



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ρύθμιση της Μορφογενετικής πρωτεΐνης των  
οστών 2 (BMP-2) από το miR-140 σε  
οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα**

ΣΤΑΥΡΟΣ ΣΤΑΜΑΤΑΚΙΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

# **REGULATION OF BMP-2 FROM MIR140 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ασπασία Τσέζου

Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΜΕΛΗ:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής μοριακής Βιολογίας – Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Βαρβάρα Τραχανά

Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>7</b>
<b>A.1 Οστεοαρθρίτιδα</b>	<b>7</b>
<i>A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά</i>	7
<i>A.1.2 Ταξινόμηση</i>	8
<i>A.1.3 Επιδημιολογία – Επιπολασμός</i>	10
<i>A.1.4 Φαινότυποι</i>	10
<i>A.1.5 Αιτιολογία και παράγοντες κινδύνου</i>	11
<b>A.2 Χονδροκύτταρα και ομοιόσταση αρθρικού χόνδρου</b>	<b>12</b>
<i>A.2.1 Χονδρογένεση και ενδοχόνδρια οστεοποίηση</i>	12
<i>A.2.2 Δομή αρθρικού χόνδρου και μεταβολισμός χονδροκυττάρων</i>	18
<b>A.3 Εκφυλισμός αρθρικού χόνδρου και ενδοχόνδρια οστεοποίηση στην οστεοαρθρίτιδα</b>	<b>19</b>
<b>A.4 Οστεοαρθρίτιδα και γενετική</b>	<b>21</b>
<i>A.4.1 Γενετική της οστεοαρθρίτιδας</i>	21
<i>A.4.2 Η Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 2 (BMP-2) στην ΟΑ</i>	24
<i>A.4.3 Επιγενετική ρύθμιση στην οστεοαρθρίτιδα</i>	24
<i>A.4.4.1 Μεθυλίωση του DNA</i>	25
<i>A.4.4.2 Τροποποίηση ιστονών</i>	25
<b>A.5 Micro-RNAs</b>	<b>26</b>
<b>A.5.1 Τα Micro-RNAs και η βιογένεση τους</b>	<b>26</b>
<i>A.5.2 Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNAs) στην οστεοαρθρίτιδα</i>	28
29	
<b>A.7 Το miR-140</b>	<b>29</b>
<i>A.7.1 Το miR-140 στη χονδρογένεση και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση</i>	30
<i>A.7.2 Το miR-140 στην οστεοαρθρίτιδα</i>	31
<b>A.8 ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>37</b>
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>38</b>

<b>B.1. Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>38</b>
<i>B.1.1. Συλλογή δειγμάτων</i>	38
<i>B.1.2. Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων</i>	38
<i>B.1.3. Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας</i>	39
<i>B.1.4. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)</i>	41
<i>B.1.5. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL10A1, BMP-2, MMP-13, ADAMTS-5, RUNX2 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)</i>	43
<i>B.1.6 Επιμόλυνση OA χονδροκυττάρων με mimics miR-140-5p</i>	45
<i>B.1.7. Ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων και της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής</i>	46
<i>B.1.8. Στατιστική ανάλυση</i>	46
<b>B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>46</b>
<i>B.2.1 Προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της BMP-2 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων.</i>	46
<i>B.2.2 Ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για θέσεις σύνδεσης miRNAs</i>	47
<i>B.2.3 Έκφραση του miR-140-5p στα OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα</i>	48
<i>B.2.4 Έκφραση της BMP-2 πριν και μετά τη χορήγηση του mimics miR-140-5p σε OA χονδροκύτταρα</i>	49
<i>B.2.5 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων COL10A1, MMP-13, ADAMTS-5 και RUNX2 μετά από επιδράσεις με miR-140 mimics σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.</i>	50
<b>B.3 Συζήτηση</b>	<b>52</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>57</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια του Ακαδημαϊκού έτους 2018-2019, με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Ασπασία Τσέζου.

Θα ήθελα αρχικά, να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με τίμησαν με τη πολύτιμη βοήθεια τους και την συνεισφορά τους στα πλαίσια της ολοκλήρωσης της πτυχιακής μου εργασίας.

Οφείλω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Τσέζου Ασπασία για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, την άψογη συνεργασία που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως μέλος της εργαστηριακής της ομάδας. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την κατανόηση και την εύστοχη καθοδήγηση της σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυψε στα πλαίσια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, και τέλος, για το γεγονός ότι αποτέλεσε πηγή έμπνευσης προκειμένου να βελτιώσω τις δυνατότητες μου σε κάθε επίπεδο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή - Πρόεδρο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Βαρβάρα Τραχανά, για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου, με τους οποίους μοιράστηκα τον εργαστηριακό χώρο, για την υποστήριξη και την επικοινωνιακή συνεργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Παπαθανασίου Ιωάννα, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια της, κυρίως στα πλαίσια διεκπεραίωσης του πειραματικού σκέλους της παρούσας ερευνητικής μελέτης.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν αλλά και για την υπομονή τους κατά την διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί την πιο κοινή νόσο του μυοσκελετικού συστήματος, με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Ο εκφυλισμός του χόνδρου αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό μιας ΟΑ άρθρωσης. α μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs) έχει δειχθεί ότι παίζουν κύριο ρόλο στην τόσο στην ομοιοστασίας του αρθρικού χόνδρου όσο και στη διαταραχή του κατά την ΟΑ. Μεταξύ των διαφόρων miRNAs που έχουν ρόλο στην ΟΑ, το miR-140 φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην αύξηση της καταβολικής δράσης των ΟΑ χονδροκυττάρων. Στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του miR-140 στην ΟΑ.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών με πρωτοπαθή ΟΑ, ενώ 4 φυσιολογικά άτομα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Έγινε καλλιέργεια των χονδροκυττάρων και ακολούθησε απομόνωση RNA και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 με τη μέθοδο της real-time PCR. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών-2 (BMP-2) με real time PCR. Στη συνέχεια, έγινε επιμόλυνση των ΟΑ χονδροκυττάρων με το mimic miR-140-5p, και κατόπιν αναζήτησης γονιδίων-στόχων του με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης -με real-time PCR- της BMP-2 που παίζει κύριο ρόλο στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Τέλος, , μετά από επίδραση του miR-140 σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων. πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης -με real-time PCR- των γονιδίων COL10A1, MMP-13, ADAMTS-5 και RUNX2 που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ και αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-140 στα ΟΑ χονδροκύτταρα και σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BMP-2 στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Μετά τη χορήγηση του mimic miR-140-5p σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της BMP-2, και μείωση της έκφρασης των γονιδίων COL10A1, MMP-13, ADAMTS-5 και RUNX2.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το miR-140 παρουσιάζει ιστο-ειδικότητα και μειωμένη έκφραση στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου BMP-2, προτείνοντας τον ρόλο του στην παθογένεια της ΟΑ μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Τέλος, η μείωση της έκφρασης των γονιδίων COL10A1, MMP-13, ADAMTS-5 και RUNX2 που αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2 αντανακλά την έμμεση δράση του miR-140-5p στην ανάπτυξη του οστεοαρθρικού φαινοτύπου.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common musculoskeletal disorder, and is of multifactorial etiology. The main characteristic of joint pathology is the degradation of the articular cartilage. Short non coding RNAs (miRNAs) have been demonstrated to play a major role in articular cartilage homeostasis and also in its disruption during OA. MiR-140 has been found to play a significant role in regulating the expression of several genes associated with OA chondrocytes' catabolic activity. The aim of the present thesis is to investigate the functional role of miR-140 in OA pathogenesis.

Cell cultures of 6 human OA cartilage samples, as well as 4 samples from individuals without OA were used for RNA extraction, followed by quantification of miR-140 expression, with real-time PCR. In addition quantification of BMP-2 was also performed using real-time PCR. Using prediction algorithms for miR-140 gene-targets identification, we identified a binding site for miR-140-5p in the 3'UTR of *BMP-2* gene and thus real-time PCR experiments were performed in order to determine the mRNA expression levels of BMP-2 after miR-140 treatment. Subsequently, OA chondrocytes were placed in 6-well plates and were treated with miR-140-5pm mimic. Following treatment, *COL10A1*, *MMP-13*, *ADAMTS-5* and *RUNX2* mRNA expression levels were evaluated using real time-PCR. All above genes are involved in OA pathogenesis and constitute downstream targets of BMP-2 signalling pathway .

It was found that miR-140 expression was significantly reduced in OA chondrocytes, while BMP-2 mRNA expression was significantly increased in OA chondrocytes compared to healthy chondrocytes.. Mimic miR-140-5p treatment in OA chondrocyte resulted in significant reduction of *BMP-2*, *COL10A1*, *MMP-13*, *ADAMTS-5* and *RUNX2* mRNA expression levels.

In conclusion, miR-140 is a cartilage-specific miRNA that is down-regulated in OA chondrocytes. It, also, targets BMP-2, suggesting that miR-140 plays an important role in OA pathogenesis through regulation of the expression of genes involved in the chondrogenic differentiation processes. Finally, the reduction in expression levels of *COL10A1*, *MMP-13*, *ADAMTS-5* and *RUNX2* suggests the indirect role of miR-140-5p in OA progression..

## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A.1 Οστεοαρθρίτιδα

#### A.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την συχνότερη μορφή χρόνιας πάθησης του μυοσκελετικού συστήματος. Είναι το κλινικό και παθολογικό αποτέλεσμα ενός εύρους διαταραχών που οδηγεί στην καταστροφή της δομής και της λειτουργίας των αρθρώσεων. Εθιμοτυπικά θεωρούνταν μία πάθηση του αρθρικού χόνδρου. Η τωρινή αντίληψη για την οστεοαρθρίτιδα εμπλέκει όλα τα μέρη της άρθρωσης περιλαμβάνοντας το υποχόνδριο οστό, τον μηνίσκο, τους συνδέσμους, τους περιαρθρικούς μύες, την αρθρική κοιλότητα και τον αρθρικό θύλακα. [1]

Οι αναφορές στον επιπολασμό της ασθένειας ποικίλουν ανάλογα με την μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμησή της. Στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες ο επιπολασμός μετράται ακτινογραφικά. Η ακτινογραφία, παραταύτα, δεν αποτελεί μια μέθοδο διάγνωσης με υψηλή ευαισθησία και σύμφωνα με αυτήν, περίπου το 6% των ενηλίκων, ηλικίας άνω των 30 ετών, εμφανίζουν οστεοαρθρίτιδα με πόνο στο γόνατο.[2] Η ασθένεια προκαλείται από τοπικούς εμβιομηχανικούς παράγοντες που δρουν σε ένα πλαίσιο συστημικής ευαισθησίας. Οι συστημικοί παράγοντες που αυξάνουν την ευπάθεια της άρθρωσης περιλαμβάνουν το γήρας, το φύλο και πιθανόν η έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Παρά το γεγονός ότι οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως η γενετική συνιστώσα έχει ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας και είναι πολυγονιδιακή, τα υπεύθυνα γονίδια για αυτήν δεν έχουν ταυτοποιηθεί.[3] Στα άτομα ευπαθή για την ασθένεια τοπικοί παράγοντες όπως η μη φυσιολογική στοίχιση των οστών, η αποδυνάμωση των μυών και οι αλλαγές στην ακεραιότητα της άρθρωσης (όπως ο τραυματισμός του μηνίσκου) προάγουν την εξέλιξη της ασθένειας. Η βαρύτητα επηρεάζεται επίσης από την παχυσαρκία και τους τραυματισμούς.[2]

Τυπικά η οστεοαρθρίτιδα παρουσιάζεται με πόνο στην άρθρωση. Στη περίοδο ενός έτους το ένα τέταρτο των ανθρώπων ηλικίας άνω των 55 ετών βιώνουν ένα επεισόδιο επίμονου πόνου στο γόνατο από τους οποίους ένας στους έξι απευθύνεται στον γιατρό του για αυτό.[4] Η θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας πρέπει να είναι εξατομικευμένη για κάθε πάσχοντα και θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα συνδυασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων οι οποίες θα τροποποιούνται ανάλογα με την απόκριση του ασθενούς σε αυτές. Δυστυχώς σχεδόν όλες οι θεραπείες που έχουν δοκιμαστεί και εφαρμοστεί περιλαμβάνουν φάρμακα ή χειρουργική επέμβαση ή και τα δύο.[5] Η τοξικότητα και τα αρνητικά προφίλ των υπάρχοντων θεραπειών (όπως NSAIDs, COX 2 inhibitors, και ολική αντικατάσταση της άρθρωσης) τις καθιστούν δυσμενείς σε σύγκριση με τις παραδοσιακές παρεμβάσεις όπως η άσκηση, η απώλεια βάρους, ειδικό ιμάντες και τα ορθωτικά. [6] Η προτεινόμενη ιεραρχία της αντιμετώπισης θα πρέπει να αποτελείται από μη φαρμακολογικές θεραπείες πρώτα,



μετά φάρμακα και τέλος αν είναι απαραίτητο χειρουργική επέμβαση. Πολύ συχνά το πρώτο μέρος παραβλέπεται ή δεν του δίνεται η απαραίτητη έμφαση.[2]

Οι μη φαρμακευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την επιμόρφωση του κόσμου για την οστεοαρθρίτιδα, την απώλεια βάρους, την άσκηση, την φυσιοθεραπεία, τους ειδικούς μάντες και τα ορθωτικά. Οι φαρμακευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν αναλγητικά, χορήγηση κορτικοστεροειδών ή υαλουρονικού μεσα στην άρθρωση. Οι χειρουργικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την αρθροσκοπική μηνισεκτομή, την οστεοτομία και την αντικατάσταση της άρθρωσης. [2]

### **A.1.2 Ταξινόμηση**

Η οστεοαρθρίτιδα περιλαμβάνει κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να εντοπιστούν σε οποιαδήποτε πάθηση των αρθρώσεων γεγονός το οποίο οδηγεί στη πρόταση ότι η ΟΑ μπορεί να ταξινομηθεί ως πρωτογενής (ιδιοπαθής) ή δευτερογενής. Πολλές διαταραχές μπορούν να αναγνωριστούν ως υπαίτιες της δευτερογενούς ΟΑ και μπορούν να διαχωριστούν σε 4 κατηγορίες (Πίνακας 1). Παραταύτα η κατηγοριοποίηση σε πρωτογενής ή δευτερογενής δεν είναι πάντα ξεκάθαρη, καθώς πολλοί ασθενείς δευτερογενούς οστεοαρθρίτιδας έχουν και προδιάθεση σε αυτήν.[7]

Ένας άλλος άξονας κατηγοριοποίησης της ΟΑ σχετίζεται με τον αριθμό και τον διαμερισμό των προσβεβλημένων αρθρώσεων. Η προσβολή περισσότερων της μίας άρθρωσης ανά ασθενή είναι πολύ συχνό φαινόμενο και πολλές μελέτες πλυθησμού έχουν δείξει πως η ΟΑ μίας άρθρωσης συνδέεται και με άλλες αρθρώσεις χωρίς να μπορεί να αποδοθεί εξ ολοκλήρου στην τυχαιότητα ή την ηλικία. [1]

**Table 3.** Classification of osteoarthritis (OA).

*Classification by the joints involved*

Monoarticular, oligoarticular or polyarticular (generalized)

Chief joint site (index joint site) and localization within the joint

Hip (superior pole, medial pole or concentric)

Knee (medial, lateral, patellofemoral compartments)

Hand (interphalangeal joints and/or thumb base)

Spine (apophyseal joints or intervertebral disc disease)

Others

*Classification into primary and secondary forms of OA*

Primary = idiopathic

Secondary indicates that a likely cause can be identified; causes of secondary OA

1. Metabolic—examples include:

Ochronosis

Acromegaly

Haemochromatosis

Calcium crystal deposition

2. Anatomic—examples include:

Slipped femoral epiphysis

Epiphyseal dysplasias

Blount's disease

Legge-Perthe disease

Congenital dislocation of the hip

Leg length inequality

Hypermobility syndromes

3. Traumatic—examples include:

Major joint trauma

Fracture through a joint or osteonecrosis

Joint surgery (e.g. meniscectomy)

Chronic injury (occupational arthropathies)

4. Inflammatory—examples include:

Any inflammatory arthropathy

Septic arthritis

*Classification by the presence of specific features:*

Inflammatory OA

Erosive OA

Atrophic or destructive OA

OA with chondrocalcinosis

Others

### A.1.3 Επιδημιολογία – Επιπολασμός

Η οστεοαρθρίτιδα του γονάτου αποτελεί μία κοινή ασθένεια με την συχνότητα εμφάνισης της να αυξάνεται με την ηλικία. Ο επιπολασμός της σε παγκόσμιο επίπεδο από ακτινογραφικά δεδομένα σύμφωνα με έρευνα του 2010 εκτιμήθηκε σε 3.8% (95% UI-uncertainty interval 3.6%-4.1%). Η εμφάνιση στις γυναίκες ήταν μεγαλύτερη (mean 4.8%; 95% UI 4.4%-5.2%) απ' ό τι στους άντρες (mean 2.8%; 95% UI 2.6%-3.1%). Δεν πατρατηρήθηκε μεταβολή στον επιπολασμό της (age-standardised, κανονικοποίηση με βάση την ηλικία) ανάμεσα στο 1990 (mean 3.8%; 95% UI 3.6%-4.0%) και το 2010 (mean 3.8%; 95% UI 3.6%-4.1%) για καθένα από τα δύο φύλα (Εικόνα). Ο συχνότητα εμφάνισης με βάση την ηλικία κορυφώνεται γύρω στα 50 έτη. [8]

**Table 3** Age-standardised prevalence of knee OA by region and sex, GBD 2010 study

Region	Males			Females		
	Prevalence (%)	Lower UI (%)	Upper UI (%)	Prevalence (%)	Lower UI (%)	Upper UI (%)
Asia, Central	3.0	2.4	3.8	5.0	4.0	6.1
Asia, East	2.9	2.2	3.7	5.0	3.8	6.6
Asia Pacific, high-income	4.4	3.5	5.5	7.5	5.9	9.3
Asia, South	1.8	1.4	2.3	3.1	2.5	3.9
Asia, Southeast	2.2	1.8	2.8	3.8	3.0	4.7
Australasia	2.6	1.9	3.5	4.3	3.1	5.8
Caribbean	3.1	2.4	4.0	5.0	3.9	6.4
Europe, Central	3.0	2.4	3.7	5.0	4.0	6.0
Europe, Eastern	2.7	1.9	3.8	4.5	3.2	6.2
Europe, Western	2.7	2.3	3.1	4.5	3.9	5.2
Latin America, Andean	3.0	2.2	4.0	5.2	3.7	7.0
Latin America, Central	3.1	2.3	4.0	5.1	3.9	6.7
Latin America, Southern	3.1	2.2	4.4	5.1	3.6	7.0
Latin America, Tropical	3.1	1.9	4.8	5.2	3.2	8.0
North Africa, Middle East	4.3	3.7	5.0	7.1	6.1	8.3
North America, high-income	3.1	2.4	4.0	5.0	3.9	6.4
Oceania	4.3	3.1	5.8	7.2	5.1	9.8
Sub-Saharan Africa, Central	3.0	2.2	4.2	5.1	3.6	7.2
Sub-Saharan Africa, East	3.1	2.5	3.7	5.1	4.2	6.0
Sub-Saharan Africa, South	3.1	2.1	4.5	5.2	3.5	7.4
Sub-Saharan Africa, West	3.0	2.3	3.9	5.1	4.0	6.7

GBD, Global Burden of Disease; OA, osteoarthritis; UI, uncertainty interval.

Πίνακας 2: Συχνότητα εμφάνισης της OA του γονάτου (κανονικοποίηση με βάση την ηλικία ) ανά γεωγραφική περιοχή και φύλο. Μελέτη του 2010 από τον GBD (Global Burden of Disease). (Cross M. et al., The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. 2014)

### A.1.4 Φαινότυποι

Η οστεοαρθρίτιδα του γονάτου αποτελεί μία ετερογενή ασθένεια με πολύπλοκη παθολογία. Ανάλογα με την παθολογία του ασθενούς μπορούν να χαρακτηριστούν διαφορετικοί φαινότυποι της ασθένειας οι οποίοι είναι αποτέλεσμα διαφορετικών μηχανισμών.[9] Μία συστηματική μελέτη ανασκόπησης από τους Sell'isola et al. το 2016

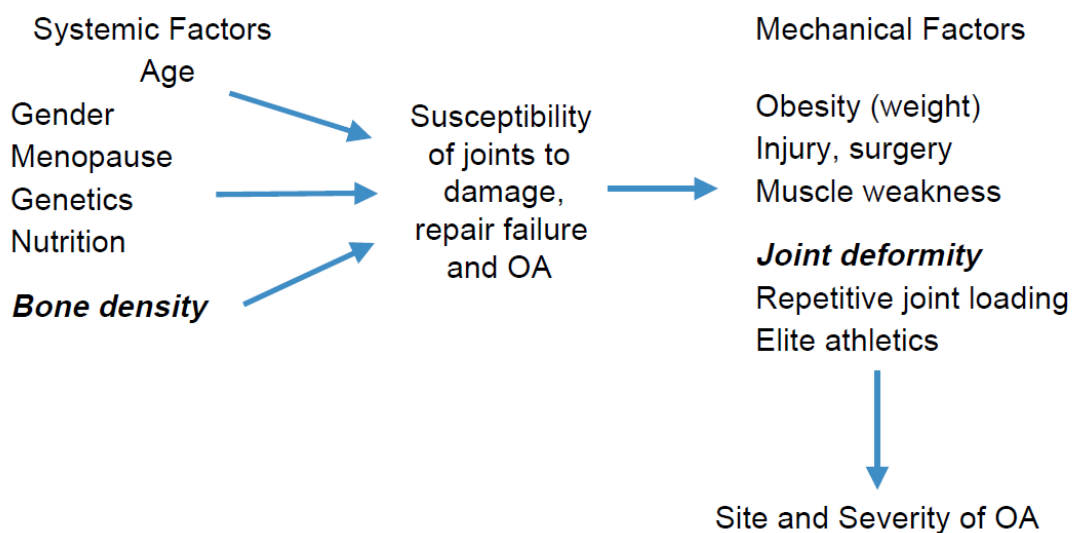
αναγνώρισε 6 διαφορετικούς φαινοτύπους στην οστεοαρθρίτιδα: 1) χρόνια πόνο (με εμφανή κεντρικό μηχανισμό βλάβης), 2) φλεγμονή, 3) μεταβολικό σύνδρομο, 4) μεταβολισμός του οστού και του χόνδρου 5) μηχανική επιβάρυνση και 6) ελαφριά αρθρική πάθηση. Οι έξι φαινότυποι πιθανόν αντιπροσωπεύουν διαφορετικές αιτιολογίες, με εξαίρεση την ελαφριά αρθρική πάθηση που ορίζεται με βάση την βαρύτητα των συμπτωμάτων.[10]

Μία άλλη συστηματική ανάλυση από τους Deveza LA et al., το 2017 αναφέρεται στα χαρακτηριστικά εκείνα με τα οποία μπορούν να διαχωριστούν οι φαινότυποι της οστεοαρθρίτιδας του γονάτου. Οι κλινικοί φαινότυποι είναι αυτοί που μελετώνται συχνότερα, ακολουθούμενοι από τους εργαστηριακούς και τους ακτινογραφικούς φαινοτύπους. Οι συγγραφείς της ανάλυσης συμπέραναν ότι οι κλινικοί φαινότυποι σχετίζονται με την αίσθηση του πόνου, το ψυχολογικό στρες, τα ακτινογραφικά αποτελέσματα, τον δείκτη μάζας σώματος, την μυική δύναμη, την φλεγμονή και την ύπαρξη κάποιου συνδρόμου (ιδιαίτερα του μεταβολικού). Επίσης οι συγγραφείς συμπέραναν ότι το φύλο, οι διαταραχές του μεταβολισμού, ο τραυματισμός του χόνδρου και η φλεγμονή είναι περισσότερο σχετικές με τους φαινότυπους που προκύπτουν από την ανάλυση της δομής της άρθρωσης.[11]

#### **A.1.5 Αιτιολογία και παράγοντες κινδύνου**

Από επιδημιολογικές μελέτες έχουν εντοπιστεί μοτίβα που αφορούν την εμφάνιση ΟΑ και μας παρέχουν με ενδείξεις για την παθογένεια της ασθένειας του πάσχοντα. Ένα μοντέλο εξέτασης της παθογένειας της ΟΑ, που έχει λάβει σημαντική αναγνώριση, μας παρέχει μία βάση για την κατανόηση των αιτιών εμφάνισης της νόσου. Αρχές αυτού του μοντέλου είναι: 1) Η θεώρηση της λειτουργίας των ιστών και δομών της άρθρωσης ως ένα βιολογικό -μηχανικό σύστημα που διατηρεί την σωστή κίνηση της άρθρωσης και αποτρέπει την υπερβολική επιβάρυνση της. 2) Το γεγονός ότι συστημικοί παράγοντες που αυξάνουν την γενική ευαισθησία των αρθρώσεων απέναντι στην φθορά και τοπικοί μηχανικοί παράγοντες που προκαλούν προβλήματα στην λειτουργία της άρθρωσης παίζουν μείζονα ρόλο στην εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης ΟΑ 3) Οι συστημικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με τους μηχανικούς παράγοντες στο μικροπεριβάλλον μίας άρθρωσης για να ορίσουν αν θα εμφανιστεί ΟΑ και πόσο γρήγορα θα εξελιχθεί. [12]

Στους συστημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ηλικία, το φύλο, οι φυλετικές ορμόνες, η οστέινη πυκνότητα, η φυλή/εθνικότητα, το γονιδίωμα και η διατροφή. Στους τοπικούς μηχανικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η παχυσαρκία, ο τραυματισμός και η καταπόνηση της άρθρωσης, οι δομικές ανωμαλίες της άρθρωσης, η μυική δύναμη. Οι συστημικοί με τους τοπικούς παράγοντες πιθανόν δρούν με έναν αρthro-ειδικό τρόπο για να καθορίσουν αν μία απόκριση επανόρθωσης στην άρθρωση είναι φυσιολογική ή όχι και αν μπορεί ή όχι να παρέχει προστασία από μελλοντική φθορά. Η μεγάλη ετερογένεια στην απόκριση του οργανισμού στην OA που έχει παρατηρηθεί μετά την εμφάνιση της υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο αυτών των παραγόντων στην βιολογική απόκριση σε από τραυματισμό μίας άρθρωσης. [13][14]



Εικόνα 1: Η παθογένεση της OA διαγραμματικά. (Arden N and Nevitt M C: Osteoarthritis: Epidemiology. 2006)

## A.2 Χονδροκύτταρα και ομοίωση αρθρικού χόνδρου

### A.2.1 Χονδρογένεση και ενδοχόνδρια οστεοποίηση

Η χονδρογένεση αποτελεί την αρχική φάση της σκελετικής ανάπτυξης περιλαμβάνοντας την συνάρθρωση και την μετανάστευση μεσεγχυματικών κυττάρων, την συσσωμάτωση των πρόδρομων χονδροκυττάρων, την διαφοροποίηση και ωρίμανση τους η οποία θα οδηγήσει στον σχηματισμό της άρθρωσης, και του οστού κατά την διάρκεια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης.[15] Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει καθώς και από αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες διαφοροποίησης και περιβαλλοντικούς παράγοντες που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Η ανάπτυξη των αρθρώσεων χωρίζεται σε δύο βασικά γεγονότα: τον σχηματισμό μίας πρώιμης αρθρικής δομής που θα λειτουργήσει σαν ικρίωμα για την ανάπτυξη των υπόλοιπων στοιχείων του σκελετού και την επακόλουθη ανάπτυξη της άρθρωσης. Η άρθρωση αναπτύσσεται από το αρχικό αναγγείο και πυκνά στιβαγμένο

κυτταρικό μεσέγγυμα. Τα κύτταρα του μεσεγγύματος οργανώνονται αρχικά σε συσσωματώματα και στην συνέχεια χωρίζονται σε δύο γενεαλογίες, αυτήν των χονδροκυττάρων και αυτή των μυικών κυττάρων, οι οποίες καθορίζουν την μορφοποίηση της άρθρωσης κεντρικά και του μυός περιφερικά. Η μετατροπή των μεσεγγυματικών κυττάρων σε πρόδρομα χονδροκύτταρα ρυθμίζεται από κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεσεγγυματικών και των επιθηλιακών κυττάρων που τα περιβάλλουν.[15] Στο επόμενο στάδιο της χονδρογένεσης γίνεται συσσωμάτωση των πρόδρομων χονδροκυττάρων με την επίδραση σημάτων προερχόμενη από τα παρακείμενα κύτταρα και τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, όπως την cartilage oligomeric protein (COMP),[16] τον fibroblast growth factor (FGF), την hedgehog, τις bone morphogenetic proteins (BMPs), το μονοπάτι Wnt τα οποία συνεργατικά οδηγούν στην διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και στην σωστή ανάπτυξη των άκρων κατά μήκος του ραχοκοιλιακού και κεντροπεριφεριακού άξονα.[17] Οι BMPs οι οποίες αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως μόρια που επάγουν την ενδοχόνδρια οστεογένεση (Urist, 1965), θέτουν την βάση για την μορφογένεση του οστού ξεκινώντας την διαφοροποίηση των πρόδρομων χονδροκυττάρων αλλά επίσης ρυθμίζουν τα μετέπειτα στάδια της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων και της τελικής διαφοροποίησής τους σε υπερτροφικά. Οι BMP-2, -4 και -7 ρυθμίζουν συνεργιστικά την ανάπτυξη του άκρου δρώντας στα συσσωματώματα των πρόδρομων κυττάρων και συγκεκριμένα η δράση των BMPs εξαρτάται από τον χώρο και τον χρόνο έκφρασης των BMP υποδοχέων και των ανταγωνιστών τους όπως οι noggin και chordin.[18]

Για την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κρίνεται απαραίτητη και η δράση του κολλαγόνου II, IX, XI και των αγγρεκανών του εξωκυττάρου υγρού καθώς και των SOX πρωτεϊνών, η έκφραση των οποίων εξαρτάται από την BMP σηματοδότηση μέσω των BMP υποδοχέων (BMPRII και BMPRII) οι οποίοι είναι ενεργοί στα συσσωματώματα των χονδροκυττάρων και όχι στον επιχόνδριο χόνδρο.[19][20] Οι BMPs επάγουν σήματα μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερών συμπλόκων και με τους δύο τύπους υποδοχέων τους, οι οποίοι διαθέτουν δραστηριότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Κατά την BMP σηματοδότηση, ο υποδοχέας τύπου 2 (BMPRII) φωσφορυλίζει υποδοχείς τύπου I, ALK-2, BMPRII/ALK-3, και BMPRII/ALK-6.[21][22] Η σηματοδότηση ενεργοποιεί το κανονικό μονοπάτι SMAD, το οποίο περιλαμβάνει τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες Smad 1, 5, και 8 (με δράση ενεργοποιητή) και τις Smad 6 και 7 (με δράση αναστολέα). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από BMPs είναι οι JunB, JunD και τα μέλη των οικογενειών ID και DLX.[23] Οι BMPs επάγουν την σηματοδότηση και την ενεργοποίηση της κινάσης TAK1 (TGFb-activated kinase 1), η οποία αντιδρά με την MEKK1 και ενεργοποιεί τους καταρράκτες σημάτων p38 και JNK, είτε ενεργοποιεί την σηματοδότηση Ras/ERK1/2 ή RhoA/ROCK.[20] Το μονοπάτι p38 συμβάλει στην συσσωμάτωση των πρόδρομων χονδροκυττάρων και η ενεργοποίηση των ERK1/ERK2 έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή τους με την BMP-2 σηματοδότηση προάγοντας την χονδρογένεση.[24] Μετά την BMP-επαγόμενη φωσφορυλίωση των ενεργοποιημένων από υποδοχείς (R)-SMADs, αυτοί δημιουργούν σύμπλοκα με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου συνδέονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Επίσης τα σύμπλοκα των

Smads αλληλεπιδρούν με πολλά στοιχεία της μεταγραφής που ενεργοποιούν ή καταστέλουν την μεταγραφή γονιδίων.[21]

Η ισορροπία της σηματοδότησης από BMPs και FGFs καθορίζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων και κατά συνέπεια τον ρυθμό της διαφοροποίησης τους. Στα μακριά οστά, αρκετά μετά το στάδιο της συσσωμάτωσης των χονδροκυττάρων, οι BMP-2, -3, -4, -5, και -7 εκφράζονται κυρίως στο περιχόνδριο και μόνο η BMP-7 εκφράζεται στα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα.[25] Σε μετέπειτα στάδιο ανιχνεύονται μόνο οι BMP-6 και BMP-2. Από τους πολλούς FGFs που έχουν εντοπιστεί ως τώρα, οι προσδέτες που ενεργοποιούν τους FGFRs in vivo κατά την διάρκεια της χονδρογένεσης είναι αρκετά δύσκολο να εντοπιστούν, αλλά η σηματοδότηση εξαρτάται από την χωρική και χρονική διευθέτηση όχι μόνο των FGFRs αλλά και των προσδετών τους.[26] Ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων στην κατώτερη ζώνη πολλαπλασιασμού και στην προ-υπερτροφική ζώνη είναι υπό τον έλεγχο μίας τοπικής αρνητικής ανατροφοδότησης ανάμεσα στην μεταγωγή σημάτων από την PTHrP και την Indian hedgehog (Ihh). [27][28] Η PTHrP προάγει την ανάπτυξη των χονδροκυττάρων και η Ihh επηρεάζει θετικά την μεταγραφή του γονιδίου της PTHrP και προσθετικά η έκφραση της Ihh ελέγχεται χωρικά και χρονικά από BMP και FGF σηματοδότηση. Επίσης οι PTHrP και Ihh δρουν στα χονδροκύτταρα του αναπτυσσόμενου οστού επάγοντας άλλους παράγοντες για να καθορίσουν ποιά χονδροκύτταρα θα αποτελέσουν μέρος του χόνδρου και ποιά θα ακολουθήσουν την ενδοχόνδρια οστεοποίηση.[29]

Η δημιουργία των μακριών οστών από τον αναπτυσσόμενο χόνδρο συμβαίνει κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, η οποία περιλαμβάνει την τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα, την ασβεστοποίηση του αρθρικού πλέγματος, την αγγειοποίηση και την οστεογένεση.[30] Αυτή η διαδικασία ξεκινά με την μετατροπή των χονδροκυττάρων, έπειτα από ρυθμισμένη σηματοδότηση, σε υπερτροφικά με την αύξηση του όγκου του κυτταρικού υγρού σχεδόν κατά 20 φορές. Η Ihh είναι απαραίτητη για την ενδοχόνδρια μορφοποίηση του οστού και συγχρονίζει την αγγειοποίηση του οστού με την ωρίμανση του περιχόνδριου. Η Ihh εκφράζεται στα προ-υπερτροφικά χονδροκύτταρα όπως μεταβαίνουν από την φάση πολλαπλασιασμού στην υπερτροφική φάση και αρχίζουν να εκφράζουν τους υπερτροφικούς δείκτες, κολλαγόνο τύπου X (Col10a1) και αλκαλική φωσφατάση. Αναφορά Η Runx2 δρά ως θετικός ρυθμιστής στην ωρίμανση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα και αλληλεπιδρά με τις Ihh, Col10a1, BMP-6.[31] Οι επαγόμενες-από-Smad1 BMPs και οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις Smad1 και Runx2/Cbfa1 είναι σημαντικές για τον υπερτροφισμό των χονδροκυττάρων.[32] Η Matrix metalloproteinase (MMP)-13, ένας καθοδικός στόχος της Runx2, εκφράζεται στο τελικό στάδιο των χονδροκυττάρων και χωρίς αυτήν τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα δεν προχωρούν σε οστεοποίηση. Άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (ECM), όπως οι osteocalcin και osteopontin, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση κυττάρου με εξωκυττάρια ουσία κατά την οστεοποίηση. Η τροποποίηση της ECM η οποία συνοδεύει την τελική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην επίδραση του μικροπεριβάλλοντος των χονδροκυττάρων, επίδραση η οποία τα οδηγεί τελικά

σε απόπτωση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων με σκοπό την αντικατάστασή τους από οστέινο ιστό.[33] Συμπερασματικά η σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας και οι τροποποιήσεις που δέχεται παίζει καθοριστικό ρόλο οριοθετώντας την υπερτροφία των χονδροκυττάρων, την αγγειογένεση και την δημιουργία των οστεοβλαστών κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση.[15]

Τα γεγονότα της χονδρογένεσης και της οστεοποίησης με σκοπό την δημιουργία οστών λαμβάνουν πυρετοδώς χώρα κατά την εμβρυική και μεταεμβρυική ανάπτυξη. Οι χόνδρινες δομές σχηματίζονται από την συσσωμάτωση μεσεγγυματικών κυττάρων, ακολουθούμενη από την διαφοροποίηση τους σε χονδροκύτταρα και την έκκριση ουσίων του εξωκυττάρου πλέγματος (extracellular matrix, ECM). Αφού σχηματιστεί μία χόνδρινη δομή, η διακυτταρική σηματοδότηση από τα παρακείμενα κύτταρα και το περιβάλλον τους οδηγεί στην δημιουργία ζωνών κυττάρων, ποικίλης ωρίμανσης οι οποίες θα δημιουργήσουν τα πρωτογενή και δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης. Αυτά τα κέντρα οστεοποίησης ονομάζονται και αναπτυξιακές πλάκες οι οποίες αποτελούνται από τρεις βασικές ζώνες κυττάρων διαφορετικής ωρίμανσης και διαφορετικής μεταβολικής δραστηριότητας. [34] Οι ζώνες που αποτελούν μία αναπτυξιακή πλάκα χαρακτηρίζονται κατά σειρά ως ζώνη ηρεμίας, ζώνη πολλαπλασιασμού και υπερτροφική ζώνη. Τα κέντρα οστεοποίησης ταυτόχρονα και βαθμιαία αυξάνουν την έκταση που καταλαμβάνουν, με την πρόοδο της ανάπτυξης, και αντικαθιστούν πλήρως την χόνδρινη δομή με σκοπό την δημιουργία οστού, αφήνοντας εκτεθειμένες τις επιφάνειες στις οποίες θα αναπτυχθούν οι αρθρώσεις. Η σημαντικότητα της χόνδρινης δομής του πρώιμου οστού έγκειται στην παροχή μίας σταθερής βάσης πάνω στην οποία θα μπορέσει να αναπτυχθεί βαθμιαία το οστό κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και επίσης στον ρόλο της για την επιμήκη ανάπτυξη του οστού. Το μέρος του χόνδρου που συμμετέχει στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση θα αναφέρεται ως αναπτυξιακός χόνδρος. Ο αναπτυξιακός χόνδρος εντοπίζεται σε δύο περιοχές σε κάθε άκρο ενός αναπτυσσόμενου μακρύ οστού: στην αναπτυξιακή πλάκα και στην επίφυση της άρθρωσης οι οποίες καθοδηγούν την άυξηση των πρωτογενών και δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης αντίστοιχα. Η οργάνωση των ζωνών των κυττάρων στην αναπτυξιακή πλάκα και στην επίφυση της άρθρωσης δεν είναι όμοια.[35]

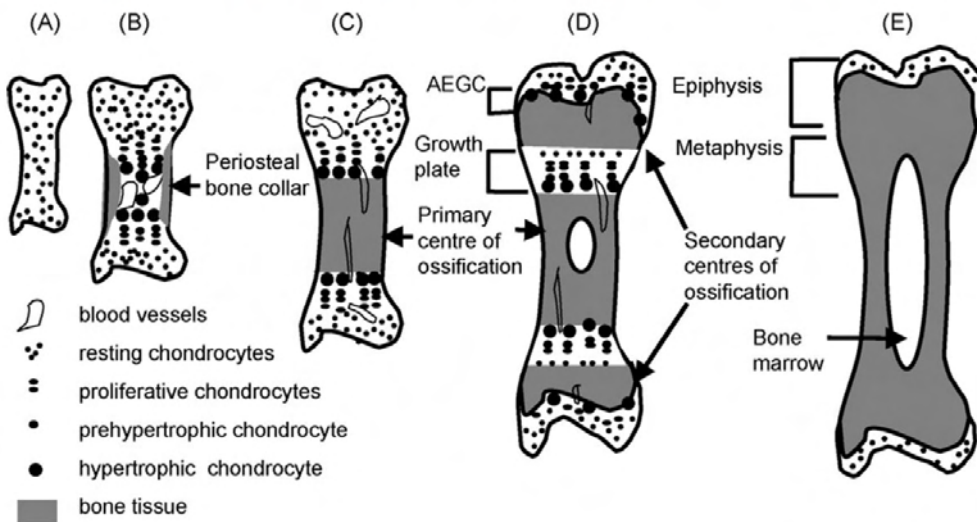
Ανεξάρτητα από την περιοχή ή το στάδιο της ανάπτυξης, τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας είναι ταξινομημένα σε μορφολογικά ξεκάθαρες ζώνες, οι οποίες αντανακλούν τις αλλαγές στα λειτουργικά στάδια των κυττάρων. Η ζώνη μακρύτερα από το μέτωπο της οστεοποίησης είναι η ζώνη ωρίμανσης. Η επόμενη ζώνη που βρίσκεται πιο κοντά στο μέτωπο οστεοποίησης είναι η ζώνη πολλαπλασιασμού, όπου τα χονδροκύτταρα από στογγυλά γίνονται πεπλατυσμένα και πακετάρονται σε συσσωματώματα. Μετά το στάδιο πολλαπλασιασμού τα χονδροκύτταρα περνούν στο στάδιο των προ-υπερτροφικών χονδροκυττάρων.[36] Έπειτα περνούν στο υπερτροφικό στάδιο όπου αυξάνουν δραματικά σε όγκο και ταυτόχρονα έχουν μεγάλες εκκρίσεις που αποτελούν μέρος της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία στην συνέχεια θα αλατοποιηθεί. Ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων και η εκκρίσεις τους που διαμορφώνουν την ECM προκαλούν την αύξηση του αναπτυσσόμενου οστού. Τα υπερτροφικά κύτταρα καθώς ωριμάζουν και πεθαίνουν το



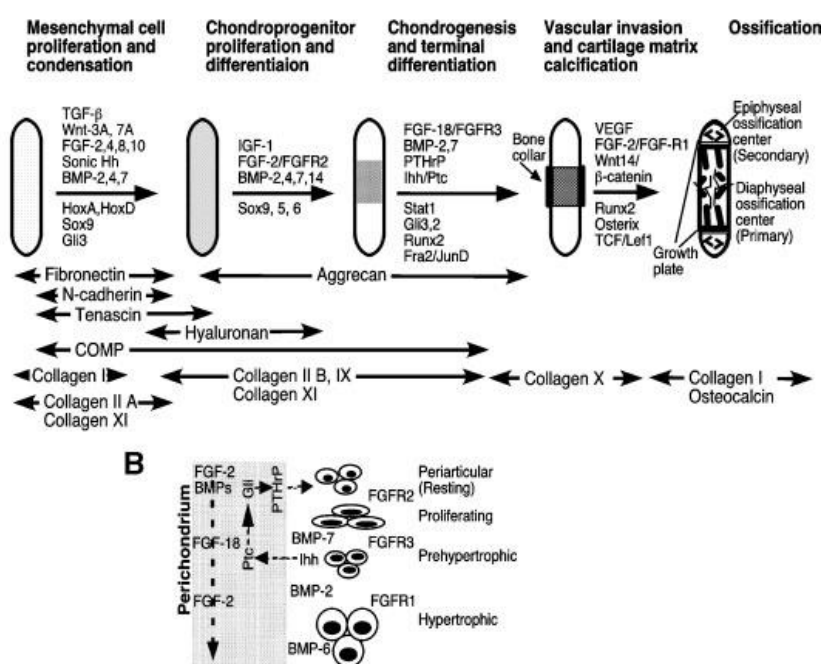
εγκάρσιο αρθρικό πλέγμα που τα χωρίζει καταστρέφεται, αφήνοντας τα κάθετα χωρίσματα ανέπαφα επιτρέποντας την είσοδο των κυττάρων υπεύθυνων για την οστεοποίηση, δηλαδή τα αγγεία, τους οστεοκλάστες, τους πρόδρομους οστεοβλάστες και τα κύτταρα του μυελού. Οι οστεοκλάστες είναι σημαντικοί στην αφαίρεση του χόνδρινου πλέγματος και οι διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες χρησιμοποιούν τα εναπομείναντα στοιχεία του χόνδρινου πλέγματος ως ικρίωμα για την εναπόθεση του οστέινου πλέγματος.[34]

Επειδή ο αρθρικός χόνδρος υπολείπεται αγγείωσης, τα χονδροκύτταρα παίρνουν το οξυγόνο τους και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το αρθρικό υγρό μέσω διάχυσης. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στον χόνδρο είναι 1-3% σε σχέση με το 21% της ατμόσφαιρας. Οι ενεργειακές απαιτήσεις των χονδροκυττάρων καλύπτονται κυρίως μέσω της γλυκόλυσης, όπου η γλυκόζη μεταβολίζεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε γαλακτικό.k[37]m Τα χονδροκύτταρα συνδέονται με το εξωκυτταρικό πλέγμα μέσω πρωτεϊνών σύνδεσης στην επιφάνεια τους, τις ιντεγκρίνες, οι οποίες αντιστέκονται στην μηχανική καταπόνηση. Παρομοίως τα χονδροκύτταρα διαθέτουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς για μία ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, τα οποία ρυθμίζουν την αναβολικές και καταβολικές λειτουργίες στα κύτταρα στόχους τους. Τα χονδροκύτταρα εκκρίνουν τα συστατικά του εξωκυτταρικού πλέγματος και τα ένζυμα τα οποία μπορούν να αποικοδομήσουν αυτό το πλέγμα. Έτσι τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου. Η διατηρητέα λειτουργία και η αντοχή του αρθρικού χόνδρου δείχνει την σημαντική ρυθμιστική φύση των χονδροκυττάρων.[38]

Οι αυξητικοί παράγοντες της άρθρωσης είναι απαραίτητοι για την σύνθεση και διατήρηση του εξωκυτταρίου πλέγματος που θα προστατέψει την άρθρωση από φθορές λόγω κίνησης, τραυματισμού ή φλεγμονής. Τα επιπέδα των παραγόντων αυτών σε υγιή χόνδρο ενήλικα είναι χαμηλά για την διατήρηση του πλέγματος. Παρότι πολλοί παράγοντες είναι αυξητικοί κάποιιοι από αυτούς μπορούν να επάγουν και την αποικοδόμηση του χόνδρου και είναι εν μέρη υπεύθυνοι για τις καταβολικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την οστεοαρθρίτιδα.[39] Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι παράγοντες που αφορούν την ανάπτυξη και διατήρηση του χόνδρου περιλαμβάνουν τους εξής: transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), bone morphogenic proteins (BMPs), cartilage-derived morphogenic proteins (CDMPs), insulin-like growth factors (IGFs), connective-tissue growth factor(CTGF), hepatocyte growth factor (HGF), and fibroblast growth factor (FGF). Στην αντίπερα όχθη οι παράγοντες που επάγουν την αποικοδόμηση του χόνδρου, είναι δυνητικά καταλύτες της OA. Μερικοί από του παράγοντες καταβολισμού του χόνδρου περιλαμβάνουν: πρωτεάσες, fibronectin, κάποιους νευροδιαβιβαστές και φλεγμονώδους παράγοντες οι οποίοι έχουν παρατηρηθεί και στην εκδήλωση της OA. [40][41]



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τα γεγονότα που οδηγούν στην αντικατάσταση του εμβρυϊκού χόνδρου από οστό. Α) Εμβρυϊκός χόνδρος. Β) Εκκίνηση σχηματισμού του πρωταρχικού κέντρου οστεοποίησης στο κέντρο του εμβρυϊκού χόνδρου. Γ) Εμφανώς σχηματισμένο πρωταρχικό κέντρο οστεοποίησης. Δ) Τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης έχουν σχηματιστεί και διαχωρίζονται από το πρωταρχικό κέντρο με την αναπτυξιακή πλάκα. Ο χόνδρος AEGC (articular-epiphyseal growth cartilage) παραμένει κάτω από τον μόνιμο αρθρικό χόνδρο για να σχηματίσει την επίφυση. Ε) Στο ενήλικο οστό το μεταφύσιο και το επιφύσιο οστό έχουν συγχωνευτεί μεταξύ τους, το οποίο οδηγεί στην εξαφάνιση της αναπτυξιακής πλάκας. Ο χόνδρος AEGC έχει αντικατασταθεί από οστό και ο μόνος χόνδρινος ιστός που έχει μείνει είναι ο μόνιμος χόνδρος στην άκρη κάθε οστού. (Martel J. et al, Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. 2008)



Εικόνα 3: Η σειρά των γεγονότων της χονδρογένεσης κατά την ανάπτυξη μακρών οστών: Α) Παρουσιάζονται σχηματικά τα διαφορετικά στάδια, δείχνονται χρονικά οι αναπτυξιακοί και διαφοροποιητικοί παράγοντες (πάνω από τα βέλη) και οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται (κάτω από τα βέλη). Από κάτω από αυτά φαίνονται οι πρωτεΐνες του εξωκυττάριου πλέγματος που διακρίνουν τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Β) Μοντέλο ρύθμισης της αναπτυξιακής πλάκας

που δείχνει τα σημεία έκφρασης και δράσης των Ihh/PTHrP, FGF, και BMP pathways στις διαφορετικές ζώνες και στο περιχόνδριο. (Martel J. et al, Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. 2008)

## A.2.2 Δομή αρθρικού χόνδρου και μεταβολισμός χονδροκυττάρων

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί έναν εξειδικευμένο ιστό, χωρίς νεύρωση και χωρίς αγγείωση οποίος παρέχει την κάλυψη των οστέινων τμημάτων των διαρθρώσεων. Είναι απαραίτητος για την αντοχή της άρθρωσης στο βάρος του σώματος, απορροφά τους κραδασμούς, αντέχει στις δυνάμεις διάτμησης της αρθρώσεως. Οι μοναδικές ιδιότητες αυτού του τύπου ιστού οφείλονται στην δομή και σύνθεση του αρθρικού πλέγματος (cartilage matrix), η οποία αποτελείται από υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεογλυκανών (αγγρεκάνες) συνυφασμένες σε ένα πυκνό δίκτυο ινών κολλαγόνου μαζί με μία μεγάλη ποσότητα νερού. Ο ιστός αυτός επιτρέπει τις φθορές κατά την κίνηση της άρθρωσης, για την οποία απορροφά και κατανέμει το φορτίο. Ο αρθρικός χόνδρος περιλαμβάνει έναν διάσπαρτο αριθμό κυττάρων, τα επανομαζόμενα χονδροκύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύνθεση και διατήρηση του αρθρικού πλέγματος. Το αρθρικό πλέγμα αποτελείται από μακρομόρια με τα κυριότερα να είναι οι πρωτεογλυκάνες (αγγρεκάνες) και το κολλαγόνο. Αυτά τα μακρομόρια είναι καλά ταξινομημένα από την επιφάνεια του χόνδρου μέχρι και τα βαθύτερα στρώματα. Ο χόνδρος διαχωρίζεται σε 4 ζώνες, κάθε μία από τις οποίες έχει διαφορετική λειτουργία: την επιφανειακή ή ζώνη ολίσθησης, την ενδιάμεση ή μεταβατική, την εν τω βάθει και την ασβεστοποιημένη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα όρια μεταξύ των τριών πρώτων ζωνών δεν είναι πολύ ξεκάθαρα.[42]

Η επιφανειακή ζώνη, που αποτελεί και την πιο λεπτή, συντίθεται από λεπτές ίνες κολλαγόνου οι οποίες εφάπτονται μεταξύ τους, χαμηλή ποσότητα πρωτεογλυκανών και επιμηκυσμένα χονδροκύτταρα ευθυγραμμισμένα παράλληλα στην επιφάνεια. Η επιφανειακή ζώνη εφάπτεται με το αρθρικό υγρό και είναι υπεύθυνη για τις ελαστικές ιδιότητες του χόνδρου που τον κάνουν ικανό να αντέχει τις δυνάμεις διάτμησης, τεντώματος και πίεσης που προκύπτουν από την κίνηση της άρθρωσης.[43]

Η ενδιάμεση ζώνη καταλαμβάνει το 40-60% του συνολικού μήκους του αρθρικού χόνδρου. Αποτελείται από πρωτεογλυκάνες και παχιές ίνες κολλαγόνου οργανωμένες σε ακτινικές δέσμες ή στρώματα. Τα χονδροκύτταρα αυτής της ζώνης βρίσκονται σε χαμηλή πυκνότητα και έχουν κυκλικό σχήμα.[44]

Στην εν τω βάθει ζώνη τα χονδροκύτταρα έχουν το ίδιο σχήμα με αυτά της ενδιάμεσης ζώνης και είναι στιβαγμένα κάθετα στην αρθρική επιφάνεια, σε χαμηλή επίσης πυκνότητα. Αυτή η ζώνη περιέχει τις μεγαλύτερες ίνες κολλαγόνου σε ακτινική διεύθυνση και την μεγαλύτερη πυκνότητα αγγρεκανών.[45]

Ο ασβεστοποιημένος χόνδρος διαχωρίζεται από τις άλλες ζώνες μέσω μιας χαρακτηριστικής ενδιάμεσης πλάκας ("tidemark") η οποία διαχωρίζει, φυσικά και μηχανικά, τον χόνδρο από το υποχόνδριο οστό. Η κύρια λειτουργία του φέρεται να είναι η πρόσφυση του χόνδρινου ιστού στο υποχόνδριο οστό καθώς ινίδια κολλαγόνου από την ακτινωτή ζώνη διεισδύουν στον ασβεστοποιημένο χόνδρο. Σε αυτή την ζώνη τα κύτταρα είναι πολύ διάσπαρτα και τα χονδροκύτταρα είναι υπερτροφικά.[46]

Η περιοχή που περιβάλλει τα χονδροκύτταρα αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα μη ινώδους υλικού, το οποίο πιθανότατα αποτελείται από τις εκκρίσεις των χονδροκυττάρων, όπως τις πρωτεογλυκάνες και τις γλυκοπρωτεΐνες. Σε επαφή με την περιοχή αυτή βρίσκεται το αρθρικό πλέγμα, που περιέχει ένα πυκνό δίκτυο με λεπτές ίνες κολλαγόνου οι οποίες σχηματίζουν μία καψιδιακή δομή γύρω από τα κύτταρα και, παρέχει μηχανική υποστήριξη στα χονδροκύτταρα.[39]

### **A.3 Εκφυλισμός αρθρικού χόνδρου και ενδοχόνδρια οστεοποίηση στην οστεοαρθρίτιδα**

Η οστεοαρθρίτιδα επηρεάζει ολόκληρη την άρθρωση, δηλαδή τον χόνδρο, το εξωκυτταρικό υγρό και το υποχόνδριο οστό. Τα κύτταρα σε καθέναν από αυτούς τους ιστούς έχουν διαφορετική ικανότητα στην απόκριση σε τραυματισμούς της άρθρωσης, απόκριση η οποία καταλήγει σε αποικοδόμηση των αρθρικών ιστών. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αποικοδόμηση της άρθρωσης χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις: μία βιοσυνθετική φάση, κατά την οποία τα χονδροκύτταρα της άρθρωσης δρουν προσπαθώντας να επανορθώσουν την εξωκυτταρική μήτρα, και μία φάση αποικοδόμησης κατά την οποία τα ένζυμα παραγόμενα από τα χονδροκύτταρα δρουν καταβολίζοντας την μήτρα, της οποίας η σύνθεση αναστέλεται και ακολουθεί η διάβρωση του χόνδρου. Από αναλύσεις RNA στα χονδροκύτταρα της ΟΑ άρθρωσης προέκυψε πως δεν είναι μεταβολικά αδρανή αλλά συνθέτουν πρωτεΐνες με δομικό και λειτουργικό ρόλο καθώς και ένζυμα αποικοδόμησης. Παραταύτα σε κάποια σημεία της άρθρωσης τα κύτταρα μένουν αδρανή και δυστυχώς σε κάποιο σημείο η καταβολική δραστηριότητα ξεπερνά την αναβολική και ο ιστός αποικοδομείται. [47][47] [48]

Στον ενήλιο χόνδρο τα χονδροκύτταρα συνθέτουν τα συστατικά του εξωκυτταρικού πλέγματος πολύ αργά. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης η βιοσύνθεση ενεργοποιείται από μία ποικιλία αναβολικών παραγόντων και κυτοκινών όπως τα transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , bone morphogenetic proteins (BMPs), και insulin-like growth factor I (IGF-I). Στην ΟΑ πολλοί από αυτούς τους παράγοντες, και άλλοι όπως οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  και η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), παράγονται από τα κύτταρα της άρθρωσης. Στον φυσιολογικό χόνδρο υπάρχει μία αυστηρή ρύθμιση στην φυσιολογία της μήτρας, η οποία διατηρεί μία λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην σύνθεση και την αποικοδόμηση. Στη ΟΑ παραταύτα αυτή η ισορροπία διαταράσσεται με τις διαδικασίες της σύνθεσης και της αποικοδόμησης να εντείνονται. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17 και IL-18 δρουν αυξάνοντας την σύνθεση των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών της μήτρας (matrix metalloproteinases MMPs) και μειώνοντας την έκφραση των αναστολέων τους καθώς επιφέρουν μείωση και στην σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας. Οι αναβολικές κυτοκίνες IGF-I, TGF- $\beta$ 1, 2, και 3, fibroblast growth factors (FGFs) 2, 4 και 8, και οι BMPs δρουν επάγοντας την σύνθεση της μήτρας. [49][47]

Τα μοτίβα απόκρισης των κυττάρων κατά την διάρκεια της ΟΑ με την πρώτη ματιά δείχνουν να έχουν μεγάλη ετερογένεια, αλλά θα μπορούσαν να συνοψιστούν σε 4

κατηγορίες: (1) πολλαπλασιασμός και κυτταρικός θάνατος (απόπτωση), (2) αλλαγές στην συνθετική δραστηριότητα, (3) αλλαγές στην αποικοδομική δραστηριότητα, (4) φαινοτυπική αλλαγή στα χονδροκύτταρα της άρθρωσης και (5) δημιουργία οστεοφύτων.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως υπάρχει χαμηλή συχνότητα πολλαπλασιασμού στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Η δραστηριότητα που εμφανίζεται στα ΟΑ χονδροκύτταρα σχετίζεται περισσότερο με την ευκολότερη πρόσβασή τους σε παράγοντες πολλαπλασιασμού του αρθρικού υγρού εξαιτίας της ρήξης ή χαλάρωσης του πλέγματος κολλαγόνου είτε εξαιτίας της καταστροφής της μήτρας. Σε κάθε περίπτωση η προσπάθεια των χονδροκυττάρων να πολλαπλασιαστούν είναι πιθανότατα αυτό που προκαλεί την συσσωμάτωσή τους, που είναι κύριο χαρακτηριστικό της ΟΑ.[50]

Η μείωση της ποσότητας των πρωτεογλυκανών είναι ένα από τα σημαντικότερα σημεία στην αποικοδόμηση του χόνδρου. Από *in situ* αναλύσεις φένεται πως τα αποθέματα των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας μειώνονται στις ανώτερες ζώνες του αρθρικού χόνδρου στις οποίες είναι ανεσταλμένη η έκφραση των αγγρεκανών της μήτρας. Η σύνθεση πρωτεϊνών της μήτρας είναι μειωμένη στις μεσέες και βαθύτερες ζώνες του χόνδρου όπου η εξωκυττάρια μήτρα είναι ιστοχημικά ανεπηρέαστη και οι πρωτεογλυκάνες δεν είναι πολύ μειωμένες.[51] Αυτό εξηγεί εν μέρει την μείωση των πρωτεογλυκανών στις ανώτερες ζώνες, εάν κάποιος υποθέσει ότι η επίδραση των αγγρεκανών στις ανώτερες ζώνες είναι μειωμένη και η αυξημένη σύνθεση τους σε μία ζώνη δεν μπορεί να υποκαταστήσει την μειωμένη σύνθεση τους σε άλλες ζώνες. [51]

Τα αρθρικά χονδροκύτταρα συνθέτουν διάφορες MMPs, τις MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 13, και 14 καθώς και πολλές πρωτεϊνάσες κυστεΐνης και σερίνης. Τα περισσότερα από αυτά έχουν αυξημένες ενζυματικές δραστηριότητες στην ΟΑ είτε λόγω αύξησης της έκφρασης των γονιδίων τους είτε λόγω μείωσης των αναστολέων τους.[52] Σε σχεδόν όλα τα ΟΑ χονδροκύτταρα οι MMP-3 (stromelysin), MMP-8 (collagenase-2) και MMP-13 (collagenase-3) ήταν αυξημένες. Πολλές MMPs ενεργοποιούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η MMP-13 είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του κολλαγόνου τύπου 2, πέρα από τις MMPs 7,9,14. Αυτό δείχνει την σημαντικότητα των μεταλλομεταλλοπρωτεΐνασών στην αποσταθεροποίηση της άρθρωσης.[53]

Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά της οστεοαρθρίτιδας είναι η ανάπτυξη οστεοχονδρικών εξωγκομάτων που ονομάζονται οστεόφυτα. Πράγματι η ανάπτυξη οστεοφύτων είναι το παθολογικό χαρακτηριστικό εκείνο που θα ξεχωρίσει την ΟΑ από άλλες μορφές αρθρίτιδας.[54] Φαίνεται πως στην ανάπτυξη οστεοφύτων εμπλέκονται μηχανικοί και χημικοί παράγοντες. Τα οστεόφυτα είναι ένα παράδειγμα ανάπτυξης νέου χόνδρινου και οστέινου αρθρικού ιστού κατά την ΟΑ που προκύπτουν από τον ιστό της άρθρωσης ή από κύτταρα προγεννήτορες του περιχόνδριου, γεγονός το οποίο επισημαίνει πως υπάρχει πως υπάρχει ένας πλυθησμός πολυδύναμων κυττάρων που αντιδρά στις χημικές και μηχανικές καταπονήσεις της άρθρωσης.[55] Παρότι η ακριβής λειτουργική σημασία των οστεοφύτων δεν έχει διαλευκανθεί, τα οστεόφυτα ίσως βοηθούν στην σταθεροποίηση της ΟΑ άρθρωσης. [47]

## A.4 Οστεοαρθρίτιδα και γενετική

### A.4.1 Γενετική της οστεοαρθρίτιδας

Η ΟΑ αποτελεί μία σύνθετη ασθένεια που ενέχει ολόκληρη την άρθρωση με πολλαπλούς βιοχημικούς, γενετικούς, εμβιομηχανικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες να συμπεριλαμβάνονται στην εμφάνισή της.[12] Ο κληρονομικός παράγοντας στην γενετική προδιάθεση για την πρωτογενή ΟΑ, όπως έχει υπολογιστεί από μελέτες διδύμων και αδερφών, εκτιμάται πρίπου στο 50% και κληρονομείται με έναν μη-Μενδελικό τρόπο. [56] Επίσης ο επιπολασμός της νόσου ποικίλει ανά πλυθησμό με τον Ασιατικό να έχει τα μεγαλύτερα ποσοστά της ΟΑ του γονάτου και Κορεάτες και Ιαπωνέζοι να εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά στην ΟΑ των μηρών από ότι οι Ευρωπαίοι.[57] Αυτές οι διαφορές στον επιπολασμό της νόσου πιθανόν αντανακλούν την γενετική ετερογένεια των πλυθησμών. Γενικά η αλληλεπίδραση των γενετικών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες της ΟΑ δεν είναι πολύ κατανοητή και μόνο ένα μικρό μέρος της γενετικής συνιστώσας έχει διαλευκανθεί.[58]

Όπως και με άλλες κοινές σύνθετες ασθένειες, η γενετική αρχιτεκτονική της ΟΑ χαρακτηρίζεται από πολυμορφισμούς που καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα συχνοτήτων και βαρύτητας των επιπτώσεων.[59] Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι πολυμορφισμοί είναι μονονουκλεοτιδικοί (SNPs) με χαμηλή συχνότητα αλληλομόρφων (MAF) >5% με μέτρια έως χαμηλή επίπτωση (OR ~1.1–1.3). Ο μικρός αριθμός των χρωμοσωμικών περιοχών της ΟΑ που έχουν ταυτοποιηθεί αφορά ένα μικρό κομμάτι της κληρονομικότητας της ασθένειας (10,7%).[56] Είναι επίσης πιθανό να εκτιμήσουμε την γενετική συνιστώσα των πολυμορφισμών χρησιμοποιώντας genome-wide association study (GWAS), summary statistics, με προσεγγίσεις όπως η Restricted Maximum Likelihood και η παλίνδρομη συσχέτιση φαινότυπου γονότυπου (Phenotype correlation genotype correlation regression). [60] Οι χαμηλής συχνότητας και οι σπάνιοι πολυμορφισμοί (MAF 1–5% και MAF < 1%, αντίστοιχα), οι αλλαγές στο επιγένωμα, οι δομικοί πολυμορφισμοί, και οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος πιθανόν συνεισφέρουν στην γενετική συνιστώσα την οποία ακόμα δεν έχουμε διαλυκάνει.[61]

Παρά τις πολλές προσπάθειες που έχουν γίνει για τον συσχετισμό γονιδιακών περιοχών με την ΟΑ και έχουν αποτύχει να παράγουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, κατ' εξαίρεση το GDF5 έχει συχετιστεί επανηλημένως σε γενετικές μελέτες. Ο παράγοντας GDF5 επιδρά στην χονδρογένεση και την διαμόρφωση της άρθρωσης κατά την ανάπτυξη του σκελετού.[62] Ο πολυμορφισμός 143383, στην 5' περιοχή του GDF5 είχε συχετιστεί αρχικά με την ΟΑ του μηρού σε δύο ανεξάρτητους Ιαπωνικούς πλυθησμούς και αργότερα και σε Ευρωπαϊκούς πλυθυσμούς. Ο SNP αυτός προκαλεί μείωση στα επίπεδα μεταγραφής του GDF5 με αποτέλεσμα την μείωση στο προϊόν της μετάφρασης.[63]

Οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide association scan, GWAS) εξετάζουν εκατοντάδες χιλιάδες SNPs κατά μήκος του γονιδιώματος και προσπαθούν και εξάγουν συχότητες με τον κίνδυνο εμφάνισης πολύπλοκων ασθενειών και φαινοτύπων. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση σημαντικών μονοπατιών-κλειδιά που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου και μπορούν να οδηγήσουν σε νέες προσεγγίσεις στην διάγνωση, θεραπεία, πρόληψη, προγνωστικούς δείκτες και εξατομικευμένη θεραπεία. Πολλές, μικρού και μεγάλου, σκέλους GWAS έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα για την ΟΑ. Από τις μελέτες GWAS κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση γενετικών τόπων που σχετίζονται με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου, σε διαφορετικούς γεωγραφικά πληθυσμούς.[64][65][66] Οι γενετικοί αυτοί τόποι, συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες.[67] [68][69]

**Table 1** Knee osteoarthritis susceptibility genes with genome-wide significant or suggestive evidence

SNP ID	Nearest gene	Study design	Race	Study
rs143383	<i>GDF5</i>	Candidate gene	Asian	Miyamoto, 2007 (4)
rs11718863	<i>DVWA</i>	GWAS	Asian	Miyamoto, 2008 (5)
rs7775228	<i>HLA-DQB1</i>	GWAS	Asian	Nakajima, 2010 (3)
rs10947262	<i>BTNL2</i>	GWAS	Asian	Nakajima, 2010 (3)
rs4730250	<i>COG5</i>	GWAS	Caucasian	Evangelou, 2011 (6)
rs11842874	<i>MCF2L</i>	GWAS	Caucasian	Day-Williams, 2011 (7)
rs12107036	<i>TP63</i>	GWAS	Caucasian	arcOGEN Consortium, 2012 (8)
rs8044769	<i>FTO</i>	GWAS	Caucasian	arcOGEN Consortium, 2012 (8)
rs10948172	<i>SUPT3H/RUNX2</i>	GWAS	Caucasian	arcOGEN Consortium, 2012 (8)
rs11177/rs6976	<i>GLN3/GLT8D1</i>	GWAS	Caucasian	arcOGEN Consortium, 2012 (8)

SNP, single nucleotide polymorphism; GWAS, genome-wide association study.

Πίνακας 3: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σχετιζόμενοι με την ΟΑ του γονάτου σε ασιατικούς και Ευρωπαϊκούς πολυτισμούς. (Takuwa H. Et al., Genome-wide association study of knee osteoarthritis: present and future. 2018)

#### Association of the 9 osteoarthritis loci with radiographically-derived osteoarthritis endophenotypes.

<sup>a</sup>For minimal joint space width, proxy variant rs2150403 ( $r^2=0.99$  with rs6516886) was used. <sup>b</sup>Sample size=13,013. <sup>c</sup>Sample size=6,880. <sup>d</sup>Sample size cases=639. <sup>e</sup>Sample size controls=4,339. <sup>f</sup>two sided p-value. EA: effect allele; EAF: effect allele frequency; SE: standard error; N/A: not available.

rsID	minimal joint space width <sup>b</sup>					Center edge-angle <sup>c</sup>					alpha angle (cam deformity) <sup>d,e</sup>				
	EA	EAF	Beta	SE	P value <sup>f</sup>	EA	EAF	Beta	SE	P value <sup>f</sup>	EA	EAF	Beta	SE	P value <sup>f</sup>
rs2820436	A	0.317	-0.0146	0.0135	0.2817	A	0.317	-0.0104	0.1301	0.9363	A	0.318	0.0165	0.0675	0.8073
rs3771501	A	0.484	-0.0699	0.0127	3.454E-08	A	0.474	0.1943	0.1199	0.1051	A	0.4779	-0.0144	0.0626	0.8176
rs11335718	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11780978	A	0.389	-0.0291	0.0129	0.02419	A	0.386	0.078	0.1239	0.5291	A	0.3866	0.0035	0.0644	0.9564
rs2521349	A	0.398	0.0229	0.0128	0.07404	A	0.391	0.0998	0.1236	0.4192	A	0.3921	-0.0262	0.0644	0.6835
rs864839	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	T	0.702	-0.0206	0.1325	0.8766	T	0.7026	-0.0081	0.0691	0.907
rs375575359	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs116882138	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	A	0.0137	-1.1388	0.5276	0.0309	A	0.0135	0.1814	0.2607	0.4865
rs6516886	T	0.272	-0.0222	0.0143	0.1206	A	0.265	-0.1491	0.1373	0.2773	A	0.263	0.0544	0.0713	0.4458

Πίνακας 4: Συσχέτιση 9 γενετικών τόπων με την ΟΑ από ασθενείς φαινότυπους που διαγνώστηκαν με ακτινογραφία. Χρησιμοποιήθηκαν 30,727 περιπτώσεις ΟΑ και 297,191 control από την UK Biobank. (Zengini E. et al., Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. 2018)

Associations with Knee OA in African Americans (p-value < 1×10<sup>-6</sup>)

Marker	Nearest Gene(s)	Chr	Risk/Other Allele	Risk Allele Freq	JoCo*		OAI*		Meta-Analysis, adjusted for age, sex, and PCs		Meta-Analysis, adjusted for age, sex, PCs, and BMI	
					OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
rs7792864	LINC01006	7	C/G	0.88	2.21 (1.43-3.41)	3.56×10 <sup>-4</sup>	2.47 (1.69-3.60)	2.79×10 <sup>-6</sup>	2.35 (1.77-3.13)	4.11×10 <sup>-9</sup>	2.29 (1.69-3.10)	1.02×10 <sup>-7</sup>
rs145965284	MAG11	3	A/T	0.27	1.72 (1.22-2.44)	1.94×10 <sup>-3</sup>	2.27 (1.54-3.33)	2.78×10 <sup>-5</sup>	1.96 (1.51-2.54)	3.18×10 <sup>-7</sup>	1.92 (1.46-2.53)	3.12×10 <sup>-6</sup>
rs78571182	ANKRD6	6	T/G	0.88	2.59 (1.70-3.94)	9.69×10 <sup>-6</sup>	1.74 (1.19-2.54)	4.25×10 <sup>-3</sup>	2.08 (1.57-2.75)	3.70×10 <sup>-7</sup>	2.17 (1.61-2.93)	3.62×10 <sup>-7</sup>
rs76983122	EPPK1/PLEC	8	T/C	0.11	2.70 (1.75-4.35)	1.00×10 <sup>-5</sup>	1.89 (1.18-3.03)	4.25×10 <sup>-3</sup>	2.31 (1.67-3.20)	4.90×10 <sup>-7</sup>	2.27 (1.60-3.21)	3.76×10 <sup>-6</sup>
rs4920343	PAX7/TAS1R2	1	G/A	0.87	1.79 (1.20-2.70)	4.73×10 <sup>-3</sup>	2.17 (1.52-3.13)	3.43×10 <sup>-3</sup>	2.00 (1.52-2.63)	6.82×10 <sup>-7</sup>	2.04 (1.54-2.78)	1.27×10 <sup>-6</sup>
rs9783397	DDX10/C11orf87	11	T/G	0.71	2.21 (1.53-3.19)	4.73×10 <sup>-3</sup>	1.59 (1.17-2.18)	3.35×10 <sup>-3</sup>	1.83 (1.44-2.32)	6.99×10 <sup>-7</sup>	1.88 (1.46-2.43)	1.00×10 <sup>-6</sup>

Abbreviations: Chr = chromosome, CI = confidence interval, Freq = frequency, JoCo = Johnston County Osteoarthritis Study, OAI = Osteoarthritis Initiative, OR = odds ratio, PCs = principal components

\* Odds ratios adjusted for age, sex, and population stratification

Πίνακας 5: Συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με την ΟΑ σε πλυθησμό Αφρικανών Αμερικάνων. (Kumawat R. et al., Association of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Genes Encoding for Folate Metabolising Enzymes with Glioma and Meningioma in Indian Population. 2018)

Association of knee OA in African Americans with SNPs robustly associated with knee OA in prior studies

SNP	Gene	Chr	Risk/other allele	SNP effect in European Caucasians			SNP effect in African Americans			
				Frequency of risk allele in ECs	OR	Ref	Frequency of risk allele in AAs	Power to detect OR of magnitude seen in ECs <sup>‡</sup>	OR (95% CI) <sup>‡</sup>	P-value from meta-analysis
rs4730250*	7q22 (DUS4L)	7	G/A	0.17	1.17	9, 10	0.01	0.10	NA	NA
rs143383	GDF5	20	T/C	0.59-0.68	1.16	11	0.12	0.46	0.92 (0.68-1.24)	0.59
rs11842874	MCF2L	13	A/G	0.91-0.94	1.17	12	0.77	0.56	1.00 (0.80-1.26)	0.98
rs6976	GLT8D1	3	T/C	0.37	1.12	8	0.15	0.34	0.99 (0.75-1.30)	0.95
rs11177	GNL3	3	A/G	0.38	1.12	8	0.17	0.36	0.98 (0.75-1.27)	0.87
rs4836732	ASTN2	9	C/T	0.47	1.20	8	0.67	0.79	1.11 (0.90-1.35)	0.33
rs9350591	FILIP1; SENP6	6	T/C	0.11	1.18	8	0.12	0.54	0.90 (0.67-1.21)	0.48
rs10492367*	KLHDC5; PTHLH	12	T/G	0.19	1.14	8	0.01	0.09	NA	NA
rs835487	CHST11	12	G/A	0.34	1.13	8	0.64	0.51	0.93 (0.77-1.15)	0.53
rs12107036	TP63	3	G/A	0.52	1.21	8	0.35	0.90	1.12 (0.91-1.38)	0.29
rs8044769	FTO	16	C/T	0.50	1.11	8	0.76	0.32	0.94 (0.75-1.17)	0.56
rs10948172	SUPT3H; CDC5L	6	C/T	0.29	1.14	8	0.30	0.59	0.95 (0.77-1.16)	0.60

Abbreviations: SNP = single nucleotide polymorphism; Chr = chromosome; EC = European Caucasians; OR = Odds ratio; Ref = reference; AA = African Americans; CI = confidence interval; NA = not applicable

\* SNPs with a minor allele frequency < 0.05 were excluded from the meta-analysis

<sup>‡</sup> Power based on 742 cases and 475 controls, p-value = 0.05, and population prevalence of knee OA = 0.35

<sup>‡</sup> Odds ratios adjusted for age, sex, and population stratification

Πίνακας 6: Συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με την ΟΑ σε πλυθησμό Αφρικανών Αμερικάνων από προηγούμενες μελέτες. (Kumawat R. et al., Association of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Genes Encoding for Folate Metabolising Enzymes with Glioma and Meningioma in Indian Population. 2018)



#### **A.4.2 Η Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 2 (BMP-2) στην ΟΑ**

Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών ή BMP (bone morphogenetic proteins), οι οποίες αποτελούν μία κατηγορία της υπερικογένειας των TGF- $\beta$  (transforming growth factor B, παράγονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τους οστεοβλάστες και τα χονδροκύτταρα.[70] Εμπλέκονται στην προστασία έναντι της αποικοδόμησης της άρθρωσης και στον σχηματισμό νέου αρθρικού ιστού αφού, εντοπίζονται κατά τον σχηματισμό οστεοφύτων. Ενεργοποιούν την παραγωγή συστατικών του εξωκυττάριου πλέγματος (ECM) από χονδροκύτταρα και έχουν την ικανότητα να δρουν ενάντια σε καταβολικές κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1.[71]

Έχει προταθεί πως συγκεκριμένα η BMP-2 πιθανόν αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς επαγωγείς της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, ενώ οι υπόλοιπες BMPs προωθούν την ωρίμανση των οστεοβλαστών.[72] Επίσης η BMP-2 ελέγχει την παραγωγή και άλλων BMPs και όταν μπλοκάρεται η δραστηριότητα της κύτταρα του μυελού (marrow stromal cells) αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες.[73]

Παρότι η BMP-2 μπορεί να επάγει τον σχηματισμό του χόνδρου, βρέθηκε πως η έκφραση της στον υγιή ιστό ήταν χαμηλή, αλλά η έκφραση της ήταν υψηλή σε περιοχές που περιβάλλουν τα cartilage lesions και στον οστεοαρθρικό χόνδρο.[74] Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη πως η αύξηση στην έκφραση της BMP-2 δεν αποτελεί μόνο αντίδραση επανόρθωσης, όπως παλαιότερα πίστευαν, αλλά έχει και επίδραση στην παθολογία της νόσου και στην σοβαρότητα του τραυματισμού. [74]

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται μία έρευνα από τους (Liu., et al. 2015) που μελετούν τα επίπεδα της BMP-2 σε 38 ασθενείς με πρωτογενή ΟΑ του γονάτου σε σύγκριση με 20 control ήταν αρκετά μεγαλύτερα στον ορό και στο αρθρικό υγρό. Ο Liu και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι αυτή η αύξηση ίσως οφείλεται στην έκκριση της BMP-2 στο εξωκυττάριο πλέγμα ή στην αύξηση της σύνθεσής της από τα κύτταρα των γειτονικών ιστών είτε και στα δύο. [75]

#### **A.4.3 Επιγενετική ρύθμιση στην οστεοαρθρίτιδα**

Η επιγενετική ρύθμιση συμβάλλει στην αιτιοπαθόγνευα της ΟΑ μέσω αλλαγής του προτύπου μεθυλίωσης του DNA, την τροποποίηση ιστονών και την δράση των μη κωδικών μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένου των microRNAs και long noncoding RNAs. Από τα πρωταρχικά στάδια εμφάνισης της ΟΑ, περιβαλλοντικοί παράγοντες ενεργοποιούν επιγενετικούς μηχανισμούς για να παρέχουν μία θετική ανατροφοδότησης των ενδοκυτταρικών μηχανισμών που σχετίζονται με την παθογένεση της ΟΑ. Αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις διατηρούνται κατά την διάρκεια της ασθένειας παρεμποδίζοντας

την φυσική επανόρθωση του οστού και του χόνδρου και κατ' επέκταση την εξέλιξη της νόσου.[76]

#### **A.4.4.1 Μεθυλίωση του DNA**

Η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται στην παθογένεση της ΟΑ όπως φαίνεται από αρκετές έρευνες. Επιπλέον υπάρχουν αποδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών μοτίβων μεθυλίωσης ανάμεσα σε μέτρια και βαριά ΟΑ,[77] υποδεικνύοντας έτσι τον ρόλο της μεθυλίωσης στα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας. Κάποια ευρήματα δείχνουν επίσης, διαφορετικά μοτίβα DNA μεθυλίωσης σε ανατομικά διαφορετικές, προσβεβλημένες αρθρώσεις.[78] Τα μοτίβα μεθυλίωσης μπορεί να διαφέρουν ακόμα και σε συσσωματώματα χονδροκυττάρων που τοποθετούνται σε διαφορετικά σημεία του ίδιου χόνδρινου ιστού που έχει προσβληθεί από ΟΑ.[79]

Ο Roach et al. 2005 [79] ήταν οι πρώτοι που συσχέτισαν την απώλεια της DNA μεθυλίωσης των εκκινητών με την ανώμαλη έκφραση των γονιδίων MMP-3, MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4 σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Η διμεθυλίωση του -110bp CpG εγγύς του MMP-13 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του υποκινητή από το (HIF)-2α, η οποία οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του MMP13 σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του COL9A1 σε ΟΑ χονδροκύτταρα οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του. Η μεθυλίωση του υποκινητή του SOX9 έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτόν, το οποίο οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του SOX9 σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Η διμεθυλίωση ανοδικά του iNOS ενισχυτή επάγει την σύνδεση του NF-κB και συνεισφέρει στην έκφραση iNOS στην ΟΑ.[80] Η αναστολή της έκφρασης του GDF5 λόγω ανώμαλης μεθυλίωσης,[81] προκαλεί ελλείμματα στην ανάπτυξη του χόνδρου και στην αποτελεσματική επανόρθωσή του.[76]

#### **A.4.4.2 Τροποποίηση ιστονών**

Η διαμόρφωση του επιγενώματος μπορεί να ρυθμιστεί και με τροποποιήσεις στις ουρές των ιστόνων. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικιτινυλίωση, σουμοϋλίωση, ADP-ριβοσυλίωση, απαμίνωση και τον ισομερισμό προλίνης με κύρια δράση την ρύθμιση της μεταγραφής. Η ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστονών ενεργοποιούν και καταστέλουν αντίστοιχα την μεταγραφή.[76]

Όπως αναφέρθηκε και πριν, το SOX9 αποτελεί ένα αναβολικό γονίδιο και η έκφρασή του μειώνεται στην ΟΑ. Όπως είναι αναμενόμενο συμβαίνουν ανασταλτικές τροποποιήσεις στις ιστόνες που σχετίζονται με το SOX9, συμπεριλαμβανομένων της αυξημένης μεθυλίωσης των καταλοίπων H3K9 και H3K27, και της μειωμένης ακετυλίωσης στις ιστόνες H3K9, 15, 18, 23, και 27 στον SOX9 υποκινητή σε ΟΑ χονδροκύτταρα.[82] Η άυξηση του ενζύμου LSD1 στην ΟΑ οδηγεί στην μονο- και δι- μεθυλίωση της H3K9 στον υποκινητή του mPGES-1.[83] Επίσης

επάγεται η έκφραση των COX-2 και iNOS από την IL-1 λόγω αυξημένης δι- και τρι-μεθυλίωσης του H3K4 στους υποκινητές των δύο γονιδίων.[83] Η προσταγλαδίνη E2 μέσω του υποδοχέα της σε χονδροκύτταρα, EP4, αυξάνει την έκφραση αποικοδομητικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των MMP-13 και ADAMTS-5, και ταυτόχρονα αναστέλει την παραγωγή αγγρεκανών, που αποτελούν δομικούς λίθους του εξωκυττάρου πλέγματος.[84]

Epigenetic change	Cell population/tissue	Outcome	References
DNA methylation	Chondrocytes	Loss of DNA methylation in the promoters and abnormal expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-4	Roach et al. (2005)
		Hypermethylation of CpG in the proximal promoter of COL9A1	Imagawa et al. (2014)
		DNA methylation in the promoter of the SOX9 gene is increased	Kim et al. (2013)
		Demethylation of the upstream sites of iNOS	Hashimoto et al. (2013)
		Methylation of the promoter and 5'-UTR of GDF5	Reynard et al. (2011)
		550 CpGs with differential methylation, 83 of the CpGs were in the 24 known OA susceptibility genes	Jeffries et al. (2014)
Histone modification	Chondrocytes	Increased methylation of histone residues H3K9 and H3K27, and decreased histone acetylation at the H3K9, 15, 18, 23, and 27 in the SOX9 promoter	Kim et al. (2013)
		IL-1 $\beta$ -induced H3K9 demethylation at the mPGES-1 promoter by LSD1	El Mansouri et al. (2014)
		Increased H3K4 di- and tri-methylation in chondrocytes following activation by IL-1	El Mansouri et al. (2011)
	Synovial fibroblasts	DNA hypomethylation and histone hyperacetylation in the promoter region of IL-6	F. Yang et al. (2017)

Πίνακας 7: Σύνοψη των DNA μεθυλίσεων και των τροποποιήσεων ιστονών που συμβαίνουν σε ΟΑ ασθενείς. (Reddi A. Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Science to Clinical Applications. 2001)

## A.5 Micro-RNAs

### A.5.1 Τα Micro-RNAs και η βιογένεση τους

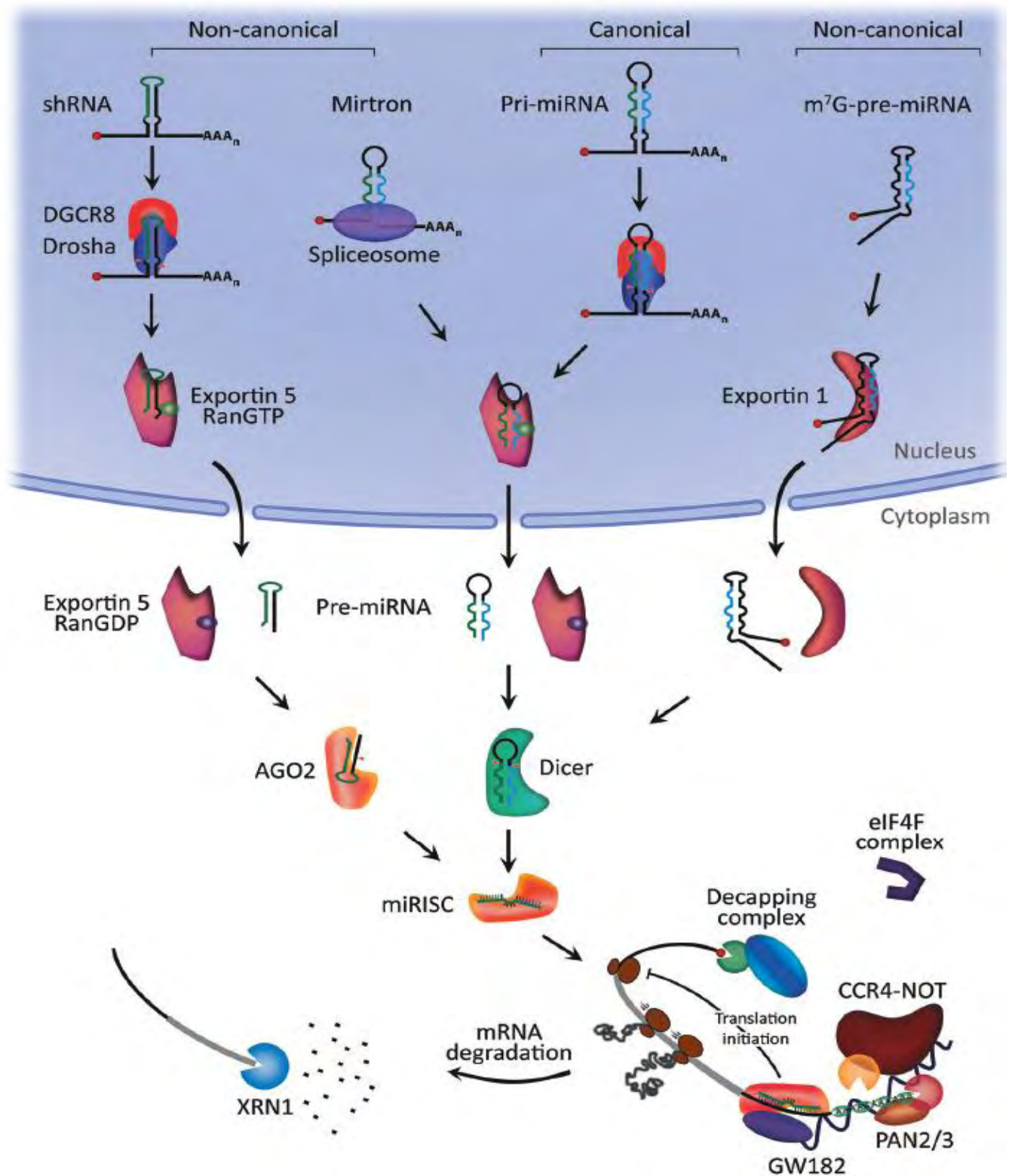
Τα MicroRNAs (miRNAs) αποτελούν μία κατηγορία των μη κωδικών RNA (non-coding RNAs), με μέσο μήκος 22 νουκλεοτιδίων, τα οποία διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η ανακάλυψη του πρώτου miRNA, lin-4, έγινε το 1993 από τις επιστημονικές ομάδες των Ambros και Ruvkun στον *Caenorhabditis elegans* και έφερε μια επανάσταση στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας.[85] Από τότε miRNAs έχουν εντοπιστεί σε όλα ζωικά συστήματα και κάποια είναι υψηλά συντηρημένα ανάμεσα σε πολλά είδη.[86] Τα miRNAs είναι κρίσιμα για την φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών καθώς εμπλέκονται σε ένα μεγάλο πλήθος βιολογικών διαδικασιών.[87] Η μη φυσιολογική έκφραση των miRNAs συνδέεται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες.[88] Επιπροσθέτως τα miRNAs εκκρίνονται στα εξωκυτταρικά υγρά.[89] Τα miRNAs των εξωκυτταρικών υγρών έχουν ευρέως αναφερθεί ως δυνητικοί βιοδείκτες για μία μεγάλη γκάμα ασθενειών και αποτελούν ακόμα, και σηματοδοτικά μόρια με ρόλους στην διακυτταρική επικοινωνία.[90]

Η βιογένεση των miRNA ξεκινά με την επεξεργασία των μεταγράφων που παράγονται από τις RNA πολυμεράσες II/III κατά και μετά την μεταγραφή.[91] Περίπου τα μισά miRNAs παράγονται από γονίδια (intragenic) τα οποία βρίσκονται κυρίως σε ιντρόνια και λίγα σε

εξόνια γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα γονίδια των miRNAs βρίσκονται μεταξύ γονιδίων (intergenic) και ρυθμίζονται από δικούς τους υποκινητές.[92] Τα miRNAs μεταγράφονται από αλληλουχίες DNA αρχικά ως πρώιμα miRNAs (primary miRNAs/pri-miRNAs) και έπειτα από επεξεργασία προκύπτουν τα πρόδρομα miRNAs (precursor miRNAs/pre-miRNAs) και τέλος τα ώριμα miRNAs. Η βιογένεση των miRNA κατηγοριοποιείται σε κανονικά και μη κανονικά μονοπάτια.[93]

Το κανονικό μονοπάτι της βιογένεσης είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου γίνεται η επεξεργασία των miRNA. Σε αυτό το μονοπάτι τα pri-miRNAs μεταγράφονται από τα γονίδια στόχους τους και μετατρέπονται σε pre-miRNAs από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αποτελείται από μία RNA binding protein DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) και ένα ribonuclease III ένζυμο, το Drosha.[94] Όταν παραχθούν τα pre-miRNA εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα από ένα σύμπλοκο exportin 5 (XPO5)/RanGTP και στην συνέχεια κόβονται οι δομές φουρκέτας από την Dicer (RNase III endonuclease), η οποία τα μετατρέπει σε ένα ώριμο δίκλωνο μόριο miRNA.[95] Η κατεύθυνση της αλυσίδας (του δίκλωνου μορίου) του miRNA καθορίζει το όνομα του τελικού ώριμου miRNA. Το 5p strand προκύπτει από το 5' άκρο της φουρκέτας του pre-miRNA ενώ το 3p strand προκύπτει από το 3' άκρο. Μπορούν και τα δύο strands που προκύπτουν από το δίκλωνο μόριο miRNA να συνδεθούν με την οικογένεια των Argonaute (AGO) πρωτεϊνών με έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο.[96][97] Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί διάφορα μη κανονικά μονοπάτια βιογένεσης του miRNA. Αυτά τα μονοπάτια κάνουν χρήση διαφορετικών συνδυασμών των πρωτεϊνών που περιέχονται στο κανονικό μονοπάτι, κυρίως των Drosha, Dicer, exportin 5, και AGO2. Γενικά τα μη κανονικά μονοπάτια βιογένεσης miRNA μπορούν να ομαδοποιηθούν σε Drosha/DGCR8-independent και Dicer-independent pathways.[98][99] Τα μονοπάτια βιογένεσης μπορούν να συοψιστούν στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5).[100]

Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει πως τα ώριμα miRNAs προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες στην 3' UTR του mRNA στόχου για να επάγουν την αναστολή της μετάφρασης του και την αποαδενυλίωση του mRNA και την παρεμπόδιση σχηματισμού της 5' καλύπτρας.[101][102] Παραταύτα η αλληλεπίδραση των miRNAs με άλλες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των 5' UTR και κωδική αλληλουχία έχει επίσης αναφερθεί στην βιβλιογραφία με επιδράσεις σίγησης στην γονιδιακή έκφραση.[103][104] Η αλληλεπίδραση των miRNAs με την αλληλουχία του υποκινητή έχει συνήθως επαγωγική επίδραση στην μεταγραφή. Η αλληλεπίδραση των miRNAs με τα γονίδια στόχους τους είναι δυναμική και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η υποκυτταρική τοποθέτησή τους, ο αριθμός τους, τα mRNA στόχοι και η συγγένια miRNA-mRNA.[105]



Εικόνα 4: Κανονικά και μη κανονικά μονοπάτια βιογένεσης των microRNAs. (Denli A. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. 2004)

### A.5.2 Τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNAs) στην οστεοαρθρίτιδα

Πολλές ομάδες επιστημόνων έχουν προτείνει πως τα miRNAs πιθανόν να διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην ΟΑ εξαιτίας του γεγονότος ότι η μηχανική επιβάρυνση επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των miRNA, ενώ παράλληλα πολλά miRNAs συμμετέχουν στην ρύθμιση γονιδίων σχετιζόμενα με την ανάπτυξη και την ομοίωση του χόνδρου και την παθογένεια της ΟΑ.[106][107] Συγκεκριμένα 25 miRNAs συσχετίστηκαν με την ρύθμιση του υπερτροφικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων και την σύνθεση πρωτεολυτικών ενζύμων.[108] Σημειωτέον σηματοδοτικά μονοπάτια που ενέχονται στην εμφάνιση της ΟΑ, μεταξύ των οποίων το σηματοδοτικό μονοπάτι του transforming growth factor-β (TGF-β)/SMA and Drosophila MADs (SMADs)/Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), και μονοπάτια που συμμετέχουν οι MMPs, ADAMTS, inducible nitric acid synthase (iNOS) IL-1, and TNF-α, ρυθμίζονται εν μέρη από miRNAs.[109] Επιπροσθέτως γενικά παθολογικά φαινόμενα συσχετιζόμενα με την αποικοδόμηση του χόνδρου, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της παχυσαρκίας, της απόπτωσης και της αυτοφαγίας βρέθηκαν να σχετίζονται με την δραστηριότητα συγκεκριμένων miRNAs. Όσο αφορά την αυτοφαγία, τα miRNAs φάνηκε πως έχουν σημαντικό ρόλο στην ανώμαλη αυτοφαγική απόκριση των ΟΑ χονδροκυττάρων λόγω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν την απόπτωση και τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS).[110][111][112]

Η θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της BMP-2 στο πλάσμα με την χρονική περίοδο που πάσχουν οι ασθενείς από ΟΑ μπορεί να αποδοθεί και στην προοδευτική φύση της ΟΑ, σύμφωνα με την Kadery N., et al. 2017[21]. Επίσης οι ίδιοι επιστήμονες παρατήρησαν συσχέτιση της BMP-2 με τις τρεις συνισταμένες της ΟΑ, τον πόνο, την ανικανότητα κίνησης και την ακαμψία της άρθρωσης. Έτσι η BMP-2 δεν αυξάνεται μόνο ανάμεσα σε ασθενή και μη ασθενή άτομα αλλά αυξάνεται και με την βαρύτητα της νόσου. Η μέτρηση της BMP-2 σε ασθενείς με ΟΑ μπορεί να χρησιμεύσει, όχι μόνο ως ένας βιοχημικός δείκτης για την πρόοδο της ασθένειας, αλλά επίσης ως μία ένδειξη για την βαρύτητα της ΟΑ και ένα δυνητικό εργαλείο για την εξακρίβωση του μηχανισμού παθογένεσης της ΟΑ.[113]

### A.7 Το miR-140

Το miR-140 είναι το καλύτερα μελετημένο microRNA το οποίο εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο (cartilage specific). Το γονίδιο του miR-140 εδράζεται μεταξύ των εξωνίων 16 - 17 του γονιδίου *Wwp2* που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που είναι E3 λιγάση της ουβικουΐτινης 2, το οποίο εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 (16p) (Araldi E. and Schipani E., 2010).[114] Κάθε miRNA μεταγράφεται αρχικά ως ένα μακρύ μετάγραφο το οποίο διαθέτει δευτεροταγή δομή, η οποία περιλαμβάνει μία ή περισσότερες stem loops. Οι stem loops από κάθε pre-miRNA ακολουθώντας τεμαχίζονται για να δημιουργηθούν τα ώριμα -5p και -3p σκέλη του miRNA. Ενώ οι λεπτομέρειες της σύνδεσης και της επεξεργασίας αυτών των θραυσμάτων δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές, το ώριμο και λειτουργικό miRNA από

οποιοδήποτε pre-miRNA φαίνεται να είναι καθορισμένο ως το κυρίαρχο σκέλος ενώ το άλλο σκέλος συνήθως αποικοδομείται.[115] Αποδείξεις γενικά τείνουν στο ότι το 5p είναι το λειτουργικό ώριμο miR-140.[116] Ανάλυση της ιντρονικής αλληλουχίας του γονιδίου έχει αποκαλύψει την παρουσία δύο miR-140, του miR-140-3p και του miR-140-5p.[117] Οι περισσότερες προηγούμενες μελέτες που περιλαμβάνουν αρθρικά κύτταρα ή ιστούς έχουν γίνει με την χρήση του miR-140-5p. Έτσι και σε αυτή την μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-140-5p. Παρότι και τα δύο miR-140-3p και -5p προέρχονται από το ίδιο πρώιμο μετάγραφο, το pre-miR-140, έχουν διαφορετικές seed sequences και για αυτό έχουν και διαφορετικά γονίδια-στόχους. Ενώ το miR-140-5p, έχει δειχθεί να στοχεύει αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην ΟΑ, το miR-140-3p, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, στοχεύει την dynamin 1, η οποία διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο κεντρικό νευρικό σύστημα,[118] καθώς και τον nuclear factor kappa B (NF-κB) που είναι συν-ενεργοποιητής του nuclear receptor-interacting protein 1.[119] Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, σύγχρονες μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συμμετοχή του miR-140-5p στη διαδικασία της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των χονδροκυττάρων, αλλά και την εμπλοκή του στην παθογένεση της ΟΑ.

#### **A.7.1 Το miR-140 στη χονδρογένεση και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση**

Το γονίδιο του miR-140 παράγει δύο ώριμα miRNAs (5p and 3p strand) που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό και είναι ιστοειδικά σε χονδροκύτταρα. Η έλλειψη του miR-140 γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την ημιτελή σκελετική ανάπτυξη, πιο συγκεκριμένα παρεμποδίζει την ομαλή διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων χωρίς να επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.[120] Η απαλοιφή του miR-140 σε ποντίκια επιταχύνει την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά και αναστέλλει την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε χονδροκύτταρα της ζώνης πολλαπλασιασμού, ενώ δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους.[121] Η απάλειψη του γονιδίου miR-140 προκαλεί την επέκταση της ζώνης ηρεμίας στον χόνδρο και μία ήπια μείωση της ζώνης πολλαπλασιασμού. Ποντίκια με έλλειψη του miR-140 και υπερκέκφραση της πρωτεΐνης Lin28a παρουσίασαν μία σοβαρή ανωμαλία στην ανάπτυξη της άνω γνάθου, που ενίοτε οδηγούσε σε προγναθισμό της κάτω γνάθου, ένας φαινότυπος που παρατηρείται σε ποντίκια όπου λείπει η Dicer των χονδροκυττάρων.[122] Εν κατακλείδι το miR-140 στα ποντίκια βοηθάει στην διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων στην ζώνη ηρεμίας, αναστέλλει την διαφοροποίηση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων της στηλιδωτής ζώνης.[122]

Στο zebrafish η αποσίωψη του miR-140 προκαλεί μία ήπια επιμήκυνση του χόνδρου της υπερώας.[123] Ενώ η ταυτόχρονη αποσίωψη του miR-140 και η υπερκέκφραση του Lin28a είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικρότερου σκελετού και κρανίου, φαινότυπου ανάλογου με έλλειψη Dicer στο Zebrafish.[124] Επίσης άλλες έρευνες προτείνουν ότι το miR-140 και Let-7 μαζί, παίζουν μείζονα ρόλο στην σκελετική ανάπτυξη του Zebrafish, το οποίο αποτελεί και ένδειξη για τον συντηρημένο ρόλο των miRNAs στα σπονδυλωτά.[122]

Η πρώτη έρευνα που περιλάμβανε το miR-140 ανέφερε πως η HDAC4 ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-140.[125] Σε επακόλουθες έρευνες αποδείχθηκε πως η χημειοαντίσταση ξενομοσχευμάτων καρκινικού όγκου οστεοσαρκώματος οφειλόταν εν μέρη στην αναστολή της HDAC4 από το miR-140, με την ταυτόχρονη έκφραση των p52 και p21.[126] Συμπερασματικά σε γλοιώματα η υπερέκφραση του miR-140 σχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου.[127]

Σε μια άλλη έρευνα του 2009 οι Miyaki et al., κάνοντας χρήση μικροσυστοιχιών miRNA, παρατήρησαν πως το miR-140 παρουσιάζει την μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση μεταξύ ανθρώπινων αρθρικών χονδροκυττάρων και μεσεγχυματικών κυττάρων.[128]

### **A.7.2 Το miR-140 στην οστεοαρθρίτιδα**

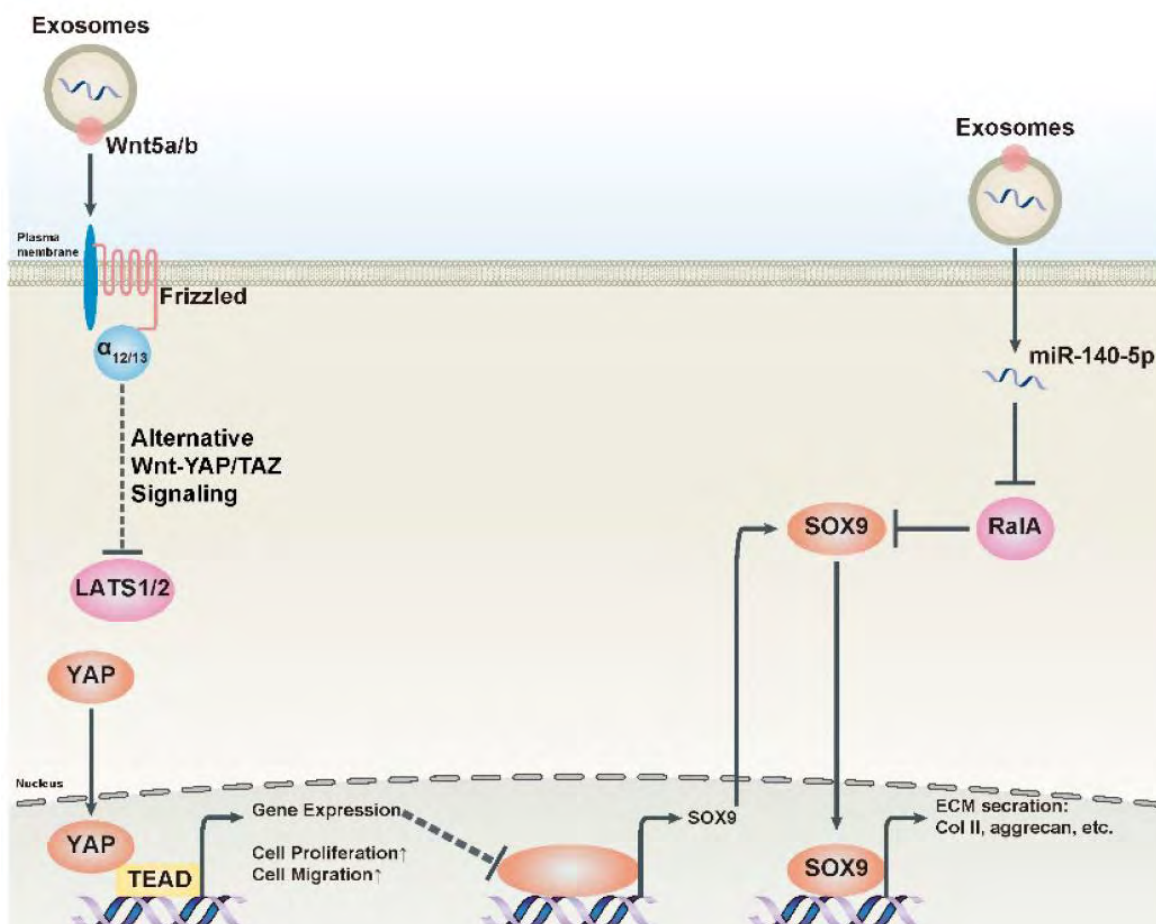
Έχει γίνει αντιληπτό εδώ και χρόνια πως τα microRNAs και συγκεκριμένα το miR-140 διαδραματίζουν ένα ρόλο στην παθογένεση της ΟΑ. Σε μία μελέτη οι Asahara και συνεργάτες [128] έδειξαν πως στον φυσιολογικό ανθρώπινο αρθρικό χόνδρο εκφράζεται το miR-140, και αυτή η έκφραση μειώνεται σημαντικά στην ΟΑ και επίσης σε *in vitro* κατεργασία χονδροκυττάρων με IL-1β (κυτοκίνη εμπλεκόμενη στην παθογένεση της ΟΑ) αναστέλλεται η έκφραση του miR-140. Αντιστρόφως η εισαγωγή του miR-140 σε χονδροκύτταρα ρυθμίζει αρνητικά την επαγόμενη από IL-1β έκφραση της ADAMTS5.[128] Οι Asahara και συνεργάτες αναφέρουν πως το miR-140 έχει μείζονα ρόλο στην παθογένεση της ΟΑ και ότι ενέχονται μηχανισμοί που περιλαμβάνουν την ρύθμιση της έκφρασης της ADAMTS5. Μία σειρά καλά σχεδιασμένων πειραμάτων[120] πρόσφερε ατέραιες αποδείξεις, πως το miR-140 παρότι δεν είναι απαραίτητο για την διαμόρφωση της αρθρικής επιφάνειας του χόνδρου, ότι η ολική αποσιώπησή του προδιαθέτει για ηλικιοεξαρθρώμενες αλλαγές στην ΟΑ και ότι αντίστροφα η υπερέκφραση του miR-140 σε χονδροκύτταρα τα προστατεύει από την ΟΑ. Αυτή η μελέτη είναι σημαντική για μία σειρά λόγων. Δείχνει για πρώτη φορά πως τα microRNA ελέγχουν την ομοιότητα του αρθρικού χόνδρου *in vivo*, παρέχοντας έτσι πρώτες ενδείξεις στους μηχανισμούς που κυριαρχούν την αναπαραγωγή του αρθρικού χόνδρου δίνοντας μας ταυτόχρονα πληροφορίες για πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές.[114][120][128]

Οι Yin και συνεργάτες [129] έδειξαν πως ενώ η βαρύτητα της οστεοαρθρίτιδας αυξάνεται με την ηλικία, η έκφραση των miR-140-5p και -3p δεν αλλάζει. Επίσης τα miR-140-5p και - miR-140-3p βρέθηκαν μειωμένα στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΟΑ, συγκριτικά με άτομα χωρίς τη νόσο, ενώ όσο αυξανόταν η σοβαρότητα της νόσου τόσο μειωνόταν η έκφραση των miR-140, προτείνοντας την αντιστρόφως ανάλογη σχέση της έκφρασης των miR-140 με την σοβαρότητα της νόσου[123]. Επιπροσθέτως η έκφραση του miR-140-5p ήταν 7.4 φορές μεγαλύτερη από αυτή του miR-140-3p σε όλες τις ομάδες ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη. Καθώς η ανάπτυξη της ΟΑ εξελίσσεται, φαίνεται η καταβολική δραστηριότητα να αυξάνεται, η οποία σχετίζεται πρώτον με την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και δεύτερον με την σταδιακή απώλεια



πρωτεογλυκανών, ακολουθούμενη από την αποικοδόμηση κολλαγόνου τύπου 2.[130] Επιπλέον μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης ενός αριθμού καταβολικών ενζύμων πρωτεϊνών (MMPs, ADAMTS5, ADAMTS4, and ADAMTS9) με τη μειωμένη έκφραση του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο.[131] Το miR-140 έχει πολλαπλούς στόχους συμπεριλαμβανομένων των MMP-13, ADAMTS5, IGFBP5 και αγγρεκανών, προτείνοντας πως το miR-140 παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του σχηματισμού του εξωκυττάρου πλέγματος και της αποικοδόμησης του.[132]

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017 από τους Tao S. et al.[133] μετά από επίδραση OA χονδροκυττάρων ποντικών, *in vivo*, με εξωσώματα (SMSC-140-Exos) προερχόμενα από αρθρικά μεσεγχυματικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το miR-140-5p [SMSC-140s: miR-140-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells (SMSC-140-Exos: Exosomes derived from SMSC-140s)], παρατήρησαν ότι ο τραυματισμός της άρθρωσης ήταν ακόμη εμφανής αλλά η βαρύτητα ήταν πολύ ήπια, σε σχέση με τα control (OA+SMSC-Exos group).[127] Το αρθρικό πλέγμα, που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου 2, των προηγούμενων ποντικών ήταν ελαφρώς πιο λεπτό από τα υγιή ποντίκια αλλά εμφανώς σε καλύτερη κατάσταση από τα OA ποντίκια ή τα control (OA+SMSC-Exos group). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν πως τα εξωσώματα (SMSC-140-Exos) επιβράδυναν την εξέλιξη της OA (early OA) και παρεμπόδισαν την βαριά ζημιά στον αρθρικό χόνδρο του γονάτου σε OA μοντέλα ποντικών.[127] Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6) απεικονίζεται συνοπτικά ο θεραπευτικός μηχανισμός υπό τον οποίο δρουν τα αναφερθέντα εξωσώματα (SMSC-140-Exos). Η YAP ενεργοποιείται από τις Wnt5a και Wnt5b από το εναλλακτικό Wnt-YAP/TAZ σηματοδοτικό μονοπάτι. Η ενεργοποίηση της YAP επάγει τον πολλαπλασιασμό χονδροκυττάρων και την μετανάστευση τους και ταυτόχρονα ελαττώνει την έκφραση της SOX9 και την έκκριση του ECM. Με την βοήθεια του miR-140-5p που υπερεκφράζεται στα SMSC-140-Exos, η παραγωγή της SOX9 σώζεται από την αναστολή της RalA και επανακτάται η έκκριση του ECM.[133]



Εικόνα 5: Διάγραμμα που απεικονίζει τον προτεινόμενο μηχανισμό δράσης του εξωσώματος SMSC-140-Exos στην ΟΑ. (Tao SC. et al Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model 2017)

Σε μια άλλη έρευνα που δημοσιεύτηκε από τους Zhao R και συν. το 2019[134] μελετήθηκε ο ρόλος του miR-140 και του IGF-1, μέσω ειδικών πεπτιδίων [phosphorylatable nucleus localization signal linked nucleic kinase substrate short peptide (pNNS)-conjugated chitosan (pNNS-CS)] σε χονδροκύτταρα κουνελιών in vitro και στις αρθρώσεις κουνελιών in vivo. Τα pNNS-CS συνδυάστηκαν με πλασμιδιακά DNA που φέρουν τις αλληλουχίες του IGF-1 και miR-140 και αρνητικό control (pBudCE4.1-IGF-1, pBudCE4.1-miR-140, and negative control pBudCE4.1) για να σχηματίσουν σύμπλοκα pDNA/pNNS-CS. Στη συνέχεια αυτά τα σύμπλοκα εισάχθηκαν σε χονδροκύτταρα in vitro και σε αρθρώσεις γονάτου κουνελιών in vivo. Υψηλά επίπεδα IGF-1 και miR-140 εντοπίστηκαν in vivo και in vitro. Συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα pBudCE4.1, in vitro, τα διαγονιδιακά δείγματα προώθησαν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, αυξήθηκε η σύνθεση γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) και των ACAN, COL2A1, TIMP-1 και μειώθηκαν τα επίπεδα οξειδίου του αζώτου (NO), MMP-13, και ADAMTS-5. In vivo, τα εξωγενή γονίδια α) αύξησαν την παραγωγή COL2A1, ACAN, και TIMP-1 στον χόνδρο β) μείωσαν το Mankin score στον αρθρικό χόνδρο γ) μείωσαν την ποσότητα NO, IL-1β, TNF-α, και GAG στο αρθρικό υγρό κουνελιών δ) μείωσαν το περιεχόμενο MMP-13, ADAMTS-5, COL1A2, COL10A1 στο χόνδρο. Η επιδράσεις που είχε ο

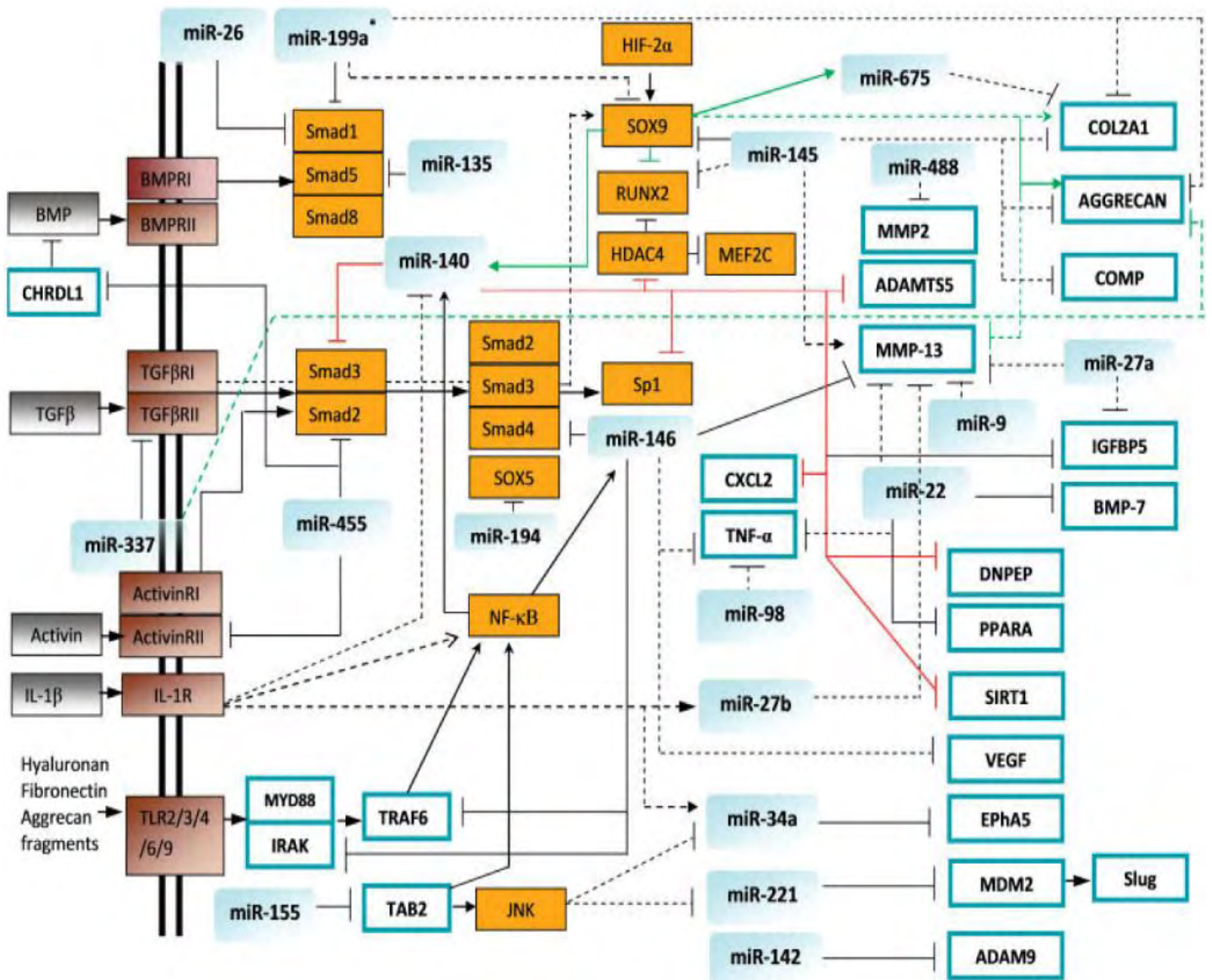
συνδυασμός και των δύο διαγονιδίων (IGF-1, miR-140) ήταν μεγαλύτερες από την επίδραση του καθενός ξεχωριστά. Αυτή η μελέτη αποτελεί ένδειξη πως το pNNS-CS αποτελεί ένα καλύτερο εργαλείο γονιδιακής θεραπείας για ανωμαλίες του χόνδρου και ο συνδυασμός των IGF-1 και miR-140 έχει καλύτερα αποτελέσματα.[134]

Οι Guo P. και συν. σε μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2019 δείχνουν πως η αποσιώπηση του miR-140-5p από λεντοϊούς μπορεί να προάγει σημαντικά την οστεογένεση από βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από λιπώδη ιστό (ASCs) με την άμεση ρύθμιση των γονιδίων στόχων του, TLR4 και BMP2. Επίσης έδειξαν πως ο συνδυασμός adipose scaffold με γενετικά τροποποιημένα ASCs μπορεί να επάγει σημαντικά την επανόρθωση από τραυματισμό και την οστεογένεση σε ατροφικά μοντέλα ψευδάρθρωσης ποντικών.[135]

Μία μελέτη του Isozaki et al. το 2014 έδειξε ότι η fucosyltransferase1 (FUT1), η οποία υπερεκφράζεται κατά την ΟΑ στους αρθρικούς ινοβλάστες, συμβάλει στην κυτταρική συσσωμάτωση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών σε ιστό ασθενούς, ρευματοειδούς αρθρίτιδας.[136] Ο Zi Wang και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μία έρευνα το 2018 για τον ρόλο του άξονα miR-140-5p/miR-149/FUT1 στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την αυτοφαγία των χονδροκυττάρων.[137] Τα miR-140-5p/miR-149 συνδέονται άμεσα στην 3'-UTR της FUT1 σε χονδροκύτταρα και η έκφραση τους σχετίζεται αρνητικά με αυτήν της FUT1. Η μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων είναι ένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά της ΟΑ, το οποίο οδηγεί στην αδυναμία αυτοεπανόρθωσης της τραυματισμένης άρθρωσης.[138] Ο Li et al. αναφέρει πως το miR-140-5p ίσως προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων κατά την ΟΑ με πολλαπλούς τρόπους όπως η βελτίωση του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος.[139] Σε άλλη έρευνα δείχνεται πως το miR-140-5p αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών της άρθρωσης και την έκκριση φλεγμονωδών κυτοσινών μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του TLR4.[140] Στην έρευνα του Zi Wang et al. η αύξηση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των miR-140-5p/miR-149, ελάττωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης FUT1 και αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Γι' αυτό οι επιστήμονες πιστεύουν πως αυτά τα microRNAs επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αναστολής της FUT1. Επίσης, μόρια που σχετίζονται με την φλεγμονή όπως η IL-1 επάγουν την έναρξη του κυτταρικού θανάτου υπό συνθήκες φλεγμονής. Μελέτες δείχνουν πως τα χονδροκύτταρα της άρθρωσης ΟΑ ασθενών εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα αποπτωτικού θανάτου σε σχέση με τα υγιεί.[141] Στην μελέτη του Zi Wang et al. η FUT1 προώθησε σημαντικά την επαγόμενη-από-IL1 απόπτωση, ενώ τα miR-140-5p/miR-149 επανάφεραν τον αποπτωτικό ρυθμό στα φυσιολογικά, οδηγώντας τους στο συμπέρασμα πως η ρύθμιση του FUT1 από τα miR-140-5p/miR-149 ίσως αποτελεί μέθοδο για την αναστολή της απόπτωσης μεσολαβούμενη από την IL-1.[137] Οι Meng et al. αναφέρουν πως το miR-140-5p προωθεί την αυτοφαγία και ευαισθητοποιεί τα οστεοσαρκωματικά κύτταρα απέναντι στην χημειοθεραπεία κατά το οστεοσάρκωμα.[142] Οι Wei et al. επίσης επισημαίνουν πως το miR-140-5p ελαττώνει τον κυτταρικό θάνατο από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας.[143] Στην έρευνα του Zi Wang et al. τα miR-140-5p/miR-149 προώθησαν την αυτοφαγία σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα. Επίσης τα επίπεδα του αυτοφαγώματος άλλαξαν με την έκφραση των

miR-140-5p/miR-149 και της FUT1 οδηγώντας τους στην πρόταση πως ο άξονας miR-140-5p/miR-149/FUT1 μπορεί να ρυθμίσει την αυτοφαγική δραστηριότητα κατά την ΟΑ. [137]

Στην μελέτη των Hui Li et al. το 2017 οι επιστήμονες έδειξαν πως η έκφραση του miR-140-5p ελαττώνεται στους αρθρικούς ινοβλάστες ρευματοειδούς αρθρίτιδας (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASFs), το οποίο υποστηρίζεται και από προηγούμενες έρευνες.[144] Επιπλέον έδειξαν πως το miR-140-5p αναστέλλει την απελευθέρωση πολλαπλασιαστικών και φλεγμονωδών κυτοκινών από RASFs. Η αύξηση των RASF κυττάρων οδηγεί στην αποικοδόμηση της άρθρωσης με την επαγωγή της ανοσολογικής αντίδρασης.[145] Έτσι οι Hui Li et al. πρότειναν πως οι ανασταλτικές επιδράσεις του miR-140-5p στην αναπαραγωγή των RASF κυττάρων και στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών πιθανόν έχουν θεραπευτικό ρόλο στην ρευματοειδή οστεοαρθρίτιδα.[146] Την πρόταση τους αυτή στήριξαν και με τα εξής αποτελέσματα: Η αύξηση της έκφρασης της TLR4 πρωτεΐνης αυξάνει την έκκριση των φλεγμονωδών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-6 και IL-8. Ο πολλαπλασιασμός των RASF κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό της εξέλιξης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και οι φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες προωθούν αυτόν τον πολλαπλασιασμό. Σε αυτή την μελέτη οι επιστήμονες έδειξαν πως το miR-140-5p μπορεί να ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των RASFs και την απελευθέρωση αυτών των κυτοκινών μέσω της αναστολής το γονιδίου-στόχου του TLR4. Έτσι οι Hui Li et al. έβαλαν το miR-140-5p και την TLR4 στο στόχαστρο για την χρήση τους στην κλινική θεραπεία της ρευματοειδούς οστεοαρθρίτιδας.[140]



Εικόνα 6: Ρυθμιστικά δίκτυα microRNAs που εμπλέκονται στην ΟΑ και την χονδρογένεση. Τα miRNAs ρυθμίζουν τα συστατικά διαφορετικών μονοπατιών στα οποία άμεσα (συνεχείς γραμμές) ή έμμεσα (διακεκομμένες γραμμές) αναστέλουν την έκφραση των στόχων τους. Έτσι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση ενζύμων (π.χ. ADAMTS-5 ή MMP-3) άμεσα ή μπορούν να επηρεάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. TGFβ) που τροποποιούνται κατά την ΟΑ. Παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ή τον φαινότυπο των χονδροκυττάρων (π.χ. SOX9 ή HDAC-4) μπορούν να ρυθμίζονται ή να ρυθμίζονται από miRNAs. Μονοπάτια φλεγμονής και miRNAs (π.χ. miR-155 ή miR-146a) μπορούν να επηρεάσουν όλες αυτές τις λειτουργίες. Τα γκρι κουτιά αντιστοιχούν σε κυτοκίνες, τα καφέ κουτιά σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, τα κίτρινα κουτιά σε μεταγραφικούς παράγοντες και τα μπλέ συννοριακά αντιστοιχούν σε άλλα στοιχεία. Ο αστερίσκος υποδεικνύει το passenger strand ενός miRNA.[106]

## A.8 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miRNA-140-5p σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα

Συγκεκριμένα, για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε:

- Η έκφραση του miR-140-5p σε αρθρικό χόνδρο ατόμων με οστεοαρθρίτιδα γόνατος
- Αναζήτηση θέσης σύνδεσης του miR-140 στο mRNA της BMP-2 με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.
- Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ και αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2, μετά από επίδραση του miR-140-5p σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B.1. Υλικά και Μέθοδοι**

#### **B.1.1. Συλλογή δειγμάτων**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου τα οποία συλλέχθηκαν από μηριαίους και κνημιαίους κονδύλους ασθενών που είχαν υποβληθεί σε χειρουργείο ολικής αρθροπλαστικής γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα ασθενών (2 άνδρες και 4 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $65.3 \pm 6.7$ ). Αυτά τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη απομονώθηκαν από σημεία του αρθρικού χόνδρου τα οποία παρουσίαζαν ΟΑ προχωρημένου σταδίου. Ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλης ασθένειας ή ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και σηπτική ΟΑ, χονδροδυσπλασία και μετατραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από την μελέτη. Τέσσερα άτομα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (1 άνδρας και 3 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $58.3 \pm 10.6$ ), χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων και τα οποία είχαν υποβληθεί σε σοβαρές χειρουργικές επεμβάσεις για κατάγματα ή ακρωτηριασμούς.

Για κάθε ασθενή συμπληρώθηκαν σε ειδική φόρμα αναλυτικά κλινικά δεδομένα που αφορούσαν το φύλο, την ηλικία τους, τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), και την παρουσία άλλων νοσημάτων. Προηγήθηκε ακτινογραφικός έλεγχος, πριν την αρθροπλαστική και οι ακτινογραφίες βαθμολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence (K/L score). Οι ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΑ εμφάνισαν K/L score  $\geq 2$  ενώ όλα τα δείγματα των φυσιολογικών αρθρικών χόνδρων είχαν K/L score = 0.

#### **B.1.2. Απομόνωση και καλλιέργεια χονδροκυττάρων**

##### **B.1.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας των χονδροκυττάρων**

Τα χονδροκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από τμήμα αρθρικού χόνδρου που ελήφθη άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Το δείγμα του αρθρικού χόνδρου υπέστη ενζυμική διάσπαση προκειμένου να απελευθερωθούν τα χονδροκύτταρα των οποίων η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες των  $25\text{cm}^3$ , σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη των χονδροκυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instrumanets), όπου επικρατούσαν κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή τους, όπως η σταθερή θερμοκρασία στους  $37^\circ\text{C}$ , οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με  $5\% \text{CO}_2$ . Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής

ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

#### B.1.2.2. Υλικά απομόνωσης και καλλιέργειας χονδροκυττάρων

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Πριν τη χρήση του προστίθεται στο θρεπτικό υλικό ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, ο συγκεκριμένος ορός παρέχει παράγοντες που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM.
- Κολλαγενάση (Roche)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (HyClone)
- Προνάση (Roche)

#### B.1.2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης και καλλιέργειας χονδροκυττάρων

- Έκλυση του ιστού με PBS για απαλλαγή από χειρουργικά υπολείμματα και τεμαχισμός με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Προσθήκη 5mg/ml προνάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 30 λεπτά.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου διαλύματος, προσθήκη 5mg/ml κολλαγενάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 90 min.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15 ml και φυγοκέντρηση στα 2000 spins για 7 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου διαλύματος και προσθήκη 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
- Επαναιώρηση του ιζήματος, μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm<sup>3</sup> και επώαση στον κλίβανο.

#### **B.1.3. Απομόνωση RNA από χονδροκύτταρα κυτταροκαλλιέργειας**

##### B.1.3.1. Υλικά απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)



- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amresco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)

#### B.1.3.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS x2.
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 min στον κλίβανο.
- Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 7 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1-3 ml Trizol, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων.
- Επώαση για 5 min στους 15-30 °C σε υδατόλουτρο.
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου για κάθε ml Trizol.
- Καλή ανάδευση για 15 sec.
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 min στους 4 °C.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε erpendorf των 2 ml.
- Προσθήκη 0,5ml Ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε ml Trizol.
- Επώαση για 10 min στο ψυγείο στους -20°C.
- Φυγοκέντρηση στις 7500 στροφές για 8 min στους 4 °C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του RNA με 1ml 70% αιθανόλης.
- Ανάδευση σε Vortex.

- Φυγοκέντρηση στις 7500 στροφές για 8 min στους 4 °C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου κα στέγνωμα RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για περίπου μία ώρα.
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl).
- Επώαση για 10 min στους 55-60 °C σε υδατόλουτρο.
- Αποθήκευση του RNA στους -80 °C.

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

Τα RNAs που απομονώθηκαν, από τα φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή.

##### B.1.4.1. Υλικά για τη σύνθεση cDNA

- Random hexamers (2,97 μg/μl, Invitrogen)
- Κιτ αντίστροφης μεταγραφής M-MLV SuperScript III (200U/μl, Invitrogen)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO S.A.)

##### B.1.4.2. Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 2μgr RNA από κάθε δείγμα ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl. Αναλυτικότερα:

- Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O και προστέθηκε 1μl Random Primers και 1μl dNTPs, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15 μl
- Το μείγμα θερμάνθηκε στους 70 °C για 7 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των RNA μορίων.
- Ακολούθησε προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες
  - Ρυθμιστικό διάλυμα 5x: 5μl
  - DTT: 2μl

- M-MLV Super Script III (200U/μl): 0,5μl
- Το διάλυμα αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
  - 20 °C, 10 λεπτά
  - 42 °C, 45 λεπτά
  - 99 °C, 3 λεπτά
  - 18 °C, 5 λεπτά
  - τελική θερμοκρασία: 4 °C

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείθηκε το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο GAPDH:

**Forward:** 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'

**Reverse:** 5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'

Το διάλυμα αντίδρασης για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

○ cDNA	3	μl
○ Εκκινητής Forward ( 500 pmol)	1	μl
○ Εκκινητής Reverse (500 pmol)	1	μl
○ Master Mix(Dream Taq Green MM)	12,5	μl
○ δις απεσταγμένο νερό	7,5	μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 min.
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - -αποδιάταξη στους 95°C για 15sec
  - -υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 60 sec
  - -επιμήκυνση στους 72 °C για 30sec
- τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10min.

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, για τον έλεγχο της παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100 bp (Fermentas).

#### **B.1.5. Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων COL10A1, BMP-2, MMP-13, ADAMTS-5, RUNX2 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)**

##### B.1.5.1. Γενικές αρχές ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

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

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου επιτυγχάνει την αξιόπιστη ανίχνευση και την μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα καταγραφής αποτελεί το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems). Η αρχή του συστήματος στηρίζεται στην χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών και στην ανίχνευση του φθορισμού, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση τους στο DNA του δείγματος.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία SYBR Green. Η SYBR Green έχει την ιδιότητα να συνδέεται σε δίκλινα μόρια DNA, ενισχύοντας τον φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών προϊόντων. Η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας είναι στα 497 nm. Η SYBR Green ουσία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την

ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο, συνδέεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Αντίθετα ο υπολογισμός του φθορισμού σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμοκρασιών (πλήθος κύκλων 30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95°C.
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης ακολουθίας-στόχου που προκύπτει, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών.
- θέρμανση του μείγματος στους 68-72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

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

#### B.1.5.2. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων των υπομελέτη γονιδίων

- cDNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα με SYBR Green και ROX (Applied Biosystems)
- Εκκινητές (5μM)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO S.A)

#### B.1.5.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιείχε:

cDNA:	2.5 μl
SYBR Green:	7,5 μl
Εκκινητής reverse:	0.5 μl

Εκκινητής forward:	0.5 μl
ddH <sub>2</sub> O:	4 μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο φαίνονται στον **πίνακα 3**

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων ήταν οι εξής:

- 50°C για 2 λεπτά
- 95°C για 2 λεπτά
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε δύο στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 15''
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών και επιμήκυνση στους 60°C για 1 λεπτό

### **B.1.6 Επιμόλυνση ΟΑ χονδροκυττάρων με mimic miR-140-5p**

#### B.1.6.1 Πρωτόκολλο αποσιώπησης γονιδίων με mimic miRNAs

Μία ημέρα πριν την επιμόλυνση των χονδροκυττάρων με το mimic miR-140-5p τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλάκα με 6 πηγαδάκια και προστίθενται 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε στείρες συνθήκες σε κλίβανο για 24 ώρες (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Τα κύτταρα από τα τρία πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα ελέγχου (δεν προστέθηκε ποσότητα microRNA), ενώ στα υπόλοιπα τρία πηγαδάκια έγινε επιμόλυνση των κυττάρων με 40 nM mimic miR-140-5p. Η μεταφορά του mimic miR-140-5p έγινε με τη βοήθεια της λιποφεκταμίνης σε συγκέντρωση 40 nM.

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την επιμόλυνση κάθε πηγαδιού ήταν η εξής:

- Προσθήκη 2 μl λιποφεκταμίνης σε 498 μl Optimem χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση.
- Προσθήκη 2 μl mimic miR-140-5p σε 498 μl Optimem χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Καλή ανάδευση
- Επώαση των δύο παραπάνω διαλυμάτων για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με αυτό του mimic miR-140-5p. Καλή ανάδευση
- Επώαση του μίγματος για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS x2.
- Μεταφορά 1 ml σε κάθε πηγαδάκι του μίγματος λιποφεκταμίνη / microRNA.
- Προσθήκη 1 ml Optimem χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά (στα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου προστέθηκε μόνο 2 ml Optimem χωρίς να περιέχει FBS και αντιβιοτικά)
- Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 72 h και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν, τόσο για την απομόνωση RNA, όσο και για τον προσδιορισμό της έκφρασης γονιδίων με real time-PCR με τις διαδικασίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

#### **B.1.7. Ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων και της 3' αμετάφραστης περιοχής των mRNAs με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής**

Η ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την εύρεση θέσεων σύνδεσης των miRNAs έγινε με τη χρήση 4 διαφορετικών υπολογιστικών προγραμμάτων (miRanda, miRDB, TargetScan, και Diana-microT), προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

#### **B.1.8. Στατιστική ανάλυση**

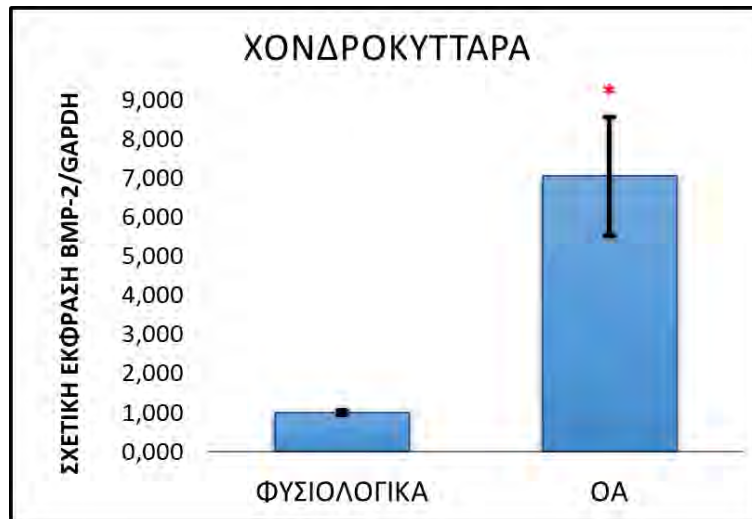
Προχωρώντας στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 20 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες: independent-samples T-test, Kruskal-Wallis, και Spearman correlation. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean + standard error, SE).

## **B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **B.2.1 Προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της BMP-2 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων.**

Αρχικά έγινε προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της BMP-2 σε χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από ΟΑ ασθενείς και υγιή άτομα με τη μέθοδο qRT-PCR.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p=0.013$ ) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα).

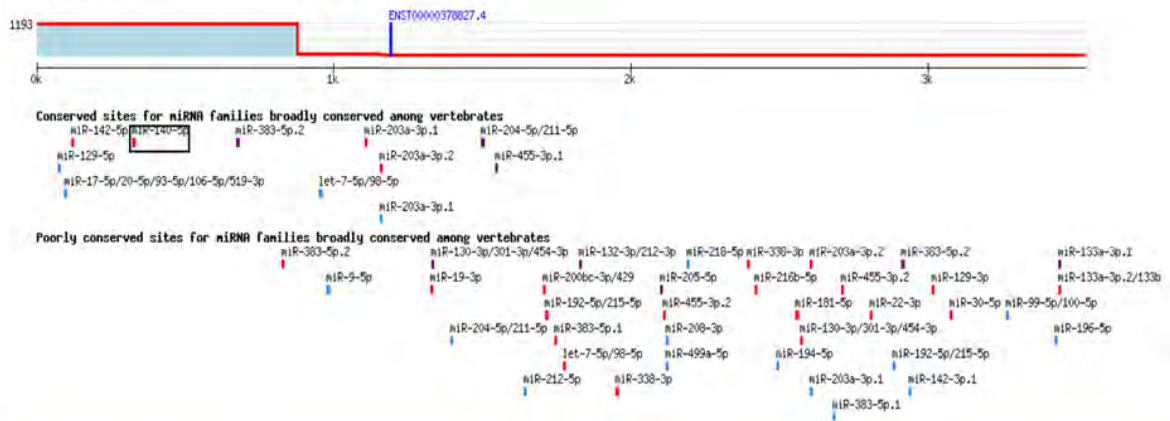
### B.2.2 Ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για θέσεις σύνδεσης miRNAs

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η διαφοροποιημένη έκφραση της BMP-2 στα ΟΑ χονδροκύτταρα είναι αποτέλεσμα δράσης επιγενετικών μηχανισμών, όπως των miRNAs, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την εύρεση θέσεων σύνδεσης miRNAs. Μεταξύ των miRNAs που η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε να συνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2, επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω το miR-140-5p, καθώς ενέχεται στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου. Στην εικόνα 8 φαίνεται η θέση σύνδεσης του miR-140-5p στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2.



A

Human BMP2 ENST00000378827.4 3' UTR length: 3530



B

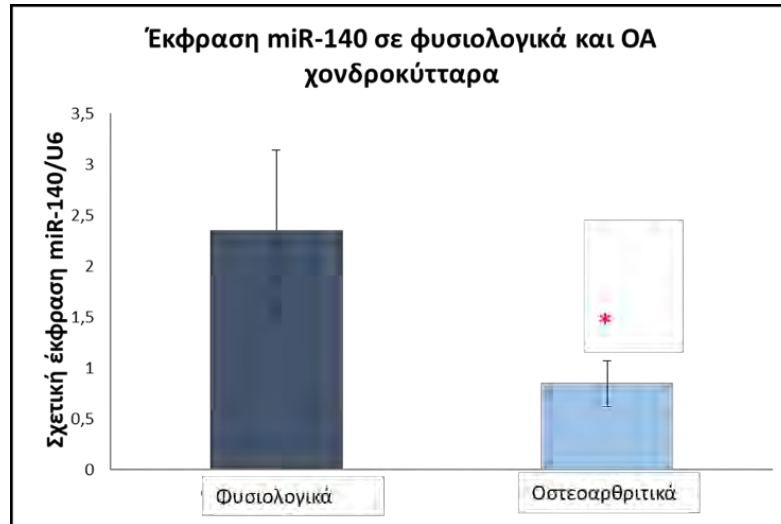
**Conserved**

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 323-329 of BMP2 3' UTR	5' ...UUUUAUUUACUUAUUAACCAU... 	Zmer-m8	-0.38	98	-0.38	8.860	0.85
hsa-miR-140-5p	3' GAUGGUAUCCCAUUUUGGUGAC						

Εικόνα 8: (α) Απεικόνιση της αλληλουχίας της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 και των πιθανών miRNAs που μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση της. (β) Απεικόνιση της θέσης σύνδεσης του miR-140 στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2 όπως βρέθηκε μετά τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

### B.2.3 Έκφραση του miR-140-5p στα OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα

Με τη μέθοδο της qRT-PCR πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του miR-140-5p σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του miR-140-5p στα OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Έκφραση του miR-140-5p σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα. (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα).

#### **B.2.4 Έκφραση της BMP-2 πριν και μετά τη χορήγηση του mimic miR-140-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα**

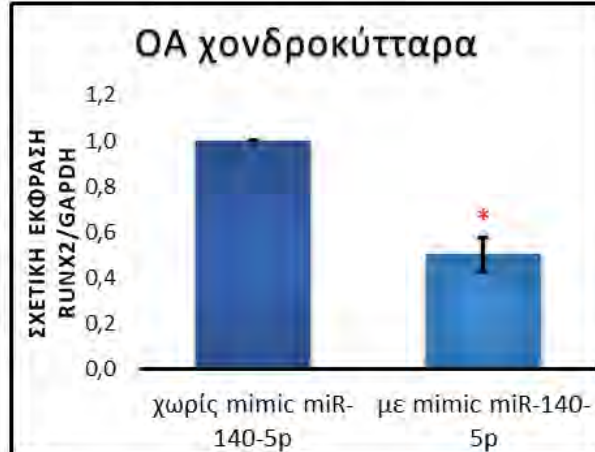
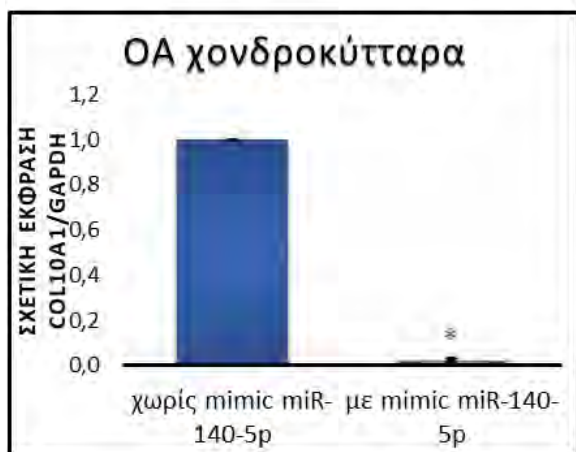
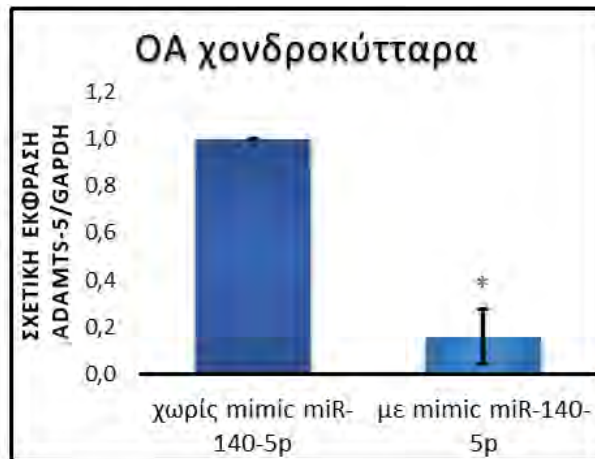
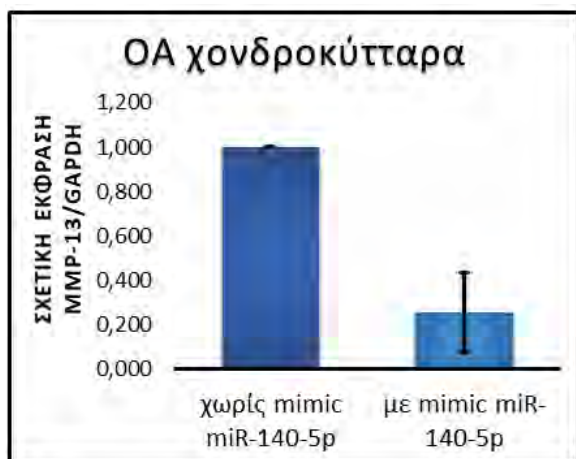
Στη συνέχεια, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης σε κυτταρικό επίπεδο για την επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 από το miR-140-5p, ακολούθησε ο προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 πριν και μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 στα ΟΑ χονδροκύτταρα μετά τη χορήγηση mimic-miR-140-5p, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε ( $p < 0.05$ ) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Απεικόνιση των επιπέδων mRNA της BMP-2 μετά από επίδραση με miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα).

### **B.2.5 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων COL10A1, MMP-13, ADAMTS-5 και RUNX2 μετά από επιδράσεις με miR-140 mimics σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων.**

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της OA και αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2, μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε OA χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης των MMP-13, ADAMTS-5, RUNX2 και COL10A1 μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε OA χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ). (Εικόνα11).



Εικόνα 11: Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων της MMP13, ADAMTS-5, COL10A1 και RUNX2 μετά από επίδραση με mimic miR-140-5p σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων. (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα).

### B.3 Συζήτηση

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) παραμένει ένα μείζον πρόβλημα υγείας σε παγκόσμια κλίμακα, όπως επισημαίνεται σε πρόσφατη δημοσίευση του *OARSI, Osteoarthritis: A Serious Disease*. [147] Η OA προσβάλλει 240 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, περίπου το 10% των αντρών και το 18% των γυναικών άνω των 60 ετών, η οποία συνοδεύεται από νοσηρότητα που περιλαμβάνει αδυναμία κίνησης, και αυξημένη συννοσηρότητα και θνητότητα. [148] Παρά τα υψηλά ποσοστά, η συχνότητα εμφάνισης της OA αναμένεται να αυξηθεί κατακόρυφα τις επόμενες δεκαετίες λόγω του υπερήλικα πληθυσμού, της αύξησης των ποσοστών παχυσαρκίας και των υψηλών συχνοτήτων των σοβαρών τραυματισμών γονάτων. [149][150][151][152] Ο L.A. Mandl σε ανασκοπήσή το 2018 αναφέρει πως βρισκόμαστε σε μία παγκόσμια κρίσης της δημόσιας υγείας και ότι υπάρχει επιτακτική ανάγκη για ενδεδειγμένη κλινική έρευνα υψηλής ποιότητας για την OA, η οποία θα εξασφαλίσει ότι οι ασθενείς θα λάβουν ασφαλείς και αποτελεσματικές θεραπείες. [153]

Η OA αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα και δεν είναι ακόμα εντελώς ξεκάθαρο το σύνολο των παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Πολλοί συστημικοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί ως υπαίτιοι για την OA οι οποίοι δρουν αυξάνοντας την ευαισθησία των αρθρώσεων σε τραυματισμό, είτε προκαλώντας απευθείας βλάβη στην άρθρωση, είτε παρεμποδίζοντας τις διαδικασίες επανόρθωσης μίας τραυματισμένης άρθρωσης. Στους συστημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η ηλικία, το φύλο, οι φυλετικές ορμόνες, η οστική πυκνότητα, η φυλή/εθνικότητα και η γενετική. Επίσης, τοπικοί εμβιοχημικοί παράγοντες, παίζουν το ρόλο τους στην OA καθώς επηρεάζουν την ευαισθησία των αρθρώσεων έναντι στους τραυματισμούς και στην καταπόνηση λόγω φορτίου. Στους τοπικούς μηχανικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η παχυσαρκία, ο τραυματισμός και η καταπόνηση της άρθρωσης, οι δομικές ανωμαλίες της άρθρωσης, η μυϊκή δύναμη. Οι συστημικοί με τους τοπικούς παράγοντες πιθανόν δρουν με έναν αρthro-ειδικό τρόπο για να καθορίσουν αν μία απόκριση επανόρθωσης στην άρθρωση είναι φυσιολογική ή όχι και αν μπορεί ή όχι να παρέχει προστασία από μελλοντική φθορά. [1] Ο κληρονομικός παράγοντας στην γενετική προδιάθεση για την πρωτογενή OA, όπως έχει υπολογιστεί από μελέτες διδύμων και αδερφών, εκτιμάται περίπου στο 50% και κληρονομείται με έναν μη-Μενδελικό τρόπο. [56]

Η επιγενετική ρύθμιση συμβάλλει στην αιτιοπαθόγνευα της OA μέσω αλλαγής του προτύπου μεθυλίωσης του DNA, της τροποποίησης ιστονών και της δράση των μη κωδικών μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένου των microRNAs και των long noncoding RNAs. [76] Πολλές ομάδες επιστημόνων έχουν προτείνει πως τα miRNAs πιθανόν να διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην OA εξαιτίας του γεγονότος ότι η μηχανική επιβάρυνση επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των miRNA, ενώ παράλληλα πολλά miRNAs συμμετέχουν στην ρύθμιση γονιδίων σχετιζόμενων με την ανάπτυξη και την ομοιόσταση του χόνδρου και την παθογένεια της OA. [106][107] Έχει γίνει αντιληπτό τα τελευταία χρόνια πως το miR-140 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της OA. Το γονίδιο του miR-140 παράγει δύο ώριμα miRNAs (5p and 3p strand) που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό και σχετικά

ιστοειδικά σε χονδροκύτταρα. Η έλλειψη του miR-140 γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την ημιτελή σκελετική ανάπτυξη, πιο συγκεκριμένα παρεμποδίζει την ομαλή διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων χωρίς να επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.[120]

Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών ή BMP (bone morphogenetic proteins), παράγονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα.[70] Εμπλέκονται στην προστασία έναντι της αποικοδόμησης της άρθρωσης και στον σχηματισμό νέου αρθρικού ιστού αφού, εντοπίζονται κατά τον σχηματισμό οστεοφύτων. Ενεργοποιούν την παραγωγή συστατικών του εξωκυττάρου πλέγματος (ECM) από χονδροκύτταρα και έχουν την ικανότητα να δρουν ενάντια σε καταβολικές κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1.[71] Έχει προταθεί πως, συγκεκριμένα η BMP-2 πιθανόν αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς επαγωγείς της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, ενώ οι υπόλοιπες BMPs προωθούν την ωρίμανση των οστεοβλαστών.[72]

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miR-140-5p μέσω ρύθμισης της BMP-2 στη οστεοαρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 στα OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ( $p=0.013$ ) (Εικόνα8). Τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR επιβεβαιώνονται από την μελέτη των Dell'Accio F. et al., οι οποίοι παρατήρησαν πως η έκφραση της στον υγιή ιστό ήταν χαμηλή, αλλά η έκφραση της ήταν υψηλή τόσο σε περιοχές που περιβάλλουν τις αλλοιώσεις του OA αρθρικού χόνδρου όσο σε περιοχές με βαριές αλλοιώσεις στον χόνδρο.[74] Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη πως η αύξηση στην έκφραση της BMP-2 δεν αποτελεί μόνο αντίδραση επανόρθωσης, όπως παλαιότερα πίστευαν, αλλά έχει και επίδραση στην παθολογία της νόσου και στην σοβαρότητα του τραυματισμού. [74] Στην βιβλιογραφία αναφέρεται μία έρευνα από τους (Liu., et al. 2015) που μελετούν τα επίπεδα της BMP-2 σε 38 ασθενείς με πρωτογενή OA του γονάτου σε σύγκριση με 20 υγιείς ήταν αρκετά μεγαλύτερα στον ορό και στο αρθρικό υγρό τω OA ασθενών.. Ο Liu και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι αυτή η αύξηση ίσως οφείλεται στην έκκριση της BMP-2 στην εξωκυττάρια ουσία ή στην αύξηση της σύνθεσής της από τα κύτταρα των γειτονικών ιστών είτε και στα δύο. [75] Με βάση τα παραπάνω ο υπολογισμός της BMP-2 σε ασθενείς με OA μπορεί να χρησιμεύσει, όχι μόνο ως ένας βιοχημικός δείκτης για την εξέλιξη της ασθένειας[21], αλλά επίσης και ως μία ένδειξη για την βαρύτητα της νόσου και ένα δυνητικό εργαλείο για την εξακρίβωση του μηχανισμού παθογένεσης της OA.[113]

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η διαφοροποιημένη έκφραση της BMP-2 στα OA χονδροκύτταρα είναι αποτέλεσμα δράσης επιγενετικών μηχανισμών, όπως των miRNAs, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της BMP-2 για την εύρεση θέσεων σύνδεσης miRNAs. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση 4 διαφορετικών υπολογιστικών προγραμμάτων (miRanda, miRDB, TargetScan, και Diana-microT), προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Μεταξύ των miRNAs που η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε να συνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της BMP-2, επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω το miR-140-5p, καθώς ενέχεται στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

Εν συνεχεία, σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε ο προσδιορισμός και η σύγκριση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του miR-140-5p σε φυσιολογικά και OA χονδροκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την χρήση qRT-PCR για τον προσδιορισμό των μεταγραφικών επιπέδων του miR-140-5p έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα, σε σχέση με τα χονδροκύτταρα φυσιολογικού ιστού, προτείνοντας τη συμμετοχή του miR-140 στην αιτιο-παθογένεια της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη του Iliorouλος και συν. το 2008 από το Εργαστήριο που εκπονήθηκε η παρούσα πτυχιακή, [154] οι οποίοι έδειξαν πως στον φυσιολογικό ανθρώπινο αρθρικό χόνδρο εκφράζεται το miR-140, και αυτή η έκφραση μειώνεται σημαντικά στην OA. Επίσης τα ευρήματα των Iliorouλος και συν.. επιβεβαιώθηκαν την επόμενη χρονιά (2009) από δύο επιστημονικές ομάδες των Miyaki S και συν. και των Tardif G. και συν. [128][155] Έχοντας ως βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να πούμε πως κατά την εκδήλωση της OA, η έκφραση του miR-140 μειώνεται στα χονδροκύτταρα κατ' επέκταση, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων αυτού. Μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έκφρασης διαφόρων καταβολικών ενζύμων, όπως μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και κυρίως της MMP-13, καθώς και των ADAMTS5, ADAMTS4, και ADAMTS9 με τη μειωμένη έκφραση του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο. [126] Το miR-140 έχει πολλαπλούς στόχους συμπεριλαμβανομένων των MMP-13, ADAMTS5, IGFBP5 και αγγρεκανών, προτείνοντας το σημαντικό ρόλο του στην διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του σχηματισμού του εξωκυττάρου πλέγματος και της αποικοδόμησης του. [127] Έχει παρατηρηθεί σε πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια, ότι η υπερέκφραση του miR-140 συνοδεύεται από εκδήλωση ανθεκτικότητας στην εμφάνιση OA, λόγω καταστολής της έκφρασης καταβολικών ενζύμων της ECM. [120] Από τα παραπάνω φαίνεται η διπλή δράση του miR-140 στα χονδροκύτταρα καθώς, αφενός το miR-140 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστικό μόριο κατά τη χονδρογένεση και την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου ωστόσο, και αφετέρου συμμετέχει και σε διεργασίες εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου, λόγω απορρύθμισης και διαταραχής των επιπέδων έκφρασής του, και κατ' επέκταση των γονιδίων-στόχων του, που συμμετέχουν στις διαδικασίες διατήρησης της ομοιόστασης των χονδροκυττάρων. Συνεπώς, η πλήρης κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην ρύθμιση της έκφρασης του miR-140, όπως επίσης και τα γονίδια που αποτελούν ρυθμιστικό στόχο για το συγκεκριμένο miRNA κρίνονται απαραίτητα προκειμένου η μοριακή βάση της OA να μπορέσει να καταστεί πιο διακριτή με τελικό στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών για την αντιμετώπιση του νοσήματος.

Στη συνέχεια, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης σε κυτταρικό επίπεδο για την επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης της BMP-2 από το miR-140-5p, ακολούθησε ο προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 πριν και μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της BMP-2 στα OA χονδροκύτταρα μετά τη χορήγηση mimic-miR-140-5p συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έρχεται από την δημοσίευση

των Yang R. Et al. το 2018 όπου το miR-140 και η πρωτεΐνη BMP-2 φαίνεται να δρα συνεργιστικά στις καταβολικές διεργασίες κατά την ΟΑ αλλά και στις αναβολικές διαδικασίες μετά την επέμβαση ατόμων με ΟΑ του γονάτου. [156] Άγεται λοιπόν περαιτέρω μελέτης η αλληλεπίδραση μεταξύ του miR-140 και του mRNA της BMP-2 στην ΟΑ και στους διαφορετικούς ιστούς της άρθρωσης για την διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ωθούν στον καταβολισμό του αρθρικού χόνδρου και στον αναβολισμό του.[157]

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ και αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της BMP-2, μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Οι MMP-13, ADAMTS-5, RUNX2 και COL10A1 έχουν μελετηθεί και σε προηγούμενες μελέτες για την αλληλεπίδραση των μεταγράφων τους με το miR-140. Από τα αποτελέσματα της real-time PCR παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής έκφρασης των *MMP-13*, *ADAMTS-5*, *RUNX2* και *COL10A1* μετά τη χορήγηση mimic miR-140-5p σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Η αξία της μελέτης των γονιδίων-στόχων του miR-140 ενέχεται στην κατανόηση της μοριακής βάσης τόσο της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και οστεογένεσης όσο και της παθογένειας της ΟΑ. Το προαναφερθέν θα μας βοηθήσει στην ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για την ΟΑ και άλλων διαταραχών του σκελετικού συστήματος. Για αυτό τον λόγο παρατίθενται στην συνέχεια τα σημεία αλληλεπίδρασης των γονιδίων στόχων με το miR-140.

Η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) αποτελεί ένα από τα σημαντικά μόρια στην αποικοδόμηση και στην φλεγμονή της οστεοαρθρικής άρθρωσης.[158] Η IL-1β επάγει έναν καταράκτη φλεγμονωδών και καταβολικών γεγονότων στα χονδροκύτταρα. Επίσης επηρεάζει τον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων καταστέλλοντας την σύνθεση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνων και επάγοντας την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs).[159] Σε δημοσίευση του Miyaki et al. το 2009 οι επιστήμονες έδειξαν πως η εισαγωγή ds-miR-140 σε ΟΑ χονδροκύτταρα μείωσε την έκφραση της ADAMTS5 και της MMP-13 επάγωντας την IL-1β.[128] Η MMP-13 είναι από τους κύριους "παίκτες" στην παθολογία της ΟΑ, εξαιτίας της ικανότητάς της να αποικοδομεί, εκτός από μόρια κολλαγόνου, και συστατικά του εξωκυτταρικού πλέγματος.[160] Οι ADAMTS4 (aggrecanase-1) και ADAMTS5 (aggrecanase-2) είναι τα κύρια ένζυμα που ευθύνονται για την αποικοδόμηση των αγγρεκανών και η αναστολή τους αποτελεί ένα κύριο θεραπευτικό στόχο στην ΟΑ.[161] Η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά κατά την ΟΑ έχει χαρακτηριστεί εκτενώς και θεωρείται ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος.[162] Το RUNX2 είναι κύριος μεταγραφικός παράγοντας της τελικής διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, γι' αυτό ρυθμίζει άμεσα ένζυμα υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του εξωκυτταρίου πλέγματος. Το κολλαγόνο τύπου X (type X collagen) είναι ο πιο αντιπροσωπευτικός δείκτης των υπερτροφικών χονδροκυττάρων και θέσεις σύνδεσης του RUNX2 έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή του εκκινήτη του Col10a1, επισημαίνοντας τον έλεγχο της μεταγραφής του Col10a1 γονιδίου από το RUNX2.[163] Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας για το Col10a1 επιβεβαιώνονται και από τους Canfeng Li et al. το 2018 οι οποίοι παρατήρησαν μείωση στην έκφραση του Col10a1 μετά από εισαγωγή mimic-miR-140 σε ΟΑ χονδροκύτταρα.[164] Επίσης έχει δειχθεί ότι ο RUNX2



μπορεί να συνδέεται άμεσα στον εκκινητή του MMP-13 σε κύτταρα χονδροσάρκωματος [165], και αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την άποψη πως πολλές MMPs και ADAMTSs είναι άμεσοι στόχοι του RUNX2.[166][167][168][169]

Οι διακετυλάσες των ιστονών HDAC4 και HDAC5 έχουν αρνητική επίδραση στην σηματοδότηση από μορφογενετικές πρωτείνες των ιστονών λόγω του ρυθμιστικού τους ρόλου στον RUNX2. Ο διακετυλιωμένος παράγοντας Runx2 ωθεί την πρωτείνη αυτή σε διαμεσολαβούμενη από Smurf αποικοδόμηση.[170] Έχει βρεθεί πως το miR-140 επίσης στοχεύει την HDAC4 στα χονδροκύτταρα και έτσι έμμεσα επηρεάζει θετικά την δραστηριότητα της RUNX2.[171] Τα αποτελέσματα του πειράματός μας, όμως, δείχνουν πως η εισαγωγή του miR-140 μειώνει τα επίπεδα της RUNX2. Αυτό θα μπορούσε πιθανόν να αποδοθεί στο γεγονός ότι η BMP-2 σηματοδότηση διεγείρει την ακετυλίωση της Runx2 από το p300, αυξάνοντας την τρανσ-ενεργοποίηση της και αναστέλει την μεσολαβούμενη από την Smurf1 αποικοδόμηση της.[170] Έτσι, η μείωση των επιπέδων της BMP-2 από το miR-140 θα έχει πιθανόν ως συνέπεια και την μείωση των επιπέδων της Runx2. Ακολούθως η μείωση του μεταγραφικού παράγοντα Runx2 θα επιφέρει και μείωση στα γονίδια στόχους όπως των MMP-13, ADAMTS5, COL10A1.

Συμπερασματικά, το miR-140 κατέχει έναν πολύπλοκο ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του οστού, όσο και στην αιτιοπαθογένεια της OA και στην εξέλιξή της. Η υψηλή ιστο-ειδικότητα του και η συμμετοχή του σε πολλές αναπτυξιακές και παθολογικές διαδικασίες που αφορούν κυρίως τον αρθρικό χόνδρο, καθιστούν το εν λόγω microRNA, ένα μόριο στόχευσης πολλών πειραματικών μελετών με σκοπό αφενός την διαλεύκανση των μοριακών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει –άμεσα ή έμμεσα- μέσω της ρύθμισης που επιφέρει στα γονίδια-στόχους του αλλά και την ανακάλυψη και άλλων miRNA που δρουν σε αντίστοιχα μονοπάτια και αφετέρου τον χαρακτηρισμό των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην ρύθμιση της έκφρασης και της δράσης του. Η παρούσα πτυχιακή εργασία συνέβαλε στον περαιτέρω χαρακτηρισμό της δράσης του miR-140-5p στην OA μέσω ρύθμισης της BMP2 σηματοδότησης.

Στις μελλοντικές προοπτικές της παρούσας έρευνας θα μπορούσε να συμπεριλαμβάνεται αφενός ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν αλλά και τα ενδιάμεσα μόρια που ενέχονται- στην επαγόμενη από το miR-140-5p- BMP2 σηματοδότηση καθώς και ο ρόλος τους στον φαινότυπο των οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων και κατ'επέκταση στην κλινική εικόνα της νόσου. Επίσης μελλοντικά θα μπορούσαν να μελετηθούν και άλλα miRNA με τα οποία το miR-140-5p συμμετέχει σε κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια συμβάλλοντας στον OA φαινότυπο.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Arden N and Nevitt M C: **Osteoarthritis: Epidemiology**. 2006 *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20** 3–25
- [2] Hunter D J and Felson D T: **Osteoarthritis**. 2006 *BMJ* **332** 639–42
- [3] Peach C A, Carr A J and Loughlin J: **Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis**. 2005 *Trends Mol. Med.* **11** 186–91
- [4] Peat G, McCarney R and Croft P: **Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care**. 2001 *Ann. Rheum. Dis.* **60** 91–7
- [5] Tallon D, Chard J and Dieppe P: **Relation between agendas of the research community and the research consumer**. 2000 *Lancet* **355** 2037–40
- [6] Jordan K M, Arden N K, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma J W J, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Leeb B, Lequesne M, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Serni U, Swoboda B, Verbruggen G, Zimmerman-Gorska I, Dougados M and ESCISIT S C for I C S I T T: **EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)**. 2003 *Ann. Rheum. Dis.* **62** 1145–55
- [7] Cushnaghan J and Dieppe P: **Study of 500 patients with limb joint osteoarthritis. I. Analysis by age, sex, and distribution of symptomatic joint sites**. 1991 *Ann. Rheum. Dis.* **50** 8–13
- [8] Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, Bridgett L, Williams S, Guillemin F, Hill C L, Laslett L L, Jones G, Cicuttini F, Osborne R, Vos T, Buchbinder R, Woolf A and March L: **The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study**. 2014 *Ann. Rheum. Dis.* **73** 1323–30
- [9] Vina E R and Kwok C K: **Epidemiology of osteoarthritis: Literature update**. 2018 *Curr. Opin. Rheumatol.* **30** 160–7
- [10] Dell’Isola A, Allan R, Smith S L, Marreiros S S P and Steultjens M: **Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature**. 2016 *BMC Musculoskelet. Disord.* **17** 425
- [11] Deveza L A, Melo L, Yamato T P, Mills K, Ravi V and Hunter D J: **Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review**. 2017 *Osteoarthr. Cartil.* **25** 1926–41
- [12] Felson D T, Lawrence R C, Dieppe P A, Hirsch R, Helmick C G, Jordan J M, Kington R S, Lane N E, Nevitt M C, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector T D, Poole A R, Yanovski S Z, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter J A, Brandt K D and Fries J F: **Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors**. 2000 *Ann. Intern. Med.* **133** 635–46
- [13] Felson D T, Zhang Y, Hannan M T, Naimark A, Weissman B N, Aliabadi P and Levy D: **The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly, the framingham osteoarthritis study**. 1995 *Arthritis Rheum.* **38** 1500–5
- [14] Cooper C, Snow S, McAlindon T E, Kellingray S, Stuart B, Coggon D and Dieppe P A: **Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis**. 2000 *Arthritis Rheum.* **43** 995–1000
- [15] Goldring M B, Tsuchimochi K and Ijiri K: **The control of chondrogenesis**. 2006 *J. Cell.*

- Biochem.* **97** 33–44
- [16] DeLise A M, Fischer L and Tuan R S: **Cellular interactions and signaling in cartilage development.** 2000 *Osteoarthr. Cartil.* **8** 309–34
- [17] Tickle C: **Patterning Systems—From One End of the Limb to the Other.** 2003 *Dev. Cell* **4** 449–58
- [18] Pizette S and Niswander L: **BMPs Are Required at Two Steps of Limb Chondrogenesis: Formation of Prechondrogenic Condensations and Their Differentiation into Chondrocytes.** 2000 *Dev. Biol.* **219** 237–49
- [19] Eames B F, De La Fuente L and Helms J A: **Molecular ontogeny of the skeleton.** 2003 *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **69** 93–101
- [20] Yoon B S and Lyons K M: **Multiple functions of BMPs in chondrogenesis.** 2004 *J. Cell. Biochem.* **93** 93–103
- [21] Derynck R and Zhang Y E: **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling.** 2003 *Nature* **425** 577–84
- [22] Wan M and Cao X: **BMP signaling in skeletal development.** 2005 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328** 651–7
- [23] Liu Z, Xu J, Colvin J S and Ornitz D M: **Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18.** 2002 *Genes Dev.* **16** 859–69
- [24] Anon Seghatoleslami MR, Roman-Blas JA, Rainville AM, Modaresi R, Danielson KG, Tuan RS. 2003. **Progression of chondrogenesis in C3H10T1/2 cells is associated with prolonged and tight regulation of ERK1/2.** *J. Cell. Biochem* **88:1129–1144. 2003 *J. Cell. Biochem.* **89** 212**
- [25] Minina E, Kreschel C, Naski M C, Ornitz D M and Vortkamp A: **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation.** 2002 *Dev. Cell* **3** 439–49
- [26] Hu H, Hilton M J, Tu X, Yu K, Ornitz D M and Long F: **Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development.** 2005 *Development* **132** 49 LP – 60
- [27] Vokes S A and McMahon A P: **Hedgehog Signaling: Iguana Debuts as a Nuclear Gatekeeper.** 2004 *Curr. Biol.* **14** R668–70
- [28] McMahon A P, Ingham P W and Tabin C J B T-C T in D B: **1 Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling.** 2003 vol 53 (Academic Press) pp 1–114
- [29] Kobayashi T, Soegiarto D W, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon A P and Kronenberg H M: **Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP.** 2005 *J. Clin. Invest.* **115** 1734–42
- [30] Provot S and Schipani E: **Molecular mechanisms of endochondral bone development.** 2005 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328** 658–65
- [31] Colnot C: **Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis.** 2005 *J. Cell. Biochem.* **95** 688–97
- [32] Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X and Lee B: *Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo.* *J Cell Biol* **162: 833-842** vol 162
- [33] Gerber H-P, Vu T H, Ryan A M, Kowalski J, Werb Z and Ferrara N: **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.** 1999 *Nat. Med.* **5** 623–8
- [34] Mackie E J, Ahmed Y A, Tatarczuch L, Chen K-S and Mirams M: **Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton.** 2008

- Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40** 46–62
- [35] Byers P D and Brown R A: **Cell columns in articular cartilage physes questioned: a review.** 2006 *Osteoarthr. Cartil.* **14** 3–12
- [36] Ahmed Y A, Tatarczuch L, Pagel C N, Davies H M S, Mirams M and Mackie E J: **Physiological death of hypertrophic chondrocytes.** 2007 *Osteoarthr. Cartil.* **15** 575–86
- [37] Kim Y J, Sah R L Y, Grodzinsky A J, Plaas A H K and Sandy J D: **Mechanical Regulation of Cartilage Biosynthetic Behavior: Physical Stimuli.** 1994 *Arch. Biochem. Biophys.* **311** 1–12
- [38] Michael Ulrich-Vinther, MD, Michael D. Maloney, MD, Edward M. Schwarz, PhD, Randy Rosier, MD, PhD, and Regis J. O’Keefe, MD P: **Articular Cartilage Biology.** 2003 *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **11** 421–30
- [39] Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J P and Roughley P J: **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** 2008 *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22** 351–84
- [40] Lum Z-P, Hakala B E, Mort J S and Recklies A D: **Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 $\beta$  on human articular chondrocytes by transforming growth factor- $\beta$ .** 1996 *J. Cell. Physiol.* **166** 351–9
- [41] Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, De Ceuninck F and Sabatini M: **Effects of transforming growth factor- $\beta$ 2; on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes *in vitro*.** 2004 *Osteoarthr. Cartil.* **12** 296–305
- [42] Venn M F: **Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation.** 1979 *Ann. Rheum. Dis.* **38** 57–62
- [43] Kirsch I: **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. Preface.** 2011 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366** 1781–2
- [44] Eyre D R: **Collagens and Cartilage Matrix Homeostasis.** 2004 *Clin. Orthop. Relat. Res.* **427**
- [45] Bian W, Lian Q, Li D, Wang J, Zhang W, Jin Z and Qiu Y: **Morphological characteristics of cartilage-bone transitional structures in the human knee joint and CAD design of an osteochondral scaffold.** 2016 *Biomed. Eng. Online* **15** 82
- [46] Struglics A, Larsson S, Pratta M A, Kumar S, Lark M W and Lohmander L S: **Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments.** 2006 *Osteoarthr. Cartil.* **14** 101–13
- [47] Sandell L J and Aigner T: **Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis.** 2001 *Arthritis Res.* **3** 107–13
- [48] Hamerman D: **The Biology of Osteoarthritis.** 1989 *N. Engl. J. Med.* **320** 1322–30
- [49] Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J, McCartney J, Rueger D C and Kuettner K E: **Human Articular Chondrocytes Express Osteogenic Protein-1.** 2000 *J. Histochem. Cytochem.* **48** 239–50
- [50] Lee B Y D A, Bentley G and Charles W: **Rthritis.** 1993
- [51] Aigner T and Dudhia J: **Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis.** 1997 *Ann. Rheum. Dis.* **56** 287–91
- [52] Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K and Okada Y: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.** 2000 *Ann. Rheum. Dis.* **59** 455–61
- [53] Wang Z, Bryan J, Franz C, Havlioglu N and Sandell L J: **Type IIB procollagen NH(2)-**

- propeptide induces death of tumor cells via interaction with integrins alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5).** 2010 *J. Biol. Chem.* **285** 20806–17
- [54] Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke T D, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Kaplan D, Koopman W, Longley III S, Mankin H, McShane D J, Medsger Jr. T, Meenan R, Mikkelsen W, Moskowitz R, Murphy W, Rothschild B, Segal M, Sokoloff L and Wolfe F: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee.** 1986 *Arthritis Rheum.* **29** 1039–49
- [55] Matyas J R, Sandell L J and Adams M E: **Gene expression of type II collagens in chondro-osteophytes in experimental osteoarthritis.** 1997 *Osteoarthr. Cartil.* **5** 99–105
- [56] Panoutsopoulou K and Zeggini E: **Advances in osteoarthritis genetics.** 2013 *J. Med. Genet.* **50** 715–24
- [57] Xu L, Nevitt M C, Zhang Y, Yu W, Alibadi P and Felson D T: **[High prevalence of knee, but not hip or hand osteoarthritis in Beijing elders: comparison with data of Caucasian in United States].** 2003 *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **83** 1206–9
- [58] Zengini E, Finan C and Wilkinson J M: **The genetic epidemiological landscape of hip and knee osteoarthritis: Where are we now and where are we going?.** 2016 *J. Rheumatol.* **43** 260–6
- [59] Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott K S, Wrayner N, Zhai G, Beazley C, Thorleifsson G, Arden N K, Carr A, Chapman K, Deloukas P, Doherty M, McCaskie A, Ollier W E R, Ralston S H, Spector T D, Valdes A M, Wallis G A, Wilkinson J M, Arden E, Battley K, Blackburn H, Blanco F J, Bumpstead S, Cupples L A, Day-Williams A G, Dixon K, Doherty S A, Esko T, Evangelou E, Felson D, Gomez-Reino J J, Gonzalez A, Gordon A, Gwilliam R, Halldorsson B V, Hauksson V B, Hofman A, Hunt S E, Ioannidis J P A, Ingvarsson T, Jonsdottir I, Jonsson H, Keen R, Kerkhof H J M, Kloppenburg M G, Koller N, Lakenberg N, Lane N E, Lee A T, Metspalu A, Meulenbelt I, Nevitt M C, O’Neill F, Parimi N, Potter S C, Rego-Perez I, Riancho J A, Sherburn K, Slagboom P E, Stefansson K, Styrkarsdottir U, Sumillera M, Swift D, Thorsteinsdottir U, Tsezou A, Uitterlinden A G, van Meurs J B J, Watkins B, Wheeler M, Mitchell S, Zhu Y, Zmuda J M, Consortium arcOGEN, Zeggini E and Loughlin J: **Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study.** 2011 *Ann. Rheum. Dis.* **70** 864–7
- [60] Golan D, Lander E S and Rosset S: **Measuring missing heritability: inferring the contribution of common variants.** 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111** E5272–81
- [61] Panoutsopoulou K, Tachmazidou I and Zeggini E: **In search of low-frequency and rare variants affecting complex traits.** 2013 *Hum. Mol. Genet.* **22** R16–21
- [62] Sullivan A M and O’Keefe G W: **The role of growth/differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurones: relevance to Parkinson’s disease treatment.** 2005 *J. Anat.* **207** 219–26
- [63] Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, Fujioka M, Sudo A, Uchida A, Yamamoto S, Ozaki K, Takigawa M, Tanaka T, Nakamura Y, Jiang Q and Ikegawa S: **A functional polymorphism in the 5’ UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis.** 2007 *Nat. Genet.* **39** 529
- [64] Welter D, MacArthur J, Morales J, Burdett T, Hall P, Junkins H, Klemm A, Flicek P, Manolio T, Hindorff L and Parkinson H: **The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations.** 2014 *Nucleic Acids Res.* **42** D1001–6
- [65] Bravatà V, Minafra L, Forte G I, Cammarata F P, Saporito M, Boniforti F, Lio D, Gilardi M C and Messa C: **DVWA gene polymorphisms and osteoarthritis.** 2015 *BMC Res.*

- [66] Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino J J, Furuichi T, Dai J, Sudo A, Uchida A, Fukui N, Kubo M, Kamatani N, Tsunoda T, Malizos K N, Tsezou A, Gonzalez A, Nakamura Y and Ikegawa S: **New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study.** 2010 *PLoS One* **5** e9723–e9723
- [67] Takuwa H, Uchio Y and Ikegawa S: **Genome-wide association study of knee osteoarthritis: present and future.** 2018 *Ann. Joint; July 2018*
- [68] Zengini E, Hatzikotoulas K, Tachmazidou I, Steinberg J, Hartwig F P, Southam L, Hackinger S, Boer C G, Styrkarsdottir U, Gilly A, Suveges D, Killian B, Ingvarsson T, Jonsson H, Babis G C, McCaskie A, Uitterlinden A G, van Meurs J B J, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Davey Smith G, Wilkinson J M and Zeggini E: **Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis.** 2018 *Nat. Genet.* **50** 549–58
- [69] Kumawat R, Gowda S H, Debnath E, Rashid S, Niwas R, Gupta Y, Upadaya A D, Suri A, Chandra P S, Gupta D K, Lakshmy R, Sarkar C, Sinha S and Chosdol K: **Association of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Genes Encoding for Folate Metabolising Enzymes with Glioma and Meningioma in Indian Population.** 2018 *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **19** 3415–25
- [70] Reddi A H: *Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Science to Clinical Applications* vol 83-A Suppl
- [71] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R and Yoneda T: **BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation.** 2008 *J. Biol. Chem.* **283** 29119–25
- [72] Chen G, Deng C and Li Y-P: **TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.** 2012 *Int. J. Biol. Sci.* **8** 272–88
- [73] Edgar C M, Chakravarthy V, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld L C and Einhorn T A: **Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells.** 2007 *Bone* **40** 1389–98
- [74] Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil N M F, Barone F, Mitsiadis T A, O'Dowd J and Pitzalis C: **Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury.** 2006 *Arthritis Res. Ther.* **8** R139–R139
- [75] Liu Y, Hou R, Yin R and Yin W: **Correlation of bone morphogenetic protein-2 levels in serum and synovial fluid with disease severity of knee osteoarthritis.** 2015 *Med. Sci. Monit.* **21** 363–70
- [76] Fathollahi A: **Epigenetics in osteoarthritis : Novel spotlight.** 2019
- [77] Moazedi-Fuerst F C, Hofner M, Gruber G, Weinhaeusel A, Stradner M H, Angerer H, Peischler D, Lohberger B, Glehr M, Leithner A, Sonntagbauer M and Graninger W B: **Epigenetic differences in human cartilage between mild and severe OA.** 2014 *J. Orthop. Res.* **32** 1636–45
- [78] den Hollander W, Ramos Y F M, Bos S D, Bomer N, van der Breggen R, Lakenberg N, de Dijcker W J, Duijnisveld B J, Slagboom P E, Nelissen R G H H and Meulenbelt I: **Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches.** 2014 *Ann. Rheum. Dis.* **73** 2208 LP – 2212
- [79] Roach H I, Yamada N, Cheung K S C, Tilley S, Clarke N M P, Oreffo R O C, Kokubun S and Bronner F: **Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG**

- sites in the promoter regions.** 2005 *Arthritis Rheum.* **52** 3110–24
- [80] Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, de Andrés M C, Coico J M, Roach H I, Oreffo R O C, Marcu K B and Goldring M B: **Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 $\beta$  (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites.** 2013 *J. Biol. Chem.* **288** 10061–72
- [81] Reynard L N, Bui C, Canty-Laird E G, Young D A and Loughlin J: **Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation .** 2011 *Hum. Mol. Genet.* **20** 3450–60
- [82] Park S J, Cheon E J and Kim H A: **MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1 $\beta$ -induced catabolic effects in human articular chondrocytes.** 2013 *Osteoarthr. Cartil.* **21** 981–9
- [83] El Mansouri F E, Nebbaki S-S, Kapoor M, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Benderdour M and Fahmi H: **Lysine-specific demethylase 1-mediated demethylation of histone H3 lysine 9 contributes to interleukin 1 $\beta$ -induced microsomal prostaglandin E synthase 1 expression in human osteoarthritic chondrocytes.** 2014 *Arthritis Res. Ther.* **16** R113–R113
- [84] Attur M, Al-Mussawir H E, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, Pillinger M H and Abramson S B: **Prostaglandin E $\beta$ 2; Exerts Catabolic Effects in Osteoarthritis Cartilage: Evidence for Signaling via the EP4 Receptor.** 2008 *J. Immunol.* **181** 5082 LP – 5088
- [85] Wightman B, Ha I and Ruvkun G: **Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans.** 1993 *Cell* **75** 855–62
- [86] Li S-C, Chan W-C, Hu L-Y, Lai C-H, Hsu C-N and Lin W: **Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes.** 2010 *Genomics* **96** 1–9
- [87] Fu G, Brkić J, Hayder H and Peng C: **MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications.** 2013 *Int. J. Mol. Sci.* **14** 5519–44
- [88] Ardekani A M and Naeini M M: **The Role of MicroRNAs in Human Diseases.** 2010 *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2** 161–79
- [89] Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha R K S, Malakar A K and Chakraborty S: **Interplay between miRNAs and human diseases.** 2018 *J. Cell. Physiol.* **233** 2007–18
- [90] Hayes J, Peruzzi P P and Lawler S: **MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy.** 2014 *Trends Mol. Med.* **20** 460–9
- [91] Ha M and Kim V N: **Regulation of microRNA biogenesis.** 2014 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** 509
- [92] de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, Åström G, Babina M, Bertin N, Burroughs A M, Carlisle A J, Daub C O, Detmar M, Deviatiiarov R, Fort A, Gebhard C, Goldowitz D, Guhl S, Ha T J, Harshbarger J, Hasegawa A, Hashimoto K, Herlyn M, Heutink P, Hitchens K J, Hon C C, Huang E, Ishizu Y, Kai C, Kasukawa T, Klinken P, Lassmann T, Lecellier C-H, Lee W, Lizio M, Makeev V, Mathelier A, Medvedeva Y A, Mejhert N, Mungall C J, Noma S, Ohshima M, Okada-Hatakeyama M, Persson H, Rizzu P, Roudnický F, Sætrom P, Sato H, Severin J, Shin J W, Swoboda R K, Tarui H, Toyoda H, Vitting-Seerup K, Winteringham L, Yamaguchi Y, Yasuzawa K, Yoneda M, Yumoto N, Zabierowski S, Zhang P G, Wells C A, Summers K M, Kawaji H, Sandelin A, Rehli M, Consortium F, Hayashizaki Y, Carninci P, Forrest A R R and de Hoon M J L: **An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in**

- human and mouse.** 2017 *Nat. Biotechnol.* **35** 872–8
- [93] Tanzer A and Stadler P F: **Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster.** 2004 *J. Mol. Biol.* **339** 327–35
- [94] Denli A M, Tops B B J, Plasterk R H A, Ketting R F and Hannon G J: **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** 2004 *Nature* **432** 231–5
- [95] Okada C, Yamashita E, Lee S J, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y and Tsukihara T: **A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery.** 2009 *Science (80-. ).* **326** 1275 LP – 1279
- [96] Meijer H A, Smith E M and Bushell M: **Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?.** 2014 *Biochem. Soc. Trans.* **42** 1135 LP – 1140
- [97] Khvorova A, Reynolds A and Jayasena S D: **Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias.** 2003 *Cell* **115** 209–16
- [98] Ruby J G, Jan C H and Bartel D P: **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** 2007 *Nature* **448** 83–6
- [99] Babiarz J E, Ruby J G, Wang Y, Bartel D P and Blelloch R: **Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs.** 2008 *Genes Dev.* **22** 2773–85
- [100] O’Brien J, Hayder H, Zayed Y and Peng C: **Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation.** 2018 *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **9** 1–12
- [101] Huntzinger E and Izaurralde E: **Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay.** 2011 *Nat. Rev. Genet.* **12** 99
- [102] Ipsaro J J and Joshua-Tor L: **From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery.** 2015 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22** 20–8
- [103] Zhang J, Zhou W, Liu Y, Liu T, Li C and Wang L: **Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5’UTR of RUNX3.** 2018 *Oncol. Lett.* **15** 7215–20
- [104] Forman J J, Legesse-Miller A and Collier H A: **A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence.** 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** 14879–84
- [105] Fabbri M: **MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication.** 2018 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **373** 20160486
- [106] Zhang M, Lygrisse K and Wang J: **Role of MicroRNA in Osteoarthritis.** 2017 *J. arthritis* **6** 239
- [107] Sondag G R and Haqqi T M: **The Role of MicroRNAs and Their Targets in Osteoarthritis.** 2016 *Curr. Rheumatol. Rep.* **18** 56
- [108] Wu C, Tian B, Qu X, Liu F, Tang T, Qin A, Zhu Z and Dai K: **MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review).** 2014 *Int. J. Mol. Med.* **34** 13–23
- [109] Li Y P, Wei X C, Li P C, Chen C W, Wang X H, Jiao Q, Wang D M, Wei F Y, Zhang J Z and Wei L: **The Role of miRNAs in Cartilage Homeostasis.** 2015 *Curr. Genomics* **16** 393–404
- [110] Li Y-S, Zhang F-J, Zeng C, Luo W, Xiao W-F, Gao S-G and Lei G-H: **Autophagy in osteoarthritis.** 2016 *Jt. Bone Spine* **83** 143–8
- [111] Nugent M: **MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis.** 2016 *Osteoarthr. Cartil.* **24** 573–80
- [112] Le L T T, Swingle T E and Clark I M: **Review: The Role of MicroRNAs in Osteoarthritis and Chondrogenesis.** 2013 *Arthritis Rheum.* **65** 1963–74
- [113] A El Kadery N, F Khaled H, K El Zohiery A and Bekhit M: *Role of Bone Morphogenetic Protein-2 in Primary Knee Osteoarthritis*



- [114] Araldi E and Schipani E: **MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis**. 2010 *Genes Dev.* **24** 1075–80
- [115] Kenyon J D, Sergeeva O, Somoza R A, Li M and Caplan A I: **Analysis of -5p and -3p strands of miR-145 and miR-140 during mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation**. 1–21
- [116] Hansen T B, Venø M T, Kjems J and Damgaard C K: **miRIdentify: high stringency miRNA predictor identifies several novel animal miRNAs**. 2014 *Nucleic Acids Res.* **42** e124–e124
- [117] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L and Bradley A: **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units**. 2004 *Genome Res.* **14** 1902–10
- [118] Huang W and Li M D: **Nicotine modulates expression of miR-140\*, which targets the 3'-untranslated region of dynamin 1 gene (Dnm1)**. 2009 *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12** 537–46
- [119] Takata A, Otsuka M, Kojima K, Yoshikawa T, Kishikawa T, Yoshida H and Koike K: **MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF-κB activity by regulating the expression of NF-κB coactivators**. 2011 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411** 826–31
- [120] Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, Kato Y, Takemoto F, Nakasa T, Yamashita S, Takada S, Lotz M K, Ueno-Kudo H and Asahara H: **MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis**. 2010 *Genes Dev.* **24** 1173–85
- [121] Nakamura Y, Inloes J B, Katagiri T and Kobayashi T: **Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling**. 2011 *Mol. Cell. Biol.* **31** 3019–28
- [122] Papaioannou G, Inloes J B, Nakamura Y, Paltrinieri E and Kobayashi T: **let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development**. 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** E3291–300
- [123] Eberhart J K, He X, Swartz M E, Yan Y-L, Song H, Boling T C, Kunerth A K, Walker M B, Kimmel C B and Postlethwait J H: **MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis**. 2008 *Nat. Genet.* **40** 290–8
- [124] Wienholds E, Koudijs M J, van Eeden F J M, Cuppen E and Plasterk R H A: **The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development**. 2003 *Nat. Genet.* **35** 217–8
- [125] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini M K, Clark I and Dalmay T: **The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells**. 2006 *FEBS Lett.* **580** 4214–7
- [126] Liu J, Carmell M A, Rivas F V, Marsden C G, Thomson J M, Song J-J, Hammond S M, Joshua-Tor L and Hannon G J: **Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi**. 2004 *Science (80-. ).* **305** 1437 LP – 1441
- [127] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stühler K, Meyer H E and Reifenberger G: **Identification and Functional Characterization of microRNAs Involved in the Malignant Progression of Gliomas**. 2010 *Brain Pathol.* **20** 539–50
- [128] Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan S P, Higashiyama R, Inoue A, Kato Y, Sato T, Lotz M K and Asahara H: **MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses**. 2009 *Arthritis Rheum.* **60** 2723–30
- [129] Yin C-M, Suen W-C-W, Lin S, Wu X-M, Li G and Pan X-H: **Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity**. 2017

- Bone Joint Res.* **6** 612–8
- [130] Goldring M B and Goldring S R: **Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis.** 2010 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192** 230–7
- [131] Murphy G and Nagase H: **Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?.** 2008 *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4** 128
- [132] Zhang R, Ma J and Yao J: *Molecular mechanisms of the cartilage-specific microRNA-140 in osteoarthritis* vol 62
- [133] Tao S C, Yuan T, Zhang Y L, Yin W J, Guo S C and Zhang C Q: **Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model.** 2017 *Theranostics* **7** 180–95
- [134] Zhao R L, Zhang X M, Sun Y L, Jia L N, Song W, Meng X Y and Peng X X: **NNS-Conjugated Chitosan Mediated IGF-1 and miR-140 Overexpression in Articular Chondrocytes Improves Cartilage Repair.** 2019 *Biomed Res. Int.* **2019**
- [135] Guo P-Y, Wu L-F, Xiao Z-Y, Huang T-L and Li X: **Knockdown of MiR-140-5 promotes osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting TLR4 and BMP2 and promoting fracture healing in the atrophic nonunion rat model.** 2019 *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23** 2112–24
- [136] Isozaki T, Ruth J H, Amin M A, Campbell P L, Tsou P-S, Ha C M, Haines G K, Edhayan G and Koch A E: **Fucosyltransferase 1 mediates angiogenesis, cell adhesion and rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast proliferation.** 2014 *Arthritis Res. Ther.* **16** R28–R28
- [137] Wang Z, Hu J, Pan Y, Shan Y, Jiang L, Qi X and Jia L: **miR-140-5p/miR-149 Affects Chondrocyte Proliferation, Apoptosis, and Autophagy by Targeting FUT1 in Osteoarthritis.** 2018 *Inflammation* **41** 959–71
- [138] Aigner T, Söder S, Gebhard P M, McAlinden A and Haag J: **Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence.** 2007 *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3** 391
- [139] Li X, Zhen Z, Tang G, Zheng C and Yang G: **MiR-29a and MiR-140 Protect Chondrocytes against the Anti-Proliferation and Cell Matrix Signaling Changes by IL-1 $\beta$ .** 2016 *Mol. Cells* **39** 103–10
- [140] Li H, Guan S-B, Lu Y and Wang F: **MiR-140-5p inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion through targeting TLR4.** 2017 *Biomed. Pharmacother.* **96** 208–14
- [141] Yang D, Du G, Xu A, Xi X and Li D: **Expression of miR-149-3p inhibits proliferation, migration, and invasion of bladder cancer by targeting S100A4.** 2017 *Am. J. Cancer Res.* **7** 2209–19
- [142] Meng Y, Gao R, Ma J, Zhao J, Xu E, Wang C and Zhou X: **MicroRNA-140-5p regulates osteosarcoma chemoresistance by targeting HMGN5 and autophagy.** 2017 *Sci. Rep.* **7** 416
- [143] Wei R, Cao G, Deng Z, Su J and Cai L: **miR-140-5p attenuates chemotherapeutic drug-induced cell death by regulating autophagy through inositol 1,4,5-trisphosphate kinase 2 (IP3k2) in human osteosarcoma cells.** 2016 *Biosci. Rep.* **36** e00392
- [144] Peng J-S, Chen S-Y, Wu C-L, Chong H-E, Ding Y-C, Shiau A-L and Wang C-R: **Amelioration of Experimental Autoimmune Arthritis Through Targeting of Synovial Fibroblasts by Intraarticular Delivery of MicroRNAs 140-3p and 140-5p.** 2016 *Arthritis Rheumatol.* **68** 370–81

- [145] Sun J, Schnackenberg L K and Beger R D: **LC-MS-based metabolomics applications in biomarker discovery**. 2015 *Advanced LC-MS Applications in Metabolomics* Future Science Book Series (Future Science Ltd) pp 72–83
- [146] Li H, Guan S B, Lu Y and Wang F: **MiR-140-5p inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion through targeting TLR4**. 2017 *Biomed. Pharmacother.* **96** 208–14
- [147] OARSI: **Osteoarthritis: A Serious Disease, Submitted to the U. S. Food and Drug Administration**. 2016 *Oarsi* 1–103
- [148] Nelson A E: **Osteoarthritis year in review 2017: clinical**. 2018 *Osteoarthr. Cartil.* **26** 319–25
- [149] Ogden C L, Carroll M D, Lawman H G, Fryar C D, Kruszon-Moran D, Kit B K and Flegal K M: **Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014** US Trends in Obesity Prevalence in Children and Adolescents, 1988-2014 US Trends in Obesity Prevalence in Children and Adolescents, 1988-2014. 2016 *JAMA* **315** 2292–9
- [150] Ortman J M, Velkoff V a. and Hogan H: **An aging nation: The older population in the United States**. 2014 *Econ. Stat. Adm. US Dep. Commer.* **1964** 1–28
- [151] Lohmander L S, Englund P M, Dahl L L and Roos E M: **The Long-term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries: Osteoarthritis**. 2007 *Am. J. Sports Med.* **35** 1756–69
- [152] Flegal K M, Kruszon-Moran D, Carroll M D, Fryar C D and Ogden C L: **Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014** Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014 Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. 2016 *JAMA* **315** 2284–91
- [153] Mandl L A: **Osteoarthritis year in review 2018: clinical**. 2019 *Osteoarthr. Cartil.* **27** 359–64
- [154] Iliopoulos D, Malizos K N, Oikonomou P and Tsezou A: **Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks**. 2008 *PLoS One* **3** e3740–e3740
- [155] Tardif G, Hum D, Pelletier J-P, Duval N and Martel-Pelletier J: **Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes**. 2009 *BMC Musculoskelet. Disord.* **10** 148
- [156] Yang R, Zhang D, Yu K, Sun L, Yang J, Zhao C, Li X and Chen Y: **Detection of miR-22, miR-140 and Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-2 Expression Levels in Synovial Fluid of Osteoarthritis Patients Before and After Arthroscopic Debridement**. 2018 *Med. Sci. Monit.* **24** 863–8
- [157] Hwang S, Park S-K, Lee H Y, Kim S W, Lee J S, Choi E K, You D, Kim C-S and Suh N: **miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells**. 2014 *FEBS Lett.* **588** 2957–63
- [158] Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen J S, van den Berg W and Schett G: **TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1**. 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** 11742–7
- [159] Goldring M B, Birkhead J, Sandell L J, Kimura T and Krane S M: **Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes**. 1988 *J. Clin. Invest.* **82** 2026–37
- [160] Fosang A J, Last K, Knäuper V, Murphy G and Neame P J: **Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)**. 1996 *FEBS Lett.* **380** 17–20

- [161] Fosang A J and Little C B: **Drug Insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis.** 2008 *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4** 420
- [162] van der Kraan P M and van den Berg W B: **Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?.** 2012 *Osteoarthr. Cartil.* **20** 223–32
- [163] Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung U-I and Kawaguchi H: **Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene.** 2009 *Arthritis Rheum.* **60** 166–78
- [164] Li C, Hu Q, Chen Z, Shen B, Yang J, Kang P, Zhou Z and Pei F: **MicroRNA-140 Suppresses Human Chondrocytes Hypertrophy by Targeting SMAD1 and Controlling the Bone Morphogenetic Protein Pathway in Osteoarthritis.** 2018 *Am. J. Med. Sci.* **355** 477–87
- [165] Wang M, Tang D, Shu B, Wang B, Jin H, Hao S, Dresser K A, Shen J, Im H-J, Sampson E R, Rubery P T, Zuscik M J, Schwarz E M, O’Keefe R J, Wang Y and Chen D: **Conditional activation of  $\beta$ -catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue.** 2012 *Arthritis Rheum.* **64** 2611–23
- [166] Thirunavukkarasu K, Pei Y, Moore T L, Wang H, Yu X, Geiser A G and Chandrasekhar S: **Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines.** 2006 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345** 197–204
- [167] Pratap J, Javed A, Languino L R, van Wijnen A J, Stein J L, Stein G S and Lian J B: **The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion.** 2005 *Mol. Cell. Biol.* **25** 8581–91
- [168] Mak I W Y, Cowan R W, Popovic S, Colterjohn N, Singh G and Ghert M: **Upregulation of MMP-13 via Runx2 in the stromal cell of Giant Cell Tumor of Bone.** 2009 *Bone* **45** 377–86
- [169] Pérez-García S, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, González-Álvaro I, Gomariz R P and Juarranz Y: **VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts.** 2016 *J. Cell. Mol. Med.* **20** 678–87
- [170] Jeon E-J, Lee K-Y, Choi N-S, Lee M-H, Kim H-N, Jin Y-H, Ryoo H-M, Choi J-Y, Yoshida M, Nishino N, Oh B-C, Lee K-S, Lee Y H and Bae S-C: **Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Runx2 Acetylation.** 2006 *J. Biol. Chem.* **281** 16502–11
- [171] Zhao W, Zhang S, Wang B, Huang J, Lu W W and Chen D: **Runx2 and microRNA regulation in bone and cartilage diseases.** 2016 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1383** 80–7