



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Κ. ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

*«Έκφραση γονιδίων στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση σε ιστούς
οστεοαρθρικής άρθρωσης»*

*«Gene expression in endochondral ossification in arthritic joint
tissues»*

ΚΑΤΣΙΩΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

Φοιτήτρια Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας

Επιβλέποντες:

Καθηγήτρια κ. Τσέζου Ασπασία

Συνεπιβλέποντες:

Καθηγητής κ. Μαμούρης Ζήσης

Επ.καθηγήτρια κ.Τραχανά Βαρβάρα

Λάρισα, 2017

[2]

Περιεχόμενα

1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 HDACS	8
1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ VEGF	10
1.3 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	27
1.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ	29
1.5 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	32
1.6 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	33
1.8 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	36
1.9 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	38
1.10 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	39
1.11 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	42
1.12 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ	42
1.13 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΑ	43

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη γενετικών παραγόντων που μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας, την εξέλιξη αυτής και την αποτελεσματικότητα των διαφόρων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ως γνωστόν, η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια χρόνια εκφυλιστική νόσο που προσβάλλει τις αρθρώσεις ατόμων μεγαλύτερης συνήθως ηλικίας, ενώ έχουν γίνει πολλές προσπάθειες προκειμένου να καθοριστούν οι ακριβείς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι η ηλικία, το φύλο, οι συχνοί τραυματισμοί των αρθρώσεων, διάφορα χρόνια νοσήματα των αρθρώσεων ή του συνδετικού ιστού, η παχυσαρκία ενώ σημαντική φαίνεται να είναι και η γενετική προδιάθεση. Διάφοροι γενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί ότι σχετίζονται με την παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση δύο από αυτούς τους παράγοντες, η απακετυλάση των ιστονών 4 (HDAC4) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-A (VEGF-A), από κύτταρα αρθρικών ιστών. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια χειρουργείου γόνατος χονδροκύτταρα και αρθρικός υμένας από 20 ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα και από 16 υγιείς-μάρτυρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους ώστε να απομονωθεί το RNA των υπεύθυνων γονιδίων. Ο προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε έπειτα από απομόνωση του ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA και πολλαπλασιασμό του με real-timePCR. Όσον αφορά τον HDAC4, φάνηκε ότι τα επίπεδά του ήταν πολύ μεγαλύτερα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς, ενώ ο VEGF-A φάνηκε να μην εκφράζεται από τα χονδροκύτταρα τόσο των ασθενών όσο και των υγείων. Για το λόγο αυτό στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση του VEGF-A από κύτταρα αρθρικού υμένα, όπου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφρασή του στους υγιείς σε σχέση με τους ασθενείς που έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα.

Abstract

The aim of this study was to study the genetic factors that may be related to the development of osteoarthritis, its progression and the effectiveness of various therapeutic approaches. It is well known that osteoarthritis is a chronic degenerative disease that affects the joints of mainly older people, and many efforts have been made to determine the exact risk factors for developing the disease. Some of these factors include age, gender, frequent joint injuries, various chronic connective tissue diseases, obesity, and genetic predisposition. Several genetic factors have been implicated in the pathogenesis of osteoarthritis. In the present study, the expression of two of these factors from synovial tissue cells, the histone deacetylase 4 (HDAC4) and the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), was studied. For this purpose, chondrocytes and synovial membranes from 20 patients with osteoarthritis and 16 healthy controls were isolated during knee surgery. The cells were cultured under specific conditions in order to multiply them and isolate the RNAs of the responsible gene. Gene expression was determined after isolating the total RNA, reverse transcribing it into cDNA and multiplying it by real-time PCR. With regard to HDAC4, it appeared that its levels were much higher in patients than healthy ones, whereas VEGF-A appeared not to be expressed by both chondrocytes of both patients and health. Therefore, expression of VEGF-A by synovial cells was studied, where increased expression was seen in healthy subjects compared to patients suffering from osteoarthritis.

1.0 Εισαγωγή

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την συχνότερη πάθηση των αρθρώσεων, προσβάλλει άτομα >65 ετών και συνοδεύεται από πόνο και δυσλειτουργία των προσβεβλημένων αρθρώσεων. Θεωρείται πολυπαραγοντική ασθένεια, η ακριβής αιτιολογία της οποίας παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη. Ωστόσο, η εκτεταμένη εμβιομηχανική επιβάρυνση των αρθρώσεων, η ηλικία, το φύλο, η παχυσαρκία, προϋπάρχουσες παθήσεις των αρθρώσεων καθώς και η γενετική προδιάθεση συγκαταλέγονται στους κύριους παράγοντες κινδύνου.

Ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου είναι το κύριο χαρακτηριστικό της εκφυλιστικής αρθρίτιδας ή οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ). Τα μοριακά γεγονότα και η παθοφυσιολογία των εκφυλιστικών αλλοιώσεων της άρθρωσης που οδηγούν στην ΟΑ έχουν διευκρινιστεί σε πολύ μικρό βαθμό. Προς το παρόν δεν υπάρχει ικανοποιητική θεραπευτική αντιμετώπιση παρόλο που η ασθένεια ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό αναπηρίας στις βιομηχανοποιημένες περιοχές, κατάσταση που αναμένεται να επιβαρυνθεί με την αυξανόμενη γήρανση του πληθυσμού.

Η πλειονότητα των μακρών και βραχέων οστών του σώματος αναπτύσσεται με ενδοχόνδρια οστεοποίηση (endochondral ossification). Αυτός ο τύπος σχηματισμού οστίτη ιστού συμβαίνει σε δύο στάδια: α) σχηματίζεται ένα μικρό πρόπλασμα από υαλοειδή χόνδρο και β) το χόνδρινο πρόπλασμα συνεχίζει να μεγαλώνει και χρησιμεύει ως δομικό «καλούπι» για την ανάπτυξη του οστού, επαναρροφάται και αντικαθίσταται από οστίτη ιστό.

Συνοπτικά τα γεγονότα της ενδοχόνδριας οστεοποίησης είναι τα εξής:

1. Πρωτογενής Πυρήνας Οστεώσεως: Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, σχηματίζεται μικρό πρόπλασμα από υαλοειδή χονδρικό ιστό στην περιοχή όπου θα αναπτυχθεί οστόν. Μερικά χονδροκύτταρα ωριμάζουν, υπερτρέφονται και αποθνήσκουν, ενώ η θεμέλια ουσία του χονδρικού ιστού αποτιτανώνεται.

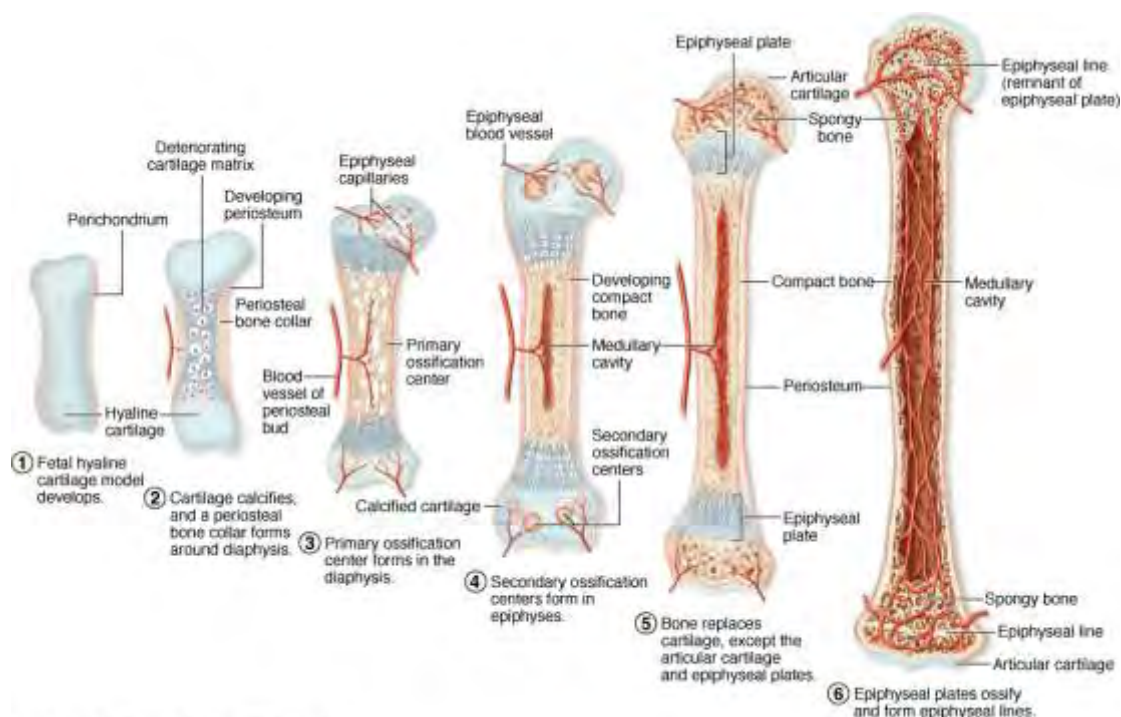
2. Το περιχόνδριο στη μεσότητα της διάφυσης αποκτά αγγείωση, οπότε το περιχόνδριο μετατρέπεται σε περισσότερο και τα χονδρογόνα κύτταρα καθίστανται οστεοπρογονικά και σχηματίζουν οστεοβλάστες.
3. Οι οστεοβλάστες πλέον εκκρίνουν θεμέλια ουσία σχηματίζοντας υποπεριοστικό οστέινο περιλαίμιο στην επιφάνεια του χόνδρινου προπλάσματος, με ενδοϋμενώδη σχηματισμό οστίτη ιστού.
4. Το οστέινο περιλαίμιο δεν επιτρέπει την διάχυση θρεπτικών συστατικών προς τα υπερτρέφοντα χονδροκύτταρα στο εσωτερικό του χόνδρινου προπλάσματος, προκαλώντας το θάνατό τους. Στην εν λόγω διεργασία οφείλεται η παρουσία κενών συρρευουσών κοιλιοτήτων, οι οποίες σχηματίζουν ευμεγέθη επικοινωνούντα κοιλώματα – τον μελλοντικό μυελώδη αυλό στο κέντρο του χόνδρινου προπλάσματος.
5. Οι οπές που σκάπτονται στο οστέινο περιλαίμιο από οστεοκλάστες επιτρέπουν σε ένα περιοστικό βλάστημα (οστεογόνο βλάστημα), αποτελούμενο από οστεοπρογονικά κύτταρα, αιμοποιητικά κύτταρα και αιμοφόρα αγγεία, να εισέλθει στα κοιλώματα που βρίσκονται μέσα στο χόνδρινο πρόπλασμα.
6. Οστεοπρογονικά κύτταρα διαιρούνται σχηματίζοντας οστεοβλάστες. Τα εν λόγω νεοσχηματισμένα κύτταρα παράγουν θεμέλια οστική ουσία στην επιφάνεια του αποτιτανωμένου χόνδρου. Η θεμέλια οστική ουσία αποτιτανώνεται και σχηματίζεται σύμπλεγμα αποτιτανωμένου χόνδρου / αποτιτανωμένου οστού.
7. Καθώς ο υποπεριοστικός οστίτης ιστός καθίσταται παχύτερος και αυξάνεται προς κατεύθυνση από την μεσότητα της διάφυσης προς τις επιφύσεις, οι οστεοκλάστες αρχίζουν να επαναρροφούν το σύμπλεγμα αποτιτανωμένου χόνδρου / αποτιτανωμένου οστού, διευρύνοντας το μυελώδη αυλό. Καθώς η διεργασία αυτή συνεχίζεται, ο χόνδρος της διάφυσης αντικαθίσταται από οστούν, με εξαίρεση τους συζευκτικούς χόνδρους, που είναι επιφορτισμένοι με τη συνεχή ανάπτυξη των οστών έως την ηλικία των 18-20 ετών.
8. Δευτερογενή κέντρα οστεώσεως: αρχίζουν να σχηματίζονται στις επιφύσεις στα δύο άκρα του σχηματιζόμενου οστού με διεργασία

όμοια με εκείνη της διαφύσεως, με εξαίρεση το γεγονός ότι δε σχηματίζεται οστέινο περιλαίμιο. Μάλλον οστεοπρογονικά κύτταρα εισβάλλουν στο χόνδρο της επιφύσεως, διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και αρχίζουν την έκκριση θεμέλιας ουσίας πάνω στο χόνδρινο «καλούπι».

9. Τα γεγονότα αυτά συνεχίζονται όπως και στη διάφυση και τελικά ο χόνδρος της επίφυσης αντικαθίσταται από οστόν με εξαίρεση την αρθρική επιφάνεια και τον συζευκτικό χόνδρο. Η αρθρική επιφάνεια του οστού παραμένει χόνδρινη εφ' όρου ζωής.

10. Η επίφυση και η διάφυση καθίστανται συνεχείς.

Τα παραπάνω γεγονότα της ενδοχόνδριας οστεοποίησης παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 1. [1]



Source: Meacher AL, Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition. <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 1 : Γεγονότα της ενδοχόνδριας οστεοποίησης.

1.1 HDACS

Οι HDACs χωρίζονται σε δύο οικογένειες: την οικογένεια των κλασικών εξαρτημένων από zinc δακτύλιο HDACs και την SIR2 οικογένεια των εξαρτημένων από NAD⁺ HDACs. Η κλασική οικογένεια HDACs έχει διαιρεθεί σε τρεις τάξεις [2]: HDACs τάξης I (HDAC1, 2, 3 και 8)

παρουσιάζουν ομολογία με το γονίδιο RPD3 του μύκητα, οι HDACs τάξης II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 και 10) σχετίζονται περισσότερο με το γονίδιο HDA1 του μύκητα [3]. Η HDAC11 από μόνη της αντιπροσωπεύει τις HDACs τάξης IV[2].

Διαφοροποίηση οστεοβλαστών και υπερτροφία χονδροκυττάρων

Η HDAC4 έχει φανεί να διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση της κυτταρικής έκφρασης, της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων, της κυτταρικής ανάπτυξης, της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού.

Η HDAC4-null ποντίκια εμφάνισαν ανώμαλη υπερτροφία χονδροκυττάρων και ακολούθως πρόωρη οστεοποίηση στον πλευροχόνδρικό χόνδρο [4]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η τριχοστατίνη A (TSA) και το βουτυρικό νάτριο, τα οποία δρουν ως μη εκλεκτικοί αναστολείς των HDACs τάξης I και II, φάνηκε ότι επίσης αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της μεταλλοπρωτεϊνάσης στα χονδροκύτταρα και εμποδίζουν την απορρόφηση του χόνδρου [5].

Στην αυξητική πλάκα, η HDAC4 παρεμποδίζει την υπερτροφία των χονδροκυττάρων μέσω της αναστολής της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα σχετιζόμενου με runt (Runx2), έναν μεταγραφικό παράγοντα σημαντικό για την υπερτροφία των χονδροκυττάρων κατά τη διάρκεια του ενδοχόνδριου οστικού σχηματισμού. Τα HDAC4-null ποντίκια παρουσιάζουν υπερτροφία χονδροκυττάρων, αυξημένες MMP-13 (matrix metalloproteinases 13) και πρόωμη οστεοποίηση των αναπτυσσόμενων οστών λόγω της έκφρασης του Runx2 [4, 6]. Η HDAC4 αναστέλλει την MMP-13 μέσω της σύνδεσής της με την περιοχή εκκινητή του Runx2 [6-9]. Έτσι, η HDAC4 θεωρείται κεντρικός ρυθμιστής της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων και της σκελετογένεσης κατά την ανάπτυξη της αυξητικής πλάκας.

Η HDAC-4 στην οστεοαρθρίτιδα

Μελέτες έχουν δείξει σημαντική έκφραση της HDAC-4 σε οστεοαρθρικούς χόνδρους και κυρίως στην μεσαία και εν τω βάθου στοιβάδα της αναπτυξιακής πλάκας. Μάλιστα η αυξημένη έκφραση της HDAC-4 οδηγεί μέσω μηχανισμών οι οποίοι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί και σε αυξημένη έκφραση ενζύμων που προάγουν τη φλεγμονή π.χ κυτοκινών και τον καταβολισμό του αρθρικού χόνδρου μέσω διάσπασης του κολλαγόνου και την απώλεια αγκρεκάνης, όπως

MMP-13, ADAMTS-4. Στη ρύθμιση της έκφρασης της HDAC-4 συμβάλουν και ορισμένα miRNA (π.χ miR-140) τα οποία μπορούν είτε να την καταστείλουν είτε να την αυξήσουν. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος της HDAC4 στα OA χονδροκύτταρα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. . Συνολικά, η έκταση της έκφρασης HDAC-4 βρέθηκε να μειώνεται γραμμικά με την αυξανόμενη δριμύτητα της OA.

1.2 Ο ρόλος του VEGF

Αν και ο ενήλικας ανθρώπινος χόνδρος είναι φυσιολογικά ένας ιστός χωρίς αγγεία, μπορεί να παρατηρηθεί αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης ενδοχονδρικού οστού. Η φλεγμονή στις αρθρικές αρθρώσεις μπορεί επίσης να οδηγήσει σε νεοαγγειοποίηση στον χόνδρο. Σε τέτοιες συνθήκες, η έκφραση αγγειογόνων παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), έχει αποδειχθεί ότι παίζει βασικό ρόλο, ελέγχοντας όχι μόνο την αγγειογένεση αλλά και τον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων.

Ο Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντα-A (VEGF) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης για τη ρύθμιση της αγγειακής ανάπτυξης και της αγγειογένεσης. Τα αιμοφόρα αγγεία χρησιμεύουν τόσο ως δομικά πρότυπα για το σχηματισμό των οστών παρέχοντας κύτταρα, αυξητικούς παράγοντες και τα ανόργανα στοιχεία που απαιτούνται για τη σύνθεση, καθώς και του κύκλου εργασιών, για τη μετατροπή της εξωκυττάριας μήτρας σε οστό. Μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης, VEGF συμβάλλει στην σύζευξη οστεογένεσης με αγγειογένεση, και ελέγχει άμεσα τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Επειδή η αγγείωση των οστών και η αγγειογένεση παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην οστεογένεση, ο VEGF επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη του σκελετού και την μεταγεννητική επισκευή των οστών. Η δυσκολία επισκευής των οστών και η αναγέννηση σε πολλούς ασθενείς μπορεί να αποδοθεί σε μειωμένη παροχή αίματος. Έτσι, η ρύθμιση των επιπέδων VEGF στα οστά αντιπροσωπεύει μια δυνητική στρατηγική για την επισκευή των οστών και τη βελτίωση της αναγέννησής τους.

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση αρχίζει με τον πολλαπλασιασμό και την ομαδοποίηση των μη διαφοροποιημένων μεσεγγυματικών κύτταρων. Αυτά τα κύτταρα που μεταναστεύουν μαζί με τα νέα αιμοφόρα αγγεία διαφοροποιούνται σε οστεο-προγονικά κύτταρα, με δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Ο χρόνος που απαιτείται για την αγγειακή εισβολή, μετά την έκφραση του αγγειακού γονιδίου ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), οδηγεί σε καταρράκτη φυσιολογικών γεγονότων για σχηματισμό νέου οστού και εν τω μεταξύ, εισβολή αίματος που πραγματοποιείται για υποκατάσταση του χόνδρου με οστό [10,11].

Παράγοντες που προκαλούν έκφραση VEGF-A

Η υποξία αποτελεί πρωταρχικό ερέθισμα για την αγγειογένεση. Ειδικότερα, η μειωμένη τάση οξυγόνου επάγει έκφραση του VEGF-A μέσω επαγωγής ενός παράγοντα μεταγραφής, HIF-1α. Συγκεκριμένα, Ο HIF-1α οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου VEGF-A σε υποξυγονικά κύτταρα με πρόσδεση σε ένα στοιχείο απόκρισης υποξίας (HRE). Στην αναπτυξιακή πλάκα, η τάση οξυγόνου στις πολλαπλασιαστικές και υπερτροφικές ζώνες έχει αναφερθεί ότι είναι 57 και 29,3 mmHg, αντίστοιχα. Τα χαμηλά αποθέματα οξυγόνου στις υπερτροφικές ζώνες οφείλεται στην έλλειψη αγγείωσης. Η υποξία σε αυτές τις στιβάδες επάγει τον παράγοντα μεταγραφής HIF-1^α και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του VEGF-A [10].

Ο ρόλος του VEGF-A στην οστεοαρθρίτιδα

Αν και η έκφραση του VEGF-A είναι κρίσιμη στην ανάπτυξη ενδοθηλιακών οστών των νεογνών, γενικά δεν ανευρίσκεται στον αρθρικό χόνδρο των ενηλίκων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει την έκφραση του VEGF-Α και των υποδοχέων του σε οστεοαρθρικό χόνδρο. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι σε χονδροκύτταρα και ιστό χόνδρου που προέρχεται από ασθενείς με ΟΑ η έκφραση του VEGF και VEGF υποδοχέα του είναι υψηλότερη σε σχέση με την έκφραση του σε υγιή άτομα. Η έκφραση του VEGF επίσης, σε οστεοαρθρικό χόνδρο συνοδεύεται από αγγειογένεση και φλεγμονή. Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το VEGF μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση της ΟΑ δεν

είναι ακόμη πλήρως κατανοητός[10].

Οστεόφυτα και VEGF-A

Τα οστεοφυτά είναι οστικές και χόνδρινες δομές στην ΟΑ, οι οποίες προκύπτουν από τα οστεώδη περιθώρια των οστικών συστατικών της άρθρωσης. Ο σχηματισμός οστεόφυτων έχει ερμηνευτεί ως προσαρμογή της άρθρωσης στις αλλοιώσεις που προκαλούνται από την ΟΑ. Ο VEGF-A παίζει κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη οστεοφυτών. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο VEGF-A μπορεί να ρυθμίσει τα οστεοφυτά κατά την ανάπτυξη της ΟΑ εξακολουθεί να είναι ασαφής[10,11].

Ο VEGF-A επάγει την έκφραση ενζύμων καταβολισμού

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων έκφρασης καταβολικών ενζύμων που εμπλέκονται στην καταστροφή του χόνδρου όπως ,MMP-1,MMP-3,σε χονδροκύτταρα ΟΑ όχι όμως σε φυσιολογικά . Το γεγονός αυτό δηλώνει την αναμφίβολη συμμετοχή του VEGF-Αστην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ [10].

Η συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής με Διευθύντρια την Καθηγήτρια κ. Ασπασία Τσέζου, και αφορά στη διερεύνηση του ρόλου των HDAC-4 και του VEGF-A στη παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας.

ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα ή οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων, αποτελώντας τη συχνότερη μορφή αρθρίτιδας (50% όλων των μορφών αρθρίτιδας), με κύριο χαρακτηριστικό τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, ο οποίος σταδιακά

καθίσταται μαλακός και διαβρώνεται κατά τόπους. Συνοδεύεται επίσης από αντιδραστική παραγωγή νέου οστού στην περιφέρεια της άρθρωσης (οστεόφυτα) και πάχυνση και σκλήρυνση του αρθρικού υμένα [12,13]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.), περίπου 40 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα και υπολογίζεται ότι ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί στα 60 εκατομμύρια το 2020 [14].

Η ΟΑ αποτελεί χρόνια κατάσταση και επηρεάζει κυρίως άτομα μέσης και τρίτης ηλικίας (>65 ετών), ευθύνεται δε για το μεγαλύτερο ποσοστό αναπηρίας και χαμηλού βιοτικού επιπέδου σε όλες τις χώρες του δυτικού κόσμου (Ευρώπη, Ηνωμένες πολιτείες, Καναδάς, Αυστραλία) κατάσταση που αναμένεται να επιβαρυνθεί με την αυξανόμενη γήρανση του πληθυσμού [15]. Η Π.Ο.Υ. επίσης υπολογίζει ότι το 10% του πληθυσμού της γης άνω των 60 πάσχει από οστεοαρθρίτιδα και ότι το 80% των ατόμων αυτών έχει κάποιου βαθμού περιορισμένη δραστηριότητα ενώ το 20% δεν μπορεί να εκτελέσει τις βασικές λειτουργίες της καθημερινής ζωής. Όσον αφορά τη χώρα μας σύμφωνα με την Πανελλήνια Επιδημιολογική Έρευνα για τις ρευματικές παθήσεις στο γενικό πληθυσμό που οργανώθηκε και πραγματοποιήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών (2006) βρέθηκε ότι ο συνολικός επιπολασμός της συμπτωματικής ΟΑ, που αφορά στις αρθρώσεις τόσο των άνω και κάτω άκρων όσο και της σπονδυλικής στήλης ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων [16].

Παρόλο που περιγράφεται ως μη φλεγμονώδης ασθένεια, προκειμένου να διακρίνεται από τη φλεγμονώδη αρθρίτιδα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), είναι γνωστό ότι η φλεγμονή των αρθρώσεων συμβάλλει σημαντικά στην πρόοδο της ασθένειας [17].

Η ΟΑ διακρίνεται σε πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή όταν η αιτία ανάπτυξής της δεν είναι εμφανής και ως εκ τούτου συνεπάγεται την πολυπαραγοντικότητα της νόσου και σε δευτεροπαθή όταν εμφανίζεται ως αποτέλεσμα κάκωσης ή μίας ποικιλίας συγγενών, αναπτυξιακών, φλεγμονωδών και νευρολογικών διαταραχών (π.χ. νόσος Paget, σύνδρομο Ehlers- Danlos, αιμοχρωμάτωση, χονδροασβέστωση νευροπαθητική αρθροπάθεια, κ.α.). Η ιδιοπαθής ΟΑ σπάνια εμφανίζεται σε άτομα νεαρότερα των 40 ετών, σε αντίθεση με τη δευτεροπαθή η οποία μπορεί να εμφανιστεί και σε νεαρότερες ηλικίες [18]. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις συνυπάρχουν πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς παράγοντες [13].

Οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος μπορεί να προσβληθεί από ΟΑ αν και αρχικά προσβάλλεται μόνο μία άρθρωση (**Εικόνα 2**). Ωστόσο, κάποιες αρθρώσεις (γόνατο, ισχίο, σπονδυλική στήλη) προσβάλλονται συχνότερα εν συγκρίσει με άλλες (αγκώνας, ποδοκνημική) [13]. Επίσης, εκτός από τον αρθρικό χόνδρο προσβάλλονται όλα τα στοιχεία μίας άρθρωσης (μηνίσκος, τένοντες, υμένας, υποχόνδριο οστό) [19].



Εικόνα 1: Αρθρώσεις που προσβάλλονται στην ΟΑ.

Ως παράγοντες κινδύνου αναφέρονται η ηλικία [21], το φύλο [21], γενετικές ανωμαλίες [20,21], εμβιομηχανικοί παράγοντες (συγγενείς δυσπλασίες [21], μειωμένη μυϊκή δύναμη [21], εκτεταμένη επιβάρυνση της άρθρωσης, επάγγελμα [21], ύπαρξη προϋπάρχουσας πάθησης ή τραύματος [21], ο δείκτης μάζας σώματος (BMI- BoneMassIndex) [22], περιβαλλοντικοί παράγοντες [23], η φυλή [13] καθώς και μεταβολικές

διαταραχές [24-26]. Γενικά η συχνότητα εμφάνισης αυξάνει με την ηλικία χωρίς αυτό να σημαίνει ότι εμφανίζεται αναπόφευκτα με τη γήρανση, αλλά επισημαίνεται ότι απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για εκδήλωση κλινικής συμπτωματολογίας [13]. Επίσης, η ασθένεια είναι σημαντικά συχνότερη στις γυναίκες (50% μεγαλύτερος κίνδυνος) συγκριτικά με τους άντρες [21].

Τα κύρια συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας είναι ο πόνος των προσβεβλημένων αρθρώσεων και μάλιστα όσο πιο εκτεταμένη είναι η φθορά του αρθρικού χόνδρου τόσο ισχυρότερος είναι. Παρόλα αυτά η συσχέτιση του πόνου με το βαθμό φθοράς ποικίλλει μεταξύ των αρθρώσεων αλλά και μεταξύ των διαφόρων ασθενών [13].

Προς τα παρόν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση της ΟΑ σε πρώιμα στάδια ούτε αποτελεσματική θεραπεία παρά μόνο συμπτωματική αντιμετώπισή της νόσου. Οι σύγχρονες θεραπευτικές μέθοδοι περιορίζονται στη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (NSAIDS) και σε χειρουργικές επεμβάσεις [27]. Τα μοριακά γεγονότα και η παθοφυσιολογία των εκφυλιστικών αλλοιώσεων της άρθρωσης που οδηγούν στο κλινικό σύνδρομο της ΟΑ έχουν διευκρινιστεί σε πολύ μικρό βαθμό αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον καθορισμό των πιθανών μηχανισμών που ευθύνονται για τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

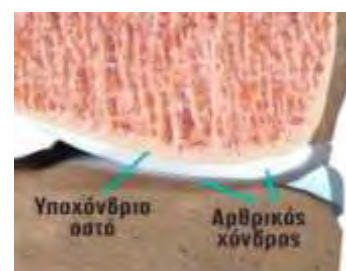
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος, είναι ο ιστός ο οποίος καλύπτει και προστατεύει τα άκρα των οστών στις διαρθρώσεις, διευκολύνοντας την κίνηση (Εικόνα 3),[28]. Ο σχηματισμός του ξεκινάει κατά την εμβρυογένεση μέσω



Εικόνα 3. Αρθρικός χόνδρος.
μίας διαδικασίας που ονομάζεται χονδρογένεση [29,30]. Νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη το μεγαλύτερο μέρος του σκελετικού συστήματος είναι χόνδρος. Αυτός ο προσωρινός χόνδρος προοδευτικά αντικαθίσταται από οστό μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης [30], διαδικασία που ολοκληρώνεται στην εφηβεία, οπότε και δημιουργείται ο ενήλικος ώριμος αρθρικός χόνδρος.

Σε αντίθεση με τον προσωρινό χόνδρο, ο αρθρικός χόνδρος δεν οστεοποιείται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής αποτελώντας μία μόνιμη δομή [29]. Η σχέση μεταξύ χόνδρου και οστού γίνεται αντιληπτή στη δομή μίας άρθρωσης όπου μεταξύ του χόνδρου και του οστού υπάρχει το υποχόνδριο οστό (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχέση αρθρικού χόνδρου και υποχόνδριου οστού.

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα χονδροκύτταρα αποτελούν τα κύρια συστατικά του ενήλικου αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα

είναι ο μοναδικός κυτταρικός πληθυσμός του χόνδρου και αποτελούν λιγότερο από το 5% του συνολικού όγκου του ιστού (η μικρότερη περιεκτικότητα σε κύτταρα σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο ιστό του ανθρώπινου οργανισμού). Είναι επίσης τα κύτταρα που συνθέτουν τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του χόνδρου στην οποία και είναι εμβαπτισμένα [31,32]. Η θεμέλια ουσία περιέχει ένα δίκτυο βιολογικών μακρομορίων, κυρίως κολλαγόνου (60% τύπου II, VI, IX και XI), πρωτεογλυκανών (25%-35%) και μη κολλαγονικών πρωτεϊνών με κυριότερες τις γλυκοπρωτεΐνες και είναι πλούσια σε νερό [32]. Συγκεκριμένα περίπου το 75% του υγρού βάρους του αρθρικού χόνδρου είναι νερό και περίπου το 70% του ξηρού βάρους είναι κολλαγόνο [33]. Εξαιτίας αυτής της σύστασης ο αρθρικός χόνδρος χαρακτηρίζεται ως διφασικό υλικό, αποτελούμενο από τη στερεά και την υγρή φάση [34]. Τη στερεά φάση την αποτελούν τα χονδροκύτταρα, οι ίνες κολλαγόνου και οι πρωτεογλυκάνες και την υγρή φάση την αποτελεί το νερό.

Αποτελεί έναν βασικό ιστό υψηλής οργάνωσης και μοναδικής υφής με κύριο ρόλο την προστασία του υποχόνδριου οστού από τις εμβιομηχανικές βλάβες κατά τη διάρκεια φόρτισης (κίνηση, έντονη φυσική δραστηριότητα) των αρθρώσεων και χρησιμεύει ως φορτιζόμενο ελαστικό υλικό, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατανομή των μηχανικών φορτίων που ασκούνται στις αρθρώσεις καθώς και για την χωρίς τριβή κίνηση των αρθρικών επιφανειών (συμβάλλει και το αρθρικό υγρό) [34]. Αυτά τα μηχανικά φορτία απορροφούνται αρχικά από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του χόνδρου και στη συνέχεια διαχέονται και μεταβιβάζονται στα χονδροκύτταρα.

Παρόλο που η ποιοτική του σύσταση είναι η ίδια σε όλες τις αρθρώσεις και τα δομικά στοιχεία του εκτελούν τις ίδιες λειτουργίες, ο

αρθρικός χόνδρος μπορεί να διαφέρει σε πάχος, κυτταρική περιεκτικότητα και σύσταση θεμέλιας ουσίας σε διάφορες περιοχές της ίδιας άρθρωσης, σε διαφορετικές αρθρώσεις και σε διαφορετικά είδη οργανισμών [35].

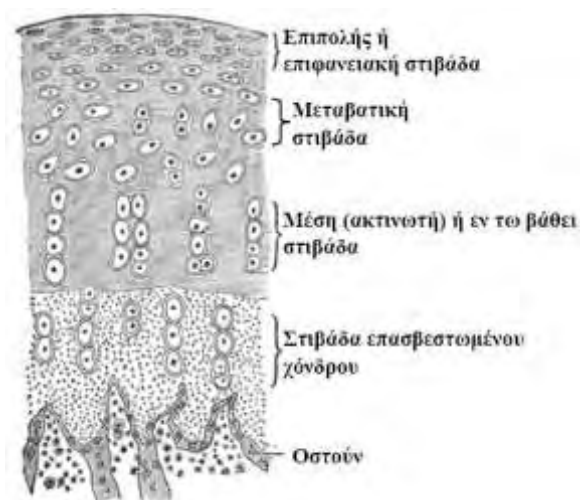
Ο αρθρικός χόνδρος δεν διαθέτει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία [36]. Το οξυγόνο και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά προωθούνται στα χονδροκύτταρα κυρίως μέσω διάχυσης από το αρθρικό υγρό και από τα αγγεία του υποχόνδριου οστού μέσω της ζώνης ασβεστοποίησης του χόνδρου [37].

Επίσης, ο χόνδρος στερείται νεύρων και νευρικών απολήξεων [36], με αποτέλεσμα η βλάβη που εντοπίζεται αρχικά στο χόνδρο να μην γίνεται αντιληπτή. Θα πρέπει να επεκταθεί στον αρθρικό υμένα ή το υποχόνδριο οστό προκειμένου να εκδηλωθούν συμπτώματα (άλγος). Για το λόγο αυτό οι βλάβες κατά την έναρξη της οστεοαρθρίτιδας, που πιθανόν να είναι αντιμετωπίσιμες, δεν γίνονται έγκαιρα αντιληπτές.

Η πορώδης και ελαστική δομή του αρθρικού χόνδρου, η διφασική του φύση, η δομική και λειτουργική σχέση ανάμεσα στο δίκτυο ινών κολλαγόνου, στις πρωτεογλυκάνες, στα άλλα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της υγρής φάσης, υπαγορεύουν τη μηχανική του συμπεριφορά. Το πιο σημαντικό ωστόσο είναι ότι ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος στα πλαίσια μίας εξίσου φυσιολογικής μηχανικής φόρτισης, εξασφαλίζει το περιβάλλον για τη βέλτιστη ισορροπία ανάμεσα στις αναβολικές και καταβολικές δραστηριότητες των χονδροκυττάρων.

ΣΤΙΒΑΔΕΣ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

Διακρίνονται λειτουργικά, τέσσερις ανατομικές στιβάδες ανάμεσα στον αρθρικό χόνδρο και το υποχόνδριο οστό (**Εικόνα 5**), εξαιτίας των μορφολογικών διαφορών των χονδροκυττάρων και της θεμέλιας ουσίας [37,38]. Οι τέσσερις αυτές στιβάδες ή ζώνες είναι οι εξής: η επιπολής ή επιφανειακή στιβάδα (superficialtangentialzone), η μεταβατική στιβάδα (middleortransitionalzone), η μέση (ακτινωτή) ή εν τω βάθει στιβάδα (deeorradialzone) και η ζώνη ασβεστοποίησης ή στιβάδα επασβεστωμένου χόνδρου (calcifiedcartilagezone).



Εικόνα 5: Στιβάδες αρθρικού χόνδρου.

Η επιπολής ή επιφανειακή στιβάδα, το πάνω μέρος της οποίας αποτελεί την αρθρική επιφάνεια, είναι λεία και συνεχής. Τα χονδροκύτταρα είναι πεπλατυσμένα και οργανώνονται μέσα στη θεμέλια ουσία χωρίς σημάδια πολλαπλασιασμού και αποτελούν τα χονδροκύτταρα που συνθέτουν τον μόνιμο χόνδρο. Οι ίνες κολλαγόνου είναι λεπτότερες και λιγότερες απ' ότι στις βαθύτερες ζώνες και έχουν προσανατολισμό παράλληλο με την αρθρική επιφάνεια. Το πάχος αυτής

της ζώνης είναι ίσου με 10%-20% του συνολικού πάχους του αρθρικού χόνδρου [37].

Η μεταβατική στιβάδα, περιλαμβάνει πιο σφαιρικά χονδροκύτταρα και ακτινωτές δέσμες παχύτερων ινιδίων κολλαγόνου με τυχαίο προσανατολισμό. Το πάχος αυτής της ζώνης είναι ίσο με 40%-60% του συνολικού [37].

Στη μέση ακτινωτή ή εν τω βάθει στιβάδα, τα χονδροκύτταρα είναι ελλειψοειδή με τον μεγάλο άξονά τους κάθετο στην αρθρική επιφάνεια. Οι δέσμες των ινιδίων κολλαγόνου είναι ακόμα παχύτερες και ακτινικά προσανατολισμένες και κάθετες προς το οστό. Το πάχος αυτής της ζώνης είναι ίσο με το 30% του συνολικού [37].

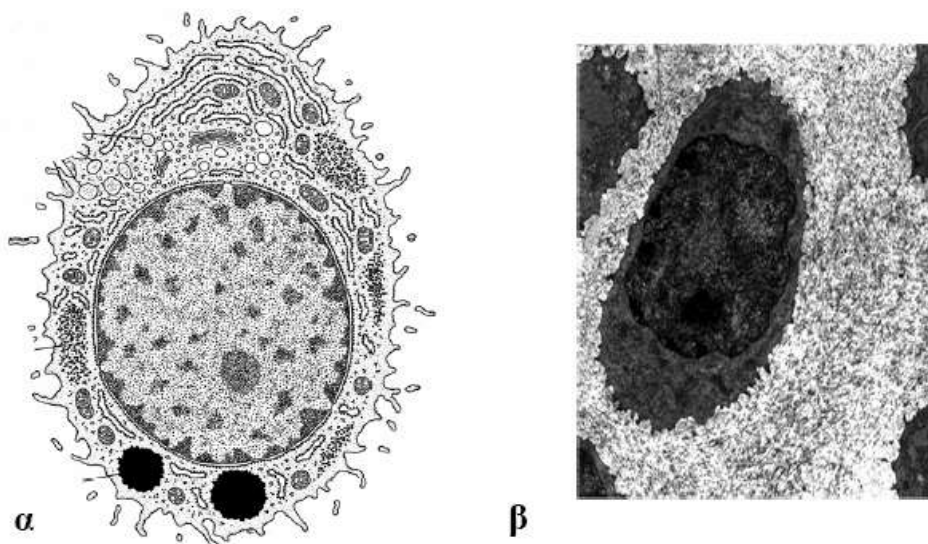
Τέλος, η ζώνη ασβεστοποίησης βρίσκεται πριν το υποχόνδριο οστό και αποτελεί το σύνορο μεταξύ χόνδρου και υποχόνδριου οστού. Περιέχει υπερτροφικά χονδροκύτταρα που εκφράζουν κυρίως κολλαγόνο X, οι ίνες του οποίου είναι προσανατολισμένες ακτινικά και στηρίζονται μέσα στο υποχόνδριο οστό [37].

Συνεπάγεται από τη μορφολογία των τεσσάρων στιβάδων, ότι τα χονδροκύτταρα σε κάθε στιβάδα ή ζώνη διαφέρουν όχι μόνο στο σχήμα, το μέγεθος και τον προσανατολισμό σε σχέση με την αρθρική επιφάνεια αλλά και ως προς τις μεταβολικές τους δραστηριότητες καθώς υπάρχουν διαφορές στη δομή της θεμέλιας ουσίας και στα ινίδια του κολλαγόνου [39]. Συμπεραίνεται, ότι η διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου εξαρτάται εν μέρει και από τη διαφοροποίηση των διαφορετικών φαινοτυπικά χονδροκυττάρων.

ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Πρόκειται για τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα μεσεγγυματικής προέλευσης, τα οποία δεν διαιρούνται περαιτέρω σε φυσιολογικές συνθήκες [40], αποτελώντας τα μόνιμα κύτταρα του χόνδρου [35]. Ευθύνονται τόσο για τη διατήρηση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του, όσο και για την αναδιαμόρφωση του σε καταστάσεις βλάβης.

Παρά το γεγονός, ότι χονδροκύτταρα από διαφορετικές στοιβάδες του αρθρικού χόνδρου διαφέρουν σε σχήμα, μέγεθος και πιθανόν στη μεταβολική δραστηριότητα [39], εμφανίζουν τα παρακάτω γενικά χαρακτηριστικά: είναι μεγάλα κύτταρα με στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα, που περικλείεται από πυρηνικό περίβλημα (**Εικόνα 6**). Περιέχουν όλα τα κοινά κυτταρικά συστατικά κυρίως αυτά που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση ή την αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας, όπως λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και λυσοσωμάτια. Επίσης περιέχουν μιτοχόνδρια, γλυκογόνο, εκκριτικά κυστίδια.



Εικόνα 6: Χονδροκύτταρο (α), στρογγυλός ή ωοειδής πυρήνας με πυρηνικό περίβλημα, λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή

Golgi, λυσοσωμάτια, μιτοχόνδρια, ενδοκυτοπλασματικά ινίδια, λιπίδια, γλυκογόνο και εκκριτικά κυστίδια.

Βρίσκονται σε συνεχή επικοινωνία με τη θεμέλια ουσία και τα συστατικά της αλλά και με το ευρύτερο περιβάλλον τους μέσω υποδοχέων που διαθέτουν στην κυτταρική επιφάνειά τους. Μεταξύ των υποδοχέων συγκαταλέγονται ιντεγκρίνες, υποδοχείς για κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, για τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [40], ιστικές ορμόνες αλλά και υποδοχείς διαμεσολαβητές φλεγμονής και ανοσοσφαιρινών και με τον τρόπο αυτό αντιλαμβάνονται και αντιδρούν σε αλλαγές του περιβάλλοντος τους [41]. Τα ίδια τα χονδροκύτταρα επίσης έχουν την ικανότητα να παράγουν αρκετούς από αυτούς τους παράγοντες ως απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα.

Διαβιούν σε ένα περιβάλλον εξαιρετικά χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και εξαρτώνται από αναερόβιο μεταβολισμό (κυρίως τα χονδροκύτταρα των βαθύτερων στιβάδων). Σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων, η ισορροπία αερόβιας και αναερόβιας μεταβολικής οδού διαταράσσεται με αποτέλεσμα τα κύτταρα, ακόμα και της επιφανειακής ζώνης που εμφανίζουν χαμηλό αερόβιο μεταβολισμό, να εξαρτώνται αποκλειστικά από αναερόβια αναπνοή και μεταβολισμό και να είναι πιθανή η επικείμενη καταστροφή τους.

Γενικά, εμφανίζουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα αλλά η συνολική μεταβολική δραστηριότητα δείχνει χαμηλή εξαιτίας της μικρής τους κυτταρικής πυκνότητας. Γι αυτό το λόγο αναφέρεται ότι βρίσκονται εντός ενός ηρεμούντος ιστού.

ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ (ECM)

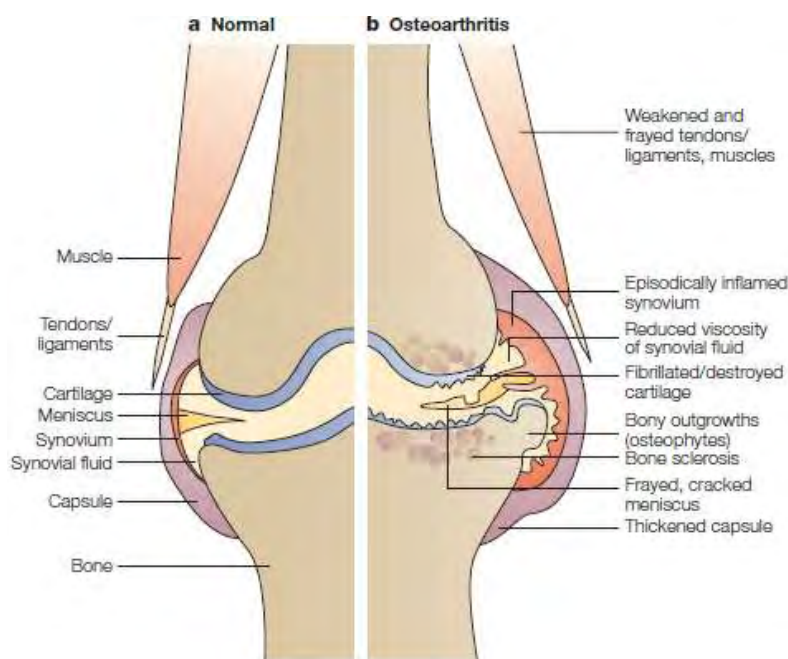
Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του αρθρικού χόνδρου έχει μηχανική και βιολογική δράση. Εξασφαλίζει ομοιομερή κατανομή των φορτίων της άρθρωσης σε όλη την έκταση του αρθρικού χόνδρου, προσδίδει στον αρθρικό χόνδρο σταθερότητα, ευκαμψία, ελαστικότητα και επιτρέπει την ομαλή κίνηση των αρθρικών επιφανειών με πολύ χαμηλό συντελεστή τριβής (30% μικρότερο από την πιο τέλεια τεχνητή άρθρωση) [35]. Σχετικά με τη βιολογική της δράση, προστατεύει τα χονδροκύτταρα, παρέχοντάς τους ωστόσο και τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το υγρό περιβάλλον και να μεταβάλλουν τη λειτουργία τους ανάλογα με τις εκάστοτε μεταβολές του, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της δομής του χόνδρου [42].

Εκτός από νερό, όπως προαναφέρθηκε αποτελείται από αέρια, μικρομόρια πρωτεϊνών, μεταβολίτες και υψηλή συγκέντρωση κατιόντων για να εξισορροπεί τις αρνητικά φορτισμένες και υδρόφιλες πρωτεογλυκάνες. Η ποσότητά του εξαρτάται από την κατάσταση φόρτισης και από την παρουσία ή μη εκφυλιστικών αλλοιώσεων [28,43].

Οι εμβιομηχανικές ιδιότητες του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου διασφαλίζονται από το μακρομοριακό δίκτυο της θεμέλιας ουσίας, το οποίο παράγεται από τα χονδροκύτταρα, είναι ανομοιογενές και τα κυριότερα συστατικά είναι το δίκτυο ινιδίων κολλαγόνου με κυριότερο εκπρόσωπο το κολλαγόνο τύπου II και τις πρωτεογλυκάνες με κυριότερη την αγκρεκάνη (AGC). Προσδίδουν στον αρθρικό χόνδρο αντοχή σε δυνάμεις εφελκυσμού και ακαμψία αντίστοιχα [32]. Επιπλέον συστατικά αποτελούν οι μη κολλαγονικές πρωτεΐνες και οι γλυκοπρωτεΐνες. Το δίκτυο των μακρομορίων της μεσοκυττάριας ουσίας αποτελεί το 20-40% του συνολικού βάρους του αρθρικού χόνδρου [28,42].

Ο ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ ΣΤΗΝ ΟΑ

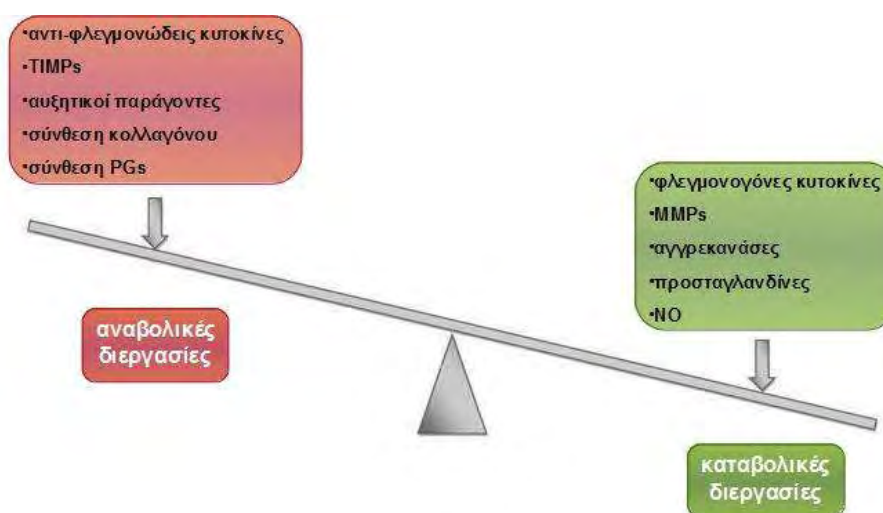
Η ΟΑ χαρακτηρίζεται κυρίως από τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, αλλά αλλοιώσεις υφίστανται σταδιακά και οι υπόλοιποι ιστοί της άρθρωσης με αποτέλεσμα την υπερτροφία του υποχόνδριου οστού και το σχηματισμό οστεοφύτων, νέου οστού στις παρυφές της άρθρωσης, την ανάπτυξη φλεγμονής στον αρθρικό υμένα (υμενίτιδα), το μειωμένο ιξώδες του αρθρικού υγρού, η πάχυνση του αρθρικού θύλακα, ο εκφυλισμός του μηνίσκου και η ατροφία των τενόντων και των μυών της άρθρωσης [28,29,34]



Εικόνα 7. Οι ιστοί μίας φυσιολογικής άρθρωσης και μίας άρθρωσης που έχει προσβληθεί από ΟΑ. a) Οι ιστοί μιας φυσιολογικής άρθρωσης, b) Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε μια ΟΑ άρθρωση: ο ινιδισμός του χόνδρου, ο σχηματισμός οστεοφύτων και η σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, η υμενίτιδα, το μειωμένο ιξώδες του αρθρικού υγρού, η πάχυνση

του αρθρικού θύλακα, ο εκφυλισμός του μηνίσκου και η βλάβη των τενόντων και των μυών.

Η παθολογία της ΟΑ διέπεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και των καταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε όλη την άρθρωση, ιδιαιτέρως του αρθρικού χόνδρου, και δευτερογενώς την ανάπτυξη φλεγμονωδών αλλοιώσεων κυρίως στον αρθρικό υμένα, αλλά και στο χόνδρο [33]. Η παθογένειά της δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων εμβιομηχανικών, βιοχημικών και γενετικών παραγόντων.



Εικόνα 8. Στον αρθρικό χόνδρο, τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και των καταβολικών διεργασιών, συμβάλλοντας στην ομοιοστασία του ιστού. Στην ΟΑ, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται με αποτέλεσμα η «ζυγαριά» να γέρνει τελικά προς τον καταβολισμό και να οδηγεί στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

Η παθοφυσιολογία του αρθρικού χόνδρου στην ΟΑ

Οι πρώιμες αλλοιώσεις που υφίσταται ο αρθρικός χόνδρος στην ΟΑ είναι το οίδημα λόγω αυξημένης εισροής νερού και ο σχηματισμός ινώδους χόνδρου (fibrillation) στην αρθρική επιφάνεια λόγω εκφυλισμού του κολλαγόνου II. Μακροσκοπικά, οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται ως διόγκωση και απώλεια της λείας επιφάνειας του ιστού. Στη συνέχεια, οι ρωγμές επεκτείνονται προς τις βαθύτερες στιβάδες του ιστού με εκτεταμένη αποικοδόμηση της ECM του και αλλαγές στις βιο-μηχανικές του ιδιότητες. Στα μεταγενέστερα στάδια της νόσου παρατηρείται υπερτροφία του ιστού που συνοδεύεται από εναπόθεση ιόντων μετάλλων, κυρίως ασβεστίου, και διείσδυση αιμοφόρων αγγείων από το υποχόνδριο οστό. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι αλλοιώσεις αυτές που υφίσταται ο αρθρικός χόνδρος στην ΟΑ και οι υποβόσκοντες μηχανισμοί προσομοιάζουν τις διαδικασίες και τους μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα στη διαδικασία της **ενδοχόνδριας οστεοποίησης** κατά το σχηματισμό των μακρών οστών στην εμβρυογένεση. Τα τελικά στάδια της νόσου χαρακτηρίζονται από πλήρη απώλεια του αρθρικού χόνδρου και έκθεση του υποχόνδριου οστού στην αρθρική επιφάνεια [13-18].

Η διαδικασία του εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου στην ΟΑ μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις, αν και τα όριά τους δεν είναι απόλυτα σαφή. Αρχικά, ο ιστός υφίσταται κάποιες μεταβολές ή τραυματισμό, που τα χονδροκύτταρα προσπαθούν να επιδιορθώσουν ενισχύοντας το μεταβολισμό τους και τις αναβολικές διεργασίες (αναβολική φάση). Παρόλο που οι προσπάθειες επιδιόρθωσης του ιστού από τα χονδροκύτταρα μπορούν να επιβραδύνουν την πρόοδο της νόσου για αρκετά χρόνια, τα κύτταρα της επιφανειακής στιβάδας ιδιαίτερα δεν μπορούν να αντισταθμίσουν πλήρως την απώλεια της ECM. Τελικά, η

αποικοδόμηση της ECM λόγω της αυξημένης έκφρασης και ενεργοποίησης των πρωτεολυτικών ενζύμων υπερτερεί των προσπαθειών ανασύστασης του αρθρικού χόνδρου με αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της ECM του ιστού στα τελευταία στάδια της νόσου (καταβολική φάση) [16,19,20].

1.3 Οστεοαρθρίτιδα και παράγοντες κινδύνου

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μια συχνή, συσχετιζόμενη με την ηλικία, διαταραχή των αρθρώσεων. Χαρακτηρίζεται από εντοπισμένες περιοχές απώλειας και καταστροφής του αρθρικού χόνδρου, σχηματισμό νέου οστού στις αρθρικές επιφάνειες (οστεόφυτα), μεταβολές των οστών κάτω από τους χόνδρους, ποικίλου βαθμού ήπια αρθρίτιδα και πάχυνση του αρθρικού υμένα (ΕΙΚΟΝΑ9). Η ΟΑ κλασικά κατατασσόταν στις μη φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων. Ωστόσο, είναι πλέον προφανής η παρουσία συγκεκριμένων δεικτών φλεγμονής και στην ΟΑ, καθιστώντας έτσι και τη φλεγμονή ως ένα ακόμα χαρακτηριστικό της ΟΑ. Η χρήση της μαγνητικής τομογραφίας (MRI) και της αρθροσκόπησης έχει κάνει σαφές το γεγονός ότι οι οστεοαρθρικές μεταβολές μιας άρθρωσης δεν καθορίζονται αποκλειστικά και μόνο από αλλοιώσεις που παρατηρούνται στις απλές ακτινογραφίες.

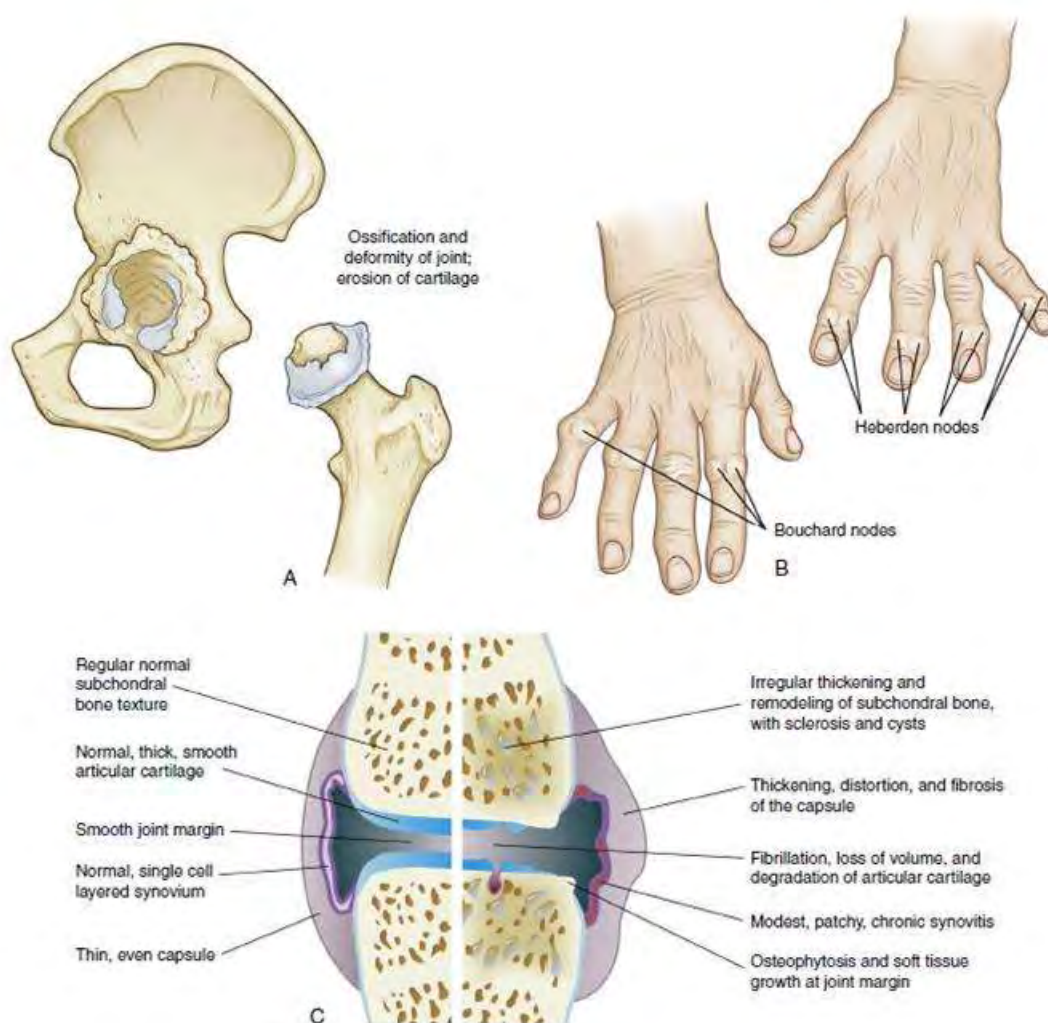
Η ακριβής αιτία της ΟΑ δεν είναι γνωστή, αν και συνήθως αφορά περιοχές που δέχονται αυξημένη καταπόνηση. Η φυσική πορεία της νόσου περιλαμβάνει την στένωση των μεσάρθριων διαστημάτων λόγω της απώλειας του χόνδρου, την ανάπτυξη οστεοφύτων και αρκετές φορές μεταβολές στο υποχόνδριο οστό. Η εμφάνισή της σπανίζει σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών, αλλά η επίπτωση της ΟΑ αυξάνεται με την ηλικία. Η χαμηλού βαθμού φλεγμονή, η ασβεστοποίηση του αρθρικού χόνδρου, οι γενετικές τροποποιήσεις και οι μεταβολικές διαταραχές σε συνδυασμό με την συμμετοχή μεταγραφικών παραγόντων, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, matrix molecules, και ενζύμων επηρεάζουν την εμφάνιση και εξέλιξη της ΟΑ (44,45). Η ΟΑ γενικά προσβάλλει τόσο περιφερικές όσο και σε εγγύτερες αρθρώσεις του ανθρώπου (ισχία, άκρες χείρες, γόνατα και σπονδυλική στήλη). Τέλος

έχει παρατηρηθεί ότι με την πάροδο της ηλικίας, η ποιότητα και η ποσότητα των πρωτεογλυκανών στους χόνδρους ελαττώνεται ανάλογα με την ένταση της ΟΑ.

Η ΟΑ μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε κατάσταση η οποία προσβάλλει άμεσα το χόνδρο μιας άρθρωσης, ή υποβάλλει τις αρθρικές επιφάνειες καθώς και το υποκείμενο οστό σε χρόνια, εκτεταμένη ή ασυνήθιστη καταπόνηση προκαλώντας αστάθεια στην άρθρωση. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΟΑ αποτελούν οι παρακάτω:

1. Τραυματισμοί, και ιδιαίτερα το διάστρεμμα, η τάση, ή εξάρθρωση και τα κατάγματα.
2. Μακροχρόνια μηχανική καταπόνηση των αρθρώσεων, που συχνά συσχετίζεται με τον αθλητισμό, τους χορευτές/-ριες μπαλέτου ή με επαναλαμβανόμενες φυσικές δραστηριότητες σε παχύσαρκα άτομα.
3. Η παρουσία φλεγμονής στις διάφορες αρθρικές δομές, κατά τη διάρκεια της οποίας τα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνουν ένζυμα ικανά να καταστρέψουν τα χονδροκύτταρα.
4. Η αστάθεια μιας άρθρωσης, η οποία προκαλείται από προσβολή των υποστηρικτικών δομών της άρθρωσης, όπως είναι ο αρθρικός υμένας, οι σύνδεσμοι και οι τένοντες.
5. Νευρολογικές διαταραχές (π.χ. η διαβητική νευροπάθεια, η αρθροπάθεια Charcot) στις οποίες ο πόνος και η ιδιοδεκτικότητα είναι μειωμένα ή έχουν εξαφανιστεί, αυξάνοντας έτσι την τάση για ανάπτυξη μη φυσιολογικής κίνησης, τοποθέτησης και στήριξης του βάρους του σώματος.
6. Συγγενείς ή επίκτητες σκελετικές δυσπλασίες.
7. Αιματολογικές ή ενδοκρινικές διαταραχές, όπως η αιμορροφιλία, η οποία προκαλεί χρόνια αιμορραγία εντός της άρθρωσης ή ο υπερπαραθυρεοειδισμός, ο οποίος προκαλεί απώλεια οστικής μάζας.
8. Τα φάρμακα (π.χ. κολχικίνη, ινδομεθακίνη, στεροειδή) τα οποία επάγουν τη δραστηριότητα ενζύμων που αποδομούν το κολλαγόνο στην αρθρική μεμβράνη.
9. Η παχυσαρκία.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες μεταβάλλουν τον αρθρικό χόνδρο με τέτοιο τρόπο ώστε επιταχύνουν το ρυθμό απώλειας του τελευταίου (46).



Εικόνα 9 : Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ). Α. Αρθρικός Χόνδρος και εκφύλιση της άρθρωσης του ισχίου, επαγόμενη από την ΟΑ. Β. Οζίδια Heberden και Bouchard. C. Χαρακτηριστικά ΟΑ: φυσιολογική vs οστεοαρθριτικής άρθρωσης.

1.4 Στοιχεία Ανατομίας και Ιστολογίας

Για την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της οστεοαρθρίτιδας κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν τα βασικά ανατομικά στοιχεία των αρθρώσεων καθώς και η φυσιολογική διεργασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης.

A. Βασική Ανατομία των αρθρώσεων

Τα οστά συναρμολογούνται ή έρχονται πολύ κοντά μεταξύ τους στις αρθρώσεις, οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό της επιτρεπόμενης κίνησης μεταξύ των οστών της άρθρωσης. Έτσι λοιπόν, εκείνες στις οποίες τα οστά συντάσσονται στενά μεταξύ τους ονομάζονται συναρθρώσεις, ενώ εκείνες οι αρθρώσεις στις οποίες είναι ελεύθερα να αρθρώνονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται μεγάλο εύρος κινήσεων, χαρακτηρίζονται ως διαρθρώσεις.

Υπάρχουν τρεις τύποι συναρθρώσεων ανάλογα με το είδος του ιστού που επιτελεί τη συνένωση:

1. **Συνοστέωση**: δεν επιτρέπονται καθόλου ή σχεδόν καθόλου κινήσεις, ο δε ιστός που γεφυρώνει την άρθρωση αποτελείται από οστόν (π.χ. τα οστά του κρανίου στην ενήλικα).
2. **Συγγόρδωση**: επιτρέπονται μικρές κινήσεις, ο δε ιστός που γεφυρώνει την άρθρωση είναι υαλοειδής χόνδρος (π.χ. η άρθρωση της πρώτης πλευράς με το στήθος).
3. **Συνδέσμιση**: επιτρέπονται μικρές κινήσεις, τα δε οστά συνδέονται με πυκνό συνδετικό ιστό (π.χ. ηβική σύμφυση).

Η πλειονότητα των αρθρώσεων των άκρων είναι διαρθρώσεις. Τα οστά που σχηματίζουν τέτοιου είδους αρθρώσεις καλύπτονται από εναπομείναντα **υαλοειδή χόνδρο** ή **αρθριτικό χόνδρο**(articular cartilage). Συνήθως τα οστά της άρθρωσης διατηρούνται σε επαφή χάρη στους συνδέσμους, ενώ η άρθρωση περιβάλλεται από τον **αρθρικό θύλακο**(joint capsule). Ο εν λόγω θύλακος αποτελείται από μία έξω **ινώδη στιβάδα**(fibrous layer) πυκνού συνδετικού ιστού, ο οποίος συνέχεια με το περίοστεο των οστών, και μία έσω κυτταροβριθή στιβάδα, την **υμενώδη στιβάδα**(synovial layer), η οποία καλύπτει όλες τις μη αρθρικές επιφάνειες. Μερικοί την αποκαλούν **υμενώδες έλυτρο**(synovial membrane) (Εικόνα 10).

Δύο είδη κυττάρων εντοπίζονται στην υμενώδη στιβάδα, τα κύτταρα τύπου A και τύπου B. Τα κύτταρα τύπου A, είναι μακροφάγα και

παρουσιάζουν καλώς ανεπτυγμένη συσκευή Golgi καθώς επίσης πολλά λυσοσώματα, αλλά μικρή μόνο ποσότητα αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (RER). Τα εν λόγω φαγοκυτταρικά κύτταρα είναι επιφορτισμένα με την απομάκρυνση νεκρωμένων στοιχείων από το χώρο της άρθρωσης. Τα κύτταρα τύπου Β μοιάζουν με ινοβλάστες, διαθέτουν καλώς ανεπτυγμένο RER και πιστεύεται ότι είναι αυτά τα οποία εκκρίνουν το αρθρικό υγρό (47).

Τέλος, κάθε άρθρωση φέρει επιπλέον επικουρικές δομές απαραίτητες για την σωστή λειτουργία των επιμέρους αρθρώσεων. Τέτοιες δομές είναι

1. οι σύνδεσμοι (απαραίτητοι για τη σταθερότητα και για τον καθορισμό της κινητικότητας μιας άρθρωσης),
2. οι αρθρικοί δίσκοι ή αρθρικοί μηνίσκοι (αποτελούνται από κολλαγόνο συνδετικό ιστό, ο οποίος περιέχει και ινώδη χόνδρο. Επηρεάζουν την κατεύθυνση της κίνησης, εξασφαλίζουν καλή επαφή μεταξύ των κινούμενων μοιρών της διάρθρωσης και μετά από τραυματισμό μπορούν είτε να αναγεννηθούν είτε να αφαιρεθούν χειρουργικά),
3. επιχείλιοι χόνδροι (αποτελούμενοι από κολλαγόνο συνδετικό ιστό, διασπειρόμενοι από χονδροκύτταρα) (Εικόνα 11)



Εικόνα 10: Βασικά ανατομικά στοιχεία μιας διάρθρωσης



Εικόνα 11 : Απεικόνιση των βασικών ανατομικών δομών της άρθρωσης του γόνατος

1.5Επιδημιολογία

Στο γενικό πληθυσμό, η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια νόσο που οδηγεί σε σημαντική νοσηρότητα και αναπηρία, ειδικά όσον αφορά τους ηλικιωμένους. Αποτελεί την κύρια ένδειξη για αρκετές χιλιάδες χειρουργείων αντικατάστασης σε γόνατο και ισχίο, που πραγματοποιούνται κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. Για το λόγο αυτό έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια όσον αφορά στη βελτίωση της κατανόησης της επιδημιολογίας αυτής της οντότητας, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης των παραγόντων κινδύνου που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΟΑ, και ειδικά όταν πρόκειται για αναστρέψιμους και τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου.

Όπως έγινε αντιληπτό, αρκετοί είναι οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΑ, όπως η ηλικία, το φύλο, οι τραυματισμοί των αρθρώσεων και η παχυσαρκία. Αν και οι κλινικές εκδηλώσεις της ΟΑ μπορούν να ξεκινήσουν ήδη από την 4^η δεκαετία της ζωής, είναι προφανές το γεγονός ότι η επίπτωσή της αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας. Επιπλέον, οι γυναίκες στις δεκαετίες των 50, 60 και 70 ετών

έχουν μεγαλύτερη επίπτωση OA στις άκρες χείρες και στα γόνατα σε σχέση με τους άντρες. Η OA στους μαύρους είναι πιο έντονη και έχει μεγαλύτερη νοσηρότητα από ότι στους λευκούς. Η γενετική πιθανώς παίζει κάποιο ρόλο στην αύξηση της επιρρέπειας ορισμένων αρθρώσεων στην νόσο. Η επίδραση της γενετικής στην εμφάνιση της νόσου είναι σημαντική και συνήθως ειδική για κάποια άρθρωση. Για παράδειγμα, η OA του ισχίου φαίνεται να εμφανίζεται σε ορισμένες οικογένειες πιο συχνά, ενώ στις ίδιες οικογένειες φαίνεται ότι δεν προσβάλλονται με την ίδια συχνότητα άλλες αρθρώσεις.

Ο τραυματισμός στοιχείων μιας άρθρωσης, όπως για παράδειγμα του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου ή το σχίσσιμο ενός μηνίσκου στο γόνατο, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης OA στην συγκεκριμένη άρθρωση με την πάροδο των χρόνων. Τυχαίοι και συχνά ασυμπτωματικοί τραυματισμοί των μηνίσκων είναι συνηθισμένοι σε μεσήλικες και σε ηλικιωμένα άτομα, άνδρες και γυναίκες, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης OA στο γόνατο. Οι παχύσαρκες γυναίκες και άνδρες έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης OA γονάτων και μέτριο κίνδυνο για OA ισχίων. Αυτήν η αύξηση στην επίπτωση της OA προκαλείται κυρίως λόγω του αυξημένου φορτίου-βάρους που καλούνται να αντέξουν οι αρθρώσεις των παχύσαρκων ατόμων και ειδικά για τις γυναίκες ο κίνδυνος αυτός είναι ευθέως ανάλογος προς το επίπεδο της παχυσαρκίας. Όσον αφορά στην OA του γόνατος, η απώλεια βάρους στους μεσήλικες μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης OA (48).

1.6 Παθοφυσιολογία

Η πρωτοπαθής βλάβη στην OA είναι η απώλεια του αρθρικού χόνδρου. Νωρίς στην πορεία της νόσου, ο αρθρικός χόνδρος χάνει τη γυαλιστερή επιφάνειά του και γίνεται κίτρινος-γκρι ή καφέ-γκρι σε χρώμα. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, αποπίπτουν οι επιφανειακές περιοχές του αρθρικού χόνδρου και τα βαθύτερα στρώματα αναπτύσσουν επιμήκεις ρωγμές (fibrillation). Ο χόνδρος λεπτύνεται και σε μερικές περιοχές μπορεί να εξαφανιστεί τελείως, αφήνοντας το υποκείμενο οστό απροστάτευτο. Κατά αυτό τον τρόπο το οστό μετατρέπεται σε σκληρωτικό (πυκνότερο και σκληρότερο). Επίσης, μερικές φορές σχηματίζονται κύστεις στο

υποχόνδριο οστό οι οποίες επικοινωνούν με τις επιμήκειες ρωγμές των χόνδρων. Η πίεση των κύστεων αυτών αυξάνεται συνεχώς μέχρι το κυστικό περιεχόμενο να αναγκαστεί να μεταφερθεί εντός της αρθρικής κοιλότητας, διαπερνώντας τον αρθρικό χόνδρο. Καθώς ο αρθρικός χόνδρος διαβρώνεται, συχνά αναπτύσσονται οστεόφυτα καλυμμένα από χόνδρο, εξορμούμενα από το υποκείμενο οστό, αλλάζοντας έτσι το περίγραμμα του οστού και την ανατομία της άρθρωσης. Αυτές οι σαν αιχμές οστικές προεκβολές μεγαθύνονται συνεχώς, μέχρι που αποκολλώνται (jointmice) και ελευθερώνονται μέσα στην αρθρική κοιλότητα. Αν λοιπόν τα θραύσματα των οστεοφύτων προσβάλλουν την αρθρική μεμβράνη, τότε θα προκληθεί φλεγμονή του αρθρικού υμένα και διόγκωση της άρθρωσης. Ο αρθρικός θύλακος επίσης παχύνεται και μερικές φορές προσκολλάται στο μετασχηματισμένο υποκείμενο οστό, γεγονός που οδηγεί σε περιορισμό της κινητικότητας της άρθρωσης (Εικόνα 9).

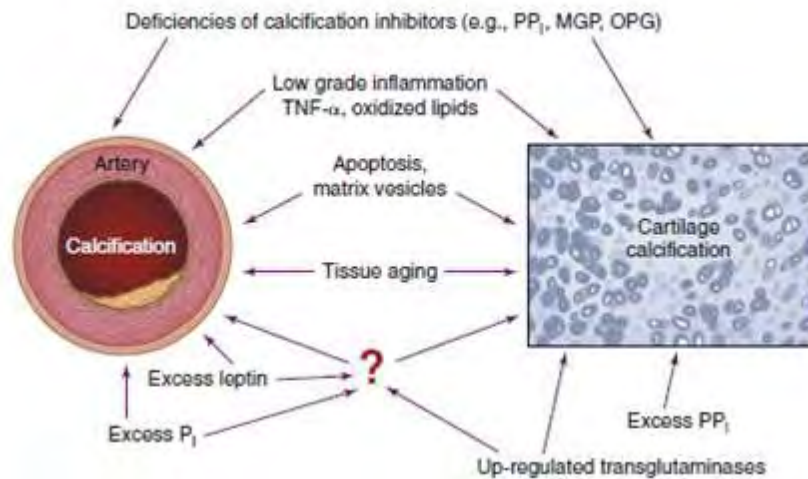
1.7 Καταβολισμός του χόνδρου

Ο αρθρικός χόνδρος καταστρέφεται μέσω ενός καταρράκτη ενεργοποίησης κυτοκινών και αναβολικών αυξητικών παραγόντων (46). Ενζυμικές διαδικασίες, και ειδικά αυτές που περιλαμβάνουν ματριξ μεταλλοπρωτεϊνάσες, αποδομούν τα μακρομόρια των πρωτεογλυκανών, γλυκοζαμινογλυκανών και του κολλαγόνου σε μεγάλα διαχεόμενα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα χονδροκύτταρα και πέπτονται από τα λυσοσωματικά ένζυμα των κυττάρων αυτών. Η απώλεια των πρωτεογλυκανών από τον αρθρικό χόνδρο αποτελεί τη βάση της εξέλιξης της οστεοαρθριτικής διεργασίας.

Η ενζυμική καταστροφή του αρθρικού χόνδρου ξεκινά στη «μήτρα» με καταστροφή των πρωτεογλυκανών και των ινών κολλαγόνου. Διάφορα ένζυμα και κυρίως η στρωμαλυσίνη και οι ματριξ μεταλλοπρωτεάσες(κολλαγενάση), προσβάλλουν τις πρωτεογλυκάνες παρεμβαίνοντας στη δομή σύνδεσης των υπομονάδων ή των συσσωμάτων των πρωτεογλυκανών. Τα επίπεδα αυτών των ενζύμων είναι ιδιαίτερα αυξημένα στην ΟΑ. Αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεογλυκανών διαταράσσουν τη λειτουργία αντλίας η οποία ρυθμίζει την ανταλλαγή ύδατος και αρθρικού υγρού εντός και εκτός του αρθρικού χόνδρου. Χωρίς τη ρυθμιστική δράση της αντλίας πρωτεογλυκανών, ο

χόνδρος απορροφά υπερβολική ποσότητα υγρών και αδυνατεί πλέον να αντισταθμίσει τις πιέσεις που δημιουργούνται κατά την συγκράτηση βάρους. Επίσης με την πάροδο της ηλικίας, η συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών μειώνεται και το περιεχόμενο του χόνδρου σε νερό μπορεί να αυξηθεί μέχρι και κατά 8%, επηρεάζοντας την ισχύ του χόνδρου. Άτομα με ΟΑ, ακόμα και αυτά με αρκετά εκτεταμένη καταστροφή χόνδρου, έχουν αυξημένα επίπεδα πρωτεογλυκανών ή θραυσμάτων αυτών στο αρθρικό υγρό, ευρήματα μάλλον ενδεικτικά μιας περισσότερο εκτεταμένης επιδιορθωτικής φάσης. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-1 και ο TNF, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του χόνδρου εν μέρει μέσω της επαγωγής της αυξημένης παραγωγής της συνθετάσης του νιτρικού οξέος (iNOS) και του νιτρικού οξέος (NO). Οι κυτοκίνες απελευθερώνουν και ενεργοποιούν ένζυμα πρωτεολυτικά και αποδόμησης του κολλαγόνου, προκαλώντας διαταραχή της ισορροπίας των κυτταρικών αποκρίσεων στη δράση των αυξητικών παραγόντων (52).

Η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ (53). Μερικά από τα ένζυμα που αποδομούν το κολλαγόνο (π.χ. οι χημειοκίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες) παράγονται από τον αρθρικό υμένα. Η απόπτωση των χονδροκυττάρων είναι αυξημένη στον οστεοαρθρικό χόνδρο και σχετίζεται άμεσα με την εναπόθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Το NO διεγείρει την απόπτωση των χονδροκυττάρων. Η επακόλουθη καταστροφή του χόνδρου ενεργοποιεί τα φλεγμονώδη μονοπάτια της IL-1 β και του TNF- α . Γενετικά ελλείμματα της αναστολής της ασβεστοποίησης επίσης συμβάλλουν στην εξέλιξη της προχωρημένης ασβεστοποίησης (Εικόνα 12). Η αποδόμηση του κολλαγόνου καταστρέφει τα ινίδια που προσδίδουν στον αρθρικό χόνδρο την ικανότητα εφελκυσμού και έτσι εκθέτει τα χονδροκύτταρα στη μηχανική καταπόνηση και στη δράση των λυτικών ενζύμων. Κατά αυτόν τον τρόπο, ξεκινά ένας φαύλος κύκλος καταστροφής που περιλαμβάνει όλα τα συστατικά του αρθρικού χόνδρου – πρωτεογλυκάνες, ίνες κολλαγόνου και χονδροκύτταρα.



Εικόνα 12 : Πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί ασβεστοποίησης αρτηριών και χόνδρου. MGP, Matrix GLA-protein; OPG, osteoprotegerin; Pi, inorganic phosphate; PPi, inorganic pyrophosphate. (From Rutsch F, Terkeltaub R (2005): *Joint Bone Spine* 72, p110-118)

1.8 Κλινικές εκδηλώσεις

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΟΑ τυπικά εμφανίζονται κατά την πέμπτη και έκτη δεκαετία της ζωής, αν και ασυμπτωματικές μεταβολές των αρθρικών επιφανειών συχνά παρατηρούνται από την ηλικία των 40 ετών. Πόνος και δυσκαμψία σε μία ή περισσότερες αρθρώσεις, συνήθως σε αυτές που καταπονούνται περισσότερο λόγω βάρους ή λόγω υπερβολικής χρήσης, αποτελούν τα πρώτα συμπτώματα της νόσου. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι ο αρθρικός πόνος ο οποίος εμφανίζεται κατά την ξεκούραση σε αρθρώσεις που καταπονούνται καθημερινά. Η κλινική εξέταση μπορεί να αναδείξει γενικευμένη προσβολή τόσο περιφερικών όσο και εγγύτερων αρθρώσεων. Οι πιο συχνά προσβαλλόμενες περιφερικές αρθρώσεις είναι αυτές των άκρων χειρών, οι καρποί, τα γόνατα και οι άκρες πόδες. Οι πιο συχνά κεντρικές προσβαλλόμενες αρθρώσεις είναι η αυχενική και η οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, οι ώμοι και τα ισχία.

Το άλγος και η δυσκαμψία αποτελούν τα κυρίαρχα συμπτώματα της ΟΑ. Άλλα συμπτώματα αποτελούν η διόγκωση, το αίσθημα τάσης και η μεγέθυνση ή παραμόρφωση των αρθρώσεων. Τα παραπάνω συμπτώματα

συνήθως επιδεινώνονται με την κόπωση των προσβεβλημένων αρθρώσεων, ενώ βελτιώνονται με την ξεκούραση. Αρκετές είναι οι φορές που ο πόνος μπορεί να αντανακλά σε άλλο μέρος του σώματος. Για παράδειγμα, η ΟΑ της οσφυϊκής μοίρας μπορεί να μιμηθεί την ισχιαλγία, προκαλώντας έντονο άλγος στην οπίσθια επιφάνεια των γλουτών κατά μήκος της πορείας του ισχιακού νεύρου. Επίσης η ΟΑ της αυχενικής μοίρας μπορεί να προκαλέσει βραχιόνιο νευραλγία (άλγος στο άνω άκρο) επιδεινούμενη με την κίνηση του αυχένα. Τέλος, η ΟΑ του ισχίου μπορεί να προκαλεί πόνο ο οποίος ακτινοβολεί στους γλουτούς, το μηρό και το γόνατο.

Οι ακριβείς μηχανισμοί των αρθραλγιών δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις. Οι υποχόνδριες οστικές μεταβολές, η καταπόνηση λόγω βάρους και η δράση των φλεγμονωδών μεσολαβητών μπορεί να αποτελούν πηγές αρθραλγιών στην ΟΑ (48,49). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει ακόμα ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της απεικονιστικής εμφάνισης της ΟΑ και της έντασης του πόνου στα προσβεβλημένα άτομα [50]. Η διάταση των δομών της άρθρωσης και κυρίως της αρθρικής κάψας, η οποία παρέχει άφθονη νεύρωση στην άρθρωση, μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη δημιουργία του πόνου. Επιπλέον, η φλεγμονή της αρθρικής κάψας προκαλεί συρρίκνωση του ινώδους ιστού της, με αποτέλεσμα η κίνηση της άρθρωσης σε οποιοδήποτε επίπεδο να προκαλεί επώδυνη διάταση των δομών της άρθρωσης (Εικόνα 13).

Η προέλευση της δυσκαμψίας των προσβεβλημένων αρθρώσεων δεν είναι ακριβής. Η αρθρική δυσκαμψία ορίζεται ως δυσκολία στην έναρξη της κίνησης της άρθρωσης, ακινησία ή απώλεια του εύρους της κίνησης. Η έκταση της εκφύλισης του χόνδρου μπορεί επίσης να περιορίσει το εύρος της κίνησης ως ένα βαθμό. Η δυσκαμψία συχνά παρατηρείται όταν ξεκινά η κίνηση της άρθρωσης και υφίεται μετά από 30 περίπου λεπτά κατά μέσο όρο. Η διόγκωση και διεύρυνση των ορίων της άρθρωσης, που κοινώς αποκαλείται διόγκωση της άρθρωσης, μπορεί να προκληθεί από τη μεγέθυνση των οστών ή λόγω παραγωγής οστεοφύτων. Τέτοιου είδους αρθρικές διογκώσεις όταν εμφανίζονται στα δάκτυλα αποκαλούνται οζίδια Heberden (στις άνω μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις) ή Bouchard (στις εγγύς μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις). Διόγκωση επίσης παρατηρείται όταν

φλεγμονώδες εξίδρωμα ή αίμα εισέρχεται στην αρθρική κοιλότητα, αυξάνοντας τοιουτοτρόπως την ποσότητα του αρθρικού υγρού. Αυτή η κατάσταση που καλείται αρθρική συλλογή, προκαλείται από (1) την παρουσία θραυσμάτων οστεοφύτων στην αρθρική κοιλότητα, (2) την παροχέτευση των αρθρικών κύστεων ή (3) οξύ τραύμα αρθρικών δομών, οδηγώντας σε αιμορραγία και συλλογή υγρού εντός της αρθρικής κοιλότητας[49-51, 54, 55].

Η μη φυσιολογική ευθυγράμμιση του γόνατος (ραιοβότητα ή βλαιοβότητα μεγαλύτερες των πέντε μοιρών) έχει φανεί να επιταχύνει την ανάπτυξη ΟΑ [56]. Επίσης διαταραχές κατά τη βάδιση μπορεί να συμβάλλουν στην μη φυσιολογική ευθυγράμμιση της άρθρωσης του γόνατος.



Εικόνα 13 : Πιθανή αιτία του πόνου στην Οστεοαρθρίτιδα

1.9Εργαστηριακά Ευρήματα

Στην κλινική πρακτική δεν υπάρχουν συγκεκριμένες εργαστηριακές εξετάσεις οι οποίες να επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ΟΑ. Παρόλα αυτά, ενδείκνυται η διενέργεια του ελέγχου ρουτίνας όπως είναι η γενική αίματος και ο προσδιορισμός δεικτών φλεγμονής (ΤΚΕ, CRP) καθώς και αυτοαντισωμάτων (ρευματοειδής παράγοντας και αντιπυρηνικά αντισώματα), κυρίως όταν υπάρχει η υπόνοια φλεγμονώδους αρθροπάθειας, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οπότε και υπάρχει διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα. Αν οι προσβεβλημένες αρθρώσεις είναι

οι τυπικές για την ΟΑ (όπως οι άπω μεσοφαλαγγικές, εγγύς μεσοφαλαγγικές και οι καρπομετακάρπιες) και τα συμπτώματα από τις αρθρώσεις σχετίζονται με την άσκηση και την κούραση, πιθανώς η διενέργεια των παραπάνω ορολογικών εξετάσεων δεν θεωρείται απαραίτητη. Ωστόσο, αν η κλινική εικόνα ταιριάζει με ρευματοειδή αρθρίτιδα (προσβολή καρπών, πρωινή δυσκαμψία για 30-60 λεπτά), οι εξετάσεις αίματος έχουν μεγάλη διαγνωστική αξία, καθώς σε αντίθεση με την ΟΑ, οι φλεγμονώδεις αρθροπάθειες έχουν συνήθως αυξημένους δείκτες φλεγμονής και συχνά πτώση του αιματοκρίτη[50, 52, 58].

1.10 Απεικονιστικά Ευρήματα

Οι απεικονιστικές μέθοδοι μπορούν να επιβεβαιώσουν τη διάγνωση της ΟΑ. Σε έναν μεγαλύτερης ηλικίας ασθενή, με οστική διόγκωση περί την άρθρωση στην κλινική εξέταση και πόνο που σχετίζεται με τη δραστηριότητα, οι ακτινογραφίες μπορεί να μην είναι απαραίτητες για να μπει η διάγνωση. Τα χαρακτηριστικά απεικονιστικά ευρήματα της ΟΑ αποτελούν η στένωση του αρθρικού διαστήματος, τα οστεόφυτα, οι υποχόνδριες κύστες και η οστική σκλήρυνση (ΕΙΚΟΝΕΣ). Αν και η μαγνητική τομογραφία μπορεί να αναδείξει χαρακτηριστικά ευρήματα ΟΑ, αυτά δεν είναι ειδικά καθώς αποτελούν συχνό εύρημα σε άτομα μεγάλης ηλικίας, γεγονός που καθιστά την MRI μια δοκιμασία μικρής διαγνωστικής αξίας όσον αφορά στην ΟΑ (Εικόνες 14-16)[49-51].



Εικόνα 14 : Απλή Ακτινογραφία άκρας χείρας ενδεικτική ΟΑ των εγγύς και άπω μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων και της πρώτης καρπομετακάρπιας άρθρωσης. Παρατηρείται στένωση των αρθρικών διαστημάτων των μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων, συγκριτικά με τις μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις, καθώς επίσης και οστική σκλήρυνση σε όλες τις προσβεβλημένες αρθρώσεις (έντονο λευκό χρώμα γύρω από τις αρθρώσεις).



Εικόνα 15 : Οστεοαρθρίτιδα γόνατος με μετρίου βαθμού στένωση του αρθρικού διαστήματος και οστεόφυτα.



Εικόνα 15 : Οστεοαρθρίτιδα δεξιού ισχίου. Παρατηρείται στένωση του αρθρικού διαστήματος στο ανώτερο τμήμα της δεξιάς άρθρωσης, συγκρινόμενο με το αντίστοιχο τμήμα της αριστερής.

1.11 Εκτίμηση και Θεραπεία

Η εκτίμηση της ΟΑ είναι τόσο κλινική όσο και απεικονιστική (απλή ακτινογραφία, αξονική τομογραφία, αρθροσκόπηση και μαγνητική τομογραφία). Η θεραπεία βασίζεται στην ένταση των συμπτωμάτων. Η έρευνα συνεχίζεται όσον αφορά στην αξία της χρήσης διαφόρων βιοδεικτών οι οποίοι θα επιτρέψουν τη συντομότερη ανίχνευση και παρακολούθηση της εξέλιξης της ΟΑ [52]. Η συντηρητική θεραπεία περιλαμβάνει την ξεκούραση των προσβεβλημένων αρθρώσεων μέχρι να υποχωρήσει η φλεγμονή, αν και όποτε είναι παρούσα, τη συμμετοχή σε αερόβια γυμναστικά προγράμματα και ασκήσεις βελτίωσης του εύρους της κίνησης, προκειμένου να προληφθεί η συρρίκνωση του αρθρικής κάψας, τη χρήση μαστουριού ή πατερίτσας για την αποφυγή της επιβάρυνσης, την απώλεια βάρους σε περιπτώσεις παχυσαρκίας και τη θεραπεία με αναλγητικά ή και αντιφλεγμονώδη φάρμακα ώστε να περιοριστεί ο πόνος και η διόγκωση [59]. Άλλες εναλλακτικές θεραπείες, όπως τα μαγνητικά βραχιόλια και ο βελονισμός ίσως να βελτιώνουν τα συμπτώματα σε μερικές μόνο περιπτώσεις καθώς επίσης και οι ενδοαρθρικές ενέσεις διαφόρων ουσιών όπως το υαλουρονικό οξύ. Νέες τεχνολογίες συμπεριλαμβανομένης της μηχανικής των ιστών είναι πολλά υποσχόμενες όσον αφορά την αναστροφή των εκφυλιστικών αλλαγών της άρθρωσης.

Η χειρουργική παρέμβαση χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της κινητικότητας της άρθρωσης, τη διόρθωση της παραμόρφωσης ή της όποιας παρεκτόπισης ή ακόμα και για τη δημιουργία νέας άρθρωσης με τη βοήθεια τεχνητών προθέσεων.

1.12 Γενετική και επιγενετική

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πολλοί είναι οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας, ανάμεσα σε αυτούς είναι και η γενετική προδιάθεση. Παρόλα αυτά, οι μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεια και την εξέλιξη της νόσου δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί. Ο ολόενα και

αυξανόμενος αριθμός μελετών σχετικά με την ΟΑ οδήγησε στην ενοχοποίηση επιγενετικών παραγόντων ως υπεύθυνων στην εμφάνιση της νόσου [60]. Η επιγενετική αναφέρεται στην ύπαρξη κληρονομήσιμων φαινοτυπικών αλλαγών χωρίς μεταβολές στις αλληλουχίες του DNA. Από τις πιο χαρακτηριστικές επιγενετικές τροποποιήσεις είναι η μεθυλίωση του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και τα non-codingRNAs. Ως ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς της επιγενετικής, η ακετυλιωτική τροποποίηση των ιστονών ελέγχεται από ακετυλοτρανσφεράσεσιςτωνών (HATs) και απακετυλάσες ιστονών (histone deacetylases - HDACs). Πιστεύεται ότι η απουσία ακετυλίωσης θα μπορούσε να συμπιέσει τη δομή της χρωματίνης, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων.

1.13 Ο ρόλος της απόπτωσης στην ΟΑ

Η απόπτωση είναι μια ισχυρά ελεγχόμενη, ενεργητική διαδικασία κυτταρικού θανάτου η οποία συμμετέχει στην εξέλιξη, την ομοιοστασία και στην γήρανση. Η απορρύθμιση της απόπτωσης οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος, οι αναπτυξιακές ανωμαλίες και οι εκφυλιστικές ασθένειες. Η οστεοαρθρίτιδα, καθώς αποτελεί την πιο κοινή χρόνια ασθένεια των αρθρώσεων στον ηλικιωμένο κυρίως πληθυσμό, χαρακτηρίζεται από προοδευτική καταστροφή του αρθρικού χόνδρου, που έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλο βαθμού αναπηρία. Δεδομένου ότι ο αρθρικός χόνδρος εξαρτάται αποκλειστικά από τα δικά του κύτταρα, τα χονδροκύτταρα, για τη διατήρηση της εξωκυττάριας μήτρας, ο συμβιβασμός της λειτουργίας και επιβίωσης των χονδροκυττάρων θα οδηγούσε στην αποτυχία της λειτουργίας του αρθρικού χόνδρου. Ο ρόλος του υποχόνδριου οστού στη διατήρηση της κατάλληλης χόνδρινης μήτρας έχει επίσης μελετηθεί, και συνεπώς έχει προταθεί ότι τόσο ο αρθρικός χόνδρος όσο και το υποχόνδριο οστό αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας και της φυσιολογίας της άρθρωσης. Μερικοί ερευνητές λαμβάνουν υπόψη τους και τα δύο αυτά στοιχεία ως στόχο για την επιδιόρθωση της εκφύλισης της άρθρωσης. Σε περιπτώσεις ΟΑ τελικού σταδίου, ο χόνδρος γίνεται ελλιπής σε κύτταρα, και συχνά συνοδεύεται από κενοτοπιώδες άδειασμα, το οποίο έχει θεωρηθεί ως στοιχείο το

γεγονότος ότι ο θάνατος των χονδροκυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο της εξέλιξης της ΟΑ. Η απόπτωση σίγουρα συμβαίνει στον οστεοαρθρικό χόνδρο, ωστόσο η σχετική συνεισφορά της απόπτωσης των χονδροκυττάρων στην παθογένεια της ΟΑ είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, και έτσι προκύπτουν αντιφατικά δεδομένα όσον αφορά στο ρυθμό των αποπτωτικών χονδροκυττάρων στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Δεν είναι σαφές ακόμα το εάν η απόπτωση των χονδροκυττάρων είναι αυτή η οποία επάγει την εκφύλιση του χόνδρου ή αν πρόκειται για κάποιο παραπροϊόν της χόνδρινης καταστροφής. Ο θάνατος των χονδροκυττάρων και η απώλεια της μήτρας μπορεί να οδηγήσει σε ένα φαύλο κύκλο, όπου η εξέλιξη της μιας κατάστασης να επιδεινώνει και την άλλη, και η βιβλιογραφία αποκαλύπτει ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό της καταστροφής του χόνδρου και στην απόπτωση των χονδροκυττάρων. Καθώς οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΟΑ στοχεύουν μόνο στην επούλωση των συμπτωμάτων και δεν προλαμβάνουν ούτε θεραπεύουν την ΟΑ, η απόπτωση των χονδροκυττάρων θα μπορούσε να είναι ένας πολύτιμος στόχος για τη ρύθμιση της εκφύλισης του χόνδρου[74].

1. Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια οστεοποίηση σε ιστούς οστεοαρθριτικής άρθρωσης. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του κατά πόσο δύο γονίδια, το HDAC4 και ο VEGF, μεταβάλλουν την έκφραση τους σε ιστούς αρθρώσεων ασθενών με οστεοαρθρίτιδα προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή συμμετοχή των παραπάνω γονιδίων στην πρόκληση, εξέλιξη και πορεία της οστεοαρθρίτιδας καθώς και η πιθανή χρήση των δεδομένων αυτών για την ανάπτυξη νέων, μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Οι δύο αυτοί παράγοντες επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα και αποτελούν ιδιαίτερο αντικείμενο ενδιαφέροντος και μελέτης του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας[74-84], όπου και πραγματοποιήθηκε η εν λόγω εργασία.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 20 δείγματα χόνδρου, υμένα και αρθρικού υγρού από ασθενείς και 16 δείγματα από υγιείς ανθρώπους. Οι ασθενείς έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα και τα δείγματα προέκυψαν από το χειρουργείο στο οποίο υποβλήθηκαν.

Διαδικασία καθαρισμού και καλλιέργειας κυττάρων από τους ιστούς

Οι ιστοί αφού απομονωθούν από το χειρουργείο διατηρούνται σε φυσιολογικό ορό με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία. Στην συνέχεια προστίθεται το ένζυμο προνάση έτσι ώστε να σπάσουν οι πρωτεογλυκάνες αρχικά μαζί με θρεπτικού υλικό στα sixwellplates και μετά τα δείγματα επώάζονται σε κλίβανο για 45 λεπτά. Αναλυτικότερα γίνεται η απομόνωση του εκφυλισμένου χόνδρου, υμένα και μηνίσκου. Στον μηνίσκο προτιμάται η περιοχή από τη μέση που είναι πιο σκληρός και δεν έχει υμένα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε sixwellplate. Σε κάθε sixwellplate προστίθονται 200μl του ενζύμου προνάση και 2ml θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί η επώαση στον κλίβανο για 45 λεπτά στους 37°C. Σε περίπτωση που τα δείγματα περιέχουν αίμα πραγματοποιείται ξέπλυμα με PBS ενώ αν δεν υπάρχει αίμα τα δείγματα τοποθετούνται σε φυσιολογικό ορό για να διατηρηθούν. Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού υλικού που περιέχει προνάση και προστίθεται κολλαγενάση με σκοπό να σπάσει το κολλαγόνο. Προστίθεται ξανά θρεπτικό υλικό και τα δείγματα επώάζονται στον κλίβανο overnight.

Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται ανάδευση των sixwellplate και τα δείγματα μπαίνουν σε falcon των 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' με προσθήκη θρεπτικού υλικού στις 3500 στροφές σε θερμοκρασία 25 βαθμών κελσίου. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται PBS ώστε να ξεπλυθούν. Απομακρύνεται το PBS και προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι τελικό όγκο 5ml. Για κάθε falcon χρησιμοποιούνται 5 φλάσκες και σε κάθε φλάσκα μπαίνουν περίπου 4ml θρεπτικό και 1 περίπου ml από το αντίστοιχο falcon. Στη συνέχεια

τοποθετούνται στον κλίβανο με ανοιχτό ελαφρά το καπάκι ώστε να αναπνέουν τα κύτταρα.

Παρασκευή θρεπτικού μέσου

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων παρασκευάστηκε με την ανάμιξη 50ml FBS με 500ml του μέσου DMMF12 καθώς και 5ml του αντιβιοτικού PS

Απομόνωση Ολικού RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA τα κύτταρα επώαστηκαν με θρυψίνη ώστε να ξεκολλήσουν από τις φλάσκες. Στην συνέχεια ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Φυγοκέντρηση στις 3500 ή 12000 στροφές για αποκόλληση των κυττάρων και μεταφορά σε falcon των 12ml. Απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα περιέχει τα κύτταρα.
- Προσθήκη 1-3ml τριζόλ ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων.
- Επώαση για 5' στους 15-30 βαθμούς κελσίου ή φύλαξη στους -80 βαθμούς κελσίου.
- Προσθήκη 0.2ml χλωροφορμίου για κάθε ml τριζολ που προστέθηκε παραπάνω.
- Καλή ανάδευση για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές για 15 λεπτά στους 2-8 βαθμούς κελσίου
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούργιο σωληνάριο.
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε ml τριζολ.
- Επώαση για 10 λεπτά στους 15-30 βαθμούς κελσίου.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 2-8 βαθμούς κελσίου.
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Ξέπλυμα του RNA με 1ml αιθανόλη 70%.
- Ανάδευση με vortex.
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για λίγη ώρα.

- Διάλυση του RNA σε ddH₂O και επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 βαθμούς κελσίου και τοποθέτηση στους -80 βαθμούς κελσίου.

Παρασκευή Gelαγαρόζης

Για την Παρασκευή gel αγαρόζης ακολουθείται η εξής διαδικασία. Στο μικρό φιαλίδιο 150ml τελικού όγκου προστίθενται: 8μl βρωμιούχο αιθίδιο, Tβ υγρό για να διαλυθεί η αγαρόζη 1χ (άρα για 1000ml αναμιγνύεται 100ml τβ και 900ml νερό).

Για 1% gel βάζω 1.5 gr DNA, για 2% 3gr DNA για 3% 4,5gr DNA.

Βάζουμε το gel σε φούρνο μικροκυμάτων στους 70 βαθμούς κελσίου για 10 λεπτά και αμέσως μετά το βρωμιούχο αιθίδιο. Στο τέλος το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι και αφήνεται να κρυώσει.

Αποκόλληση κυττάρων με θρυψίνη

Για την αποκόλληση των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Καθάρισμα με PBS τις φλάσκες και προσθήκη 1ml θρυψίνης με κλειστά καπάκια στον κλίβανο για 5-10 λεπτά ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα.
- Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο με κλειστά καπάκια όταν έχουν θρυψίνη.
- Προσθήκη περίπου 5πλάσιου όγκο της θρυψίνης θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τοποθέτησή τους σε falcon για φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις 2500 στροφές.
- Ξέπλυμα των falcon με PBS και εκ νέου φυγοκέντρηση για 7' σε θερμοκρασία δωματίου στις 2500 στροφές
- Μετά τη φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο και τα falcon στεγνώνονται μέχρι να παραμείνει μόνο το ίζημα
- Αποθήκευση στους -80 με τη μορφή pellet

Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

1^ο στάδιο

Στο πρώτο στάδιο για ένα δείγμα αναμιγνύθηκαν σε ένα eppendorf τα εξής:

Random primers 5μl

H₂O 3μl

RNA 3μl

Σε καθε eppendorf έχουμε 8μl.

Στη συνέχεια τα δείγματα μπήκαν για 10 λεπτά στο PCR σε πρόγραμμα Cdna 1

2ο στάδιο

Στο δεύτερο στάδιο για ένα δείγμα αναμιγνύθηκαν σε ένα eppendorf τα εξής:

5x buffer 4μl

MgCl₂ 2μl

dNTPs 2μl

DTT 2μl

Superscript 0.5 μl

Τα RNA που προκύπτουν αποθηκεύονται στους -80 βαθμούς κελσίου

Προσθέτω 10μl από το δεύτερο μιξ και βάζω PCR Cdna2

Real-TimePCR

Master mix : 7.5μl

Primer F : 0.5μl

Primer R : 0.5μl

H2O : 4.5μl

Cdna : 2μl

Απλή PCR

2X MgTaq2 mix :12.5μ;

PfF :0.5μl

PrF :0.5μl

H2O : 8.5μl

Στατιστική Ανάλυση

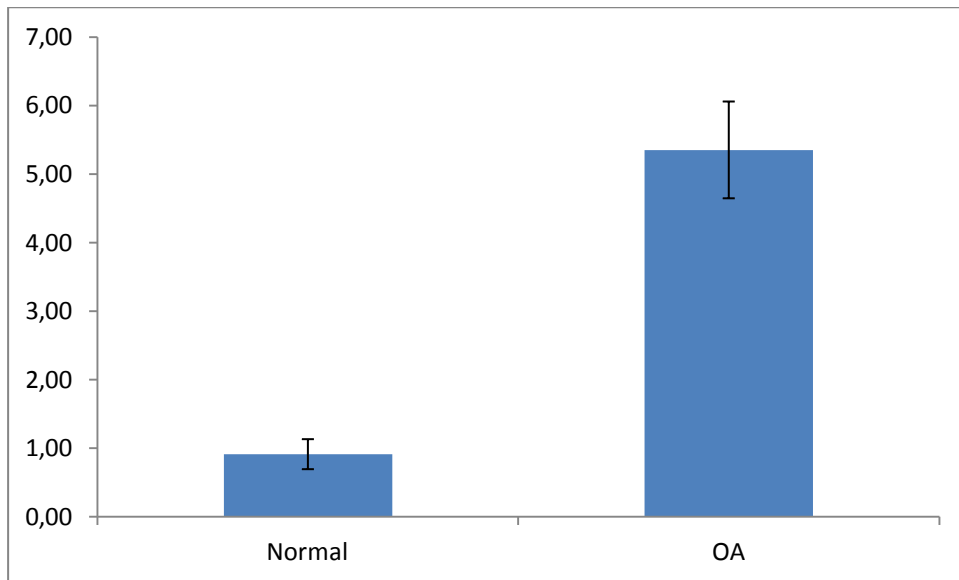
Τα αποτελέσματα προκύπτουν από μερική ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA με τη μέθοδο ΔΔct.

Έγινε υπολογισμός του λόγου για το καθένα mRNA προς το γονίδιο αναφοράς (HDAC4/GAPDH και VEGF/GAPDH) η οποία είναι η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου και στη συνέχεια υπολογίστηκε η απόλυτη τιμή. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS20.

3. Αποτελέσματα

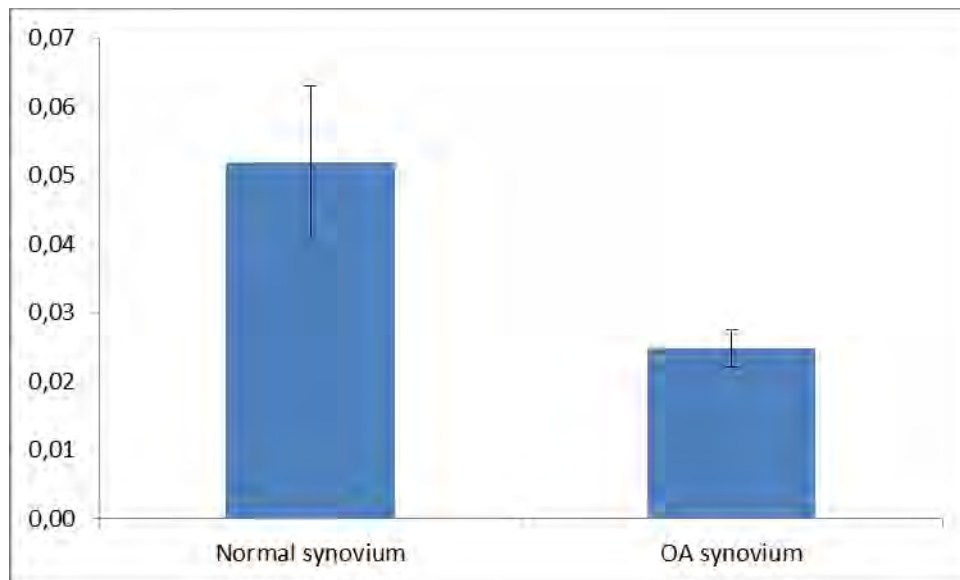
Αρχικά έγινε σύγκριση της έκφρασης του HDAC4 σε σχέση με το GAPDH (γονίδιο αναφοράς) σε χονδροκύτταρα από άρθρωση γόνατος φυσιολογικών-μαρτύρων και ασθενών με οστεοαρθρίτιδα. Από την παραπάνω σύγκριση προέκυψε ότι το γονίδιο του HDAC4 υπερκφράζεται από τα χονδροκύτταρα των ασθενών με ΟΑ σε σχέση με τους υγιείς. Τα εν λόγω δεδομένα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.

Διάγραμμα 1: Έκφραση του HDAC4 σε υγιείς και οστεοαρθρικές αρθρώσεις



Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της έκφρασης του VEGFAσε χονδροκύτταρα, όπου παρατηρήθηκε απουσία έκφρασής του. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε προσδιορισμό της έκφρασης του VEGFAαπό τα κύτταρα του αρθρικού υμένα παρατηρήθηκε ότι στην τελευταία περίπτωση υπήρχε έκφραση του VEGFA. Έπειτα, έγινε σύγκριση της έκφρασης του VEGFAσε σχέση με το GAPDH (γονίδιο αναφοράς) από άρθρωση γόνατος φυσιολογικών-μαρτύρων και ασθενών με οστεοαρθρίτιδα. Τα αντίστοιχα δεδομένα από αυτή την ανάλυση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.

Διάγραμμα 2: Έκφραση του VEGFAσε υγιείς και οστεοαρθρικές αρθρώσεις



4. Συμπεράσματα

Όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, το γονίδιο του HDAC4 υπερκφράζεται σε χονδροκύτταρα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, γεγονός που συμβαδίζει με τα δεδομένα από άλλες μελέτες, οι οποίες μάλιστα αναφέρουν ότι υπάρχει μεγαλύτερη έκφραση του HDAC4 σε πρώιμα στάδια της νόσου. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί, από το γεγονός ότι στα πρώιμα στάδια της νόσου ο καταβολισμός του χόνδρου είναι περισσότερο ενεργός σε σχέση με την ΟΑ τελικού σταδίου [85].

Όσον αφορά στην έκφραση του VEGFA, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε έκφρασή του από τα κύτταρα του χόνδρου, παρά μόνο από τα κύτταρα του αρθρικού υμένα. Ως γνωστόν, ο VEGF εκφράζεται κυρίως στην εμβρυική ζωή κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του αρθρικού χόνδρου, καθίσταται αδρανής στη λήξη και επανεκφράζεται σε ΟΑ ιστούς. Το ποσοστό των χονδροκυττάρων στα οποία αυξάνεται η έκφραση του VEGF αυξάνεται σημαντικά στα τελευταία στάδια της νόσου [72]. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα έκφρασής του από τα υμενοκύτταρα στη συγκεκριμένη μελέτη, ο VEGFA υποεκφράζεται σε σχέση με του υγιείς. Το γεγονός αυτό ίσως μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη το στάδιο της νόσου των ασθενών που μελετήθηκαν, υποθέτοντας ότι η πλειοψηφία αυτών βρισκόταν σε αρχικό στάδιο.

Αξίζει ακόμη να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, αφορούν μικρό αριθμό δειγμάτων που πιθανώς να μην είναι αντιπροσωπευτικά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gartner LP, Hiatt JL (2003). “ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ”. 2^η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., σ. 141-169
2. Gregoretti I, Lee Y-M, Goodson HV: Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004, 338(1):17–31.
3. De Ruijter A, Van Gennip A, Caron H, Kemp S, van Kuilenburg A: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003, 370:737–749.
4. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN: Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004, 119(4):555-566.
5. Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian L, Edwards DR, Cawston TE, Clark IM: Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther* 2005, 7(3):R503–R512.
6. Shimizu E, Selvamurugan N, Westendorf JJ, Olson EN, Partridge NC: HDAC4 represses matrix metalloproteinase-13 transcription in osteoblastic cells, and parathyroid hormone controls this repression. *J Biol Chem* 2010 285:9616–9626.
7. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH: Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12:963–973.
8. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum* 2009, 60:166–178.
9. Higashiyama R, Miyaki S, Yamashita S, Yoshitaka T, Lindman G, Ito Y, Sasho T, Takahashi K, Lotz M, Asahara H: Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2010, 20:11–17.
10. M. Murata, K. Yudoh, K. Masuko, (2008). “The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage”, *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 16, Issue 3, pp. 279–286

11. Steven R. Goldring, Mary B. Goldring, (2016). “Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk”, *Nature Reviews Rheumatology*, 12, pp.632-644, doi:10.1038/nrrheum.2016.148
12. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends in molecular medicine*. Apr 2005;11(4):186-191.
13. Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. Oct-Dec 2006;6(4):376-378.
14. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12 Suppl A:S31-33.
15. Ishiguro N, Kojima T, Poole AR. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya journal of medical science*. Nov 2002;65(3-4):73-84.
16. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Dec 2010;67(24):4197-4211.
17. Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis-lessons from developmental biology. *Nature reviews. Rheumatology*. 2011;7(11):654-663.
18. Tchetina EV. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis*. 2011;2011:683970.
19. Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. Jan 2011;7(1):50-56.
20. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures*. 2005;54:465-480.
21. Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *Veterinary journal*. Jul 2010;185(1):36-42.
22. Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, et al. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochemical Society symposium*. 2003(70):115-123.
23. Smith GN, Jr. The role of collagenolytic matrix metalloproteinases in the loss of articular cartilage in osteoarthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:3081-3095.
24. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine*. Feb 2001;33(1):7-21.

25. Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(1):203.
26. Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *The Journal of clinical investigation*. Dec 1992;90(6):2268-2277.
27. Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, et al. Cyclic tensile stretch loaded on bovine chondrocytes causes depolymerization of hyaluronan: involvement of reactive oxygen species. *Arthritis and rheumatism*. Nov 2003;48(11):3151-3158.
28. Oliviero F, Ramonda R, Punzi L. New horizons in osteoarthritis. *Swiss medical weekly*. 2010;140:w13098.
29. Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nature reviews. Drug discovery*. Apr 2005;4(4):331-344.
30. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and rheumatism*. Jan 2008;58(1):26-35.
31. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *The Journal of rheumatology*. Dec 2006;33(12):2507-2513.
32. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and rheumatism*. Aug 1998;41(8):1343-1355.
33. Baker JF, Walsh P, Mulhall KJ. Statins: a potential role in the management of osteoarthritis? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. Jan 2011;78(1):31-34.
34. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*. Dec 2007;213(3):626-634.
35. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *The New England journal of medicine*. Feb 23 2006;354(8):841-848.
36. Millennium WHOSGotBoMCatSotN. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organization technical report series*. 2003;919:i-x, 1-218, back cover.
37. Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL, et al. Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *The Journal of rheumatology*. Apr 1989;16(4):427-441.

- 38.Sowers MR, Karvonen-Gutierrez CA. The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*. Sep 2010;22(5):533-537.
- 39.Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. Apr 2008;22(2):351-384.
- 40.Kyle R Flik NV, Brian J Cole, Bernard R Bach, ed *Cartilage repair strategies: articular cartilage basics*. Williams RJ, ed.
- 41.RA S, ed *Morphology of cartilage*: San Diego: Academic Press; 1990. K IMAK, ed. *Methods in cartilage research*.
- 42.Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*. 1998;47:477-486.
- 43.Bullough PG, Jagannath A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Jan 1983;65(1):72-78.
- 44.Evangelou E et al, (2011).“Translation research in Europe applied technologies for osteoarthritis (TreatOA): meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22”,*Ann Rheum Dis*, 70 (2), pp. 349–355.
- 45.Heinegård D, Saxne T, (2010).“The role of cartilage matrix in osteoarthritis”,*Nat Rev Rheumatol*, 7 (1), pp. 50–56.
- 46.McCance K. (2014). “PATHOPHYSIOLOGY: THE BIOLOGIC BASIS FOR DISEASE IN ADULTS AND CHILDREN”,7th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc., pp.103-126.
- 47.Gartner LP, Hiatt JL (2003). “ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ”. 2^η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΗΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., σ. 141-169
- 48.Messier SP, Loeser RF, Miller GD, et al. “Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial”,*Arthritis Rheum*. 2004;50:1501. [PMID: 15146420] [Osteoarthritis Research Society International] <http://www.oarsi.org>
- 49.Abramson SB. Attur M. “Developments in the scientific understanding of osteoarthritis”, *Arthritis Res Ther*. 2009;11:227. [PMID: 19519925] [Arthritis Foundation] <http://www.arthritis.org>
- 50.Felson DT. “Clinical practice. Osteoarthritis of the knee”, *N Engl J Med*. 2006;354:841. [PMID: 16495390]

51. Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:203. [PMID:19232065] [Johns Hopkins Arthritis Center] <http://www.hopkins-arthritis.org>
52. Kapoor M et al, (2011). “Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis”, *Nat Rev Rheumatol*, 7, pp. 33–42.
53. Wu L et al, (2012). “Insights on biology and pathology of HIF-1 α /2 α , TGF β / BMP, Wnt/ β -catenin, and NF- κ B pathways in osteoarthritis”, *Curr Pharm Des*, 18 (22), pp. 3293–3312.
54. Neogi T, (2012). “Clinical significance of bone changes in osteoarthritis”, *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 4 (4), pp. 259–267.
55. Yusuf E et al, (2011). “Do knee abnormalities visualized in MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review”, *Ann Rheum Dis*, 70(1), pp. 60–67.
56. Schiphof D et al, (2012). “Factors for pain in patients with different grades of knee osteoarthritis”, *Arthritis Care Res (Hoboken)*.
57. Tanamas S et al, (2009). “Does knee malalignment increase the risk of development and progression of knee osteoarthritis? A systematic review”, *Arthritis Rheum*, 61 (4), pp. 459–466.
58. JCh Rousseau, Ganrero P, (2012). “Biological markers in osteoarthritis”, *Bone*, 51(2), pp. 265–277.
59. Hochberg MC et al, (2012). “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*, 64 (4), pp. 465–474.
60. Barter MJ, Bui C, Young DA: Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20(5):339–349.
61. Bird A: Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007, 447(7143):396–398.
62. Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 128(4):693–705.
63. Gregoret I, Lee Y-M, Goodson HV: Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004, 338(1):17–31.
64. De Ruijter A, Van Gennip A, Caron H, Kemp S, van Kuilenburg A: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003, 370:737–749.
65. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G,

- Olson EN: Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004, 119(4):555-566.
66. Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, Jones D, Kevorkian L, Edwards DR, Cawston TE, Clark IM: Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther* 2005, 7(3):R503–R512.
67. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN: Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004, 119:555–566.
68. Shimizu E, Selvamurugan N, Westendorf JJ, Olson EN, Partridge NC: HDAC4 represses matrix metalloproteinase-13 transcription in osteoblastic cells, and parathyroid hormone controls this repression. *J Biol Chem* 2010 285:9616–9626.
69. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH: Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12:963–973.
70. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum* 2009, 60:166–178.
71. Higashiyama R, Miyaki S, Yamashita S, Yoshitaka T, Lindman G, Ito Y, Sasho T, Takahashi K, Lotz M, Asahara H: Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2010, 20:11–17.
72. M. Murata, K. Yudoh, K. Masuko, (2008). “The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage”, *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 16, Issue 3, pp. 279–286
73. Steven R. Goldring, Mary B. Goldring, (2016). “Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk”, *Nature Reviews Rheumatology*, 12, pp.632-644, doi:10.1038/nrrheum.2016.148
74. Hyun Sook Hwang, Hyun Ah Kim, (2015). “Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis”, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, pp. 26035–26054; doi:10.3390/ijms161125943
75. van der Kraan PM, Berenbaum F, Blanco FJ, Cosimo de B, Lafeber F, Hauge E, Higginbottom A, Ioan-Facsinay A, Loughlin J, Meulenbelt I, Moilanen E, Pitsillidou I, Tsezou A, van Meurs J, Vincent T, Wittoek R, Lories R; EULAR Study group in OA: **Translation of clinical problems in**

osteoarthritis into pathophysiological research goals.
(http://www.eular.org/investigative_rheumatology_study_groups.cfm).

76. Michalitsis S, Hantes M, Thriskos P, Tsezou A, Malizos KN, Fezoulidis I, Vlychou M: "Articular cartilage status 2 years after arthroscopic ACL reconstruction in patients with or without concomitant meniscal surgery: evaluation with 3.0T MR imaging", *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017 Feb;25(2):437-444. doi: 10.1007/s00167-016-4153-7. Epub 2016 May 3.
77. Papathanasiou I, Michalitsis S, Hantes ME, Vlychou M, Anastasopoulou L, Malizos KN, Tsezou A. "Molecular changes indicative of cartilage degeneration and osteoarthritis development in patients with anterior cruciate ligament injury", *BMC Musculoskelet Disord.* 2016 Jan 13;17:21. doi: 10.1186/s12891-016-0871-8.
78. Tsolis KC, Bei ES, Papathanasiou I, Kostopoulou F, Gkretsi V, Kalantzaki K, Malizos K, Zervakis M, Tsezou A, Economou A. "Comparative proteomic analysis of hypertrophic chondrocytes in osteoarthritis", *Clin Proteomics.* 2015 Apr 25;12(1):12. doi: 10.1186/s12014-015-9085-6
79. Tsezou A. "Osteoarthritis year in review 2014: genetics and genomics", *Osteoarthritis Cartilage.* 2014 Dec;22(12):2017-24. doi: 10.1016/j.joca.2014.07.024. Epub 2014 Nov 22. Review.
80. Papathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. "Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes", *Arthritis Res Ther.* 2012 Apr 18;14(2):R82. doi: 10.1186/ar3805.
81. Nakajima M, Shi D, Dai J, Tsezou A, Zheng M, Norman PE, Chou CH, Lee MT, Hwang JY, Kim DH, Takahashi A, Ikegawa S, Jiang Q. "A large-scale replication study for the association of rs17039192 in HIF-2 α with knee osteoarthritis", *J Orthop Res.* 2012 Aug;30(8):1244-8. doi: 10.1002/jor.22063. Epub 2012 Jan 13
82. Iliopoulos D, Gkretsi V, Tsezou A. "Proteomics of osteoarthritic chondrocytes and cartilage", *Expert Rev Proteomics.* 2010 Oct;7(5):749-60. doi: 10.1586/epr.10.27. Review
83. Simopoulou T, Malizos KN, Poultsides L, Tsezou A. "Protective effect of atorvastatin in cultured osteoarthritic chondrocytes", *J Orthop Res.* 2010 Jan;28(1):110-5. doi: 10.1002/jor.20953.

84. Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. "Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention", *Ann Rheum Dis*. 2007 Dec;66(12):1616-21. Epub 2007 May 14.
85. Jingwei Lu, Ye Sun, Qiting Ge, Huajian Teng, Qing Jiang, (2014). "Histone deacetylase 4 alters cartilage homeostasis in human osteoarthritis", *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15, (438), doi: 10.1186/1471-2474-15-438