

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ»

ΤΣΟΥΜΠΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσέζου Ασπασία Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας..... (Επιβλέπουσα)

Τραχανά Βαρβάρα Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.....(Μέλος)

Δήμας Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.....(Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«THE ROLE OF INFLAMMASOME IN OSTEOARTHRITIS»**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019. Πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κυρίας Ασπασίας Τσέζου, καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην οποία οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της. Την ευχαριστώ θερμά για την κατανόηση και την καθοδήγησή της.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βαρβάρα Τραχανά, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και τον κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή και το χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ το Διευθυντή της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας Καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Μαλίζο, για τη διάθεση των δειγμάτων.

Ακόμη, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ευανθία Μουρμούρα για τη βοήθεια, τις συμβουλές και την ψυχολογική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, καθώς και τους συμφοιτητές μου Βασίλη Κοντελέ και Κλαίρη Κανίδου για τη συνεργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (OA), ή αλλιώς εκφυλιστική αρθρίτιδα, αποτελεί την πιο κοινή πάθηση των αρθρώσεων που πλήττει συνήθως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Πρόκειται για μία νόσο που επηρεάζει όλους τους ιστούς της άρθρωσης και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε άρθρωση με συχνότερες το ισχίο, το γόνατο, το χέρι και τη σπονδυλική στήλη. Η OA είναι μία πολυπαραγοντική ασθένεια στην εμφάνιση της οποίας συμβάλλουν τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί παράγοντες. Σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της διαδραματίζει η διαταραχή μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στον αρθρικό χόνδρο. Πιστεύεται ότι οι μεταβολικές αυτές αλλαγές συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της χρόνιας προ-φλεγμονώδους κατάστασης, λόγω γήρανσης ή τραυματισμού, και της ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων. Τα φλεγμονοσώματα είναι κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προκαλούν την ωρίμανση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, κυρίως των IL-18 και IL-1β, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης, ως απόκριση σε ποικιλία ερεθισμάτων.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε το φλεγμονόσωμα NLRP3 και ο ρόλος του στην OA. Για την υλοποίηση της έρευνας, χρησιμοποιήθηκαν 17 δείγματα από ασθενείς με OA που είχαν υποβληθεί σε ολική αρthroπλαστική γόνατος και 10 δείγματα από ασθενείς χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση λόγω σοβαρών τραυματισμών (ομάδα ελέγχου). Αφού τα δείγματα καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο, έγινε απομόνωση RNA και πρωτεϊνών και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *NLRP3*, *ASC*, *Casp-1* και των ιντερλευκινών *IL-18* και *IL-1β*, με τη μέθοδο Real-time PCR και Western blot, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των OA χονδροκυττάρων με siRNA προκειμένου να αδρανοποιηθεί το γονίδιο *NLRP3* και μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των προαναφερόμενων γονιδίων υπό αυτή τη συνθήκη.

Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των υπό μελέτη γονιδίων στα OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, έπειτα από την αδρανοποίηση του γονιδίου *NLRP3*, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα τριών από τα τέσσερα γονίδια που εξετάστηκαν στα OA χονδροκύτταρα που παρέμειναν με το siRNA για 48 ώρες σε σχέση με εκείνα που δε διαμολύνθηκαν με siRNA. Τέλος, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των

πρωτεϊνών που σχηματίζουν το φλεγμονόσωμα NLRP3 και ενεργοποίηση της ώριμης μορφής της κασπάσης-1 στα OA χονδροκύτταρα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν τη σημασία της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην παθογένεση της OA, ενώ ταυτόχρονα προτείνουν ότι η αναστολή συστατικών μορίων του θα μπορούσε, αν επιβεβαιωθεί και σε άλλες μελέτες, να αποτελέσει μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για τη νόσο.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA), or degenerative arthritis, is the most common joint disease that affects mainly the elderly. It is a disease that affects all joint tissues and may occur in any joint with most frequent occurrence in the hip, knee, hand and spine. OA is considered to be multifactorial and it involves both environmental and genetic factors. The disorder between anabolic and catabolic processes which occurs in the articular cartilage plays a crucial role in the early stages of its development. It is believed that these metabolic changes occur as a result of a chronic pro-inflammatory state, due to aging or injury, and activation of inflammasomes. Inflammasomes are cytoplasmic protein complexes that trigger the maturation and release of pro-inflammatory cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$ , via activated caspase-1, as a response to a variety of stimuli.

The aim of this study was to investigate the role of NLRP3 inflammasome in OA. We used 17 articular cartilage samples from osteoarthritic patients who were undergoing total knee replacement surgery and 10 samples from patients without history of joint disease who were undergoing surgery due to serious injury (control group). These samples were used for RNA and protein extraction followed by quantification of *NLRP3*, *ASC*, *Casp-1*, *IL-18* and *IL-1 $\beta$*  expression levels with Real-time PCR and Western blot, respectively. In addition, Real-time PCR were performed in order to determine these genes' expression levels after transfection of *NLRP3*-siRNA into OA chondrocytes.

Our results showed that the transcriptional levels of the four inflammasome-related genes were significantly increased in OA chondrocytes compared to normal ones. Moreover, there was a statistically significant decrease in the transcriptional levels in three of the four genes examined, after the inactivation of the *NLRP3* gene. Finally, with regard to protein expression levels, we observed increased levels of the proteins forming the NLRP3 inflammasome and activation of mature caspase-1 in OA chondrocytes. In conclusion, our results emphasize the importance of the NLRP3 inflammasome activation in the pathogenesis of OA and suggest that inhibition of its constituent molecules, if confirmed in other studies, may possibly represent a novel therapeutic approach for OA.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	1
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	7
A.1.1. Οστεοαρθρίτιδα: Γενικά χαρακτηριστικά	7
A.1.2. Επιδημιολογία	7
A.1.3. Παράγοντες κινδύνου	8
A.1.4. Παθοφυσιολογία	10
A.1.5. Διάγνωση και Θεραπεία	12
A.1.6. Κλινικοί φαινότυποι	13
A.1.7. Παράγοντες που συνεισφέρουν στην οστεοαρθρίτιδα	14
A.1.7.1. Γήρανση και φλεγμονή	14
A.1.7.2. Μεταβολικό Σύνδρομο	16
A.2.1. Φλεγμονόσωμα	17
A.2.2. Τύποι φλεγμονοσώματος και μηχανισμοί ενεργοποίησής τους	18
A.2.2.1. Το φλεγμονόσωμα NLRP1	19
A.2.2.2. Το φλεγμονόσωμα NAIP-NLRC4	20
A.2.2.3. Το φλεγμονόσωμα ALR AIM2	20
A.2.2.4. Το φλεγμονόσωμα NLRP3	20
A.2.3. Το φλεγμονόσωμα σε φυσιολογικές καταστάσεις	22
A.2.4. Το φλεγμονόσωμα σε παθολογικές καταστάσεις	23
A.3.1. Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυτοκινών στην ΟΑ	24
A.3.1.1. Η IL-1β στην ΟΑ	25
A.3.1.2. Η IL-18 στην ΟΑ	26
A.3.2. Ο ρόλος του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην ΟΑ	26
<b>B. ΣΚΟΠΟΣ</b>	28
<b>Γ.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	29
Γ.1.1. Συλλογή δειγμάτων	29
Γ.1.2. Κυτταροκαλλιέργειες	29
Γ.1.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων	30
Γ.1.2.2. Χώρισμα κυττάρων (Split)	31
Γ.1.2.3. Αποθήκευση κυττάρων	31
Γ.1.2.4. Απόψυξη κυττάρων	32

Γ.1.3. Απομόνωση RNA από κύτταρα .....	32
Γ.1.4. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	33
Γ.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) ...	35
Γ.1.6. Απομόνωση πρωτεϊνών .....	37
Γ.1.7. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford .....	38
Γ.1.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blot).....	38
Γ.1.8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου.....	39
Γ.1.8.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης .....	41
Γ.1.8.3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα και ανίχνευση πρωτεϊνών .....	41
Γ.1.9. Διαδικασία αδρανοποίησης του γονιδίου <i>NLRP3</i> (siRNA κατά <i>NLRP3</i> ) .....	43
Γ.1.10. Στατιστική ανάλυση .....	44
Γ.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
Γ.2.1. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων <i>NLRP3</i> και <i>ASC</i> σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα .....	45
Γ.2.1.1. Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου <i>NLRP3</i> .....	45
Γ.2.1.2. Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου <i>ASC</i> .....	46
Γ.2.2. Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της κασπάσης-1 .....	46
Γ.2.3. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων <i>IL-18</i> και <i>IL-1β</i> σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα .....	47
Γ.2.4. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων <i>NLRP3</i> , <i>ASC</i> , <i>IL-18</i> και <i>IL-1β</i> σε ΟΑ χονδροκύτταρα μετά από siRNA κατά <i>NLRP3</i> .....	47
Γ.2.4.1. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου <i>ASC</i> μετά από διαμόλυνση ΟΑ χονδροκυττάρων με siRNA έναντι του <i>NLRP3</i> .....	48
Γ.2.4.2. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>IL-18</i> και <i>IL-1β</i> μετά από διαμόλυνση ΟΑ χονδροκυττάρων με siRNA έναντι του <i>NLRP3</i> .....	49
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	56



## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A.1.1. Οστεοαρθρίτιδα: Γενικά χαρακτηριστικά**

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), γνωστή και ως εκφυλιστική αρθρίτιδα ή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, είναι η πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και αποτελεί την κύρια αιτία πόνου και αναπηρίας παγκοσμίως με σοβαρό κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο (Glyn-Jones et al., 2015) (O'Neill et al., 2018). Χαρακτηρίζεται από χρόνια προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου καθώς και μεταβολές σε όλους τους ιστούς των αρθρώσεων (Guilak et al., 2018). Πρόκειται δηλαδή για πάθηση ολόκληρης της άρθρωσης με εμπλεκόμενους όλους τους ενδοαρθρικούς ιστούς (αρθρικός χόνδρος, αρθρική μεμβράνη, μηνίσκος, σύνδεσμοι) και του υποχόνδριου οστού (Sandy et al., 2015). Επηρεάζει κυρίως άτομα μέσης και προχωρημένης ηλικίας, αλλά μπορεί να εκδηλωθεί και σε νεότερα άτομα ως αποτέλεσμα τραυματισμού ή καταπόνησης της άρθρωσης (Mobasheri et al., 2017). Η ΟΑ μπορεί να επηρεάσει οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος, ωστόσο είναι πιο συχνή στο ισχίο, στο γόνατο, στις αρθρώσεις των δακτύλων και στη σπονδυλική στήλη (O'Neill et al., 2018). Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι ο πόνος στις αρθρώσεις και η δυσκολία στην κίνηση (δυσκαμψία). Πολλοί ασθενείς, προκειμένου να αποφύγουν τον πόνο, ελαχιστοποιούν τις κινήσεις τους γεγονός που οδηγεί σε ατροφία μυών και χαλάρωση των συνδέσμων και επηρεάζει σημαντικά την καθημερινότητά τους (Uth & Trifonov, 2014). Ανάλογα με την αιτιολογία της, η ΟΑ ταξινομείται σε πρωτοπαθή/ιδιοπαθή εάν δεν υπάρχει αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία και δευτεροπαθής όταν υπάρχει υποκείμενη αιτία που πυροδοτεί την έναρξη της, συνήθως κάποιος τραυματισμός ή μηχανική καταπόνηση και ανατομικά κακή ευθυγράμμιση των άκρων (Mora et al., 2018).

### **A.1.2. Επιδημιολογία**

Η ΟΑ είναι η πιο κοινή πάθηση των αρθρώσεων και υπολογίζεται ότι επηρεάζει περίπου 250εκ. άτομα παγκοσμίως και πάνω από 27εκ. άτομα στις ΗΠΑ (Mora et al., 2018). Εκτιμάται ότι επηρεάζει το 10% των ανδρών και το 18% των γυναικών άνω των 60 ετών. Η επιδημιολογία της νόσου είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική με γενετικές, βιολογικές και βιοχημικές παραμέτρους, και διαφέρει ανάλογα με την άρθρωση που επηρεάζεται (Glyn-Jones et al., 2015). Δεδομένα από το Fallon Community Health Plan έδειξαν ότι μεταξύ ενηλίκων 20-89 ετών η συχνότητα εμφάνισης (κανονικοποιημένη ως προς την ηλικία και το φύλο) της ΟΑ γόνατος είναι

240/100000 άτομα/έτος, της ΟΑ ισχίου 88/100000 άτομα/έτος και των χεριών 100/100000 άτομα/έτος. Η συχνότητα αυξάνεται με την ηλικία και με μεγαλύτερο ρυθμό στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, ειδικότερα μετά την ηλικία των 50 ετών (O'Neill et al., 2018).

Συγκεκριμένα για την ΟΑ γόνατος, ο εκτιμώμενος κίνδυνος για ανάπτυξη της νόσου είναι περίπου 14%, κυμαινόμενος από 9,6% για τους μη παχύσαρκους άνδρες έως 23,8% για τις παχύσαρκες γυναίκες (Bortoluzzi et al., 2018).

Τέλος, από μελέτες διδύμων και οικογενειών προκύπτει ότι υπάρχει και επίδραση της γενετικής στην ΟΑ. Τα ποσοστά κληρονομικότητας ποικίλουν ανάλογα με την άρθρωση και εκτιμώνται σε ποσοστό 39% έως 65% για τα χέρια και το γόνατο, έως 60% για το ισχίο και 70% για τη σπονδυλική στήλη (O'Neill et al., 2018) (Bortoluzzi et al., 2018).

Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, ότι οι πληθυσμοί που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ είναι οι ηλικιωμένοι, οι γυναίκες, τα άτομα που πάσχουν από παχυσαρκία και οι Αφροαμερικάνοι (Mora et al., 2018). Δεδομένης της γήρανσης του πληθυσμού και της προοδευτικής αύξησης της παχυσαρκίας, ο αριθμός των προσβεβλημένων ατόμων από ΟΑ αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά μέσα στα επόμενα έτη (Mora et al., 2018) και εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 θα επιβαρύνει 67εκ. άτομα στις ΗΠΑ (Uth & Trifonov, 2014).

### **A.1.3. Παράγοντες κινδύνου**

Ένα σύνολο προδιαθεσιακών παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι δρουν συνεργιστικά συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου. Οι παράγοντες κινδύνου για την ΟΑ κατηγοριοποιούνται σε συστημικούς και τοπικούς εμβιομηχανικούς παράγοντες. Στους συστημικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η ηλικία, το φύλο, ο δείκτης μάζας σώματος, το γενετικό υπόβαθρο και η εθνικότητα, ενώ οι τοπικοί εμβιομηχανικοί παράγοντες αφορούν στη δομή, τον τραυματισμό ή την επιβάρυνση της άρθρωσης π.χ. λόγω επαγγέλματος ή φυσικής δραστηριότητας (O'Neill et al., 2018).

Ηλικία: Η ηλικία φαίνεται να είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για την ΟΑ. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου δεν έχει κατανοηθεί επαρκώς, ωστόσο πιθανολογείται ότι σχετίζεται με διαδικασίες όπως το οξειδωτικό στρες, η λέπτυνση του χόνδρου, η αδυναμία των μυών και η μείωση στη δεκτικότητα

του χόνδρου στη φθορά που επέρχονται με το πέρασμα του χρόνου και την κυτταρική γήρανση (Palazzo et al., 2016).

Φύλο: Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η OA εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες, ειδικότερα σε μεγαλύτερες ηλικίες (Bortoluzzi et al., 2018). Επιπλέον, η βαρύτητα της νόσου φαίνεται να είναι αυξημένη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (Johnson & Hunter, 2014). Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας της ασθένειας στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση σε συνδυασμό με την ανίχνευση υποδοχέων των οιστρογόνων στις αρθρώσεις επισημαίνουν τον πιθανό ρόλο των φυλετικών ορμονών στην παθογένεση της OA (Bortoluzzi et al., 2018). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική οστική δύναμη, ευθυγράμμιση των άκρων και νευρομυϊκή δύναμη (Johnson & Hunter, 2014).

Γενετικό υπόβαθρο: Όπως προαναφέρθηκε, ο κίνδυνος εμφάνισης OA καθορίζεται γενετικά σε ποσοστό 30%-65% και διαφοροποιείται ανάλογα με την άρθρωση. Πρόσφατες μελέτες σάρωσης γονιδιώματος ανέδειξαν περίπου 46 γενετικούς τόπους να έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης OA γόνατος ή ισχίου (Styrkarsdottir et al., 2018) (Tachmazidou et al., 2019) (Zengini et al., 2018). Μερικά από τα γονίδια που παίζουν ρόλο στην έναρξη της νόσου και μπορούν να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους είναι τα: MAP2K6, TGFa, BACH1, CHADL, TGFB1, GDF5, FGF18, CTSK (Styrkarsdottir et al., 2018) (Tachmazidou et al., 2019) (Zengini et al., 2018).

Εθνικότητα: Υπάρχουν και εθνικές διαφορές στην εμφάνιση της OA. Οι Κινέζοι παρουσιάζουν μικρότερη συχνότητα OA χεριών και ισχίου σε σύγκριση με τους Καυκάσιους. Όσον αφορά στην OA γόνατος, η συχνότητα είναι παρόμοια σε Κινέζους και Καυκάσιους άνδρες, ενώ οι γυναίκες κινεζικής καταγωγής φαίνεται να εμφανίζουν συχνότερα OA συγκριτικά με τις Καυκάσιες. Τέλος, δεδομένα από τις ΗΠΑ δείχνουν ότι οι Καυκάσιοι εμφανίζουν OA γόνατος σπανιότερα από τους Αφροαμερικάνους με τους δεύτερους μάλιστα να υποφέρουν από βαρύτερες μορφές της νόσου (O'Neill et al., 2018).

Δείκτης Μάζας Σώματος (Δ.Μ.Σ.): Το υπέρβαρο και η παχυσαρκία αποτελούν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΟΑ γόνατος. Αντίστροφα, η απώλεια βάρους έχει συσχετιστεί με βελτίωση των συμπτωμάτων της ΟΑ και βραδύτερο εκφυλισμό του χόνδρου του γόνατος (Vina & Kwoh, 2018). Χαρακτηριστικά, η επιδημιολογική μελέτη Framingham αναφέρει ότι η μείωση του ΔΜΣ κατά 2 ή περισσότερες μονάδες μειώνει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης ΟΑ γόνατος (O'Neill et al., 2018).

Επάγγελμα και αθλητισμός: Η χρόνια καταπόνηση των αρθρώσεων λόγω συγκεκριμένων επαναλαμβανόμενων κινήσεων και γονυκλίσιας που απαιτούνται σε συγκεκριμένα επαγγέλματα έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ΟΑ (Vina & Kwoh, 2018). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που συνδέουν την ενασχόληση με τον αθλητισμό με την πιθανότητα εμφάνισης ΟΑ, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Δεν έχει διευκρινιστεί εάν η οποιαδήποτε συσχέτιση (θετική ή αρνητική) είναι απόρροια της συμμετοχής σε αθλητικές δραστηριότητες καθαυτής ή των πιθανών τραυματισμών λόγω της συμμετοχής σε αυτές (Vina & Kwoh, 2018). Γενικά, συνίσταται η φυσική δραστηριότητα μέτριας έντασης, ενώ προτείνεται να αποφεύγεται η πολύ έντονη γυμναστική καθώς φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ γόνατος (O'Neill et al., 2018).

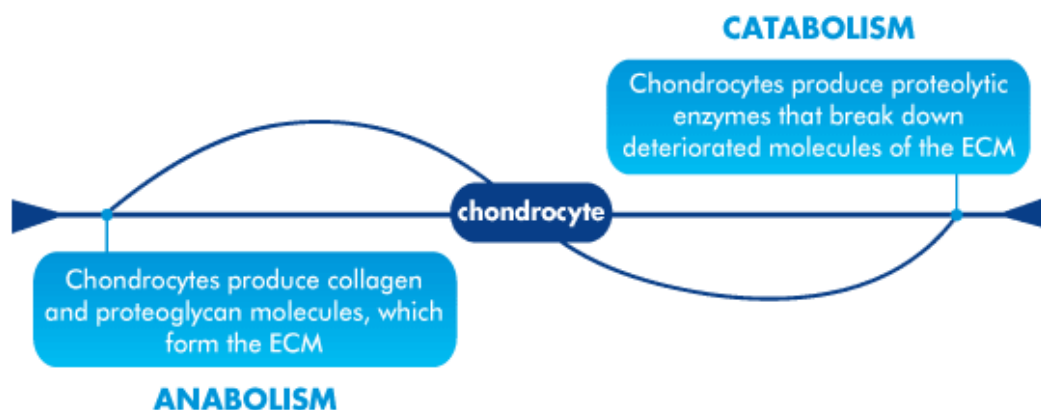
Ανώμαλη ανατομία άρθρωσης: Τέλος, ανωμαλίες στη δομή της άρθρωσης έχει αναφερθεί ότι μπορεί να οδηγήσουν σε άνιση κατανομή του βάρους και μηχανικό στρες συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στην εξέλιξη της ΟΑ (Vina & Kwoh, 2018).

#### **A.1.4. Παθοφυσιολογία**

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας εύκαμπτος συνδετικός ιστός που εντοπίζεται στο τέλος των μακρών οστών στις αρθρώσεις και στο μεσοσπονδύλιο δίσκο και προσδίδει λεία, ομαλή επιφάνεια για την κίνηση των αρθρώσεων. Η κύρια λειτουργία του είναι η διευκόλυνση της μετακίνησης φορτίων προσδίδοντας χαμηλό συντελεστή τριβής.

Η ομοιοστάση του χόνδρου αφορά τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ δύο αντίθετων μεταβολικών οδών: μίας αναβολικής (ή βιοσυνθετικής) και μίας καταβολικής (ή εκφυλιστικής) (Εικόνα 1). Κατά την αναβολική φάση, τα χονδροκύτταρα λειτουργούν για να διατηρήσουν τη φυσιολογική δομή του αρθρικού χόνδρου συνθέτοντας μόρια της εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix, ECM).

Στην καταβολική φάση, η σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας αναστέλλεται και τα χονδροκύτταρα συνθέτουν ένζυμα αποδόμησής της (Ulrich-Vinther et al., 2003). Στον υγιή αρθρικό χόνδρο, οι αναβολικές και καταβολικές διεργασίες διατηρούνται σε ισορροπία από τα χονδροκύτταρα. Εάν ο καταβολισμός υπερβεί την αναγεννητική ικανότητα των χονδροκυττάρων, τότε εμφανίζεται εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου (Mueller & Tuan, 2011).

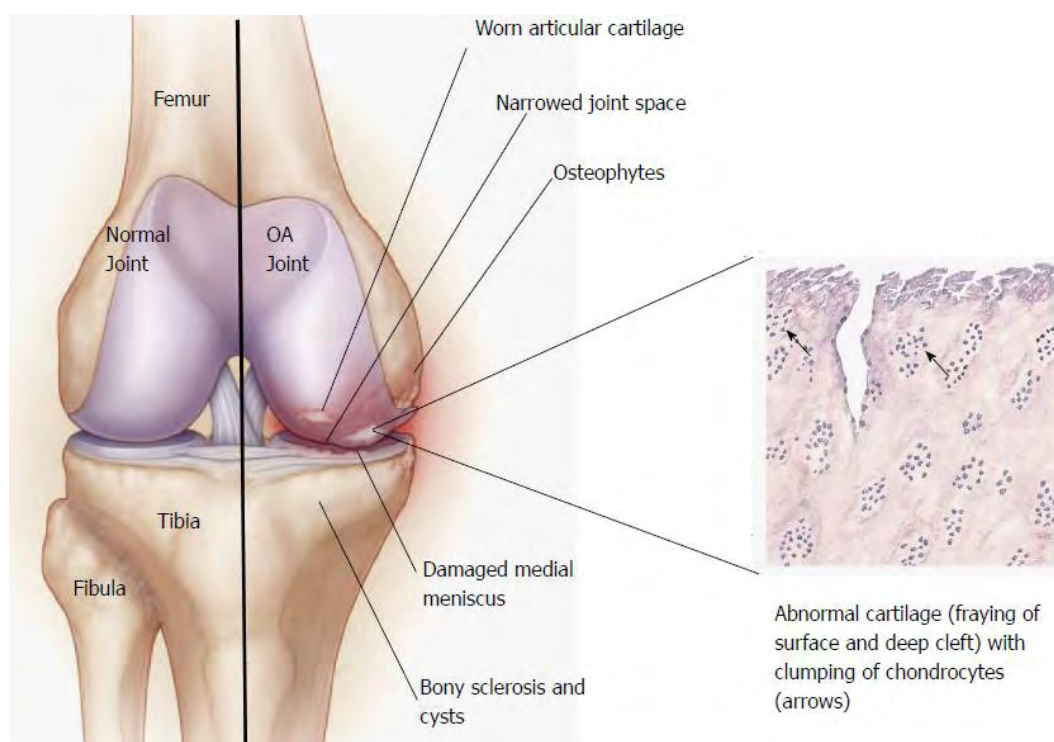


**Εικόνα 1.** Μεταβολισμός αρθρικού χόνδρου (Oesser & Seifert, 2003)

Κατά τη διάρκεια της ζωής, τα χονδροκύτταρα αντικαθιστούν τα αποδομημένα μακρομόρια της εξωκυττάριας μήτρας με νέα συστατικά, επιτρέποντας την αναδιαμόρφωση του χόνδρου. Ωστόσο, στους ενήλικες η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά αργή. Συνεπώς, παρόλο που ο αρθρικός χόνδρος ανέχεται μεγάλα ποσοστά έντονου και επαναλαμβανόμενου μηχανικού στρες, δεν είναι εφικτό να θεραπευτεί ακόμα και από ένα μικρό τραύμα. Ακόμη, ο αρθρικός χόνδρος όταν υποστεί βλάβη, δε μπορεί να ανταποκριθεί με μια συνηθισμένη φλεγμονώδη απόκριση καθώς δε φέρει νεύρα και αγγεία (Berenbaum, 2013). Αυτό καθιστά τις αρθρώσεις ευαίσθητες σε εκφυλιστικές διαδικασίες και επομένως στην ανάπτυξη OA (Mobasheri & Batt, 2016). Πιστεύεται, λοιπόν, ότι η εμφάνιση της νόσου προκαλείται αρχικά από διαταραχές στην ισορροπία μεταξύ αποδόμησης και επιδιόρθωσης του χόνδρου (Cope et al., 2019).

Εκτός, όμως, από τη φθορά του αρθρικού χόνδρου, παρατηρούνται και άλλες αλλοιώσεις λόγω παθογενετικών βιοχημικών και εμβιομηχανικών αλλαγών (όπως ανικανότητα αντοχής σε κανονικού επιπέδου μηχανικό στρες, περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών και O<sub>2</sub>, αυξημένη σύνθεση μεταλλοπρωτεϊνών, αγκρεκανασών και άλλων πρωτεασών που αποδομούν την εξωκυττάρια μήτρα του αρθρικού χόνδρου και απόπτωση χονδροκυττάρων) (Uth & Trifonov, 2014). Αυτές

αφορούν: υπερτροφία του υποχόνδριου οστού, στένωση του μεσάρθριου διαστήματος (Σ.Μ.Δ.), σχηματισμό οστεόφυτων και εκφυλισμός μηνίσκου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Παθοφυσιολογία της OA (Uth & Trifonov, 2014)

#### A.1.5. Διάγνωση και Θεραπεία

Για τη διάγνωση της OA λαμβάνονται υπόψη τόσο οι δομικές αλλαγές όσο και τα συμπτώματα των αρθρώσεων (Palazzo et al., 2016). Απαιτείται η αξιολόγηση ακτινογραφικών ευρημάτων και η φυσική εξέταση του ασθενή για την επιβεβαίωση και το χαρακτηρισμό του βαθμού προσβολής της άρθρωσης. Ακόμη, απαραίτητος κρίνεται ο αποκλεισμός άλλων λειτουργικών συνδρόμων και του πόνου που σχετίζονται με άλλες αιτίες (Uth & Trifonov, 2014). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και αποδεκτή από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) για την αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου είναι το Σύστημα Kellgren-Lawrence (KL score) που βαθμολογεί τη νόσο σε κλίμακα από το 0 έως το 4, με βάση την ύπαρξη οστεόφυτων και κύστεων, τη μείωση μεσάρθριου διαστήματος και τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού (Mora et al., 2018) (Palazzo et al., 2016) (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Σύστημα Kellgren-Lawrence. (Προσαρμογή από: Petersson et al., 1997)

<b>KL score</b>	<b>Ερμηνεία</b>
0	Απόντα ακτινογραφικά ευρήματα της ΟΑ
1	Αμφίβολη Σ.Μ.Δ, πιθανή οστεοφυτική προσβολή
2	Παρουσία οστεόφυτων και πιθανή Σ.Μ.Δ.
3	Πολλαπλά οστεόφυτα, Σ.Μ.Δ, σκλήρυνση και πιθανή παραμόρφωση οστού
4	Μεγάλα οστεόφυτα, Σ.Μ.Δ., σκλήρυνση και παραμόρφωση οστού

Οι υπάρχουσες μέθοδοι διαχείρισης της νόσου στοχεύουν στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, εκτός εάν η βαρύτητα της ασθένειας απαιτεί τη χειρουργική επέμβαση με αντικατάσταση ολόκληρης της άρθρωσης (ολική αρθροπλαστική) (Mora et al., 2018). Προσεγγίσεις όπως η φυσιοθεραπεία, διατροφή πλούσια σε βιταμίνη D και υποστηρικτική άθληση (π.χ. κολύμβηση) καθώς και φαρμακευτικές προσεγγίσεις όπως μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη σκευάσματα ανακουφίζουν μόνο από τα συμπτώματα και τον πόνο (Glyn-Jones et al., 2015) (Mora et al., 2018).

#### **A.1.6. Κλινικοί φαινότυποι**

Η ΟΑ είναι μία ετερογενής ασθένεια με πολλαπλές αιτιολογίες και φαινοτύπους. Είναι πλέον αποδεκτό ότι οι διαφορετικοί κλινικοί φαινότυποι αντιπροσωπεύουν και διαφορετικούς μηχανισμούς της νόσου. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι ο προσδιορισμός των φαινοτύπων της ΟΑ θα μπορούσε να επιτρέψει την εξατομικευμένη άρα και αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της. Οι κύριοι κλινικοί φαινότυποι που έχουν προταθεί μέχρι στιγμής είναι οι εξής (Mobasheri et al., 2017) (Vina & Kwoh, 2018):

- (α) Φαινότυπος σχετιζόμενος με την ηλικία
- (β) Φαινότυπος σχετιζόμενος με τη φλεγμονή του υμένα: χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών βιοδεικτών
- (γ) Φαινότυπος Μεταβολικού Συνδρόμου: χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία, διαβήτη και άλλες διαταραχές που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο
- (δ) Φαινότυπος σχετιζόμενος με το χόνδρο

- (ε) Φαινότυπος σχετιζόμενος με το υποχόνδριο οστό
- (στ) Φαινότυπος προκαλούμενος μετά από τραυματισμό.

#### **A.1.7. Παράγοντες που συνεισφέρουν στην οστεοαρθρίτιδα**

Η γήρανση, η φλεγμονή και το μεταβολικό σύνδρομο (MetS) συγκαταλέγονται μεταξύ των κυριότερων παραγόντων που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη αρθρικών και μυοσκελετικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης και της ΟΑ. Βασικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της νόσου είναι η διαταραχή της ομοιόστασης των χονδροκυττάρων στον προσβεβλημένο χόνδρο. Αυτή η ανισορροπία μεταξύ αναβολικής και καταβολικής δραστηριότητας είναι αποτέλεσμα αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη γήρανση των χονδροκυττάρων (chondrosenescence). Επιπλέον, η δυσλειτουργία αλλά και η γήρανση των χονδροκυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παχυσαρκία και τον τρόπο ζωής (Mobasheri & Batt, 2016).

##### **A.1.7.1. Γήρανση και φλεγμονή**

Η γήρανση είναι μια φυσική και αναπόφευκτη διαδικασία στο ανθρώπινο σώμα που σχετίζεται με πλήθος συστημικών και τοπικά εντοπισμένων αλλαγών (Rezuş et al., 2019). Η προοδευτική δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων που παρατηρείται στην ΟΑ συνοδεύεται από διάβρωση των τελομερών και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία λόγω οξειδωτικής βλάβης, γεγονότα που αποτελούν ορόσημα της γήρανσης (Mobasheri & Batt, 2016). Ορισμένες από τις ηλικιο-εξαρτώμενες αλλαγές των κυττάρων και των ιστών των αρθρώσεων και η συνεισφορά τους στην ΟΑ φαίνονται στον Πίνακα 2.

Όλες αυτές οι καταστάσεις έχουν ένα κοινό παθογενετικό μηχανισμό που χαρακτηρίζεται από χαμηλού βαθμού προ-φλεγμονώδη κατάσταση. Ο όρος «inflammaging» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2000 από τους Franceschi και συνεργάτες και αναφέρεται σε όλες τις διαδικασίες που συνεισφέρουν σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση (Franceschi et al., 2000). Αντιπροσωπεύει μία χρόνια και ασυμπτωματική κατάσταση χαμηλού βαθμού φλεγμονής και μαζί με την ανιούσα ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης και την αναδιαμόρφωση της απόπτωσης συνεισφέρει στις διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία. Η ΟΑ και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες των αρθρώσεων σχετίζονται με μηχανισμούς γήρανσης, όπως η ύπαρξη μικροπεριβάλλοντος φλεγμονής και η εξασθενημένη σύνδεση μεταξύ των φλεγμονοσωμάτων και της αυτοφαγίας (Rezuş et al., 2019).



**Πίνακας 2.** Συνεισφορά των μεταβολών της γήρανσης στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΟΑ.  
(Προσαρμογή από: Shane Anderson & Loeser, 2010)

Μεταβολές	Συνεισφορά στην ΟΑ
Συσσώρευση κυττάρων με γηρασμένο εκκριτικό φαινότυπο	↑ παραγωγής κυτοκινών, MMP → αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας
Οξειδωτικό στρες	Κυτταρικός θάνατος και ↓ σύνθεσης εξωκυττάριας μήτρας
↓ επιπέδων αυξητικών παραγόντων (π.χ. IGF-1, BMP-7) ή απόκρισης σε αυτούς	↓ επιδιόρθωσης και σύνθεσης εξωκυττάριας μήτρας
↑ σχηματισμού γλυκοζυλιωμένων τελικών προϊόντων (AGE)	↑ ευαισθησίας στην κόπωση
↓ ενυδάτωσης του αρθρικού χόνδρου, ↑ διάσπασης κολλαγόνου	↓ ελαστικότητας και αντοχής
↑ επασβέστωσης	Τροποποίηση μηχανικών ιδιοτήτων και πιθανή ενεργοποίηση φλεγμονώδους σηματοδότησης

Είναι γνωστό ότι η φλεγμονή της άρθρωσης αποτελεί παράγοντα ανασταλτικό για την επιδιόρθωση του χόνδρου, ενώ σημαντικός αριθμός μελετών αναφέρει ότι σχετίζεται και με χαρακτηριστικά της κλινικής εικόνας της ΟΑ γόνατος όπως το οίδημα και ο πόνος (Uth & Trifonov, 2014). Συγκεκριμένα, ο Torres και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ύπαρξη φλεγμονής στον υμένα και αλλοιώσεις στο μυελό των οστών συσχετίζονται με πόνο στο γόνατο σε ασθενείς με ΟΑ (Torres et al., 2006). Η σχέση πόνου και φλεγμονής ενισχύεται περαιτέρω από μελέτες που υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές στη βαθμίδα του πόνου με την πάροδο του χρόνου ποικίλλουν ανάλογα με τις αλλαγές στη βαρύτητα της φλεγμονής (Lo et al., 2009) (Wang et al., 2016) (Zhang et al., 2011). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η αρθρική φλεγμονή ενοχοποιείται για τη δυσλειτουργία της άρθρωσης γόνατος και σχετίζεται με λειτουργική βλάβη και αναπηρία (Wang et al., 2018).

#### **A.1.7.2. Μεταβολικό Σύνδρομο**

Η σχετιζόμενη με το Μεταβολικό Σύνδρομο OA (Met-OA) είναι ένας κλινικός φαινότυπος που καθορίζεται από το ρόλο της παχυσαρκίας και του MetS ως παραγόντων κινδύνου, καθώς επίσης και από χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού. Η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου όχι μόνο για την OA αρθρώσεων που φέρουν το βάρος του σώματος, αλλά και για την OA χεριού. Επιπλέον το MetS είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την OA και η συσσωρευτική επίδραση των διαφόρων χαρακτηριστικών του συνδρόμου συνδυάζεται με την ανεξάρτητη επίδραση ατομικών χαρακτηριστικών, όπως ο διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία και η υπέρταση (Courties et al., 2018). Η μεταβολική OA πλήττει κυρίως άτομα μέσης ηλικίας (45-65 ετών) και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα αντιποκινών, υπεργλυκαιμία και ορμονικές διαταραχές που οδηγούν σε OA γόνατος και χεριού. Μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με MetS αναπτύσσουν σε μικρότερη ηλικία OA, η οποία χαρακτηρίζεται από μία πιο γενικευμένη παθολογία, αυξημένο βαθμό φλεγμονής και έντονο πόνο στις αρθρώσεις σε σύγκριση με OA ασθενείς χωρίς MetS (Zhuo et al., 2012).

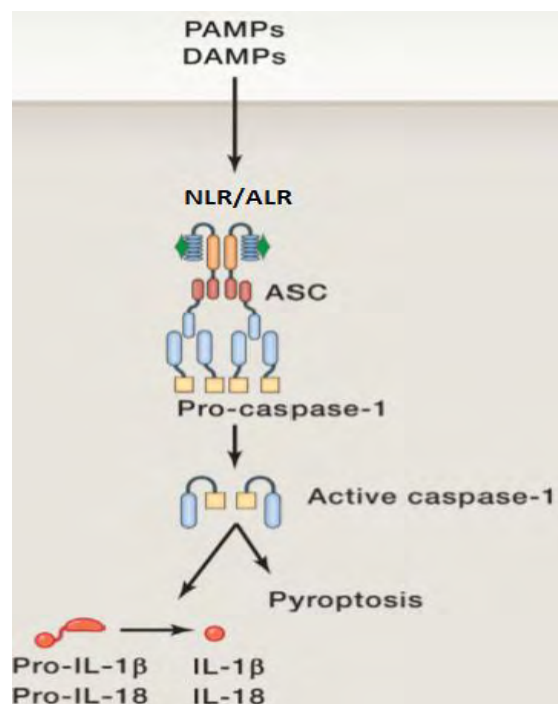
Τα κύρια σημεία συσχέτισης του MetS με την OA είναι τα εξής:

- Η σύνδεση ανάμεσα στην υπέρταση και την OA εστιάζει στην ισχαιμία του υποχόνδριου οστού που μειώνει την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών στον αρθρικό χόνδρο και πυροδοτεί την αναδιαμόρφωση του οστού.
- Η απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού των λιπιδίων στους αρθρικούς ιστούς που επάγεται από τη δυσλιπιδαιμία μπορεί να επάγει την ανάπτυξη OA.
- Η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε τοπική συσσώρευση γλυκοζυλιωμένων προϊόντων γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία τοξικού περιβάλλοντος, διευκολύνοντας την εμφάνιση της νόσου.
- Τα διαταραγμένα επίπεδα αντιποκινών λόγω παχυσαρκίας επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων και ενζύμων αποδόμησης όπως οι MMP-9 και MMP13, οδηγώντας σε αναστολή της σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας και αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού. (Zhuo et al., 2012)

### A.2.1. Φλεγμονόσωμα

Η φλεγμονή είναι μία οξεία απόκριση που συμβαίνει κατά τη μόλυνση ή καταστροφή του ιστού προκειμένου να περιορίσει τη βλάβη στο σώμα. Ωστόσο, απορρύθμιση της διαδικασίας και ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής οδηγούν σε δευτερογενή βλάβη και ανοσολογική παθολογία στον ξενιστή. Η φλεγμονή ξεκινά με ανίχνευση σημάτων οξείας βλάβης ή διαταραχή της φυσιολογικής κατάστασης (Strowig et al., 2012). Για την ανίχνευση τέτοιων σημάτων, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί μια σειρά από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRR). Οι PRRs εκφράζονται από κύτταρα πρώτης γραμμής άμυνας συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, μονοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, ουδετερόφιλων και επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και κυττάρων του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος (Schroder & Tschopp, 2010). Οι PRRs περιλαμβάνουν τους TLRs (Toll-Like Receptors), CTLs (C-Type Lectins), RLRs (Retinoic acid-inducible gene-I-Like Receptors), ALRs (AIM2-Like Receptors) και NLRs (NOD-Like Receptors) (Lamkanfi & Dixit, 2014). Πολλοί από αυτούς τους υποδοχείς αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροβίων (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) ή/και σήματα κινδύνου προερχόμενα από τον ξενιστή (Danger-Associated Molecular Patterns, DAMPs) (Strowig et al., 2012).

Τα φλεγμονοσώματα είναι κυτταροπλασματικά σύμπλοκα πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν ποικιλία φλεγμονωδών ερεθισμάτων συμπεριλαμβανομένων των PAMPs και DAMPs και πυροδοτούν την ωρίμανση και έκκριση σημαντικών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-1 (Bolívar et al, 2019). Τα φλεγμονοσώματα αποτελούν αισθητήρες/αποκριτές του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που ελέγχουν τη δραστηριότητα της κασπάσης-1. Η κασπάση-1 συντίθεται ως ένα ανενεργό ζυμογόνο (προ-κασπάση-1) που ενεργοποιείται έπειτα από διμερισμό των φλεγμονοσωμάτων. Τα φλεγμονοσώματα μόλις λάβουν ένα σήμα ενεργοποίησης, ενεργοποιούν την προ-κασπάση-1 είτε άμεσα (μέσω ομοτυπικής σύνδεσης της CARD) είτε έμμεσα (μέσω της περιοχής PYD με τη βοήθεια της ASC) (Strowig et al., 2012). Τα κύρια υποστρώματα της κασπάσης-1 είναι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 $\beta$  και IL-18 (Bolívar et al., 2019). Επιπλέον, η κασπάση-1 είναι απαραίτητη για την πυρόπτωση, έναν τύπο κυτταρικού θανάτου που συνδυάζει χαρακτηριστικά της απόπτωσης και της νέκρωσης και παρατηρείται σε καταστάσεις μικροβιακών λοιμώξεων (Strowig et al., 2012). (Εικόνα 3)



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν τα φλεγμονοσώματα.

(Τροποποίηση από: Rathinam & Fitzgerald, 2016)

Το κλασικό σύμπλοκο φλεγμονοσώματος αποτελείται από έναν κυτοσολικό αισθητήρα (NLR ή ALR πρωτεΐνη), μία πρωτεΐνη προσαρμογής-ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) και την προ-κασπάση-1 (Herrero-Beaumont et al., 2019). Η πρωτεΐνη ASC είναι ένα διμερές μόριο που περιέχει μία N-τελική περιοχή PYD και μία C-τελική περιοχή CARD, ώστε να φέρει σε επαφή τις NLR/ALR και προ-κασπάση-1. Η προ-κασπάση-1, στη συνέχεια, ενεργοποιείται οδηγώντας έτσι σε διάσπαση των προ-IL-1β και προ-IL-18 και σε παραγωγή των ώριμων βιολογικά ενεργών κυτοκινών (Rathinam & Fitzgerald, 2016).

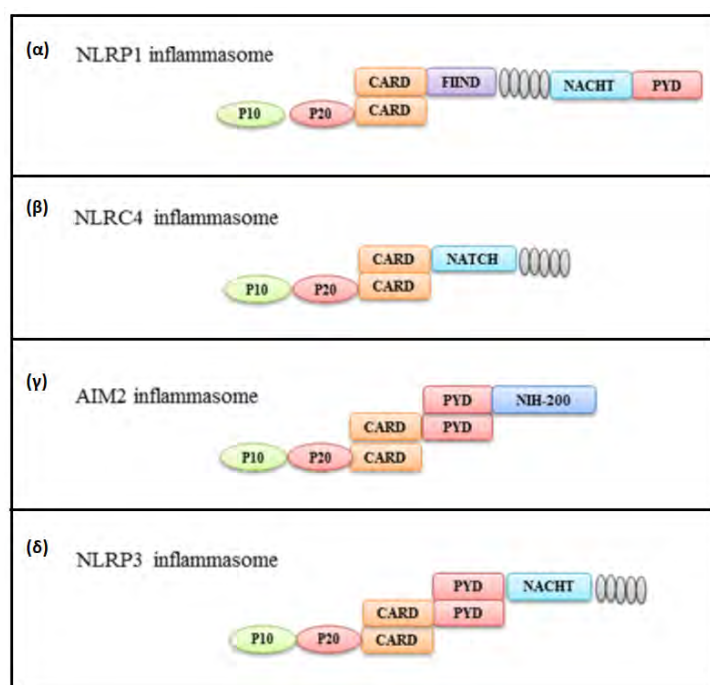
#### **A.2.2. Τύποι φλεγμονοσώματος και μηχανισμοί ενεργοποίησής τους**

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί διαφορετικοί τύποι φλεγμονοσωμάτων που διαφέρουν ως προς τη δομή (διαφορετικός ενεργοποιητής, μέλη της οικογένειας NLP/ALR και κασπάση-τελεστής) και τον τρόπο ενεργοποίησης. Κάθε τύπος φλεγμονοσώματος έχει το όνομά του από την πρωτεΐνη NLR ή ALR που περιέχει. Στον άνθρωπο, οι πρωτεΐνες NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP12 και ALR IFI16 σχηματίζουν φλεγμονοσώματα, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση του ρόλου τους. Αντίθετα, ο ρόλος των πρωτεϊνών ALR AIM2 και NLRP1,

NLRP3 και NAIP-NLRC4 στη φλεγμονώδη σηματοδότηση έχει αποσαφηνιστεί (Lamkanfi & Dixit, 2014).

#### A.2.2.1. Το φλεγμονόσωμα NLRP1

Η πρωτεΐνη NLRP1 είναι η πρώτη που βρέθηκε να σχηματίζει φλεγμονόσωμα. Στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο NLRP1, που περιέχει τις περιοχές PYD (pyrin domain), FIIND (function-to-find domain) και CARD (Εικόνα 4α), ενώ στο ποντίκι από τα NLRP1 (a-c) και στερούνται περιοχής PYD. Για το σχηματισμό του συμπλόκου του φλεγμονοσώματος στα ποντίκια αρκεί η διάσπαση της NLRP1b στο αμινοτελικό άκρο από την τοξίνη *Bacillus anthracis anthrax*, όμως ο συνδέτης της ανθρώπινης NLRP1 δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη. Το φλεγμονόσωμα NLRP1b δεν οδηγεί σε αυτοπρωτεολυτική διάσπαση της κασπάσης-1 σε όλες τις περιπτώσεις, συμβάλλει ωστόσο στη διάσπαση της IL-1 $\beta$ . Στον άνθρωπο, περιοχές του φλεγμονοσώματος NLRP1 ασκούν αυτο-ανασταλτική δράση. Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας προκαλούν αυθόρμητη ενεργοποίηση οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε παθολογικές καταστάσεις λόγω υπερδραστικής ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος και απελευθέρωσης της IL-1 $\beta$  (Place & Kanneganti, 2018).



**Εικόνα 4.** Δομή των διαφορετικών τύπων φλεγμονοσωμάτων.

(Τροποποίηση από: Parsamanesh et al., 2019)

#### **A.2.2.2. Το φλεγμονόσωμα NAIP-NLRC4**

Τα φλεγμονοσώματα NAIP-NLRC4 (Εικόνα 4β) αποκρίνονται σε στοιχεία των βακτηρίων με σύστημα έκκρισης τύπου 3 και σε πρωτεΐνες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Στον άνθρωπο μία μόνο πρωτεΐνη NAIP αναγνωρίζει αυτά τα συστατικά, ενώ στα ποντίκια διαφορετικές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν ξεχωριστούς συνδέτες. Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι το NLRC4 μπορεί να σχηματίσει φλεγμονόσωμα ενσωματώνοντας τις πρωτεΐνες NLRP3, ASC, κασπάση-1 και κασπάση-8 κατά τη μόλυνση με *Salmonella*, υποδεικνύοντας ότι διαφορετικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν το σχηματισμό τους (π.χ. φωσφορυλλίωση S533) (Place & Kanneganti, 2018).

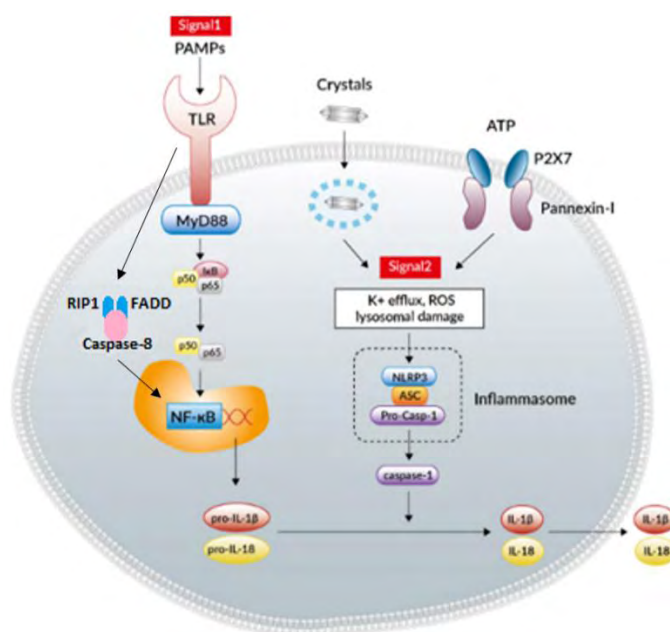
#### **A.2.2.3. Το φλεγμονόσωμα ALR AIM2**

Το φλεγμονόσωμα AIM2 (Εικόνα 4γ) ανιχνεύει dsDNA στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια ιικών ή βακτηριακών λοιμώξεων, καθώς και self-DNA. Η περιοχή NH200 της AIM2 συμμετέχει στην πρόσδεση του dsDNA με τρόπο ανεξάρτητο από την αλληλουχία. Οι επαγόμενες από ιντερφερόνη πρωτεΐνες GBP2, GBP5 και IRGB10 έχουν αναγνωριστεί ως απαραίτητες για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος κατά τη μόλυνση με *Francisella novicida*. Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες δρουν προσβάλλοντας τη βακτηριακή μεμβράνη και προκαλώντας λύση, προκειμένου να εκτεθεί το βακτηριακό DNA ή άλλα βακτηριακά συστατικά στους κυτταροπλασματικούς αισθητήρες. Επιπλέον από μελέτες αναφορικά με το ρόλο της AIM2 στην ανίχνευση self-DNA προκύπτει ότι η ενεργοποίηση του AIM2 συμβάλλει στις αρνητικές συνέπειες της χημειοθεραπείας, καθώς αναγνωρίζει σπασίματα της διπλής έλικας του DNA (dsDNA breaks) και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη του DNA αντί να ανιχνεύει dsDNA που έχει απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα (Place & Kanneganti, 2018).

#### **A.2.2.4. Το φλεγμονόσωμα NLRP3**

Ένα από τα πιο καλά μελετημένα φλεγμονοσώματα είναι αυτό που περιέχει την NLRP3, την πρωτεΐνη ASC και την κασπάση-1 (Εικόνα 4δ) και ανταποκρίνεται σε ποικιλία λοιμώξεων και ερεθισμάτων στρες. Η ενεργοποίηση του NLRP3 γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο σήμα αφορά την ανιούσα ρύθμιση της NLRP3 και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις αυτής, προκειμένου να ενεργοποιηθεί από το δεύτερο σήμα το οποίο οδηγεί στον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης με στοιχεία του φλεγμονοσώματος. Αν και πρόσφατα έχουν αναγνωριστεί ρυθμιστές και των δύο

σημάτων, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται το συγκεκριμένο φλεγμονόσωμα παραμένει υπό διερεύνηση (Place & Kanneganti, 2018).



**Εικόνα 5.** Μηχανισμός ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3 (Τροποποίηση από: “Activation of the NLRP3 Inflammasome Review | InvivoGen” και Pellegrini et al., 2019)

Αναλυτικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι το πρώτο βήμα ρυθμίζεται από το μονοπάτι του υποδοχέα TLR-πρωτεΐνης μυελοειδούς διαφοροποίησης πρωτογενούς απόκρισης 88 (MyD88) και του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFR). Αυτό το στάδιο οδηγεί σε ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και παραγωγή των NLRP3, προ-IL-1β και προ-IL-18. Η διέγερση του TLR από PAMPs και/ή DAMPs ενεργοποιεί, επίσης, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο RIP1-FADD-κασπάση 8 το οποίο με τη σειρά του προάγει τη μεταγραφή του *NFκB* (Pellegrini et al., 2019) (Place & Kanneganti, 2018). Το δεύτερο σήμα έχει ως αποτέλεσμα τον ολιγομερισμό και ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, με συνέπεια την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και την έκκριση IL-1β και IL-18 (Pellegrini et al., 2019). Το δεύτερο σήμα παρέχεται από εξωκυττάριο ATP, κρυστάλλους ουρικού οξέος, βακτηριακές τοξίνες, θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ιούς, ή άλλα παθογόνα (Place & Kanneganti, 2018). Αν και ο πλήρης μηχανισμός είναι αμφισβητήσιμος, αυτά τα ερεθίσματα πιθανόν να δρουν σε κοινό κυτταρικό μηχανισμό. Μεταξύ των μηχανισμών που έχουν προταθεί συγκαταλέγονται αλλαγές στην ομοιόσταση ιόντων μέσω εκροής καλίου (π.χ. ενεργοποίηση του υποδοχέα P2X7 από εξωκυττάριο ATP και

ενεργοποίηση παννεξίνης-1), εισροή ασβεστίου ή διάσπαση της μεμβράνης από τοξίνες, λυσοσωμική ρήξη και απελευθέρωση καθεψίνης B, αλλαγές στον όγκο των κυττάρων, μετατόπιση καρδιολιπίνης στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Parsamanesh et al., 2019) (Place & Kanneganti, 2018). Η απελευθέρωση οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA και η αύξηση των ROS οδηγεί σε ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (Εικόνα 5). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στα ανθρώπινα μονοκύτταρα το φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί να ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από ένα παρατηρούμενο δεύτερο σήμα (Place & Kanneganti, 2018).

Επιπλέον, η NLRP3 ρυθμίζεται από συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως η NEK7, η PKD και η PTPN22, και τον ενδοκυτταρικό της εντοπισμό. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη NEK7 (πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και στην κυτοκίνηση) αλληλεπιδρά με την περιοχή LRR της NLRP3 και οδηγεί σε ενεργοποίησή της. Ακόμα, η PDK (πρωτεϊνική κινάση D) και η PTPN22 (πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης N-22) εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 μέσω φωσφορυλλίωσης και αποφωσφορυλλίωσης στην Tyr861 της NLRP3, αντίστοιχα (Place & Kanneganti, 2018).

### **A.2.3. Το φλεγμονόσωμα σε φυσιολογικές καταστάσεις**

Σε υγιείς καταστάσεις, τα φλεγμονοσώματα ενεργοποιούν το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα για την προστασία του ξενιστή έναντι βακτηριακών, μυκητιακών, ιικών και παρασιτικών λοιμώξεων. Η κασπάση-1, η IL-1β, η IL-18 και άλλες κυτοκίνες παράγονται για να εξαλείψουν τις λοιμώξεις και να περιορίσουν την καταστροφή του ιστού. Σε φυσιολογικά επίπεδα, οι παραπάνω κυτοκίνες είναι επωφελείς για τον ξενιστή, όμως απορρύθμιση της ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές και ασθένειες (McAllister et al., 2018). Προκειμένου, λοιπόν, να αποφεύγεται η υπερβολική παραγωγή κυτοκινών και ο κυτταρικός θάνατος, η δραστηριότητα των φλεγμονοσωμάτων θα πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά από τον ξενιστή, σε μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά επίπεδα με σκοπό τη διατήρηση της φυσιολογικής κατάστασης.

Αρχικά, όπως ήδη αναφέρθηκε, η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων ελέγχεται από τα σήματα που λαμβάνουν, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν



μικροβιακούς συνδέτες, κυτοκίνες ή ROS. Επίσης τα διάφορα συστατικά των φλεγμονοσωμάτων μπορεί να διαφέρουν λόγω εναλλακτικού ματίσματος και τα διάφορα παράγωγα να έχουν διαφορετική λειτουργία. Πράγματι, έχουν αναγνωριστεί πολλές παραλλαγές της πρωτεΐνης ASC με διαφορετική ικανότητα ως προσαρμογείς, ενώ μία μάλιστα έχει ανασταλτική δράση. Επιπλέον, ένας ακόμη μηχανισμός ρύθμισης είναι ο σχηματισμός των συμπλόκων με διαφορετικά στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η επεξεργασία των κυτοκινών μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRC4 εξαρτάται από την πρωτεΐνη ASC, ενώ η πυρόπτωση είναι ανεξάρτητη της ASC (Strowig et al., 2012).

Επιπλέον η έκφραση πρωτεϊνών από τον ξενιστή ρυθμίζει τη δράση του φλεγμονοσώματος μέσω αλληλεπίδρασης με τις περιοχές CARD ή PYD ή με άμεση αναστολή της δράσης της κασπάσης-1. Ακόμα ο εντοπισμός και η διακίνηση των συστατικών του φλεγμονοσώματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο δεδομένου ότι η ASC εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων σε συνθήκες «ανάπαυσης» (Strowig et al., 2012).

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της δράσης των φλεγμονοσωμάτων είναι η αλληλεπίδραση με διαδικασίες που σχετίζονται με το στρες, όπως η αυτοφαγία. Κύτταρα με μειωμένη αυτοφαγία έχουν και μειωμένο κατώφλι ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων ως αποτέλεσμα της διαταραγμένης κάθαρσης των ελαττωματικών μιτοχονδρίων και αυξημένων επιπέδων ROS (Strowig et al., 2012).

Τέλος, η κατιούσα ρύθμιση των φλεγμονοσωμάτων επιτυγχάνεται με εκκρινόμενους παράγοντες ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων όπως για παράδειγμα οι ιντερφερόνες τύπου I ή αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα με μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα (Strowig et al., 2012).

#### **A.2.4. Το φλεγμονόσωμα σε παθολογικές καταστάσεις**

Η διαταραχή της ρύθμισης των φλεγμονοσωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές νοσηρές καταστάσεις όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, νευρολογικές και ψυχιατρικές ασθένειες (νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, κατάθλιψη), μεταβολικές διαταραχές (παχυσαρκία, διαβήτης τύπου 2) και χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές (αρθρίτιδες) (Pellegrini et al., 2019).

Τα επίπεδα έκφρασης NLRP3 στον υποδόριο λιπώδη ιστό, τα οποία εξαρτώνται από ασθένειες επηρεαζόμενες από τον τρόπο ζωής, έχουν συσχετιστεί θετικά με τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου. Ειδικότερα, παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα,

υπέρταση, αυξημένη λήψη κορεσμένων λιπαρών οξέων) συσχετίζονται με ενεργοποιημένη NLRP3 σε μυελοειδή κύτταρα ασθενών με αθηρωμάτωση (Parsamanesh et al., 2019). Ορισμένες μελέτες, επίσης, αναφέρουν ότι τα βασικά στοιχεία του φλεγμονοσώματος NLRP3 είναι σημαντικά αυξημένα σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις (Parsamanesh et al., 2019).

Αρκετές αυτοφλεγμονώδεις ασθένειες έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες των φλεγμονοσωμάτων. Οι πιο γνωστές από αυτές, τα περιοδικά σύνδρομα σχετιζόμενα με την κρυοπυρίνη (CAPS), είναι αποτέλεσμα αυξημένης έκκρισης IL-1β ως συνέπεια ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο φλεγμονόσωμα NLRP3 (Bolívar et al., 2019). Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στο NLRC4 (οι οποίες οδηγούν σε αποδέσμευση της πρωτεΐνης από την αρχική κατάσταση αυτοκαταστολής της) οδηγούν, επίσης, σε αυξημένα επίπεδα IL-1β και IL-18 και προκαλούν ασθένειες με ευρύ φάσμα φαινοτυπικών φλεγμονωδών ευρημάτων (Bolívar et al., 2019). Παρομοίως, μεταλλάξεις στο NLRP1 οδηγούν κυρίως σε δερματική νόσο και αυτοφλεγμονώδη χαρακτηριστικά. Τέλος, δεν έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις του AIM2 που να αναγνωρίζονται ως αιτία αυτοφλεγμονής, γεγονός που ίσως οφείλεται στο διπλό ρόλο του AIM2 ως ογκοκατασταλτικό (Bolívar et al., 2019).

Συμπερασματικά, το εύρημα ότι οι μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας σε πρωτεΐνες σχηματισμού των φλεγμονοσωμάτων οδηγούν σε αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, υπογραμμίζει τη σημασία της ρύθμισης στη διαδικασία ενεργοποίησης της κασπάσης. Περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών μπορεί να επεκτείνει τους διαθέσιμους θεραπευτικούς στόχους για τον έλεγχο τέτοιων νοσημάτων.

### **A.3.1. Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυτοκινών στην ΟΑ**

Κατά την εξέλιξη της ΟΑ, η παραγωγή και η δραστηριότητα των διαφόρων κυτοκινών ποικίλλει ανάλογα με τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της ασθένειας. Η σημαντικότερη επίδραση των κυτοκινών έγκειται στο γεγονός ότι διαταράσσουν τις αναβολικές και καταβολικές διεργασίες οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές ειδικά για ιστούς που συχνά ανέχονται μεγάλο μηχανικό φορτίο όπως οι αρθρώσεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι παθοφυσιολογικές διαδικασίες που συμβαίνουν στις αρθρώσεις με ΟΑ εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από φλεγμονώδεις κυτοκίνες και άλλες ουσίες που εντείνουν τις καταβολικές επιδράσεις (Wojdasiewicz et al., 2014). Παρόλο που η αιτιολογία και η παθογένεση της ΟΑ γόνατος δεν έχει ακόμη καθοριστεί

πλήρως, οι κυτοκίνες IL-1β και IL-18 που, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παράγονται με την ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της OA (Zhao et al., 2018).

#### **A.3.1.1. Η IL-1β στην OA**

Η IL-1 θεωρείται μία από τις κυτοκίνες-κλειδιά στην OA καθώς ασκεί φλεγμονώδη καταβολική επίδραση είτε ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά με άλλους παράγοντες και πολλές από τις βιολογικές της δράσεις σχετίζονται με την παραγωγή των ROS (Rousset et al., 2015). Η σύνθεσή της στις αρθρώσεις γίνεται από χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, και μονοκύτταρα που υπήρχαν ήδη στην άρθρωση ή διείσδυσαν κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης. Ασθενείς με OA έχουν ανεβασμένα επίπεδα IL-1β στο αρθρικό υγρό, την αρθρική μεμβράνη, το χόνδρο και το στρώμα υποχόνδριου οστού (Wojdasiewicz et al., 2014). Πολλές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η IL-1β αναστέλλει τη σύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας από τα χονδροκύτταρα, παρεμβαίνοντας στη σύνθεση βασικών δομικών πρωτεϊνών όπως το κολλαγόνο τύπου 2. Επιπλέον αυξάνει τη σύνθεση αγκρεκανασών και μεταλλοπρωτεϊνών, κυρίως των MMP-1, MMP-3 και MMP-13, καθώς και των μεταλλοπρωτεϊνών ADAMTS (Rousset et al., 2015), οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αποδόμηση της υαλώδους μήτρας του χόνδρου και σε απώλεια λειτουργίας που χαρακτηρίζεται από έλλειψη λίπανσης και ανεπαρκή μετάδοση της μηχανικής φόρτισης της άρθρωσης (Jenei-Lanzl et al., 2019). Τα χονδροκύτταρα υπό τη δράση της IL-1β έχουν την τάση να γηράσκουν γρηγορότερα και να αποπίπτουν. Σε χονδροκύτταρα, η IL-1β είναι ικανή να προκαλέσει την έκκρισή της με αυτοκρινή δράση και να διεγείρει τη σύνθεση και άλλων κυτοκινών. Ακόμη έχει δειχθεί ότι αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα SMAD, που είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων του TGF-β. Τέλος, συμμετέχει στην παραγωγή και έκκριση ενζύμων και άλλων ουσιών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της OA, συμπεριλαμβανομένων των NO, φωσφολιπάσης A2 (PLA2), κυκλο-οξυγενάσης-2 (COX2) και προσταγλανδίνης E (PGE2). Κατά την εξέλιξη της νόσου η IL-1β διεγείρει την παραγωγή ROS που βλάπτουν περαιτέρω τον αρθρικό χόνδρο (Wojdasiewicz et al., 2014).

### **A.3.1.2. Η IL-18 στην ΟΑ**

Η IL-18 παράγεται στις αρθρώσεις από χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και μακροφάγα. Τα επίπεδά της έχουν βρεθεί ότι είναι αυξημένα στο αρθρικό υγρό, στον αρθρικό υμένα και στον ορό ασθενών με ΟΑ, ενώ επίσης έχουν συσχετιστεί και με τη βαρύτητα της ασθένειας. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί των γονιδίων τόσο της IL-18 όσο και του υποδοχέα της προκαθορίζουν την ανάπτυξη της ΟΑ (Wojdasiewicz et al., 2014). Όπως και η IL-1β, η IL-18 επάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1, MMP-3 και MMP-13 στα χονδροκύτταρα. Εκτός από την αύξηση της σύνθεσης ενζύμων αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου, αναστέλλει την παραγωγή πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τύπου 2 (Zhao et al., 2018). Επίσης τα χονδροκύτταρα υπό την επίδραση της IL-18 παρουσιάζουν μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές των κυττάρων που αποπίπτουν. Τέλος, η IL-18 επηρεάζει τα χονδροκύτταρα αυξάνοντας την παραγωγή μιας σειράς ενώσεων και ενζύμων όπως IL-6, iNOS, PGE2, COX2 και VEGF (Wojdasiewicz et al., 2014).

### **A.3.2. Ο ρόλος του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην ΟΑ**

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται όλο και περισσότερη έρευνα σχετικά με την ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων και τη συμμετοχή τους σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή όπως η ΟΑ. Δεδομένου του πρωταρχικού ρόλου του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην ωρίμανση της IL-1β και του ρόλου της IL-1β στην παθολογία της ΟΑ, οι έρευνες έχουν στραφεί κυρίως προς το συγκεκριμένο φλεγμονόσωμα.

Αρχικά, αποδείχθηκε τόσο από *in vitro* όσο και από *in vivo* δεδομένα ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 ενεργοποιείται από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και εξαρτάται από την εκροή  $K^+$  και τη φαγοκυττάρωση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 συμμετέχει στην παθολογική επίδραση των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη στην ΟΑ και υποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεση της νόσου (Jin et al., 2011).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρόλος της IL-1β και του φλεγμονοσώματος στην αποδόμηση του χόνδρου σε ασθενείς με ΟΑ και μοντέλα ποντικών και βρέθηκε ότι η IL-1β που συμμετέχει στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου πιθανόν δεν παράγεται από τον ίδιο το χόνδρο αλλά από τον αρθρικό ιστό. Αυτό αποδεικνύει την επίδραση του αρθρικού ιστού στην αποδόμηση του χόνδρου μέσω της ενεργοποίησης του

φλεγμονοσώματος NLRP3 (Bougault et al., 2012). Επιπλέον αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης NLRP3 έχει βρεθεί σε δείγματα αρθρικού υμένα που ελήφθησαν από ασθενείς με OA συγκριτικά με υγιή άτομα. Η πρωτεϊνική έκφραση, επίσης, συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ενζύμων για την παραγωγή ROS, υπογραμμίζοντας τη συσχέτιση αυτών με την OA και την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 (Clavijo-Cornejo et al., 2016).

Σε προηγούμενη μελέτη, οι Denoble και συνεργάτες βρήκαν ότι το ουρικό οξύ ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα NLRP3 με αποτέλεσμα την αυξημένη έκκριση IL-1β και IL-18. Το ουρικό οξύ, η IL-1β και IL-18 στο αρθρικό υγρό συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της OA γόνατος, προτείνοντας ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια των φλεγμονοσωμάτων συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της OA (Denoble et al., 2011).

Επιπλέον, το 2018 οι Shi και συνεργάτες έδειξαν ότι η αύξηση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και του ATP στο χώρο της άρθρωσης υποβοηθά την ανάπτυξη OA γόνατος μέσω του φλεγμονοσώματος NLRP3, ενώ η καταστολή του φλεγμονοσώματος μπορεί να ασκεί προστατευτική δράση (Shi et al., 2018). Ακόμη, πρόσφατη μελέτη (Zhao et al., 2018) υποστήριξε ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της OA γόνατος, ειδικά μέσω πυρόπτωσης των αρθρικών κυττάρων παρόμοιων με ινοβλάστες (Fibroblast-like synoviocytes, FLS).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη των Fioravanti και συνεργατών οι οποίοι διερεύνησαν τη συμμετοχή των IL-1β και NLRP3 στη διαβρωτική και μη διαβρωτική OA χεριού σε ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, παρατηρήθηκαν ανεπαρκώς ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις IL-1β και ελάχιστη δραστηριότητα του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε ασθενείς με OA χεριού, προτείνοντας χαμηλού βαθμού συστημική φλεγμονή χωρίς όμως να αποκλείουν τη συμμετοχή αυτών των παραγόντων σε τοπικό επίπεδο (Fioravanti et al., 2019).

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν μία πιθανή συμμετοχή του φλεγμονοσώματος NLRP3 στην παθογένεια της OA. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί ο ρόλος και η ενεργοποίηση του παραπάνω φλεγμονοσώματος σε χονδροκύτταρα ασθενών με OA.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου της φλεγμονής στην ΟΑ μέσω ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, διερευνήθηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του φλεγμονοσώματος NLRP3.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκαν:

1. Η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων *NLRP3*, *ASC*, *IL-18* και *IL-1β* σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα
2. Η πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων *NLRP3*, *ASC* και *Casp-1* σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα
3. Ο ρόλος του NLRP3 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *ASC*, *IL-18* και *IL-1β* σε ΟΑ χονδροκύτταρα μετά από την αδρανοποίηση του γονιδίου *NLRP3*.

## **Γ.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Γ.1.1. Συλλογή δειγμάτων**

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπεδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 17 δείγματα αρθρικού χόνδρου από άτομα με ΟΑ γόνατος. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χονδροδυσπλασία, σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ακτινογραφικός έλεγχος πριν υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική και οι οστεοαρθριτικές αλλοιώσεις αξιολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence. Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν βαθμολογία μεγαλύτερη του 3, ενώ το 90% αυτών είχαν βαθμολογία 4.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 10 δείγματα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου που ελήφθησαν από άτομα που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση για σοβαρά κατάγματα ή ακρωτηριασμό και δεν είχαν ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων ή αλλοιώσεων συμβατών με ΟΑ όπως προέκυψε μετά από ακτινολογικό έλεγχο.

### **Γ.1.2. Κυτταροκαλλιέργειες**

Όλες οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Bluebeam 4, Class II Biohazard Cabinet). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια χονδροκυττάρων ήταν το DMEM/F-12 εμπλουτισμένο με 10% Fetal Bovine Serum (FBS) και 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P/S). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο (Heraeus Instruments, Function Line) στους 37°C με 95% αέρα και 5% CO<sub>2</sub>. Για τις φυγοκεντρήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Megafuse 1.0R/Heraeus Instruments (για falcon) και Biofyge fresco/Heraeus Instruments (για eppendorf). Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης Axiovert S100.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες είναι τα παρακάτω:

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM/F-12 1:1 1X, Gibco BRL, UK). Περιέχει L-glutamine και 15mM HEPES.

- Fetal Bovine Serum/FBS (Gibco BRL, UK)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffered Solution 1X/PBS (Lonza BioWhittaker)
- Προνάση (Roche)
- Κολλαγενάση (Roche)
- 0,05% Trypsin-EDTA 1X (Gibco )

#### **Γ.1.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων**

Για κάθε δείγμα, ο ιστός υπεβλήθη σε ενζυμική επεξεργασία με προνάση και κολλαγενάση ώστε να καταστεί δυνατή η απελευθέρωση των χονδροκυττάρων. Η προνάση είναι ένα μείγμα μη ειδικών ενδο- και εξω- νουκλεασών που συμβάλλει στη διάσπαση των γλυκοπρωτεϊνών για την παραγωγή γλυκοπεπτιδίων και την απελευθέρωση ινών κολлагόνου. Η κολλαγενάση συντελεί στη διάσπαση των ινιδίων κολлагόνου οπότε οδηγεί στο διαχωρισμό των χονδροκυττάρων από τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ξέπλυμα του ιστού με PBS ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα από το χειρουργείο
2. Τεμαχισμός του τμήματος με τη χρήση νυστεριού και λαβίδας
3. Τοποθέτηση των ιστοτεμαχίων του χόνδρου σε τρυβλίο με 2mL πλήρες DMEM/F-12 και 200μL προνάση
4. Ανάδευση και τοποθέτηση στον κλίβανο στους 37°C για 30 λεπτά
5. Αφαίρεση της προνάσης και προσθήκη 2mL πλήρες DMEM/F-12 και 200μL κολλαγενάση
6. Επώαση στους 37°C για 24h
7. Την επόμενη ημέρα: μεταφορά σε σωληνάρια των 15mL και φυγοκέντρωση στις 1200rpm για 10 λεπτά και αφαίρεση υπερκειμένου
8. Επαναδιάλυση του ιζήματος με πλήρες θρεπτικό υλικό, μεταφορά σε φλάσκες των 25cm<sup>3</sup> και επώαση στους 37°C.

Τα χονδροκύτταρα αρχικά είναι στρογγυλά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από διάστημα περίπου 48 ωρών προσκολλώνται στο τοίχωμα της φλάσκας οπότε και αποκτούν πεπλατυσμένο, πολυγωνικό σχήμα.



### **Γ.1.2.2. Χώρισμα κυττάρων (Split)**

Το κυτταρικό χώρισμα πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας σε ποσοστό περίπου 80%. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται θρυψίνη η οποία καταστρέφει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων στο τοίχωμα της φλάσκας και σε γειτονικά τους κύτταρα.

Αναλυτικά ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού
2. Ξέπλυμα του τοιχώματος με 5mL PBS προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα θρεπτικού υλικού (ο εμβρυϊκός ορός απενεργοποιεί τη θρυψίνη)
3. Επώαση με 1mL θρυψίνη στους 37°C για 10 λεπτά με κλειστό καπάκι
4. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η αποκόλληση των κυττάρων
5. Προσθήκη 5mL πλήρους DMEM/F-12 ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
6. Μοίρασμα σε φλάσκες και προσθήκη θρεπτικού υλικού μέχρι τελικού όγκου 5mL

### **Γ.1.2.3. Αποθήκευση κυττάρων**

Τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -150°C. Η κατάψυξή τους είναι σταδιακή.

1. Θρυψινοποίηση των κυττάρων που με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στην παραπάνω ενότητα
2. Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Απομάκρυνση υπερκειμένου, επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5mL PBS και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες
4. Απομάκρυνση υπερκειμένου
5. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2mL μείγματος θρεπτικών υλικών (60% DMEM, 30% FBS, 10% DMSO) και μεταφορά σε κρυοφιαλίδιο (cryovial)
6. Τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου αρχικά στους -20°C για 3 ώρες, στη συνέχεια στους -80°C για 2 ημέρες και τέλος φύλαξή του στους -150°C

#### **Γ.1.2.4. Απόψυξη κυττάρων**

Σε αντίθεση με τη σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα. Πιο συγκεκριμένα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C για λίγο και μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο με 2mL θρεπτικό υλικό
2. Φυγοκέντρωση στις 1200rpm για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Αφαίρεση υπερκειμένου, προσθήκη PBS και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες
4. Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναδιάλυση του ιζήματος σε θρεπτικό υλικό και μεταφορά σε φλάσκα

#### **Γ.1.3. Απομόνωση RNA από κύτταρα**

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα έγινε με το αντιδραστήριο TRIzol, το οποίο δρα διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA λόγω αναστολής της δραστηριότητας των RNασών, ενώ ταυτόχρονα διασπά τα κύτταρα και τα λοιπά κυτταρικά συστατικά.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA από κύτταρα είναι:

- TRIzol Reagent (Invitrogen)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπρυλική αλκοόλη (Amresco)
- Αιθανόλη 75% (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρατίθεται παρακάτω:

##### Ομογενοποίηση

1. Αφαίρεση θρεπτικού και προσθήκη 500μL Trizol, χωρίς ξέπλυμα με PBS
2. Μεταφορά σε eppendorf, vortex και διατήρηση στους -80°C
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου

##### Διαχωρισμός φάσεων

4. Προσθήκη 200μL χλωροφόρμιο και vortex για 15 δευτερόλεπτα
5. Επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

6. Φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά από τη φυγοκέντρωση είναι διακριτές 3 φάσεις: η ανώτερη υδατική φάση περιέχει το RNA, η μεσόφαση το DNA και η υποκείμενη οργανική φάση τις πρωτεΐνες, τις κυτταρικές μεμβράνες, τα θραύσματα οργανιδίων κ.ά.
7. Μεταφορά της ανώτερης φάσης σε νέο eppendorf

#### Κατακρήμνιση

8. Προσθήκη 250μL παγωμένη ισοπρυλική αλκοόλη και ήπια ανάδευση με το χέρι
9. Επώαση στους -20°C για 10 λεπτά
10. Φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 10 λεπτά στους 4°C

#### Έκπλυση

11. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 1mL παγωμένη αιθανόλη 70-75%
12. Φυγοκέντρωση στις 7500rpm για 10 λεπτά στους 4°C

#### Επαναδιάλυση

13. Αφαίρεση υπερκειμένου και στέγνωμα του RNA σε διηθητικό χαρτί
14. Τοποθέτηση στους 37°C με ανοιχτά καπάκια για περίπου 1 ώρα
15. Διάλυση του RNA σε 30μL RNase-free H<sub>2</sub>O και επώαση για 10 λεπτά στους 55°C στο υδατόλουτρο
16. Πολύ καλή ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C

### **Γ.1.4. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Μετά την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα, συντίθεται το cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, ένα μονόκλωνο μόριο RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό είναι μία πολυμεράση που έχει την ικανότητα να συνθέτει τη συμπληρωματική της αλυσίδα cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μία αλυσίδα RNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται σε τυχαίες θέσεις του RNA (random primers).

Τα διαλύματα για τη σύνθεση του cDNA είναι:

- Random primers (Takara Bio)

- 5x first Strand Buffer (Invitrogen)
- $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen)
- DTT 0,1M (Invitrogen)
- dNTPs 50mM (Invitrogen)
- SuperScript III Reverse Transcriptase 10000U (200U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό / ddH<sub>2</sub>O (DEMO S.A.)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Παρασκευή του μείγματος

RNA	1,5 $\mu\text{L}$
Random primers	1,0 $\mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O	12,5 $\mu\text{L}$

2. Τοποθέτηση στο θερμοκυκλοποιητή (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) για επώαση στους 70°C για 10 λεπτά και έπειτα επώαση στον πάγο για 5 λεπτά

3. Παρασκευή του master mix με την αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο περιέχει τα παρακάτω συστατικά

5x buffer	4,0 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$	2,0 $\mu\text{L}$
DTT	2,0 $\mu\text{L}$
dNTPs	2,0 $\mu\text{L}$
SuperScript III	0,5 $\mu\text{L}$

\* Οι ποσότητες που αναγράφονται είναι αυτές που απαιτούνται για μία αντίδραση

4. Προσθήκη 10,5 $\mu\text{L}$  από το master mix σε κάθε δείγμα

5. Τοποθέτηση στο θερμοκυκλοποιητή και εκτέλεση του προγράμματος που ακολουθεί

Θερμοκρασία	Χρόνος
20°C	10'
42°C	45'
99°C	3'
18°C	5'
4°C	$\infty$

6. Τέλος, τα δείγματα αραιώνονται με 30 $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O.

### **Γ.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR) ή αλλιώς Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR) είναι μία τεχνική μοριακής βιολογίας που βασίζεται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και την ποσοτικοποίηση ενός τμήματος DNA-στόχου. Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, η ενίσχυση του τμήματος DNA-στόχου καταγράφεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας και όχι στο τέλος αυτής.

Η Real-time PCR πραγματοποιείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή που έχει την ικανότητα να ανιχνεύει το φθορισμό που εκπέμπεται από το φθοροφόρο έπειτα από διέγερση κάθε δείγματος με δέσμη φωτός καθορισμένου μήκους κύματος. Επιπλέον ο θερμικός κυκλοποιητής έχει την ικανότητα να εναλλάσσει ταχύτατα τη θερμοκρασία αξιοποιώντας με αυτό τον τρόπο τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων και της DNA πολυμεράσης. Τυπικά, η διαδικασία της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους (συνήθως 30-50), κάθε ένας από τους οποίους περιλαμβάνει 3 στάδια: στο πρώτο, η δίκλωνη έλικα του DNA αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία κοντά στους 95°C, στο δεύτερο οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο σε θερμοκρασία 50-60°C και στο τρίτο η DNA πολυμεράση συνθέτει μία νέα μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή σε θερμοκρασία μεταξύ 68-72°C.

Στη Real-time PCR, η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου, οπότε καταγράφεται το αυξανόμενο ποσό του DNA. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος βασίζονται στη χρήση φθορίζουσών ουσιών όπως (α) οι μοριακοί σηματοδότες, (β) τα μόρια υβριδισμού, (γ) τα υδρολυόμενα μόρια και (δ) οι χρωστικές προσδεόμενες στο DNA (DNA binding dyes). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική βασίζεται στην ανίχνευση μιας ειδικής φθορίζουσας χρωστικής, της SYBR Green, που προσδένεται σε δίκλωνο DNA. Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να επιβεβαιωθεί με την καμπύλη τήξεως ή αποδιάταξης (melting curve ή dissociation curve) του προϊόντος. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας το φθορισμό που λαμβάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ) του πολλαπλασιαζόμενου μορίου. Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση, είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

Η ποσοτικοποίηση του προϊόντος μπορεί να είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης και προϋποθέτει τη συμβολή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει είτε με πρότυπη καμπύλη είτε με τη συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT method). Η συγκριτική CT μέθοδος βασίζεται σε αριθμητικούς τύπους. Το ποσό του μορίου-στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα (γονίδιο αναφοράς) σε σχέση με ένα μόριο-ρυθμιστή δίνεται από τη σχέση  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  όπου RQ: η σχετική ποσοτικοποίηση

$\Delta\Delta Ct$ : η διαφορά του  $\Delta Ct$  του δείγματος από το  $\Delta Ct$  του δείγματος αναφοράς

$\Delta Ct$ : η διαφορά του Ct του γονιδίου από το Ct του γονιδίου αναφοράς

Ct: το σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε Real-time PCR για τα γονίδια *GAPDH* (εσωτερικός μάρτυρας/γονίδιο αναφοράς), *NLRP3*, *ASC*, *IL-18* και *IL-1 $\beta$* . Οι εκκινητές για κάθε γονίδιο φαίνονται στον Πίνακα 3. Τα αντιδραστήρια (στις κατάλληλες ποσότητες) που χρησιμοποιήθηκαν και τα προγράμματα κυκλοποίησης που ακολουθήθηκαν για κάθε γονίδιο φαίνονται στους Πίνακες 4 και 5, αντίστοιχα. Έγινε χρήση του μηχανήματος 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) και το αντίστοιχο πακέτο λογισμικού για ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης 7300 System SDS Software.

**Πίνακας 3.** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο για την Real-time PCR.

ΓΟΝΙΔΙΟ		ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ
<i>GAPDH</i>	forward	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
	reverse	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
<i>NLRP3</i>	forward	5'-CTTCTCTGATGAGGCCCAAG-3'
	reverse	5'-GCAGCAAACCTGGAAAGGAAG-3'
<i>ASC</i>	forward	5'-AAGCCAGGCCTGCACTTTAT-3'
	reverse	5'-CTGGTACTGCTCATCCGTCA-3'
<i>IL-18</i>	forward	5'-CACCAGAGGTCAGGTGTTCA-3'
	reverse	5'-TCTACCTCCGGAGTGCAAGT-3'
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	forward	5'-ACGATGCACCTGTACGATCA-3'
	reverse	5'-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3'

**Πίνακας 4.** Αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
SYBR Green Master Mix	5,0
forward primer	0,3
reverse primer	0,3
dH <sub>2</sub> O	2,4
cDNA	2,0

**Πίνακας 5.** Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη	95oC	2΄
Αποδιάταξη	95oC	15΄΄
Υβριδοποίηση-σύνδεση εκκινητών	60oC	15΄
Επιμήκυνση	72oC	1΄
Τελική επιμήκυνση	72oC	10΄

#### Γ.1.6. Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος RIPA. Το RIPA επιτρέπει την αποτελεσματική λύση των κυττάρων και τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, αποφεύγοντας την αποικοδόμηση τους.

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα έγινε χρήση των διαλυμάτων:

- RIPA buffer
- Αναστολείς πρωτεϊνολυτικών (Roche)

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι:

1. Αφαίρεση θρεπτικού και ξέπλυμα με 2mL PBS
2. Προσθήκη 500μL θρυψίνη και επώαση στους 37°C για 10 λεπτά για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
3. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο
4. Προσθήκη 1,5mL πλήρους θρεπτικού DMEM/F-12
5. Μεταφορά σε σωληνάριο και φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 15 λεπτά
6. Αφαίρεση θρεπτικού και προσθήκη 1mL PBS
7. Φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 15 λεπτά και αφαίρεση υπερκείμενου

8. Προσθήκη 8μL αναστολείς πρωτεϊνών και 80μL RIPA buffer
9. Πολύ καλή ανάδευση
10. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά με vortex κάθε 10 λεπτά
11. Φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 15 λεπτά
12. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο σωληνάριο και αποθήκευση στους -80°C

#### **Γ.1.7. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα κύτταρα έγινε με τη μέθοδο Bradford και την χρήση του πακέτου της Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant G-250 όταν δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Αρχικά, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη συσχέτισης απορρόφησης και πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Διάλυση ποσοτήτων από 1μg έως 20μg αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) σε 800μL dH<sub>2</sub>O
2. Προσθήκη 200μL χρωστικής σε κάθε δείγμα
3. Επώαση μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
5. Μεταφορά σε κυβέτα και φωτομέτρηση στα 595nm (φωτόμετρο: PerkinElmer precisely, Lamda 25, UV/VIS Spectrometer)
6. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προστέθηκαν 5μL διαλύματος πρωτεΐνης από κάθε δείγμα σε 495nm διαλύματος Bradford και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν μετά τη φωτομέτρηση συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και υπολογίστηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης κάθε δείγματος.

#### **Γ.1.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blot)**

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (ή αλλιώς Western blot) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των



αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS–πολυακρυλαμιδίου
2. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα
4. Ανίχνευση των πρωτεϊνών

Για τη διαδικασία του Western blot χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Separating gel και Stacking gel (30% acrylamide/0.8% bisacrylamide, 4x Tris-CI/SDS, dH<sub>2</sub>O, 10% ammonium persulfate, TEMED)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Pre-Stained Protein ladder, Thermo Scientific)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης δις απεσταγμένο νερό / ddH<sub>2</sub>O (DEMO S.A.)
- Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer): methanol, wet transfer, dH<sub>2</sub>O
- Ponceau
- Διάλυμα πλύσης TBS-T: 900mL dH<sub>2</sub>O, 100mL 10x TBS, 1mL Tween
- Διάλυμα αποκλεισμού (blocker): γάλα σκόνη, TBS 1x
- Αντισώματα (NovusBio)
- Ενισχυτικά σήματος:
  - (α) Western Lighting Plus-ECL (PerkinElmer)
  - (β) Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

#### **Γ.1.8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου**

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους. Η διάλυση των πρωτεϊνών σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS) επιτρέπει το διαχωρισμό τους κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο,

περίπου ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθιστώντας το αρχικό φορτίο αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε λεπτή κατακόρυφη πηκτή πολυακρυλαμίδιου με κατεύθυνση ροής από πάνω προς τα κάτω.

#### Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε αποδιάταξή τους. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μgr. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

Πρωτεΐνη	x μL
Sample buffer	5 μL
Reducing buffer	2 μL
ddH <sub>2</sub> O	y μL (μέχρι τελικό όγκο 25μL)

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95°C για 5 λεπτά.

#### Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Για την διαχωρισμό των πρωτεϊνών απαιτείται πήγμα πολυακρυλαμίδης το οποίο αποτελείται από 2 διακριτά μέρη:

- Πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel): Στόχος του είναι η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών έτσι ώστε να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση από το ίδιο σημείο.
- Πηκτή διαχωρισμού (Separation gel) 10%: Σκοπός του είναι ο διαχωρισμός τις πρωτεϊνών.

Η διαδικασία για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Στήσιμο της ηλεκτροφορητικής συσκευής (Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra System) και προσθήκη ειδικού buffer ηλεκτροφόρησης.
2. Φόρτωμα των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Στο πρώτο από αριστερά πηγαδάκι φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.
3. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στα 120V για περίπου 50 λεπτά

### **Γ.1.8.2. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου στη μεμβράνη πολυβινυλίου (PVDF) έγινε χρήση της συσκευής Trans-Blot Wet Transfer Cell (Bio-Rad).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Επώαση της μεμβράνης σε μεθανόλη για 15 δευτερόλεπτα ώστε να ενεργοποιηθεί
2. Επώαση των παρακάτω υλικών σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για 20 λεπτά: 2 ειδικά «σφουγγαράκια», 2 διηθητικά χαρτιά Whatman, πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεμβράνη PVDF
3. Η διάταξη για την ηλεκτρομεταφορά είναι: 1 σφουγγαράκι → 1 χαρτί Whatman → η πηκτή πολυακρυλαμίδιου → η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης → 1 χαρτί Whatman → 1 σφουγγαράκι
4. Τοποθέτηση της συσκευής στη δεξαμενή με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)
5. Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 400mA για 1 ώρα

Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη βάφτηκε με Ponceau μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολούθησαν διαδοχικά ξεπλύματα της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T.

### **Γ.1.8.3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα και ανίχνευση πρωτεϊνών**

Μετά την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών ακολούθησε αναγνώριση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με αντίσωμα ειδικό για αυτή, η οποία αναγνωρίζεται ως αντιγόνο. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP). Με την αξιοποίηση της τεχνικής χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence, ECL), η αντίδραση της HRP με το παρεχόμενο υπόστρωμα δημιουργεί μία σκοτεινή γραμμή σε φωτογραφικά φιλμ στα οποία εκτίθεται η μεμβράνη. Αναλυτικά, η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα αποκλεισμού 5% (blocker) για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του

γάλακτος. Έτσι, αποφεύγονται μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη.

2. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
3. Ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C
4. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
5. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (αναδευτήρας: IKA VIBRAX VXR basic, Janke & Kunkel)
6. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)

\* Τα αντισώματα έχουν αραιωθεί σε διάλυμα αποκλεισμού 5%.

**Πίνακας 6.** Αναλυτικά στοιχεία των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών (Western blot).

Πρωτογενή αντισώματα	Εταιρεία	Κωδικός	Είδος	Αραίωση
GAPDH	Calbiochem, Burlington, USA	CB1001	Mouse	1:1000
NLRP3	Novus Biologicals, Abingdon, UK	NBP2-12446	Rabbit	1:1000
ASC	Novus Biologicals, Abingdon, UK	NBP1-78977	Rabbit	1:500
Caspase-1	Novus Biologicals, Abingdon, UK	NB100-56565	Mouse	1:500

**Πίνακας 7.** Στοιχεία των δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών (Western blot).

Δευτερογενή αντισώματα	Αραίωση
anti-mouse	1:5000
anti-rabbit	1:2000

Ακολουθεί η ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:

1. Επώαση της μεμβράνης με ενισχυμένο σήμα για 1-3 λεπτά
2. Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί και μεταφορά της μεμβράνης σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance 4.7), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή

3. Εκτέλεση του αντίστοιχου προγράμματος από τον υπολογιστή και αναγνώριση του σήματος των ζωνών

#### **Γ.1.9. Διαδικασία αδρανοποίησης του γονιδίου *NLRP3* (siRNA κατά *NLRP3*)**

Τα siRNAs είναι εξωγενή μόρια δίκλωνου RNA (dsRNA) μήκους 21-23 ζεύγη βάσεων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική της παρεμβολής του RNA (RNA interference, RNAi). Πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιείται συχνά για την αδρανοποίηση γονιδίων-στόχων σε καλλιέργειες κυττάρων από θηλαστικά. Η τεχνική βασίζεται στην εισαγωγή σε ένα κύτταρο dsRNAs με αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία του υπό αδρανοποίηση γονιδίου. Το εισαγόμενο RNA αναγνωρίζεται ως «ξένο» και καταστρέφεται από το κύτταρο όπως συνεπώς και το mRNA με συμπληρωματική αλληλουχία. Τα siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν συμπληρωματικά προς την αλληλουχία του γονιδίου *NLRP3*. Η εισαγωγή τους στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια λιποφεκταμίνης, ενός χημικού διαμολυντικού που αποτελείται από κατιονικά λιπίδια (τα ίδια που συνιστούν τη διπλαστοϊβάδα φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης). Αυτά σχηματίζουν λιποσώματα (θετικό φορτίο) που προσλαμβάνουν τα μόρια siRNAs (αρνητικό φορτίο) και το σύμπλοκο εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης. Μετά την αποσυναρμολόγηση του όψιμου ενδοσώματος τα μόρια siRNAs απελευθερώνονται και ασκούν τη δράση τους.

Τα διαλύματα για την αδρανοποίηση του γονιδίου *NLRP3* είναι:

- OPTI-MEM I 1X (Gibco)
- *NLRP3* Silencer pre-designed siRNA και Nuclease-Free Water (Thermo Fisher Scientific)
- Lipofectamine 2000 (1mg/mL) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

Το πρωτόκολλο για τη διαδικασία siRNA κατά του γονιδίου *NLRP3* έχει ως εξής:

1. Μία μέρα πριν το siRNA τα κύτταρα επωάζονται με 2mL DMEM/F-12 + FBS, χωρίς P/S
2. Για κάθε well: Προσθήκη 500μL Optimem και 5μL siRNA σε ένα eppendorf και 500μL Optimem και 5μL λιποφεκταμίνης σε ένα άλλο
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά

4. Ανάμιξη των 2 παραπάνω mixes και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, προκειμένου να δημιουργηθεί το σύμπλοκο (λιπόσωμα+siRNA)
5. Μεταφορά 1mL του mix στο well και προσθήκη ακόμη 1mL Optimem
6. Επώαση στους 37°C για 4-6 ώρες
7. Αφαίρεση του Optimem, προσθήκη 2mL DMEM/F-12 + FBS και επώαση στους 37°C για το διάστημα που μας ενδιαφέρει

#### **Γ.1.10. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS 24 Software. Αρχικά, ελέγχθηκε εάν το δείγμα του πληθυσμού ακολουθεί κανονική κατανομή και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι έλεγχοι σύγκρισης των τιμών μεταξύ 2 ομάδων (Mann-Whitney U test, Paired Sample T-test, Wilcoxon Signed-Rank test). Οι συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούν στην έκφραση mRNA μεταξύ OA και φυσιολογικών χονδροκυττάρων, και την έκφραση mRNA σε OA χονδροκύτταρα έπειτα από siRNA κατά *NLRP3* (untransfected-48h). Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0.05.

## Γ.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

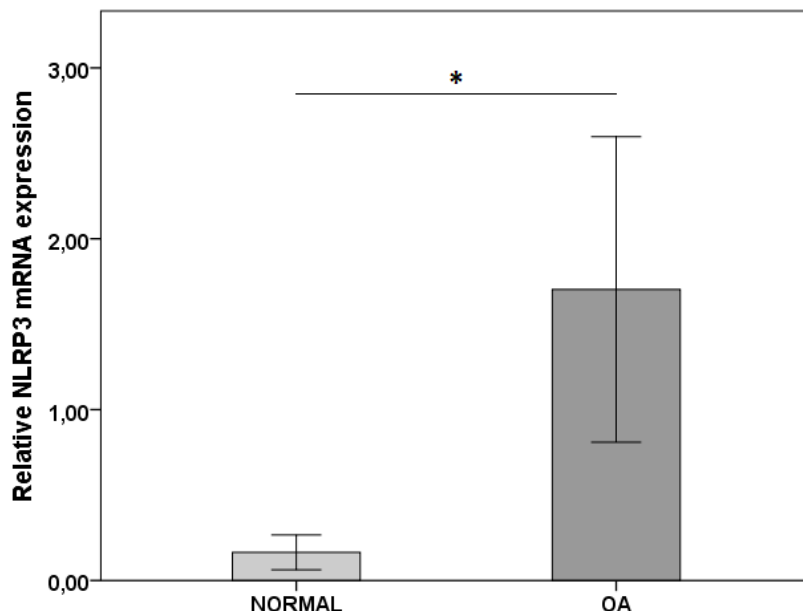
### Γ.2.1. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *NLRP3* και *ASC* σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *NLRP3* και *ASC*, σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου και έγινε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το *GAPDH*.

Έγινε προσπάθεια για μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης και των δύο αυτών γονιδίων (*NLRP3*, *ASC*) με Western blot. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

#### Γ.2.1.1. Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *NLRP3*

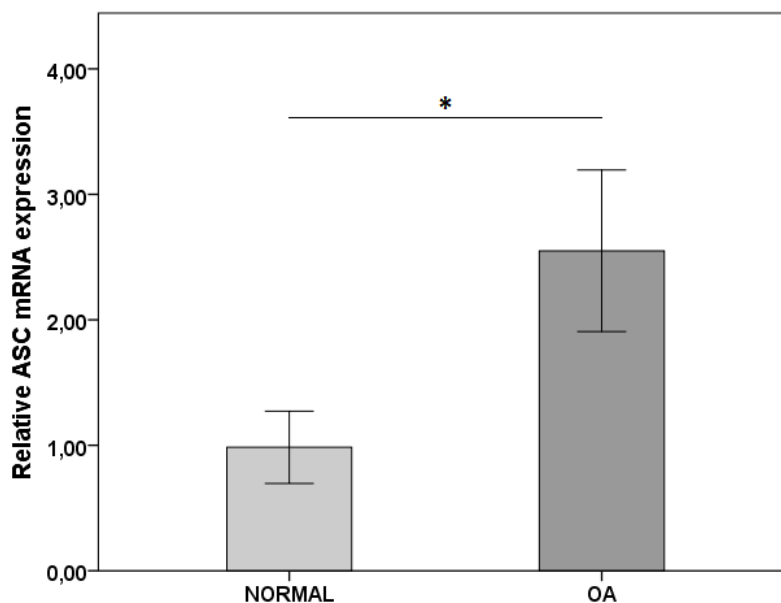
Όσον αφορά στο γονίδιο *NLRP3*, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA στα OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p = 0.015$ ) (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NLRP3* σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα, έπειτα από κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. \* :  $p$ -value  $\leq 0.05$  (μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U,  $p$ -value = 0.015)

### Γ.2.1.2. Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου ASC

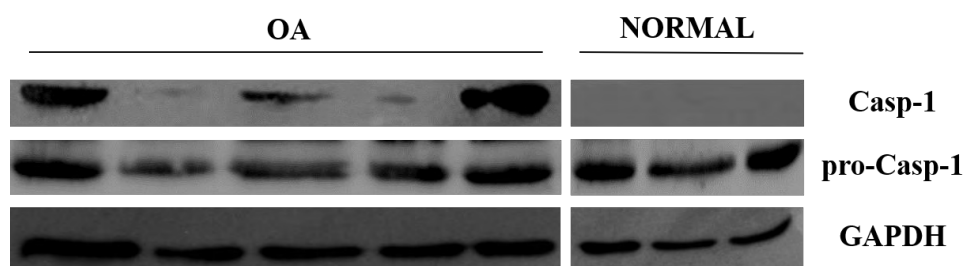
Όσον αφορά στο γονίδιο ASC, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA στα OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p = 0.035$ ) (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου ASC σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα, έπειτα από κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. \* :  $p$ -value  $\leq 0.05$  (μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U,  $p$ -value = 0.035)

### Γ.2.2. Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της κασπάσης-1

Με την τεχνική του Western blot διερευνήθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης-1, βασικού μορίου που προκαλεί τη μετατροπή των πρόδρομων μορφών των προφλεγμονωδών κυτοκινών, προ-IL-18 και προ-IL-1 $\beta$ , στις ώριμες μορφές τους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, στα OA χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της ώριμης μορφής της κασπάσης-1 (Casp-1), κάτι που δε φαίνεται να συμβαίνει στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε η ώριμη μορφή της παρά μόνο η πρόδρομη (pro-Casp-1).

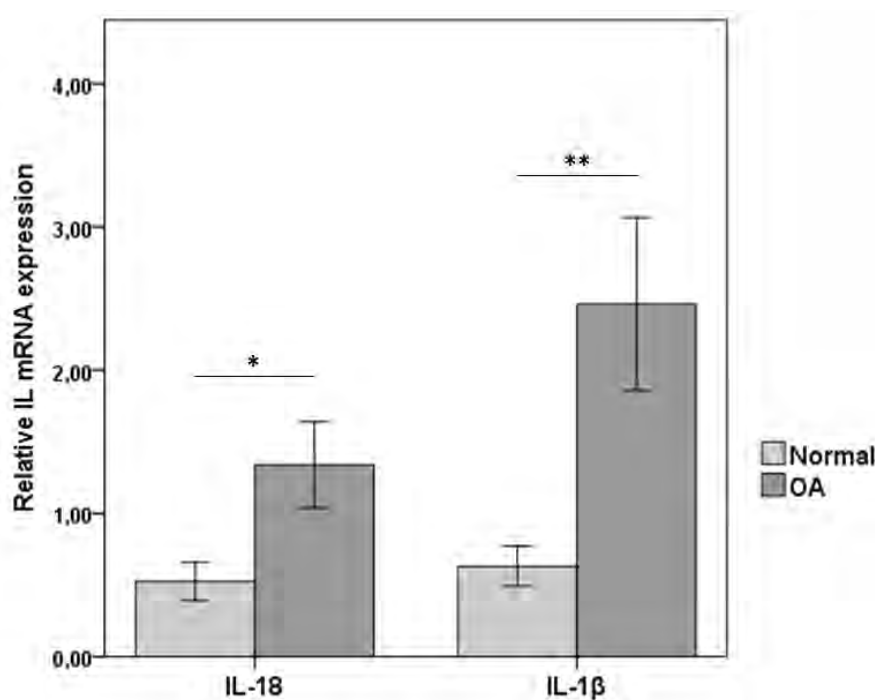


**Εικόνα 8.** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων προ-κασπάσης-1 και κασπάσης-1 σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα.



### Γ.2.3. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *IL-18* και *IL-1β* σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Όσον αφορά στα γονίδια των ιντερλευκινών *IL-18* και *IL-1β* παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA *IL-18* και *IL-1β* στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p = 0.031$  και  $0.002$  αντίστοιχα) (Εικόνα 9).



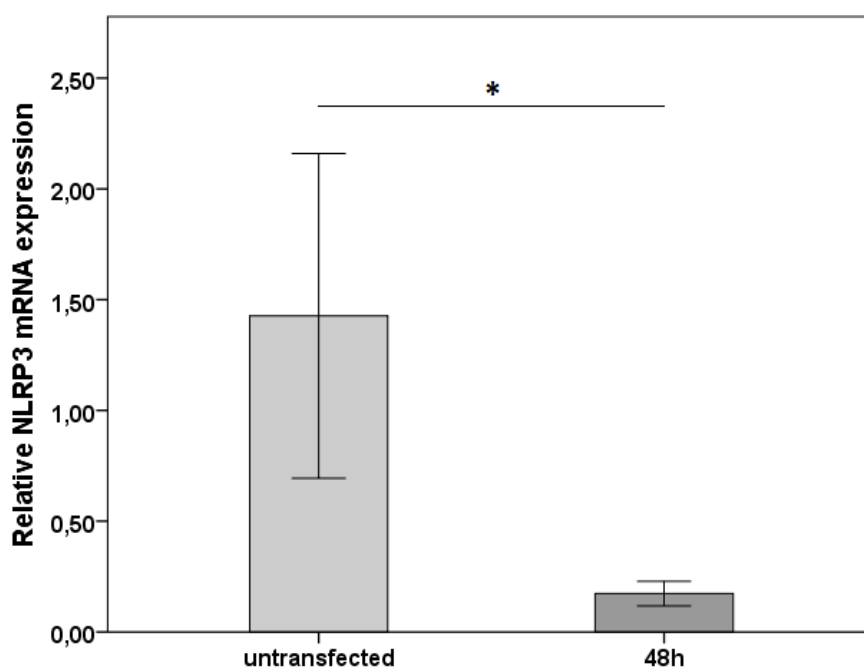
**Εικόνα 9.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *IL-18* και *IL-1β* σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα, έπειτα από κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. \*:  $p\text{-value} \leq 0.05$ , \*\*:  $p\text{-value} \leq 0.01$  (μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U,  $p\text{-value}_{(IL-18)} = 0.031$  και  $p\text{-value}_{(IL-1\beta)} = 0.002$ )

### Γ.2.4. Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *NLRP3*, *ASC*, *IL-18* και *IL-1β* σε ΟΑ χονδροκύτταρα μετά από siRNA κατά *NLRP3*

Στη συνέχεια, ΟΑ χονδροκύτταρα διαμολύνθηκαν με *NLRP3* siRNA και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων mRNA των τεσσάρων γονιδίων μεταξύ μη διαμολυσμένων κυττάρων (untransfected) και κυττάρων διαμολυσμένων με siRNA κατά *NLRP3* μετά από 48 ώρες (48h). Ειδικότερα, RNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα καλλιέργειας σε πηγαδάκια 6-wells, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου και έγινε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το *GAPDH*. Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

Πρώτα ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NLRP3* προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η διαμόλυνση με το siRNA ήταν επιτυχής. Πράγματι, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τα επίπεδα mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν μειωμένα στα χονδροκύτταρα με το siRNA μετά από 48 ώρες σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα χονδροκύτταρα (Εικόνα 10) και, μάλιστα, διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $p=0.028$ ).

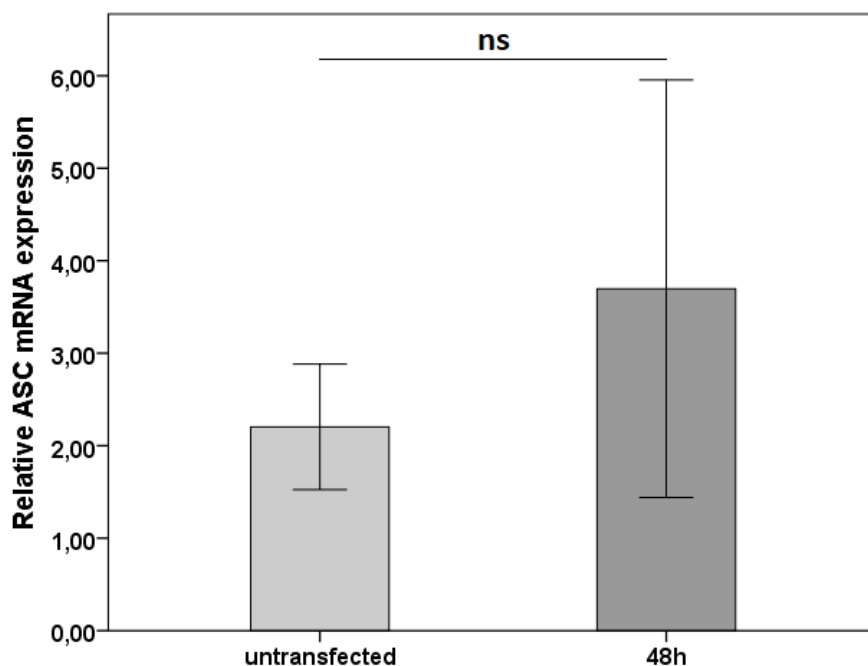


**Εικόνα 10.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NLRP3* σε ΟΑ χονδροκύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με *NLRP3* siRNA και κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. \* :  $p$ -value  $\leq 0.05$  (μη παραμετρικός έλεγχος Wilcoxon,  $p$ -value = 0.028)

#### **Γ.2.4.1. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ASC* μετά από διαμόλυνση ΟΑ χονδροκυττάρων με siRNA έναντι του *NLRP3***

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του *NLRP3* στην ΟΑ, ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ASC* μετά από επιδράσεις σε ΟΑ χονδροκύτταρα με siRNA έναντι του γονιδίου *NLRP3*.

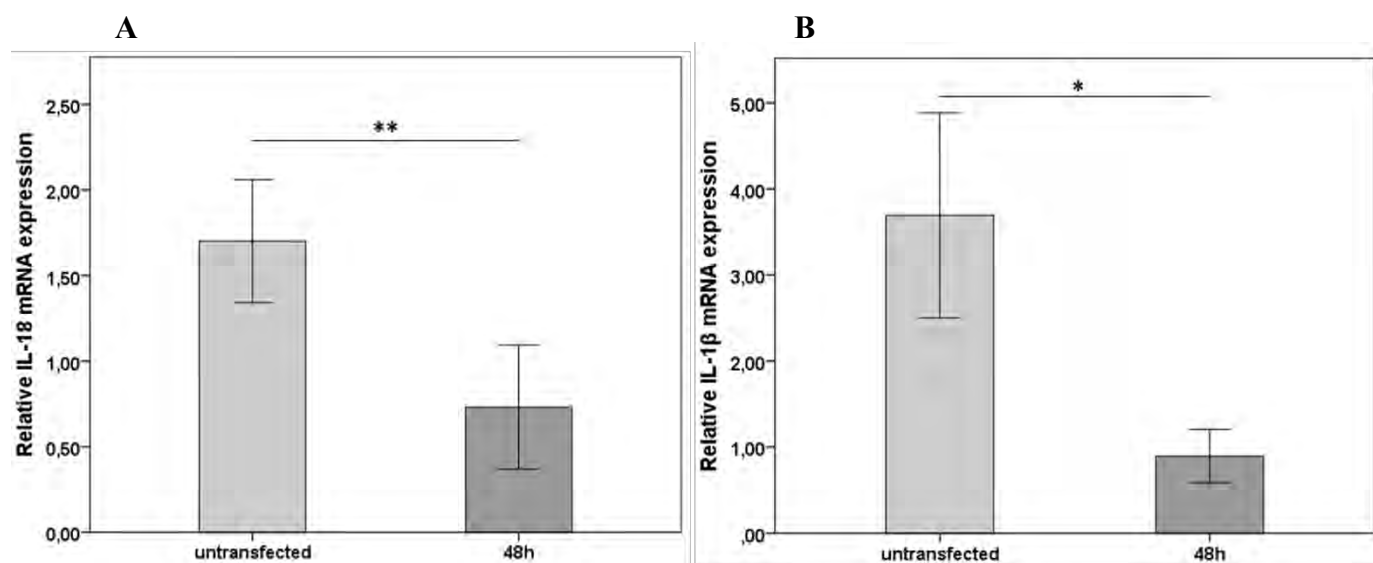
Τα επίπεδα mRNA του *ASC* παρουσίασαν αύξηση στα διαμολυσμένα με *NLRP3* siRNA για 48 ώρες χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (untransfected), όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *ASC* σε OA χονδροκύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με *NLRP3* siRNA και κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. ns: non-significant (μη στατιστικά σημαντικό) / p-value > 0.05 (μη παραμετρικός έλεγχος Wilcoxon, p-value = 0.600, ns)

#### **Γ.2.4.2. Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *IL-18* και *IL-1β* μετά από διαμόλυνση OA χονδροκυττάρων με siRNA έναντι του *NLRP3***

Η συμμετοχή του *NLRP3* στην παθολογία της OA μελετήθηκε και με τη διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων των ιντερλευκινών 18 και 1β μετά από αναστολή του γονιδίου *NLRP3* σε OA χονδροκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA στα χονδροκύτταρα που διαμολύνθηκαν με *NLRP3* siRNA για 48 ώρες σε σύγκριση με εκείνα που δε διαμολύνθηκαν (Εικόνα 12A, B).



**Εικόνα 12.** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των ιντερλευκινών *IL-18* (A) και *IL-1β* (B) σε ΟΑ χονδροκύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με *NLRP3* siRNA και κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. (A) Παραμετρικός συσχετισμένος έλεγχος t (paired t-test), p-value = 0.010. (B) μη παραμετρικός έλεγχος Wilcoxon, p-value = 0.028. \* : p-value ≤ 0.05, \*\* : p-value ≤ 0.01

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την πιο συχνή αρθροπάθεια του μυοσκελετικού συστήματος που συνοδεύεται από χρόνιο πόνο στις αρθρώσεις και δυσκολία στην κίνηση, ενώ σε προχωρημένα στάδια συνδέεται με την αναπηρία (O'Neill et al., 2018). Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας άνω των 40 ετών αλλά και σε νεότερα άτομα λόγω τραυματισμού ή υψηλού βαθμού καταπόνησης της άρθρωσης (Cope et al., 2019) (Mobasheri et al., 2017). Ο χόνδρος, το υποχόνδριο οστό και ο αρθρικός υμένας είναι οι κύριοι ιστοί της ΟΑ. Ωστόσο, οι παθολογικές μεταβολές περιλαμβάνουν όλα τα δομικά στοιχεία της άρθρωσης και περιαρθρικές δομές. Οι τυπικές μεταβολές περιλαμβάνουν τον εκφυλισμό του χόνδρου, το σχηματισμό των οστεόφυτων, τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, αρθραιμία καθώς και περιαρθρική σαρκοπενία (Herrero-Beaumont et al., 2019).

Η ΟΑ είναι μία πάθηση με πολυπαραγοντική αιτιολογία, ο μηχανισμός της οποίας δεν έχει κατανοηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Ανάμεσα στους προδιαθεσιακούς παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου συγκαταλέγονται το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, η διατροφή και οι τραυματισμοί των αρθρώσεων (Bortoluzzi et al., 2018) (Vina & Kwoh, 2018). Επιπλέον σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου έχουν και οι γενετικοί παράγοντες, καθώς υπολογίζεται ότι η κληρονομικότητα ευθύνεται περίπου για το 50% της προδιάθεσης για τη νόσο, ποσοστό που μεταβάλλεται ανάλογα με την πάσχουσα άρθρωση (O'Neill et al., 2018).

Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη το γεγονός ότι δεν υπάρχουν κατάλληλα φάρμακα που να αναστέλλουν την εξέλιξη της νόσου και ότι η μόνη παρέμβαση για θεραπεία είναι η ολική αρθροπλαστική, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ και μπορούν να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του φλεγμονοσώματος *NLRP3* τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε αναστολή του γονιδίου *NLRP3* σε ΟΑ χονδροκύτταρα με σκοπό τη διευκρίνιση του ρόλου του ως πιθανοί μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι.

Τα φλεγμονοσώματα είναι πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα που ενεργοποιούνται από διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι απαραίτητα για την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες, κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης (Bolívar et al., 2019). Η αναγνώριση ποικίλων μικροβιακών σημάτων ή

σημάτων στρες και βλάβης από τα φλεγμονοσώματα οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση της κασπάσης-1, η οποία στη συνέχεια επάγει την έκκριση σημαντικών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μια μορφή κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται πυρόπτωση (Strowig et al., 2012). Η δράση των φλεγμονοσωμάτων είναι μεγάλης σημασίας κατά τη διάρκεια μικροβιακών λοιμώξεων καθώς επίσης και στη ρύθμιση των μεταβολικών διαδικασιών και των ανοσολογικών αποκρίσεων. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι διαταραχές που σχετίζονται με τη ρύθμιση και τη λειτουργία τους είναι δυνατό να οδηγήσουν σε νευρολογικές, μεταβολικές ή φλεγμονώδεις ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης και της OA (Bolívar et al., 2019) (Clavijo-Cornejo et al., 2016) (McAllister et al., 2018) (Parsamanesh et al., 2019) (Pellegrini et al., 2019) (Strowig et al., 2012).

Πράγματι, έχει βρεθεί ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 συμμετέχει στην παθογένεση της OA προκαλώντας φλεγμονή σε υμενοκύτταρα ασθενών με OA μέσω της παραγωγής ιντερλευκινών και ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας (Clavijo-Cornejo et al., 2016) (McAllister et al., 2018). Κατά την εξέλιξη της OA, η παραγωγή και η λειτουργία των διαφόρων κυτοκινών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της νόσου. Η πιο σημαντική επίδραση των κυτοκινών αφορά στη διαταραχή των διαδικασιών καταβολισμού και αναβολισμού των χονδροκυττάρων (Wojdasiewicz et al., 2014). Οι IL-18 και IL-1β θεωρείται ότι έχουν εξέχοντα ρόλο στη μετατόπιση της μεταβολικής ισορροπίας προς την αποδόμηση του χόνδρου. Και οι δύο αυτές κυτοκίνες συντίθενται ως αδρανή πρόδρομα μόρια που διασπώνται στην ενεργή εκκρινόμενη μορφή μέσω της δράσης του φλεγμονοσώματος (Bougault et al., 2012).

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά, διερευνήθηκαν για πρώτη φορά τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που απαρτίζουν το συγκεκριμένο φλεγμονόσωμα, *NLRP3* και *ASC*, ήταν σημαντικά αυξημένα στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, σε μεταγραφικό επίπεδο. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν την πρώτη ένδειξη για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε OA χονδροκύτταρα, ενώ επίσης ενισχύουν την άποψη ότι σε μία οστεοαρθρική άρθρωση παρατηρείται ένα μικροπεριβάλλον φλεγμονής που ενέχεται στον εκφυλισμό του χόνδρου. Επιπλέον, σε συνδυασμό με δεδομένα προγενέστερων μελετών που αναφέρουν την έκφραση των

παραπάνω γονιδίων και σε κύτταρα του υμένα ΟΑ ασθενών, ενισχύουν το ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια της νόσου.

Βασικό μόριο του σηματοδοτικού μονοπατιού του φλεγμονοσώματος NLRP3 είναι η κασπάση-1. Πρόκειται για μία ενδοπεπτιδάση με καταλυτικά ενεργό κατάλοιπο κυστεΐνης, υπεύθυνο για τη διάσπαση των πρωτεϊνών-στόχων. Τα κύρια υποστρώματα του ενζύμου είναι η IL-18 και η IL-1β (Bolívar et al., 2019). Η κασπάση-1 συντίθεται ως ένα ανενεργό μόριο που ενεργοποιείται από τα φλεγμονοσώματα, τα οποία διευκολύνουν το διμερισμό και την αυτο-επεξεργασία της (Bolívar et al., 2019) (Boucher et al., 2018). Ο διμερισμός της κασπάσης-1 θεωρείται απαραίτητος για την ενεργοποίησή της και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, ενώ η αυτο-επεξεργασία της πιθανόν είναι χρήσιμη για τη σταθεροποίηση της ενεργής μορφής της (Bolívar et al., 2019). Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την ενεργοποίηση και το ρόλο του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε ΟΑ χονδροκύτταρα, ελέγξαμε την ενεργοποίηση της κασπάσης-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ΟΑ χονδροκύτταρα παρατηρείται παρουσία της ενεργής μορφής της κασπάσης-1, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα όπου παρατηρείται παρουσία μόνο της πρόδρομης μορφής της. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ενεργοποίηση της κασπάσης-1 στην ΟΑ και επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 ενεργοποιείται στα χονδροκύτταρα των ασθενών.

Ο ρόλος του φλεγμονοσώματος μελετήθηκε περαιτέρω μέσω της διερεύνησης των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των ιντερλευκινών *IL-18* και *IL-1β*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα mRNA επίπεδα τόσο της *IL-18* όσο και της *IL-1β* είναι σημαντικά αυξημένα στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της *IL-1β* στο αρθρικό υγρό και στον ορό ασθενών με ΟΑ (Denoble et al., 2011). Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματά μας δε συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Bougault και συνεργατών (Bougault et al., 2012). Στη μελέτη τους βρήκαν ότι ο αρθρικός χόνδρος εκφυλίζεται ανεξάρτητα από τη δράση των φλεγμονοσωμάτων και ότι η *IL-1β* που συμμετέχει στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου παράγεται από τον αρθρικό ιστό και όχι από τα χονδροκύτταρα. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά μεταξύ των ομάδων ατόμων που συμμετείχαν στις μελέτες, καθώς και στη διάρκεια της ύπαρξης ή τη βαρύτητα της ΟΑ στις ομάδες των ασθενών. Πιστεύεται ότι το χρονικό διάστημα ύπαρξης της νόσου μπορεί να επηρεάζει τη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση της *IL-*

1β (Fioravanti et al., 2019), και πως η IL-1β είναι πιθανότερο να εμπλέκεται στην ΟΑ πρώιμης έναρξης (Bougault et al., 2012).

Έχοντας, λοιπόν, πλέον ως δεδομένο ότι η χρόνια ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης στα χονδροκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών όπως και αποικοδομητικών ενζύμων (Herrero-Beaumont et al., 2019), διερευνήσαμε εάν η αναστολή της υπομονάδας NLRP3 του υπό μελέτη φλεγμονοσώματος έχει κάποια πιθανή επίδραση στην παραγωγή των προ-φλεγμονωδών ιντερλευκινών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με ολιγονουκλεοτίδια έναντι του γονιδίου *NLRP3*. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η καταστολή του γονιδίου *NLRP3* (siRNA κατά *NLRP3*) οδήγησε σε σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της υπομονάδας NLRP3 του φλεγμονοσώματος, επιβεβαιώνοντας την πετυχημένη καταστολή του γονιδίου.

Η συμβολή του NLRP3 στην παθογένεια της ΟΑ διερευνήθηκε μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στο σηματοδοτικό του μονοπάτι έπειτα από αδρανοποίηση του γονιδίου *NLRP3*. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *IL-18* και *IL-1β* μετά από καταστολή του γονιδίου *NLRP3*. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η παραγωγή των ιντερλευκινών IL-18 και IL-1β στην ΟΑ, εξαρτάται από την ενεργοποίηση του υπό μελέτη φλεγμονοσώματος. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη και την αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των Shi και συνεργατών (Shi et al., 2018), συμπεραίνουμε ότι η καταστολή του φλεγμονοσώματος NLRP3 φαίνεται να έχει προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης της ΟΑ γόνατος. Αντίθετα, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ASC* παρουσιάστηκαν αυξημένα μετά την αδρανοποίηση του γονιδίου *NLRP3*, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. Παρόμοια αποτελέσματα όπου το siRNA κατά *NLRP3* δεν είχε επίδραση στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ASC*, παρατηρήθηκαν και σε άλλη έρευνα σχετική με το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε RAW264.7 μακροφάγα κύτταρα ποντικού (Xie et al., 2014). Ωστόσο, ο υποκείμενος μηχανισμός παραμένει ασαφής και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας έδειξαν ότι το φλεγμονόσωμα NLRP3 εμπλέκεται στη φλεγμονή και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από τα χονδροκύτταρα στην ΟΑ μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-1. Επιπλέον, η αναστολή του φλεγμονοσώματος NLRP3 φαίνεται να



συμβάλλει στη μείωση της παραγωγής αυτών των κυτοκινών, αναδεικνύοντας το φλεγμονόσωμα ως ένα μελλοντικό πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της νόσου.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Activation of the NLRP3 Inflammasome Review | InvivoGen. Retrieved from <https://www.invivogen.com/review-nlrp3-inflammasome>

Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), 16–21

Bolívar, B. E., Vogel, T. P., & Bouchier-Hayes, L. (2019). Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. *The FEBS Journal*, 286(14), 2628-2644

Bortoluzzi, A., Furini, F., & Scirè, C. A. (2018). Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 17(11), 1097–1104

Boucher, D., et al. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 215(3), 827–840

Bougault, C., et al. (2012). Stress-induced cartilage degradation does not depend on the NLRP3 inflammasome in human osteoarthritis and mouse models. *Arthritis & Rheumatism*, 64(12), 3972–3981

Clavijo-Cornejo, D., et al. (2016). The Overexpression of NALP3 Inflammasome in Knee Osteoarthritis Is Associated with Synovial Membrane Prolidase and NADPH Oxidase 2. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–7

Cope, P. J., Ourradi, K., Li, Y., & Sharif, M. (2019). Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(2), 230–239

Courties, A., Berenbaum, F., & Sellam, J. (2018). The Phenotypic Approach to Osteoarthritis: A Look at Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis. *Joint Bone Spine*

- Denoble, A. E., et al. (2011). Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 2088–2093
- Fioravanti, A., et al. (2019). Exploring the Involvement of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in Osteoarthritis of the Hand: Results from a Pilot Study. *Mediators of Inflammation*, 2019, 2363460
- Franceschi C., et al. (2000). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 244–254
- Glyn-Jones, S., et al. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387
- Guilak, F., Nims, R. J., Dicks, A., Wu, C.-L., & Meulenbelt, I. (2018). Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biology*, 71–72, 40–50
- Herrero-Beaumont, G., et al. (2019). Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression. *Biochemical Pharmacology*, 165, 24–32
- Jenei-Lanzl, Z., Meurer, A., & Zaucke, F. (2019). Interleukin-1 $\beta$  signaling in osteoarthritis – chondrocytes in focus. *Cellular Signalling*, 53, 212–223
- Jin, C., et al. (2011). NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14867–14872
- Johnson, V. L., & Hunter, D. J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 28(1), 5–15
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013–1022
- Lo, G. H., et al. (2009). Bone marrow lesions and joint effusion are strongly and independently associated with weight-bearing pain in knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(12), 1562–1569

- McAllister, M. J., Chemaly, M., Eakin, A. J., Gibson, D. S., & McGilligan, V. E. (2018). NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(5), 612–619
- Mobasheri, A., & Batt, M. (2016). An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(5–6), 333–339
- Mobasheri, A., et al. (2017). Soluble biochemical markers of osteoarthritis: Are we close to using them in clinical practice? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 31(5), 705–720
- Mora, J. C., Przkora, R., & Cruz-Almeida, Y. (2018). Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *Journal of Pain Research, Volume 11*, 2189–2196
- Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2011). Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis: Identifying Molecular Targets. *PM&R*, 3, S3–S11
- O'Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 32(2), 312–326
- Oesser, S., & Seifert, J. (2003). Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell and Tissue Research*, 311(3), 393–399
- Palazzo, C., Nguyen, C., Lefevre-Colau, M.-M., Rannou, F., & Poiraudau, S. (2016). Risk factors and burden of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(3), 134–138
- Parsamanesh, N., et al. (2019). NLRP3 inflammasome as a treatment target in atherosclerosis: A focus on statin therapy. *International Immunopharmacology*, 73, 146–155
- Pellegrini, C., et al. (2019). Phytochemicals as Novel Therapeutic Strategies for NLRP3 Inflammasome-Related Neurological, Metabolic, and Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2876

- Petersson, I. F., Boegård, T., Saxne, T., Silman, A. J., & Svensson, B. (1997). Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlbäck and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35-54 years with chronic knee pain. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(8), 493–496
- Place, D. E., & Kanneganti, T.-D. (2018). Recent advances in inflammasome biology. *Current Opinion in Immunology*, 50, 32–38
- Rathinam, V. A. K., & Fitzgerald, K. A. (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*, 165(4), 792–800
- Rezuş, E., et al. (2019). The Link Between Inflammaging and Degenerative Joint Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 614
- Rousset, F., et al. (2015). IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22phox and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), 1972–1980
- Sandy, J. D., Chan, D. D., Trevino, R. L., Wimmer, M. A., & Plaas, A. (2015). Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), 1939–1945
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–832
- Shane Anderson, A., & Loeser, R. F. (2010). Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 24(1), 15–26
- Shi, J., et al. (2018). Estradiol inhibits NLRP3 inflammasome in fibroblast-like synoviocytes activated by lipopolysaccharide and adenosine triphosphate. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 21(11), 2002–2010
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278–286
- Styrkarsdottir, U., et al. (2018). Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. *Nature Genetics*, 50(12), 1681–1687

- Tachmazidou, I., et al. (2019). Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nature Genetics*, 51(2), 230–236
- Torres, L., et al. (2006). The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(10), 1033–1040
- Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R., & O’Keefe, R. J. (2003). Articular cartilage biology. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 11(6), 421–430
- Uth, K., & Trifonov, D. (2014). Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), 629–636.
- Vina, E. R., & Kwoh, C. K. (2018). Epidemiology of osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), 160–167
- Wang, X., et al. (2016). Cross-sectional and Longitudinal Associations between Knee Joint Effusion Synovitis and Knee Pain in Older Adults. *The Journal of Rheumatology*, 43(1), 121–130
- Wang, X., et al. (2018). The importance of synovial inflammation in osteoarthritis: current evidence from imaging assessments and clinical trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(2), 165–174
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. (2014). The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–19
- Xie, Q., Shen, W.-W., Zhong, J., Huang, C., Zhang, L., & Li, J. (2014). Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), 341–349
- Zengini, E., et al. (2018). Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis Europe PMC Funders Group. *Nat Genet*, 50(4), 549–558

Zhang, Y., et al. (2011). Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), 691–699

Zhao, L., et al. (2018). NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5463–5469

Zhuo, Q., Yang, W., Chen, J., & Wang, Y. (2012). Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(12), 729–737