



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Έκφραση μικρών μη κωδικών μορίων RNA σε διάφορους
ιστούς της άρθρωσης ασθενών με εκφυλιστική νόσο των
αρθρώσεων»**

Παπάζη Γεωργία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσέζου Ασπασία **(Επιβλέπουσα)**
Τζέτη Μαρία **(Μέλος)**
Δήμας Κωνσταντίνος **(Μέλος)**

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«MicroRNA expression in different joint tissues in patients
with degenerative arthritis»**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Οστεοαρθρίτιδα- Γενικές πληροφορίες	9
A.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	9
A.1.2. Κοινωνικές & οικονομικές παράμετροι της ΟΑ	12
A.1.3. Η ΟΑ ως μία πολυπαραγοντική ασθένεια	12
A.1.4. ΟΑ & Μεταβολικό Σύνδρομο	14
A.1.5. Αρθρικός Χόνδρος: Δομή- μορφολογία & σύσταση	19
A.1.6. Χονδροκύτταρα	20
A.1.7. Χονδρογένεση	20
A.1.8. Οστεοαρθρίτιδα: Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά & κλινική εικόνα	22
A.1.9. ΟΑ & αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης	24
A.1.10. Φλεγμονή στην ΟΑ	26
A.1.11. ΟΑ & κληρονομικότητα	30
A.1.12. Σχετιζόμενα με ΟΑ γονίδια & πολυμορφισμοί	31
A.1.13. Επιγενετική	33
A.2. MicroRNAs- Γενικά χαρακτηριστικά	35

A.2.1.	Τα microRNAs στον C. Elegans	35
A.2.2.	Βιογένεση των microRNAs	36
A.2.3.	Θέση των miRNAs στο γονιδίωμα	38
A.2.4.	Λειτουργικός ρόλος των microRNAs	39
A.3.	Διάγνωση & θεραπεία της ΟΑ	40
A.4.	Τα microRNAs ως βιοδείκτες	42
A.5.	Τα microRNAs στην ΟΑ	45
A.6.	Σκοπός της εργασίας	47
 B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
B.1.	Υλικά και μέθοδοι	
B.1.1.	Συλλογή δειγμάτων	50
B.1.2.	Απομόνωση κυττάρων & καλλιέργειά τους	50
B.1.3.	Απομόνωση RNA	53
B.1.4.	Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (Complementary DNA,cDNA) ..	54
B.1.5.	Ανίχνευση μεταγράφων των υπό μελέτη miRNAs με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	56

B.1.6.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%	58
B.1.7.	Ποσοτικοποίηση των παραγομένων miRNA μεταγράφων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction- RT PCR)	58
B.1.8.	Στατιστική ανάλυση	62
B.1.9.	Βιοπληροφορική ανάλυση	62
B.2.	Αποτελέσματα	
B.2.1.	Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233 και miR-4284 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων	63
B.2.2.	Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των miR-140-3p και miR-671-3p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ κυττάρων προερχόμενων από τον υμένα	66
B.2.3.	Ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των μορίων- στόχων των διαφορετικά εκφραζόμενων microRNAs, καθώς και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται	66
B.3.	Συζήτηση	73
	Βιβλιογραφία	82

Περίληψη

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία εκφυλιστική, χρόνια διαταραχή των αρθρώσεων, η οποία αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες αναπηρίας και μία από τις συχνότερες παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος παγκοσμίως, με τον επιπολασμό της στον γενικό πληθυσμό άνω των 60 ετών να ανέρχεται σε 1 στα 4 άτομα. Πρόκειται για μία συστηματική, ετερογενή διαταραχή, πολύπλοκης αιτιολογίας και ποικίλους εντόπισης. Η πιο συχνή της μορφή είναι η ΟΑ γόνατος, καθώς επηρεάζει το 45 % του πληθυσμού και ακολουθούν η ΟΑ ισχίου και άκρας χείρας. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από πολλαπλούς φαινοτύπους, με προεξάρχοντες τον ηλικιοεξαρτώμενο, τον μετατραυματικό, τον φλεγμονώδη και τον μεταβολικό. Το ορόσημό της είναι ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, συνοδευόμενος από φλεγμονή στην περιοχή του υμένα, ασβεστοποίηση του υποχόνδριου οστού, αγγειακή διήθηση και δημιουργία οστεοφύτων.

Στην παθογένεση της ΟΑ συμμετέχουν ποικίλοι παράγοντες, με κυριότερους την ηλικία, το φύλο, τους τραυματισμούς και την παχυσαρκία, ενώ τελευταία ως αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται και τα microRNAs (miRNAs). Πρόκειται για μικρά, μη κωδικά μόρια RNA, μεγέθους ~ 25 nts, με ρόλους σε σημαντικές βιολογικές, μεταβολικές και βιοχημικές διεργασίες, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση μορίων mRNA- στόχων σε μεταμεταγραφικό επίπεδο, μέσω πρόσδεσης σε αυτά, οδηγώντας τα είτε σε αποδόμηση είτε σε μεταφραστική αποσιώπηση. Επιπλέον, τα microRNAs εμφανίζουν τοποειδική έκφραση, ενώ μπορούν να ανευρεθούν και στην κυκλοφορία. Χάρη σε αυτό τους το γνώρισμα, συνδυαστικά και με τη σταθερότητα που παρουσιάζουν και την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής τους επί παθολογικών καταστάσεων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους δείκτες πρόγνωσης και διάγνωσης της ΟΑ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της έκφρασης των miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233, miR-4284 σε κύτταρα προερχόμενα από αρθρικό χόνδρο και των miR-140-3p και miR-671-3p σε κύτταρα υμένα, προερχόμενα από υγιή άτομα και άτομα με οστεοαρθρίτιδα. Σε δεύτερη φάση η μελέτη περιλαμβάνει ανάλυση των κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των γονιδίων- στόχων των microRNAs που θα ανευρεθούν στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένα στους υπό μελέτη ΟΑ ιστούς, καθώς και των μοριακών μονοπατιών τα οποία επηρεάζουν, με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής.

Από την μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR, στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης στον χόνδρο παρατηρήθηκε για 3 από τα υπό μελέτη miRNAs (miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p), ενώ κανένα δεν εμφανίστηκε διαφοροποιημένο στον υμένα. Σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση, τα ανωτέρω miRNAs συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια του καταρράκτη της φλεγμονής, καθώς και του μεταβολισμού, υπογραμμίζοντας έτσι την καίρια σημασία τους τόσο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ όσο και στην εμφάνιση του μεταβολικού της φαινοτύπου.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a degenerative, chronic joint disorder which is well recognized as one of the major causes of disability, as well as one of the most common diseases of the musculoskeletal system, with a prevalence of 1 out of 4 adults older than 60 years of age in the general population. OA is a systemic and highly heterogeneous disorder of complex aetiology, which can affect many anatomical sites. The most common type is knee OA, since it affects 45 % of the population, with hip and hand OA following. It is characterised by the presence of multiple phenotypes, with the ageing- driven, post- traumatic, inflammation- related and metabolic being the most notable. The hallmark of OA is the progressive loss of the articular cartilage, accompanied by synovitis, calcification of the subchondral bone, vascular invasion and osteophyte formation.

A number of factors is involved in the pathogenesis of OA, with the main ones being age, sex, joint trauma and obesity. Lately, a new category of biological molecules with a possible implication in OA initiation and progression was proposed, the so- called microRNAs (miRNAs). MicroRNAs is a class of small, non- coding RNAs of about 25 nts, with a role in significant biologic, metabolic and biochemical processes. These molecules modulate the expression of their target mRNAs in a post-transcriptional manner, leading to translational silencing by binding to them. MiRNAs are characterised by spatial expression, but they can be found in circulation as well. Due to this feature, in combination with their stability and the alteration of their expression levels under pathologic conditions, they could be considered as potent prognostic and diagnostic markers of OA.

The aim of this study is 1) to investigate the expression levels of miR-33b-3p,

miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233, miR-4284 and miR-140-3p, miR-671-3p in cells isolated from articular cartilage and synovium of patients with OA, respectively, and to compare them with those of healthy individuals, and 2) with the use of bioinformatics tools to conduct analysis of the cellular and biological processes of the differentially expressed miRNAs target genes and analysis of the molecular pathways affected by these miRNAs.

According to the results of quantitative PCR, statistically significant reduction was observed for miR-140-3p, miR-150-5p and miR-671-3p on cartilage, while there was no statistically significant alteration on the expression levels of any of the investigated miRNAs on the synovium. As for the bioinformatics, the abovementioned differentially expressed microRNAs were shown to be involved in signaling inflammatory and metabolic pathways, highlighting their significance on the onset and progression of osteoarthritis as well as on its metabolic component.

A. ΓΕΝΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Οστεοαρθρίτιδα- Γενικές Πληροφορίες

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία σύνθετη, πολυπαραγοντική ασθένεια του μυοσκελετικού συστήματος η οποία θεωρείται ηλικιοεξαρτώμενη, καθώς εκδηλώνεται ως επί το πλείστον σε πιο προχωρημένη ηλικία¹⁻³. Δεν πρόκειται για μία εντοπισμένη νόσο, αλλά αφορά στην προσβολή ολόκληρης της άρθρωσης, συμπεριλαμβανομένων του χόνδρου, του αρθρικού υμένα, των τενόντων, των συνδέσμων και του υποχόνδριου οστού^{4,5}. Γενικά μπορεί να παρατηρηθεί σε οποιαδήποτε άρθρωση, αν και συνηθέστερα προσβάλλονται οι αρθρώσεις των άνω και κάτω άκρων, με κυριότερες αυτές της άκρας χείρας και των δακτύλων και του γόνατος και των ισχίων, αντίστοιχα, καθώς και η σπονδυλική στήλη, ενώ συχνά η προσβολή μίας άρθρωσης συνοδεύεται από εκδήλωση διαταραχής και σε μία ή περισσότερες άλλες, κατάσταση που ορίζεται ως γενικευμένη οστεοαρθρίτιδα.

Η ΟΑ μπορεί να εμφανιστεί είτε ως ιδιοπαθής διαταραχή σχετιζόμενη με την ηλικία είτε ως δευτεροπαθής πυροδοτούμενη από μία πλειάδα άλλων παραγόντων. Η δευτεροπαθής ΟΑ μπορεί να αναπτυχθεί στα πλαίσια προϋπάρχοντος τραυματισμού⁶, συνδυαστικά με άλλη ασθένεια ή παθολογική κατάσταση (π.χ επί παχυσαρκίας) ή ως απόρροια φλεγμονωδών, αναπτυξιακών, μεταβολικών ή γενετικών διαταραχών. Στην οικογενή της μορφή παρουσιάζεται ως σπάνια, κληρονομική διαταραχή, εκδηλώνεται σε υγιείς αρθρώσεις χωρίς προϋπάρχον τραύμα ή ανατομική ανωμαλία, οφείλεται σε έλλειψη ή δυσλειτουργία ενός και μόνο γονιδίου και συνηθέστερα είναι πρώιμης έναρξης.

A.1.1. Επιδημιολογικά Στοιχεία

Η αρθρίτιδα κατατάσσεται ως μία από τις πιο κοινές, χρόνιες παθήσεις με περίπου 1 στους 5 Αμερικανούς να πάσχουν από κάποια μορφή της^{7,8}, ενώ και οι προβλέψεις για το μέλλον είναι ιδιαίτερος ανησυχητικές και κάνουν λόγο για περαιτέρω αύξηση του αριθμού των προσβεβλημένων ενηλίκων, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι το 2040 το ποσοστό των ατόμων με αρθρίτιδα στην Αμερική θα αυξηθεί περίπου κατά 50 % και θα φτάσει στα 78,4 εκατομμύρια⁹.

Η οστεοαρθρίτιδα συγκαταλέγεται στις 10 κυριότερες αιτίες αναπηρίας στις ανεπτυγμένες χώρες¹⁰ και παρά το γεγονός ότι είναι δύσκολο να διενεργηθούν επιδημιολογικές μελέτες για τον υπολογισμό του επιπολασμού της στο γενικό πληθυσμό, τόσο λόγω της δυσκολίας ακριβούς διάγνωσής της, εξαιτίας και της ποικίλους εντόπισής της όσο και λόγω του ότι πολλές περιπτώσεις ασθενών υποδιαγιγνώσκονται, εντούτοις φαίνεται ότι προσεγγιστικά 1 στους 10 ενήλικες άνω των 60 ετών πάσχει από κάποια μορφή πόνου στις αρθρώσεις που θα μπορούσε να αποδοθεί σε ΟΑ¹¹, με το 9,6 % των ανδρών και το 18 % των γυναικών να εκδηλώνουν συμπτωματική ΟΑ μετά την ηλικία των 60 σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO)¹⁰. Επιπλέον στοιχεία αναφέρουν ότι ο εφ' όρου ζωής κίνδυνος εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας ισχίου είναι 25,3 % (18,5 % και 28,6 % αντίστοιχα για άνδρες και γυναίκες)¹², με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος να είναι σαφώς υψηλότερος και να προσεγγίζει το 45 %¹³, ενώ μελέτη του 2017 ανέδειξε και την ΟΑ άκρας χείρας ως μία σοβαρή μορφή οστεοαρθρίτιδας, με τον κίνδυνο εμφάνισής της να ανέρχεται στο 39,8 % και τις γυναίκες να απειλούνται σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τους άνδρες (1/2 έναντι 1/4)¹⁴.

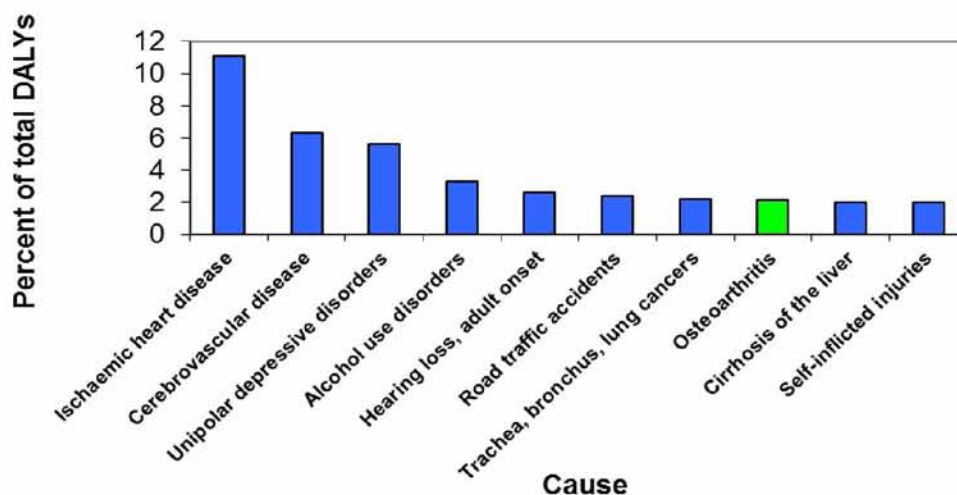
Μελέτη που δημοσεύτηκε το 2016 σχετικά με την επίπτωση 310 παθολογικών καταστάσεων στην ποιότητα ζωής και την πρόκληση αναπηρίας, ανέδειξε την οστεοαρθρίτιδα στην 13^η θέση στην κατάταξη με τις 30 κυριότερες αιτίες YLDs (years lived with disability) παγκοσμίως, με τις παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος ευρύτερα να κατατάσσονται στην τρίτη θέση των YLDs, μετά τις νοητικές και συμπεριφορικές διαταραχές και την ΟΑ γόνατος και ισχίου να αποτελούν δύο από τις κυριότερες παθήσεις στην κατηγορία των μυοσκελετικών διαταραχών¹⁵. Επιπλέον, η ΟΑ στη διάρκεια της δεκαετίας 2005- 2015 παρουσίασε αύξηση της τάξης του 34,8 %¹⁶ στην κλίμακα YLDs, ενώ συγκεντρωτικά η αύξηση που παρατηρήθηκε στο διάστημα 1990- 2013, προσεγγίζει το 72 %¹⁷.

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα από 7 διαφορετικές χώρες της Ευρώπης είναι προφανές ότι ο επιπολασμός, δηλαδή η συχνότητα εμφάνισης, της κλινικά διεγνωσμένης ΟΑ γενικά ποικίλει και κυμαίνεται από < 5 % στη Ρουμανία μέχρι 25 % στην Ουγγαρία, ενώ με βάση την κλίμακα DALYs (Disability Adjusted Life Years), η οποία αποτελεί ένα μέτρο για τον προσδιορισμό της νοσηρότητας και

της θνησιμότητας, η οστεοαρθρίτιδα κατάσσεται στην 8^η θέση μεταξύ των αιτιών νόσου, όπως αυτές υπολογίστηκαν μέσα από έρευνες στις 25 χώρες- μέλη της ΕΕ¹¹ (Πίνακας 1).

Η οστεοαρθρίτιδα στην Ελλάδα, σύμφωνα με έρευνα του 2002 του Ελληνικού Ιδρύματος Ρευματολογικών Παθήσεων, εμφανίζεται με συχνότητα της τάξης του 13,1 %¹⁸ έως 17,82 % (σύμφωνα με μία πιο πρόσφατη μελέτη που αφορούσε σε κατοίκους του κεντρικού τομέα της χώρας)³, συνολικά και ανεξαρτήτως ανατομικής εντόπισης. Ειδικότερα, στη χώρα μας η άρθρωση του γόνατος είναι αυτή που προσβάλλεται πιο συχνά από ΟΑ, καθώς εντοπίζεται στο 6 % των ενηλίκων, ενώ όσον αφορά στην άκρα χείρα και το ισχίο η συχνότητα είναι σχετικά μικρότερη και αγγίζει το 2 % και 0,9 %, αντίστοιχα². Παρόμοια με τα παραπάνω, με μικρές μόνο αποκλίσεις, είναι και τα αποτελέσματα της μελέτης που αφορά στον πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας, όπως αυτά δημοσιεύτηκαν από τους Αναγνωστόπουλου και συν³.

Leading causes of burden of disease (DALYs) in EU25, 2004



Πίνακας 1: Οι κυριότερες αιτίες DALYs στην Ευρώπη το 2004 (ελήφθη από: EUMUSC. *Musculoskeletal Health in Europe*. 12 (2013). Available at: <http://eumusc.net/myUploadData/files/30 August Final draft report.pdf>)

A.1.2. Κοινωνικές & Οικονομικές Παράμετροι της ΟΑ

Άτομα με οστεοαρθρίτιδα εκτός από τη συμπτωματολογία της νόσου, καλούνται να αντιμετωπίσουν δυσκολίες και εμπόδια στην προσωπική, κοινωνική και επαγγελματική τους ζωή. Πιο συγκεκριμένα, η νόσος επηρεάζει σημαντικά την καθημερινότητα των ασθενών, καθώς συνδέεται άμεσα με περιορισμούς στην κινητικότητα, δυσκολία στη βάδιση, επίπονη εκτέλεση απλών, καθημερινών δραστηριοτήτων εντός και εκτός της οικίας, ενώ συχνά άτομα προχωρημένης κυρίως ηλικίας έχουν άμεση ανάγκη βοήθειας από άλλους ανθρώπους^{19,20}. Με βάση στοιχεία του ΠΟΥ ποσοστό μεγαλύτερο του 80 % των ατόμων με ΟΑ εμφανίζουν δυσκολία στην κίνηση με το 1/4 αυτών να αδυνατούν να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις της καθημερινότητας¹⁰.

Πέρα όμως από την επιβάρυνση τόσο σε σωματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, βαρύτερος είναι ο αντίκτυπος της εν λόγω μυοσκελετικής διαταραχής όχι μόνο για τον ίδιο τον ασθενή και την οικογένειά του^{19,21}, αλλά σε μεγάλο βαθμό και για το κράτος, το οποίο καλείται να καλύψει σε μεγάλο βαθμό τα υψηλά κόστη αντιμετώπισης της ΟΑ- φαρμακευτικής και χειρουργικής- την νοσηλεία και τις ιατροφαρμακευτικές δαπάνες που προκύπτουν²². Επιπλέον, δε θα πρέπει να υποβαθμίζεται και η κοινωνική παράμετρος της νόσου, καθώς οι ασθενείς με μυοσκελετικές παθήσεις γενικότερα, και ΟΑ ειδικότερα, ενδέχεται να εμφανίζουν μειωμένη αποδοτικότητα στην εργασία τους ή/ και να απουσιάζουν αρκετές μέρες από αυτήν λόγω της υποκείμενης συμπτωματολογίας^{13,21} ή/ και να συνταξιοδοτούνται πρόωρα²². Με βάση τα στοιχεία του CDC, το 43,5 % των Αμερικανών με κάποια μορφή αρθρίτιδας αντιμετωπίζει περιορισμούς είτε στην καθημερινή είτε στην επαγγελματική του δραστηριότητα²³, με τις προβλέψεις να κάνουν λόγο για αξιοσημείωτη αύξηση των εν λόγω δυσκολιών τις επόμενες δεκαετίες ακόμα και κατά ~ 50 %⁹.

A.1.3. Η ΟΑ ως μία Πολυπαραγοντική Ασθένεια

Στην παθογένεση της νόσου συμμετέχουν κυρίως η μηχανική καταπόνηση και οι τραυματισμοί στην περιοχή της άρθρωσης^{6,24}, αλλά και άλλοι μη μηχανικοί

παράγοντες όπως το φύλο^{2,3,24-26}, η εθνικότητα²⁷, η ηλικία¹⁻³, οι διατροφικές συνήθειες συνδυαστικά με τον τρόπο ζωής- παχυσαρκία^{2,24,25,28-30} και το μεταβολικό σύνδρομο^{3,28}, ενώ δεν αποκλείεται και η συμμετοχή γενετικών παραμέτρων (Εικόνα 1).

Το φύλο φαίνεται να σχετίζεται με την εκδήλωση οστεοαρθρίτιδας, με την νόσο να παρουσιάζει κάποιου βαθμού προτίμηση στις γυναίκες^{2,3,25}, εύρημα το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και μέσα από μετα- αναλύσεις^{24,26}.

Αναφορικά με την εξαρτώμενη από την ηλικία φύση της ΟΑ μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες ο κίνδυνος εμφάνισής της σε περιοχές όπως το γόνατο και το ισχίο αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 50 ετών μέχρι και τα 75 οπότε και παρατηρείται μείωση του κινδύνου^{2,3,30}, ενώ ειδικά για την περίπτωση οστεοαρθρίτιδας στα χέρια οι περι- και μετ- εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (50 έως 60 ετών) εμφανίζουν χαρακτηριστικά υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τους άνδρες. Σε κάθε περίπτωση, η υπεροχή του επιπολασμού στο γυναικείο φύλο είναι έκδηλη^{2,3,28,31}.

Όσον αφορά στο γενετικό υπόστρωμα της νόσου έχουν περιγραφεί κληρονομήσιμες αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως είναι οι χονδροδυσπλασίες, οφειλόμενες σε μεταλλάξεις γονιδίων σχετιζόμενων με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, μεταγραφικούς και αυξητικούς παράγοντες, ή/ και αλλαγές στη διαφοροποίηση ή/ και λειτουργία των χονδροκυττάρων, οι οποίες σχετίζονται σημαντικά με την εμφάνιση ΟΑ. Επίσης, επί ύπαρξης διαταραχών στα στάδια της χονδρογένεσης ή της ανάπτυξης των αρθρώσεων προάγεται η εμφάνιση της νόσου. Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις η νόσος είναι πρόιμης έναρξης, με νεαρή ηλικία αρχικής εκδήλωσης συμπτωμάτων.

Μεταξύ των άλλων παραγόντων και η γήρανση φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση της νόσου, καθώς επιφέρει σταδιακή καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας με αλλαγές στη δομή, τη σύσταση και την οργάνωση των βασικών της συστατικών, με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται οι εμβιομηχανικές της ιδιότητες^{32,33}. Επιπλέον, αλλαγές επέρχονται και στα ίδια τα κύτταρα του χόνδρου, με μελέτες να δείχνουν ότι οι αναβολικές τους ιδιότητες μειώνονται με την ηλικία^{34,35},

πιθανόν λόγω μετάπτωσής τους στη φάση της αναδιπλασιαστικής γήρανσης³⁶, με επακόλουθο μειωμένη αποκατάσταση των βλαβών που προκύπτουν³³.

Σε κάθε περίπτωση, όμως, ο βασικότερος τρόπος ανάπτυξης και εξέλιξης της ΟΑ είναι μέσω της «φυσιολογικής χρήσης» μίας ήδη προσβεβλημένης- ευαίσθητης άρθρωσης ή η έντονη καταπόνηση μίας κατά τα άλλα «υγιούς άρθρωσης»^{6,37}, καταστάσεις οι οποίες οδηγούν σε διαταραχή της συνοχής ή/ και της λειτουργικότητας της άρθρωσης ή/ και του περιβάλλοντός της.

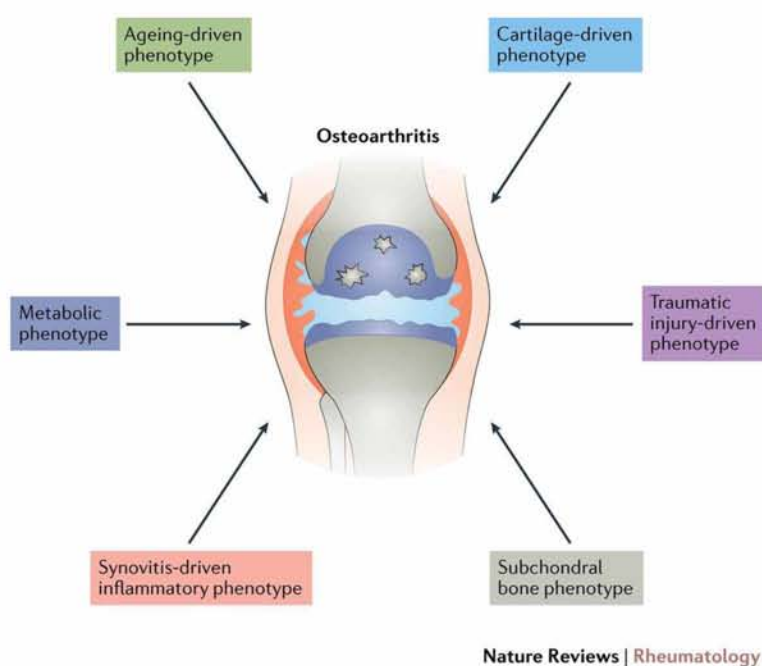


Εικόνα 1: Παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση ΟΑ

A.1.4. ΟΑ & Μεταβολικό Σύνδρομο

Πλέον είναι ξεκάθαρο ότι η ΟΑ αποτελεί μία συστηματική, κατ'εξοχήν ετερογενή πάθηση του μυοσκελετικού που περικλείει και κάποιου βαθμού φλεγμονώδες υπόστρωμα. Η ετερογένειά της οφείλεται στο ότι τόσο η εμφάνιση και ανάπτυξη όσο και η εξέλιξή της συνοδεύονται από διάφορους φαινοτύπους, καθένας εκ των οποίων έχει διαφορετική συμβολή στην τελική εικόνα και διεγείρεται από

διαφορετικούς παράγοντες. Οι χαρακτηριστικότεροι φαινότυποι που έχουν αποδοθεί στην ΟΑ είναι ο ηλικιοεξαρτώμενος- σχετιζόμενος με γήρανση, ο μετατραυματικός, ο γενετικός και ο φλεγμονώδης, ενώ εδώ και αρκετά χρόνια, με διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον μελετάται και η συμβολή του μεταβολικού φαινοτύπου³⁸ (Εικόνα 2). Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία του μεταβολικού φαινοτύπου συγκαταλέγεται μια σειρά από διαφοροποιήσεις σε μεταβολικά μονοπάτια όχι μόνο των χονδροκυττάρων, αλλά και των κυττάρων της περιοχής του υμένα, οι οποίες τελικά με κάποιον τρόπο συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση και την ενισχύουν περαιτέρω.



Εικόνα 2:

Οι πολλαπλοί φαινότυποι της ΟΑ (ελήφθη από: *The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. Mobasheri, A. et al. Nat. Rev. Rheumatol. 13, 302 (2017)*)

Η μεταβολική ΟΑ είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού κάποιων ή και όλων των παθολογικών χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου (MetS), το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσλιπιδαιμία, διαταραχές της γλυκόζης- αντίσταση στην ινσουλίνη, παχυσαρκία και υπέρταση, παράγοντες οι οποίοι συνδυαστικά αλλά και μεμονωμένα συμβάλλουν στην εκδήλωση καρδιαγγειακής νόσου και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Με καρδιαγγειακή και στεφανιαία νόσο³⁹, καθώς και με αυξημένη θνησιμότητα μεταξύ των ασθενών έχει συσχετιστεί και η ΟΑ⁴⁰, γεγονός το οποίο ενισχύει ακόμα περισσότερο τη σχέση ΟΑ- MetS και την αλληλεπίδραση που έχει η μία στην εμφάνιση ή/ και έκβαση της άλλης.

Η ΟΑ και το μεταβολικό σύνδρομο μοιράζονται κάποιους από τους βασικότερους αιτιολογικούς τους παράγοντες, όπως η ηλικία και ο δείκτης μάζας σώματος. Ο επιπολασμός του MetS στον πληθυσμό είναι αρκετά υψηλός και κυμαίνεται γύρω στο 24 %^{41,42}, με μελέτες να δείχνουν ότι είναι σημαντικότερα αυξημένος μεταξύ ατόμων με ΟΑ, στα οποία και υπερδιπλασιάζεται⁴³. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας είναι συχνότερη σε άτομα με πλήρως εκδηλούμενο MetS ή ακόμα και επί ύπαρξης κάποιων από τα χαρακτηριστικά του συμπτώματα (όπως υπεργλυκαιμία, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία)^{43,44} και μάλιστα συνοδεύεται από εμφάνισή της σε νεαρότερη ηλικία από αυτήν της τυπικής μορφής ΟΑ (δηλαδή < 65 έτη) με γενικευμένη παθολογία, έντονη φλεγμονή⁴⁵ και αυξημένα επίπεδα πόνου⁴⁶ και άρα δυσλειτουργικών αρθρώσεων⁴⁷.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στην αιτιολογία της ΟΑ υπάγεται και η παχυσαρκία, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίον επηρεάζει την εμφάνισή της. Μία πιθανή εξήγηση είναι η εναπόθεση αυξημένου φορτίου σε αρθρώσεις που στηρίζουν το σώμα, όπως αυτές του γόνατος, του ισχίου και της σπονδυλικής στήλης σε παχύσαρκα άτομα που μακροπρόθεσμα οδηγεί σε βλάβη ή/και δυσλειτουργία των εν λόγω αρθρώσεων. Η παραπάνω άποψη, ωστόσο, φαίνεται να έχει εγκαταληφθεί πλήρως καθώς επί παχυσαρκίας έχει διαπιστωθεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας και σε ανατομικές περιοχές που δε φέρουν το βάρος του σώματος, όπως οι αρθρώσεις της άκρας χείρας και της καρπιαίας περιοχής^{29,48,49}. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση, η συσχέτιση παχυσαρκίας- ΟΑ μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες, κυρίως φλεγμονώδεις, που απελευθερώνονται στα πλαίσια αυτής της παθολογικής οντότητας και που με κάποιον τρόπο αλληλεπιδρούν με κύτταρα στην περιοχή της άρθρωσης, ενισχύοντας το φλεγμονώδες υπόστρωμα της ΟΑ. Επί παχυσαρκίας παρατηρείται αύξηση του λιπώδους ιστού και δυσλειτουργία του, ενώ υπάρχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η αυξημένη συσσώρευση λίπους ειδικά στην κοιλιακή περιοχή ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη συσχέτιση ΟΑ- παχυσαρκίας^{44,50}. Επιπλέον, στα πλαίσια παχυσαρκίας τα λιποκύτταρα εμφανίζονται υπερπλαστικά, υπετροφικά και χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων,

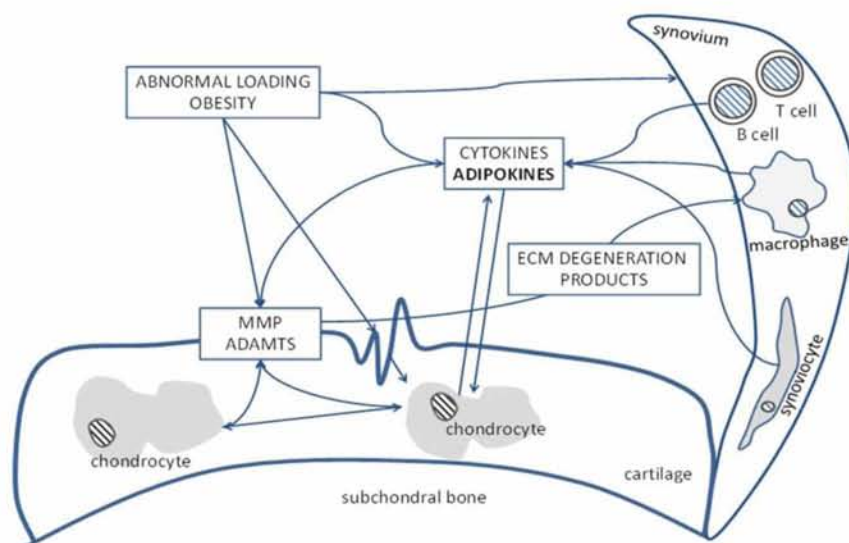
όπως φλεγμονώδεις κυτταροκίνες⁵¹ και αδιποκίνες. Οι αδιποκίνες αποτελούν μία κατηγορία ορμονών εκκρινόμενων από τον λευκό λιπώδη ιστό, οι οποίες ασκούν τη φλεγμονώδη δράση τους με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο. Επιπλέον, εμφανίζουν πλειοτροπισμό, με τη συμμετοχή τους τόσο σε ποικίλα βιολογικά δίκτυα, όπως αυτά της ανοσίας, της ομοιόστασης, της ρύθμισης της πίεσης του αίματος και του μεταβολισμού λιπιδίων και γλυκόζης, όσο και σε βιολογικές λειτουργίες όπως η αναπαραγωγή, η αγγειογένεση και η οστεογένεση, να είναι καθοριστικής σημασίας⁵². Οι γνωστότερες αδιποκίνες είναι η λεπτίνη (leptin), η ρεσιστίνη (resistin), η βισφατίνη (visfatin) και η αδιπονεκτίνη (adiponectin) και πλέον συγκαταλέγονται στους συστηματικούς παράγοντες που συνεπικουρούν στην ανάπτυξη παθολογίας στις αρθρώσεις⁵³.

Η λεπτίνη είναι από τις πρώτες αδιποκίνες, τα επίπεδα της οποίας μελετήθηκαν στην ΟΑ, με τους Dumond και συν. να αποδεικνύουν την παρουσία της τόσο στο αρθρικό υγρό όσο και την αυξημένη έκφρασή της σε ΟΑ χονδροκύτταρα, αποδίδοντάς της με αυτόν τον τρόπο έναν πιθανό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των χονδροκυττάρων⁵⁴. Τόσο η λεπτίνη όσο και ο υποδοχέας της ανευρίσκονται φυσιολογικά στην επιφάνεια των χονδροκυττάρων, με πιθανούς ρόλους στην επικοινωνία, τη μεταγωγή σήματος, τον αναβολισμό αλλά και τον καταβολισμό^{55,56}. Τα επίπεδα της λεπτίνης^{57,58}, αλλά και των υπολοίπων αδιποκινών έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη ΟΑ^{50,59}.

Η παχυσαρκία συνοδεύεται και από κλινικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με διαταραγμένο λιπιδιακό προφίλ, όπως είναι τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων και οξειδωμένων χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (ox- LDL)⁶⁰. Στα πλαίσια διερεύνησης της συμμετοχής του διαταραγμένου λιπιδιακού προφίλ στην ανάπτυξη της ΟΑ, ολοένα και περισσότερες έρευνες στρέφονται στη μελέτη της LDL χοληστερόλης και στους υποδοχείς της. Επί αυξημένων επιπέδων λιπιδίων στο αίμα έχει βρεθεί αυξημένη εναπόθεσή τους και στα χονδροκύτταρα στα αρχικά στάδια ΟΑ^{61,62}, ενώ επιπλέον, μελέτες έχουν διαπιστώσει διαφοροποιημένη έκφραση γονδίων και πρωτεϊνών σχετιζόμενων με το μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως το PPAR, τόσο σε απομονωμένα χονδροκύτταρα όσο και σε πρωτεομικές

αναλύσεις⁶³⁻⁶⁵, με τον υποδοχέα της οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης 1 (LOX-1) να εκφράζεται σε ΟΑ όχι όμως και σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα⁶⁶. Τα απορρυθμισμένα επίπεδα της LDL συμβάλλουν στις διαδικασίες εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου μέσω επαγωγής διαδικασιών όπως η δημιουργία οστεοφύτων και η απελευθέρωση μεταλλοπρωτεασών⁶⁷. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής της διαταραγμένης ομοιόστασης των λιπιδίων στην εμφάνιση και ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας. Ειδικά η οξειδωμένη μορφή LDL (ox-LDL) φαίνεται να είναι αυτή που σχετίζεται ισχυρότερα με την παθογένεση της ΟΑ, καθώς διαθέτει εντονότερες προφλεγμονώδεις ιδιότητες⁶⁸.

Τέλος, ο μεταβολικός φαινότυπος της ΟΑ πιθανότατα σχετίζεται και με τη διήθηση της περιοχής του υμένα από μακροφάγα⁶⁹, τα οποία όπως είναι γνωστό έχουν ισχυρή συμμετοχή στις φλεγμονώδεις διαδικασίες (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Επίδραση της

παχυσαρκίας στην ευρύτερη περιοχή της άρθρωσης. Ξεχωρίζουν η απελευθέρωση μεταλλοπρωτεασών (ADAMTS, MMPs), αδιποκινών και κυτταροκινών και η δράση τους σε οστό, χόνδρο και υμένα και η παρουσία μακροφάγων στον υμένα (ελήφθη από: *Is osteoarthritis a metabolic disorder?* Kluzek, S., Newton, J.

L. & Arden, N. K. Br. Med. Bull. 115, 111-21 (2015))

A.1.5. Αρθρικός Χόνδρος: Δομή- Μορφολογία & Σύσταση

Ο αρθρικός (ή υαλοειδής) χόνδρος είναι ένας συνδετικού τύπου ελαστικός ιστός, ο οποίος καλύπτει τα οστά στην περιοχή της άρθρωσης και χαρακτηρίζεται από δύο βασικές ιδιότητες. Κατ' αρχάς, διευκολύνει την κίνηση των αρθρώσεων μειώνοντας τις τριβές μεταξύ των οστών χάρη στη λεία επιφάνεια που διαθέτει και στη λίπανση που παρέχει στην περιοχή και επιπλέον, απορροφά τους κραδασμούς και κατανέμει ομοιόμορφα τη μηχανική πίεση. Η ομοιόσταση του αρθρικού χόνδρου και η παροχή θρεπτικών συστατικών για τη διατήρηση και ανάπτυξη του επιτυγχάνονται χάρη στην άσκηση μηχανικής πίεσης, η οποία διεγείρει την κυκλοφορία υγρών στην περιοχή μεταξύ χόνδρου και υμένα, εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτόν τη λίπανσή τους⁷⁰.

Ο χόνδρος συνίσταται από την εξωκυττάρια ουσία (ECM, extracellular matrix) και μόλις έναν κυτταρικό τύπο. Τα δομικά συστατικά της ECM είναι το νερό σε συνδυασμό με μακρομοριακά στοιχεία στα οποία συγκαταλέγονται κολλαγόνα διαφόρων τύπων, πρωτεογλυκάνες και άλλες μη σχετιζόμενες με το κολλαγόνο πρωτεΐνες, όπως ντεκορίνη (decorin), ματριλίνη (matrilin), ινωμοντουλίνη (fibromodulin) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο COMP (cartilage oligomeric matrix protein). Τα κυριότερα συστατικά της, ωστόσο, είναι η αγκρεκάνη και τρεις τύποι κολλαγόνου που δημιουργούν το υποστηρικτικό δίκτυο του χόνδρου, οι II, IX και XI, με την πρώτη μορφή κολλαγόνου να ανευρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση. Επιπλέον, η εξωκυττάρια ουσία στερείται αγγείων, λεμφαγγείων και νεύρων και αποτελείται αποκλειστικά από χονδροκύτταρα, ενώ παρουσιάζει υψηλού βαθμού δομική και κυτταρική οργάνωση. Τυπικά διακρίνεται σε δύο βασικές περιοχές. Η μεν άνω είναι πιο ευρεία, αποτελούμενη από μη ασβεστοποιημένο ιστό και διακρίνεται αδρά σε 3 ζώνες: την επιφανειακή (όπου επικρατεί το κολλαγόνο, με την πρωτεογλυκάνη να βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση⁷¹), την ενδιάμεση και την ακτινωτή ή εν τω βάθει, με τα όρια μεταξύ τους να είναι σχετικά χαλαρά και να μη διακρίνονται σαφώς. Η δεύτερη περιοχή καταλαμβάνει μικρότερη έκταση και αφορά σε μία λεπτή ζώνη, πλούσια σε ασβέστιο, εκτεινόμενη μεταξύ της μη ασβεστοποιημένης- από την οποία και διακρίνεται μέσω μίας δομής καλούμενης tidemark- και του υποχόνδριου οστού, ενώ εντός των ορίων της μπορεί να

παρατηρηθεί και κάποιου βαθμού αγγείωση. Κατά μήκος των διαφόρων υποπεριοχών παρατηρείται διαφορετικού βαθμού κυτταρική ωρίμανση και μορφολογία, ενώ διαφορετικός είναι ο βαθμός έκφρασης και η λειτουργία τους^{70,72}. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η εξωκυττάρια ουσία διατηρείται σε μία κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, με τις αναβολικές διεργασίες να εξισώνονται με τις καταβολικές⁷³.

A.1.6. Χονδροκύτταρα

Τα χονδροκύτταρα καταλαμβάνουν μόλις το 5% της έκτασης του αρθρικού χόνδρου, προέρχονται από αδιαφοροποίητα προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα και έχουν ως βασικό τους ρόλο τη διαμόρφωση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας, μέσω της σύνθεσης των συστατικών της, καθώς και τη διατήρηση της λειτουργικότητας και ομοιοστασίας της⁷⁴.

Η βιοσύνθεση των δομικών συστατικών της ECM είναι μία αναβολική διαδικασία που εκτελείται με αργό ρυθμό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα χονδροκύτταρα παραμένουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε μία μετα- μιτωτική φάση «αδράνειας» (quiescent), χαρακτηριζόμενα από χαμηλή μεταβολική και αναγεννητική ικανότητα, με την πολλαπλασιαστική τους δεινότητα να μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου⁷⁰. Θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως μία ιδιαίτερη κατηγορία κυττάρων, λόγω του ότι μπορούν και επιβιώνουν φυσιολογικά σε σχετικά υποξικές συνθήκες, οι οποίες τα βοηθούν να παράγουν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας και ειδικότερα κολλαγόνο τύπου II και αγκρεκάνη, ενώ επιπλέον στερούνται αγγείωσης^{75,76}, χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη διατήρηση του περιβάλλοντος του χόνδρου, καθώς σε αυτές τις συνθήκες η έκφραση και η απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων είναι μειωμένες^{70,77}.

A.1.7. Χονδρογένεση

Το πρώτο στάδιο στην ανάπτυξη της άρθρωσης είναι η δημιουργία του

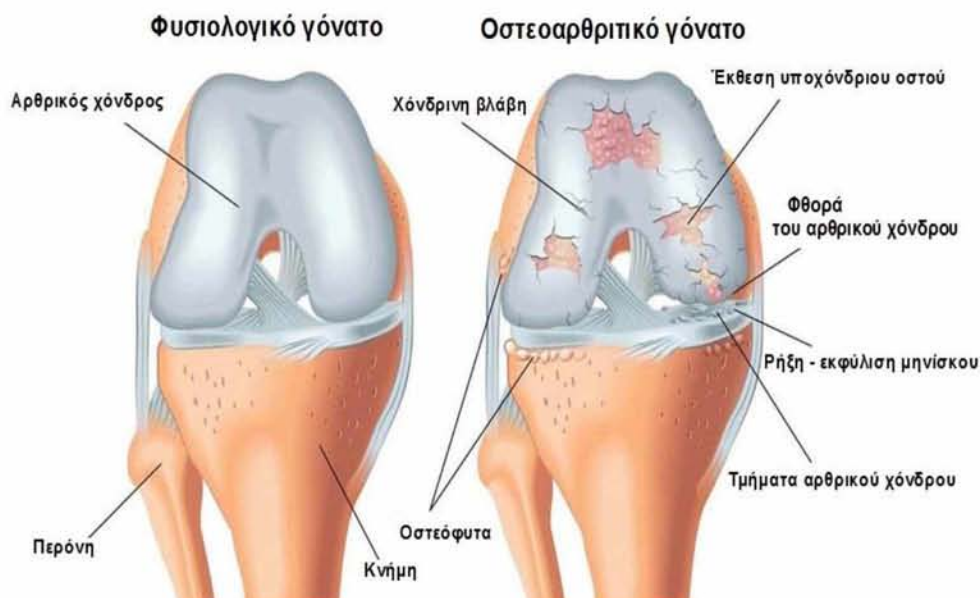
χόνδρου, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται χονδρογένεση, η οποία ξεκινάει από την επαγόμενη από το παρακείμενο επιθήλιο διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς χονδροκύτταρα και ακολουθεί το στάδιο της αρθρικής ανάπτυξης. Σε πρώτη φάση τα μεσεγχυματικά κύτταρα υφίστανται συμύκνωση, διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, ακολούθως αυτά πολλαπλασιάζονται, υφίστανται τελική διαφοροποίηση προς υπερτροφικά χονδροκύτταρα και στη συνέχεια οδηγούνται σε απόπτωση⁷⁸. Στη φάση της συμύκνωσης λαμβάνει χώρα παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας όπως είναι το κολλαγόνο τύπου I και ΙΑ (μέσω της έκφρασης του γονιδίου COL2A) και στη συνέχεια, τα διαφοροποιημένα πλέον χονδροκύτταρα αναλαμβάνουν τη σύνθεση της πλούσιας σε αγκρεκάνη και υαλουρονάνη ECM, με συνακόλουθη μετατροπή του κολλαγόνου ΙΑ στην ώριμη μορφή του (κολλαγόνο τύπου ΙΒ, με έκφραση του γονιδίου COL2B)⁷⁹.

Η δημιουργία και ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου είναι μία κατ' έξοχήν αναβολική διαδικασία, με τη σύνθεση της ECM να διεγείρεται από αναβολικές κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως ο IGF- 1 (insulin growth factor- 1), οι TGFs (transforming growth factors), οι FGFs (fibroblast growth factors) και οι BMPs (bone morphogenetic factors), με τα μόρια αυτά να είναι απαραίτητα σε διεργασίες όπως η χονδρογένεση, η οστεοποίηση και η διατήρηση της ομοιόστασης στην περιοχή του χόνδρου⁷⁹.

Η χονδρογένεση λαμβάνει χώρα κυρίως κατά την εμβρυογένεση, μπορεί όμως να παρατηρηθεί και στους ενήλικες κατά τη φάση επούλωσης τραυμάτων και καταγμάτων, ενώ η ανάπτυξη των μακρών οστών επιτελείται μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Στη διάρκεια της διαδικασίας αυτής λαμβάνει χώρα τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, τα οποία αποκτούν υπερτροφικό φαινότυπο και ουσιαστικά ο αρθρικός χόνδρος ασβεστοποιείται και αντικαθίσταται από οστό. Ενδείξεις υπερτροφίας αποτελούν το μεγάλο μέγεθος των κυττάρων, η αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου X (COL10A1)⁸⁰ και μεταλλαπωτεάσης- 13 (MMP -13), με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης κολλαγόνου τύπου ΙΙ, ενώ παράλληλα, επιτελούνται και άλλες διαδικασίες όπως η εναπόθεση ασβεστίου στην εξωκυττάρια ουσία, η οστεοποίηση και η αγγειακή διήθηση, μέσω της διαδικασίας της αγγειογένεσης^{79,81}.

A.1.8. Οστεοαρθρίτιδα: Παθοφυσιολογικά Χαρακτηριστικά & Κλινική Εικόνα

Το ορόσημο της ΟΑ είναι ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου και η αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου II³². Τα κυριότερα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η απώλεια του αρθρικού χόνδρου, η διόγκωση στην περιοχή του υμένα⁸²⁻⁸⁴, η αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού⁸⁵ με εμφανή την παρουσία σκληρωτικών περιοχών⁸⁶, με συνακόλουθη αγγειακή διήθηση^{82,84}, ίνωση^{84,87}, ασβεστοποίηση του χόνδρου και δημιουργία οστεοφύτων^{83,87}, η παρουσία των οποίων μάλιστα αποτελεί χαρακτηριστικό διαφοροδιαγνωστικό εύρημα της ΟΑ από άλλες μορφές αρθρίτιδας, καθώς και η έντονη φλεγμονή στην ευρύτερη περιοχή της άρθρωσης, με συνοδά κλινικά χαρακτηριστικά τον χρόνιο, έντονο πόνο, την εμφάνιση δυσκαμψίας και δυσκολίας στην κίνηση, ενώ σταδιακά επέρχεται απώλεια της λειτουργικότητας της άρθρωσης, με ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών να εκδηλώνει κάποιου βαθμού αναπηρία (Εικόνες 4, 5, 6).



Εικόνα 4: Εικόνα φυσιολογικής άρθρωσης γόνατος (αριστερά) και επί ΟΑ (δεξιά) (ελήφθη από:

Οστεοαρθρίτιδα γόνατος και σύγχρονες μέθοδοι θεραπείας - Ygeiaonline.gr. Available at:

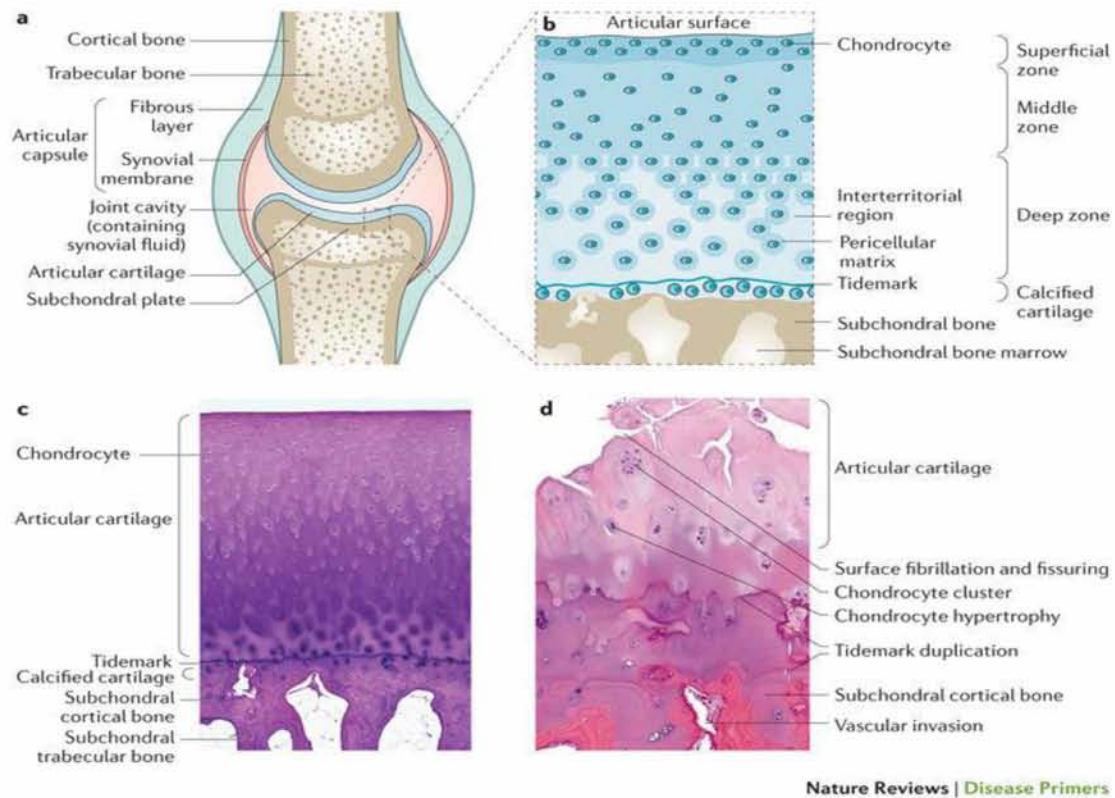
<http://www.ygeiaonline.gr/ta-panta-gia-tin-ygeia/arthra-ygeias/130-orthopedic/19012-osteoarthritis-gonatos-kai-synchrones-methodoi-therapeias>. (Accessed: 9th September 2017))

Η νόσος αρχίζει να εκδηλώνεται όταν διαταραχθεί η δυναμική ισορροπία που διατηρείται στην περιοχή του χόνδρου, η οποία σηματοδοτείται από την αδυναμία αντιστάθμισης των καταβολικών διεργασιών αποδόμησης από τη βιοσυνθετική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων για αποκατάσταση των βλαβών και με τον τρόπο αυτόν ξεκινάει ο εκφυλισμός του ιστού, με βασικότερα χαρακτηριστικά την αναστολή της σύνθεσης της ECM και τη σταδιακή της διάβρωση.

Γενικά, σε φυσιολογικό περιβάλλον άρθρωσης οι βιομηχανικές πιέσεις που ασκούνται έχουν αντίκτυπο τόσο στη διατήρηση της ακεραιότητάς της όσο και στις διαδικασίες εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου. In vivo μελέτες σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι η ακινητοποίηση των αρθρώσεων οδηγεί σε ευρύτερη καταστροφή του χόνδρου, με εξασθένηση των συστατικών της ECM, δημιουργία ίνωσης και εμφάνιση διαβρωτικών σημείων^{88,89}, με σημαντική συμβολή στις διαδικασίες αυτές της μεταλλοπρωτεάσης- 3 (MMP- 3)⁹⁰, ενώ στον αντίποδα, in vitro μελέτες αποδεικνύουν ότι διέγερση των χονδροκυττάρων μετά από περίοδο ακινησίας και επανάκτηση της κινητικότητας της άρθρωσης επάγουν την αύξηση της έκφρασης αγκρεκάνης και τη μείωση της MMP- 3^{90,91}. Σύμφωνα με τις ανωτέρω μελέτες γίνεται αντιληπτό ότι στον φυσιολογικό- όχι όμως και στον οστεοαρθρικό- χόνδρο οι διαδικασίες ατροφίας και αποδόμησης που παρατηρούνται επί απουσίας κινητικότητας είναι αναστρέψιμες, με συνοδό αποκατάσταση της δομής και λειτουργικότητας της εξωκυττάριας ουσίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα χονδροκύτταρα όταν δεχτούν το κατάλληλο ερέθισμα είναι σε θέση να επανακτήσουν τις αναβολικές τους ιδιότητες. Μία τέτοια απόκριση, ωστόσο, απουσιάζει επί ΟΑ ενδεχομένως λόγω διαταραχών είτε στη λειτουργία των χονδροκυττάρων ή/ και σε μονοπάτια σχετιζόμενα με τη σηματοδότηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων- ECM ή/ και λόγω της έκκρισης κυτταροκινών και καταβολικών ουσιών που απορυθμίζουν τη φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των χονδροκυττάρων⁹¹.

A.1.9. ΟΑ & Αλλαγές στο Μικροπεριβάλλον της Άρθρωσης

Η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από μεταβολές στις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του αρθρικού χόνδρου και του υμένα, στα εμβιομηχανικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και στη λειτουργία και το μεταβολισμό των χονδροκυττάρων. Οι παραπάνω αλλαγές είναι απόρροια διαδικασιών που περιλαμβάνουν μηχανικό stress, δομικές ή/ και ποσοτικές διαταραχές των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και έκθεση σε φλεγμονώδεις παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια της νόσου λαμβάνουν χώρα διάφορες τροποποιήσεις στη δομή και οργάνωση του χόνδρου, παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται κατά τη φυσιολογική διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, με πρωταρχικό συμβάν την ενεργοποίηση των μέχρι εκείνη τη στιγμή «αδρανών» χονδροκυττάρων, τα οποία σταδιακά καθίστανται υπερτροφικά. Ειδικότερα, όσον αφορά στη φαινοτυπική αλλαγή των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων στα αρχικά στάδια νόσου, προσομοιάζει με αυτήν που λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη και συνίσταται στην αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους που οδηγεί στη δημιουργία κυτταρικών συσσωρεύσεων (clusters), στην αύξηση της συνθετικής τους ικανότητας και στην παραγωγή αναβολικών ενζύμων⁹². Σημαντική ένδειξη υιοθέτησης του υπερτροφικού φαινοτύπου αποτελεί κυρίως η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου X (COL10A1), αλλά και άλλων γονιδίων όπως το Runx2⁹³, της οικογένειας Runt, το οποίο λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και εμπλέκεται τόσο στην ωρίμανση και τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων προς υπερτροφικά όσο και στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση^{94,95}, ενώ επάγει και την έκφραση της μεταλλοπρωτεάσης- 3⁹⁶. Είναι προφανές ότι τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά και μάλιστα παράγουν δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες της ECM, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν κάποιου βαθμού πολλαπλασιαστική ικανότητα, την οποία στερούνται επί απουσίας ΟΑ^{97,98}.

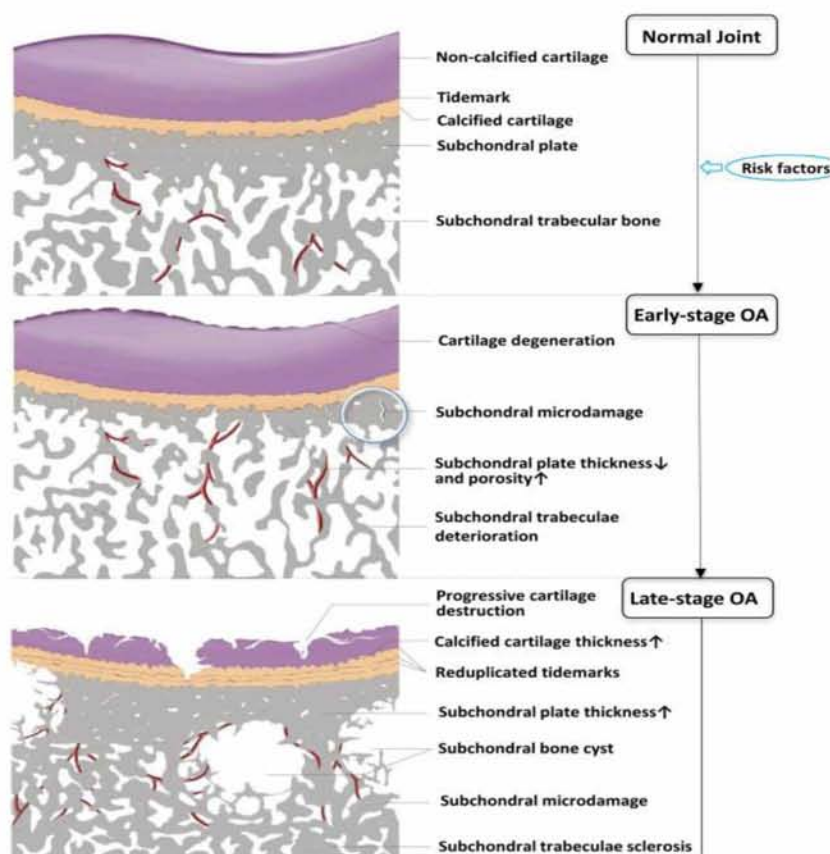


Nature Reviews | Disease Primers

Εικόνα 5: Στα (a) και (b) φαίνεται σχηματικά η εικόνα της φυσιολογικής άρθρωσης και η αρθρική επιφάνεια, αντίστοιχα. Οι εικόνες (c) και (d) αφορούν ιστολογικά δείγματα φυσιολογικού και οστεοαρθρικού χόνδρου, αντίστοιχα, όπου διακρίνονται δομικά και κυτταρικά στοιχεία της άρθρωσης (ελήφθη από: *Osteoarthritis. Martel-Pelletier, J. et al. Nat. Rev. Dis. Prim. 2, 16073 (2016)*)

Όταν αρχίσει να διαρυνγύεται η συνοχή της ECM- στα πρωταρχικά στάδια νόσου- τα χονδροκύτταρα αυξάνουν τη βιοσυνθετική τους ικανότητα και απαντούν στα ερεθίσματα αποδόμησης που λαμβάνουν με αυξημένη παραγωγή διαφόρων τύπων κολλαγόνου (II⁹⁹, IV, IX και XI) και αγκρεκάνης, υπό την επίδραση ποικίλων αυξητικών παραγόντων, με απώτερο σκοπό τη διατήρηση της ομοιοστασίας στην περιοχή και την αποκατάσταση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας¹⁰⁰. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αποδόμηση της πρωτεογλυκάνης που παρατηρείται στα αρχικά στάδια αρθρίτιδας θεωρείται ως ένα αναστρέψιμο συμβάν, χωρίς ωστόσο τα αποπτωτικά συμβάντα να απουσιάζουν. Ωστόσο, επί παρατεταμένης διάρκειας έκθεση στο ερέθισμα και εκτεταμένης αποδόμησης και καταστροφής προκαλείται ρήξη στην ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού, με επικράτηση του δεύτερου, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη της «κατάρρευσης» του δικτύου κολλαγόνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δίκτυο κολλαγόνου είναι γενικά

προστατευμένο και δεν αποδομείται εύκολα, καθώς είναι επικαλυμμένο από πρωτεογλυκάνη και ως εκ τούτου η έναρξη της αποδόμησής του αποτελεί ορόσημο του μη αναστρέψιμου εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου¹⁰¹, της αυξημένης απώλειας χονδροκυττάρων και τελικά της δυσλειτουργίας της άρθρωσης.



*Εικόνα 6: Η ζώνωση του αρθρικού χόνδρου και οι αλλαγές που επέρχονται σε αυτήν κατά την έναρξη OA και στο τελικό της στάδιο (ελήφθη από: *Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes*. Li, G. et al. *Arthritis Res. Ther.* 15, 223 (2013))*

A.1.10. Φλεγμονή στην OA

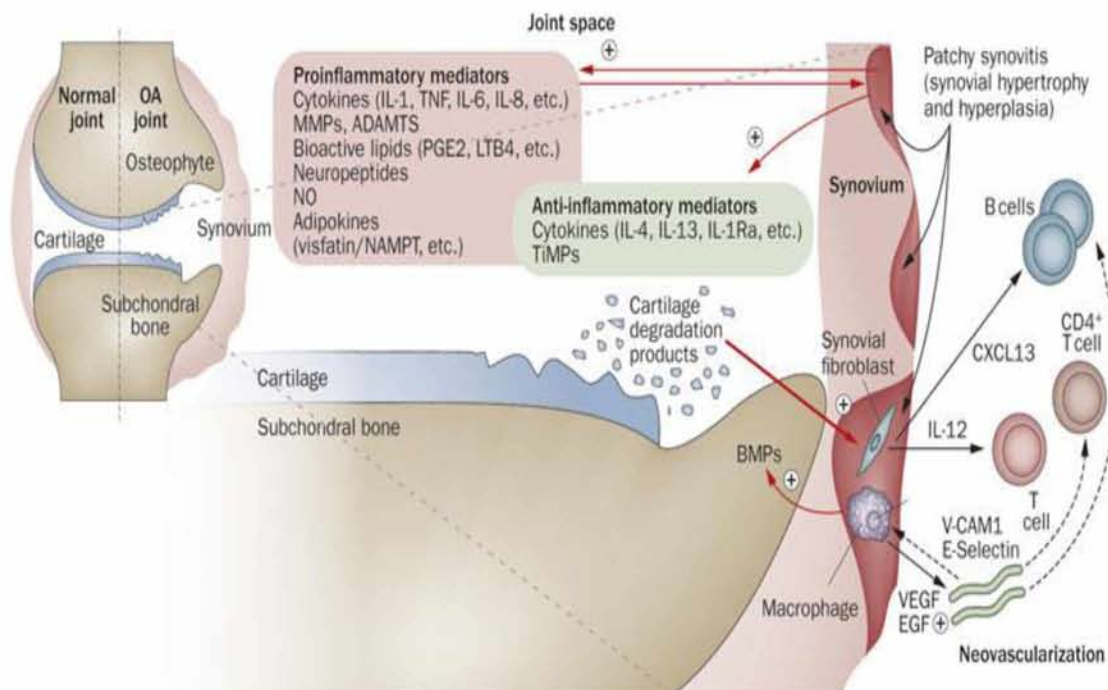
Η OA παρά το γεγονός ότι αρχικά θεωρήθηκε ως μία νόσος μη σχετιζόμενη με φλεγμονή, λόγω της απουσίας μεγάλης ποσότητας κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων στο αρθρικό υγρό (συγκριτικά με άλλα φλεγμονώδη νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα), εντούτοις ήδη από το 1959 είχε γίνει αναφορά για την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη φλεγμονή τόσο στο πλάσμα όσο και στο αρθρικό υγρό ασθενών με την νόσο¹⁰². Σύμφωνα με αυτή και άλλες παρατηρήσεις^{103,104}, η οστεοαρθρίτιδα πλέον κατατάσσεται ξεκάθαρα στα φλεγμονώδη νοσήματα, όπως προκύπτει από την παρουσία μονοπύρηνων κυττάρων

σχετιζόμενων με φλεγμονή στην περιοχή του υμένα¹⁰⁴, εκδήλωση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένου του οιδήματος, του πόνου και της δυσκαμψίας, ενώ έκδηλη είναι και η παρουσία κυκλοφορούντων φλεγμονωδών παραγόντων (χυμοκίνες, κυτταροκίνες κλπ), με αξιοσημείωτα αυξημένη συγκέντρωση των TNF- α , IL- β και VEGF στο αρθρικό υγρό των ασθενών με ΟΑ¹⁰³. Κατά συνέπεια, η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της οστεοαρθρίτιδας, με την προέλευσή της να είναι συνηθέστερα κάποιος τραυματισμός στην περιοχή της άρθρωσης, η εκτεταμένη μηχανική της καταπόνηση ή τυχόν ανατομικές δυσμορφίες.

Γενικά, η οστεοαρθρίτιδα συχνά συνυπάρχει με φλεγμονή στην περιοχή του αρθρικού υμένα (υμενίτιδα)^{84,105,106}. Δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο εάν προϋπάρχει της ΟΑ και συμβάλλει στη δημιουργία αλλοιώσεων στην περιοχή του χόνδρου ή εάν εκδηλώνεται σε δεύτερο χρόνο στα πλαίσια διέγερσής της από το ανοσοποιητικό σύστημα και τη συσσώρευση προϊόντων αποδόμησης, σε κάθε περίπτωση όμως αποτελεί βασικό γνώρισμα της νόσου και συνδέεται στενά με αυτήν είτε στην έναρξη είτε στην εξέλιξή της¹⁰⁶.

Είναι σαφές ότι μεταξύ φλεγμονής και εκφυλισμού επικρατεί ένας φαύλος κύκλος που ευθύνεται για τη διαιώνιση της παθολογίας της ΟΑ και παρά το γεγονός ότι πρόκειται για δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους διαδικασίες, υπάρχει μία ισχυρή υπερσύνδεση, η οποία εκκινεί από την παραγωγή κυτταροκινών από τους φλεγμαίνοντες ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, σε περιβάλλον φλεγμονής παρατηρείται αρχικά ήπια, τοπική ιστική καταστροφή με συνοδό αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, επιτέλεση εκτεταμένων επιδιορθωτικών διεργασιών και διήθηση από μονοπύρηννα κύτταρα^{84,105,106}, μακροφάγα^{87,106,107} και σε μικρότερο βαθμό από Β- και Τ- λεμφοκύτταρα^{83,104,106}. Επί μακράς διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος, η φλεγμονή καθίσταται χρονίζουσα και παρατηρείται σταδιακή απώλεια του αρθρικού χόνδρου. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό γνώρισμα του φλεγμονώδους υποστρώματος στην ΟΑ είναι και η παρουσία αγγειογένεσης¹⁰⁸, η οποία επάγεται από την παραγωγή του αγγειογενετικού παράγοντα (VEGF) κυρίως από τα μακροφάγα^{103,109}, κυτταρικά στοιχεία με ενεργό συμμετοχή στις διαδικασίες ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας, καθώς και αυτά επάγουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων, προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεασών^{107,110}, ενώ

φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο και στη δημιουργία οστεοφύτων^{87,111}. Τα οστεόφυτα εκφύονται από τα όρια της άρθρωσης και ουσιαστικά αφορούν στην έκτοπη ανάπτυξη προεξοχών αποτελούμενων από οστό και χόνδρο.



Εικόνα 7: Το περιβάλλον φλεγμονής της άρθρωσης στην οστεοαρθρίτιδα (ελήφθη από: *The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Sellam, J. & Berenbaum, F. Nat. Rev. Rheumatol. 6, 625–635 (2010)*)

Συνηθέστερες πηγές φλεγμονής αποτελούν ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, οι οποίοι παράγουν σηματοδοτικά μόρια για την προσέλκυση στην περιοχή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF α , IL-1 β) και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων (MMP -1, -3)¹⁰⁵. Η ιστική καταστροφή σε πρώτη φάση οδηγεί σε αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και ως επί το πλείστον της αγκρεκάνης, με σύγχρονη απελευθέρωση ενδογενών «σημάτων κινδύνου», τα οποία καλούνται DAMPs (Danger/ Damage Associated Molecular Patterns)¹⁰³. Τα DAMPs είναι μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με την καταστροφή¹¹² και σε αυτά υπάγονται, μεταξύ άλλων, προϊόντα αποδόμησης της ECM (όπως η φιβρονεκτίνη), πρωτεΐνες του πλάσματος (όπως το ινωδογόνο)^{63,103} και αλαρμίνες. Αυτά ενεργοποιούν καταβολικά μονοπάτια και επάγουν την παραγωγή διαλυτών φλεγμονωδών παραγόντων του τύπου των κυτταροκινών, των αδιποκινών¹¹³, των χυμοκινών¹¹⁴ και

των νευροπεπτιδίων, οι οποίοι τελικά διεγείρουν την υπερέκφραση πρωτεασών από τα χονδροκύτταρα^{115,116}.

Ανεξαρτήτως της ύπαρξης νόσου, η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας επιτελείται σε μεγάλο βαθμό από πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως είναι οι εξαρτώμενες από το ψευδάργυρο μεταλλοπρωτεάσες της οικογένειας των MMPs (μεταλλοπρωτεϊνάσες) με ενεργότητα λύσης πρωτεογλυκανών, κολλαγόνου, ελαστίνης και γλυκοπρωτεϊνών και των ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motifs)¹¹⁷. Η ομοιοστασία στην περιοχή του χόνδρου εξασφαλίζεται από την ισορροπημένη δράση μεταξύ των προαναφερθέντων ενζύμων και των αναστολέων τους, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Οι ADAMTS/ MMPs είναι κύριοι ρυθμιστές διαδικασιών επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης του περιβάλλοντος του αρθρικού χόνδρου και του οστού τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και στα πλαίσια τραυματισμού και παθολογίας, επάγοντας διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η ανάπτυξη και η επούλωση, με τις MMPs -1, -8 και -13 (γνωστές και ως κολλαγενάσες -1, -2 και -3, αντίστοιχα) να διασπών το κολλαγόνο^{118,119}, την MMP- 13 να παρουσιάζει υψηλότερη ειδικότητα στη διάσπαση του κολλαγόνου τύπου II^{119,120} και τις MMP -3 και ADAMTS -4^{121,122} και -5 (αγκρεκανάση -1 και -2, αντίστοιχα)¹²³ να υπάγονται στις αγκρεκανάσες (ένζυμα που διασπών την αγκρεκάνη της εξωκυττάριας ουσίας¹¹⁷). Ωστόσο, υπερέκφραση ή/ και παρατεταμένη έκφραση των προαναφερθέντων ενζύμων μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις στην άρθρωση, μεταξύ των οποίων υπάγεται και η εκδήλωση οστεοαρθρίτιδας. Ειδικότερα, επί ΟΑ παρατηρείται απορρύθμιση των παραπάνω πρωτεολυτικών ενζύμων και υπερέκφρασή τους, με τους TIMPs να αδυνατούν να ελέγξουν την εκτεταμένη δράση τους, με συνέπεια την αδυναμία περιορισμού της αποδόμησης της ECM¹²⁴. Πιο συγκεκριμένα, η MMP-3 (στρομελυσίνη -1) είναι ένα από τα αρχικά πρωτεολυτικά ένζυμα που εμφανίζουν αυξημένη έκφραση ήδη από τα πρώτα στάδια εμφάνισης φλεγμονής¹²⁵ και έχει ως κύρια δράση την αποδόμηση πρωτεογλυκανών^{90,126}. Επιπλέον, η αύξησή της οδηγεί σταδιακά και σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ADAMTS- 5⁹⁰, ενώ σε πιο προχωρημένη μορφή αποδόμησης παρατηρείται υπερέκφραση και της MMP- 13^{123,124}.

Πρωταγωνιστικό ρόλο στην έναρξη των φλεγμονωδών διαδικασιών κατέχουν οι προφλεγμονώδεις παράγοντες IL-1 β και TNF- α ^{105,111,127}, η σηματοδότηση των οποίων επιτελείται μέσω του NF- κ B και του μονοπατιού των MAP κινασών. Αυξημένα επίπεδα των παραπάνω διαλυτών κυτταροκινών επάγουν την έκφραση επιπλέον ενζύμων με καταβολικές ιδιότητες¹²⁸, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs)^{120,123,129}, οι ADAMTS^{117,123}, το μονοξειδίο του αζώτου (NO)¹²⁷, η IL-6^{127,130}, η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂)^{127,131} και η κυκλοοξυγενάση 2 (COX2)^{131,132}, μειώνουν την έκφραση των MMPs αναστολέων, ενώ φαίνεται να δρουν και ως φραγμός στις αναβολικές διαδικασίες της εξωκυττάριας ουσίας, μέσω αναστολής της έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή των συστατικών της (αγκρεκάνη, κολλαγόνο τύπου II και IX)^{73,133} (Εικόνα 7).

A.1.11. OA & Κληρονομικότητα

Η πρώτη αναφορά περί οικογενούς εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας πραγματοποιήθηκε πριν από περισσότερο από έναν αιώνα, με την επιβεβαίωση της υπαρξής ισχυρής γενετικής συνιστώσας να παρέχεται δεκαετίες αργότερα και συγκεκριμένα το 1940 από τον Stecher, ο οποίος παρατήρησε την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης των λεγόμενων οζιδίων του Heberden (Heberden's nodes) στα χέρια μελών της ίδιας οικογένειας¹³⁴. Η παραπάνω διαπίστωση αποτέλεσε και το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου της OA, τόσο με τη διενέργεια μελετών σε οικογένειες που εκδηλώνουν το νόσημα με σκοπό την επιβεβαίωση της κληρονομικής του φύσης^{135,136} όσο και με μελέτες διδύμων για τον προσδιορισμό του βαθμού συμπτωτικότητας μεταξύ μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Από την πρώτη κατηγορία μελετών αποδεικνύεται ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης OA επί υπαρξής οικογενειακού ιστορικού είναι 2 έως 3 φορές υψηλότερος συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό^{135,136}. Τα αποτελέσματα των μελετών σε διδύμους δείχνουν ξεκάθαρα ότι δεν πρόκειται για ένα αμιγώς κληρονομικό νόσημα, με την εκδήλωσή του να επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό και από άλλους, μη γενετικούς παράγοντες, ωστόσο το ποσοστό γενετικής συμβολής διαφέρει τόσο μεταξύ των

μελετών και των χρησιμοποιούμενων μεθόδων ελέγχου όσο και μεταξύ των 2 φύλων, των υπό μελέτη αρθρώσεων και του σταδίου της νόσου (αρχικό ή πιο προχωρημένο στάδιο). Συγκεντρωτικά, μελέτες έχουν δείξει ότι η γενετική συνιστώσα στην οστεοαρθρίτιδα γόνατος, χεριού και ισχίου κυμαίνεται από 39 % έως 65 %, με τα αποτελέσματα αυτά, ωστόσο, να αφορούν μόνο σε ζεύγη θήλεων διδύμων^{137,138}. Πρόσφατα δημοσιευμένη, πολυπληθής μελέτη σε ζευγάρια διδύμων και των 2 φύλων έδειξε ότι η συνολική γενετική συνεισφορά στην οστεοαρθρίτιδα ισχίου είναι σημαντικά μικρότερη από την προαναφερθείσα και φτάνει στο 18 % συνολικά για άνδρες και γυναίκες, με την επίδραση του περιβαλλοντικού υποστρώματος να υπερισχύει σημαντικά¹⁴⁰, ενώ σύμφωνα με στοιχεία της ίδιας μελέτης η ποικιλότητα στον επιπολασμό της ΟΑ στο γενικό πληθυσμό οφείλεται σε ποσοστό της τάξης του 68 % στη συνδυαστική δράση γενετικών και περιβαλλοντικών επιδράσεων¹³⁹.

A.1.12. Σχετιζόμενα με ΟΑ Γονίδια & Πολυμορφισμοί

Εδώ και αρκετά χρόνια γίνονται προσπάθειες ανεύρεσης γενετικών τόπων και πολυμορφισμών που είτε συμμετέχουν άμεσα στην εμφάνιση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου είτε δρουν συνεργικά τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλους εξωγενείς παράγοντες και αυξάνουν την προδιάθεση εμφάνισης ΟΑ. Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών ανάλυσης σύνδεσης και μελετών συσχέτισης που έχουν διενεργηθεί, είναι λίγα τα γονίδια που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την ΟΑ, με κυριότερα το GDF5, το FRZB, το DIO2, το GPR22 και το ASPN.

Χάρη στις GWAS (GenomeWide Association Studies) μελέτες ένας εκτενής κατάλογος πολυμορφισμών ευρισκόμενων σε μία πληθώρα γονιδίων έχει διερευνηθεί ως προς τη συνεισφορά του στην εμφάνιση ΟΑ. Το γονίδιο GDF5 (Growth and Differentiation Factor 5) (20q11.2), το οποίο ανήκει στην υπεροικογένεια των TGF- β (Transforming Growth Factor- β) και προσομοιάζει με τις BMPs έχει μελετηθεί εκτενώς, με το ρόλο του στη μορφογένεση και τη διατήρηση των οστών και του αρθρικού χόνδρου¹⁴¹ να έχει αποδειχθεί ήδη από το 1997¹⁴². Επιπλέον, λόγω της συμμετοχής συγκεκριμένων μεταλλάξεων του εν λόγω γονιδίου σε σκελετικές ανωμαλίες¹⁴³ και χονδροδυσπλασίες¹⁴⁴, ήταν από τα πρώτα γονίδια ο ρόλος των

οποίων διερευνήθηκε ως προς την εμπλοκή του στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας και μέσα από τρεις μετα- αναλύσεις που διενεργήθηκαν σε διαφορετικές χρονολογικά στιγμές και από διαφορετικές ομάδες σε ποικίλους πληθυσμούς βρέθηκε ότι ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός (SNP rs143383) αυξάνει την προδιάθεση εκδήλωσης OA και ανευρίσκεται τόσο σε πληθυσμούς της Ευρώπης όσο και της Ασίας^{145,146}.

Το FRZB (frizzled motif associated with bone development) γονίδιο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη sFRP3, μια γλυκοπρωτεΐνη που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Ένα SNP σε μία περιοχή του γονιδίου έχει βρεθεί να αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα της OA, ωστόσο το ανώτερο εύρημα έχει αποδειχθεί μόνο σε γυναίκες^{147,148} και ως εκ τούτου χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Κάποια από τα SNPs που φαίνεται να δρουν προδιαθεσικά εντοπίζονται στα παρακάτω γονίδια: DIO2 (deiodinase iodothyronine type II gene) εμπλεκόμενο σε ένα ρυθμιστικό μονοπάτι του θυρεοειδούς (rs225014)¹⁴⁹ και PTGS2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene) (rs4140564)¹⁵⁰. Επίσης, από GWAS μελέτες έχει προκύψει μία χρωμοσωμική περιοχή στο 7q22, η οποία περιέχει ένα cluster 6 γονιδίων που φαίνεται να σχετίζονται με προδιάθεση για εκδήλωση OA. Τα γονίδια αυτά είναι τα GPR22 (G protein-coupled receptor 22), COG5 (component of oligomeric golgi complex 5), PRKAR2B (protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta), HPB1 (HMG-box transcription factor 1), DUS4L (dihydrouridine synthase 4-like) και BCAP29 (B-cell receptor-associated protein 29)^{151,152}.

Τα αποτελέσματα των μελετών, ωστόσο, είναι συχνά αντιφατικά ή/ και στερούνται στατιστικά σημαντικής συσχέτισης με την νόσο, προβλήματα που δυσχεραίνουν ακόμα περισσότερο την αναζήτηση υπεύθυνων γενετικών παραγόντων. Ειδικά για το γονίδιο της ασπορίνης (ASPN) που κωδικοποιεί για την ομώνυμη πρωτεΐνη που αποτελεί συστατικό της ECM, παρά το γεγονός ότι έχει ανευρεθεί ισχυρή συσχέτιση με την OA, εντούτοις απεδείχθη ότι αυτή αφορά μόνο σε Ασιάτες¹⁵³ και δεν εντοπίζεται στους Ευρωπαίους^{154,155}, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι γενετικοί παράγοντες εν τέλει επηρεάζονται και από την εθνικότητα. Αντικρουόμενα συμπεράσματα, στερούμενα επαναληψιμότητας έχουν προκύψει και

για μια κατηγορία γονιδίων, παραλλαγές των οποίων φαίνεται να σχετίζονται με ΟΑ. Σε αυτήν περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται τα COL2A1^{148,156-158} και COMP^{148,159-161}, με ορισμένες μελέτες να υποστηρίζουν την ύπαρξη^{160,161} και άλλες την απουσία συσχέτισης μεταξύ COMP και οστεοαρθρίτιδας^{148,159}, ενώ ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα για το δεύτερο γονίδιο, το COL2A1, με ορισμένες μελέτες να μιλάνε για συσχέτιση^{148,156} και κάποιες να την περιορίζουν μόνο στο ανδρικό φύλο^{157,158}. Είναι προφανές ότι δεν έχει βρεθεί κάποια ισχυρή και αδιάσειστη συσχέτιση και προς το παρόν η συμβολή των δύο αυτών γονιδίων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης τόσο μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών όσο και μεταξύ των 2 φύλων.

Φαίνεται πλέον ισχυρότερα ότι η οστεοαρθρίτιδα αφορά περισσότερο σε μία πολυγονιδιακή παρά σε μονογονιδιακή διαταραχή, με τη δράση διαφόρων πολυμορφισμών σε πολλά γονίδια (που λειτουργούν προδιαθεσικά) συνδυαστικά με εξωγενείς- μη γενετικούς- παράγοντες να αποτελούν τελικά τα στοιχεία που συνθέτουν την κλασική μορφή οστεοαρθρίτιδας, σποραδικής εμφάνισης και όψιμης έναρξης, η οποία είναι πολυγονιδιακής και πολυπαραγοντικής φύσης.

A.1.13. Επιγενετική

Καθώς η επίδραση γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη και εκδήλωση ΟΑ είναι μάλλον μικρότερη από την αναμενόμενη, πλέον η έρευνα έχει στραφεί και στον τομέα της επιγενετικής συμβολής. Ως επιγενετικές καλούνται οι κληρονομήσιμες μέσω μείωσης ή μίτωσης αλλαγές, οι οποίες είναι αποτέλεσμα τροποποιήσεων στην έκφραση των γονιδίων ή στο φαινότυπο των κυττάρων και δεν αφορούν σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Σε αυτές υπάγονται η μεθυλίωση του DNA σε CpG νησίδες και οι τροποποιήσεις των ιστονών του τύπου της μεθυλίωσης, της ακετυλίωσης, της φωσφορυλίωσης και της ουβικουιτινιλίωσης, ενώ στο ευρύτερο πλαίσιο της επιγενετικής θα μπορούσε να συμπεριληφθεί και η RNA- επαγόμενη γονιδιακή αποσιώπηση, κατηγορία στην οποία ανήκουν και τα microRNAs. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων είτε σε μεταγραφικό είτε σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο και οδηγούν στη δημιουργία σταθερών και κληρονομήσιμων φαινοτύπων.

Από GWAS μελέτες που έχουν διενεργηθεί την τελευταία δεκαετία έχει βρεθεί ότι άτομα με ΟΑ παρουσιάζουν διαφοροποιημένο πρότυπο μεθυλίωσης σε σχέση με άτομα χωρίς παθολογία στην άρθρωση. Ειδικότερα, οι διαφορικά μεθυλιωμένες περιοχές (DMLs) εντοπίζονται σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών και ενζύμων που σχετίζονται μεταξύ άλλων με την ανάπτυξη, την οστεογένεση, τη χονδρογένεση και τη σύνθεση της ECM, καθώς και σε γονίδια με συμμετοχή σε σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με φλεγμονώδεις διαδικασίες^{162,163}, ενώ έχουν βρεθεί και υπομεθυλιωμένες περιοχές στους υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, όπως οι MMPs και οι ADAMTS^{121,164}. Επιπλέον, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι διαδικασίες μεθυλίωσης μπορεί να επηρεάζουν γονίδια που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεση της ΟΑ, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αυτό του GDF5, το οποίο έχει ήδη βρεθεί διαφορετικά μεθυλιωμένο¹⁶⁵. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών αναδεικνύουν τη μεθυλίωση του DNA ως έναν καθοριστικής σημασίας επιγενετικό παράγοντα ρύθμισης της ισορροπίας στην περιοχή του χόνδρου, με σημαντική επίπτωση στις διαδικασίες σύνθεσης και αποδόμησης του.

Από τις τροποποιητικές διαδικασίες των ιστονών χαρακτηριστικότερη είναι η ακετυλίωση, η οποία επάγει τη μεταγραφή και επιτελείται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των HATs (Histone Acetyl Transferases), ενώ υπεύθυνες για την αντίστροφη διαδικασία είναι δύο ομάδες ενζύμων, οι HDACs (Histone Deacetylases) και οι Sirtuins. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο αποακετυλασών συνίσταται στο ότι οι πρώτες (HDACs) χρησιμοποιούν ψευδάργυρο, ενώ οι Sirtuins είναι NAD⁺ εξαρτώμενες. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι η ενζυμική οικογένεια των Sirtuins και κυρίως η πρωτεΐνη Sirt1, συμμετέχει μεταξύ άλλων και στην παθογένεση της ΟΑ. Μελέτες έχουν αναδείξει την καίρια σημασία της Sirt1 τόσο στη ρύθμιση της επιβίωσης των χονδροκυττάρων¹⁶⁶ όσο και σε αναγεννητικούς μηχανισμούς της ECM^{167,168}, με τα επίπεδα έκφρασής της να μειώνονται στον οστεοαρθρικό χόνδρο με αποτέλεσμα μετάπτωση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, απόπτωσή τους και απώλεια της εξωκυττάριας ουσίας¹⁶⁹. Σε αντίθεση με την ακετυλίωση, η μεθυλίωση άλλοτε σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργές και άλλοτε με ανενεργές περιοχές.

Η συνεισφορά των microRNAs στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας θα

αναλυθεί εκτενώς στην παρακάτω ενότητα.

A.2. MicroRNAs- Γενικά Χαρακτηριστικά

Τα microRNAs (miRNAs) ταξινομούνται ως μία ευρύτατη φυλογενετικά οικογένεια, η οποία είναι ιδιαίτερος πολυπληθής και αποτελείται από μικρά, μη κωδικά, μονόκλιωνα τμήματα RNA μεγέθους κατά μέσο όρο περίπου 22 (19 έως 25) νουκλεοτιδίων (nts). Τα μόρια αυτά αποτελούν μία εξαιρετικά εξελικτικά συντηρημένη ομάδα, τόσο στα πλαίσια συγγενικών¹⁷⁰⁻¹⁷² όσο και διαφορετικών ειδών^{173,174}, γεγονός που ενισχύει τη μείζονα σημασία τους, καθώς και έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε επίπεδο γονιδιακής ρύθμισης σε ένα ευρύ φάσμα διεργασιών. Μέχρι σήμερα ο αριθμός των διαφορετικών, ώριμων microRNAs που έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα είδη ανέρχεται στις 28645, εκ των οποίων τα 2885 αποτελούν ώριμα μετάγραφα ανευρισκόμενα στον άνθρωπο, όπως αναφέρεται από το Sanger miRBase (έκδοση 21.0, Ιούνιος 2014)¹⁷⁵, με τις συντηρημένες αλληλουχίες να ξεπερνούν σε αριθμό τις 500¹⁷⁶.

A.2.1. Τα microRNAs στον *C. elegans*

Το έναυσμα για τη μελέτη των miRNAs ως ρυθμιστικών παραγόντων δόθηκε το 1993 από τους Ambros και συν.¹⁷⁰ και Wightman και συν.¹⁷⁷, οι οποίοι κατά τη μελέτη ανάπτυξης του νηματώδους σκώληκα *Caenorhabditis elegans* διαπίστωσαν ότι το γονίδιο *lin- 4*, το οποίο συμμετέχει στην ρύθμιση του χρόνου ανάπτυξής του, δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη αλλά ένα μικρό, μη κωδικό μόριο RNA, το οποίο βρέθηκε ότι ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *lin- 41* μέσω πρόσδεσης σε αυτό¹⁷⁸. Μερικά χρόνια αργότερα, το 2000, μελέτες στον ίδιο σκώληκα ανέδειξαν ένα δεύτερο miRNA με συμμετοχή στην αναπτυξιακή εξέλιξη του *C. elegans*, το *let- 7*^{171,179}, το οποίο αργότερα ανευρέθη και σε άλλους οργανισμούς, μεταξύ των οποίων και στον άνθρωπο¹⁷³, ενώ μετά από εκείνο το χρονικό σημείο περαιτέρω μελέτες εντόπισαν και πολλά άλλα μόρια, με παρόμοια χαρακτηριστικά, τα οποία βρέθηκαν να έχουν σημαντική συμμετοχή σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια¹⁷². Λόγω της

χρονικής έκφρασής τους σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, τα microRNAs αρχικά αναφέρονταν ως temporal (χρονικά) μόρια^{171,177}, με την πρώτη ονομασία που τους δόθηκε να είναι stRNAs (small temporal RNAs)^{170,173}, ενώ στη συνέχεια επικράτησε ο όρος microRNAs^{172,174}.

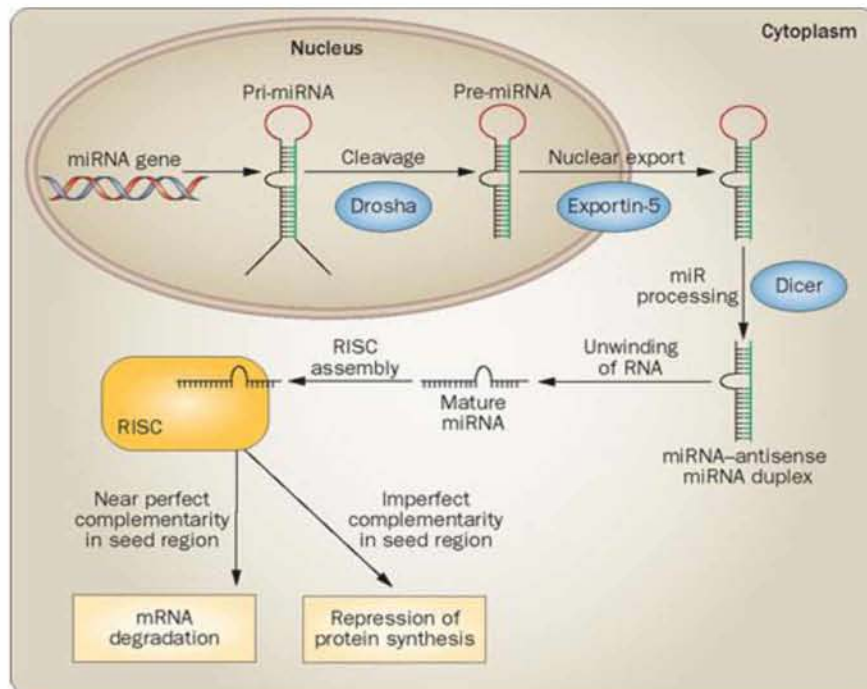
Παρά το γεγονός ότι τα microRNAs πρωτοανευρέθησαν στον *C. elegans*, σταδιακά εντοπίστηκαν και σε άλλους οργανισμούς, όχι μόνο παρασιτικούς, αλλά και φυτικούς¹⁸⁰ και σε έντομα¹⁸¹ ενώ πλέον είναι δεδομένη η παρουσία τους σε θηλαστικά¹⁷⁴ και φυσικά στον άνθρωπο, με τουλάχιστον 1/3 των miRNAs που έχουν ανευρεθεί στον νηματώδη σκόληκα να εμφανίζουν ομολογία και στο ανθρώπινο είδος¹⁸².

A.2.2. Βιογένεση των microRNAs

Υπάρχουν τρία βασικά στάδια ανάπτυξης των miRNAs, με τα δύο πρώτα να λαμβάνουν χώρα στον πυρήνα και το τελευταίο στο κυτταρόπλασμα. Η αρχική μορφή είναι αυτή των pri- miRNAs, τα οποία αποτελούν τα πρωταρχικά μετάγραφα του DNA, είναι δίκλιωνα μόρια, τα οποία εμφανίζονται υπό μορφή βρόγχου (stem-loop), μήκους από μερικές εκατοντάδες ζεύγη νουκλεοτιδίων μέχρι αρκετές κιλοβάσεις (kbs) και εντοπίζονται στον πυρήνα¹⁸³. Το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης διαμεσολαβείται από ένα σύμπλοκο ενζύμων και πρωτεϊνών, το Drosha- DGCR8 (Di George syndrome Critical Region gene 8 στον άνθρωπο¹¹⁵, γνωστό και ως Pasha στη *Drosophila* και στον *C. elegans*¹⁸⁴), το οποίο τροποποιεί κατάλληλα τα μόρια pri-miRNAs κόβοντάς τα σε μικρότερα τμήματα μήκους 60 έως 70 nts (κυρίως, χάρη στη δράση της Drosha που διαθέτει ενεργότητα RNAάσης III¹⁸⁵). Τα τροποποιημένα αυτά μόρια καλούνται πρόδρομα miRNAs ή pre- miRNAs και εμφανίζονται με δομή φουρκέτας (hairpin) και μία προεξοχή 2- nt στο 3' άκρο τους¹⁸⁶. Η ανωτέρω μορφολογία είναι χαρακτηριστική των προϊόντων της RNAάσης III και καθοριστικής σημασίας για την περαιτέρω τροποποίηση των pre- miRNAs, καθώς χάρη σε αυτήν αναγνωρίζονται από μία πυρηνική πρωτεΐνη, την εξπορτίνη 5 (exportin- 5, Exp5) που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα¹⁸⁷. Η μετακίνηση αυτή επιτυγχάνεται χάρη στην συνεργική δράση της Exp5 με τον

συμπαράγοντα Ran (Ras- related nuclear protein), με δράση GTPάσης, και το pre-miRNA¹⁸⁸.

Στο κυτταρόπλασμα λαμβάνει χώρα το τελικό στάδιο ωρίμανσης, όπου επιτελείται η αναγνώριση από τη Dicer, ένα ένζυμο το οποίο επίσης διαθέτει ενεργότητα ενδοριβονουκλεάσης III, που έχει ως βασικό ρόλο να κόψει το pre-miRNA και να το μετατρέψει σε μικρότερου μεγέθους (της τάξης των 19- 25 nts) δίκλιωνα γραμμικά τμήματα (RNA duplex), καθένα εκ των οποίων διαθέτει ένα προεξέχον δινουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του^{189,190}. Ακολούθως, με τη δράση μίας ελικάσης δημιουργούνται 2 μονόκλιωνα τμήματα miRNA, από τα οποία στη συνέχεια το ένα θα προσδεθεί σ' ένα σύμπλοκο κυρίως γνωστό ως miRISC ή απλά RISC (RNA-induced silencing complex, εναλλακτικά, miRNP ή miRgonaute) και θα αποτελέσει το ώριμο miRNA¹⁹¹ (Εικόνα 8), ενώ το άλλο θα καταστραφεί, με την επιλογή σχετικά με το ποιός από τους δύο κλώνους θα διατηρηθεί και ποιός θα αποδομηθεί να βασίζεται στη θερμοδυναμική σταθερότητα του καθενός¹⁹². Ειδικότερα, ο κλώνος που θα παραμείνει συνδεδεμένος με το RISC είναι αυτός με το λιγότερο σταθερό ζεύγος βάσεων στο 5' άκρο του¹⁹³.



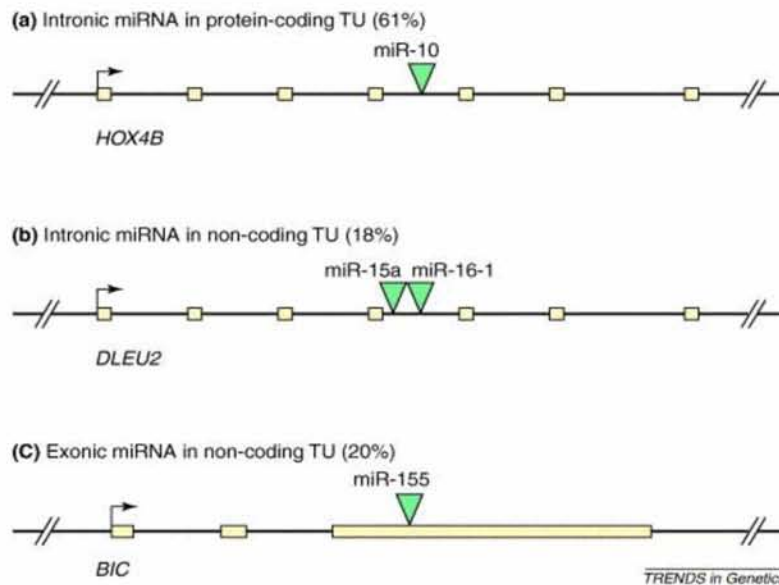
Εικόνα 8: Σχηματική

αναπαράσταση της σύνθεσης microRNA, ξεκινώντας από τον πυρήνα και καταλήγοντας στο κυτταρόπλασμα υπό τη μορφή μονόκλιων, ώριμου μορίου, το οποίο ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας ως προς το mRNA- στόχο οδηγεί είτε σε αποδόμηση είτε σε μεταφραστική αποσιώπηση. (ελήφθη από: *Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis*

A.2.3. Θέση των miRNAs στο γονιδίωμα

Τα microRNAs βρίσκονται διάσπαρτα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, καταλαμβάνοντας περιοχές μεταξύ γονιδίων (intergenic) ή μέσα σε αυτά (intragenic)¹⁹⁴. Τα intragenic miRNAs μπορούν να ανευρεθούν σε κωδικοποιούσες (exonic) ή μη (intronic) αλληλουχίες, με τη δεύτερη περίπτωση να αφορά στην εντόπισή τους σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν ή όχι πρωτεΐνες^{195,196} (Εικόνα 9). Όσον αφορά στην πρώτη κατηγορία, αυτήν των intergenic miRNAs, η μεταγραφή τους γίνεται ανεξάρτητα από αυτήν των εκατέρωθεν γονιδίων, καθώς διαθέτουν δικούς τους υποκινητές, πρόκειται δηλαδή για αυτόνομες μεταγραφικά μονάδες^{172,183}. Τα microRNAs σε περιοχές εξωνίων και ιντρονίων φαίνεται να χρησιμοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες των γονιδίων που τα «φιλοξενούν»^{181,197}, με τη μεταγραφική διαδικασία να είναι είτε ταυτόχρονη¹⁹⁶ είτε να γίνεται σε διαφορετικό χρόνο.

Αναφορικά με τη μεταγραφή των miRNAs, περισσότερες και ισχυρότερες ενδείξεις υπάρχουν υπέρ της διαμεσολάβησής της από την RNA πολυμεράση II¹⁹⁶, όπως αυτή προκύπτει και από την παρουσία τροποποιήσεων του τύπου της πολυαδενυλίωσης και της προσθήκης καλύπτρας 7- μεθυλγουανωσίνης στο 5' άκρο (5' capping) στα pri-miRs^{198,199}, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και μεταγραφή- τουλάχιστον ορισμένων miRNAs- από άλλους τύπους του ενζύμου, όπως η RNA πολυμεράση III²⁰⁰. Επίσης, πολλά microRNAs φαίνεται να ανευρίσκονται σε συστάδες (clusters) και να μεταγράφονται ως πολυκιστρονικά μετάγραφα¹⁸³, με τουλάχιστον το 1/2 των microRNAs στον άνθρωπο να εμφανίζονται κατ' αυτόν τον τρόπο¹⁹⁶.



Εικόνα 9: Θέση των microRNAs στο γονιδίωμα, σε κωδικοποιούσες και μη περιοχές και σε περιοχές εξωνίων και ιντρονίων.

A.2.4. Λειτουργικός Ρόλος των microRNAs

Τα microRNAs λειτουργούν κατά κύριο λόγο ως αρνητικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο, μέσω της πρόσδεσής τους σε συγκεκριμένα μόρια mRNA- στόχους^{201,202}. Η πρόσδεση αυτή γίνεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) και επιτυγχάνεται μέσω μερικής ή πλήρους συμπληρωματικότητας με το mRNA- στόχο, καθεμία εκ των οποίων έχει διαφορετική έκβαση¹⁸⁹. Σε κάθε περίπτωση, ο σκοπός των miRNAs είναι η αναστολή της γονιδιακής έκφρασης.

Τα miRNAs επάγουν τη δράση τους έπειτα από την αναγνώριση του μορίου-στόχου και την πρόσδεση σε αυτό, ενώ βάσει του βαθμού συμπληρωματικότητας miRNA- mRNA, αυτό οδηγείται είτε σε μεταγραφική αποσιώπηση είτε σε αποδόμηση^{203,204}, διαδικασίες διαμεσολαβούμενες από το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα RISC²⁰⁵. Σε περίπτωση πλήρους ή σχεδόν πλήρους συμπληρωματικότητας, το mRNA- στόχος κόβεται από τη ριβονουκλεάση που περιέχεται στο σύμπλεγμα RISC (με το ένζυμο να πιθανολογείται ότι ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Argonaute, με επικρατέστερη την Ago2, αν και εξακολουθεί να είναι ανοιχτό προς περαιτέρω διερεύνηση το συγκεκριμένο θέμα)^{191,206} και με τον τρόπο αυτό αποδομείται²⁰⁷. Επί ατελούς συμπληρωματικότητας, το mRNA- στόχος υφιστάμενο τη δράση του microRNA

οδηγείται σε μεταφραστική καταστολή, η οποία μπορεί να λάβει χώρα είτε στο στάδιο έναρξης της μετάφρασης είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης²⁰⁸, με τον μηχανισμό αυτόν να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης, όχι όμως και αυτά του mRNA.

Ένα μόριο miRNA μπορεί να προσδένεται σε διάφορους στόχους-mRNA^{209,210}, ενώ και ένα mRNA μπορεί να φέρει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης διαφορετικών microRNAs στην 3' αμετάφραστη περιοχή του (3' UTR)^{202,211}.

Με τη χρήση αλγορίθμων και υπολογιστικών μεθόδων υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των γονιδίων, η έκφραση των οποίων υπόκειται σε έλεγχο από τα microRNAs, ανέρχεται περίπου στο 10 % του συνόλου τους^{202,211}. Φάνηκε, ωστόσο, ότι αυτή ήταν μία μάλλον συντηρητική προσέγγιση καθώς οι Lewis και συν. σύντομα ανέδειξαν ότι ποσοστό τουλάχιστον της τάξης του 20 έως 30 % των γονιδίων ελέγχονται από miRNAs^{201,212}, ενώ το 2008 οι Friedman και συν. αύξησαν ακόμα περισσότερο το ποσοστό, καταλήγοντας στο ότι > 60 % των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ελέγχονται από αυτά τα μικρά, μη κωδικά μόρια²¹³.

Τα microRNAs αποτελούν κύριους ρυθμιστές σε μία πληθώρα βιολογικών και βιοχημικών διεργασιών, όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, ο μεταβολισμός και η ανοσολογική λειτουργία, με την απορρύθμισή τους να ενέχεται στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται ο καρκίνος, διαταραχές του μεταβολισμού²¹⁴, διάφορες φλεγμονώδεις²¹⁵, αυτοάνοσες²¹⁶ και καρδιαγγειακές²¹⁷ παθήσεις, καθώς και η οστεοαρθρίτιδα.

A.3. Διάγνωση & Θεραπεία της ΟΑ

Η διάγνωση της εν λόγω εκφυλιστικής διαταραχής των αρθρώσεων βασίζεται κατά κύριο λόγο στο συνδυασμό κλινικών σημείων, όπως αυτά υπαγορεύονται από τον ασθενή και στα αποτελέσματα ραδιογραφικών και υπερηχογραφικών απεικονιστικών μεθόδων όπου μπορούν να εντοπιστούν εύκολα τόσο τυχόν διαβρώσεις χαρακτηριστικές της ΟΑ, όπως δυσμορφίες στο οστό, παρουσία οστεοφύτων ή σκληρωτικών περιοχών στο υποχόνδριο οστό όσο και ευρημάτων ενδεικτικών υμενίτιδας, με το gold standard της διάγνωσης να είναι η ιστολογική

εκτίμηση βιοοπτικού υλικού, διαδικασία ωστόσο επεμβατική και με περιορισμούς ως προς τη χρήση σε όλους τους πιθανούς ασθενείς.

Η απεικονιστική διάγνωση βασίζεται σ' ένα σύστημα βαθμολόγησης το οποίο καλείται Kellgren- Lawrence (K- L). Σύμφωνα με αυτό, τα ευρήματα χαρακτηρίζονται ανάλογα με τη βαρύτητά τους σε μία κλίμακα από το 0 που υποδηλώνει φυσιολογική εικόνα άρθρωσης μέχρι το 4 που σηματοδοτεί την πλήρη απώλειά της²¹⁸. Ωστόσο, οι ραδιογραφικές τεχνικές εμφανίζουν περιορισμούς καθώς έχουν χαμηλή ευαισθησία και εντοπίζουν ευρήματα ως επί το πλείστον σε προχωρημένα στάδια νόσου²¹⁹.

Παρά το γεγονός ότι η συχνότητα εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας αυξάνεται με ραγδαίο ρυθμό, ειδικά τα τελευταία χρόνια, και ολόένα και περισσότεροι άνθρωποι υποφέρουν από αυτήν, εντούτοις μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ούτε επαρκής τρόπος πρόωμης κλινικής διάγνωσης της, ούτε αποτελεσματική θεραπεία που να εμποδίζει ή/ και να αναστέλλει την εξέλιξή της, με τις θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται στα μεν αρχικά στάδια νόσου να στρέφονται στην ανακούφιση από τα συμπτώματα και κυρίως στη διαχείριση του πόνου, ενώ σε πιο προχωρημένα απαιτείται χειρουργική αντιμετώπιση, με αντικατάσταση της προσβεβλημένης άρθρωσης με τη μέθοδο της αρθροπλαστικής.

Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη σημασία στην υιοθέτηση ενός πιο υγιούς και ενεργητικού τρόπου ζωής, ως μέσο βελτίωσης των συμπτωμάτων της ΟΑ. Ειδικότερα, καθώς η νόσος σχετίζεται άμεσα με την παχυσαρκία, προτείνεται ένα πρόγραμμα ισοροποποιημένης διατροφής σε συνδυασμό με άσκηση, ενέργειες που κατ' ουσία στοχεύουν στον θερμιδικό περιορισμό, στην απώλεια βάρους²²⁰ και στη μείωση της μηχανικής πίεσης που ασκείται στις αρθρώσεις των κάτω άκρων. Η Αμερικάνικη Ένωση Ρευματολογίας (ACR) με σύστασή της προτείνει ορισμένες μη φαρμακολογικές προσεγγίσεις για τη διαχείριση των συμπτωμάτων της ΟΑ, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η αερόβια άσκηση ή/και οι ασκήσεις στο νερό, διάφορες μορφές φυσιοθεραπείας και η απώλεια βάρους, ενώ αναφορικά με τη χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων συστήνονται κυρίως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) είτε από του στόματος είτε τοπικά²²¹.

Καθώς η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη, μη επιδιορθώσιμη απώλεια του αρθρικού χόνδρου, μείζον στόχος είναι κατ' εξοχήν η πρόληψη και όχι η θεραπεία. Ένας τρόπος πρόληψης, πέρα από την υιοθέτηση ενός ευρύτερα υγιούς τρόπου ζωής, είναι η έγκαιρη ή ιδανικά πρόωμη ανίχνευση της πάθησης, η οποία θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση αξιόπιστων δεικτών της νόσου- βιοδεικτών.

A.4. Τα microRNAs ως Βιοδείκτες

Τα miRNAs παρουσιάζουν συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης σε διαφορετικούς ιστικούς και κυτταρικούς τύπους, όπως επίσης και σε συγκεκριμένες χρονικές ή/ και αναπτυξιακές φάσεις, ενώ η έκφρασή τους διαφοροποιείται και επί παθολογικών συνθηκών. Ως εκ τούτου, αποτελούν δυνητικούς προγνωστικούς ή/ και διαγνωστικούς δείκτες (βιοδείκτες).

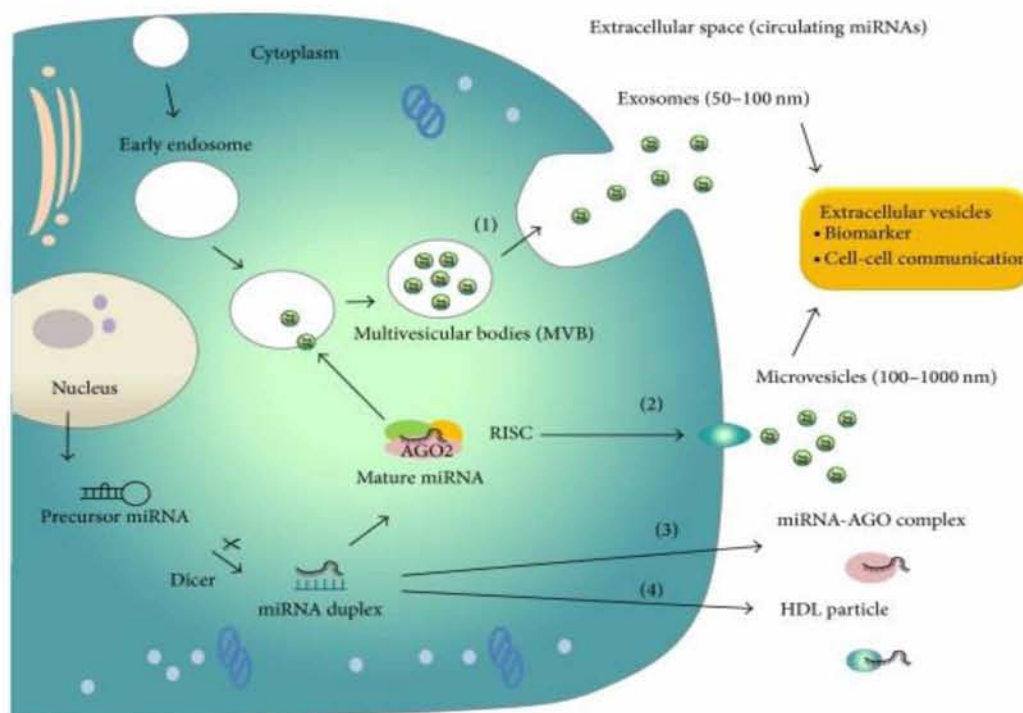
Η ανάγκη ανάπτυξης νέων, μη ή ελάχιστα επεμβατικών μεθόδων διάγνωσης ή και πρόγνωσης ενός ευρέως φάσματος ασθενειών καθιστά απαραίτητη τη μελέτη των microRNAs ως βιοδεικτών. Κατ' αρχάς, ένας ιδανικός βιοδείκτης (biomarker) θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα και να διαθέτει προγνωστική αξία, γνωρίσματα τα οποία, τουλάχιστον εν μέρει, διαθέτουν και τα miRNAs. Ειδικότερα, τα microRNAs μπορούν να ανευρεθούν σε διάφορα βιολογικά υγρά, τουλάχιστον 12 όπως έχει προκύψει από μελέτη των Weber και συν., μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το πλάσμα, τα ούρα, τα δάκρυα, ο σίελος, το αμνιακό υγρό, το μητρικό γάλα και οι βρογχικές εκπλύσεις²²², ενώ επιπλέον έχουν ανευρεθεί στο σπέρμα²²³, στο αρθρικό υγρό²²⁴, καθώς και σε κύτταρα και ιστούς του σώματος όπως ο αρθρικός χόνδρος και φυσικά στο αίμα (ορός και πλάσμα)²²⁵⁻²²⁹ που αποτελεί το πιο εύκολα προσβάσιμο και ίσως καταλληλότερο υλικό για ανεύρεση βιοδεικτών, με τα microRNAs να βρίσκονται σε αφθονία σε αυτό και μάλιστα να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα²³⁰.

Αναφορικά με την παρουσία miRNAs στην κυκλοφορία, δοθέντος ότι το RNA αποδομείται στον ορό υπό την επίδραση RNAασών, θα ήταν αναμενόμενο να

απουσιάζουν και τα microRNAs από αυτόν. Ωστόσο, ήδη από το 2002 οι Tsui και συν. ανέδειξαν κάποιου βαθμού σταθερότητα του RNA στον ορό²³¹ και 2 χρόνια αργότερα, το 2004, ανευρέθησαν στην κυκλοφορία μικρά, εξωκυττάρια τμήματα RNA, χωρίς ωστόσο να γίνει ταυτοποίησή τους²²⁵, με τους Lawrie και συν. να είναι οι πρώτοι που περιέγραψαν την αυξημένη έκφραση microRNAs στον ορό ασθενών με λέμφωμα²²⁶, ενώ την ίδια χρονιά ανεδείχθη και η σταθερότητά τους τόσο στον ορό όσο και στο πλάσμα²²⁷. Έπειτα από αυτήν τη σημαντική παρατήρηση ακολούθησαν αρκετές μελέτες, οι οποίες επιχειρούσαν να δώσουν μία εξήγηση σχετικά με την παρουσία των μορίων αυτών στην κυκλοφορία και φυσικά στόχευαν στην ανεύρεση επιπλέον miRNAs και στη συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις.

Έχουν προταθεί διάφορες πιθανές πηγές προέλευσης κυκλοφορούντων microRNAs, χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί η ακριβής. Πιο συγκεκριμένα, πιθανολογείται ότι τα μόρια αυτά μπορεί να ανευρίσκονται στην κυκλοφορία ως «ελεύθερα ή γυμνά» miRNAs, τα οποία διατηρούν τη μορφή των τυπικών, ώριμων microRNAs και ενδέχεται να αποτελούν προϊόντα αποδόμησης ή/ και απόπτωσης, προερχόμενα από διαδικασίες ιστικής καταστροφής και φλεγμονής ή εκκρινόμενα απευθείας από τα κύτταρα²³². Μια άλλη προσέγγιση αναφέρει ότι τα κυκλοφορούντα microRNAs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία συνιστώντας το περιεχόμενο κυστιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των microRNAs στο εξωκυττάριο περιβάλλον μπορεί να είναι το αποτέλεσμα 1) ενσωμάτωσής τους σε μικροκυστίδια αποτελούμενα από πλασματική μεμβράνη (microvesicles), ή 2) έκκρισής τους υπό τη μορφή των εξωσωμάτων, όταν τα μικροκυστιδιακά σωμάτια (microvesicular bodies) στα οποία εμπεριέχονται συγχωνευτούν με την πλασματική μεμβράνη και με διαδικασίες εξωκύττωσης τα απελευθερώσουν στην κυκλοφορία^{233,234}, ενώ 3) μπορεί να περιέχονται και σε αποπτωτικά σωμάτια μαζί με πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κατάλοιπα των κυττάρων. Παρόλ' αυτά, δεν αποκλείεται και η ανεξάρτητη κυστιδίων παρουσία τους κυκλοφορούντων miRNAs, η οποία περιλαμβάνει την πρόσδεσή τους σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Χαρακτηριστικότερα παραδείγματα πρωτεϊνικών μεταφορέων των ώριμων microRNAs στην κυκλοφορία αποτελούν το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα με κυρίαρχη πρωτεΐνη την Ago2²³⁵ και οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL)²³⁶. Καθώς δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος εξόδου των miRNAs από τους ιστούς και τα κύτταρα που τα φιλοξενούν, δεν αποκλείεται να υπάρχουν περισσότερες από μία διαφορετικές οδοί που συμβάλλουν στην

απελευθέρωσή τους στο αίμα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Πιθανές οδοί απελευθέρωσης των microRNAs στην κυκλοφορία. (ελήφθη από: *The impact of extracellular vesicle-encapsulated circulating microRNAs in lung cancer research*. Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T. & Takeshita, F. *Biomed Res. Int.* 2014, 486413 (2014))

Στα πλαίσια της βιολογικής σταθερότητας, βρέθηκε ότι τα miRNAs διαθέτουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα τόσο στη δράση της RNAάσης A (RNAase A) όσο και στην επίδραση ακραίων συνθηκών, όπως ο βρασμός και η έκθεση σε όξινο και βασικό pH (pH= 1 και 10, αντίστοιχα)²²⁸, ενώ σταθερά παραμένουν σε διάφορες συνθήκες συντήρησης, αλλά και σε επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάψυξης και απόψυξης²³⁴.

Λόγω της εύκολης εντόπισής τους σε υγρά του σώματος, έχουν ήδη διενεργηθεί μελέτες σχετικά με τον πιθανό τους ρόλο ως βιοδείκτες, με αρκετά ενθαρρυντικά ευρήματα, με τις πρώτες έρευνες να προσανατολίζονται στη διερεύνηση της διαφοροποιημένης έκφρασής τους στον καρκίνο^{227,237}, ενώ σταδιακά η έρευνα στρέφεται σε όλο και περισσότερες παθήσεις, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα^{229,238} και η οστεοαρθρίτιδα^{224,232,239,240}. Οι έρευνες σχετικά με την ΟΑ είναι

λίγες, καθώς αφορούν μόλις στη τελευταία πενταετία, ωστόσο παρά το γεγονός ότι στερούνται μεγάλου αριθμού δειγμάτων ή/ και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων, είναι πολλά υποσχόμενες. Ειδικότερα, η μελέτη των Beyer και συν. κατάφερε να εντοπίσει το κυκλοφορούν miRNA, let- 7e, και να το χαρακτηρίσει ως δυνητικό προγνωστικό δείκτη σοβαρού βαθμού οστεοαρθρίτιδας²³⁹, ενώ και οι Kong και συν. ανέδειξαν 3 miRNAs (miR-19b-3p, miR-122-5p και miR-486-5p), τα οποία συνδυαστικά θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ένας αξιόπιστος βιοδείκτης διάγνωσης και πρόγνωσης της ΟΑ²⁴⁰.

A.5. Τα microRNAs στην ΟΑ

Την τελευταία δεκαετία έχει δημοσιευθεί μία πληθώρα ερευνητικών εργασιών, οι οποίες αποσκοπούν στη μελέτη του προφίλ έκφρασης ποικίλων microRNAs σε διάφορους ιστούς, καθώς και σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος²⁴¹ και η οστεοαρθρίτιδα⁶⁴.

Ειδικά για την ΟΑ, οι πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μοντέλα ζώων και στρέφονταν κυρίως στο λειτουργικό ρόλο των miRNAs σε ιστούς της άρθρωσης. Το 2006 ο Kobayashi και οι συνεργάτες του μέσω μελετών σε μοντέλα ζώων απέδειξαν ότι η συμμετοχή της Dicer στη σκελετική ανάπτυξη και λειτουργικότητα του χόνδρου είναι μείζονος σημασίας, καθώς από την παρουσία της εξαρτάται ο πολλαπλασιασμός και η ωρίμανση των χονδροκυττάρων και κατ' επέκταση και των ίδιων των οργανισμών²⁴².

Η πρώτη δημοσίευση στην οποία έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης διαφόρων miRNAs σε ιστούς της άρθρωσης μεταξύ ατόμων με ΟΑ και άνευ παθολογίας ήταν το 2008, από τους Ηλιόπουλο και συν⁶⁴. Η ομάδα αυτή μελέτησε την έκφραση 365 microRNAs στον αρθρικό χόνδρο και κατέληξε σε 16, τα οποία παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση. Λειτουργικές μελέτες και αναλύσεις αλγορίθμων έδειξαν ότι αυτά τα miRNAs εμπλέκονται σε μεταβολικά και σχετιζόμενα με τη φλεγμονή μονοπάτια, ενώ έγινε και σαφής συσχέτιση της παχυσαρκίας με την οστεοαρθρίτιδα, με την πρώτη παθολογική κατάσταση να συμβάλλει στην ανάπτυξη της δεύτερης μέσω διαταραχής της ομοιόστασης στην περιοχή του χόνδρου στα πλαίσια αλλαγής της έκφρασης διαφόρων miRNAs⁶⁴. Οι

Jones και συν. μελετώντας την έκφραση σε οστά και χόνδρους ατόμων με και χωρίς οστεοαρθρίτιδα ανέδειξαν 41 διαφορετικά εκφραζόμενα microRNAs, εκ των οποίων σημαντικού βαθμού υπερ- και υπο- έκφραση παρουσίαζαν, αντίστοιχα, τα miR- 9, -98 και -146, με τις λειτουργικές μελέτες που διενεργήθηκαν να φανερώνουν συμμετοχή τους σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες²⁴³. Τις παραπάνω δημοσιεύσεις που αποτελούν και τις πρώτες που ασχολήθηκαν με το θέμα των miRNAs στην ΟΑ ακολούθησαν και πολλές άλλες, με τον αριθμό τους πλέον να υπερβαίνει τις 200²⁴⁴. Είναι πλέον προφανές ότι η λίστα με τις έρευνες που αποδεικνύουν ότι η έκφραση ποικίλων microRNAs διαφοροποιείται στην οστεοαρθρίτιδα είναι εκτενής^{64,243,245-247}, με τα μικρά αυτά μη κωδικά μόρια να φαίνεται ότι ασκούν τη δράση τους στοχεύοντας είτε σηματοδοτικά μονοπάτια²⁴⁸, είτε απ' ευθείας μεταγραφικούς και επιγενετικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, διάφορα miRNAs έχει βρεθεί να δρουν upstream μονοπατιών, όπως το NF- kappa B^{245,249-252}, το SIRT1/ p53 και το Wnt/ β- catenin²⁵³, με τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται από έρευνες τόσο σε μοντέλα ζώων όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες προερχόμενες από δείγματα ανθρώπων.

Από τις μελέτες που έχουν διενεργηθεί έχει προκύψει μία πληθώρα μικρών, μη κωδικών μορίων RNA, τα οποία έχουν βρεθεί να υπό- ή υπερ- εκφράζονται σε ιστούς της άρθρωσης ατόμων με ΟΑ συγκριτικά με μη ασθενείς. Κάποια από αυτά τα microRNAs, όπως τα miR-140, -146a, -199a^{254,255}, -145^{256,257}, -27b και -9 έχουν σημαντικούς ρόλους τόσο στη διατήρηση της ομοιοστασίας στην περιοχή της άρθρωσης όσο και στην ανάπτυξη ΟΑ.

Πιο συγκεκριμένα, το miR-140 αποτελεί ένα από τα πιο καλά μελετημένα miRNAs, τόσο λόγω του ότι παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στην ΟΑ όσο και γιατί εκφράζεται ειδικά από τα χονδροκύτταρα και μάλιστα σε αφθονία. Ο λειτουργικός του ρόλος έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι αποτελεί βασικό παράγοντα για τη διατήρηση της ομοιοστασίας στην περιοχή του χόνδρου, ενώ επιπλέον συμμετέχει και στη φυσιολογική σκελετική ανάπτυξη^{258,259}, μέσω ρύθμισης της έκφρασης της ADAMTS- 5^{247,260}. Άμεσο στόχο του εν λόγω miRNA αποτελεί και ο παράγοντας IGFBP5 (Insulin- like growth factor binding protein 5), με τα

επίπεδα έκφρασης του να ακολουθούν αυτά του miR-140 και τα δύο τους να ρυθμίζονται από τον TGFβ²⁶¹. Σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα τα επίπεδα έκφρασης του miR-140 είναι πολύ χαμηλά, με την ADAMTS- 5 και την MMP- 13 να υπερεκφράζονται^{247,260,262}.

Ένα άλλο miRNA το οποίο έχει μελετηθεί αρκετά είναι το miR-146a. Αυτό φαίνεται να αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του NF- kappa B, καθώς και της φλεγμονώδους απάντησης και καταβολικών γονιδίων²⁵¹, ενώ εκφράζεται υπό την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, κυρίως της IL- 1β²⁴⁵.

Άλλα παραδείγματα microRNAs που εκφράζονται διαφορετικά στα πλαίσια ΟΑ είναι τα miR-27b και miR-9. Το μεν πρώτο ανευρίσκεται υποεκφραζόμενο σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα και αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της έκφρασης της MMP- 13. Μάλιστα, σε χονδροκύτταρα μετά από επίδραση με IL- 1β το miR-27b μειώνεται σημαντικά, με τα επίπεδα της MMP- 13 να αυξάνονται²⁵². Για το συγκεκριμένο miRNA έχει βρεθεί επιπλέον ότι παράλληλα με τα μειωμένα του επίπεδα η λεπτίνη υπερεκφράζεται, ενώ in vivo διέγερσή του σε μοντέλα ζώων οδηγεί σε αναστολή του NF- kappa B μονοπατιού, μέσω στόχευσης της λεπτίνης²⁵⁰. Αναφορικά με το miR-9, αυτό φαίνεται να δρα ως ρυθμιστής της έκφρασης του NF- kappa B και μάλιστα υποέκφραση του πρώτου οδηγεί σε υπερέκφραση του δεύτερου, που συνεπάγεται και αυξημένη έκφραση των IL- 6 και MMP- 13²⁴⁹.

A.2. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία βασίστηκε στα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης η οποία έχει σαν σκοπό τη μελέτη της έκφρασης microRNAs στον ορό ασθενών με ΟΑ και ατόμων χωρίς παθολογία στην άρθρωση, με τη μέθοδο των microRNA μικροσυστοιχιών. Από την εν λόγω μελέτη προέκυψαν microRNAs με

διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό και από αυτά επελέγησαν τα ακόλουθα 7 προκειμένου να ελεγχθεί η έκφρασή τους σε επιλεγμένους ιστούς της άρθρωσης. Ειδικότερα, τα miRNAs που μελετήθηκαν είναι τα miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233 και miR-4284. Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η έκφραση και των 7 miRNAs στον αρθρικό χόνδρο φυσιολογικών ατόμων και ατόμων με OA και στη συνέχεια, από τα microRNAs που εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφοροποιημένη έκφραση επελέγησαν 2, τα οποία επιπλέον μελετήθηκαν σε υμένα.

Εκτός από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης, διερευνήθηκαν και οι πιθανοί μοριακοί και βιολογικοί ρόλοι των γονιδίων- στόχων των διαφοροποιημένων microRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Υλικά και Μέθοδοι

B.1.1. Συλλογή Δειγμάτων

Για τη διενέργεια της μελέτης χρειάστηκαν κύτταρα προερχόμενα από δύο τύπους ιστού της άρθρωσης, τον αρθρικό χόνδρο και τον υμένα. Όσον αφορά στη μελέτη του χόνδρου χρησιμοποιήθηκαν 19 δείγματα, 12 προερχόμενα από άτομα με οστεοαρθρίτιδα και 7 από φυσιολογικά άτομα. Ο αριθμός δειγμάτων υμένα που μελετήθηκαν είναι 5, εκ των οποίων τα 3 ελήφθησαν από ασθενείς με ΟΑ και τα 2 από άτομα άνευ παθολογίας στην άρθρωση.

Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τον εάν παρουσίαζαν ή όχι οστεοαρθρίτιδα. Στην πρώτη ομάδα, των ατόμων με ΟΑ, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χόνδρου και υμένα από 12 και 3 άτομα, αντίστοιχα, ηλικίας 66.7 ± 7.6 ετών, με κλινικά και ακτινολογικά διεγνωσμένη οστεοαρθρίτιδα και βαθμολογία ≥ 3 στην κλίμακα Kellgren- Lawrence, ενώ απεκλείστησαν ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα ή μη νοσήματα, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα και χονδροδυσπλασία. Τα δείγματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια ολικής αρθροπλαστικής γόνατος στα πλαίσια πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Συνολικά για χόνδρο και υμένα χρησιμοποιήθηκαν 7 και 2 φυσιολογικά δείγματα αντίστοιχα, προερχόμενα από άτομα με μέση ηλικία τα 59.9 ± 7.3 έτη, χωρίς προηγούμενο ιστορικό παθήσεων στις αρθρώσεις ή ακτινολογικά εντοπισμένες αλλοιώσεις συμβατές με ΟΑ. Αυτοί οι συμμετέχοντες συγκρότησαν τη δεύτερη ομάδα, των μη πασχόντων από οστεοαρθρίτιδα, από τους οποίους τα δείγματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής αποκατάστασης καταγμάτων ή στα πλαίσια ακρωτηριασμού.

B.1.2. Απομόνωση Κυττάρων & Καλλιέργειά τους

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από δύο τύπους ιστού, αρθρικό χόνδρο και υμένα. Η απομόνωση των κυττάρων βασίζεται σε διαδικασίες

ενζυμικής διάσπασης και είναι κοινή και για τους δύο ιστικούς τύπους. Η καλλιέργεια γίνεται με χρήση του θρεπτικού υλικού Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F- 12 (DME/ F- 12, GIBCO BRL, UK), το οποίο πριν από τη χρήση έχει υποστεί εμπλουτισμό με βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10 %, καθώς και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 1 % του όγκου του θρεπτικού υλικού. Όλες οι επώσεις έγιναν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και συνεχή παροχή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) 5 %. Όλα τα στάδια επεξεργασίας των κυττάρων έγιναν σε κατάλληλα διαμορφωμένο στείρο χώρο και οι χειρισμοί τους σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, προκειμένου να εξασφαλιστούν οι άσηπτες συνθήκες εργασίας και να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Το πρωταρχικό βήμα της διαδικασίας είναι ο καθαρισμός του ιστού, όπως αυτός βρίσκεται στην αρχική του μορφή αμέσως μετά την παραλαβή του από το χειρουργείο, για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων. Η έκπλυση γίνεται με διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS without Ca²⁺, Mg²⁺, Hyclone), το οποίο επίσης εξασφαλίζει και σταθερό pH. Στη συνέχεια ο ιστός τεμαχίζεται με αποστειρωμένο νυστέρι και τοποθετείται σε τρυβλίο petri χωρητικότητας 2 mL. Η διαδικασία που έπεται περιλαμβάνει την ενζυμική διάσπαση των ιστοτεμαχίων αρχικά με προνάση (Pronase, Roche) και ακολούθως με κολλαγενάση (Collagenase P, Roche). Το πρώτο ένζυμο συμβάλλει στην πέψη των πρωτεογλυκανών προκειμένου να γίνει απελευθέρωση των ινών κολλαγόνου, ενώ το δεύτερο αποσκοπεί στην απελευθέρωση των χονδροκυττάρων μετά από λύση του δικτύου του κολλαγόνου.

Η προνάση προστίθεται στον τεμαχισμένο ιστό σε αναλογία 5 mg/ mL και ακολούθως γίνεται προσθήκη 2 mL θρεπτικού υλικού DME/ F- 12 και επώαση για 30 min σε κλίβανο (στις συνθήκες θερμοκρασίας και CO₂ που αναφέρθηκαν παραπάνω). Μετά την επώαση, απομακρύνεται το υπερκείμενο με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μίας χρήσης. Ακολουθεί προσθήκη 5 mg/ mL από το δεύτερο ένζυμο, την κολλαγενάση, σε 2 mL θρεπτικού υλικού και παραμονή στον κλίβανο για 24 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου αναμονής το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό

σωληνάριο falcon των 15 mL, συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό μέχρι τα 5 mL και φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται εκ νέου ποσότητα θρεπτικού υλικού σε τελικό όγκο 5 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, όπως και παραπάνω. Έπειτα και από αυτήν τη φυγοκέντρηση, το ίζημα μεταφέρεται με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μιας χρήσης σε φλάσκα 25 cm³, συμπληρώνεται ποσότητα 5 mL θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια γίνεται επώαση στον κλίβανο (στις παραπάνω αναγραφόμενες συνθήκες).

Η πορεία ανάπτυξης των χονδροκυττάρων στη φλάσκα παρακολουθείται με τη χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss). Σε πρώτη φάση, τα κύτταρα ανευρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό, μετά όμως από 48 περίπου ώρες, προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και το σχήμα τους από αρχικά στρογγυλό αποκτά πεπλατυσμένη μορφολογία. Χάρη στην παροχή των απαιτούμενων θρεπτικών ουσιών και στην εξασφάλιση ιδανικών συνθηκών υγρασίας, θερμοκρασίας και CO₂ τα χονδροκύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται. Ως εκ τούτου καθίσταται αναγκαία η ανακαλλιέργειά τους, η οποία εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό των κυττάρων μέσα στη φλάσκα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανωτέρω διαδικασία είναι η αποκόλληση των κυττάρων από τα τοιχώματα της φλάσκας, η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη κατάλληλου ενζύμου. Αρχικά γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού, έκπλυση με 5 mL PBS και προσθήκη θρυψίνης ποσότητας 1 mL. Η θρυψίνη είναι αυτή που θα συμβάλλει στην απομάκρυνση και συλλογή των κυττάρων, λόγω του ότι διαθέτει την ικανότητα διάρρηξης των συνδέσεων κυττάρου- επιφάνειας προσκόλλησης. Ο μέγιστος χρόνος επώασης με το ένζυμο δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 10 min και η διαδικασία επιβάλλεται να πραγματοποιείται μέσα στον κλίβανο. Η αποκόλληση των χονδροκυττάρων επιβεβαιώνεται με την παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο. Η δράση της θρυψίνης διακόπτεται με την προσθήκη θρεπτικού υλικού και ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις.

B.1.3. Απομόνωση RNA

Το επόμενο βήμα είναι η μελέτη της έκφρασης γονιδίων, διαδικασία η οποία επιτυγχάνεται χάρη στην απομόνωση RNA, και πιο συγκεκριμένα mRNA, από τα καλλιεργημένα χονδροκύτταρα.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

1. Αρχικά, σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από κυτταροκαλλιέργεια προστίθεται Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) σε ποσότητα ίση με 1 mL, προκειμένου να επιτευχθεί κυτταρική λύση.
2. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT, room temperature) για 5 min.
3. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μ L χλωροφόρμιο σε κάθε δείγμα.
4. Τα δείγματα υποβάλλονται σε έντονη ανακίνηση (vortex) και αφήνονται για επώαση σε RT για 3 min.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (θερμοκρασία 4^o C), στις 12000 rpm για 15 min.
6. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης σε κάθε eppendorf διακρίνονται 3 φάσεις: μία άνωτερη υδατική αποτελούμενη από το RNA που έχει διαχωριστεί από τα υπόλοιπα συστατικά (που είναι και αυτή που θα λάβουμε), μία ενδιάμεση και μία κατώτερη. Αφού γίνει λήψη του υπερκείμενου υγρού, αυτό μεταφέρεται σε καινούριο eppendorf των 2 mL και γίνεται προσθήκη κρύας ισοπροπυλικής αλκοόλης ποσότητας 1 mL, προκειμένου να επιτευχθεί κατακρήμνιση του RNA.
7. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση και επώαση σε RT για 10 min.
8. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 min στις 12000 rpm, στους 4^o C.
9. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1 mL κρύας αιθανόλης 70 %.

10. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται και πάλι στους 4° C, στις 8000 rpm για 8 min.
11. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα eppendorf αφήνονται στον κλίβανο προκειμένου να εξατμιστεί όση ποσότητα υγρού έχει περισσέψει.
12. Το τελικό βήμα είναι η διαλυτοποίηση του ιζήματος με προσθήκη 30 μL ddH₂O και επώαση σε υδατόλουτρο στους 55- 60° C για 10 min.

B.1.4. Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (Complementary DNA,cDNA)

Το RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα των καλλιεργημένων χονδροκυττάρων υπεβλήθει σε διαδικασία μετατροπής του σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι αυτή της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription), η οποία βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών για την ενίσχυση συγκεκριμένων, επιθυμητών τμημάτων RNA, διαδικασία που επιτυγχάνεται χάρη στο ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης και γίνεται σε ειδική συσκευή που καλείται θερμικός κυκλοποιητής PCR (AB Applied Biosystems).

Στην παρούσα διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SuperScript[®]III Reverse Transcriptase (200U/ μL , invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Η σύνθεση του cDNA γίνεται με τη χρήση εκμαγείου RNA (όπως αυτό απομονώθηκε σύμφωνα με την ανωτέρω περιγραφείσα διαδικασία) ποσότητας 1 μL και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ειδικοί, γνωστής αλληλουχίας, για τα υπό διερεύνηση microRNAs (stem loop RT primers, 5 pmol). Ως μάρτυρας για την επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης του cDNA έγινε χρήση του μικρού πυρηνικού RNA U6 (RNU6B), με τον αντίστοιχο stem loop RT εκκινητή.

Καθώς μελετήθηκε η έκφραση διαφόρων miRNAs, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι primers:

- ✓ miR-33b-3p stem loop RT primer
- ✓ miR-140-3p stem loop RT primer
- ✓ miR-150-5p stem loop RT primer
- ✓ miR-671-3p stem loop RT primer
- ✓ miR-663-3p stem loop RT primer
- ✓ miR-4284 stem loop RT primer
- ✓ miR-1233 stem loop RT primer

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε 2 στάδια:

ΣΤΑΔΙΟ 1 (cDNA1):

- | | |
|-------------------------------|-------|
| • Stem loop RT primer (5pmol) | 1 μL |
| • ddH ₂ O | 13 μL |
| • RNA | 1 μL |

Για κάθε διαφορετικό υπό μελέτη microRNA (καθώς και για το U6) παρασκευάζεται το αντίστοιχο mix αποτελούμενο από τον primer και το ddH₂O. Στη συνέχεια το μείγμα προστίθεται στα eppendorfs, μέσα στα οποία περιέχεται η ποσότητα του απομονωμένου RNA.

Ακολούθως, τα eppendorfs τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή προκειμένου να γίνει το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο περιλαμβάνει θέρμανση στους 70 ° C για 10 min με σκοπό την αποδιάταξη του RNA.

Ακολουθεί ψύξη των δειγμάτων για 5 min στον πάγο προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι αποδιατεταγμένες δομές του RNA και στη συνέχεια προστίθενται τα αντιδραστήρια του δευτέρου σταδίου.

ΣΤΑΔΙΟ 2 (cDNA2):

- 5x First Strand Buffer 4 μ L
- 50 mM MgCl₂ 2 μ L
- dNTPs (δεοξυριβονουκλεοτίδια) 2 μ L
- DTT 0,1 M 2 μ L
- SuperScript[®] III (200U/ μ L) 0,5 μ L

Αφού προηγηθεί παρασκευή και διαμοιρασμός του δεύτερου mix στα eppendorfs, αυτά τοποθετούνται στον κυκλοποιητή προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της σύνθεσης συμπληρωματικού DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

- Για 10 min στους 20 °C
- Για 45 min στους 42 °C
- Για 3 min στους 99 °C
- Για 5 min στους 18 °C
- Ψύξη στους 4 °C

B.1.5. Ανίχνευση μεταγράφων των υπό μελέτη miRNAs με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA,

καθώς και για τον αποκλεισμό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων εφαρμόζεται η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατά την οποία γίνεται *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων επιθυμητών τμημάτων DNA με τη χρήση ειδικών εκκινητών, καθορισμένης αλληλουχίας, οι οποίοι υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας- στόχου. Η ενίσχυση επιτυγχάνεται χάρη στη δράση ενός ενζύμου, της DNA πολυμεράσης (DNA polymerase). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά κόρον είναι η Taq πολυμεράση, καθώς οι θερμοανθεκτικές της ιδιότητες επιτρέπουν τη δράση και τη βιωσιμότητά της σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Απαραίτητα συστατικά για τη PCR είναι οι εκκινητές. Πρόκειται για μικρές, ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συμπληρωματικές ως προς τα δύο άκρα (δεξιά και αριστερά) της ακολουθίας DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η επιλογή των κατάλληλων για κάθε DNA- εκμαγείο εκκινητών είναι μείζονος σημασίας και καθορίζεται τόσο από την αλληλουχία του DNA- στόχου όσο και από το σημείο τήξης τους (T_m).

Για την παρασκευή του μίγματος της PCR χρησιμοποιούμε τα ακόλουθα:

- | | |
|---|---------------------|
| ➤ Εκμαγείο DNA (cDNA) | 3 μ L |
| ➤ Ζεύγος εκκινητών (Forward primer- Reverse primer) | 0,5 μ L έκαστος |
| ➤ ddH ₂ O | 8,5 μ L |
| ➤ 2x Taq HotStart polymerase | 12,5 μ L |

Στην Taq HotStart πολυμεράση περιλαμβάνεται εκτός από το ένζυμο, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτιδία (dNTPs) και το ρυθμιστικό διάλυμα με τα απαραίτητα ιόντα.

Το mix της PCR προστίθεται στα eppendorfs μαζί με το εκμαγείο DNA και ακολουθεί η αντίδραση στον κυκλοποιητή, σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

1. 94- 98 °C για ~ 5 min → Ενεργοποίηση της hot start πολυμεράσης
2. 95 °C για 1 min → Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
3. 56 °C για 1 min → Υβριδοποίηση των εκκινήτων στο μονόκλωνο DNA
4. 72 °C για 1 min → Επιμήκυνση

5. 72 °C για 5- 15 min → Τελική επιμήκυνση

6. 4 °C → Συντήρηση

Τα στάδια 2 έως και 4 επαναλαμβάνονται 40 φορές.

B.1.6. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης 3%

Ο έλεγχος της επιτυχούς και σωστής παραγωγής των προϊόντων της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση των παραγόμενων τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3 % και σύγκρισης του μεγέθους των προϊόντων με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους. Για τη διάκριση της ζώνωσης χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των 2 αλυσίδων του DNA καθιστώντας το ορατό όταν αυτό υποβάλλεται σε ανίχνευση με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

B.1.7. Ποσοτικοποίηση των παραγομένων miRNA μεταγράφων με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction- RT PCR)

Για την ποσοτική μελέτη της έκφρασης των μορίων miRNA απαιτείται η εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, γνωστής και ως Real Time PCR. Με τη μέθοδο της RT- PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA- στόχου και η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο, διαδικασίες οι οποίες γίνονται ταυτόχρονα. Η ανίχνευση της πορείας παραγωγής αντιγράφων DNA γίνεται χάρη στη χρήση ειδικών ανιχνευτών. Στην παρούσα διαδικασία ο ανιχνευτής επιλογής είναι η

φθορίζουσα ουσία *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (applied Biosystems, life technologies), η οποία προσδένεται στο δίκλωνο DNA και έχει την ιδιότητα να εκπέμπει φθορισμό. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός ανιχνεύεται από ειδικό οπτικό σύστημα που διαθέτει ο κυκλοποιητής και με τον τρόπο αυτό γίνεται η ποσοτικοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά τη φάση της επιμήκυνσης τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο προϊόν, άρα τόσο μεγαλύτερη η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Σημαντικό πλεονέκτημα της SYBR green έναντι άλλων ανιχνευτών είναι ότι παρέχει έναν αξιόπιστο τρόπο εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου, δοθέντος ότι κάθε προϊόν ανάλογα και με το μέγεθός του έχει μία θερμοκρασία τήξης (Tm) που είναι χαρακτηριστική για το καθένα. Παρά το γεγονός ότι η SYBR green αποτελεί έναν απλό τρόπο ανίχνευσης του DNA, εντούτοις μπορεί να προσδεθεί και μη ειδικά, με αποτέλεσμα να απαιτείται ταυτοποίηση του ποιό είναι το επιθυμητό προϊόν που παράγεται κάθε φορά και ποιό το παραπροϊόν- αποτέλεσμα της μη ειδικής σύνδεσης.

Τα πλεονεκτήματα της Real Time PCR ως μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. συνδυασμός αντίδρασης PCR με ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος
2. σύντομος χρόνος διαδικασίας
3. εξαιρετική ευαισθησία για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων
4. υψηλή ακρίβεια
5. επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων
6. περιορισμένος κίνδυνος επιμολύνσεων.

Η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος γίνεται με βάση μία καμπύλη που καλείται καμπύλη πολλαπλασιασμού. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα γράφημα, το οποίο παρέχει σημαντικές πληροφορίες και προκύπτει από τον εκπεμπόμενο φθορισμό σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Σε κάθε κύκλο

PCR, ήδη από τον πρώτο, παράγεται φθορισμός, ο οποίος είναι αντιπροσωπευτικός της ποσότητας του προϊόντος στο εκάστοτε σημείο της αντίδρασης. Από τις βασικότερες πληροφορίες που παρέχει η γραφική παράσταση είναι το κατώφλι κύκλου (threshold cycle, Ct), καθώς αποτελεί την τιμή που απαιτείται για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Το Ct είναι ο αριθμός του κύκλου κατά τον οποίο το σήμα του φθορισμού ξεπερνάει αυτό του αρχικά εκπεμπόμενου βασικού φθορισμού (baseline), του φθορισμού δηλαδή που εκπέμπεται και συσσωρεύεται μεν, αλλά ανευρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα από το μηχανήμα επίπεδα. Επίσης, το Ct σηματοδοτεί ότι η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική της φάση και εξαρτάται από την αρχική ποσότητα δείγματος.

Στις αντιδράσεις της RT-PCR είναι δυνατή τόσο η σχετική όσο και η απόλυτη ποσοτικοποίηση, με τη μεν πρώτη να χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου απαιτείται η ακριβής ποσότητα αντιγράφων DNA ή επιπέδων έκφρασης mRNA, διαδικασία που επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας μίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης (absolute standard curve) με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, αυτήν της σχετικής ποσοτικοποίησης, γίνεται προσδιορισμός της παραγόμενης ποσότητας ή του βαθμού έκφρασης του μορίου-στόχου σε σχέση με ένα γονίδιο αναφοράς είτε με τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$ είτε με τη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης. Στην εν λόγω εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης, βασιζόμενης στη συγκριτική σχέση $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου:

RQ: η σχετική ποσοτικοποίηση,

ΔCt : η διαφορά του Ct του υπό μελέτη γονιδίου από το Ct του γονιδίου αναφοράς (εσωτερικός μάρτυρας)

$\Delta\Delta Ct$: η διαφορά του ΔCt του δείγματος από το ΔCt του μορίου-ρυθμιστή (δείγμα αναφοράς)

με τη μαθηματική αυτή σχέση να αναπαριστά ουσιαστικά το ποσό του υπό μελέτη μορίου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο ρυθμιστή.

Η επιλογή του γονιδίου αναφοράς- εσωτερικού μάρτυρα γίνεται με βάση τη σταθερότητά του τόσο μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του οργανισμού όσο και στους διάφορους ιστούς, ενώ ιδανικά θα πρέπει να εκφράζεται σε παρόμοια (κοντινά) επίπεδα με το εκάστοτε υπό μελέτη γονίδιο και να μην επηρεάζεται από τις πειραματικές συνθήκες. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται στην κανονικοποίηση των δειγμάτων είναι η δεϋδρογονάση της 3- φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH), η β- ακτίνη και το μικρό πυρηνικό RNA U6 (RNU6B) που είναι και αυτό που επελέγη και στη συγκεκριμένη εργασία για τη μελέτη της έκφρασης μικρών, μη κωδικών μορίων RNA (microRNAs).

Διαδικασία:

Το αρχικό βήμα είναι η αραίωση σε συγκέντρωση 1:100 των δειγμάτων cDNA που έχουν παραχθεί.

Τα συστατικά της αντίδρασης για την RT- PCR περιλαμβάνουν τη φθορίζουσα χρωστική *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (applied Biosystems, life technologies), τους κατάλληλους για κάθε miR που μελετάται εκκινητές (forward και reverse primers), ddH₂O και το εκμαγείο DNA (cDNA). Ειδικότερα οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες είναι οι ακόλουθες:

- SYBR[®] Green 5 μL
- Primer Forward 0,3 μL
- Primer Reverse 0,3 μL
- ddH₂O 2,4 μL
- cDNA 2 μL

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή για RT- PCR, την AB Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System.

Οι συνθήκες PCR είναι ειδικές για κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά η

διαδικασία αποτελείται από 45 επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης του δίκλωνου DNA στους 95 °C, υβριδισμού των εκκινητών στην απαιτούμενη κάθε φορά θερμοκρασία και επιμήκυνσης του παραγόμενου DNA σε θερμοκρασία 72 °C.

B.1.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίστηκε στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA) και συγκεκριμένα στη διαδικασία Mann-Whitney. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean \pm standard deviation, SD).

B.1.9. Βιοπληροφορική ανάλυση

Για τη διερεύνηση των γονιδίων -στόχων των υπό μελέτη miRNAs χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRwalk, με τη χρήση των αποτελεσμάτων από τους αλγόριθμους πρόβλεψης miRanda, PITA, RNA22 και TargetScan.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε υπολογιστική πρόβλεψη όλων των πιθανών στόχων των microRNAs που παρουσίαζαν διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης και πιο συγκεκριμένα των miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p. Ένα γονίδιο θεωρήθηκε ως πιθανός στόχος εάν εμφανιζόταν σε τουλάχιστον σε 3 από τους 5 αλγόριθμους πρόβλεψης που χρησιμοποιήθηκαν.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η βιολογική σημασία των γονιδίων στόχων των microRNAs πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μονοπατιών με τη χρήση της βάσης

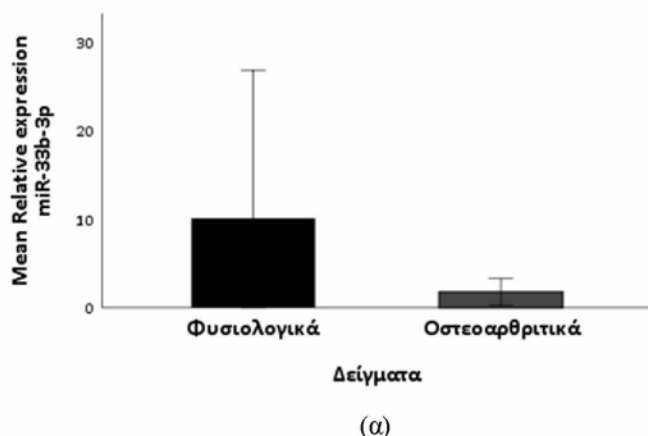
δεδομένων PANTHER Gene ontology (www.pantherdb.org).

Στη συνέχεια οι επαληθευμένοι στόχοι των miRNAs υπεβλήθησαν σε ανάλυση GO (Gene ontology), η οποία εφαρμόστηκε για την οργάνωση γονιδίων σε ιεραρχικές κατηγορίες με βάση την βιολογική τους λειτουργία.

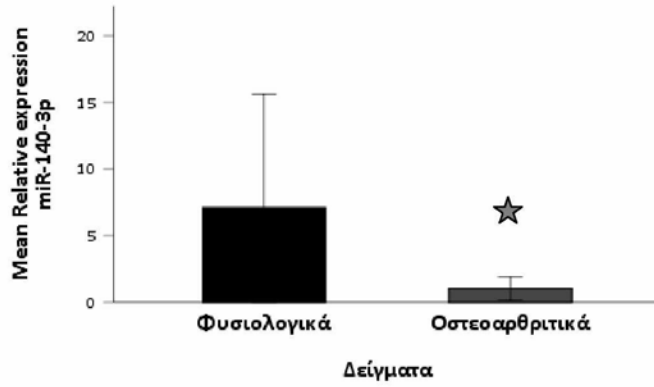
B.2. Αποτελέσματα

B.2.1. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233 και miR-4284 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

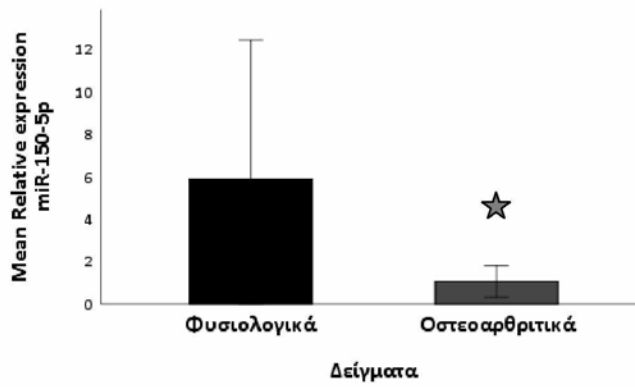
Τα επίπεδα έκφρασης των miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233 και miR-4284 μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) τόσο σε χονδροκύτταρα προερχόμενα από άτομα με ΟΑ όσο και σε δείγματα κύτταρων από άτομα χωρίς παθολογία στην άρθρωση. Από αυτά τα 7 microRNAs, στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p ($p < 0,05$). Στα ΟΑ χονδροκύτταρα τα 3 αυτά miRNAs παρουσίασαν σημαντική μείωση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Εικόνες 11- 13).



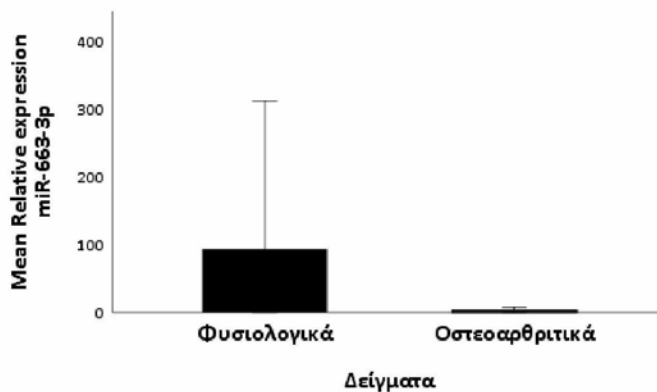
Εικόνα 11:
Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του (α) miR-33b-3p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων



(β)



(γ)

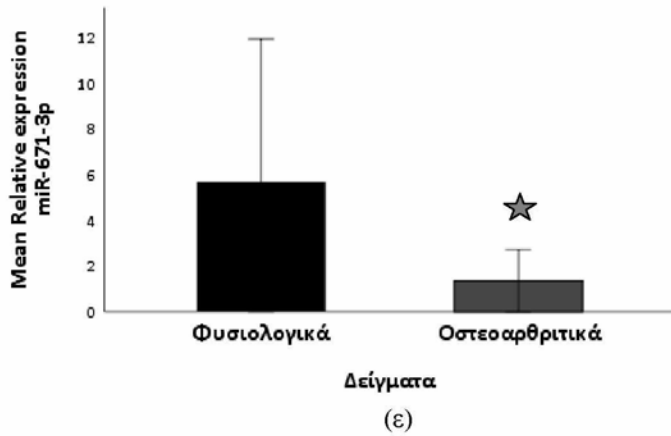


(δ)

Εικόνα 12:

Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των (β) miR-140-3p (γ) miR-150-5p και (δ) miR-663-3p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

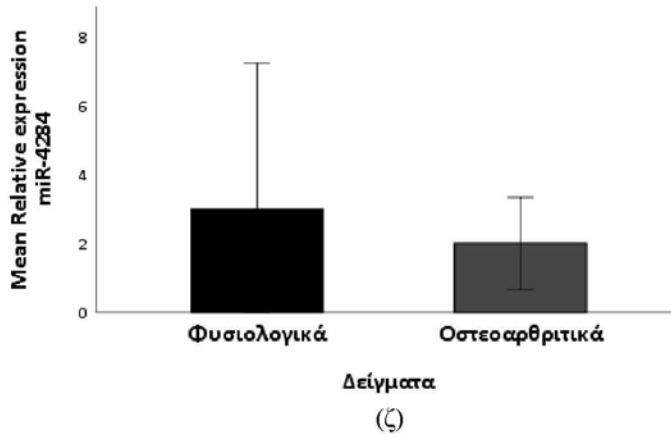
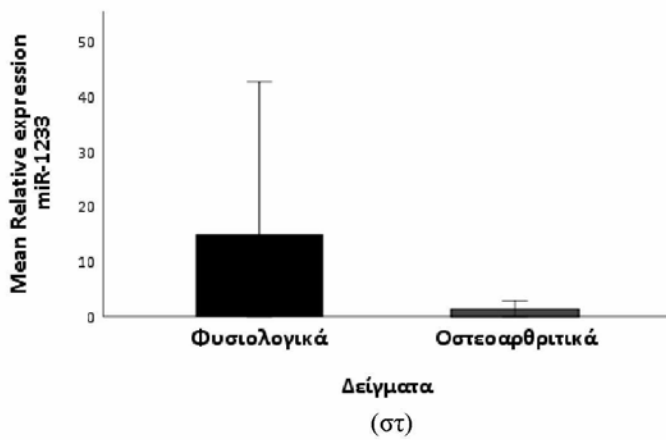
★ $p < 0,05$



Εικόνα 13 :

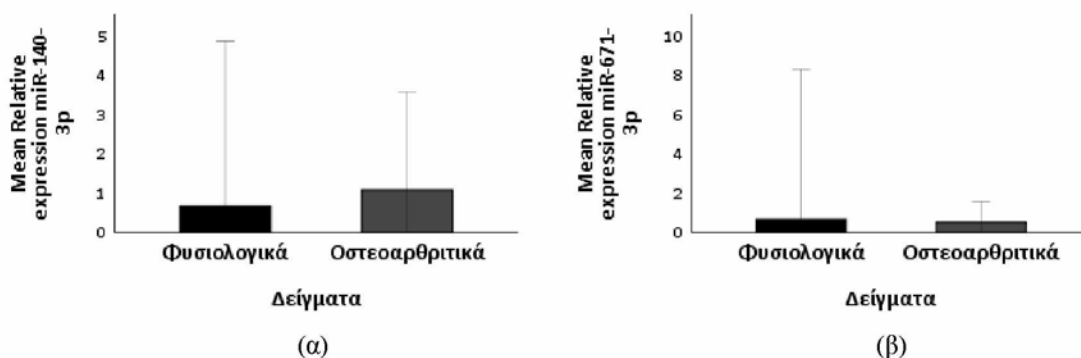
Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των (ε) miR-671-3p (στ) miR-1233 και (ζ) miR-4284 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

☆ $p < 0,05$



B.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των miR-140-3p και miR-671-3p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ κυττάρων προερχόμενων από τον υμένα

Από τα microRNAs που ανευρέθησαν στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένα στον αρθρικό χόνδρο, επελέγησαν τα miR-140-3p και miR-671-3p προκειμένου να μελετηθεί η έκφρασή τους και σε δείγματα προερχόμενα από υμένα ατόμων με και χωρίς ΟΑ. Για τα 2 αυτά microRNAs δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ οστεοαρθρικών και φυσιολογικών κυττάρων υμένα (Εικόνα 14).



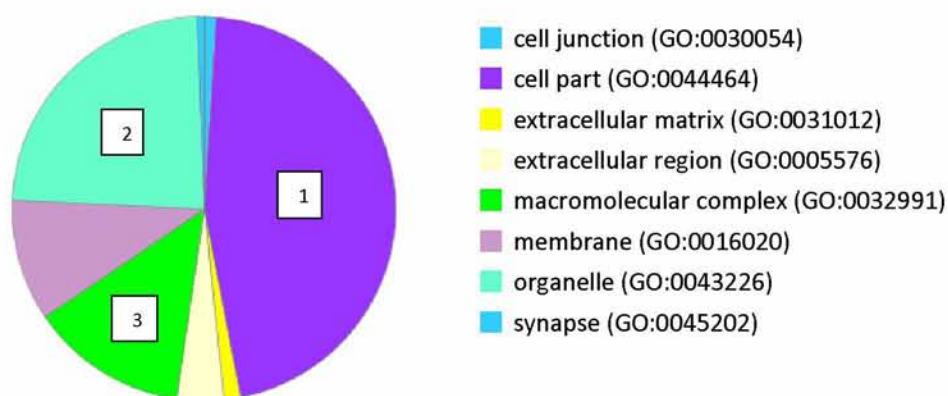
Εικόνα 14: Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των (α) miR-140-3p και (β) miR-671-3p σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ κυττάρων προερχόμενων από υμένα

B.2.3. Ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των μορίων- στόχων των διαφορετικά εκφραζόμενων microRNAs, καθώς και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται

Με σκοπό τη διερεύνηση της βιολογικής σημασίας των διαφοροποιημένων microRNAs πραγματοποιήθηκε ανάλυση των γονιδίων- στόχων, όπως αυτά προέκυψαν μέσω του λογισμικού πρόβλεψης στόχων των miRNAs, miRWalk 2.0²⁶³. Τα γονίδια- στόχοι που ανευρέθησαν για καθένα από τα 3 miRNA (miR-140-3p,

miR0-150-5p και miR-671-3p) συγκεντρώθηκαν σε μία λίστα και στη συνέχεια αναλύθηκαν ως προς τις βιολογικές, μοριακές και κυτταρικές τους λειτουργίες, ενώ επιπλέον αναζητήθηκαν και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία ενέχονται, με τη χρήση του προγράμματος PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System Version 12.0²⁶⁴. Παρακάτω ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα, συγκεντρωτικά και για τα 3 microRNAs.

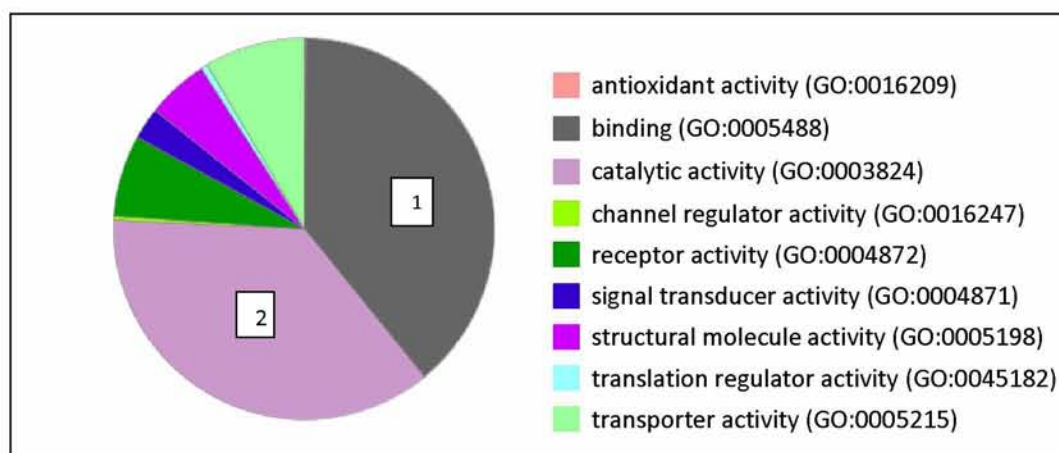
Η πρώτη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε αφορά στον κυτταρικό ρόλο των γονιδίων- στόχων, τα οποία προέκυψε ότι στην πλειοψηφία τους αποτελούν κυτταρικά τμήματα, ως επί το πλείστον ενδοκυττάρια, με τα τμήματα της πλασματικής μεμβράνης να ακολουθούν. Στην κατηγορία του κυτταρικού ρόλου, στην δεύτερη θέση συναντάμε τα γονίδια- στόχους που δρουν ως οργανίδια, κυρίως του πυρήνα αλλά και του κυτταροσκελετού, ενώ στην τρίτη θέση αναδεικνύεται ο ρόλος τους ως τμήματα μακρομοριακών, κατά κύριο λόγο, πρωτεϊνικών συμπλόκων (Εικόνα 15) (τα γραφήματα για τις υποκατηγορίες δεν περιλαμβάνονται).



Εικόνα 15: Απεικόνιση σε μορφή πίτας των κυτταρικών ρόλων των miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p. Διακρίνεται εντονότερα ο ρόλος τους ως (1) κυτταρικά τμήματα, (2) οργανίδια και (3) τμήματα μακρομοριακών συμπλόκων.

Με βάση τη μοριακή τους λειτουργία, βρέθηκε ότι τα περισσότερα γονίδια δρουν είτε ως μόρια πρόσδεσης, κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (τα

αντίστοιχα γραφήματα δεν περιλαμβάνονται) είτε διαθέτουν καταλυτική δράση, ενώ ακολουθούν οι κατηγορίες των μορίων μεταφοράς και των υποδοχέων (Εικόνα 16).

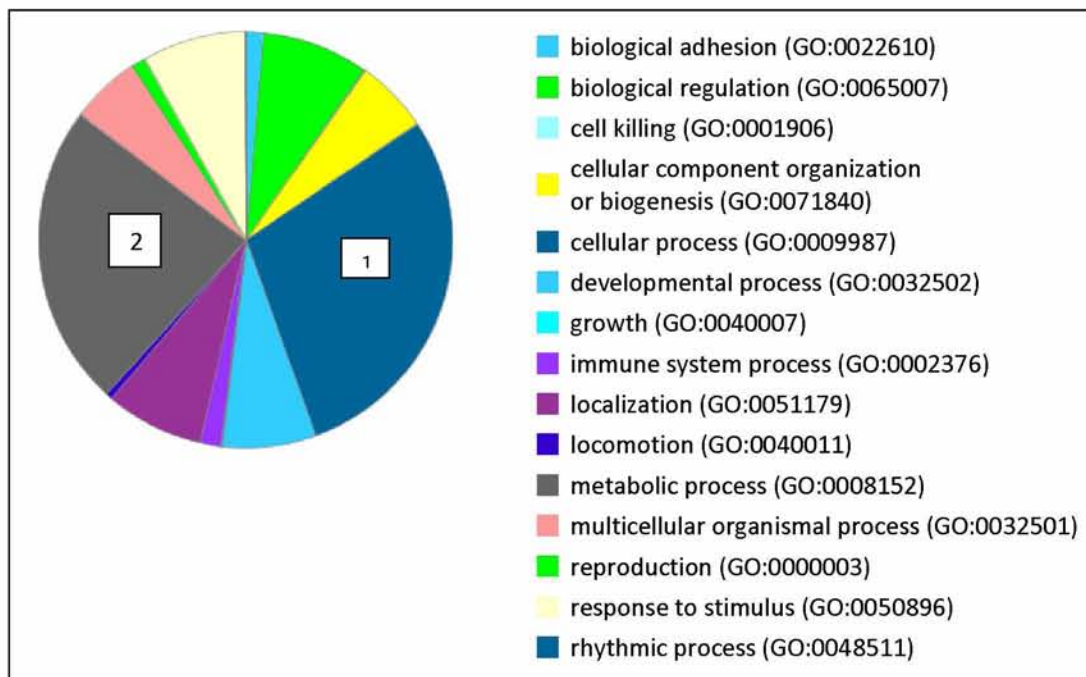


Εικόνα 16: Απεικόνιση σε μορφή πίτας των μοριακών λειτουργιών των miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p, με κυριότερες αυτές της (1) μοριακής πρόσδεσης και (2) καταλυτικής δράσης.

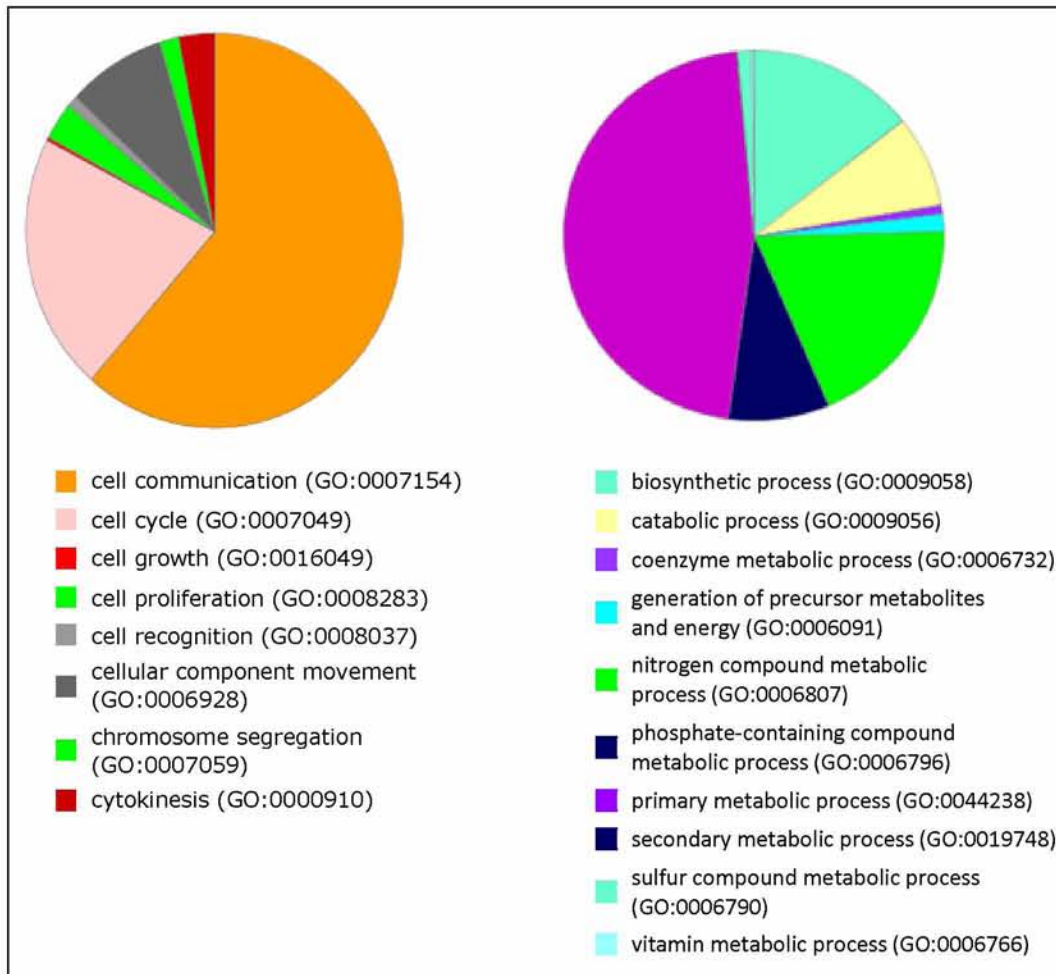
Όσον αφορά στις βιολογικές διαδικασίες οι οποίες επηρεάζονται από τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p βρέθηκαν να είναι ποικίλες με προεξάρχουσες αυτές του μεταβολισμού και της κυτταρικής λειτουργίας (Εικόνα 17), με τη βιολογική ρύθμιση, την ανταπόκριση σε διεγερτικά σήματα, τις αναπτυξιακές διαδικασίες και τη συμμετοχή στη βιογένεση ή οργάνωση κυτταρικών συστατικών να έπονται (Εικόνα 18). Στην υποκατηγορία του μεταβολισμού επικρατεί ο πρωτογενής, με το μεταβολισμό ενώσεων του αζώτου και τις βιοσυνθετικές δραστηριότητες να καταλαμβάνουν τη δεύτερη και τρίτη θέση, αντίστοιχα, ενώ στην υποκατηγορία της κυτταρικής λειτουργίας επικρατούν η επικοινωνία και ο κυτταρικός κύκλος (Εικόνα 19).

Τέλος, από την ανάλυση μονοπατιών προέκυψαν περισσότερα από 100 διαφορετικά βιολογικά μονοπάτια επηρεαζόμενα από τα προαναφερθέντα microRNAs. Κάποια από τα πιο χαρακτηριστικά μονοπάτια στα οποία ανερεύθησε συμμετοχή των miR-1403p, miR-150-5p και miR-671-3p είναι αυτά του Wnt, το μονοπάτι του υποδοχέα απελευθέρωσης της γοναδοτροπίνης, το μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από κυττοκίνες και χυμοκίνες φλεγμονής, το σηματοδοτικό μονοπάτι της ιντεγκρίνης, του

PDGF, το μονοπάτι του υποδοχέα του EGF, του FGF, της ενδοθηλίνης, της καντχερίνης, της ιντερλευκίνης και της γ - ιντερφερόνης, ενώ σημαντική ανευρέθη η συνεισφορά τους και στη σηματοδότηση μονοπατιών του μεταβολισμού, όπως αυτό της ινσουλίνης- IGF (Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/ MAP kinase cascade και Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade) και της γλυκόλυσης. Επιπλέον, τα παραπάνω miRNAs ενέχονται στα μονοπάτια των p53, Ras και Hedgehog (Εικόνα 18).



Εικόνα 17: Απεικόνιση των βιολογικών διαδικασιών στις οποίες ενέχονται τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p, κυριότερες εκ των οποίων είναι οι (1) κυτταρικές και (2) μεταβολικές διεργασίες.



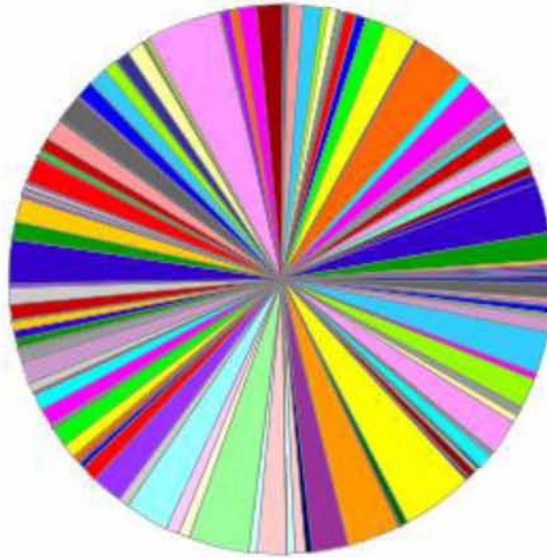
Εικόνα 18: Απεικόνιση σε μορφή πίτας των κυτταρικών (αριστερά) και των μεταβολικών (δεξιά)

διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p.

(Αριστερά) Στο γράφημα των κυτταρικών διεργασιών φαίνεται ο ρόλος των miRNAs στην κυτταρική





































επικοινωνία, αλλά και στον κυτταρικό κύκλο. (Δεξιά) Στο γράφημα των μεταβολικών λειτουργιών

διακρίνεται κατ' εξοχήν η συμμετοχή των miRNAs στον πρωτογενή μεταβολισμό.



- 2-arachidonoylglycerol biosynthesis (P05726)
- 5-Hydroxytryptamine degradation (P04372)
- 5HT1 type receptor mediated signaling pathway (P04373)
- 5HT2 type receptor mediated signaling pathway (P04374)
- 5HT3 type receptor mediated signaling pathway (P04375)
- 5HT4 type receptor mediated signaling pathway (P04376)
- ALP23B signaling pathway (P06209)
- ATP synthesis (P02721)
- Acetate utilization (P02722)
- Activin beta signaling pathway (P06210)
- Adenine and hypoxanthine salvage pathway (P02723)
- Adrenaline and noradrenaline biosynthesis (P00001)
- Alanine biosynthesis (P02724)
- Alpha adrenergic receptor signaling pathway (P00002)
- Alzheimer disease-amyloid secretase pathway (P00003)
- Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)
- Aminobutyrate degradation (P02726)
- Androgen/estrogene/progesterone biosynthesis (P02727)
- Angiogenesis (P00005)
- Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin (P05911)
- Apoptosis signaling pathway (P00006)
- Ascorbate degradation (P02729)
- Asparagine and aspartate biosynthesis (P02730)
- Axon guidance mediated by Slit/Robo (P00008)
- Axon guidance mediated by netrin (P00009)
- Axon guidance mediated by semaphorins (P00007)
- B cell activation (P00010)
- BMP/activin signaling pathway-drosophila (P06211)
- Beta1 adrenergic receptor signaling pathway (P04377)
- Beta2 adrenergic receptor signaling pathway (P04378)
- Beta3 adrenergic receptor signaling pathway (P04379)
- Blood coagulation (P00011)
- CCKR signaling map (P06959)

- Cadherin signaling pathway (P00012)
- Cell cycle (P00013)
- Cholesterol biosynthesis (P00014)
- Circadian clock system (P00015)
- Cobalamin biosynthesis (P02735)
- Coenzyme A biosynthesis (P02736)
- Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway (P04380)
- Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)
- DNA replication (P00017)
- DPP signaling pathway (P06213)
- DPP-SCW signaling pathway (P06212)
- De novo purine biosynthesis (P02738)
- De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)
- De novo pyrimidine ribonucleotide biosynthesis (P02740)
- Dopamine receptor mediated signaling pathway (P05912)
- EGF receptor signaling pathway (P00018)
- Endogenous cannabinoid signaling (P05730)
- Endothelin signaling pathway (P00019)
- Enkephalin release (P05913)
- FAS signaling pathway (P00020)
- FGF signaling pathway (P00021)
- Flavin biosynthesis (P02741)
- Formyltetrahydroformate biosynthesis (P02743)
- Fructose galactose metabolism (P02744)
- GABA-B receptor II signaling (P05731)
- GBB signaling pathway (P06214)
- Gamma-aminobutyric acid synthesis (P04384)
- General transcription by RNA polymerase I (P00022)
- General transcription regulation (P00023)
- Glutamine glutamate conversion (P02745)
- Glycolysis (P00024)
- Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway (P06664)
- Hedgehog signaling pathway (P00025)
- Heme biosynthesis (P02746)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway (P00027)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)
- Histamine H1 receptor mediated signaling pathway (P04385)
- Histamine H2 receptor mediated signaling pathway (P04386)
- Histamine synthesis (P04387)
- Histidine biosynthesis (P02747)
- Huntington disease (P00029)
- Hypoxia response via HIF activation (P00030)
- Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)
- Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade (P00032)
- Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade (P00033)
- Integrin signalling pathway (P00034)
- Interferon-gamma signaling pathway (P00035)
- Interleukin signaling pathway (P00036)
- Ionotropic glutamate receptor pathway (P00037)
- Isoleucine biosynthesis (P02748)
- JAK/STAT signaling pathway (P00038)
- Leucine biosynthesis (P02749)
- Lysine biosynthesis (P02751)
- MYO signaling pathway (P06215)
- Metabotropic glutamate receptor group I pathway (P00041)
- Metabotropic glutamate receptor group II pathway (P00040)
- Metabotropic glutamate receptor group III pathway (P00039)
- Methionine biosynthesis (P02753)
- Methylcitrate cycle (P02754)
- Methylmalonyl pathway (P02755)
- Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway (P00042)
- Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway (P00043)
- N-acetylglucosamine metabolism (P02756)
- Nicotine degradation (P05914)
- Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)
- Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)
- Notch signaling pathway (P00045)
- O-antigen biosynthesis (P02757)
- Opioid prodynorphin pathway (P05916)
- Opioid proenkephalin pathway (P05915)
- Opioid proopiomelanocortin pathway (P05917)
- Ornithine degradation (P02758)
- Oxidative stress response (P00046)
- Oxytocin receptor mediated signaling pathway (P04391)
- P53 pathway feedback loops 1 (P04392)
- PDGF signaling pathway (P00047)
- PI3 kinase pathway (P00048)
- Parkinson disease (P00049)
- Pentose phosphate pathway (P02762)

 Phenylethylamine degradation (P02766)	 Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway (P04394)
 Plasminogen activating cascade (P00050)	 Toll pathway-drosophila (P06217)
 Proline biosynthesis (P02768)	 Toll receptor signaling pathway (P00054)
 Purine metabolism (P02769)	 Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)
 Pyridoxal phosphate salvage pathway (P02770)	 Tyrosine biosynthesis (P02784)
 Pyridoxal-5-phosphate biosynthesis (P02759)	 Ubiquitin proteasome pathway (P00060)
 Pyrimidine Metabolism (P02771)	 VEGF signaling pathway (P00056)
 Pyruvate metabolism (P02772)	 Valine biosynthesis (P02785)
 Ras Pathway (P04393)	 Vasopressin synthesis (P04395)
 S-adenosylmethionine biosynthesis (P02773)	 Vitamin B6 metabolism (P02787)
 SCW signaling pathway (P06216)	 Vitamin D metabolism and pathway (P04396)
 Salvage pyrimidine deoxyribonucleotides (P02774)	 Wnt signaling pathway (P00057)
 Salvage pyrimidine ribonucleotides (P02775)	 mRNA splicing (P00058)
 Succinate to propionate conversion (P02777)	 p38 MAPK pathway (P05918)
 Synaptic vesicle trafficking (P05734)	 p53 pathway by glucose deprivation (P04397)
 T cell activation (P00053)	 p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
 TCA cycle (P00051)	 p53 pathway (P00059)
 TGF-beta signaling pathway (P00052)	
 Tetrahydrofolate biosynthesis (P02742)	

Εικόνα 19: Απεικόνιση σε μορφή πίτας των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p. Με κίτρινο χρώμα είναι υπογραμμισμένα τα πιο σημαντικά μονοπάτια.

B.3. Συζήτηση

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία από τις συχνότερες μυοσκελετικές παθήσεις των ενηλίκων, με το 20 % περίπου των Αμερικανών να πάσχουν από κάποια μορφή της^{7,8}. Ο επιπολασμός της αυξάνεται κατακόρυφα με την αύξηση της ηλικίας, ειδικά μετά τα 50 έτη. Μάλιστα, εκτιμάται ότι 1 στα 10 άτομα άνω των 60 ετών εμφανίζει σε κάποια άρθρωση πόνο σχετιζόμενο με ΟΑ¹¹. Η κυριότερη συμπτωματολογία που συνοδεύει την οστεοαρθρίτιδα είναι ο έντονος, χρόνιος πόνος, η δυσκαμψία και η δυσκινησία, με σταδιακή διαταραχή ή/ και απώλεια της λειτουργικότητας της άρθρωσης. Πρόκειται για μία πολυπαραγοντική ασθένεια, πολύπλοκης αιτιολογίας και ποικίλης εντόπισης. Η ΟΑ μπορεί να προσβάλλει οποιαδήποτε άρθρωση, αν και οι ανατομικές θέσεις που πλήττονται συχνότερα είναι αυτές του γόνατος, του ισχίου, της άκρας χείρας και της σπονδυλικής στήλης. Ως κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες

θεωρούνται το φύλο^{2,3,24,25,31}, η ηλικία¹⁻³, οι διατροφικές συνήθειες^{2,24,25,29,30} και οι τραυματισμοί στην περιοχή της άρθρωσης^{6,24}, ενώ στα αίτια της ΟΑ συγκαταλέγονται επιπλέον μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με παθολογική εικόνα άρθρωσης, όπως συμβαίνει στις διάφορες μορφές χονδροδυσπλασίας, καθώς επίσης και πολυμορφισμοί σε ποικίλα γονίδια^{149-157,159,161}, π.χ. γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της ECM, οι οποίοι δρουν προδιαθεσικά για την εκδήλωση οστεοαρθρίτιδας.

Πέρα από πολυπαραγοντικής φύσεως, η οστεοαρθρίτιδα συνιστά μια εξαιρετικά ετερογενή, συστηματική διαταραχή, η οποία εκδηλώνεται με μία ποικιλία φαινοτύπων, από τους οποίους ξεχωρίζουν ο ηλικιοεξαρθρώμενος, ο μετατραυματικός και ο γενετικός, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται πολύς λόγος και για έναν ακόμα, τον μεταβολικό³⁸. Τον μεταβολικό φαινότυπο της ΟΑ συνιστούν παθολογικές διαταραχές σχετιζόμενες με το μεταβολικό σύνδρομο (MetS), όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπεργλυκαιμία, η υπέρταση και η παχυσαρκία, με τα άτομα με MetS να εκδηλώνουν αξιολογούμενα συχνότερα ΟΑ σε κάποια άρθρωση, συγκριτικά με υγιή άτομα⁴³⁻⁴⁷. Η συμμετοχή της παχυσαρκίας στη μεταβολική ΟΑ φαίνεται να έχει αρκετές διαστάσεις, με τη διήθηση του υμένα από μακροφάγα⁶⁹ και την έντονη έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών⁵¹ και αδιποκινών (κυρίως λεπτίνης^{57,58}) από την περίσσεια του λιπώδους ιστού να είναι οι κυριότερες. Η διαταραχή του λιπιδιακού προφίλ φαίνεται επίσης να σχετίζεται με την εκδήλωση ΟΑ, καθώς έχουν ανευρεθεί αυξημένα επίπεδα LDL στην επιφάνεια των ΟΑ χονδροκύτταρων^{61,62}, ενώ επιπλέον εκφράζουν και την οξειδωμένη της μορφή (ox-LDL)^{60,66}.

Η οστεοαρθρίτιδα πλήττει κατά κύριο λόγο τον αρθρικό χόνδρο, έναν τύπο ελαστικού, συνδετικού ιστού, ο οποίος καλύπτει τα οστά της άρθρωσης και είναι απαραίτητος για την επιτέλεση των διαφόρων κινήσεων. Ο βασικότερός του ρόλος είναι να παρέχει την κατάλληλη λεία επιφάνεια και να κατανέμει ομοιόμορφα το μηχανικό φορτίο, απορροφώντας παράλληλα τους κραδασμούς, προκειμένου να μην καταπονείται η άρθρωση. Αποτελείται από την πλούσια σε αγκρεκάνη και κολλαγόνα (κυρίως κολλαγόνο τύπου II) εξωκυττάρια ουσία (ECM) και χονδροκύτταρα, τα

οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της δομής, της σύστασης και της λειτουργικότητας της ECM^{70,72,78}.

Σε επίπεδο αρθρικού χόνδρου, η ΟΑ προκαλεί σταδιακή αλλαγή στη δομή και τη μορφολογία του και τροποποίηση της λειτουργίας των χονδροκυττάρων, ενώ επιπλέον συνυπάρχει φλεγμονή στην περιοχή του υμένα^{84,105}. Στα αρχικά στάδια νόσου, τα χονδροκύτταρα εμφανίζουν έντονη βιοσυνθετική ικανότητα, με αυξημένη παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο και αγκρεκάνη) κάτω και από την επίδραση ποικίλων αναβολικών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (TGFs, BMPs, IGFs), με απώτερο σκοπό την αποκατάσταση των βλαβών που έχουν προκληθεί στην ECM¹⁰⁰, ενώ κατά την εξέλιξη της πάθησης υιοθετούν εντονότερα τον υπετροφικό φαινότυπο οπότε και παρατηρείται αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου τύπου X⁸⁰. Σε πιο προχωρήμενα στάδια νόσου και εφόσον διαρραγεί το καλά οργανωμένο δίκτυο κολλαγόνου, επέρχεται μη αναστρέψιμος εκφυλισμός του χόνδρου, με τις καταβολικές διαδικασίες να υπερισχύουν αυτές του αναβολισμού. Σε αυτό το στάδιο επικρατούν οι μηχανισμοί αποδόμησης, με τις μεταλλοπρωτεάσες MMPs και ADAMTS να υπερεκφράζονται¹²⁴. Όλες αυτές οι αλληλοδιάδοχες διεργασίες οδηγούν στην εμφάνιση παθολογικών χαρακτηριστικών στην περιοχή της άρθρωσης, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι η αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού⁸⁵, η δημιουργία οστεοφύτων^{83,87}, η αγγειακή διήθηση^{82,84} και η ασβεστοποίηση του χόνδρου¹ που είναι και αυτά που τελικά ευθύνονται για τη συμπτωματολογία της πάθησης.

Παρά το γεγονός ότι εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από ΟΑ, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αξιόπιστος τρόπος πρόγνωσης, ενώ και σε επίπεδο διάγνωσης υπάρχουν αρκετές δυσκολίες τόσο εξαιτίας της αδυναμίας έγκαιρης εντόπισης παθολογικών ευρημάτων όσο και λόγω της μειωμένης ευαισθησίας των διαγνωστικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται²¹⁹. Επιπλέον και σε επίπεδο πρόληψης το τοπίο είναι αρκετά θολό, καθώς ακόμα δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος ο μηχανισμός ανάπτυξης της οστεοαρθρίτιδας και ως εκ τούτου η πρόληψη περιορίζεται στην εφαρμογή ενός ευρύτερα υγιούς τρόπου ζωής που περιλαμβάνει ισορροπημένη διατροφή που αποσκοπεί μεταξύ άλλων στην αποφυγή της σχετιζόμενης με ΟΑ

παχυσαρκίας, καθώς και ήπια άσκηση προκειμένου οι αρθρώσεις να παραμένουν σε κίνηση και άρα υγιείς^{220,221}.

Τα τελευταία χρόνια γίνονται μεγάλες προσπάθειες εύρεσης βιοδεικτών- μορίων δηλαδή, εύκολα προσβάσιμων με ελαφρώς επεμβατικές τεχνικές (π.χ στο αίμα, στα ούρα, στο αρθρικό υγρό κλπ) και σταθερών στα βιολογικά υγρά- τα επίπεδα των οποίων διαφοροποιούνται επί παθολογικών καταστάσεων και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για διάγνωση, είτε σε άρχικα στάδια νόσου για την παρακολούθηση της εξέλιξής της είτε σε πολύ πρώιμα με σκοπό την πρόληψη ή/ και την καθυστέρηση εμφάνισής της.

Ως βιοδείκτες έχουν προταθεί και τα microRNAs. Αυτά αποτελούν μικρά (19 έως 25 nts), μη κωδικά μόρια RNA, τα οποία διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση τη γονιδιακής έκφρασης σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο. Από τον πυρήνα του κυττάρου ξεκινούν ως δίκλιωνα μόρια, εμφανιζόμενα υπό μορφή βρόγχου και σταδιακά υφιστάμενα τη δράση διαφόρων πρωτεϊνικών συμπλόκων και ενζύμων αποκτούν την τελική, ώριμη μορφή τους, αυτήν του μονόκλωνου γραμμικού miRNA^{183,186,187,265,188}, το οποίο θα προσδεθεί στο μόριο mRNA- στόχο και θα προκαλέσει είτε μεταφραστική αποσιώπηση είτε αποδόμησή του^{203,204}. Γενικά, τα microRNAs συμμετέχουν σε αμέτρητες βιολογικές και βιοχημικές διαδικασίες, με κυριότερες τον κυτταρικό κύκλο, την ανάπτυξη, την απόπτωση και τον μεταβολισμό, ενώ παράλληλα έχουν σημαντικό ρόλο τόσο επί φυσιολογίας όσο και επί παθολογίας, καθώς εμπλέκονται σε μία πληθώρα νοσημάτων^{214,215,217,216}.

Ο πιθανός ρόλος των microRNAs ως βιοδείκτες αποδίδεται στο ότι είναι εύκολα προσβάσιμα, καθώς μπορούν να ανευρεθούν σε διάφορα βιολογικά υγρά²²², στα οποία μάλιστα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα²³⁰ και επιπλέον τα επίπεδά τους τροποποιούνται όταν συνυπάρχουν παθολογικοί παράγοντες. Η προέλευση των κυκλοφορούντων miRNAs εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης, με επικρατέστερες θεωρίες είτε ότι απελευθερώνονται από τα ίδια τα κύτταρα του πάσχοντος ιστού είτε ότι συνιστούν προϊόντα φλεγμονής, αποδόμησης και απόπτωσης²³². Αλλά και η παρουσία τους στην κυκλοφορία παραμένει υπό εξέταση και πιθανολογείται ότι μπορεί να συνυπάρχουν με πρωτεΐνες όπως η Ago2²³⁵ ή να

μεταφέρονται προσδεδεμένα σε μόρια όπως τα εξωσώματα^{233,234} και οι λιποπρωτεΐνες (HDL)²³⁶.

Τα τελευταία χρόνια έχουν διενεργηθεί διάφορες μελέτες με σκοπό τη διερεύνηση τόσο του ρόλου των κυκλοφορούντων microRNAs όσο και της ιστοειδικής τους έκφρασης σε μία ευρεία λίστα παθολογικών καταστάσεων. Έρευνες με αντικείμενο τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης ποικίλων miRNAs στην οστεοαρθρίτιδα πραγματοποιούνται εδώ και περίπου μία δεκαετία, με τα αποτελέσματά τους να είναι πολλά υποσχόμενα, καθώς φανερώνουν διαφοροποιημένη έκφρασή τους τόσο μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών δειγμάτων όσο και μεταξύ διαφορετικών σταδίων νόσου^{64,242,243,245-251}.

Στην εν λόγω μελέτη διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης 7 microRNAs (miR-33b-3p, miR-140-3p, miR-150-5p, miR-663-3p, miR-671-3p, miR-1233 και miR-4284) στον χόνδρο και 2 στον υμένα (miR-140-3p και miR-671-3p), τα οποία είχαν προηγουμένως ανευρεθεί διαφοροποιημένα στον ορό ασθενών με ΟΑ. Από αυτά, τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με φυσιολογικά, ενώ κανένα δεν ανευρέθη διαφοροποιημένο στον υμένα.

Το εύρημα αυτό υποδηλώνει 1) την ιστοειδική, σε επίπεδο χόνδρου, έκφρασή τους και 2) τη διαφοροποίηση των επιπέδων τους όταν συνυπάρχει παθολογία του τύπου της ΟΑ.

Ειδικά για το miR-140-3p, η μείωση που διαπιστώθηκε θα μπορούσε να θεωρηθεί αναμενόμενη, δοθέντος ότι η παρουσία του είναι επιβεβαιωμένη στον χόνδρο, καθώς εκφράζεται ειδικά από τα χονδροκύτταρα, με το miR-140 να παρουσιάζει αποδεδειγμένα διαφοροποιημένη έκφραση στα πλαίσια ΟΑ^{258-260,262}. Επιπροσθέτως, είναι γνωστό ότι το miR-140 συμμετέχει σε διαδικασίες που αφορούν στη χονδρογένεση και ομοίωση του αρθρικού χόνδρου, ενώ μέσα από την εν λόγω μελέτη ανεδείχθη και ο μεταβολικός του ρόλος.

Η ανεύρεση στην κυκλοφορία τόσου του συγκεκριμένου όσο και των άλλων δύο miRNAs θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στο ότι αποτελούν τμήματα συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία λόγω αυξημένων διαδικασιών αποδόμησης απελευθερώνονται στην κυκλοφορία είτε ότι εκκρίνονται από φλεγμονώδεις παράγοντες (πρωτεΐνες και αποδομητικά ένζυμα) και με κάποιον τρόπο εξέρχονται του χόνδρου και κυκλοφορούν στο αίμα.

Η απουσία εύρεσης διαφοροποιημένης έκφρασης σε ορισμένα από τα microRNAs που μελετήθηκαν στην άρθρωση, παρά το ότι έχουν ανευρεθεί διαφοροποιημένα στον ορό, θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους πιθανούς λόγους. Κατ' αρχάς, η αδυναμία ανεύρεσης στατιστικά σημαντικής διαφοροποίησης στην έκφραση των miRNAs, μπορεί να οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα microRNAs που μελετήθηκαν είτε δε σχετίζονται με την οστεοαρθρίτιδα είτε σχετίζονται μεν αλλά τα επίπεδά τους δεν εμφανίζουν σημαντικού βαθμού διαφοροποίηση συγκριτικά με μη πάσχοντα άτομα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση συνίσταται στο ότι δεν είναι πλήρως γνωστός ο τρόπος και ο χρόνος ανεύρεσης των microRNAs στην κυκλοφορία και εάν προηγείται ή έπεται της τοπικής απορρύθμισής τους. Ως εκ τούτου, η απορρύθμιση ενός miRNA στην κυκλοφορία ενδέχεται να μη συνάδει απαραίτητως και με ανάλογη απορρύθμισή του στον ιστό- στόχο, γεγονός που μπορεί να επηρεάζεται και από το στάδιο της νόσου, ενώ μπορεί να ισχύει και το αντίστροφο, δηλαδή, υπο- ή υπερ- έκφραση τοπικά ενδέχεται να μην ακολουθείται και από ανάλογη αλλαγή της έκφρασης στο αίμα. Επιπλέον, η διαφοροποιημένη έκφραση που ανευρέθη στον ορό δεν αποκλείεται να οφείλεται στην παρουσία άλλης υποκείμενης, άγνωστης παθολογίας ή κατάστασης, ανεξάρτητης της ΟΑ, η οποία ενδεχομένως να ευθύνεται για την απορρύθμιση των επιπέδων τους στην κυκλοφορία. Ειδικά για την περίπτωση των microRNAs που διερευνήθηκαν στον υμένα, το ότι κανένα από αυτά δεν ανευρέθη διαφοροποιημένο είναι πολύ πιθανό να δικαιολογείται και από τον μικρό αριθμό φυσιολογικών και οστεοαρθρικών δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα 3 miRNAs που προέκυψαν να εκφράζονται διαφοροποιημένα στη συγκεκριμένη μελέτη, έχουν διερευνηθεί ως επί

το πλείστον για το ρόλο τους στον καρκίνο, με τις δημοσιεύσεις που αφορούν στην ΟΑ να είναι ελάχιστες έως και ανύπαρκτες.

Το miR-140-3p έχει ανευρεθεί να υποεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα²⁶⁶, στο δερματικό πλακώδες²⁶⁷ και στον καρκίνο των ωοθηκών²⁶⁸, υπογραμμίζοντας τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο, καθώς διακρίνεται για την ικανότητά του να αναστέλλει την κυτταρική αύξηση, τη μετανάστευση και τη διήθηση. Επιπλέον, ο ρόλος του έχει μελετηθεί και σε άλλες παθολογικές οντότητες στις οποίες συγκαταλέγονται νευροαναπτυξιακές διαταραχές (αυτισμός και διαταραχές του αυτιστικού φάσματος²⁶⁹), ψυχιατρικές διαταραχές της διάθεσης (π.χ. διπολική διαταραχή²⁷⁰), αλλά και αυτοάνοσα νοσήματα (μυασθένεια Gravis²⁷¹) όπου έχει ανευρεθεί απορρυθμισμένο, με τα επίπεδά του στις 2 πρώτες κατηγορίες να παρουσιάζουν χαρακτηριστική αύξηση, ενώ στη μυασθένεια Gravis να εμφανίζονται μειωμένα. Αναφορικά με το ρόλο του miR-140-3p στην ΟΑ, η αναζήτηση της βιβλιογραφίας οδήγησε σε μόλις 2 αποτελέσματα, εκ των οποίων το ένα αφορά σε πειραματικό μοντέλο ζώου. Η πιο πρόσφατα δημοσιευμένη έρευνα αναφέρεται στην *in vitro* δράση του EGCG (Epigallocatechin-3-O-gallate) στα επίπεδα έκφρασης του miR-140-3p σε χονδροκύτταρα τα οποία έχουν υποστεί διέγερση με IL-1β. Η ουσία αυτή, η οποία περιέχεται στο πράσινο τσάι και θεωρείται ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδεις και αντιαρθρικές ιδιότητες, βρέθηκε πειραματικά ότι μπορεί να αντιστρέψει τη δράση του miR-140-3p ως αρνητικού ρυθμιστή της έκφρασης του ADAMTS5 σε διεγερμένα χονδροκύτταρα, προκαλώντας τελικά υπερέκφραση του miRNA, συνδυαστικά όμως με μειωμένη έκφραση της μεταλλοπρωτεάσης²⁷².

Σχετικά με το miR-671-3p ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών είναι πολύ περιορισμένος και αφορούν μόλις στην τελευταία τριετία. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν έρευνες που προσανατολίζονται στον εξαρτώμενο από την ALK καρκίνο του πνεύμονα και το αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου²⁷³ όπου τα επίπεδα του microRNA είναι μειωμένα²⁷⁴, στον καρκίνο του νεφρού²⁷⁵, ενώ συνδυαστικά και με κάποια άλλα κυκλοφορούντα miRNAs έχει προταθεί ως προγνωστικός και διαγνωστικός δείκτης της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (Graft Versus Host Disease, GVHD)²⁷⁶.

Οι μελέτες που αφορούν στο miR-150-5p είναι οι πιο πολυπληθείς, με την πλειοψηφία και σε αυτήν την περίπτωση να αναφέρεται στην έκφρασή του στον καρκίνο, όπου έχει αναφερθεί τόσο ογκογονική όσο και αντικαρκινική δράση, εξαρτώμενη από τον καρκινικό τύπο. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα του παραπάνω miRNA έχουν συσχετιστεί με 1) καλύτερη πρόγνωση του μεταστατικού μελανώματος²⁷⁷, 2) in vitro μείωση της πιθανότητας μετάστασης στον καρκίνο του παχέος εντέρου²⁷⁸, 3) αυξημένο κίνδυνο μετάστασης στους λεμφαδένες στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, όταν τα επίπεδά του είναι αυξημένα²⁷⁹, 4) αντικαρκινική δράση (μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης και διήθησης των καρκινικών κυττάρων) σε πλακώδη καρκινώματα κεφαλής- τραχήλου²⁸⁰ και οισοφάγου²⁸¹ όπου παρατηρείται σημαντική υποέκφρασή του. Επιπροσθέτως, το miR-150-5p έχει μελετηθεί ως πιθανός δείκτης διάγνωσης και παρακολούθησης της εξέλιξης της επίκτητης απλαστικής αναιμίας, καθώς τα επίπεδά του εμφανίζουν αξιοσημείωτη μείωση επί χορήγησης κατάλληλης ανοσοκατασταλτικής θεραπείας στον ασθενή²⁸², ενώ ως πιθανός δείκτης πρόγνωσης έχει προταθεί και για τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, όπου η έκφρασή του είναι επίσης μειωμένη σε υψηλού κινδύνου ασθενείς²⁸³, αλλά και ως διαγνωστικός δείκτης του μελανώματος όπου τα επίπεδά του είναι αυξημένα²⁸⁴. Άλλες παθολογικές καταστάσεις στις οποίες έχουν μελετηθεί τα επίπεδα του miR-150-5p είναι η προχωρημένου σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια όπου αναδεικνύεται ο πιθανός ρόλος του κυκλοφορούντος miRNA στην πρόγνωση της νόσου²⁸⁵, αυτοάνοσα νοσήματα, όπως το σύνδρομο Sjögren's, η μυασθένεια Gravis και η αυτοάνοση παγκρετίτιδα, όπου τονίζεται η συμμετοχή του σε διαδικασίες αυτοανοσίας, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των B κυττάρων και της επαγωγής ανοσολογικής απάντησης²⁸⁶⁻²⁸⁸, καθώς και η ενδομητρίωση όπου τα επίπεδά του είναι σημαντικά μειωμένα και συνδυαστικά με κάποια άλλα microRNAs θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωσή της²⁸⁹.

Από την βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψε μία εκτενέστατη λίστα μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p. Αυτά περιλαμβάνουν καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, τον μεταβολισμό, τη φλεγμονή αλλά και μονοπάτια σχετιζόμενα μεταξύ άλλων με καρκινογένεση (π.χ μονοπάτι των Ras και p53). Ειδικά το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στο οποίο βρέθηκε ότι συμμετέχουν τα παράνω

miRNAs είναι από τα πιο καλά μελετημένα, καθώς έχει βρεθεί να σχετίζεται άμεσα με την παθογένεση, ανάπτυξη και εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας²⁹⁰. Το Wnt έχει βρεθεί ότι μεταξύ άλλων διεγείρει την έκφραση μεταλλοπρωτεασών, με τη δράση του να μην περιορίζεται μόνο στον αρθρικό χόνδρο αλλά να εκτείνεται και στον υμένα^{291,292}. Μελέτες, επίσης, έχουν αναδείξει το ρόλο της β- catenin²⁹³, αλλά και διάφορων άλλων πρωτεϊνών του Wnt (όπως η Wnt5a)²⁹⁴ στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην υιοθέτηση αρχικά του υπερτροφικού και ακολούθως, του οστεοαρθρικού φαινοτύπου.

Η συγκεκριμένη έρευνα θα μπορούσε να συνεχιστεί περαιτέρω με λειτουργικές μελέτες που θα αποσκοπούν στην εμβάθυνση των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα, τόσο στις λειτουργίες των μορίων-στόχων των διαφοροποιημένων microRNAs όσο και στα επηρεαζόμενα από αυτά μοριακά μονοπάτια και κυρίως στο ρόλο τους σε μονοπάτια του μεταβολισμού και σε διαδικασίες φλεγμονής.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω τα miR-140-3p, miR-150-5p και miR-671-3p λόγω της διαφοροποιημένης έκφρασής τους τόσο στον ορό όσο και στον αρθρικό χόνδρο, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς δείκτες διάγνωσης της οστεοαρθρίτιδας. Επιπλέον, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης αναδεικνύεται η συμμετοχή αυτών των microRNAs στη ρύθμιση σημαντικών μεταβολικών μονοπατιών, υπογραμμίζοντας τον πιθανό τους ρόλο στην εμφάνιση του μεταβολικού φαινοτύπου της ΟΑ. Σε κάθε περίπτωση κρίνεται απαραίτητη η επαλήθευση όλων των ευρημάτων και από άλλες, νέες μελέτες, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να ενισχυθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, αλλά και επέκταση της έρευνας σε διαφορετικές εθνότητες.

Βιβλιογραφία

1. Neame, R. L., Carr, A. J., Muir, K. & Doherty, M. UK community prevalence of knee chondrocalcinosis: evidence that correlation with osteoarthritis is through a shared association with osteophyte. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 513–8 (2003).
2. Andrianakos, A. A. *et al.* Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J. Rheumatol.* **33**, 2507–13 (2006).
3. Anagnostopoulos, I. *et al.* The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskelet. Disord.* **11**, 98 (2010).
4. Brandt, K. D., Radin, E. L., Dieppe, P. A. & van de Putte, L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1261–1264 (2006).
5. Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J. P. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklekt. Chir. Cerrahisi* **21**, 2–14 (2010).
6. Englund, M. *et al.* Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The multicenter osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* **60**, 831–839 (2009).
7. CDC. CDC - Arthritis - Data and Statistics - Arthritis Related Statistics. Available at: https://www.cdc.gov/arthritis/data_statistics/arthritis-related-stats.htm. (Accessed: 30th August 2017)
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of doctor-

- diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation--United States, 2010-2012. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **62**, 869–73 (2013).
9. Hootman, J. M., Helmick, C. G., Barbour, K. E., Theis, K. A. & Boring, M. A. Updated Projected Prevalence of Self-Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015-2040. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1582–1587 (2016).
 10. WHO | Chronic rheumatic conditions. *WHO* (2016).
 11. EUMUSC. Musculoskeletal Health in Europe. 12 (2013). Available at: [http://eumusc.net/myUploadData/files/30 August Final draft report.pdf](http://eumusc.net/myUploadData/files/30%20August%20Final%20draft%20report.pdf).
 12. Murphy, L. B. *et al.* One in four people may develop symptomatic hip osteoarthritis in his or her lifetime. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 1372–9 (2010).
 13. Murphy, L. *et al.* Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **59**, 1207–1213 (2008).
 14. Qin, J. *et al.* Lifetime Risk of Symptomatic Hand Osteoarthritis: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 1204–1212 (2017).
 15. Vos, T. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2163–2196 (2012).
 16. Vos, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1545–1602 (2016).

17. Vos, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **386**, 743–800 (2015).
18. Andrianakos, A. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Greece: a cross-sectional population based epidemiological study. The ESORDIG Study. *J. Rheumatol.* **30**, 1589–601 (2003).
19. Fautrel, B. *et al.* Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. *Jt. Bone Spine* **72**, 235–240 (2005).
20. Jinks, C., Jordan, K. & Croft, P. Osteoarthritis as a public health problem: The impact of developing knee pain on physical function in adults living in the community: (KNEST 3). *Rheumatology* **46**, 877–881 (2007).
21. Gupta, S., Hawker, G. A., Laporte, A., Croxford, R. & Coyte, P. C. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology* **44**, 1531–1537 (2005).
22. Hunter, D. J., Schofield, D. & Callander, E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 437–41 (2014).
23. Barbour, K. E., Helmick, C. G., Boring, M. & Brady, T. J. Vital Signs: Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation — United States, 2013–2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 246–253 (2017).
24. Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A. & Jordan, K. P. Risk factors for onset of

- osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 24–33 (2010).
25. Felson, D. T. *et al.* Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* **40**, 728–33 (1997).
 26. Srikanth, V. K. *et al.* A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **13**, 769–81 (2005).
 27. Hunter, D. J. Imaging Insights on the Epidemiology and Pathophysiology of Osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **35**, 447–463 (2009).
 28. Felson, D. T., Anderson, J. J., Naimark, A., Walker, A. M. & Meenan, R. F. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **109**, 18–24 (1988).
 29. Grotle, M., Hagen, K. B., Natvig, B., Dahl, F. A. & Kvien, T. K. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet. Disord.* **9**, 132 (2008).
 30. Losina, E. *et al.* Lifetime risk and age at diagnosis of symptomatic knee osteoarthritis in the US. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **65**, 703–11 (2013).
 31. Srikanth, V. K. *et al.* A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **13**, 769–781 (2005).
 32. Hollander, A. P. *et al.* Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J. Clin. Invest.* **96**, 2859–2869

- (1995).
33. Lotz, M. & Loeser, R. F. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* **51**, 241–248 (2012).
 34. Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2241–2256 (2005).
 35. Shane Anderson, A. & Loeser, R. F. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **24**, 15–26 (2010).
 36. Martin, J. A., Brown, T. D., Heiner, A. D. & Buckwalter, J. A. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S96-103 (2004).
 37. Bennell, K. L. *et al.* Bone marrow lesions are related to dynamic knee loading in medial knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1151–1154 (2010).
 38. Aspden, R. M., Scheven, B. A. & Hutchison, J. D. Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism. *Lancet (London, England)* **357**, 1118–20 (2001).
 39. Haugen, I. K. *et al.* Hand osteoarthritis in relation to mortality and incidence of cardiovascular disease: data from the Framingham heart study. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 74–81 (2015).
 40. Tsuboi, M. *et al.* Do musculoskeletal degenerative diseases affect mortality and cause of death after 10 years in Japan? *J. Bone Miner. Metab.* **29**, 217–223 (2011).
 41. Ford, E. S., Giles, W. H. & Dietz, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome

- among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* **287**, 356–9 (2002).
42. Miccoli, R. *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15**, 250–254 (2005).
 43. Singh, G., Miller, J. D., Lee, F. H., Pettitt, D. & Russell, M. W. 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* **8**, S383-91 (2002).
 44. Askari, A. *et al.* Relationship between metabolic syndrome and osteoarthritis: The Fasa Osteoarthritis Study. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* (2017). doi:10.1016/j.dsx.2017.07.002
 45. Puenpatom, R. A. & Victor, T. W. Increased Prevalence of Metabolic Syndrome in Individuals with Osteoarthritis: An Analysis of NHANES III Data. *Postgrad. Med.* **121**, 9–20 (2009).
 46. Shin, D. Association between metabolic syndrome, radiographic knee osteoarthritis, and intensity of knee pain: results of a national survey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 3177–83 (2014).
 47. Sowers, M. *et al.* Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Rheum.* **61**, 1328–1336 (2009).
 48. Cicuttini, F. M., Baker, J. R. & Spector, T. D. The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. *J. Rheumatol.* **23**, 1221–6 (1996).

49. Oliveria, S. A., Felson, D. T., Cirillo, P. A., Reed, J. I. & Walker, A. M. Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* **10**, 161–6 (1999).
50. Toussiro, E. *et al.* Serum adipokines, adipose tissue measurements and metabolic parameters in patients with advanced radiographic knee osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.* (2017). doi:10.1007/s10067-017-3789-0
51. Thijssen, E., van Caam, A. & van der Kraan, P. M. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology* **54**, 588–600 (2015).
52. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G. & Hill, R. A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes.* **26**, 1407–1433 (2002).
53. Azamar-Llamas, D., Hernández-Molina, G., Ramos-Ávalos, B. & Furuzawa-Carballeda, J. Adipokine Contribution to the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* **2017**, 5468023 (2017).
54. Dumond, H. *et al.* Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 3118–3129 (2003).
55. Bao, J. *et al.* Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 3265–72 (2010).
56. Yaykasli, K. O. *et al.* Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF-κB signaling pathways in human chondrocytes. *Cell Biol. Int.* **39**, 104–12 (2015).

57. Karvonen-Gutierrez, C. A. *et al.* Association of Leptin Levels With Radiographic Knee Osteoarthritis Among a Cohort of Midlife Women. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **65**, 936–944 (2013).
58. Perruccio, A. V., Mahomed, N. N., Chandran, V. & Gandhi, R. Plasma Adipokine Levels and Their Association with Overall Burden of Painful Joints among Individuals with Hip and Knee Osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **41**, 334–337 (2014).
59. de Boer, T. N. *et al.* Serum adipokines in osteoarthritis; comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 846–853 (2012).
60. Klop, B., Elte, J. & Cabezas, M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **5**, 1218–1240 (2013).
61. Gkretsi, V., Simopoulou, T. & Tsezou, A. Lipid metabolism and osteoarthritis: Lessons from atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **50**, 133–140 (2011).
62. Cillero-Pastor, B., Eijkel, G., Kiss, A., Blanco, F. J. & Heeren, R. M. A. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal. Chem.* **84**, 8909–16 (2012).
63. Gobezie, R. *et al.* High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R36 (2007).
64. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks. *PLoS One* **3**,

- e3740 (2008).
65. Tsezou, A., Iliopoulos, D., Malizos, K. N. & Simopoulou, T. Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **28**, n/a-n/a (2010).
 66. Simopoulou, T., Malizos, K. N. & Tsezou, A. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* **25**, 605–12 (2007).
 67. Yamamoto, K. *et al.* MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. *Matrix Biol.* **56**, 57–73 (2016).
 68. Tootsi, K., Märtson, A., Kals, J., Paapstel, K. & Zilmer, M. Metabolic factors and oxidative stress in osteoarthritis: a case-control study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **77**, 520–526 (2017).
 69. Sun, A. R. *et al.* Obesity-associated metabolic syndrome spontaneously induces infiltration of pro-inflammatory macrophage in synovium and promotes osteoarthritis. *PLoS One* **12**, e0183693 (2017).
 70. Houard, X., Goldring, M. B. & Berenbaum, F. Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, 375 (2013).
 71. Muir, H., Bullough, P. & Maroudas, A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. *J. Bone Joint Surg. Br.* **52**, 554–63 (1970).

72. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **54**, 465–80 (2005).
73. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* **213**, 626–634 (2007).
74. Muir, H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays* **17**, 1039–1048 (1995).
75. Moses, M. A., Sudhalter, J. & Langer, R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**, 1408–10 (1990).
76. Langer, R., Brem, H., Falterman, K., Klein, M. & Folkman, J. Isolations of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* **193**, 70–2 (1976).
77. Ströbel, S. *et al.* Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R34 (2010).
78. Knudson, C. B. & Knudson, W. Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 69–78 (2001).
79. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97**, 33–44 (2006).
80. von der Mark, K. *et al.* Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* **35**, 806–11 (1992).

81. Colnot, C. I. & Helms, J. A. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech. Dev.* **100**, 245–50 (2001).
82. Ostergaard, M. *et al.* Magnetic resonance imaging-determined synovial membrane and joint effusion volumes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comparison with the macroscopic and microscopic appearance of the synovium. *Arthritis Rheum.* **40**, 1856–67 (1997).
83. Fernandez-Madrid, F. *et al.* Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. *Magn. Reson. Imaging* **13**, 177–83 (1995).
84. Loeuille, D. *et al.* Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* **52**, 3492–3501 (2005).
85. Layton, M. W. *et al.* Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis Rheum.* **31**, 1400–5 (1988).
86. Radin, E. L. *et al.* Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J. Orthop. Res.* **2**, 221–234 (1984).
87. Blom, A. B. *et al.* Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 627–635 (2004).
88. Haapala, J. *et al.* Incomplete Restoration of Immobilization Induced Softening of Young Beagle Knee Articular Cartilage After 50-Week Remobilization. *Int. J. Sports Med.* **21**, 76–81 (2000).

89. Hagiwara, Y. *et al.* Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *J. Orthop. Res.* **27**, 236–242 (2009).
90. Leong, D. J. *et al.* Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biol.* **29**, 420–426 (2010).
91. Millward-Sadler, S. J., Wright, M. O., Davies, L. W., Nuki, G. & Salter, D. M. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **43**, 2091–2099 (2000).
92. Goldring, M. B. *et al.* Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur. Cell. Mater.* **21**, 202–20 (2011).
93. Kamekura, S. *et al.* Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* **54**, 2462–2470 (2006).
94. Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducy, P. & Karsenty, G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* **15**, 467–481 (2001).
95. Ueta, C. *et al.* Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.* **153**, 87–100 (2001).
96. Jiménez, M. J. *et al.* Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of

- the runt gene family involved in bone formation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4431–42 (1999).
97. Hulth, A., Lindberg, L. & Telhag, H. Mitosis in human osteoarthritic cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **84**, 197–9 (1972).
 98. Rothwell, A. G. & Bentley, G. Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Br.* **55**, 588–94 (1973).
 99. Hermansson, M. *et al.* Proteomic Analysis of Articular Cartilage Shows Increased Type II Collagen Synthesis in Osteoarthritis and Expression of Inhibin β A (Activin A), a Regulatory Molecule for Chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 43514–43521 (2004).
 100. Lippiello, L., Hall, D. & Mankin, H. J. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *J. Clin. Invest.* **59**, 593–600 (1977).
 101. Pratta, M. A. *et al.* Aggrecan Protects Cartilage Collagen from Proteolytic Cleavage. *J. Biol. Chem.* **278**, 45539–45545 (2003).
 102. NETTELBLADT, E. & SUNDBLAD, L. Protein patterns in synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2**, 144–51 (1959).
 103. Sohn, D. *et al.* Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R7 (2012).
 104. Revell, P. A., Mayston, V., Lalor, P. & Mapp, P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular

- infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **47**, 300–7 (1988).
105. Benito, M. J., Veale, D. J., FitzGerald, O., van den Berg, W. B. & Bresnihan, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 1263–1267 (2005).
 106. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 625–635 (2010).
 107. Blom, A. B. *et al.* Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase–mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis : Involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum.* **56**, 147–157 (2007).
 108. Pufe, T. *et al.* Mechanical Overload Induces VEGF in Cartilage Discs via Hypoxia-Inducible Factor. *Am. J. Pathol.* **164**, 185–192 (2004).
 109. Haywood, L. *et al.* Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2173–2177 (2003).
 110. Bondeson, J., Wainwright, S. D., Lauder, S., Amos, N. & Hughes, C. E. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R187 (2006).
 111. Van Lent, P. L. E. M. *et al.* Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor β -mediated osteophyte formation. *Arthritis Rheum.* **50**, 103–111 (2004).
 112. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about

- danger. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1–5 (2006).
113. Presle, N. *et al.* Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 690–695 (2006).
114. Pulsatelli, L. *et al.* Chemokine production by human chondrocytes. *J. Rheumatol.* **26**, 1992–2001 (1999).
115. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 35–44 (2015).
116. Liu-Bryan, R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, 323 (2013).
117. Song, R.-H. *et al.* Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* **56**, 575–585 (2007).
118. Shlopov, B. V *et al.* Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* **40**, 2065–74 (1997).
119. Billinghamurst, R. C. *et al.* Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* **99**, 1534–1545 (1997).
120. Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Cloutier, J. M. & Martel-Pelletier, J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* **97**, 2011–9 (1996).
121. Cheung, K. S. C., Hashimoto, K., Yamada, N. & Roach, H. I. Expression of

- ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA de-methylation. *Rheumatol. Int.* **29**, 525–534 (2009).
122. Naito, S. *et al.* Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol. Int.* **57**, 703–711 (2007).
123. Bau, B. *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum.* **46**, 2648–2657 (2002).
124. Kevorkian, L. *et al.* Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* **50**, 131–141 (2004).
125. Lohmander, L. S., Hoerrner, L. A. & Lark, M. W. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 181–9 (1993).
126. Hasty, K. A., Reife, R. A., Kang, A. H. & Stuart, J. M. The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**, 388–97 (1990).
127. Attur, M. G., Patel, I. R., Patel, R. N., Abramson, S. B. & Amin, A. R. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **110**, 65–72 (1998).
128. Goldring, M. B. & Berenbaum, F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S37-46 (2004).

129. Tetlow, L. C., Adlam, D. J. & Woolley, D. E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* **44**, 585–594 (2001).
130. Kaneko, S. *et al.* Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines. Cell. Mol. Ther.* **6**, 71–9 (2000).
131. Jacques, C. *et al.* Cyclooxygenase activity in chondrocytes from osteoarthritic and healthy cartilage. *Rev. Rhum. Engl. Ed.* **66**, 701–4 (1999).
132. Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P. & Fahmi, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin. Arthritis Rheum.* **33**, 155–67 (2003).
133. Lefebvre, V., Peeters-Joris, C. & Vaes, G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1052**, 366–378 (1990).
134. Stecher, R. M. Heberden's Nodes: The Incidence of Hypertrophic Arthritis of the Fingers. *N. Engl. J. Med.* **222**, 300–308 (1940).
135. Chitnavis, J. *et al.* Genetic influences in end-stage osteoarthritis. Sibling risks of hip and knee replacement for idiopathic osteoarthritis. *J. Bone Joint Surg. Br.* **79**, 660–4 (1997).
136. Ingvarsson, T. *et al.* The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. *Arthritis Rheum.* **43**, 2785–2792 (2000).

137. Spector, T. D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J. & Hart, D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**, 940–3 (1996).
138. Zhai, G., Hart, D. J., Kato, B. S., MacGregor, A. & Spector, T. D. Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthr. Cartil.* **15**, 222–225 (2007).
139. Skousgaard, S. G. *et al.* Probability and heritability estimates on primary osteoarthritis of the hip leading to total hip arthroplasty: a nationwide population based follow-up study in Danish twins. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 336 (2015).
140. Skousgaard, S. G., Skytthe, A., Möller, S., Overgaard, S. & Brandt, L. P. A. Sex differences in risk and heritability estimates on primary knee osteoarthritis leading to total knee arthroplasty: a nationwide population based follow up study in Danish twins. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 46 (2016).
141. Francis-West, P. H. *et al.* Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* **126**, 1305–15 (1999).
142. Luyten, F. P. Cartilage-derived morphogenetic protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1241–4 (1997).
143. Storm, E. E. & Kingsley, D. M. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* **122**, 3969–79 (1996).
144. Thomas, J. T. *et al.* A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF- β superfamily member. *Nat. Genet.* **12**, 315–317 (1996).

145. Valdes, A. M. *et al.* The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 873–5 (2011).
146. Zhang, R. *et al.* A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm. Res.* **64**, 405–414 (2015).
147. Loughlin, J. *et al.* Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 9757–9762 (2004).
148. Valdes, A. M. *et al.* Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* **56**, 137–146 (2007).
149. Meulenbelt, I. *et al.* Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1867–1875 (2008).
150. Valdes, A. M. *et al.* Genome-wide Association Scan Identifies a Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Variant Involved in Risk of Knee Osteoarthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 1231–1240 (2008).
151. Evangelou, E. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 349–355 (2011).
152. Kerkhof, H. J. M. *et al.* A genome-wide association study identifies a locus on chromosome 7q22 to influence susceptibility for osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, NA-NA (2010).

153. Song, J. H. *et al.* Aspartic acid repeat polymorphism of the Asporin gene with susceptibility to osteoarthritis of the knee in a Korean population. *Knee* **15**, 191–195 (2008).
154. Kaliakatsos, M. *et al.* *Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. Osteoarthritis and Cartilage* **14**, (2006).
155. Nakamura, T. *et al.* Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1676–1681 (2007).
156. Ala-Kokko, L., Baldwin, C. T., Moskowitz, R. W. & Prockop, D. J. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6565–8 (1990).
157. Loughlin, J., Irven, C., Fergusson, C. & Sykes, B. Sibling pair analysis shows no linkage of generalized osteoarthritis to the loci encoding type II collagen, cartilage link protein or cartilage matrix protein. *Br. J. Rheumatol.* **33**, 1103–6 (1994).
158. Baldwin, C. T. *et al.* Absence of linkage or association for osteoarthritis with the vitamin D receptor/type II collagen locus: the Framingham Osteoarthritis Study. *J. Rheumatol.* **29**, 161–5 (2002).
159. Mabuchi, A. *et al.* Identification of sequence polymorphisms of the COMP (cartilage oligomeric matrix protein) gene and association study in osteoarthrosis of the knee and hip joints. *J. Hum. Genet.* **46**, 456–462 (2001).
160. Meulenbelt, I. *et al.* Haplotype analysis of three polymorphisms of the COL2A1 gene and associations with generalised radiological osteoarthritis.

- Ann. Hum. Genet.* **63**, 393–400 (1999).
161. Ikeda, T. *et al.* Association Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Cartilage-Specific Collagen Genes With Knee and Hip Osteoarthritis in the Japanese Population. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1290–1296 (2002).
 162. Hashimoto, K. *et al.* Regulated Transcription of Human Matrix Metalloproteinase 13 (*MMP13*) and Interleukin-1 β (*IL1B*) Genes in Chondrocytes Depends on Methylation of Specific Proximal Promoter CpG Sites. *J. Biol. Chem.* **288**, 10061–10072 (2013).
 163. Rushton, M. D. *et al.* Characterization of the Cartilage DNA Methylome in Knee and Hip Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2450–2460 (2014).
 164. Roach, H. I. *et al.* Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* **52**, 3110–3124 (2005).
 165. Reynard, L. N., Bui, C., Canty-Laird, E. G., Young, D. A. & Loughlin, J. Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3450–3460 (2011).
 166. Gagarina, V. *et al.* SirT1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum.* **62**, 1383–1392 (2010).
 167. Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E.-J. & Hall, D. J. Regulation of Cartilage-specific Gene Expression in Human Chondrocytes by SirT1 and

- Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36300–36310 (2008).
168. Oppenheimer, H. *et al.* 75-kd sirtuin 1 blocks tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **64**, 718–728 (2012).
169. Takayama, K. *et al.* SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **60**, 2731–2740 (2009).
170. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
171. Ruvkun, G. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
172. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-.)*. **294**, 858–862 (2001).
173. Ruvkun, G. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
174. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (80-.)*. **294**, 853–858 (2001).
175. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–D73

- (2014).
176. Bentwich, I. *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* **37**, 766–770 (2005).
 177. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–62 (1993).
 178. Olsen, P. H. & Ambros, V. The *lin-4* Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev. Biol.* **216**, 671–680 (1999).
 179. Slack, F. J. *et al.* The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* **5**, 659–69 (2000).
 180. Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. & Bartel, D. P. MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**, 1616–1626 (2002).
 181. Aravin, A. A. *et al.* The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* **5**, 337–50 (2003).
 182. Lim, L. P. *et al.* The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **17**, 991–1008 (2003).
 183. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–4670 (2002).
 184. Denli, A. M., Tops, B. B. J. & Plasterk, R. H. A. Processing of primary

- microRNAs by the Microprocessor complex. 231–235 (2004).
185. Han, J. *et al.* The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. 3016–3027 (2004). doi:10.1101/gad.1262504.mic
186. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
187. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–6 (2003).
188. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4776–4785 (2004).
189. Hutvagner, G. *et al.* A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science (80-.).* **293**, 834–838 (2001).
190. Ketting, R. F. *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654–2659 (2001).
191. Mourelatos, Z. *et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* **16**, 720–728 (2002).
192. Schwarz, D. S., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P. D. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. **115**, 199–208 (2003).
193. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. **115**, 209–216 (2003).

194. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J. & Shimizu, K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598–1609 (2011).
195. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* **14**, 1902–1910 (2004).
196. Baskerville, S. & Bartel, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **11**, 241–247 (2005).
197. Rodriguez, A., Griffiths-jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. 1902–1910 (2004). doi:10.1101/gr.2722704.
198. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **23**, 4051–4060 (2004).
199. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped , polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. 1957–1966 (2004). doi:10.1261/rna.7135204.miRNAs
200. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
201. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
202. Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–98 (2003).

203. Hutvagner, G. & Zamore, P. D. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science (80-.)*. **297**, 2056–2060 (2002).
204. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**, 504–11 (2004).
205. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563–74 (2002).
206. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. **15**, 185–197 (2004).
207. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science (80-.)*. **293**, 1146–1150 (2001).
208. Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N. & Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **17**, 118–126 (2007).
209. Poy, M. N. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. **37**, 495–500 (2005).
210. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* **3**, e85 (2005).
211. Kiriakidou, M. *et al.* A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* **18**, 1165–1178 (2004).
212. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved Seed Pairing, Often

- Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
213. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2008).
214. Meydan, C., Shenhar-Tsarfaty, S. & Soreq, H. MicroRNA Regulators of Anxiety and Metabolic Disorders. *Trends Mol. Med.* **22**, 798–812 (2016).
215. Wu, X. *et al.* Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation. *Immunology* **148**, 237–248 (2016).
216. Garo, L. P. & Murugaiyan, G. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2041–2051 (2016).
217. Zhang, X. & Schulze, P. C. MicroRNAs in heart failure: Non-coding regulators of metabolic function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 2276–2287 (2016).
218. Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **16**, 494–502 (1957).
219. Menashe, L. *et al.* The diagnostic performance of MRI in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 13–21 (2012).
220. Messier, S. P. *et al.* Does high weight loss in older adults with knee osteoarthritis affect bone-on-bone joint loads and muscle forces during walking? *Osteoarthr. Cartil.* **19**, 272–280 (2011).
221. Hochberg, M. C. *et al.* American College of Rheumatology 2012

- recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **64**, 465–74 (2012).
222. Weber, J. A. *et al.* The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* **56**, (2010).
223. Hanson, E. K., Lubenow, H. & Ballantyne, J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal. Biochem.* **387**, 303–314 (2009).
224. Murata, K. *et al.* Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R86 (2010).
225. El-Hefnawy, T. *et al.* Characterization of Amplifiable, Circulating RNA in Plasma and Its Potential as a Tool for Cancer Diagnostics. *Clin. Chem.* **50**, 564–573 (2004).
226. Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **141**, 672–675 (2008).
227. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–8 (2008).
228. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18**, 997–1006 (2008).
229. Di Stefano, V., Zaccagnini, G., Capogrossi, M. C. & Martelli, F. microRNAs

- as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* **55**, 111–118 (2011).
230. Jayabalan, P. & Sowa, G. A. The development of biomarkers for degenerative musculoskeletal conditions. *Discov. Med.* **17**, 59–66 (2014).
231. Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O. & Lo, Y. M. D. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* **48**, 1647–1653 (2002).
232. Borgonio Cuadra, V. M., González-Huerta, N. C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A. & Miranda-Duarte, A. Altered Expression of Circulating MicroRNA in Plasma of Patients with Primary Osteoarthritis and In Silico Analysis of Their Pathways. *PLoS One* **9**, e97690 (2014).
233. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
234. Ge, Q. *et al.* miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules* **19**, 1568–1575 (2014).
235. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–8 (2011).
236. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–433 (2011).

237. Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **65**, 7065–7070 (2005).
238. Wang, K.-J. *et al.* Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are Promising Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cell. Physiol. Biochem.* **38**, 1015–1029 (2016).
239. Beyer, C. *et al.* Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, e18–e18 (2015).
240. Kong, R., Gao, J., Si, Y. & Zhao, D. Combination of circulating miR-19b-3p, miR-122-5p and miR-486-5p expressions correlates with risk and disease severity of knee osteoarthritis. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 2852–2864 (2017).
241. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
242. Kobayashi, T. *et al.* Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1949–1954 (2008).
243. Jones, S. W. *et al.* The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 464–472 (2009).
244. No Title. Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=microRNAs+and+osteoarthritis>.
(Accessed: 16th August 2017)
245. Yamasaki, K. *et al.* Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* **60**, 1035–1041 (2009).

246. Díaz-Prado, S. *et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* **13**, 144 (2012).
247. Miyaki, S. *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* **24**, 1173–1185 (2010).
248. Xu, B., Li, Y., Ma, J. & Pei, F. Roles of microRNA and signaling pathway in osteoarthritis pathogenesis. *J. Zhejiang Univ. B* **17**, 200–208 (2016).
249. Gu, R. *et al.* MicroRNA-9 regulates the development of knee osteoarthritis through the NF-kappaB1 pathway in chondrocytes. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e4315 (2016).
250. Zhou, B., Li, H. & Shi, J. miR- 27 inhibits the NF-κB signaling pathway by targeting leptin in osteoarthritic chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* **40**, 523–530 (2017).
251. Zhong, J.-H. *et al.* Effects of microRNA-146a on the proliferation and apoptosis of human osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF6 through the NF-κB signalling pathway. *Biosci. Rep.* **37**, (2017).
252. Akhtar, N. *et al.* MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **62**, 1361–1371 (2010).
253. Yang, J. *et al.* MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation. *FEBS Lett.* **585**, 2992–2997 (2011).

254. Lin, E. A., Kong, L., Bai, X.-H., Luan, Y. & Liu, C. miR-199a^{*}, a Bone Morphogenic Protein 2-responsive MicroRNA, Regulates Chondrogenesis via Direct Targeting to Smad1. *J. Biol. Chem.* **284**, 11326–11335 (2009).
255. Akhtar, N. & Haqqi, T. M. MicroRNA-199a^{*} regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1073–1080 (2012).
256. Martinez-Sanchez, A., Dudek, K. A. & Murphy, C. L. Regulation of Human Chondrocyte Function through Direct Inhibition of Cartilage Master Regulator SOX9 by MicroRNA-145 (miRNA-145). *J. Biol. Chem.* **287**, 916–924 (2012).
257. Yang, B. *et al.* Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett.* **588**, 2344–2352 (2014).
258. Nakamura, Y., Inloes, J. B., Katagiri, T. & Kobayashi, T. Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3019–3028 (2011).
259. Papaioannou, G., Inloes, J. B., Nakamura, Y., Paltrinieri, E. & Kobayashi, T. let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E3291–E3300 (2013).
260. Miyaki, S. *et al.* MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum.* **60**, 2723–2730 (2009).
261. Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Duval, N. & Martel-Pelletier, J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a

- in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* **10**, 148 (2009).
262. Swingler, T. E. *et al.* The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1909–1919 (2012).
263. Dweep, H. miRWalk 2.0 - a comprehensive atlas of predicted and validated miRNA target interactions. Available at: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>. Available at: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>. (Accessed: 4th September 2017)
264. Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
265. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–91 (2004).
266. Sand, M. *et al.* Expression of microRNAs in basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **167**, 847–855 (2012).
267. Sand, M. *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Dermatol. Sci.* **68**, 119–126 (2012).
268. Miles, G. D., Seiler, M., Rodriguez, L., Rajagopal, G. & Bhanot, G. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer. *BMC Res. Notes* **5**, 164 (2012).
269. Cirnigliaro, M. *et al.* Expression and Regulatory Network Analysis of miR-

- 140-3p, a New Potential Serum Biomarker for Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 250 (2017).
270. Maffioletti, E. *et al.* Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **200**, 250–258 (2016).
271. Nogales-Gadea, G. *et al.* Analysis of Serum miRNA Profiles of Myasthenia Gravis Patients. *PLoS One* **9**, e91927 (2014).
272. Rasheed, Z., Rasheed, N. & Al-Shaya, O. Epigallocatechin-3-O-gallate modulates global microRNA expression in interleukin-1 β -stimulated human osteoarthritis chondrocytes: potential role of EGCG on negative co-regulation of microRNA-140-3p and ADAMTS5. *Eur. J. Nutr.* (2017).
doi:10.1007/s00394-016-1375-x
273. Warnecke-Eberz, U., Chon, S.-H., Hölscher, A. H., Drebber, U. & Bollschweiler, E. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. *Tumor Biol.* **36**, 4643–4653 (2015).
274. Kim, H. *et al.* MicroRNA expression profiles and clinicopathological implications in lung adenocarcinoma according to EGFR, KRAS, and ALK status. *Oncotarget* **8**, 8484–8498 (2017).
275. Zhu, J. *et al.* Establishment of a miRNA-mRNA regulatory network in metastatic renal cell carcinoma and screening of potential therapeutic targets. *Tumor Biol.* **37**, 15649–15663 (2016).
276. Zhang, C. *et al.* The predictive value of selected serum microRNAs for acute GVHD by TaqMan MicroRNA arrays. *Ann. Hematol.* **95**, 1833–1843 (2016).

277. Tembe, V. *et al.* MicroRNA and mRNA expression profiling in metastatic melanoma reveal associations with *BRAF* mutation and patient prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 254–266 (2015).
278. Wang, W.-H. *et al.* MiR-150-5p suppresses colorectal cancer cell migration and invasion through targeting MUC4. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 6269–73 (2014).
279. Yan, L. *et al.* Identification of lymph node metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma and analysis of the underlying mechanisms using a bioinformatics approach. *Exp. Biol. Med.* **242**, 709–717 (2017).
280. Koshizuka, K. *et al.* Deep sequencing-based microRNA expression signatures in head and neck squamous cell carcinoma: dual strands of pre-miR-150 as antitumor miRNAs. *Oncotarget* **8**, 30288–30304 (2017).
281. Osako, Y. *et al.* Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Hum. Genet.* (2017). doi:10.1038/jhg.2017.69
282. Hosokawa, K. *et al.* A plasma microRNA signature as a biomarker for acquired aplastic anemia. *Haematologica* **102**, 69–78 (2017).
283. Dostalova Merkerova, M. *et al.* Microarray profiling defines circulating microRNAs associated with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma* **64**, 571–578 (2017).
284. Fogli, S. *et al.* Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. *Tumor Biol.* **39**, 101042831770164 (2017).

285. Scrutinio, D. *et al.* Circulating microRNA-150-5p as a novel biomarker for advanced heart failure: A genome-wide prospective study. *J. Hear. Lung Transplant.* **36**, 616–624 (2017).
286. Chen, J.-Q. *et al.* MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *PLoS One* **12**, e0174585 (2017).
287. Punga, A. R., Andersson, M., Alimohammadi, M. & Punga, T. Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *J. Neurol. Sci.* **356**, 90–96 (2015).
288. Hamada, S., Masamune, A., Kanno, A. & Shimosegawa, T. Comprehensive Analysis of Serum microRNAs in Autoimmune Pancreatitis. *Digestion* **91**, 263–271 (2015).
289. Cosar, E. *et al.* Serum microRNAs as diagnostic markers of endometriosis: a comprehensive array-based analysis. *Fertil. Steril.* **106**, 402–9 (2016).
290. Zhou, Y., Wang, T., Hamilton, J. L. & Chen, D. Wnt/ β -catenin Signaling in Osteoarthritis and in Other Forms of Arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **19**, 53 (2017).
291. van den Bosch, M. H. *et al.* Induction of Canonical Wnt Signaling by Synovial Overexpression of Selected Wnts Leads to Protease Activity and Early Osteoarthritis-Like Cartilage Damage. *Am. J. Pathol.* **185**, 1970–1980 (2015).
292. van den Bosch, M. H. *et al.* Induction of Matrix Metalloproteinase Expression by Synovial Wnt Signaling and Association With Disease Progression in Early Symptomatic Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2017).

doi:10.1002/art.40206

293. Zhu, M. *et al.* Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 12–21 (2009).
294. Huang, G., Chubinskaya, S., Liao, W. & Loeser, R. F. Wnt5a induces catabolic signaling and matrix metalloproteinase production in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **25**, 1505–1515 (2017).