση της ox-LDL έχει μελετηθεί σε αρθρώσεις πειραματοζώων [241-243]. Η έκφραση του υποδοχέα LOX-1 έχει ανιχνευθεί στον ανθρώπινο αρθρικό χόνδρο σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [244], ενώ αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν ανακοινωθεί για την έκφρασή του στην OA και μάλιστα από την ίδια ερευνητική ομάδα [244, 245]. Οι Kakimoto και συν. δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τον υποδοχέα στον οστεοαρθρικό χόνδρο, ενώ οι Akagi και συν. ανίχνευσαν τον υποδοχέα LOX-1 τόσο στον οστεοαρθρικό όσο και στο φυσιολογικό χόνδρο [244, 245]. Οι διαφορές μεταξύ των δύο μελετών αποδίδονται στις διαφορές λόγω του σημείου δειγματοληψίας του χόνδρου (στην πρώτη μελέτη χρησιμοποιήθηκε χόνδρος από περιοχές που δεν υπόκεινταν σε μηχανική φόρτιση, ενώ στη δεύτερη μελέτη ο αρθρικός χόνδρος προέρχονταν από περιοχές με τη μέγιστη μηχανική καταπόνηση), καθώς και στα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί το σημείο αυτό για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χόνδρου τόσο από περιοχές που δέχονταν μεγάλη μηχανική φόρτιση όσο και από παρακείμενες περιοχές που δεν δέχονταν μηχανική φόρτιση, από τον ίδιο πάντα ασθενή, κάνοντας και ιστολογική μελέτη των δειγμάτων αυτών. Καθώς οι προηγούμενες μελέτες παρείχαν αντικρουόμενα

αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση του υποδοχέα LOX-1 στο φυσιολογικό χόνδρο, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η εναπόθεση λιπιδίων παρατηρείται πολύ πρώιμα στην ΟΑ, πριν από την εμφάνιση ιστολογικών αλλοιώσεων, έγινε πολύ προσεκτική επιλογή του πληθυσμού από τον οποίο προήλθαν τα δείγματα φυσιολογικού χόνδρου. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο νέοι υγιείς ενήλικες (μέση ηλικία  $36.6 \pm 12.6$  έτη) σε αντιδιαστολή με την παλαιότερη μελέτη όπου τα φυσιολογικά δείγματα είχαν ληφθεί από πληθυσμό με μέση ηλικία τα  $80.3 \pm 10.3$  έτη [245]. Επίσης καθώς η έκφραση του υποδοχέα LOX-1 αυξάνεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η αθηρωμάτωση, χρησιμοποιήθηκε ένας πληθυσμός ενηλίκων υγιών ανθρώπων που δεν εμφάνιζαν κανέναν από τους προαναφερθέντες παράγοντες συνοσηρότητας, σε αντίθεση με την προηγούμενη σχετική μελέτη [245]. Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παρουσίαζαν έκφραση mRNA και πρωτεΐνης του υποδοχέα LOX-1 ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση στο φυσιολογικό χόνδρο. Είναι πιθανό ότι το μηχανικό στρες προάγει την έκφραση του υποδοχέα LOX-1 στα χονδροκύτταρα των περιοχών που υπόκεινται σε μεγάλη μηχανική φόρτιση. Έχει άλλωστε δειχθεί ότι η έκφραση του LOX-1 ενισχύεται από το οξειδωτικό στρες, από φλεγμονώδεις μεσολαβητές, από μηχανική καταπόνηση καθώς και από τον συνδέτη του, την οξειδωμένη LDL [239, 286, 287]. Η αποδομημένη θεμέλια ουσία του οστεοαρθρικού χόνδρου μπορεί να προσφέρει ευκολότερη πρόσβαση στην οξειδωμένη LDL, που όπως ήδη αναφέρθηκε ανιχνεύθηκε στο αρθρικό υγρό, και επομένως πιο ευχερή πρόσδεση στον υποδοχέα LOX-1 στα χονδροκύτταρα. Η σύνδεση αυτή θα μπορούσε να προκαλέσει περαιτέρω οξείδωση της LDL σε ox-LDL τοπικά στον περιβάλλοντα χώρο των χονδροκυττάρων, που ακολούθως θα προκαλούσε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 και περαιτέρω παραγωγή ριζών οξυγόνου και οξειδωτικού στρες [243]. Αυτός ο φαύλος κύκλος της οξείδωσης θα μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση έκφρασης LOX-1 ακόμη και σε περιοχές που δε δέχονται μεγάλη μηχανική φόρτιση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση ενός καθημερινά χρησιμοποιούμενου αντιοξειδωτικού, του ασκορβικού οξέος, στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, με βάση το συλλογισμό ότι καθώς η οξείδωση των λιπιδίων φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη ΟΑ τότε η χρήση ενός αντιοξειδωτικού μπορεί να την αναστείλει. Το ασκορβικό οξύ έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, καθώς είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου II, και η απουσία του σχετίζεται με μειωμένη μηχανική προσαρμοστικότητα των ινών κολλαγόνου [288, 289]. Επίσης μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν την προστατευτική δράση της χορήγησης ασκορβικού οξέος στην οστεοαρθρίτιδα [290, 291], ενώ σε πληθυσμό της



μελέτης Framingham βρέθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων, και ειδικά βιταμίνης C, μειώνει τον κίνδυνο απώλειας αρθρικού χόνδρου και εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς με ΟΑ [292]. Η προσθήκη ασκορβικού οξέος σε καλλιέργειες ανθρώπινων οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα LOX-1 και σε αύξηση της βιωσιμότητας των χονδροκυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνάρτηση με τις προηγούμενες μελέτες δείχνει ότι η προστατευτική δράση του ασκορβικού οξέος στη ΟΑ μπορεί να οφείλεται στην διακοπή του φαύλου κύκλου που δημιουργείται από τη σύνδεση της LOX-1 με την ox-LDL, η οποία έχει ήδη περιγραφεί, και η οποία σχετίζεται και με αυξημένη κυτταροτοξικότητα.

Η ανίχνευση της οξειδωμένης LDL στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ και του υποδοχέα της LOX-1 στον οστεοαρθρικό χόνδρο προσέθεσε τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα στον κατάλογο των κυττάρων που δυνητικά μπορεί να εμφανίσουν ενδοκυττάρια συσσώρευση χοληστερόλης, καθώς αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβεί μόνο σε κύτταρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προσλάβουν τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες μέσω υποδοχέων σάρωθρων [246]. Καθώς η υπερβολική συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης είναι τοξική για τα κύτταρα, υπάρχουν μηχανισμοί εξόδου της που μεσολαβούνται από τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες LXR [233, 234, 293] και την πρωτεΐνη ABCA1 [294], η οποία λειτουργεί ως αντλία λιπιδίων που μεταφέρει την χοληστερόλη στην απολιποπρωτεΐνη A1, η οποία με τη σειρά της αποτελεί το βασικό συστατικό της HDL χοληστερόλης [247].

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα έδειξε ότι η έκφραση της ABCA1 και της ApoA1 ήταν σημαντικά μειωμένα στον οστεοαρθρικό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό χόνδρο. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη των Gentili και συν. που μελέτησαν την έκφραση αυτών των γονιδίων σε χονδροκύτταρα εμβρύων όρνιθας και διαπίστωσαν μείωση των επιπέδων έκφρασής τους στα κύτταρα που βρίσκονταν στο στάδιο της υπερτροφίας [295]. Σε πρόσφατη μελέτη τα επίπεδα της ApoA1 στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ μετρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα [296]. Σχετικά με την έκφραση των μεταγραφικών ρυθμιστών τους LXRα και LXRβ διαπιστώθηκε μειωμένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με τον φυσιολογικό. Συγχρόνως δημοσιεύτηκε και η μελέτη των Collins-Racie και συν. οι οποίοι ανακοίνωσαν μειωμένη έκφραση των LXR στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα [297].

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των LXR οδηγεί σε επαγωγή του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα, διαδικασία που ως τώρα έχει

μελετηθεί σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως τα μακροφάγα [298-300], αλλά όχι στα χονδροκύτταρα. Έγινε επίδραση σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO-901317 και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων ABCA1 και ApoA1. Καθώς η ABCA1 ρυθμίζει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα, η δράση του TO-901317 μπορεί να εμποδίζει την συσσώρευση λιπιδίων και να προάγει την έξοδο χοληστερόλης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Πράγματι, με τη χρήση ραδιοσημασμένης χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα στα οποία έγινε και επίδραση με TO-901317 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έξοδο χοληστερόλης, η οποία ήταν σύμφωνη και με την απουσία εναποθέσεων λιπιδίων που διαπιστώθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση με Oil-red-O. Η έλλειψη εναποθέσεων λιπιδίων μετά από ειδική χρώση αποτελούσε και την απόδειξη ότι οι μεταγραφικές αλλαγές στα γονίδια ABCA1 και ApoA1 αντιπροσωπεύονται και στο μεταφραστικό επίπεδο στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση του TO-901317 στην έκφραση ορισμένων καταβολικών και αναβολικών γονιδίων που θεωρούνται σημαντικά στον αρθρικό χόνδρο. Βρέθηκε ότι ο LXR αγωνιστής μείωσε σημαντικά την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών από τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, δείγμα ότι ασκεί προστατευτική δράση στον χόνδρο, και παράλληλα αύξησε την έκφραση αναβολικών γονιδίων, όπως το κολλαγόνο τύπου II και η αγγρεκάνη, επάγοντας την αναγεννητική ικανότητα του διαταραγμένου οστεοαρθρικού χόνδρου. Επιπρόσθετη στήριξη στην υπόθεση ότι η χρήση του συνθετικού LXR αγωνιστή μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη για τον αρθρικό χόνδρο προσφέρει η μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων όπου φάνηκε ότι ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά μετά από επίδραση με τον αγωνιστή TO-901317.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, θα μπορούσαμε να πούμε ότι προέκυψαν αποτελέσματα τα οποία ενθαρρύνουν την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του πολυπαραγοντικού νοσήματος. Έγινε σαφές ότι πρόκειται για ένα νόσημα που δεν αποτελεί μια αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης ούτε μια παρενέργεια της παχυσαρκίας, αλλά ότι είναι ένα νόσημα με σημαντικές μεταβολικές συνιστώσες όπου ο ρόλος των λιπιδίων είναι κρίσιμος. Παρότι πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα για το οποίο δεν μπορεί να υποστηριχθεί μια σχέση αιτίου – αποτελέσματος μεταξύ της παθογένειας της ΟΑ και της διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων, παρουσιάζει ωστόσο ιδιαίτερη κλινική σπουδαιότητα το γεγονός ότι η διάγνωση της ΟΑ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως σήμα κινδύνου για την εκτίμηση του λιπιδαιμικού προφίλ και του καρδιαγγειακού κινδύνου, ειδικά σε νέους ασθενείς. Η ύπαρξη ενός ασυμπτωματικού νοσήματος που θα μπορούσε να αποτελεί προειδοποίηση για μία ασυμπτωματική αλλά συγχρόνως θανατηφόρα

κατάσταση του καρδιαγγειακού συστήματος δεν μπορεί παρά να αποτελεί σημαντικό στόχο περαιτέρω έρευνας, όπως και η προσπάθεια ανάπτυξης διπλά στοχευμένων θεραπειών.

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία ετερογενής και πολυπαραγοντική νόσος, με γενετικές, μηχανικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες να οδηγούν στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου. Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα ήταν στραμμένη στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στην ΟΑ, μεταξύ των οποίων περισσότερο μελετημένα είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, κ.α.), χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί κάποια πρόοδος στις παρεχόμενες θεραπευτικές επιλογές.

Επιδημιολογικές παρατηρήσεις που συνδέουν την ΟΑ με την παχυσαρκία, ακόμη και σε αρθρώσεις που δεν υπόκεινται σε μηχανική φόρτιση, προσέφεραν μια εναλλακτική προσέγγιση στη θεώρηση αυτού του πολυπαραγοντικού νοσήματος, ενώ οι αυξανόμενες μελέτες που συσχετίζουν την ΟΑ με παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου όπως η υπερχοληστερολαιμία και η αθηρωμάτωση, ενισχύουν την άποψη ενός πιθανού μεταβολικού παθογενετικού μηχανισμού.

Στα πλαίσια της ανωτέρω θεώρησης η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων καθώς και των εμπλεκόμενων μηχανισμών δράσης τους αποτέλεσε το αντικείμενο της μελέτης αυτής.

Αρχικά μελετήσαμε την έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της στον αρθρικό χόνδρο καθώς και το ρόλο τους στο μεταβολισμό του χόνδρου. Η λεπτίνη, είναι μία ουσία που παράγεται κύρια από το λιπώδη ιστό και σχετίζεται με τη διατήρηση σταθερού σωματικού βάρους, ενώ σε πρόσφατες μελέτες έχουν επισημανθεί και πλειοτροπικές δράσεις της λεπτίνης στα οστά και το χόνδρο καθώς και στο μεταβολισμό των λιπιδίων και την αθηρωμάτωση. Στη μελέτη μας ανιχνεύσαμε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνικής έκφρασης τόσο της λεπτίνης όσο και του λειτουργικού υποδοχέα της, Ob-Rb, στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ενώ, με τη χρήση της ποσοτικής PCR, παρατηρήσαμε διαφοροποιημένη έκφραση της λεπτίνης και του υποδοχέα της Ob-Rb στο χόνδρο με προχωρημένες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις, σε σύγκριση με το χόνδρο με ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις. Η πειραματική προσέγγιση της λήψης δύο οστεοαρθρικών δειγμάτων από την ίδια άρθρωση έχει το πλεονέκτημα ότι αποφεύγει επιρροές από εξωγενείς παράγοντες και άλλες μεταβλητές όπως η ηλικία, το γενετικό υπόβαθρο καθώς και διαφορές στη φαρμακευτική αγωγή. Αν και είναι σαφές ότι ο χόνδρος με τις ήπιες οστεοαρθρικές αλλοιώσεις δεν μπορεί να θεωρηθεί ως όμοιος με το φυσιολογικό χόνδρο, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι ο

ήπια διαταραγμένος χόνδρος πλησίον του χόνδρου με έκδηλες οστεοαρθρικές εκδηλώσεις αντιπροσωπεύει έναν ιστό ο οποίος έχει τη δυνατότητα να δώσει έναυσμα στη διεργασία αποδόμησης και να θεωρηθεί ως ο καθρέπτης του τι συμβαίνει κατά την εξέλιξη της νόσου. Επίσης διερευνήθηκαν τα επίπεδα της λεπτίνης στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ και βρέθηκε ότι ήταν υψηλότερα από ότι στα αντίστοιχα δείγματα ορού των ασθενών, ενώ παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος των ασθενών. Από τις παρατηρήσεις αυτές οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η παχυσαρκία, η οποία χαρακτηρίζεται από συστηματική υπερλεπτιναιμία, αντίσταση στη λεπτίνη και μία κατάσταση ήπιας φλεγμονής, συνεισφέρει σημαντικά σε μια δραματική αύξηση της έκφρασης λεπτίνης στον αρθρικό χόνδρο των παχύσαρκων ασθενών. Αυτή η θεώρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε παχύσαρκα άτομα η υπερλεπτιναιμία μπορεί να είναι παρούσα και σε τοπικό επίπεδο και να οδηγεί σε διάφορες καταστάσεις όπως σε υπολειτουργία της έκφρασης του λειτουργικού υποδοχέα, κάτι που ενισχύθηκε από τις παρατηρήσεις μας μετά από επίδραση λεπτίνης σε καλλιεργημένα χονδροκύτταρα και μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης του Ob-Rb. Επίσης σε καλλιεργημένα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής IL-1β μετά από επίδραση λεπτίνης, γεγονός που υποδεικνύει έναν άμεσα προ-φλεγμονώδη ρόλο της λεπτίνης στα χονδροκύτταρα. Στη μελέτη μας τέλος διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της λεπτίνης στις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη αύξηση της παραγωγής των μεταλλοπρωτεϊνών -9 και -13, δύο σημαντικών καταβολικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου. Οι παρατηρήσεις αυτές σχετικά με το ρόλο της λεπτίνης στην εξέλιξη της ΟΑ ενισχύουν το σενάριο ότι η ΟΑ αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο με μηχανικές και μεταβολικές αιτίες, μεταξύ των οποίων ο μεταβολισμός των λιπιδίων φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

Η εμπλοκή όμως των λιπιδίων στην ΟΑ δεν περιορίζεται στη συμμετοχή του λιπώδους ιστού. Η εναπόθεση λιπιδίων στο χόνδρο παρατηρείται πρώιμα, πριν την εμφάνιση ιστολογικών αλλαγών, αναδεικνύοντας την εμπλοκή των λιπιδίων στην παθογένεια της νόσου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα σε λιπίδια της επιφανειακής στιβάδας του αρθρικού χόνδρου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας. Επιπροσθέτως σε πληθυσμιακές μελέτες έχει αναδειχθεί μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης χοληστερόλης ορού και της οστεοαρθρίτιδας.

Τα λιπίδια και ειδικότερα η οξειδωση των λιπιδίων έχουν συσχετισθεί στενά με τη δομική αποσταθεροποίηση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου, ενώ οι αναστολείς της οξειδωσης των λιπιδίων φαίνεται πως ασκούν προστατευτική δράση στον αρθρικό χόνδρο. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το ρόλο της οξειδωμένης

LDL χοληστερόλης και του υποδοχέα της LOX-1 (lectin-like oxidized LDL) στην ΟΑ, ενώ μελετήσαμε και την επίδραση του αντιοξειδωτικού ασκορβικού οξέος στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε και μετρήθηκε η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ, ενώ ο υποδοχέας της LOX-1 παρατηρήθηκε ότι εκφράζεται στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά. Η επίδραση της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητάς τους, σε αντίθεση με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού ασκορβικού οξέος που επιπροσθέτως μείωσε και την έκφραση του υποδοχέα LOX-1. Από τις παρατηρήσεις αυτές γίνεται σαφές ότι μόρια που εμπλέκονται στο ενδογενές μονοπάτι μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη και ο υποδοχέας της, αποτελούν πιθανούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ.

Η συσσώρευση λιπιδίων, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς στην αθηρωμάτωση, είναι μία διαδικασία που δυνητικά μπορεί να συμβεί σε όλα τα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να εκφράσουν υποδοχείς όπως ο LOX-1, με την ιδιότητα να συνδέονται με τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες όπως η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη. Έχοντας ήδη αποδείξει την ύπαρξη ενός τέτοιου υποδοχέα στα χονδροκύτταρα προσθέσαμε τα κύτταρα αυτά στην ομάδα των κυττάρων στα οποία, όπως και στα μακροφάγα, μπορεί να εμφανιστεί συσσώρευση χοληστερόλης.

Καθώς η υπερβολική συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης είναι τοξική για τα κύτταρα, υπάρχουν μηχανισμοί εξόδου της που μεσολαβούνται από τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες LXR και την πρωτεΐνη ABCA1, η οποία λειτουργεί ως αντλία λιπιδίων που μεταφέρει την χοληστερόλη στην απολιποπρωτεΐνη A1, η οποία με τη σειρά της αποτελεί το βασικό συστατικό της HDL χοληστερόλης. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα έδειξε ότι η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση της ABCA1 και της ApoA1 ήταν σημαντικά μειωμένα στον οστεοαρθρικό σε σύγκριση με το φυσιολογικό χόνδρο, ενώ σχετικά με την έκφραση των μεταγραφικών ρυθμιστών τους LXRα και LXRβ διαπιστώθηκε μειωμένη έκφρασή τους στον οστεοαρθρικό χόνδρο σε σύγκριση με το φυσιολογικό.

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των LXR οδηγεί σε επαγωγή του μηχανισμού εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα, διαδικασία που ως τώρα έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως τα μακροφάγα, αλλά όχι στα χονδροκύτταρα. Στη μελέτη αυτή έγινε επίδραση σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων με τον συνθετικό LXR αγωνιστή TO-901317 και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων ABCA1 και ApoA1. Καθώς η ABCA1 ρυθμίζει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα, η δράση

του TO-901317 μπορεί να εμποδίζει την συσσώρευση λιπιδίων και να προάγει την έξοδο χοληστερόλης στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Πράγματι, με τη χρήση ραδιοσημασμένης χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα στα οποία έγινε και επίδραση με TO-901317 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έξοδο χοληστερόλης, η οποία ήταν σύμφωνη και με την απουσία εναποθέσεων λιπιδίων που διαπιστώθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση με Oil-red-O. Παράλληλα βρέθηκε ότι ο LXR αγωνιστής μείωσε σημαντικά την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 13 (MMP-13) από τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ασκεί προστατευτική δράση στο χόνδρο, και παράλληλα αύξησε την έκφραση αναβολικών γονιδίων, όπως το κολλαγόνο τύπου II και η αγγρεκάνη, επάγοντας την αναγεννητική ικανότητα του διαταραγμένου οστεοαρθρικού χόνδρου. Επιπρόσθετη στήριξη στην υπόθεση ότι η χρήση του συνθετικού LXR αγωνιστή μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη για τον αρθρικό χόνδρο προσέφερε η μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων όπου παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά μετά από επίδραση με τον TO-901317.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, θα μπορούσαμε να πούμε ότι προέκυψαν αποτελέσματα τα οποία ενισχύουν την άποψη ότι τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων όπως η λεπτίνη και οι υποδοχείς της, ο υποδοχέας LOX-1, η απολιποπρωτεΐνη A1, η ABCA1 και οι μεταγραφικοί παράγοντες LXRα και LXRβ παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας. Επίσης παρέχονται ενδείξεις ότι η οστεοαρθρίτιδα είναι ένα νόσημα που δεν αποτελεί μια αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης ούτε μια παρενέργεια της παχυσαρκίας, αλλά ένα νόσημα με σημαντικές μεταβολικές συνιστώσες όπου ο ρόλος των λιπιδίων είναι κρίσιμος. Παρότι πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα για το οποίο δεν μπορεί να υποστηριχθεί μια σχέση αίτιου – αποτελέσματος μεταξύ της παθογένειας της ΟΑ και της διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων, έχει ωστόσο κρίσιμη κλινική σπουδαιότητα το γεγονός ότι η διάγνωση της ΟΑ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως σήμα κινδύνου για την εκτίμηση του λιπιδαιμικού προφίλ και του καρδιαγγειακού κινδύνου, ειδικά σε νέους ασθενείς. Η ύπαρξη ενός ασυμπτωματικού νοσήματος που θα μπορούσε να αποτελεί προειδοποίηση για μία ασυμπτωματική αλλά συγχρόνως θανατηφόρα κατάσταση του καρδιαγγειακού συστήματος δεν μπορεί παρά να αποτελεί σημαντικό στόχο περαιτέρω έρευνας, ενώ ενθαρρυντική είναι και η σκέψη για την ανάπτυξη διπλά στοχευμένων θεραπειών.

## Summary

---

Osteoarthritis (OA) is a complex, multi-factorial disease with genetic, mechanic and environmental components leading to the degeneration of articular cartilage. Scientific research in the last years focused on the identification of genes connected to an increased risk for OA development. Recent studies highlighted genes with a differentiated expression in osteoarthritic compared to normal cartilage, with those encoding extracellular matrix proteins (collagen, proteoglycans etc) being the most well studied. However, there is no effective drug therapy yet.

Epidemiological studies have linked OA and obesity, even in non weight bearing joints, providing an alternative point of view for this multi-factorial disease. Considering the increasing number of studies connecting osteoarthritis with metabolic syndrome, hypercholesterolemia and atherosclerosis, the scenario of a metabolic component in the pathogenesis of OA becomes extremely attractive.

Based on the above considerations, the study of the expression of genes implicated in lipid metabolism has been the objective of this study.

Firstly, we studied the expression of leptin and its receptors in the articular cartilage, as well as its role on cartilage metabolism. Leptin is an adipose tissue derived hormone mainly involved in body weight homeostasis, while it is also implicated in various processes, such as bone and cartilage metabolism as well as lipid metabolism and atherosclerosis. We detected mRNA and protein expression of leptin and its functional receptor Ob-Rb on osteoarthritic cartilage, while the use of quantitative real-time PCR revealed differential mRNA and protein expression levels of leptin and Ob-Rb in the cartilage with advanced osteoarthritic changes compared to the cartilage with mild osteoarthritic changes. This type of approach of having tissue from adjacent regions with advanced and mild osteoarthritic changes from the same patient provided the advantage of control over confounding variables such as age, genetic background, differences in clinical management, and artefacts due to specimen collection. Since cartilage with mild OA is obtained from a joint that is clearly involved in a disease process it cannot be completely comparable to normal cartilage; therefore non-OA cartilage was also included in the study as control. In order to investigate whether leptin has a local or a systemic effect on osteoarthritic cartilage, we quantified leptin levels in paired serum and synovial fluid (SF) samples and observed significantly elevated leptin concentration levels in SF samples than in serum, while there was also a significant association with the BMI of the patients. Our



observations lead to the conclusions that obesity, which is characterised by systemic hyperleptinemia, leptin resistance and a low-grade inflammation, contributes significantly to a dramatic increase in leptin's expression in articular cartilage of obese patients. This consideration leads to the conclusion that in obese people hyperleptinemia may be present at a local level leading to various processes, such as downregulation of Ob-Rb expression, which was also shown in our study in chondrocyte cultures growing in the presence of leptin. We also observed in chondrocyte cultures that leptin had an increasing effect in IL-1 $\beta$  production, supporting a direct pro-inflammatory role of leptin on chondrocytes. We also showed that leptin had a dose dependent increasing effect on the production of two important catabolic enzymes, metalloproteinase -9 and -13 (MMP-9 and MMP-13), which are implicated in cartilage degradation. Taken together the above findings reinforce the scenario that OA is a multi-factorial disease with leptin comprising a critical metabolic link between obesity and OA which further proposes the existence of a metabolic component in OA development, providing evidence that altered lipid metabolism may be playing a significant role.

However, implication of lipid metabolism in OA is not limited to the contribution of adipose tissue. Lipid deposition, seen early in OA process and before histological changes, is conceived to reflect a lipid involvement in the pathogenesis of OA. It has been shown that the content of lipids in the superficial layer of normal articular cartilage increases with aging. Furthermore, recent population studies have provided support for the hypothesis that serum cholesterol is a systemic risk factor for OA and an association has been observed between high serum cholesterol levels and OA.

Lipids and especially lipid peroxidation has been linked to structural destabilization of cartilage matrix, while lipid peroxidation inhibitors, such as ascorbic acid, have been shown to exert a protective role in extracellular matrix degradation. In the present study we investigated the role of oxidized LDL cholesterol and its scavenger receptor, LOX-1, in OA, while we also studied the effect of ascorbic acid on osteoarthritic cartilage. More precisely, ox-LDL levels were detected in the synovial fluid of patients with OA, and LOX-1 was found to be expressed in osteoarthritic cartilage while normal cartilage showed no LOX-1 expression. We also observed that ox-LDL reduced chondrocyte's viability in cell cultures, while ascorbic acid had a completely different effect increasing chondrocyte viability and suppressing LOX-1 expression. These findings support the view that molecules

implicated in the cholesterol influx pathway, such as ox-LDL and its receptor, may be also implicated in osteoarthritic process.

Lipid accumulation has been widely studied in atherosclerosis and is a process that could be observed in all cells that, like macrophages, are able to take up modified lipoproteins via a scavenger-type receptor, like LOX-1. Having already shown that chondrocytes express LOX-1, we added chondrocytes in the repertoire of cells that can present intracellular cholesterol accumulation. As excessive accumulation of free cholesterol is toxic for cells, it is generally prevented by tight regulation of influx and efflux pathways. Efflux pathways are mediated by the nuclear receptors LXRs and the protein ABCA1, which serves as a lipid pump transferring cholesterol to ApoA1, the major compound of HDL cholesterol. We investigated the expression of genes implicated in cholesterol efflux and showed that ABCA1 and ApoA1 mRNA and protein expression levels were significantly decreased in osteoarthritic cartilage compared to normal. Regarding the expression of their transcriptional regulators LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  we found that LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  expression levels were also decreased in osteoarthritic cartilage compared to normal.

It is well known that LXR activation leads to induction of cholesterol efflux, a process well studied in various types of cells, such as the macrophages, but not in chondrocytes. We treated osteoarthritic chondrocytes with the synthetic LXR agonist TO-901317 and we observed a significant increase in ABCA1 and ApoA1 mRNA expression levels. As ABCA1 regulates cholesterol efflux, the effect of TO-901317 may prevent intracellular lipid accumulation. The use of radiolabeled cholesterol supported this hypothesis as a significant increase in cholesterol efflux was observed after treatment of osteoarthritic chondrocytes with TO-901317, which was consistent with the absence of lipid accumulation in the optical microscope after staining with Oil-red-O stain. Furthermore, LXR agonist significantly decreased MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes, playing a protective role in articular cartilage, and simultaneously increased the expression of certain anabolic genes, such as aggrecan and collagen type II, inducing the regenerative ability of the disturbed osteoarthritic cartilage. Additional support to the hypothesis that the use of a synthetic LXR agonist may be useful in articular cartilage came from the study of cellular apoptosis, as we showed that the number of apoptotic cells was significantly decreased after TO-901317 treatment.

Taken together our findings, we could support the view that genes implicated in altered lipid metabolism play a key role in the pathophysiology of osteoarthritis. It

becomes clear that OA is neither an inevitable consequence of aging nor a side effect of obesity; however, it proves to be a disease with a significant metabolic component where the role of lipid is critical. As it is a multi-factorial disease, one could not prove a direct cause and effect relationship between OA and impaired lipid metabolism, however, there is great potential clinical value as the diagnosis of OA may serve as a red flag for warning to evaluate cardiovascular disease risk and allow for more timely primary prevention of cardiovascular disease, especially in young patients. The view of a symptomatic disease (OA) as a warning of a potentially asymptomatic but deadly condition (CVD) seems to be a significant target for more scientific research aiming to double targeted therapies.

## Βιβλιογραφία

1. Di Cesare PE, Abramson SB. Pathogenesis of Osteoarthritis, in Kelley's Textbook of Rheumatology, ed. ED Harris, JR et al. Elsevier Science, USA, 2005
2. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1343-1355
3. Baker JF, Walsh P, Mulhall KJ. Statins: A potential role in the management of osteoarthritis? *Joint Bone Spine* 2010; ahead of print
4. Muirden KD. Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 153–156
5. Zeng QY, Chen R, Darmawan J et al. Rheumatic diseases in China. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R17.
6. Chopra A, Patil J, Billampelly V et al. The Bhigwan (India) COPCORD: methodology and first information report. *APLAR J Rheumatol* 1997; 1: 145–151.
7. Senna ER, De Barros AL, Silva EO et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004; 31: 594–597.
8. Reyes Llerena GA, Guibert Toledano M, Hernandez Martinez AA et al. Prevalence of musculoskeletal complaints and disability in Cuba. A community- based study using the COPCORD core questionnaire. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 739–742.
9. Farooqi A, Gibson T. Prevalence of the major rheumatic disorders in the adult population of north Pakistan. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 491–495.
10. Haq SA, Dermawan J, Islam MN et al. Prevalence of Rheumatic diseases and associated outcomes in rural and urban communities in Bangladesh: A COPCORD study. *J Rheumatol* 2005; 32: 348–353.
11. Das SK, Kumar P, Srivastava R et al. Distribution of various rheumatological diseases in rural and urban population of Lucknow. *J Ind Rheumatol Association* 2005; 13: 9.
12. Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham osteoarthritis study. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 20: 42–50.

13. Felson DT, Naimark AD, Anderson J et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 914–918.
14. Sharma L, Kapoor D. Epidemiology of Osteoarthritis in *Osteoarthritis* 4<sup>th</sup> ed., Moskowitz RW et al, LWW 2007, p.10
15. Sharma L, Lou C, Felson DT, et al. Laxity in healthy and osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 861-870
16. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, et al. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1951-1959
17. Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1): 17-24
18. Lawrence JS. *Rheumatism in Populations*. London, Heinemann Medical, 1977
19. Forman MD, Kaplan DA, Muller GF, et al. The epidemiology of osteoarthritis of the knee, in *Epidemiology of Osteoarthritis*, ed. JG Peyron. Giba-Geigy, Paris. 243, 1980
20. Brandt KD, Flusser D. Osteoarthritis, in *Prognosis in the Rheumatic Diseases*, ed. N. Bellamy. Kluwer Academic Publishers: Luncaster, UK 11, 1991
21. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteo-arthrosis, prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis* 1966; 25: 1-23
22. Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I), evidence for an association with overweight, race and physical demands of work. *Am J Epidemiol* 1998; 128: 179-189
23. Van Saase JL, Van Romunde LK, Cats A, et al. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiographical osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 271-280
24. Danielsson L, Lindberg H, Nilsson B. Prevalence of coxarthrosis. *Clin Orthop* 1984; 191: 110-115
25. Jorring K. Osteoarthritis of the hip, epidemiology and clinical role. *Acta Orthop Scand* 1980; 51: 523-530

26. Tepper S, Hochberg Mc. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Am J Epidemiol* 1993; 137: 1081-1088
27. Kallman DA, Wigley FM, Scott WW, et al. the longitudinal course of hand osteoarthritis in a male population. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1323-1331
28. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Plato CC, et al. Factors associated with osteoarthritis of the hand in males: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 1121-1127
29. Sowers M, Hochberg m, Crabbe JP, et al. Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of hand and knee in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 38-47
30. Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL et al. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *The Journal of Rheumatology* 1989; 16: 427–441.
31. Dagenais S, Garbedian S, Wai EK. Systematic review of the prevalence of radiographic primary hip OA. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467: 623-637
32. Davis MA, Ettinger WH Neuhaus JM, et al. The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 278-288
33. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A et al. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1988; 109(1): 18–24.
34. Verbrugge LM. Women, men & Osteoarthritis. *Arthritis Care and Research* 1995; 8: 212–220.
35. Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM, et al. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 119-129
36. Fytili P, Giannatou E, Papanikolaou V, et al. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta and adrogen receptor genes with knee osteoarthritis. *Clin Genet* 2005; 68: 268-277
37. Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas* 2000; 35(3): 183-199
38. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1996; 156(18): 2073-2080

39. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, et al. Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1990; 33(4): 525-532
40. Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10): 1867-1873
41. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM et al. Weight loss reduces the risk of symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992; 116(7): 535–539.
42. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, et al. Body weight, body mass index and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip and knee. *Epidemiology* 1999;10(2):161e6.
43. Strecher RM. Heberden's nodes. Heredity in hypertrophic arthritis of the finger joints. *Am J Med Sci* 1941; 201: 801
44. Kellgren J, Lawrence J, Bier F. Genetic factors in generalized osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1963; 22: 237-255
45. Hirsch R, Lethbridge-Cejku M, Hanson R, et al. Familial aggregation of osteoarthritis: Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Arthritis Rheum* 1998; 41(7): 1227-1232
46. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, et al. Evidence for a Mendelian gene in segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41(6): 1064-1071
47. Mac Gregor AJ, Antoniadou L, Matson M, et al. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: Results from a classic twin study. *Arthritis Rheum* 2000;43(11): 2410-2416
48. Zhai G, Hart DJ, Kato BS. Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(2): 222-225
49. Spector TD, Cicuttini F, Baker J et al. Genetic influences on osteoarthritis in women: A twin study. *BMJ* 1996; 312(7036): 940-943
50. MacGregor AJ, Li Q, Spector TD, et al. The genetic influence on radiographic osteoarthritis is site specific at the hand, knee and hip. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(3): 277-280
51. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorder. *Arthritis Res* 2002; 4(6): 337-345
52. Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13(2): 111-116

53. Loughlin J. Genetic studies and linkage in primary osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28: 95-109
54. Knowlton RG, Katzenstein PL, Moskowitz RW et al. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *NEJM* 1990; 322: 526-530
55. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, et al. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(17): 6565-6568
56. Jakkula E, Melkonieni M, Kiviranta I, et al. The role of sequence variations within the genes encoding collagen II, IX and XI in non-syndromic, early-onset osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 497-507
57. Solovieva S, Hirvonen A, Silvola P et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in Finnish women. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R20
58. Uitterlinden AG, Burger H, van Duijn CM, et al. Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1456-1464
59. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, et al. Estrogen receptor a gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1913-1922
60. Solovieva S, Kamarainen OP, Hirvonen A, et al. Association between interleukin 1 gene cluster polymorphisms and bilateral distal interphalangeal osteoarthritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 1977-1986
61. Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z et al. Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(6): 1519-1527
62. Leppavuori J, Kujala U, Kinnunen J, et al. Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on chromosome 2q. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65:1060–1067
63. Forster T, Chapman K, Marcelline L, et al. Finer linkage mapping of primary osteoarthritis susceptibility loci on chromosomes 4 and 16 in families with affected women. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:98–102
64. Chapman K, Mustafa Z, Irlen CM, et al. Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 167-174



65. Ingvarsson T. Prevalence and inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Acta Orthop Scand Suppl* 2000; 298: 1-46
66. Stefansson SE, Jonsson H, Ingvarsson T, et al. Genome wide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrillin-3. *Am J Hum Genet* 2003; 72(6): 1448-1459
67. Demissie S, Cupples LA, Myers R, et al. Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 2002; 46(4): 946-952
68. Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA, et al. A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 2004; 50(8): 2489-2496
69. Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, et al. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1179-1186
70. Smith AJP, Keen LJ, Billingham MJ, et al. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 2004; 5: 451-460
71. Forster T, Chapman K, Loughlin J. Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility with osteoarthritis. *Hum Genet* 2004; 114: 391-395
72. Loughlin J, Mustafa Z, Dowling B, et al. Finer linkage mapping of a primary hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 562-568
73. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9757-9762
74. Jones SE, Jomary C. Secreted frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioassays* 2002; 24: 811-820
75. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee and hand. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1710-1721
76. Kizawa H, Kou I, Iida A, et al. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2005; 37: 138-144
77. Mototani H, Mabuchi A, Saito S, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1009-1017

78. Mototani H, Iida A, Nakamura Y, et al. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. *J Bone Miner Metab* 2010; ahead of print
79. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, et al. Identification and characterization of asporin. *J Biol Chem* 2001; 276: 12201-12211
80. Kou I, Nakajima M, Ikegawa S. Binding characteristics of the osteoarthritis-associated protein asporin. *J Bone Miner Metab* 2010; 28: 395-402
81. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 322-328
82. Haeseleer F, Imanishi Y, Sokal I, et al. Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 615-623
83. Kaliakatsos M, Tzetis M, Kanavakis E. Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 609-611
84. Nakamura T, Shi D, Tzetis M, et al. Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1676-1681
85. Poulou M, Kaliakatsos M, Tsezou A, et al. Association of the CALM1 core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of greek origin. *Genet Test*. 2008; 12: 263-265
86. Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, et al. Association of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2497-2507
87. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2005; 11: 186-191
88. Haq I, Murphy E, Dacre J. Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 2003; 79: 377-383
89. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioassays* 1995; 17: 1039-1048
90. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM et al. Articular Cartilage Biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003; 11: 421-430
91. Aurich M, Squires GR, Reiner A, et al. Differential matrix degradation and turnover in early arthritic lesions of human knee and ankle joints. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 112-119
92. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 249-257

93. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001; 3: 107-113
94. Maroudas AI. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 1976; 260(5554): 808-809
95. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, et al. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 20-26
96. Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or bone? *Arthritis Rheum* 2004; 50: 341-344
97. Menkes CJ, Lane NE. Are osteophytes good or bad? *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: S53-S54
98. Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1): 203
99. Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59: 45-53
100. Rothwell AG, Bentley G. Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J Bone Joint Surg Brit* 1973; 55: 588-594
101. Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Mitosis in human osteoarthritic cartilage. *Clin Orthop Rel Res* 1972; 84: 197-199
102. Lee DA, Bentley G, Archer CW. The control of cell division in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1993; 1: 137-146
103. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 284-289
104. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1632-1638
105. Kim HA, Lee YJ, Seong SC, et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheum* 2000; 27: 455-462
106. Lippiello L, Hall D, Mankin HJ. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1977; 59: 593-600
107. Eyre D, McDevitt CA, Billingham MEJ, et al. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J.* 1980; 188: 823-837
108. Sandy JD, Adams ME, Billingham ME, et al. In vivo and in vitro stimulation of chondrocyte biosynthetic activity in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 388-397

109. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 455-461
110. Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest* 1999; 79: 1669-1677
111. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenase in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99: 1534-1545
112. Wu JJ, Lark MW, Chun LE, et al. Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *J Biol Chem* 1991; 266: 5625-5628
113. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 94-103
114. Westacott CI, Sharif MC. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25: 254-272
115. Lotz M, Blanco FJ, Kempis J, et al. Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J. Rheumatol. Suppl.* 1995; 43: 104-108
116. Henrotin YE, De Groote DD, Labasse AH, et al. Effects of exogenous IL-1 beta, TNF alpha, IL-6, IL-8 and LIF on cytokine production by human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4: 163-173
117. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M Interleukin-17- induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 27467–27473
118. Olee T, Hashimoto S, Quach J, et al. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J. Immunol.* 1999; 162: 1096–1100
119. Alaaeddine , Di Battista JA, Pelletier JP, et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 710–718
120. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 1999; 40: 1–11

121. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*1998; 41: 2165–2174
122. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 530–540
123. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, et al. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4: 77–84
124. Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, et al. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23577–23581
125. Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase- 8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Lab. Invest.* 1996; 74: 232–240
126. Ohta S, Imai K, Yamashita K, et al. Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage. *Lab. Invest.* 1998; 78: 79–87
127. Benton HP , Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 154: 421–428
128. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, et al. Interleukin 1 suppresses expression of cartilagespecific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J. Clin. Invest.* 1998; 82: 2026–2037
129. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem. J.*1997; 324: 305–310
130. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 75–85
131. Miwa M, Saura R, Hirata S, et al. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 17–24
132. Yamada H, Kikuchi T, Nemoto O, et al. Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of

- metalloproteinases- 1 by human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* 1996; 23: 1739–1743
133. Di Battista J. A, Dore S, Morin N, et al. Prostaglandin E2 stimulates insulin like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J. Cell Biochem.* 1997 65: 408–419
134. McQuillan DJ, Handley CJ, Campbell MA, et al Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem. J.* 1986; 240: 423–430
135. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem. J.* 1989; **260**: 543–548
136. Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, et al. Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 1997; 237: 318–325
137. Middleton JF, Tyler JA. Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis* 1992; 51: 440–447
138. Dore S, Pelletier J, DiBattista JA, et al. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation: possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 253–263
139. Frazer A, Seid JM, Hart KA, et al. Detection of mRNA for the transforming growth factor beta family in human articular chondrocytes by the polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 180: 602–608
140. Serra R, Johnson M, Filvaroff E. H, et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.* 1997; 139: 541–552
141. Yang X, Chen L, Xu X. et al. TGF-beta/smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biol.* 2001; 153: 35–46
142. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 1996; 10: 1580–1594

143. Jonsson H, Helgadottir GP, Aspelund T, et al. Hand osteoarthritis in older women is associated with carotid and coronary atherosclerosis: the AGES Reykjavik Study. *Ann Rheum Dis* 1999; 68: 1696-1700
144. Chan KW, Ngai HY, Ip KK, et al. Co-morbidities of patients with knee osteoarthritis. *Hong Kong Med J* 2009;15:168-72
145. Cerhan JR, Wallace RB, el-Khoury GY, et al. Decreased survival with increasing prevalence of full-body, radiographically defined osteoarthritis in women. *Am J Epidemiol* 1995;141(3): 225e34
146. Haara MM, Heliovaara M, Kroger H, et al. Osteoarthritis in the carpometacarpal joint of the thumb. Prevalence and associations with disability and mortality. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(7):1452e7
147. Singh G, Miller JD, Lee FH, et al. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Manag Care* 2002; 8: S383-S391
148. Kadam UT, Jordan K, Croft PR. Clinical comorbidity in patients with osteoarthritis: a case-control study of general practice consultants in England and Wales. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 408-414
149. Philbin EF, Ries MD, Groff GD, et al. Osteoarthritis as a determinant of an adverse coronary heart disease risk profile. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 529-533
150. Erb N, Pace AV, Douglas KMJ, et al. Risk assessment for coronary heart disease in rheumatoid arthritis and osteoarthritis
151. Conaghan PG, Vanharanta H, Dieppe PA. Is progressive osteoarthritis an atheromatous vascular disease? *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1539-1541
152. Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, et al. Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J* 1991; 121: 293-298
153. Dahaghin S, Bierma-Zeinstra SMA, Koes BW, et al. Do metabolic factors add to the effect of overweight on hand OA? (Rotterdam study). *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 916-920
154. Puenpatom RA, Victor TW. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad Med* 2009; 121(6): 9-20
155. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism* 1991; 40(6): 571-576

156. Stockwell RA. Lipid in the matrix of ageing articular cartilage. *Nature* 1965; 207: 427-428
157. Adkisson HD 4th, Risener FS Jr, Zarrinkar PP, et al. Unique fatty acid composition of normal cartilage: discovery of high levels of n-9 eicosatrienoic acid and low levels of n-6 polyunsaturated fatty acids. *FASEB J.* 1991; 5(3):344-53.
158. Arkill KP, Winlove CP. Fatty acid transport in articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 456(1):71-8.
159. Xu H, Watkins BA, Adkisson HD. Dietary lipids modify the fatty acid composition of cartilage, isolated chondrocytes and matrix vesicles. *Lipids.* 1994; 29(9):619-25
160. Kellgren JH. Osteoarthritis in patients and populations. *BMJ* 1961;1:1-6
161. Stürmer T, Sun Y, Sauerland S, et al. Serum cholesterol and osteoarthritis. The baseline examination of the Ulm Osteoarthritis Study. *J Rheumatol* 1998; 25(9): 1827-1832
162. Al-Arfaj AS. Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med J* 2003; 24(7): 745-747
163. Mathon G, Gagné C, Brun D, et al. Articular manifestations of familial hypercholesterolemia. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 599-602
164. Li SG. Images in clinical medicine. Familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2009; 360(18): 1885
165. Davies-Tuck ML, Hanna F, Davis SR, et al. Total cholesterol and triglycerides are associated with the development of new bone marrow lesions in asymptomatic middle-aged women – a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R181
166. Davies-Tuck ML, Wluka AE, Forbes A, et al. Development of new bone marrow lesions is associated with adverse effects on knee cartilage while resolution is associated with improvement – a potential target for prevention of knee osteoarthritis: a longitudinal study. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R10
167. Wluka AE, Hanna F, Davies-Tuck M, et al. Bone marrow lesions predict increase in knee cartilage defects and loss of cartilage volume in middle-aged women without knee pain over 2 years. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 850-855



168. Katz, JD, Agrawal S, Velasquez M. Getting to the heart of the matter: osteoarthritis takes its place as part of the metabolic syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 2010; ahead of print
169. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Scott WW Jr et al. The association of body weight, body fatness, and body fat distribution with osteoarthritis of the knee: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol* 1995; 22: 488-493
170. Turkbey EB, McClelland RL, Kronmal RA et al. The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *JACC Cardiovasc Imaging* 2010; 3: 266-74.
171. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6: 399-409
172. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 728-733
173. Hart DJ, Spector TD. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol* 1993; 20: 331-335
174. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, et al. Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am J Med* 1999; 107: 542-548
175. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 995-1000
176. Reijman M, Pols HA, Bergink AP, et al. Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip: the Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 158-162
177. Woolf AD, Breedveld F, Kvien TK. Controlling the obesity epidemic is important for maintaining musculoskeletal health. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65: 1401-1402
178. Griffin TM, Guilak F. The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005; 33: 195-200.
179. Lohmander LS, Gerhardsson de Verdier M, Roloff J, et al. Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: 490-496.

180. Cicuttini, FM, Baker JR, Spector TD. The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. *J Rheumatol*. 1996; 23: 1221-1226.
181. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, et al. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* 2008; 9: 132
182. Toda Y, Toda T, Takemura S, et al. Change in body fat, but not body weight or metabolic correlates of obesity, is related to symptomatic relief of obese patients with knee osteoarthritis after a weight control program. *J Rheumatol* 1998; 25: 2181-2186
183. Wang Y, Simpson JA, Wluka AE, et al. Relationship between body adiposity measures and risk of primary knee and hip replacement for osteoarthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R31
184. Christensen R, Astrup A, Bliddal H. Weight loss: the treatment of choice for knee osteoarthritis? A randomized trial. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005; 13: 20-27
185. Teichtahl AJ, Wluka AE, Wang Y, et al. Obesity and adiposity are associated with the rate of patella cartilage volume loss over 2 years in adults without knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68: 909-913
186. Griffin TM, Fermor B, Huebner JL, et al. Diet induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R130
187. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-248
188. Silberberg M, Silberberg R. Effects of a high fat diet on the joints of aging mice. *AMA Arch Pathol* 1950; 50: 828-846
189. Matarese G, Mantzoros C, La Cava A. Leptin and adipocytokines: bridging the gap between immunity and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3676-3680
190. Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 115-130
191. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, et al. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 716-724

192. Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, et al. Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *J Mol Endocrinol* 2009; 43: 11-18
193. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocytes lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol. Chem.* 2000; 275: 20069-20076,
194. Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; 30: 395-405,
195. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol J-P.L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003; 11: 747-755
196. Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290(5497): 1721-6
197. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505): 425–432.
198. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763–770.
199. Ahima RS, Flier JS, Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 2000; 62: 413-437.
200. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 14564–14568.
201. Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al. The bioenergetics of the immune system. *Science* 2001; 292: 855–856.
202. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686.
203. Collins S, Kuhn CM, Petro AE, et al. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996; 380: 677.
204. Considine RV, Caro JF. Pleiotropic cellular effects of leptin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1999; 6(2):163–9.
205. Gualillo O, Eiras S, Lago F, et al. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci* 2000; 67: 2433–2441.
206. Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept* 2000; 92: 73–78.

207. Kume K, Satomura K, Nishisho S, et al. Potential role of leptin on endochondral ossification. *J. Histochem. Cytochem* 2002; 50(2): 159-169.
208. Elefteriou F, Jong Deok Ahn, Takeda S, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434: 514- 520.
209. Elmquist JK, Strewler GJ. Do neural signals remodel bone? *Nature* 2005; 434: 447- 448.
210. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 2002; 85: 825-836
211. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263-1271
212. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996; 379:632– 635.
213. Frühbeck G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 2006; 393: 7-20
214. Gualillo O, Eiras S, White DW, et al. Leptin promotes the tyrosine phosphorylation of SHC proteins and SHC association with GRb2. *Mol Cel Endocrinol.* 2002; 190: 83-89
215. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:6093– 6096.
216. Barr VA, Lane K, Taylor SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21416– 21424.
217. Otero M, Lago R, Gomez R, et al. Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine. *Drug News Perspect.* 2006; 19(1): 21-6.
218. Otero M, Gómez-Reino JJ, Gualilo O. Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: *In vitro* effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 404-409.
219. Otero M, Lago R, Lago F, et al. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R581-591
220. Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, et al. Leptin signalling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J immunol* 2002; 168: 875-882

221. Bernotiene E, Palmer G, Talabot-Ayer D, et al. Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice. *Arthritis Res* 2004; 6: R256-263
222. Fraser RA, Thoen J, Reseland JE, et al. Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin 4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation. *Clin Rheumatol.* 1999; 18: 394-401
223. Dumond H, Presle N, Terlain B, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3118-3129.
224. Loeser RF. Systemic and local regulation of articular cartilage metabolism: Where does leptin fit in the puzzle? *Arthritis Rheum* 2003; 48(11): 3009-3012
225. Marks R, Allegrante JP. Body mass indices in patients with disabling hip osteoarthritis. *Arthritis Res* 2002; 4:112–6.
226. Teichtahl AJ, Wlulka AE, Proietto J, et al. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. *Medical Hypotheses* 2005; 65, 312–315.
227. Figenschau Y, Knutsen G, Shahazeydi S, et al. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287:190-197.
228. Presle N, Pottie P, Dumond H, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(7): 690-695.
229. Farese RV Jr, Herz J. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet* 1998, 14:115-120
230. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999, 13:2072-2086
231. Wu S, De Luca F. Role of cholesterol in the regulation of growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth. *J Biol Chem* 2004, 279:4642-4647
232. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 2005; 438: 612-621
233. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest.* 2002, 110:905-911

234. Brown MS Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci* 1999, 96:11041-11048
235. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-20966
236. Dai L, Zhang Z, Winyard PG, et al. A modified form of low-density lipoprotein with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(4): 705-710
237. Winyard PG, Tatzber F, Esterbauer H, et al. Presence of foam cells containing oxidised low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 677-680
238. Akagi M, Nishimura S, Yoshida K, et al. Cyclic tensile stretch load and oxidized low density lipoprotein synergistically induce lectin-like oxidized LDL receptor-1 in cultured bovine chondrocytes, resulting in decreased cell viability and proteoglycan synthesis. *J. Orthop Res* 2006; 24(8): 1782-1790
239. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997; 386: 73-77
240. Chen X, Du G. Lectin-Like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance. *Chin Med J* 2007; 120: 421-426
241. Nakagawa T, Akagi M, Hoshikawa H, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(9): 2486-2494
242. Nakagawa T, Yasuda T, Hoshikawa H, et al. LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299: 91-97
243. Nishimura S, Akagi M, Yoshida K, et al. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor 1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF- $\kappa$ B. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 568-576
244. Kakinuma T, Yasuda T, Nakagawa T, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates matrix metalloproteinase 3 synthesis enhanced by oxidized low-density lipoprotein in rheumatoid arthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11): 3495-3503

245. Akagi M, Kanata S, Mori S, et al. Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15: 281-290
246. Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1436:279–298
247. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res*; 2001: 42:1717–1726
248. Soumian S, Albrecht C, Davies AH, et al. ABCA1 and atherosclerosis. *Vasc Med* 2005; 10: 109-119
249. Reddy ST. ATP-binding cassette transporter 1 participates in LDL oxidation by artery wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1877-1883
250. Fu X, Menke JG, Chen Y et al. 27-hydroxysterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol chem*. 2001; 276: 38378-87
251. Bradley MN, Hong C, Chen M, et al. Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *J Clin Invest* 2007; 117: 2337-2346
252. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7604-7609
253. Peng D, Hiipakka RA, Reardon CA, et al. Differential anti-atherosclerotic effects in the innominate artery and aortic sinus by the liver X receptor agonist TO901317. *Atherosclerosis* 2009; 203: 59-66
254. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 135-142
255. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, et al. Integrative Micro RNA and Proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE* 2008; 3: e3740
256. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 1978; 15: 1313-1321

257. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267: 531-532
258. Gehrsitz A, McKenna LA, Soder S, et al. Isolation of RNA from small human articular cartilage specimens allows quantification of mRNA expression levels in local articular cartilage defects. *J Orthop Res* 2001; 19: 478-481
259. Adams ME, Huang DQ, Yao LY, et al. Extraction and isolation of mRNA from adult articular cartilage. *Anal Biochem* 1992; 202: 89-95
260. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 1995; 159: 265-358
261. McKenna LA, Gehrsitz A, Soder S, et al. Effective isolation of high quality total RNA from human adult articular cartilage. *Anal Biochem* 2000; 286: 80-85
262. World Health Organization Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. In WHO Tech Rep Ser. Geneva: World Health Organization 1995; No854
263. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-501
264. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J Bone Joint Surg* 1971; 53A: 523-537
265. Cole AA, Kuettner KE. Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 19-26
266. Chaisson CE, Zhang Y, McAlindon TE, et al. Radiographic hand osteoarthritis: incidence, patterns, and influence of pre-existing disease in a population based sample. *J Rheumatol* 1997; 24: 1337-1343
267. Jonsson H, Eliasson GJ, Petursson E. Scintigraphic hand osteoarthritis (OA) – prevalence, joint distribution, and association with OA at other sites. *J Rheumatol* 1999; 26: 1550-1556
268. Otero M, Lago R, Lago F, et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Letters* 2005; 579: 295-301
269. Reseland JE, Syversen U, Bakke I et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1426-1433



270. Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM. Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Letters* 2002; 528: 43-47
271. Ku JH, Lee CK, Joo BS, et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 1431-1435
272. Morroni M, De Matteis R, Palumbo C, et al. In vivo leptin expression in cartilage and bone cells of growing rats and adult humans. *J Anat.* 2004; 205: 291-296
273. Liu Z-J, Endoh A, Li R, Ohzeki T. Effects of leptin and dexamethasone on long and short leptin receptor mRNA. *Pediatrics International* 2004; 46: 561-564
274. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem.* 2002; 85: 825-836
275. Wolf G, Hamann A, Han DC, et al. Leptin stimulates proliferation and IGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney* 1999; 56:1154-1155.
276. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, et al. Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 241:765-768.
277. Glasow A, Bornstein SR, Chrousos GP, et al. Detection of ob-receptor in human adrenal neoplasms and effect of leptin on adrenal cell proliferation. *Hum Metab Res.*1999; 31:247-251.
278. Iwamoto I, Fujino T, Douchi T The leptin receptor in human osteoblasts and the direct effect of leptin on bone metabolism. *Gynecol Endocrinol.* 2004; 19:97-104.
279. Neuhold LA, Killer L, Zhao W, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase -3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest.* 2001; 107: 35-44.
280. Bau B, Gebhard PM, Haag J, et al. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arth Rheum.* 2002; 46: 2648-2657.
281. Soder S, Roach HI, Oehler S, et al. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24: 302-304.

282. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006; 11: 529-543
283. Bao JP, Chen WP, Feng J, et al. Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep.* 2009; ahead of print
284. Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1616-1621
285. Kita T, Kume N, Minami M, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 199-205
286. Murase T, Kume N, Korenaga R et al. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998; 83: 328-333
287. Aoyama T, Fujiwara H, Masaki T, et al. Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2101-2114
288. Wang Y, Prentice LF, Vitetta L, et al. The effect of nutritional supplements on osteoarthritis. *Alter Med Rev* 2004; 9(3): 275-293
289. Mobasher A, Vannucci SJ, Bondy CA et al. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 2002; 17(4): 1239-1267
290. McNutly AL, Stabler TV, Vail TP, et al. Dehydroascorbate transport in human chondrocytes is regulated by hypoxia and is a physiologically relevant source of ascorbic acid in the joint. *Arthritis Rheum* 2005; 52(9): 2676-2685
291. Clark AG, Rohrbaugh AL, Otterness I, et al. The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. *Matrix Biol* 2002; 21: 175-184
292. McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum* 1996; 39(4): 648-656
293. Ohashi R, Mu H, Wang X, et al. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM* 2005; 98: 845-856
294. Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA. LXRs: oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vacul Pharmacol* 2002; 38: 249-256

295. Gentili C, Tutolo G, Pianezzi A, et al. Cholesterol secretion and homeostasis in chondrocytes: a liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein A1 expression. *Matrix Biol.* 2005; 24:35-44
296. Oliviero F, Sfriso P, Baldo G, et al. Apolipoprotein A-I and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Exp Rheum.* 2009; 27:79-83
297. Collins-Racie LA, Yang Z, Arai M, et al. Global analysis of nuclear receptor expression and dysregulation in human osteoarthritic articular cartilage. Reduced LXR signalling contributes to catabolic metabolism typical of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17: 939-949
298. Bultel S, Helin L, Clavey V, et al. Liver X receptor activation induces the uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins in primary human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:2288-2295
299. Muscat GE, Wagner BL, Hou J, et al. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 40722-40728
300. Juvet LK, Andersen SM, Schuster GU, et al. On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2003 17:172-182