

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο Ρόλος της λεπτίνης στην επαγωγή οξειδωτικού στρες σε
οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα»**

ΒΑΣΙΛΗΣ ΚΟΝΤΕΛΕΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μιου Θεσσαλίας

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Μέλος): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος): Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας



LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS

MASTER PROGRAMME

«HUMAN GENETICS»

MASTER THESIS

**«The role of leptin in the induction of oxidative stress at
osteoarthritic chondrocytes»**

VASILIS KONTELES

BIOCHEMIST-BIOTECHNOLOGIST

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα έρευνα εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, και αποτελεί διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με τίμησαν με τη συνεισφορά τους και την βοήθεια τους στα πλαίσια της ολοκλήρωσης της παρακάτω εργασίας

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω στην καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Τσέζου Ασπασία για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, την άψογη συνεργασία που μου παρείχε, την πολύτιμη καθοδήγηση, και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Τραχανά Βαρβάρα και τον κ. Δήμα Κωσταντίνο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μουρμούρα Ευανθία και την Δρ. Παπαθανασίου Ιωάννα για την κομβική βοήθεια τους, τόσο στα πλαίσια του σχεδιασμού όσο και στο επίπεδο της διεκπεραίωσης του πειραματικού σκέλους της παρούσας ερευνητικής μελέτης, παίζοντας καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Τελος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου, με τους οποίους δουλέψαμε μαζί στο εργαστήριο αλλά και κατά την διάρκεια των μαθημάτων, για την υποστήριξη και την υψηλού επιπέδου συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....7

ABSTRACT.....8

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

A.1.1 Γενικά.....9

A.1.2 Επιδημιολογία.....9

A.1.3 Παθολογία της ΟΑ.....10

A.1.3.1 Άρθρωση.....10

A.1.3.2 Υποχόνδριο Οστό.....11

A.1.3.3 Συστηματική Φλεγμονή.....12

A.1.4 Παράγοντες κινδύνου-Φαινότυποι.....12

A.1.5 Μεταβολικός Φαινότυπος- Συσχετιζόμενος με το Μεταβολικό Σύνδρομο.....13

A.1.5.1 Έκκριση Κυτοκίνων από τον Λιπώδη Ιστό και παχυσαρκία.....14

A.2 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΑ

A.2.1 Λεπτίνη: γενικά στοιχεία.....16

A.2.2 Δομή.....17

A.2.3 Υποδοχείς Λεπτίνης.....17

A.2.4 Ρόλος της Λεπτίνης στην ΟΑ.....19

A.2.4.1 Λεπτίνη και παχυσαρκία.....19

A.2.4.2 Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP).....20

A.2.4.3 Οστικός Μεταβολισμός.....20

A.2.4.4 Τροποποίηση του Ανοσοποιητικού.....21

A.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΟΑ

A.3.1 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό Στρες.....22

A.3.2 NADPH οξειδάσες.....23

A.3.2.1 Δομή των οξειδασών NOX.....24

A.3.2.2 NOX2.....	25
A.3.2.3 NOX4.....	27
A.3.2.4 Υπομονάδα p22phox.....	28
A.3.2.5 p47phox/p67phox.....	29
A.3.3 NOXes και OA.....	30
<u>A.4 ΛΕΠΤΙΝΗ, ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & OA.....</u>	31
Β.ΣΚΟΠΟΣ.....	33
Γ.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	
Γ.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΑΡΘΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	34
Γ.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	34
Γ.2.1 Υλικά καλλιέργειας	
Γ.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας	
Γ.2.3 Απομόνωση χονδροκυττάρων	
Γ.2.4 Πρωτόκολλο καλλιέργειας (Κατάψυξη-Απόψυξη-Ανακαλλιέργεια)	
Γ.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	38
Γ.3.1 Υλικά απομόνωσης RNA	
Γ.3.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA(από 6-well)	
Γ.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA).....	39
Γ.4.1 Υλικά για την σύνθεση cDNA	
Γ.4.2 Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA	
Γ.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real time PCR).....	40
Γ.5.1 Υλικά για την real-time PCR	
Γ.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των NOX4 & p22phox	
Γ.5.3 Αλληλουχίες εκκινητών	
Γ.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΛΕΠΤΙΝΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	44
Γ.7 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ LEP ΜΕ siRNA.....	45

Γ.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΜΕΣΩ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....49

Γ.6.1 Υλικά για την μικροσκοπία φθορισμού

Γ.6.2 Πρωτόκολλο για μικροσκοπία φθορισμού για ανίχνευση ROS

Γ.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....50

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου NOX4 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών (ΟΑ) χονδροκυττάρων.....51

Δ.1.2 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου p22rhox σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων....52

Δ.2 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών (ΟΑ) χονδροκυττάρων.....53

Δ.3 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων NOX4 και p22rhox μετά από επιμόλυνση με siRNA για το γονίδιο της λεπτίνης σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών (ΟΑ) χονδροκυττάρων.....54

Δ.3.1 Επίπεδα mRNA του γονιδίου της NOX4 μετά απο siRNA-LEP.....55

Δ.3.2 Επίπεδα mRNA του γονιδίου της υπομονάδας p22rhox μετά απο siRNA-LEP.....56

Δ.4 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες οστεοαρθρικών (ΟΑ) χονδροκυττάρων μετά απο επιμόλυνση τους με siRNA- LEP.....57

Δ.5 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων NOX4 και p22rhox σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από εξωκυττάρια χορήγηση λεπτίνης58

Δ.6 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από εξωκυττάρια χορήγηση λεπτίνης.....60

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....61

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεταβολικός φαινότυπος της οστεοαρθρίτιδας (MetS-OA), προκύπτει από τη συσχέτιση των παθολογικών χαρακτηριστικών της οστεοαρθρίτιδας (OA) με τις διάφορες μεταβολικές συνιστώσες του Μεταβολικού Συνδρόμου, όπως την παχυσαρκία. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη μάζα του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία, γίνεται αντιληπτό ότι η απελευθέρωση των λιποκινών, είναι αυξημένη, με την λεπτίνη να είναι εκείνη η λιποκίνη που παρουσιάζει χαρακτηριστική αύξηση τόσο κατά τη διάρκεια της παχυσαρκίας όσο και στην OA. Η OA επίσης, αποτελεί μια κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες, στοιχείο το οποίο παρατηρείται και στην παχυσαρκία. Ενώ έχει αναφερθεί μια λειτουργική επαφή μεταξύ της παραγωγής ROS και σηματοδοτικών μονοπατιών της λεπτίνης σε αρκετούς ιστούς, υπάρχουν εξαιρετικά λίγα στοιχεία για το πώς η λεπτίνη επηρεάζει το οξειδωτικό στρες στην OA. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η λεπτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή του Οξειδωτικού Στρες σε OA χονδροκυτταρα. Στην παρούσα εργασία επικεντρωθήκαμε στο μονοπάτι παραγωγής ROS μέσω της μη-μιτοχονδριακής οδού και ως εκ τούτου βασικό αντικείμενο μελέτης ήταν οι NADPH-οξειδάσες (NOX) καθώς και υπομονάδες τους (πχ p22phox). Αρχικά μελετήθηκαν, τόσο τα επίπεδα της έκφρασης του mRNA της NOX4 και της p22phox, όσο και τα επίπεδα των O_2^- και των ROS συνολικά, σε καλλιέργιες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων προερχόμενα απο κλινικά δείγματα. Στην συνέχεια και μετά απο αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης με siRNA σε OA χονδροκύτταρα, επαναπροσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων NOX4 και p22phox και με την χρήση μικροσκοπίας φθορισμού τα επίπεδα των O_2^- και ROS. Τέλος για την επιβεβαίωση του παραπάνω πειράματος, έγινε επίδραση σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα με εξωκυτταρια χορήγηση λεπτίνη και έπειτα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τα προηγούμενα πειράματα (ποσοτικός προσδιορισμός mRNA και χρήση μικροσκοπίας φθορισμου για ανίχνευση O_2^- και ROS) . Συμπερασματικά λοιπόν, η λεπτίνη είναι ένα μόριο που εκτός των άλλων λειτουργιών που παίζει στην οστεοαρθρίτιδα, διαδραματίζει έναν κομβικό ρόλο στην υπέρμετρη παραγωγή ROS και την επαγωγή Οξειδωτικού Στρες στην νόσο. Ταυτόχρονα είναι εκείνη η ορμόνη η οποία συνενώνει πολλές απο τις παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζουν την OA, όπως η παχυσαρκία, το Μεταβολικό Σύνδρομο και το Οξειδωτικό Στρες, αναδुकνείνοντας ακόμα περισσότερο την πολυπαραγοντική φύση της νόσου.

ABSTRACT

The metabolic phenotype of osteoarthritis (MetS-OA) results from the correlation between the pathological features of osteoarthritis (OA) and the various metabolic components of the Metabolic Syndrome, such as obesity. Given the increased adipose tissue mass in obesity, it is understood that the release of adipokines is increased, with leptin being that adipokine that exhibits a marked increase, both in obesity and in OA. OA also constitutes a state of chronic oxidative stress, which is also observed in obesity. While a functional contact between ROS production and leptin signaling pathways has been reported in several tissues, there is extremely little evidence of how leptin affects oxidative stress in OA. The purpose of the present study was to investigate whether leptin plays a key role in the induction of oxidative stress in OA chondrocytes. In the present work, we focused on the ROS pathway through the non-mitochondrial pathway and therefore the main focus of the study was NADPH-oxidases (NOX) and their subunits (eg p22phox). Both NOX4 and p22phox mRNA expression levels, as well as O_2^- and ROS levels, were initially studied in normal and OA culture chondrocytes derived from clinical specimens. Subsequently and after silencing of the leptin gene by siRNA in OA chondrocytes, the transcriptional levels of the NOX4 and p22phox genes were re-determined as well as O_2^- and ROS levels by fluorescence microscopy. Finally, to confirm the above experiment, we treated normal chondrocytes with extracellular leptin, followed by the same procedure as in the previous experiments (mRNA assay and use of fluorescence microscopy for O_2^- and ROS detection). In conclusion, leptin is a molecule that, in addition to its functions in osteoarthritis, plays a key role in the overproduction of ROS and the induction of oxidative stress in the disease. At the same time, it is the hormone that combines many of the pathological features that characterize OA, such as obesity, metabolic syndrome and oxidative stress, further revealing the multifactorial nature of the disease.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

A.1.1 Γενικά

Η οστεοαρθρίτιδα είναι χρόνια ρευματική πάθηση που εντοπίζεται σε περιφερικές αρθρώσεις αλλά και σε αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης, αποτελώντας την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και κύρια αιτία πόνου και αναπηρίας σε μεγάλες ηλικίες. Συνήθως αφορά μία άρθρωση (π.χ. γόνατο ή ισχίο) και μερικές φορές δύο ή περισσότερες, ενώ στα χέρια και στη σπονδυλική στήλη είναι συνήθης ο εντοπισμός της σε πολλές αρθρώσεις. Η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται, τόσο από φθορά του αρθρικού χόνδρου, που καλύπτει την επιφάνεια των οστών μέσα στην άρθρωση όσο από οστική υπερπλασία στα όρια των αρθρικών επιφανειών των οστών δημιουργώντας έτσι οστικές προεξοχές, που λέγονται οστεόφυτα. Έτσι αρκετά συχνά η ΟΑ αναφέρεται και ως εκφυλιστική ασθένεια των αρθρώσεων «DJD»¹. Πρόκειται για μια εσφαλμένη και ελλιπή ονομασία, επειδή η ΟΑ δεν είναι απλώς μια διαδικασία φθοράς, αλλά μάλλον μια ανώμαλη αναδιαμόρφωση των ιστών της άρθρωσης, λόγω του πλήθους των φλεγμονωδών μεσολαβητών (συστηματική φλεγμονή) εντός της προσβεβλημένης περιοχής καθώς και μια σειράς άλλων παραγόντων, προσδίδοντας έτσι στην νόσο μια «πολυπαραγοντική-πολυφαινοτυπική» ταυτότητα^{2,3}. Οι συνηθέστεροι παράγοντες κινδύνου^{4,5} για την ΟΑ περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλο, την παχυσαρκία, τη γενετική προδιάθεση και τους μηχανικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της κακής ευθυγράμμισης και της μη φυσιολογικής μορφής αρθρώσεων. Παρά την πολυπαραγοντική φύση της ΟΑ, οι παθολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στις οστεοαρθριτικές αρθρώσεις έχουν κοινά χαρακτηριστικά⁵ που επηρεάζουν ολόκληρη τη δομή της άρθρωσης με αποτέλεσμα πόνο, παραμόρφωση και απώλεια λειτουργίας.

A.1.2 Επιδημιολογία

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο κοινή ασθένεια των αρθρώσεων παγκοσμίως, η οποία εκτιμάται ότι προσβάλλει το 10% των ανδρών και το 18% των γυναικών άνω των 60 ετών⁶. Εκτός από τις συνήθεις επιπτώσεις της νόσου, όπως ο πόνος και η απώλεια

λειτουργικότητας του ασθενούς, υπάρχει και μεγάλος αντίκτυπος σε κρατικό επίπεδο καθώς στις ανεπτυγμένες χώρες η κοινωνικοοικονομική επιβάρυνση που προκύπτει είναι μεγάλη και κοστίζει μεταξύ 1% - 2,5% του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος⁷.

A.1.3 Παθολογία της ΟΑ

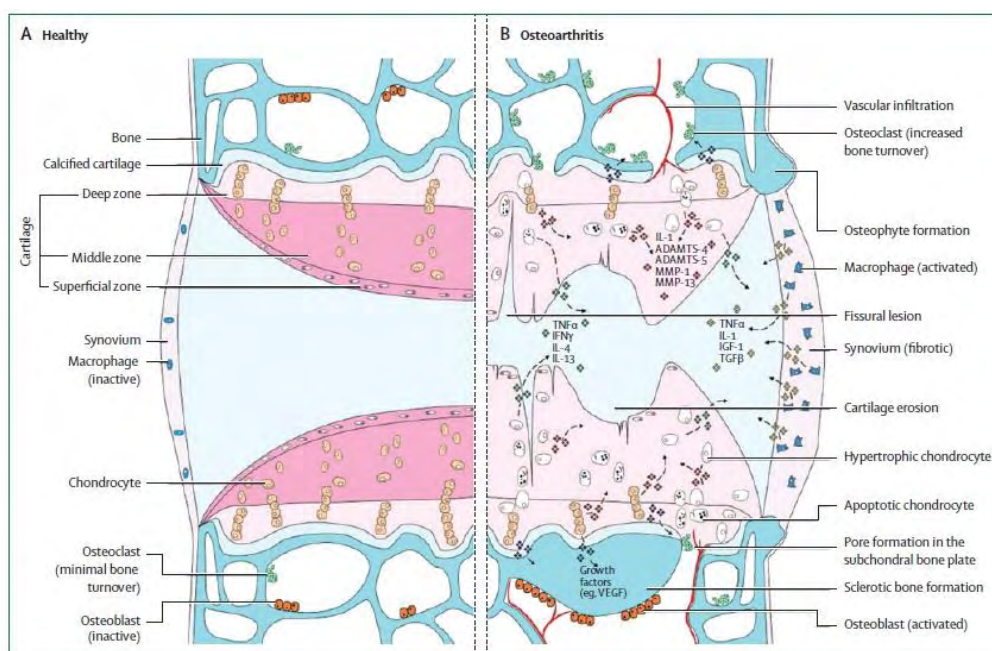
Οι παθολογικές μεταβολές⁸ που παρατηρούνται στις αρθρώσεις στην ΟΑ περιλαμβάνουν αποικοδόμηση του αρθρικού χόνδρου, πάχυνση του υποχόνδριου οστού, σχηματισμό οστεόφυτων, μεταβλητά επίπεδα αρθρικής φλεγμονής και εκφυλισμό συνδέσμων (στο γόνατο εκφυλισμός και του μηνίσκου). Μπορεί επίσης να υπάρξουν αλλαγές στους περιαρθρικούς μύες, τα νεύρα, και τα τοπικά επιθέματα λίπους συμβάλλοντας και αυτά στην ΟΑ ή στα συμπτώματά της.

A.1.3.1 Άρθρωση

Η κύρια δομική πρωτεΐνη του χόνδρου είναι το κολλαγόνο τύπου II, το οποίο σε συνεργασία με άλλους τύπους κολλαγόνου καθώς και μη-κολλαγονικές πρωτεΐνες και υαλουρονικό οξύ, διαμορφώνουν ένα πρωτεϊνικό δίκτυο το οποίο προσδίδει αντοχή και ελαστικότητα στον χόνδρο επιτρέποντας μια αποτελεσματική κίνηση ολίσθησης κατά την κίνηση της άρθρωσης. Η αγγρεκάνη και άλλες πρωτεογλυκάνες ενσωματώνονται στο δίκτυο αυτό, βοηθώντας στην απορρόφηση νερού στον χόνδρο, παρέχοντας αντίσταση στην συμπίεση⁶.

Η αρχιτεκτονική του χονδρού καθώς και η βιοχημική του «ταυτότητα» καθορίζονται πολύ αυστηρά από την απόκριση των χονδροκυττάρων (τον μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό του χόνδρου) σε διάφορα ερεθίσματα⁸. Σε φυσιολογικό χόνδρο ενηλίκου, τα χονδροκύτταρα βρίσκονται σε μια σταθερή κατάσταση (quiescent), με λίγες διεργασίες στην μήτρα (matrix) του χόνδρου. Κατά την ενεργοποίησή τους, παράγουν αρκετές πρωτεΐνες φλεγμονώδους απόκρισης, όπως κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης 1β, της ιντερλευκίνης 6 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF, καθώς και ένζυμα που αποικοδομούν την εξωκυττάρια ουσία του χόνδρου (matrix-degrading enzymes) και ονομάζονται μεταλλοπρωτεϊνάσες (πχ MMP1,3,13, ADAMTS). Από τους παραπάνω παράγοντες κάποιοι φαίνεται ότι έχουν σημαντικές παθογενετικές επιδράσεις (MMP 13) και οδηγούν στην αποδόμηση του χόνδρου ενώ άλλοι διαδραματίζουν ωφέλιμους ρόλους αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας (ADAMTS 5)⁹. Η ενεργοποίηση των χονδροκυττάρων με μηχανικά και φλεγμονώδη

ερεθίσματα συμβαίνει κυρίως μέσω των μονοπατιών NF-κB και MAPK. Η ενεργοποίηση της οδού του NF-κB (p65/p50) οδηγεί στην παραγωγή από τα χονδροκύτταρα των MMP, NOS2, COX2 και IL-1. Κατά την ενεργοποίηση, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κινασών ERK, JNK και MAPK συντονίζουν την επαγωγή και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως AP-1 (cFos / cJun), ETS και C/EBPβ, που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε καταβολικές και φλεγμονώδεις διεργασίες του χόνδρου^{10,11,6}. Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Σηματοδοτικά μονοπάτια, καταβολικές και φλεγμονώδεις διεργασίες του οστεοαρθρικού χόνδρου. Glyn-Jones, A J R Palmer, R Agricola, A J Price, T L Vincent, H Weinans, A J Carr "Osteoarthritis", Vol 386 July 25,

A.1.3.2 Υποχόνδριο Οστό

Ο αρθρικός χόνδρος διαχωρίζεται από το υποχόνδριο οστό από μια ζώνη ασβεστοποιημένου χόνδρου. Τόσο ο αρθρικός χόνδρος όσο και το υποχόνδριο οστό, χαρακτηρίζονται από αλλοιωμένη μορφή σε παθολογική κατάσταση. Η αναδιαμόρφωση των οστών στην οστεοαρθρίτιδα εμφανίζεται κυρίως στην υποχόνδρια πλάκα. Το υποχόνδριο οστό στην ΟΑ έχει αυξημένο όγκο και πάχος αλλά είναι πιο αδύναμο και περιέχει λιγότερα μέταλλα σε σύγκριση με το φυσιολογικό¹². Χαρακτηριστικό επίσης της οστεοαρθρίτιδας είναι και η ενδοαρθρική οστεοποίηση με ταυτόχρονη αγγειακή εισχώρηση εντός του χόνδρου.

Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται από το σχηματισμό οστεόφυτων και υποχονδρικών κύστεων.

A.1.3.3 Συστηματική Φλεγμονή

Παρότι η ΟΑ θεωρείται μια τοπική νόσος η συσχέτισή της με συστηματικούς δείκτες της φλεγμονής, οδηγεί σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Είναι πλέον σαφές ότι χρόνια και ήπια φλεγμονή εμπλέκονται στην εξέλιξη της ΟΑ οδηγώντας σε καταβολικές αποκρίσεις στα χονδροκύτταρα μέσω αυξημένης ρύθμισης παραγόντων όπως ο NF-κB, MMP κα. Ολόκληρη η άρθρωση, συμπεριλαμβανομένου του αρθρικού χόνδρου, του υποχόνδριου οστού των συνδέσμων και του μηνίσκου, συμβάλλουν στο δίκτυο φλεγμονής. Σε ηλικιωμένους αλλά και διαβητικούς ασθενείς, συνηθισμένοι φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως IL1β και TNFα, αναφέρθηκαν ότι συμβάλλουν στη συστηματική φλεγμονή που επάγεται από την ενεργοποίηση του NF-κB στα αρθρικά κύτταρα. Οι Zhang et.al (2013) αναφέρουν ότι η ο δείκτης CRP στον ορό, συσχετίζεται άμεσα με τα συμπτώματα παρά με την ακτινογραφική οστεοαρθρίτιδα όπως και ότι ο πόνος αποτελεί δείκτη συστηματικής φλεγμονής¹³. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου της οστεοαρθρίτιδα και σε αρθρώσεις που δεν υπόκεινται σε μεγάλα φόρτια βάρους¹⁴, με τις λιποκίνες που απελευθερώνονται από το λιπώδη ιστό και προκαλούν ενεργοποίηση των κινασών MAP, την ενεργοποίηση του NF-κB και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, να παίζουν τους πιο κεντρικούς ρόλους (βλέπε ενότητα 1.5.3 & Κεφ.2)

A.1.4 Παράγοντες κινδύνου-Φαινότυποι

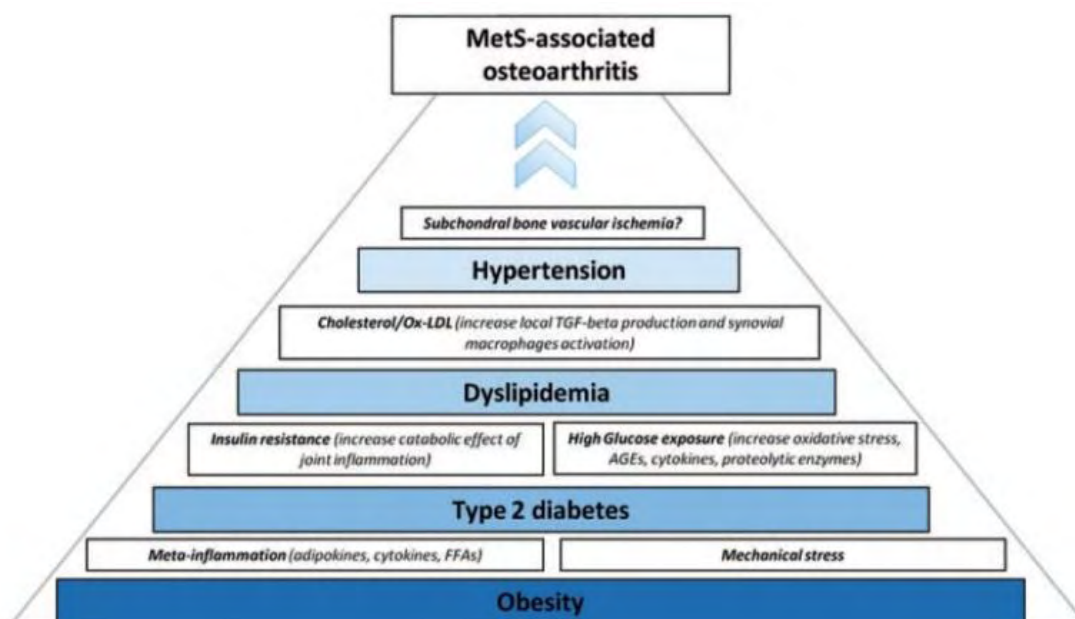
Οι παράγοντες κινδύνου της ΟΑ διαχωρίζονται σε συστηματικούς και τοπικούς/εμβιομηχανικούς, με τους συστηματικούς να διαιρούνται περαιτέρω ανάλογα με το αν μπορούν η όχι να τροποποιηθούν. Το ευρύ φάσμα των παραγόντων κινδύνου, όπως η μεγάλη ηλικία, η παχυσαρκία, οι τραυματισμοί των αρθρώσεων, οι μηχανικοί παράγοντες (το σχήμα και η ευθυγράμμιση των αρθρώσεων), οι ορμονικές αλλαγές, οι μεταβολικές διαταραχές και η γενετική προδιάθεση, δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχουν πολλαπλές υποκείμενες «διαδρομές» που οδηγούν στο παρόμοιο αποτελέσματα της καταστροφής των αρθρώσεων^{5,15}. Γι αυτό το λόγο η ΟΑ χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο φαινοτύπων, και όχι από μια σταθερή κλινική εικόνα, σε αντιστοιχία με κάθε παράγοντα κινδύνου που της προσδίδει και

διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οι βασικοί φαινότυποι^{5,16,17} της ΟΑ είναι: ο ηλικιο-σχετιζόμενος φαινότυπος, ο προκαλούμενος από τραυματισμό, ο σχετιζόμενος με το υποχόνδριο οστό, ο σχετιζόμενος με τον χόνδρο, ο φλεγμονώδης φαινότυπος και ο μεταβολικός φαινότυπος.

A.1.5 Μεταβολικός Φαινότυπος- Συσχετιζόμενος με το Μεταβολικό Σύνδρομο

Ο μεταβολικός φαινότυπος της Οστεοαρθρίτιδας (MetS-OA), προκύπτει από τη συσχέτιση των παθολογικών χαρακτηριστικών της ΟΑ με τις διάφορες μεταβολικές συνιστώσες του Μεταβολικού Συνδρόμου (Μ.Σ.) (παχυσαρκία, διαβήτης και αντίσταση στην ινσουλίνη, δυσλιπιδαιμία και υπέρταση)^{18,19}. Αποτελεί την πιο πρόσφατα μελετημένη μορφή της ΟΑ μέχρι σήμερα.

Η σπλαγγική παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι υπεύθυνες για μια συστηματική φλεγμονή χαμηλού βαθμού που ονομάζεται «μεταβολική φλεγμονή» και οδηγεί στη μη φυσιολογική έκκριση κυκλοφορούντων κυτοκινών, εκκρινόμενες από τον λιπώδη ιστό, οι οποίες ονομάζονται λιποκίνες²⁰. Ωστόσο, αν η μεταβολική φλεγμονή είναι η αιτία ή η συνέπεια των μεταβολικών ασθενειών του Μ.Σ. δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα¹⁹. Η μεταβολική ταυτότητα της ΟΑ έχει γίνει ακόμα πιο πολύπλοκη από την παραπάνω περιγραφή, επειδή πλέον περιλαμβάνει μια σειρά νέων μηχανισμών, όπως το αυξημένο οξειδωτικό στρες και η συσσώρευση προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) και ελεύθερων λιπαρών οξέων¹⁹. Οι πιο βασικές νόσοι και χαρακτηριστικά του ΜΣ που συσχετίζονται με την ΟΑ περιγράφονται στην Εικόνα 2



Εικόνα 2: Νόσοι και χαρακτηριστικά του ΜΣ που συσχετίζονται με την ΟΑ. Alice Courties et.al “Metabolic syndrome-associated osteoarthritis”, 2017 Wolters Kluwer Health

Ενδεικτικά αναφέρεται ο σακχαρώδης διαβήτης τυπου 2, καθώς είναι η πιο καλά μελετημένη νόσος του Μ.Σ η οποία σχετίζεται με την ΟΑ²¹. Έχουν περιγραφεί μια σειρά από παθολόνα αποτελέσματα της υπεργλυκαιμίας στους ιστούς και τα κύτταρα της άρθρωσης, με τα χονδροκύτταρα να χαρακτηρίζονται από προφίλ οξειδωτικού στρες, υψηλή παραγωγή φλεγμονώδων μεσολαβητών (IL-6, PGE2) και μεταλλοπρωτεϊνάσων και ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ. Επιπλέον, ο διαβητικός χόνδρος έχει υψηλότερη ευαισθησία στην διέγερση από IL-1β, η οποία προκαλεί απελευθέρωση κυτοκινών²².

Αξιοσημειωτή είναι και η συσσώρευση χοληστερόλης στον χόνδρο λόγω της απορρύθμισης του μηχανισμού εξόδου της από τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στον ρόλο της ox-LDL παρουσιάζοντας τα αυξημένα επίπεδά της στον ορό και τους ιστούς σε κατάσταση οξειδωτικό στρες²³.

A.1.5.1 Έκκριση Κυτοκινών από τον Λιπώδη Ιστό και παχυσαρκία

Ο λιπώδης ιστός^{24,25} αποτελεί έναν ειδικό τύπο συνδετικού ιστού ο οποίος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λιπιδίων κύτταρων (λιποκύτταρα). Τα λιποκύτταρα εντοπίζονται μεμονωμένα σε μικρές ομάδες και ως επί το πλείστον περιβάλλονται από ινώδη συνδετικό ιστό. Τα ώριμα λιποκύτταρα απαντούν σε δύο τύπους, τα λευκά και τα φαιά και διακρίνονται τόσο ως προς το χρώμα, όσο και ως προς τη λειτουργία τους. Τα λευκά λιποκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, με τη λιποσταγόνα να εξυπηρετεί τη μακροχρόνια αποθήκευση κυρίως τριγλυκεριδίων και εστέρων χοληστερόλης. Τα λευκά λιποκύτταρα εμφανίζουν επίσης ενδοκρινή λειτουργία, συνθέτοντας και εκκρίνοντας ποικιλία βιοδραστικών μορίων. Αντίθετα, τα φαιά λιποκύτταρα αποτελούνται από πολυάριθμες, μικρές λιποσταγόνες και επομένως εμφανίζονται ως πολύχρωρα κύτταρα, με κεντρικό πυρήνα και πολυάριθμα μιτοχόνδρια με κύρια λειτουργία τη θερμογένεση. Κατά την παχυσαρκία, ποικίλες αλλαγές λαμβάνουν χώρα στο λιπώδη ιστό και αφορούν κυρίως σε δομικές και λειτουργικές παραμέτρους του. Η παχυσαρκία²⁶ συσχετίζεται με αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων, συνοδευόμενη από αλλαγή στην πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων, αλλά και στην ποσότητα της αιματικής ροής. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη μάζα του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία, σε κάθε

περίπτωση η απελευθέρωση των λιποκινών είναι αυξημένη στο σύνολο του λιπώδους ιστού.

Αρκετές μελέτες^{27,28,29} έχουν συγκρίνει τις εκκρινόμενες λιποκίνες στο αρθρικό υγρό και στο αίμα σε ασθενείς με ΟΑ, δείχνοντας μια θετική συσχέτιση αναμεσα στους παραπάνω δείκτες και στο δείκτη μάζας σώματος (BMI) (συσχέτιση παχυσαρκίας και ΟΑ σε αρθρώσεις που δεν δέχονται μεγάλα φορτία βάρους). Οι πιο καλά μελετημένες αδιποκίνες, η λεπτίνη (βλέπε ενότητα 2.4.4), η βισφατίνη και η ρεσιστίνη, έχουν προφλεγμονώδη αποτελέσματα και οδηγούν στην διάβρωση του οστεοαρθρικού χόνδρου (βλέπε ενότητα 1.3.1), ενώ η αδιπονεκτίνη, φαίνεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο στην οστεοαρθρίτιδα.

A.2 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΟΑ

A.2.1 Λεπτίνη: γενικά στοιχεία

Η Λεπτίνη (Leptin, από την ελληνική λέξη λεπτός, Human obesity protein) είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 16 KDa που παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου επηρεάζοντας την πρόσληψη του φαγητού, το σωματικό βάρος και όχι μόνο^{29,28}. Παράγεται κυρίως από λιποκύτταρα και σε φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα κυκλοφορίας της συσχετίζονται με τη μάζα του Λευκού Λιπώδους Ιστού (White Adipose Tissue, WAT). Εκτός από τον WAT, αρθρικός υμένας, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα αποτελούν σημαντικά σημεία σύνθεσης και έκκρισης λεπτίνης. Αξιοσημείωτο για τους παραπάνω ιστούς είναι η επιβεβαιωμένη από μελέτες^{11,19,26,29,30,31} χαρακτηριστική άφθονη παράγωγή λεπτίνης σε οστεοαρθρικούς χόνδρους και οστεόφυτα, γεγονός που υποδηλώνει τοπική παραγωγή λεπτίνης κατά τη διάρκεια της ΟΑ.

Θεωρείται μια προ-φλεγμονώδης λιποκίνη δεδομένου ότι φαίνεται να συνεισφέρει στη λεγόμενη «φλεγμονώδη κατάσταση χαμηλού βαθμού» στους υπέρβαρους και παχύσαρκους ανθρώπους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η λεπτίνη είναι μία μη-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο LEP (τα ποντίκια γνωστό επίσης γνωστό και ως ob) και ασκεί τις βιολογικές του δράσεις μετά από δέσμευση στον υποδοχέα του (LEPR), ο οποίος ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων κυτοκίνης τάξης I³². Η λεπτίνη μπορεί να θεωρηθεί ως σύνδεση μεταξύ του νευροενδοκρινικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η ορμόνη δρα στον εγκέφαλο ως παράγοντας ρύθμισης της ομοιόστασης της ενέργειας που προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής και αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας ενεργοποιώντας ανορεξινικούς παράγοντες³².

Ο προσδιορισμός της λειτουργίας της, αποκρυπτογράφησε τον μηχανισμό που επηρεάζει και ελέγχει το ενεργειακό ισοζύγιο, καθιερώνοντας ταυτόχρονα τον λιπώδη ιστό ως ένα πολύπλοκο ενδοκρινικό όργανο, το οποίο επηρεάζει την ομοιόσταση του βάρους μέσω του έλεγχου πρόσληψης του φαγητού, και όχι απλώς ως ένα όργανο αποθήκευσης ενέργειας^{11,33}. Η σύνθεσή της ρυθμίζεται κυρίως από την πρόσληψη τροφής και τις ορμόνες που σχετίζονται με την κατανάλωση φαγητού, αλλά

εξαρτάται επίσης από την ενεργειακή κατάσταση του οργανισμού, από διάφορες ορμόνες, καθώς και από ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών μορίων.

A.2.2 Δομή³²

Το γονίδιο της Λεπτίνης στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q31.3 και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 167 αμινοξέων. Τα 21 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο χρησιμεύουν για τη μεταφορά της Λεπτίνης στα μικροσωμάτια και ακολούθως αποκόπτονται από το πεπτίδιο μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Έτσι η πρωτεΐνη στην κυκλοφορία αποτελείται από 146 αμινοξέα με υψηλά επίπεδα συντήρησης μεταξύ των ειδών τόσο σε επίπεδο δομής όσο και σε επίπεδο λειτουργίας λόγω της διατήρησης των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών³⁴. Η Λεπτίνη έχει μια χαρακτηριστική διαμόρφωση δέσμης τεσσάρων ελίκων με δύο ενδιάμεσους θυλάκους και κατατάσσεται ως μέλος της οικογένειας των μακράς αλυσίδας ελικοειδών πρωτεϊνών που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει και τις IL-6, IL-11, IL-12.

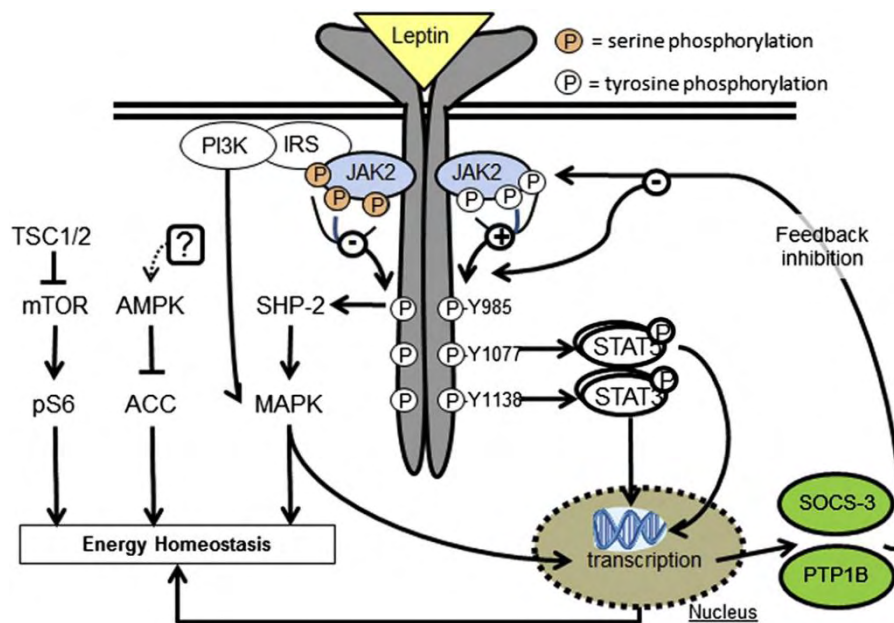
A.2.3 Υποδοχείς Λεπτίνης

Η Λεπτίνη δρα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων οι οποίοι έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς ιστούς και όργανα και παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με την κλάση I της οικογένειας των υποδοχέων κυτοκινών. Τουλάχιστον 6 ισομορφές^{30,32} έχουν αναγνωριστεί (OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re, OB-Rf), οι οποίες παράγονται μετά από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA. Εξωκυτταρικό και διαμεμβρανικό τμήμα είναι κοινά για όλους τους τύπους υποδοχέων και αποτελούνται από 816 και 34 αμινοξέα αντίστοιχα. Το ενδοκυττάριο τμήμα διαφέρει ανάμεσα στις ισομορφές, τόσο ως προς το μήκος όσο και ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων, με κάθε μοτίβο να είναι χαρακτηριστικό της κάθε ισομορφής (τα πρώτα 29 αμινοξέα του ενδοκυττάριου τμήματος είναι επίσης κοινά σε όλους τους υποδοχείς)³². Με βάση το ενδοκυττάριο τμήμα τους οι υποδοχείς διακρίνονται σε βραχείς (Ra, Rc, Rd, Rf), μακρούς (Rb) και εκκρινόμενους (Re).

Οι LepR a, b, c, d και f είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που διαθέτουν μια περιοχή Box1 η οποία απαιτείται για τη δέσμευση και ενεργοποίηση της κινάσης JAK2. Ειδικότερα ο LepRb (ένας τυπικός υποδοχέας κυτοκίνης κατηγορίας I χωρίς ενδογενή δραστηριότητα κινάσης, με αυξημένη έκφραση στον υποθάλαμο) είναι ο κυρίως υπεύθυνος για την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος, καθώς έχει το μεγαλύτερο

ενδοκυττάριο τμήμα 320 αμινοξέων και περιέχει αλληλουχίες που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και την επακόλουθη ενεργοποίηση των οδών μεταφοράς του σήματος^{32,34}.

Μετά από πρόσδεση της λεπτίνης σ' αυτόν, ενεργοποιείται η κινάση JAK2 με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση τόσο του εαυτού της, όσο και τριών αμινοξικών καταλοίπων πάνω στον υποδοχέα LepRb, κάθε ένα από τα οποία επάγει την ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Y985, Y1077 και Y1138)^{32,35}. Η μοναδική εκκρινόμενη ισομορφή είναι ο LepRe, ο οποίος έχει την δυνατότητα να δεσμεύει την κυκλοφορούσα λεπτίνη και να αναστέλλει την σύνδεση της με τους υπόλοιπους διαμεμβρανικούς υποδοχείς λειτουργώντας έτσι ως ρυθμιστικό σύστημα των επιπέδων της ελεύθερης λεπτίνης αναστέλλοντας την αποτελεσματικότητά της.



Εικόνα 3: Υποδοχέας και σηματοδοτικά μονοπάτια της λεπτίνης. Heike Münzberg and Christopher D. Morrison, Pennington Biomedical Research Center, LSU System, Baton Rouge, LA. "Structure, production and signaling of leptin". Metabolism, 2015 January*

Η σύνδεση της Λεπτίνης στους υποδοχείς της ενεργοποιεί κυρίως το ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι JAK2/STAT3, αλλά και εναλλακτικούς σηματοδοτικούς «δρόμους» συνδέοντας την φωσφορυλίωση κινάσων τυροσίνης με το σύστημα ρένινης αγγειοτενσίνης³⁶. Η ενεργοποίηση του συστήματος JAK2/STAT3 (Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3) προκαλεί διέγερση στον

υποθάλαμο των νευρώνων που παράγουν προοπιομελανοκορτίνη (POMC) η οποία έχει ανορεξιογόνο δράση και οδηγεί στην καταστολή των νευρώνων AgRP/NPY που παράγουν το νευροπεπτίδιο Y και το πεπτίδιο AgRP τα οποία έχουν ορεξιογόνο δράση³⁷. Παρόμοια αποτελέσματα έχει η ενεργοποίηση του συστήματος PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) στον υποθάλαμο³⁸. Η διαπίστωση ότι το σύστημα PI3K ενεργοποιείται και από την ινσουλίνη παρέχει ένα πιθανό μηχανισμό σύνδεσης της αντίστασης στη λεπτίνη και την ινσουλίνη σε παχύσαρκα άτομα(βλεπε ενοτητα1.5.1). Μέσω του μονοπατιου MAPK³⁹ (mitogen activated protein kinases) διεγείρονται επίσης οι POMC και καταστέλλονται οι AgRP/NPY νευρώνες στον υποθάλαμο.

A.2.4 Ρόλος της Λεπτίνης στην ΟΑ

Η συγκέντρωση της λεπτίνης στον ορό ατόμων με ΟΑ, παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το βάρος, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI), την περιφέρεια μέσης (WC), τη συνολική μάζα λίπους, και την οστική πυκνότητα (BMD). Έχει επίσης αποδειχτεί ότι τα επίπεδα έκφρασης τόσο της λεπτίνης όσο και του LEP-R ήταν σημαντικά υψηλότερα στο χόνδρο και το αρθρικό υγρό ασθενών με προχωρημένο στάδιο ΟΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα στον οργανισμό⁴⁰, κατατάσσοντας την έτσι ως ένα από τα βασικά μόρια της παθολογίας της νόσου. Μελετες εχουν δειξει ότι η λεπτίνη μπορεί να έχει είτε αναβολικά είτε καταβολικά αποτελέσματα στα χονδροκύτταρα^{29,40,41,42}.

A.2.4.1 Λεπτίνη και παχυσαρκία

Στα παχύσαρκα άτομα, οι συγκεντρώσεις λεπτίνης στην κυκλοφορία αυξάνονται, αλλά τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε αποκατάσταση της ομοιόστασης, δηλαδή σε μειωμένη πρόσληψη τροφής και αύξηση της κατανάλωση ενέργειας, λόγω της ανθεκτικότητας στη λεπτίνη στις περιοχές υποθαλάμου^{26,43}. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μετά την πρόσδεση της λεπτίνης στον υποδοχέα (Ob-R), οι δύο υπομονάδες του υποβάλλονται σε αλλαγές διαμόρφωσης που καταλήγουν στην ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης (JAKs και SFCs) και περαιτέρω φωσφορυλίωση πρωτεϊνών STAT, αλλά και άλλων στόχων. Στην παχυσαρκία, αυτές οι αποκρίσεις δεν είναι φυσιολογικές.

Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της STAT3 μειώνεται σημαντικά υποδεικνύοντας την αντίσταση της λεπτίνης του υποθαλάμου σε παχύσαρκους ασθενείς. Αυτό ίσως

οφείλεται τόσο σε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα της λεπτίνης, όσο και σε αυξημένη έκφραση αρνητικών ρυθμιστών του σηματοδοτικού μονοπατιού της, δηλαδή της φωσφατάσης 1B (PTP1B), της φωσφατάση τυροσίνης πρωτεΐνης T (TCPTP) και ιδιαίτερα του SOCS-3 (καταστολέας σηματοδότηση κυτοκίνης 3), ο οποίος είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος παράγοντας που μεσολαβεί στην αντοχή της λεπτίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έχει δειχθεί ότι η έκφραση του SOCS-3 είναι χαμηλότερη σε χόνδρους από παχύσαρκους παρά από μη παχύσαρκους ασθενείς με ΟΑ^{43,44}. Με βάση αυτά τα ευρήματα, οι παχύσαρκοι ασθενείς με ΟΑ είναι πιο ευαίσθητοι από τους μη παχύσαρκους ασθενείς σε επιβλαβείς επιδράσεις της λεπτίνης στους ιστούς των αρθρώσεων όχι μόνο λόγω των αυξημένων επιπέδων λεπτίνης στο SF αλλά και λόγω του διαταραγμένου μηχανισμού ρύθμισης.

A.2.4.2 Μονοξειδίου του αζώτου (NO) και Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP)

Η λεπτίνη τόσο μέσω της αλληλεπίδρασής με τον παράγοντα IPNγ, όσο και μέσω της «στρατολόγησης» της κυτοκίνης IL-1β (μηχανισμός που περιλαμβάνει τις JAK2, PI3K και άλλες κινάσες), οδηγεί στην ενεργοποίηση της συνθάσης NOS2 και την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO)⁴⁵. Το NO είναι ένας πολύ γνωστός προφλεγμονώδης μεσολαβητής στον αρθρικό χόνδρο, ο οποίος προκαλεί την απώλεια του χονδοκυτταρικού φαινοτύπου, και οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση αλλά και την παραγωγή ποικιλίας μεταλλοπρωτεϊνών (MMP 1,3,9,13). Μελέτες υποδεικνύουν ότι η λεπτίνη, μόνη ή σε συνδυασμό με IL-1β, ρυθμίζει θετικά την παραγωγή των MMP-1 (επίσης γνωστή ως διάμεση κολλαγενάση) και MMP-3 σε ανθρώπινο οστεοαρθρικό χόνδρο, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών NP-κΒ, πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και MAPK^{46,47,48}. Εν αντιθέσει με το παραπάνω παράδειγμα, η λεπτίνη ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση διαφόρων αναβολικών παραγόντων, όπως ο FGF2²⁸.

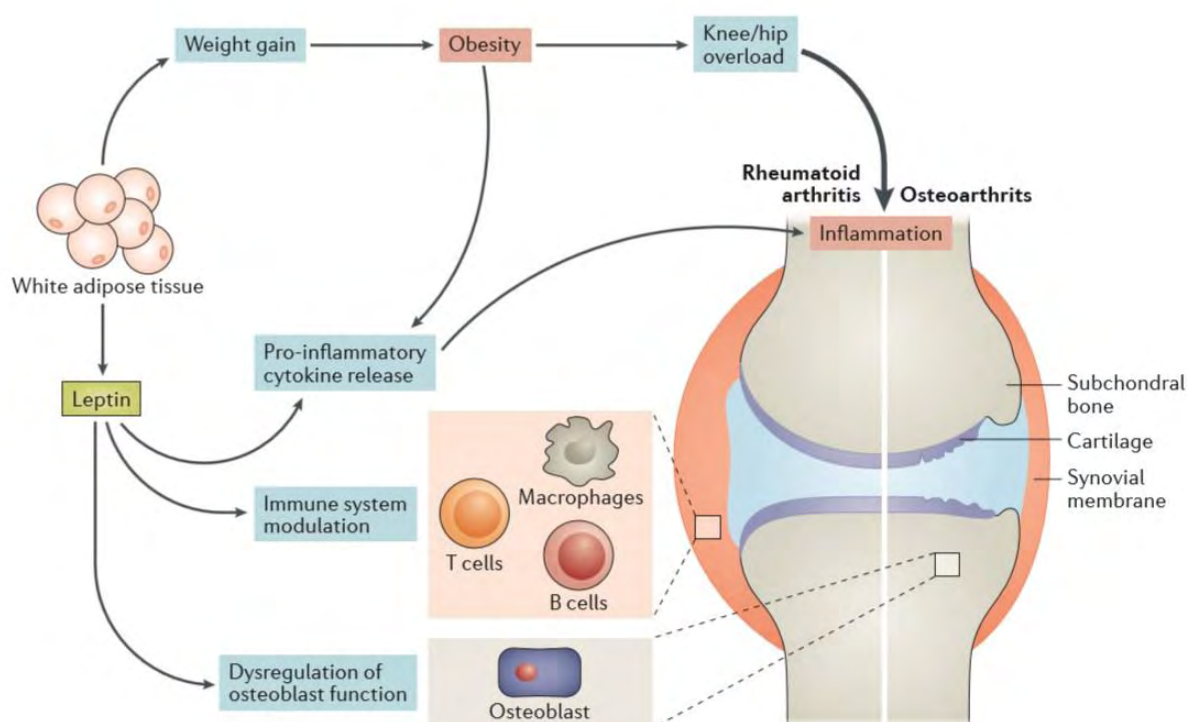
A.2.4.3 Οστικός Μεταβολισμός

Έχει αποδειχθεί ότι η λεπτίνη συμμετέχει και στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού^{28,49,50}. Ειδικότερα, συμβάλλει στην ανώμαλη λειτουργία των οστεοβλαστών οι οποίοι συμμετέχουν στην καταστροφή χόνδρου και άρθρωσης όπως παρατηρείται στην ΟΑ. Η αυξημένη παραγωγή λεπτίνης σε υποχονδριακούς οστεοβλάστες στην ΟΑ σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης, οστεοκαλσίνης, και κολλαγόνου τύπου I, τα οποία προκαλούν την οστεοβλαστική

δυσλειτουργία. Παρ' όλα αυτά υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ in vitro και in vivo παρατηρήσεων όσον αφορά την συμβολή της λεπτίνης στον οστικό μεταβολισμό⁴⁹.

A.2.4.4 Τροποποίηση του Ανοσοποιητικού

Η λεπτίνη είναι επίσης ικανή να ρυθμίζει την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων από κύτταρα του ανοσοποιητικού σε ασθενείς με ΟΑ. Έτσι, είναι ικανή να αυξήσει την παραγωγή των κυτοκινών IL-6, IL-8 και της CC-χημειοκίνης 3 (CCL3) σε CD4+ T κύτταρα⁵¹, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση και την εξέλιξη της ΟΑ.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της λεπτίνης στη ΟΑ. Oreste Gualillo et.al. *Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders* NATURE REVIEWS | RHEUMATOLOGY

A.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΟΑ

A.3.1 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό Στρες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια⁵². Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ρίζες οξυγόνου ιδιαίτερη δραστικότητα και έτσι μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να λάβουν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως οξειδωτικές ή αναγωγικές ουσίες. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς και σε αυτή περιλαμβάνονται η ρίζα υπεροξειδίου(O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου(OH^\cdot) κτλ. και περιγράφονται ως δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)^{52,53}. Υπάρχουν όμως και κάποιες ενώσεις του οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2) και το μοριακό οξυγόνο, οι οποίες αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες συμπεριφέρονται όπως αυτές, επειδή χημικά είναι πολύ δραστικές.

Η παραγωγή ROS είναι γενικά ένας καταρράκτης αντιδράσεων που αρχίζει με την παραγωγή υπεροξειδίου. Δύο μόρια υπεροξειδίου μπορούν να αντιδράσουν για να δημιουργήσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε μια αντίδραση γνωστή ως «dismutation», η οποία καταλύεται από το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου⁵⁴. Παρουσία σιδήρου, η ρίζα υπεροξειδίου και το H_2O_2 αντιδρούν για να παράγουν ρίζες υδροξυλίου. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου συμμετέχουν σε κομβικές διαδικασίες του οργανισμού όπως η ενίσχυση της αναγνώρισης του «εαυτού», βασικό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος⁵⁵. Παρόλα αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνητικά βλαπτικές για τα συστατικά του κυττάρου. Ενοχοποιούνται για εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων των μεμβρανών, του DNA, των πρωτεϊνών, καθώς και για υπεροξείδωση των λιποπρωτεϊνών. Οι πλάγιες αλυσίδες των αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στην οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου/αζώτου(RNS). Οι ROS συμμετέχουν σε μια σειρά σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγώντας κυρίως σε αναστολή των φωσφατασών τυροσίνης, σε κυτταρική διαφοροποίηση και ενεργοποίηση διαφόρων κινασών θρεονίνης (PKC), των MAPK's, του NF-κB και p53 καθώς και του μονοπατιού PI3K/Akt⁵⁶.

Είναι γνωστό πλέον ότι υπάρχουν πολλές πηγές παράγωγης ROS. Τα ROS μπορεί να προκύψουν ως παραπροϊόν από τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα, το κυτοχρώμα P-450, την λιποξυγενάση, την οξειδοοδουκτάση της ξανθίνης καθώς και από τις μη-μιτοχονδριακές NADPH οξειδάσες. Από τις παραπάνω «πηγές» τα μιτοχόνδρια αποτελούν την πιο κοινή στον οργανισμό, καθώς υπολογίζεται ότι περίπου 2-3% του συνολικού O₂ το οποίο συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάγεται προς O₂⁻ παρά προς H₂O⁵².

A.3.2 NADPH οξειδάσες⁵⁷.

Οι NADPH οξειδάσες είναι ένζυμα τα οποία εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, με βασική λειτουργία την αναγωγή του οξυγόνου (O₂) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε άλλες μορφές ROS επιτελώντας μια σειρά από λειτουργίες στον οργανισμό όπως η άμυνα, η μεταγωγή σήματος και η σύνθεση ορμονών^{57,58}. Σε αντίθεση, λοιπόν, με άλλες κυτταρικές διαδικασίες, στις οποίες παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου ως παραπροϊόντα, η οικογένεια των ενζύμων NOX έχει ως κύρια λειτουργία της την ελεγχόμενη δημιουργία ριζών. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε μια ποικιλία ευκαρυωτών αλλά όχι σε προκαρυωτικούς οργανισμούς⁵⁵. Το πρώτο παράδειγμα τέτοιων ενζύμων που περιγράφηκε, ήταν η NADPH οξειδάση που εκφράζεται σε φαγοκύτταρα θηλαστικών⁵⁹. Στα μέσα της δεκαετίας του '90 ανακαλύφθηκαν ομόλογα του φλαβοκυτοχρώματος gp91phox στα φυτά. Μεταγενέστερες έρευνες σε βάσεις δεδομένων γονιδιωμάτων οδήγησαν στην αναγνώριση νέων ομολόγων του gp91phox και στα ζώα⁶⁰, τα οποία σήμερα είναι γνωστά ως Nox (NADPH οξειδάση) ή Duox (διπλή οξειδάση).

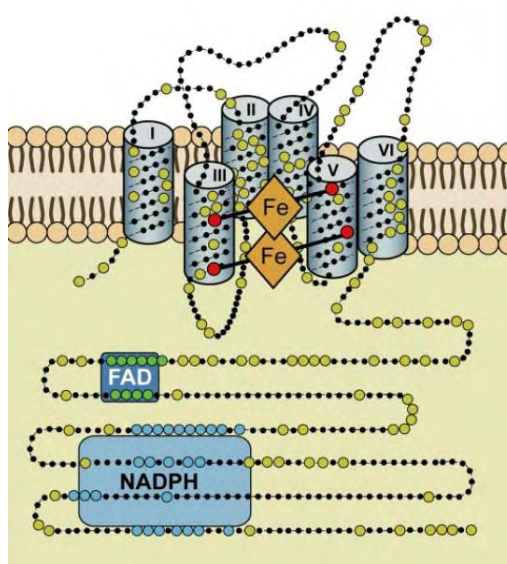
Η NOX2 είναι πιο άφθονη στα φαγοκύτταρα, αλλά βρίσκεται επίσης σε κύτταρα του αγγειακού συστήματος, στους νευρώνες, στους ινοβλάστες και σε μια ποικιλία άλλων κυτταρικών τύπων⁶¹. Στα φαγοκύτταρα, η NOX2 εντοπίζεται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στην πλασματική μεμβράνη σε στενή σύνδεση με την μεμβρανική πρωτεΐνη p22phox⁶². Σε κύτταρα διαφορετικά από τα φαγοκύτταρα, η ενδοκυτταρική κατανομή ποικίλει ανάλογα με τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρου. Για παράδειγμα στους νευρώνες του ιπποκάμπου βρίσκεται στις μεμβράνες των συναπτικών θέσεων⁶³. Η NOX1 είναι πιο άφθονη στο παχύ έντερο, αλλά εκφράζεται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών, τον προστάτη, και των πρόδρομων

οστεοβλαστών. Η NOX3 είναι εκείνο το μέλος της οικογένειας που έχει πιθανότατα την πιο ειδική και περιορισμένη έκφραση στους ιστούς. Βρίσκεται ουσιαστικά στο εσωτερικό του αυτίου, τόσο στο αιθουσαίο όσο και στο ακουστικό μέρος⁶⁴. Η NOX5 εκφράζεται ως επί το πλείστον σε όρχεις, σπλήνα και λεμφαδένες καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα λείου μυός⁶⁵. Η NOX4 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο νεφρό και έχει περίπου 39% ομοιότητα με την NOX2, σε σύγκριση με τις NOX1 και NOX3 σχεδόν ίδιες. Εκτός από την έντονη έκφρασή της στο νεφρό⁶⁶, η NOX4 βρίσκεται και σε πολλούς άλλους ιστούς και κυτταρικούς τύπους του ανθρώπινου σώματος όπως οι οστεοκλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα κτλ (βλέπε ενότητα 3.2.3).

A.3.2.1 Δομή των οξειδασών NOX

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλα τα μέλη της οικογένειας NOX είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν ηλεκτρόνια μέσω των βιολογικών μεμβρανών για την αναγωγή του οξυγόνου σε υπεροξείδιο. Σύμφωνα με αυτή την κοινή λειτουργία, υπάρχουν δομικές ιδιότητες των ενζύμων NOX, που είναι κοινές σε όλα τα μέλη της οικογένειας (Εικόνα 5). Ξεκινώντας από το COOH-άκρο, αυτά τα συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά είναι⁵⁷:

1. Μια περιοχή πρόσδεσης του NADPH (NADPH binding domain) στο –COOH άκρο του ενζύμου
2. Μια περιοχή πρόσδεσης FAD
3. Έξι συντηρημένες διαμεμβρανικές περιοχές
4. Τέσσερις υψηλά συντηρημένες ιστιδίνες, δύο στην τρίτη και δύο στην τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή, οι οποίες έχουν την ικανότητα δέσμευσης μορίων αίμης.



Εικόνα 5: Δομικές ιδιότητες των ενζύμων NOX, κοινές σε όλα τα μέλη της οικογένειας.

Δεδομένης της ύπαρξης μιας πρόσθετης NH₂-τελικής διαμεμβρανικής περιοχής στην DUOX μορφή, οι ιστιδίνες της βρίσκονται στην τέταρτη και έκτη διαμεμβρανική περιοχή. Παρακάτω θα αναλυθούν εκτενώς τα μέλη 2 και 4 της οικογένειας των NADPH οξειδάσων.

A.3.2.2 NOX2

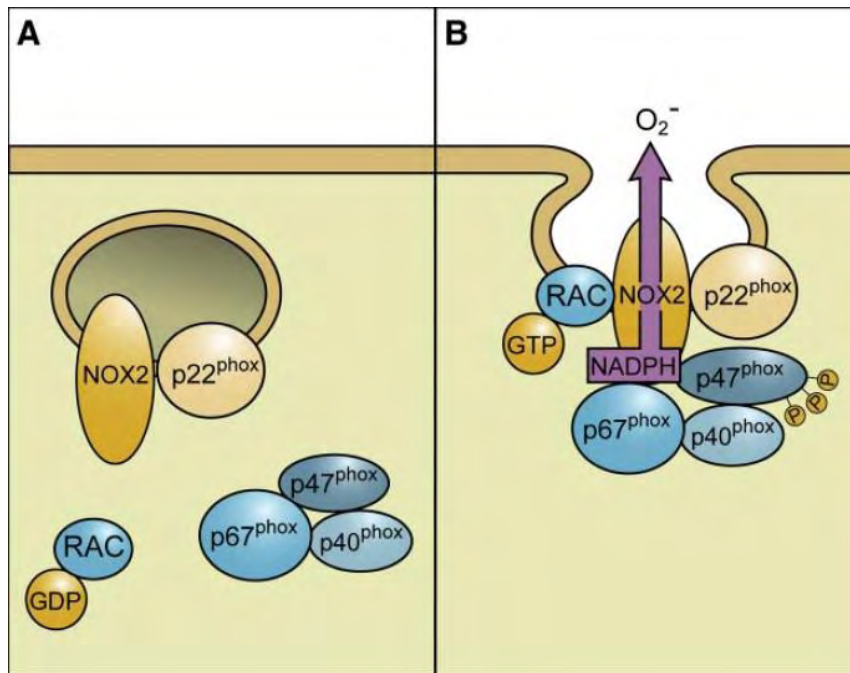
Η NOX2(gp91phox), το γονίδιο της οποίας βρίσκεται στο χρωμόσωμα X, είναι η πρωτότυπη NADPH οξειδάση, καθώς μεγάλο ποσοστό πληροφοριών που γνωρίζουμε σήμερα για την δομή, τη θέση και την λειτουργικότητα των NADPH οξειδάσων οφείλονται σε μελέτες που έχουν γίνει στην παραπάνω μορφή⁶⁷. Αποτελεί δηλαδή την οξειδάση «μοντέλο», για την περιγραφή της μορφής της οικογένειας των ενζύμων γι' αυτό και θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω.

Ενώ αρχικά η παρουσία της είχε περιγραφεί κατά βάση στα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μακροφάγα), σήμερα είναι γνωστό ότι εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό ιστών⁶⁸, συμπεριλαμβανομένου του θύμου αδένου, του λεπτού εντέρου, του παχέος εντέρου, του σπλήνα, του παγκρέατος, των ωοθηκών, του πλακούντα, του προστάτη και των όρχεων.

Η NOX2 είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 70-90 kDA (η γλυκοσυλίωση γίνεται στα κατάλοιπα ασπαραγίνης στην 2^η και στην 3^η εξωκυτταρική θηλιά), και διαθέτει 6 διαμεμβρανικές περιοχές, με τις COOH- και NH₂-τελικές περιοχές να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα⁶⁹. Η ενεργοποίηση της απαιτεί μια περίπλοκη σειρά διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπως η μεταφορά της υπομονάδας p22phox από το κυτταρόπλασμα προς την μεμβράνη με τελικό στόχο την δημιουργία συμπλόκου με την NOX2. Αναλυτικότερα το μοντέλο ενεργοποίησης της NOX2 απεικονίζεται στην Εικόνα 6 και περιγράφεται ως εξής⁷⁰:

1. Φωσφορυλίωση της υπομονάδας «οργανωτή» p47phox οδηγεί σε αλλαγή της δομής της και κατά συνέπεια σε αλληλεπίδραση με την υπομονάδα p22phox.
2. Μετανάστευση της p47phox στην μεμβράνη φέρνει σε επαφή την υπομονάδα «ενεργοποιητή» p67phox με την p22phox με αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκου.
3. Προσθήκη της μικρότερης υπομονάδας p40phox στο σύμπλοκο.

4. Αλληλεπίδραση της GTPάσης Rac (μέλος της οικογένειας Rho) με την NOX2 μέσω ενός μηχανισμού δυο βημάτων:
- 4^α άμεση αλληλεπίδραση με την NOX2
 - 4^β επακόλουθη αλληλεπίδραση με την p67phox



Εικόνα 6: Το μοντέλο ενεργοποίησης της NOX2

Μετά την συναρμολόγηση, το σύμπλοκο ενεργοποιείται και παράγει υπεροξειδίο με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH του κυτταροπλάσματος προς ένα οξυγόνο του αυλού ή του εξωκυτταρικού χώρου⁷¹.

Η NOX2 μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαμεμβρανική οξειδοαναγωγική αλυσίδα που συνδέει έναν δότη ηλεκτρονίων (NADPH) από την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης με έναν δέκτη ηλεκτρονίων (O₂) από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Πια αναλυτικά η μεταφορά ηλεκτρονίων γίνεται μέσω μιας σειράς σταδίων που περιλαμβάνουν ένα διουκλεοτίδιο φλαβίνης (FAD) και δύο ασύμμετρα μόρια αίμης που βρίσκονται στις διαμεμβρανικές περιοχές III και V^{72,73}. Το εσωτερικό μόριο αίμης συνδέεται με τα κατάλοιπα ιστιδίνης H101 και H209 και το εξωτερικό μόριο με τις ιστιδίνες H115 και H222^{58,74}.

Πρώτο βήμα είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο FAD, μια διαδικασία που ρυθμίζεται από την υπομονάδα «ενεργοποιητή» p67phox⁷⁵.

Εν συνεχεία, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από το ανοιγμένο FADH₂ στο κέντρο σιδήρου της εσωτερικής αίμης. Δεδομένου ότι ο σίδηρος της αίμης μπορεί να δεχτεί μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η εσωτερική αίμη πρέπει να μεταφέρει το ηλεκτρόνιο της στην εξωτερική αίμη πριν το δεύτερο ηλεκτρόνιο γίνει αποδεκτό από το, πλέον, μερικώς ανοιγμένο FADH⁷⁶.

A.3.2.3 NOX4

Ενώ οι NOX1-NOX3 έχουν σε γενικές γραμμές μεγάλη συγγένεια ως προς την δομή τους, η NOX4 είναι εξελικτικά η πιο απομακρυσμένη οξειδάση, διαθέτοντας μόνο το 39% ταυτότητα με την NOX2⁷¹. Παρ' όλα αυτά, τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά της NOX4 ακολουθούν το κοινό δομικό μοτίβο όλων των υπόλοιπων NOX (βλέπε ενότητα A.3.2.1), με τις σημαντικότερες διαφορές να παρατηρούνται σε δύο εξωκυττάρειες περιοχές: ο βρόγχος C είναι βραχύτερος, ενώ ο βρόγχος E είναι μεγαλύτερος στην NOX4. Δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες⁷⁷ αναφέρουν ότι η NOX4 παράγει H₂O₂ αντί για O₂⁻, οι διαφορές στους εξωκυτταρικούς βρόγχους μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη μοναδική αυτή ικανότητα του NOX4.

Το γονίδιο της ανθρώπινης NOX4 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11, με διαφορετικά μόρια mRNA να έχουν περιγραφεί λόγω εναλλακτικού ματίσματος, κάτι το οποίο οδηγεί σε 4 επιπλέον ισομορφές εκτός από την NOX4a (b,c,d,e)⁷⁸. Η NOX4a είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, παρότι μετά από επίδραση με N-γλυκοσιδάση δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο μοριακό της βάρος⁷⁹. Εκτός από την έντονη έκφραση της στα νεφρά, η NOX4 βρίσκεται επίσης σε οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, και νευρώνες. Η ευρεία αυτή κατανομή της στους ιστούς υποδηλώνει και την ποικιλία των λειτουργιών που επιτελεί στο σωμα.

Η επαγωγή της έκφρασης της NOX4 παρατηρείται υπό τις ακόλουθες συνθήκες: σε απόκριση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, σε βλάβη της καρωτιδικής αρτηρίας, σε υποξία και ισχαιμία και σε ενεργοποίηση του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) από τον λείο μυϊκό ιστό. Η υπερέκφραση της NOX4 (mRNA και πρωτεΐνης) έχει παρατηρηθεί σε απόκριση στην αγγειοτενσίνη II⁸⁰.

Οι μέχρι στιγμής υποθέσεις σχετικά με την εξάρτηση της NOX4 από τις διάφορες κυτταροπλασματικές υπομονάδες έχουν ως εξής:

1. **p22phox**. Η NOX4 είναι εξαρτημένη από την υπομονάδα p22phox αλλά και η p22phox απαιτεί την NOX4 για την σταθεροποίηση και την λειτουργία της. Σε γενικές γραμμές, η αλληλεπίδραση NOX4 και p22phox είναι προϋπόθεση για την εξαρτώμενη από την NADPH-οξειδάση παραγωγή ROS, με αρκετά πειραματικά αποτελέσματα αντικρούουν αυτό το γεγονός, υπογραμμίζοντας ότι η NOX4 είναι η μόνη οξειδάση που δεν απαιτεί υπομονάδες για την λειτουργία της^{79,81}.
2. Η NOX4 δεν απαιτεί κυτταροπλασματικές υπομονάδες «οργανωτές» (**p47,p67**) για την λειτουργία της.
3. **RAC**. Στην πλειοψηφία των κυττάρων κύτταρα όπου εκφράζουν NOX4, η Rac δεν απαιτείται για δραστικότητα της. Ωστόσο, σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, έχει τεκμηριωθεί η απαιτούμενη ύπαρξη της Rac. Βέβαια, το κατά πόσον μια τέτοια απαίτηση αφορά άμεση αλληλεπίδραση της NOX4 με την Rac ή μια έμμεση σχέση, των δυο δεν είναι ακόμα γνωστό^{82,83}.

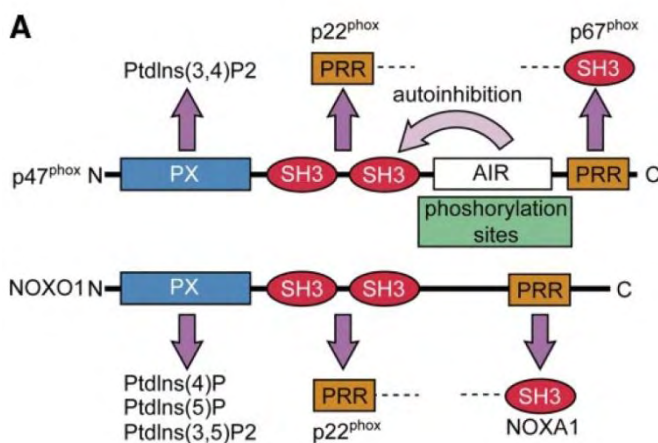
A.3.2.4 Υπομονάδα p22phox

Οι πρώτες προσπάθειες για τον καθαρισμό της NADPH-εξαρτώμενης οξειδάσης (NOX) του κυτοχρώματος b από ουδετερόφιλα οδήγησαν σε εκτιμήσεις μεγέθους που κυμαίνονταν από 11 έως 127 kDa. Ωστόσο, σύντομα κατέστη σαφές ότι το φλαβοκυτόχρωμα b₅₅₈ ήταν στην πραγματικότητα ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από την NOX2 και την p22phox⁸⁴. Το γονίδιο για την ανθρώπινη p22phox (gene CYBA) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16. Κωδικοποιεί για μια μη γλυκοσυλιωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη 22kDA, η οποία συνδέεται στενά με την NOX2 σε αναλογία 1:1. Διαθέτει δυο διαμεμβρανικές δομές με την N-τελική και την C-τελική περιοχή να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, καθώς και περιοχή πλούσια σε προλίνη που λειτουργεί ως «άγκυρα» για την δέσμευση κυτταροπλασματικών παραγόντων κατά την ενεργοποίηση της οξειδάσης⁸⁵. Ο βασικός ρόλος της υπομονάδας είναι η σταθεροποίηση των πρωτεϊνών NOX που σε συνάρτηση με την παραπάνω ικανότητα της, να δεσμεύει δηλαδή και άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες (p47phox), οδηγεί στην παραγωγή ROS.

Η NOX4 είναι και αυτή p22phox- εξαρτώμενο ενζυμο (βλέπε ενότητα 3.2.3). Παρόλα αυτά, τόσο η απουσία ολόκληρης της p22phox, όσο και μεταλλάξεις εντός της COOH-τελικής περιοχής της, οδηγεί σε απώλεια της ενεργοποίησης των NOX1, NOX2 και NOX3 αλλά όχι της NOX4, ενισχύοντας την ιδέα ότι η ενεργοποίηση της NOX4 δεν χρειάζεται υπομονάδες «οργανωτές»⁸⁶.

A.3.2.5 p47phox⁸⁷

Η p47phox (γονίδιο στο χρωμόσωμα 7) αποτελεί την υπομονάδα «οργανωτή» της NOX2 και ίσως της NOX4, έχοντας την ικανότητα να συνδέεται με την υπομονάδα p22phox προς ενεργοποίηση των ένζυμων. Η NOXO1 είναι ο «οργανωτής των NOX1 και 3, με κατά βάση κοινή δομή με την υπομονάδα p47phox. Διαθέτει πρωτεϊνικές περιοχές phox οι οποίες βοηθούν στην αλληλεπίδραση της με φωσφολιπίδια της μεμβράνης, καθώς και περιοχές SH3 οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πλούσιες σε προλίνη περιοχές της p22phox οδηγώντας έτσι στην δημιουργία συμπλόκου (Εικόνα 7).

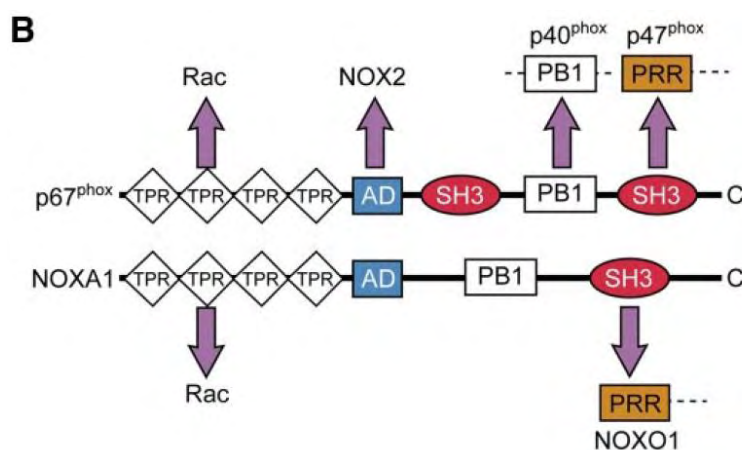


Εικόνα 7: Δομικές και λειτουργικές περιοχές της υπομονάδας «οργανωτή» p47phox

p67phox⁵⁷

Οι υπομονάδες «ενεργοποιητές» p67phox και NOXA1 μοιράζονται ~ 28% ταυτότητα αμινοξέων και γενικά παρόμοια δομή. Και οι δύο περιέχουν μια επαναλαμβανόμενη περιοχή TPR στο NH2-τελικό τους άκρο, η οποία βοηθά στην αλληλεπίδραση τους με την Rac. Διαθέτουν επίσης και μια περιοχή ενεργοποίησης AD (Activation Domain), υψηλά συντηρημένη, η οποία συμβάλει στην αλληλεπίδρασή τους με τις

NOX, καθώς και τη λιγότερο συντηρημένη Phox και Bem 1 (PB1), η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή PC της p40phox (βλέπε Εικόνα 8). Βασικό ρόλο παίζει και η COOH-τελική περιοχή SH3 η οποία συνδέεται με την αντίστοιχη COOH-τελική PRR περιοχή της p47phox.



Εικόνα 8: Δομικές και λειτουργικές περιοχές της υπομονάδας «ενεργοποιητή» p67phox

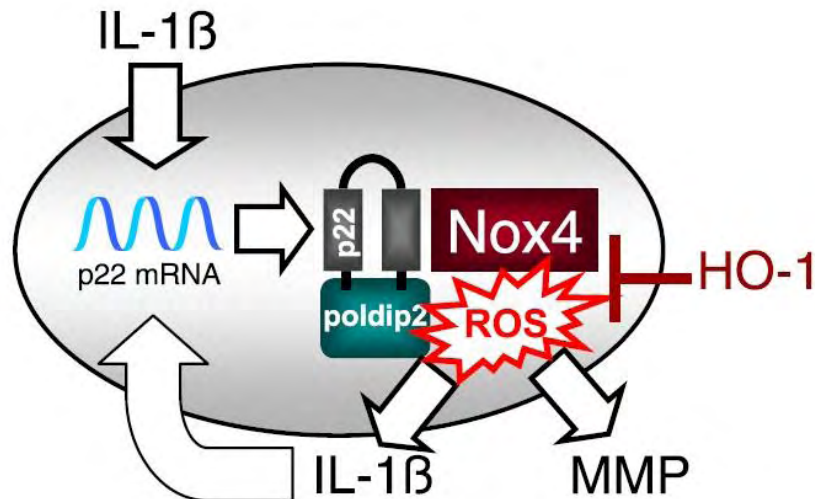
A.3.3 NOXes και OA

Στα χονδροκύτταρα έχουν περιγραφεί ποικίλες πηγές ROS. Μεταξύ αυτών, το ενζυμο συνθάση του NO, η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων και οι NADPH οξειδάσες. Στην πραγματικότητα, ο φυσιολογικός ρόλος των ROS στα χονδροκύτταρα δεν είναι απολύτως κατανοητός. Βεβαία, σύμφωνα με τους Martin et al. είναι απαραίτητη η παραγωγή ROS με βασική πηγή την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχόνδριων για τη διατήρηση της γλυκολυτικής παραγωγής ATP από χονδροκύτταρα.

Τα ROS που παράγονται από τις NOX2 και NOX4 έχουν επίσης περιγραφεί ότι δρουν ως επαγωγείς της χονδρογένεσης κατά την ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος, καθώς και της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι τα ROS εμπλέκονται στην υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων που συμβαίνει στην ενδοαρθρική οστεοποίηση.

Ο μηχανισμός λειτουργίας των NADPH οξειδασών στην OA είναι σχετικά άγνωστος⁸⁸. Παρόλα αυτά η NOX4 προάγει τις καταβολικές διεργασίες στα ανθρώπινα χονδροκύτταρα κατά τη φλεγμονώδη κατάσταση. Η επίδραση με IL-1b σε

ανθρώπινα χονδοκύτταρα οδηγεί σε υπερέκφραση της NOX4 καθώς και σταθεροποίηση της πρωτεϊνικής της δομής (παρατηρείτε και εντοπισμός της p22phox). Αποτέλεσμα έχει την αύξηση της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο δρα ως ένας κρίσιμος μεσολαβητής της έκφρασης των MMP-1, MMP-13, δηλαδή κυτοκινών που ευθύνονται για την καταστροφή του χονδρού (Εικόνα 9) (βλέπε ενότητα 1.3)⁸⁸.



Εικόνα 9: Μηχανισμός λειτουργίας των NADPH οξειδασών στην ΟΑ
F. Rousset et.al. IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis
via upregulation of p22phox and NOX4 activity in human articular
chondrocytes, Osteoarthritis and Cartilage 23 (2015)

A.4 ΛΕΠΤΙΝΗ, ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΟΑ

Η εμβιο-μηχανική καταπόνηση της άρθρωσης που οφείλεται στα μεγάλα φορτία βάρους στα οποία υπόκειται, μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή ROS στα χονδροκύτταρα προκαλώντας την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Σ' αυτή την κατηγορία οξειδωτικού στρες, έχει αναφερθεί ένας αντιοξειδωτικός μηχανισμός άμυνας επαγόμενος από τα εμβιομηχανικά φορτία της άρθρωσης. Ειδικότερα, αυτός ο πιθανός μηχανισμός δρα μέσω της σταθεροποίησης του παράγοντα Nrf2⁸⁹. Ο Nrf2 είναι ικανός να προστατεύει τα κύτταρα και τους ιστούς από το οξειδωτικό στρες ενεργοποιώντας μια οικογένεια αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών⁹⁰. Αυτή η ρυθμιζόμενη παραγωγή ROS μέσω φυσιολογικής εμβιομηχανικής διέγερσης μπορεί να αυξήσει την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα, παρέχοντας έτσι μια προσαρμοστική απόκριση που μπορεί να προστατεύσει τις αρθρώσεις από φλεγμονή και την οξειδωτική καταπόνηση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ΟΑ είναι μια κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες, στοιχείο το οποίο παρατηρείται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις οι οποίες συμπλέκονται με την ΟΑ, όπως η παχυσαρκία. Ενώ το οξειδωτικό στρες σε χαμηλά επίπεδα παίζει ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, σε υψηλά επίπεδα προκαλεί τόσο βλάβες στον χόνδρο όσο και στην εμφάνιση φλεγμονής. Επιπλέον έχει περιγραφεί εκτενώς ότι η λεπτίνη είναι εκείνη η λιποκίνη που παρουσιάζει χαρακτηριστική αύξηση κατά τη διάρκεια της παχυσαρκίας και ταυτόχρονα λειτουργεί καταλυτικά και στην παθολογία τη ΟΑ, διαμορφώνοντας ουσιαστικά τον μεταβολικό φαινότυπο της νόσου. Η λεπτίνη παρουσιάζει θετική ρύθμιση στην παχυσαρκία, όπου εμπλέκεται σε κρίσιμα στάδια της κυτταρικής ομοιόστασης όπως στην κυτταρική ανάπτυξη στο μεταβολισμό και στην παραγωγή ενέργειας. Έχει αναφερθεί μια λειτουργική επαφή μεταξύ της παραγωγής ROS και της σηματοδότησης της λεπτίνης σε αρκετούς ιστούς όπως το ενδοθήλιο, οι ωθήκες και το καρδιαγγειακό σύστημα. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρετικά λίγα στοιχεία για το πώς η λεπτίνη επηρεάζει το οξειδωτικό στρες στην ΟΑ.

Β.ΣΚΟΠΙΟΣ

Η λεπτίνη, μια λιποκίνη που και παράγεται απο τον λευκό λιπώδη ιστό και ελέγχει το ενεργειακό ισοζύγιο επηρεάζοντας την πρόσληψη του φαγητού, είναι γνωστό ότι με την άφθονη παραγωγή της στον οστεοαρθρικό χόνδρο παίζει έναν πολυποίκιλο ρόλο στην παθολογία της νόσου (π.χ. μεταβολικός φαινότυπος). Χαρακτηριστικό της ΟΑ επίσης είναι η υπέρμετρη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και το αυξημένο Οξειδωτικό Στρες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί αν η λεπτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ROS και την επαγωγή Οξειδωτικού Στρες σε ΟΑ χονδροκυττάρων. Η υπόθεση εργασίας μας περιλαμβάνει την παραγωγή ROS δια της μη-μιτοχονδριακής οδού και ειδικότερα μέσω των ενζύμων NOX και των υπομονάδων τους (p22phox). Στην προσπάθεια, λοιπόν, για τον σχεδιασμό ενός μοντέλου συσχέτισης ανάμεσα σε λεπτίνη και Οξειδωτικό Στρες μελετήθηκαν:

- Τα επίπεδα της έκφρασης του mRNA τόσο της NOX4 όσο και της p22phox σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, προερχόμενα απο κλινικά δείγματα.
- Τα επίπεδα των O_2^- και των ROS συνολικά, σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα, προερχόμενα απο κλινικά δείγματα.
- Η δράση που ασκεί η λεπτίνη πάνω στην έκφραση των γονιδίων NOX4 και p22phox. Έγιναν πειράματα χορήγησης λεπτίνης σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων και στην συνέχεια προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των NOX4 και p22phox.
- Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων NOX4 και p22phox μετά απο αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης, LEP. Έγιναν πειράματα RNAi με την χρήση siRNA σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων, προερχόμενα απο κλινικά δείγματα.
- Οι O_2^- και οι ROS συνολικά σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα, μετά απο εξωκυττάρια χορήγηση λεπτίνης, στις αντίστοιχες συνθήκες χρόνου και συγκέντρωσης με αυτές των πειραμάτων για τα γονίδια NOX4 & p22phox.
- Οι O_2^- και οι ROS συνολικά σε ΟΑ χονδροκύτταρα μετά απο αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης LEP σε αντίστοιχες συνθήκες χρόνου και συγκέντρωσης με αυτές των πειραμάτων για τα γονίδια NOX4 & p22phox.

Γ.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΑΡΘΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την διεκπεραίωση της εργασίας καλλιεργήθηκαν χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από οστεοαρθρικούς χόνδρους ατόμων, τα οποία είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος ή ισχίου στην Ορθοπαιδική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 17 δείγματα αρθρικού χόνδρου από ασθενείς με ΟΑ γόνατος. Τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη απομονώθηκαν από περιοχές του χόνδρου που παρουσίαζαν υψηλού βαθμού αλλοιώσεις, δηλαδή εμφάνιζαν προχωρημένο στάδιο ΟΑ. Πριν την ολική αρθροπλαστική στην οποία υποβλήθηκαν οι ασθενείς, έγινε ακτινογραφικός έλεγχος και οι ακτινογραφίες ελέγχθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren-Lawrence. Ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα των αρθρώσεων όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, χονδροδυσπλασία, μολυσματική ΟΑ, και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 10 δείγματα φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου. Τα δείγματα ελήφθησαν από άτομα τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση λόγω κατάγματος ή ακρωτηριασμού και δεν παρουσίαζαν κάποιο ιστορικό για παθήσεις των οστών ή αλλοιώσεις συνυφασμένες με ΟΑ .

Γ.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Γ.2.1 Υλικά καλλιέργειας

- **Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν το Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco BRL, UK). Στο θρεπτικό πριν την χρήση του προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 10% και 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM, αντίστοιχα.

- **Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των κυττάρων είναι το PBS χωρίς CaCl₂ και MgCl₂. Ρόλος του είναι η σταθεροποίηση του PH της καλλιέργειας. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου 25⁰C.

- **Θρυψίνη**

Η θρυψίνη χρησιμοποιήθηκε για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα καθώς αποτελεί ένζυμο που προκαλεί διάσπαση των συνδέσμων των κυττάρων στην επιφάνεια προσκόλλησης. Κατά την χρήση της, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 37⁰C, προκειμένου να μην μειώνεται απότομα η θερμοκρασία των χονδροκυττάρων, ενώ διατηρείται στους 4⁰C.

- **Πρωτεολυτικά ενζυμα (προνάση-κολλαγενάση)**

Η προνάση έχει την ικανότητα να διασπά τις πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) του ιστού συμβάλλοντας στην απελευθέρωση των ινών κολλαγόνου οι οποίες εν συνεχεία διασπώνται από την κολλαγενάση οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση των χονδροκυττάρων από την ECM κατά την απομόνωσή τους από τον χόνδρο.

Γ.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια τους πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 25T, χρησιμοποιώντας το πλήρες θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Istrumanets), σε σταθερή θερμοκρασία στους 37⁰C, και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και σταθερή εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθούν εξωτερικές μολύνσεις. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

Γ.2.3 Απομόνωση χονδροκυττάρων

Η απομόνωση των χονδροκυττάρων από δείγματα αρθρικού χόνδρου περιλαμβάνει ενζυμική κατεργασία των δειγμάτων με στόχο την απομάκρυνσή τους από την ECM

που τα περιβάλλει και επακόλουθη μεταφορά των χονδροκυττάρων σε επωαστικό κλίβανο. Ειδικότερα ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού σε τριβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT)
- Ξέπλυμα του ιστού 2-3 φορές με σκοπό τη διατήρηση της σταθερότητας του pH
- Τεμαχισμός του ιστού σε μικρά κομμάτια με αποστειρωμένο νυστέρι
- Μεταφορά των τεμαχίων σε πλάκα των 6 πηγαδίων και προσθήκη 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche, Mannheim, Germany) 5mg/ml με 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche, Mannheim, Germany) 5mg/ml με 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 24 ώρες
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon), φυγοκέντρωση του υπερκειμένου στις 2000rpm για 7min σε RT, απομάκρυνση του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2ml θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές

Γ.2.4 Πρωτόκολλο καλλιέργειας (Κατάψυξη-Απόψυξη-Ανακαλλιέργεια)

Τα χονδροκύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των μέσων που καλλιεργούνται και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται θρυψίνη για την αποκόλληση τους. Επιπλέον μετά την απομόνωσή τους από τους ιστούς τα χονδροκύτταρα μπορούν εκτός από άμεση καλλιέργεια, να διατηρηθούν στους -150°C. Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρονται σε κρυοφυαλίδιο σε συγκέντρωση 4-5x10⁶ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένα με 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και 30% FBS, απουσία αντιβιοτικών. Το DMSO

χρησιμοποιείται προκειμένου η ψύξη των κυττάρων-θρεπτικού υλικού που θα πραγματοποιηθεί να είναι αργή, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων οι οποίοι πιθανότατα θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η διαδικασία απόψυξης και η μετέπειτα μεταφορά τους στις φλάσκες για την καλλιέργεια τους περιλαμβάνει:

- Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού σε falcon των 15ml
- Μεταφορά του κρυοφιαλιδίου με τα κατεψυγμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο (37⁰C) για 15 δευτερόλεπτα
- Μεταφορά του περιεχομένου του κρυοφιαλιδίου στο falcon
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε RT
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε RT
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25T και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37⁰C, 5% CO₂)

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται κάθε φορά που τα κύτταρα καλύπτουν το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας. Τα κύτταρα μετά την ανάπτυξη τους διαιρούνται σε δύο νέες φλάσκες και συνεχιζόταν η καλλιέργειά τους με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνη και επώαση για 5 λεπτά στον κλίβανο

- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε RT
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 10 λεπτά σε RT
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 4ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά 2ml θρεπτικού υλικού σε κάθε νέα φλάσκα και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επάωση των κυττάρων στον κλίβανο (37⁰C)

Γ.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Γ.3.1 Υλικά απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)

Γ.3.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού
- Προσθήκη 0,5ml Trizol

- Μεταφορά σε σωληνάριο των 2mL (eppendorf)
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου και ανάδευση με vortex Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4⁰C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol
- Φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4⁰C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4⁰C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα στον κλίβανο, μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water
- Επώαση για 10 λεπτά στους 57⁰C στο υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του στους -80⁰C

Γ.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

Από τα RNA που απομονώθηκαν για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με την μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής . Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random primers).

Γ.4.1 Υλικά για την σύνθεση cDNA

- Random primers (2,97 μg/μl, invitrogen)
- Kit αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (200U/μl, invitrogen)
- Διοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό ddH₂O (DEMOS.A)

Γ.4.2 Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 3 ml RNA από κάθε δείγμα, και η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια.

Πρώτο στάδιο: Διάλυση του RNA σε ddH₂O και προσθήκη 1ml Random Primers μέχρι τελικού όγκου 15ml και στην συνέχεια θέρμανση των δειγμάτων στου 65⁰C για 10 λεπτά, για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA.

Δεύτερο στάδιο: Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5x: 4μl
- dNTPs: 2μl
- χλωριούχο μαγνήσιο: 2μl
- DTT: 2μl
- SuperScript III: 0,5μl

Και στην συνέχεια ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

- 37⁰C, 10 λεπτά
- 25⁰C, 10 λεπτά
- 37⁰C, 50 λεπτά
- 70⁰C, 15 λεπτά
- 4⁰C

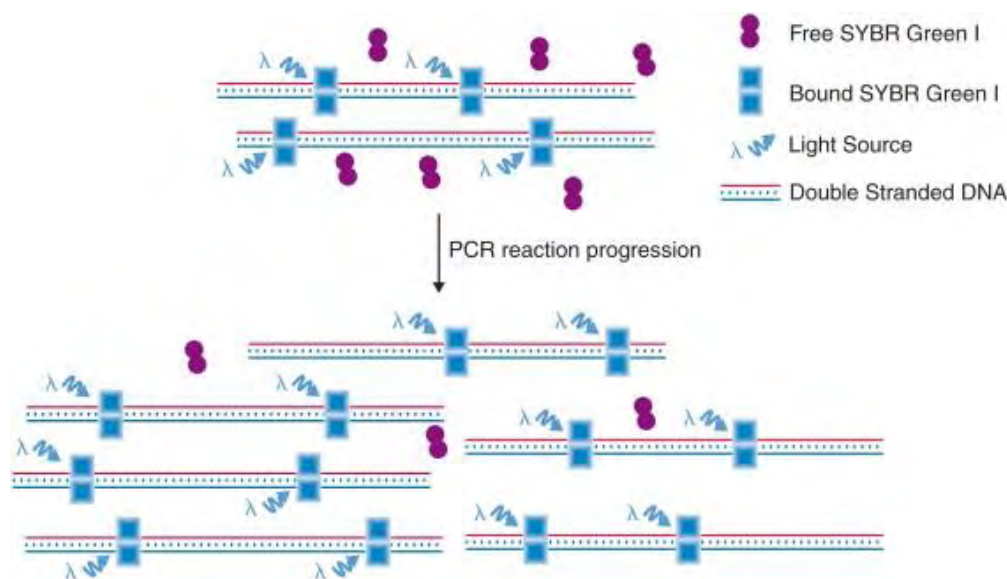
Στην συνέχεια προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε σωστά και ότι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα του καθώς και να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών ενός γονιδίου αναφοράς, του GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) δηλαδή ενός γονιδίου που εκφράζεται πάντα στον υπό μελέτη ιστό. Πραγματοποιήθηκε PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για το GAPDH, για το cDNA κάθε δείγματος.

Γ.5 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ

ΧΡΟΝΟΥ (real time PCR)

Σε μία τυπική αντίδραση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA επαναλαμβάνεται συνήθως 30-40 φορές. Η διαδικασία είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό των περισσότερων από 230 εκατομμυρίων ή 1 δισεκατομμυρίου αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το 1990 αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού DNA/RNA βασισμένη στην μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-κινητικής φθορισμού. Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο και συγκεκριμένα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Αντίθετα λοιπόν με τις υπόλοιπες τεχνικές τελικού σημείου, η Real-time PCR έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να παρέχει πληροφορίες καθ'όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Η βασική αρχή του συστήματος στηρίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών χημικών ουσιών και την ανίχνευση του φθορισμού αυτών που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση τους στο DNA του δείγματος. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία τεχνικών πραγματικού χρόνου που στηρίζονται στην παραπάνω αρχή και διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο κάνουν την ποσοτικοποίηση του στόχου. Όπως ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν τεχνικές που χρησιμοποιούν χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA (Sybr Green), αλλά και τεχνικές που απαιτούν ανιχνευτές υδρόλυσης (TaqMan), μοριακοί φάροι (Beacons) κτλ. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων *NOX4*, *p22phox*, *LEP* και *GAPDH*. Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και η φθορίζουσα ουσία SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Η SYBR Green (μέγιστη απορρόφηση στα 497nm) έχει την ικανότητα να συνδέεται σε δίκλινα μόρια DNA ενισχύοντας το φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών PCR προϊόντων. Η συγκεκριμένη φθορίζουσα ουσία, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την αποτελεσματικότερη πραγματοποίηση της αντίδρασης της real-time PCR, καθώς δύναται να συνδεθεί σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA αλλά μόνο σε μία συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευαισθησία της μεθόδου. Παράλληλα, ο

υπολογισμός του φθορισμού της SYBR Green σε αυξανόμενες θερμοκρασίες, μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων.



Εικόνα 10: Αρχή Μεθόδου SybrGreen

Στην παρούσα εργασία για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συγκριτικού C_t ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t, \text{δειγμ.}} - \Delta C_{t, \text{βαθμονομ.}}$) με την χρήση ενός δείγματος-μάρτυρα ως βαθμονομητή και ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης έτσι ώστε να κανονικοποιηθεί η τιμή του γονιδίου στόχου. Η διαδικασία της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95⁰C
- Σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα (3'-5') της μονόκλωνης ακολουθίας στόχου που προέκυψε στο προηγούμενο στάδιο, σε θερμοκρασία ανάλογη της σύνθεσης των εκκινητών
- Θέρμανση του μίγματος στους 68-72⁰C, προκειμένου η Taq πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου, με τη χρήση των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές

Η χρονική διάρκεια κάθε σταδίου δεν είναι συγκεκριμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από το μήκος (bp) του DNA-τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ~1.000.000 αντιγράφων της μητρικής

αλληλουχίας, αφού στο τέλος κάθε κύκλου του το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται.

Γ.5.1 Υλικά για την real-time PCR

- cDNA των δειγμάτων
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για τα γονίδια NOX4, p22phox, LEP και GAPDH
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (DEMO S.A.)

Γ.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των NOX4 & p22phox

- cDNA: 2μl
- SYBR Green: 5μl
- Εκκινητής Forward: 0,3μl
- Εκκινητής Reverse: 0,3μl
- ddH₂O: 2,4μl

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

- Αποδιάταξη στους 95⁰C
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
 - Αποδιάταξη στους 95⁰C για 15sec
 - Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60⁰C για 60sec
 - Επιμήκυνση στους 72⁰C για 30sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72⁰C για 10min

Γ.5.3 Αλληλουχίες εκκινητών

- **NOX4**

Forward: 5′-GCCGAACACTCTTGGCTTAC.-3′

Reverse: 5′-GTTGAGGGCATTACACCAGAT-3′

- **p22phox**

Forward: 5′-CGCTTCACCCAGTGGTACTT-3′

Reverse: 5′-GAGAGCAGGAGATGCAGGAC-3′

- **LEP**

Forward: 5′-TGTCTTGTCCCCTCTTGACC-3′

Reverse: 5′-CATGTGCTTCCAGCTTGTGT-3

- **GAPDH**

Forward: 5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3′

Reverse: 5′-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3′

Γ.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΛΕΠΤΙΝΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

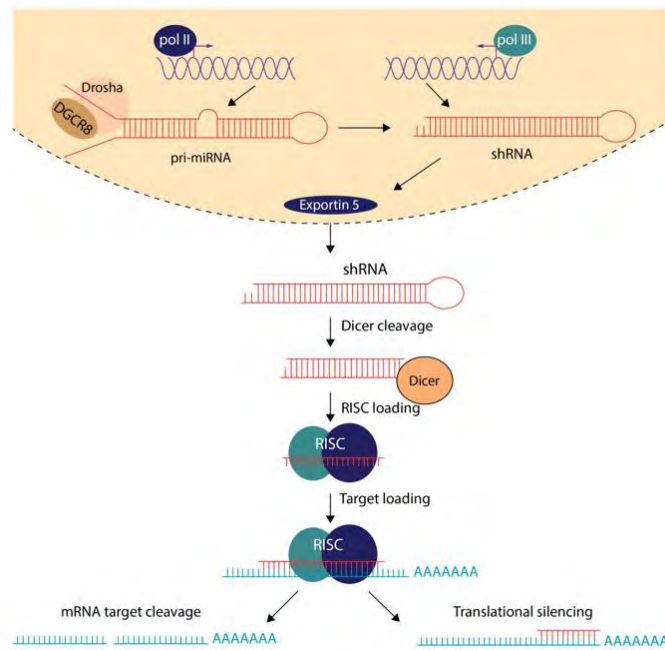
Η επίδραση με λεπτίνη χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δράσης της συγκεκριμένης λιποκίνης στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ειδικότερα, βασικός στόχος ήταν η μελέτη του κατά πόσο επηρεάζονται τα επίπεδα της έκφρασης τόσο των γονιδίων NOX4 και p22phox, όσο και τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, τα χονδροκύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλάκες 6 θέσεων (6-well) και όταν κάλυψαν το 90-95% της επιφάνειας των πηγαδιών τους χορηγήθηκε λεπτίνη (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς FBS σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml για το χρονικό διάστημα των 5 και 7 ημερών. Μία μέρα πριν την προσθήκη της λεπτίνης, τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 χωρίς FBS. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κύτταρα. . Επιπλέον, κάθε δείγμα

εξετάστηκε εις τριπλούν προκειμένου να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Γ.7 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ LEP ΜΕ siRNA

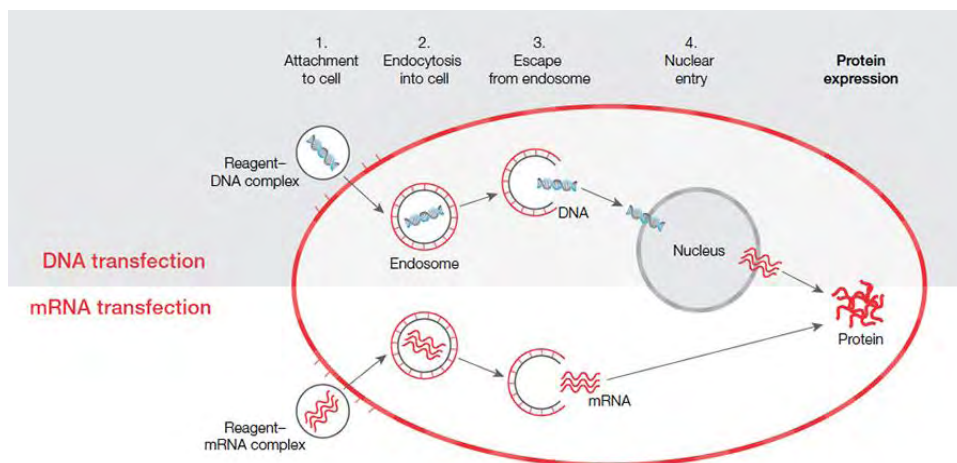
Η εξειδικευμένη αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη σύγχρονη έρευνα. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πειραματικές μέθοδοι που επιτρέπουν την επιλεκτική καταστολή της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων με την χρήση siRNA να αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο γονιδιακής αποσιώπησης. Η μέθοδος της γονιδιακής αποσιώπησης με τη χρήση siRNA εκμεταλλεύεται ένα φυσικό μηχανισμό των κυττάρων, ο οποίος σε φυτά και κατώτερα σπονδυλωτά, οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων όταν εντοπίζονται στα κύτταρά τους δίκλινα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας με τα γονίδια στόχους.

Η γονιδιακή αποσιώπηση με διπλής αλυσίδας RNA λαμβάνει χώρα δια μέσου ενός μονοπατιού πολλαπλών σταδίων, το οποίο είναι το ίδιο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα που έχουν μελετηθεί. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως μηχανισμός παρεμβολής του RNA (RNA interference – RNAi). Αυτό το μονοπάτι ξεκινά από ένα σταθερό πρωτεϊνικό ετεροδιμερές το οποίο συνδέεται στο δίκλινο RNA που στην συνέχεια το υδρολύει σε μικρά μόρια RNA. Μία υπομονάδα του ετεροδιμερούς είναι μέλος της οικογένειας RNase-III ενζύμων και καλείται Dicer 2 (DCR2) και η άλλη είναι μία RNA- συνδεδεμένη πρωτεΐνη με και ονομάζεται R2D2. Το ετεροδιμερές DCR2/ R2D2 μετατρέπει το δίκλινο RNA σε μικρά παρεμβαλόμενα μόρια RNA (siRNA: short interfering RNA), τα οποία είναι μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων. Η μία από τις δύο αλυσίδες του siRNA ενσωματώνεται μέσα στο σύμπλεγμα siRISC (RNA Induced Silencing Complex). Η έλικα του δίκλωνου RNA που ενσωματώνεται στο RISC υβριδίζεται με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας την νουκλεάση μέσα στο σύμπλοκο RISC, η οποία κατακερματίζει το στόχο. Η συγκρότηση του siRISC απαιτεί προηγουμένως την συγκρότηση του πρόδρομου συμπλέγματος RLC (RISC Loading Complex), το οποίο περιέχει το δίκλινο siRNA, το ετεροδιμερές DCR2/ R2D2 και επιπρόσθετες πρωτεΐνες. Το RISC έχει τη δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους.



Εικόνα11 : Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA.

Έτσι, από την εισαγωγή μιας αλληλουχίας σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα καθίσταται δυνατή η αποσιώπηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού μορίων mRNA. Για να επιτευχθεί η γονιδιακή αποσιώπηση μέσω της οδού RNAi έχουν συντεθεί τεχνητά μόρια siRNAs, τα οποία δρουν έναντι επιλεγμένων μορίων-στόχων. Η εισαγωγή των εξωγενών μορίων siRNA στα κύτταρα επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων φορέων, όπως τα πλασμίδια, ή λιποσωμάτων, όπως η λιποφεκταμίνη. Η λιποφεκταμίνη, μία λιπιδιακή κατιονική δομή με υψηλή αποτελεσματικότητα εισαγωγής του siRNA στα κύτταρα, συνδέεται με το μόριο siRNA, εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκυττάρωση και το απελευθερώνει.



Εικόνα 12: Σχηματική δράση της λιποφεκταμίνης. Η λιποφεκταμίνη είναι κατιονικά λιπίδια που σχηματίζουν λιποσώματα με θετικά φορτισμένη επιφάνεια, τα οποία διευκολύνουν την είσοδο των νουκλεϊκών οξέων στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα θετικά φορτισμένα λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων και σχηματίζεται σύμπλοκο. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη, επιτρέποντας την τήξη του συμπλόκου με αυτή. Το σύμπλοκο ενδοκυττάρωνεται, διαφεύγει από το ενδόσωμα και απελευθερώνεται το νουκλεϊκό οξύ

Μία ημέρα πριν γίνει η επιμόλυνση με το siRNA, τα χονδροκύτταρα τα οποία βρίσκονται σε 6-well plate, επωάζονται σε 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά για 24h στους 37⁰C στον κλίβανο. Για την ανάπτυξη των κυττάρων στα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης με siRNA χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) και DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά. Για την εισαγωγή του siRNA στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη. Η αλληλουχία του siRNA LEP gene που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στο πρωτόκολλο της εταιρίας.

Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε:

- Προσθήκη 5μl λιποφεκταμίνης σε 495μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium χωρίς FBS.
- Καλή ανάδευση και επώαση για 5min σε RT.
- Προσθήκη 5μl siRNA Leptin σε 495μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium χωρίς FBS. Καλή ανάδευση
- Ανάμειξη του διαλύματος του siRNA LEP gene με το διάλυμα της λιποφεκταμίνης
- Καλή ανάδευση και επώαση για 20min σε RT.
- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα 6-wells.
- Προσθήκη 500μl μίγματος siRNA/Lipofectamin σε κάθε πηγαδάκι.
- Προσθήκη 500μl Opti-MEM επιπλέον σε κάθε πηγαδάκι.
- Επώαση για 4-6h στους 37⁰C στον κλίβανο.
- Αφαίρεση των Opti-MEM – siRNA/Lipofectamin.
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 χωρίς αντιβιοτικά ανά πηγάδι.
- Επώαση των κυττάρων για 5 μέρες στον κλίβανο.

Γ.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΜΕΣΩ

ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

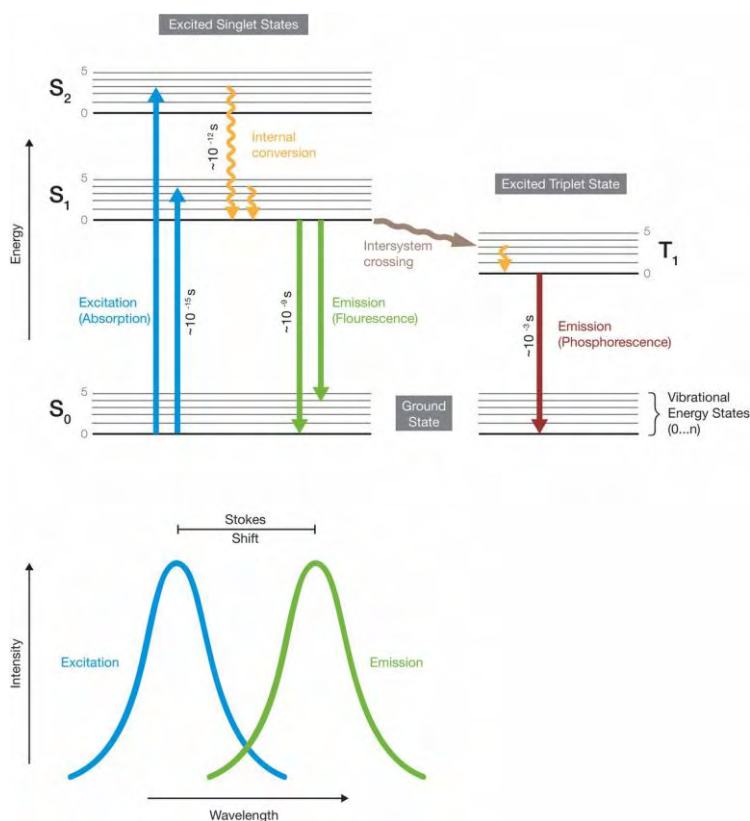
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου συμμετέχουν σε κομβικές διαδικασίες του οργανισμού όπως η ενίσχυση της αναγνώρισης του «εαυτού», βασικό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνητικά βλαπτικές για τα συστατικά του κυττάρου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ROS μπορεί να προκύψουν ως παραπροϊόν από τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα, το κυτοχρώμα P-450, την λιποξυγενάση, την οξειδοοξειδοουκτάση της ξανθίνης, καθώς και από τις μη-μιτοχονδριακές NADPH οξειδάσες στις τις οποίες επικεντρώνεται η συγκεκριμένη εργασία.

Για την μελέτη των επιπέδων ROS σε ζωντανά χονδροκύτταρα τόσο για τον έλεγχό τους σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα όσο και μετά από επιδράσεις (λεπτίνη, siRNA για γονίδιο LEP) χρησιμοποιήθηκε το kit “ROS-ID® Total ROS/Superoxide Detection Kit, for fluorescence microscopy” της Enzo Life Sciences.

Αυτό το kit έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει άμεσα την παραγωγή ROS/O₂⁻ σε πραγματικό χρόνο σε ζωντανά κύτταρα χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού. Βασικά συστατικά του είναι δύο φθορίζουσες χρωστικές: Ένας ανιχνευτής (probe) για τον προσδιορισμό των ROS (πράσινο), ο οποίος ανιχνεύει μια σειρά οξειδωτικών μορίων όπως H₂O₂ κτλ. έχοντας μικρότερη χημική συγγένεια για άλλες μορφές ROS όπως το O₂⁻) και ένας ανιχνευτής για τον προσδιορισμό μόνο ριζών υπεροξειδίου (κόκκινο). Μετά τη χρώση των κυττάρων, τα φθορίζοντα προϊόντα που παράγονται από τις δύο χρωστικές μπορούν να εμφανιστούν στο μικροσκόπιο με τη χρήση ενός πράσινου (490/525 nm) και ενός κόκκινου (550/620 nm) φίλτρου (στις παρενθέσεις αναγράφονται τα μήκη κύματος απορρόφησης των δύο χρωστικών).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 13) απεικονίζεται η αρχή της μεθόδου. Συγκεκριμένα, μόρια διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, δηλαδή απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια αυτών να μετακινούνται παροδικά σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα. Κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων αυτών στη βασική στοιβάδα εκπέμπεται ακτινοβολία (φθορισμού) μεγαλύτερου μήκους κύματος (μικρότερης ενέργειας, $E = hc/\lambda$). Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά το φθορισμό είναι 10⁻⁹ -10⁻¹² seconds

Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης/εκπομπής ακτινοβολίας τα οποία εξαρτώνται από τη δομή των ατόμων και των ηλεκτρονίων αυτής. Όταν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία φθορίζουσες χρωστικές για να σημειωθούν μακρομόρια, όπως στην παρούσα εργασία, πρέπει να γίνεται συνδυασμός χρωστικών που έχουν όσο περισσότερο διακριτά φάσματα εκπομπής/απορρόφησης γίνεται.



Εικόνα 13: Αρχή μεθόδου της μικροσκοπίας φθορισμού

Γ.6.1 Υλικά για την fluorescence microscopy

- Oxidative Stress Detection Reagent (Green) **5 mM stock solution**.
- Superoxide Detection Reagent (Orange) **5 mM stock solution**.
- ROS Inducer (Pyocyanin) με **τελική συγκέντρωση 200-500 μΜ**.
- ROS Inhibitor (N-acetyl-L-cysteine) με **τελική συγκέντρωση 5 mM**.
- Wash Buffer Salts.

Γ.6.2 Πρωτόκολλο για fluorescence microscopy για ανίχνευση ROS

- Τα κύτταρα στρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλακές και επωάζονται σε κλίβανο μέχρι να καλύψουν το 50-60%.
- Αλλαγή του θρεπτικού υλικού με φρέσκο θρεπτικό υλικό την ημέρα του πειράματος
- *Αρνητικό control*: προσθήκη του αναστολέα των ROS (N-acetyl-L-cysteine) για τουλάχιστον 30 λεπτά πριν το πείραμα του φθορισμού
- Προσθήκη ίδιου όγκου διαλύματος **ROS/Superoxide Detection Solution (2X)** με τον επαγωγέα των ROS (Pyocyanin)
- Πλήρης κάλυψη των κυττάρων της καλυπτρίδας με το παραπάνω διάλυμα.
- Επώαση υπό κανονικές συνθήκες (37⁰C) για 1 ώρα.
- Απομάκρυνση με προσοχή του ROS/Superoxide Detection Mix από τις αντικειμενοφόρους πλάκες
- Έκπλυση των πλακών με 1X Wash Buffer (δύο φορές).
- Προσθήκη ορισμένων σταγόνων 1X Wash Buffer στα στεγνά πλακάκια και άμεση κάλυψή τους με καλυπτρίδες
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Ex/Em: 490/525 nm).

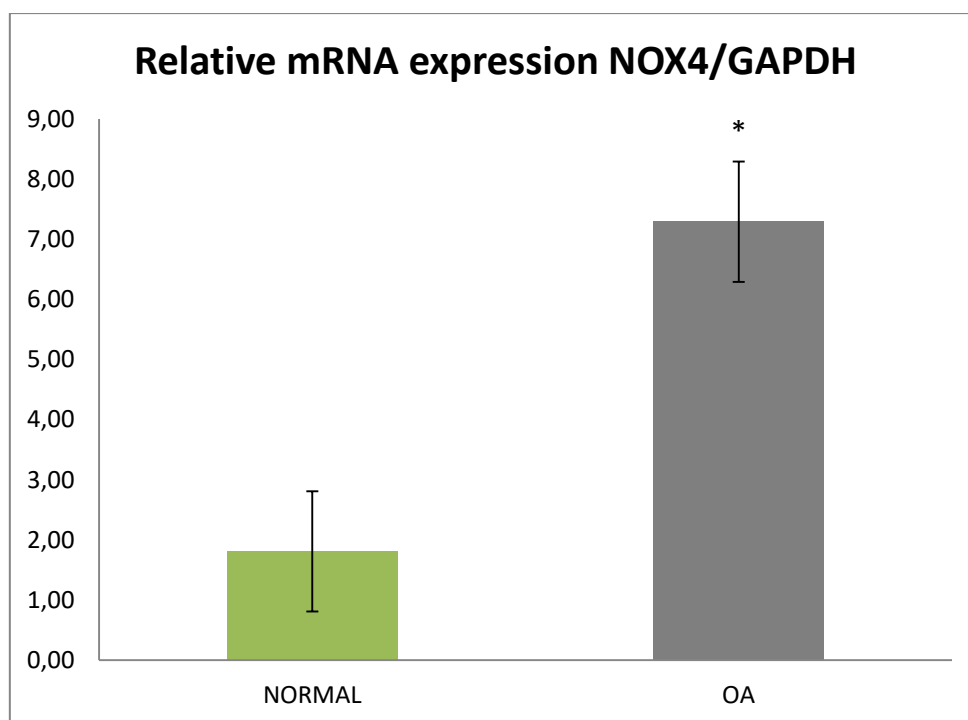
Γ.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS και πιο συγκεκριμένα οι δοκιμασίες Wilcoxon test, Kruskal Wallis test και Mann Whitney test. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p\text{-value} < 0,05$.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου NOX4 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών (ΟΑ) χονδροκυττάρων.

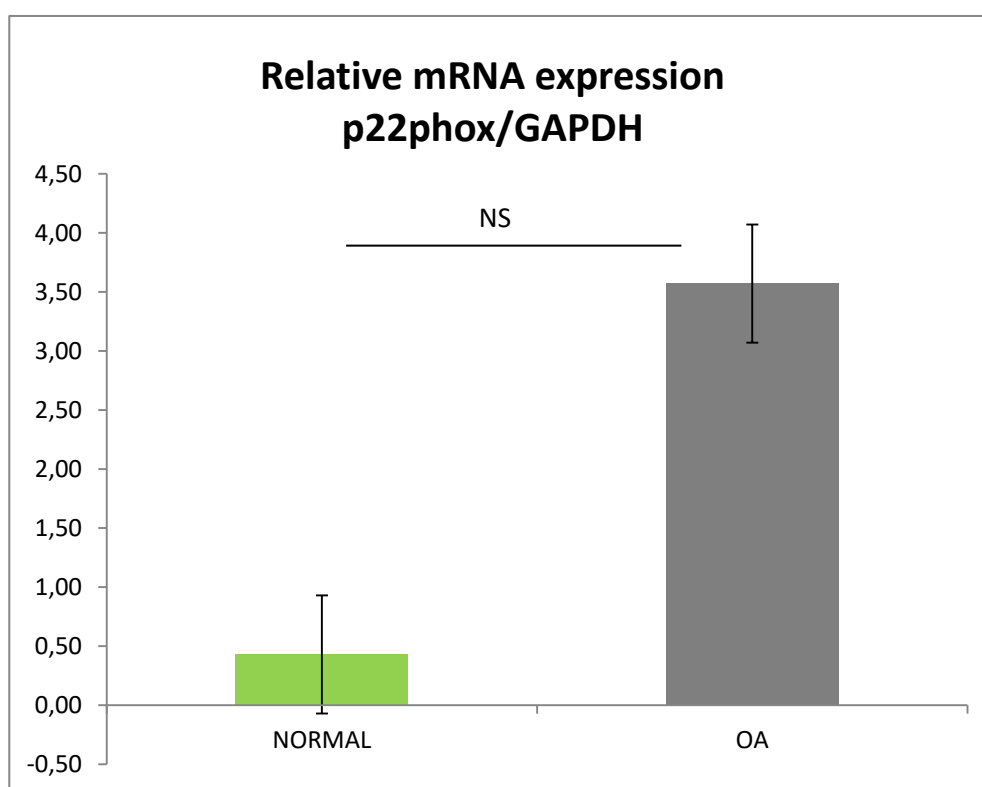
Από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, τόσο οστεοαρθρικά όσο και φυσιολογικά χονδροκύτταρα, απομονώθηκε RNA και μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NOX4. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της NOX4 παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της NOX4 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($p=0,033$, Mann-Whitney test) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NOX4 σε φυσιολογικά (normal) και οστεοαρθρικά (ΟΑ) χονδροκύτταρα. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $p<0,05$

Δ.1.2 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου p22phox σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων

Εφόσον τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της NOX4 στην ΟΑ, θελήσαμε περαιτέρω να διερευνήσουμε και τα επίπεδα έκφρασης μίας εκ των βασικών υπομονάδων της NOX4 και συγκεκριμένα της p22phox. Σε αντίθεση με τα επίπεδα mRNA της NOX4, τα μεταγραφικά επίπεδα της p22phox υπομονάδας δεν παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ ΟΑ και φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, παρόλο που παρατηρείται κάποια σχετική αύξηση των τιμών έκφρασης στα ΟΑ κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα ($p=0,228$, Mann-Whitney test) (Εικόνα 15)

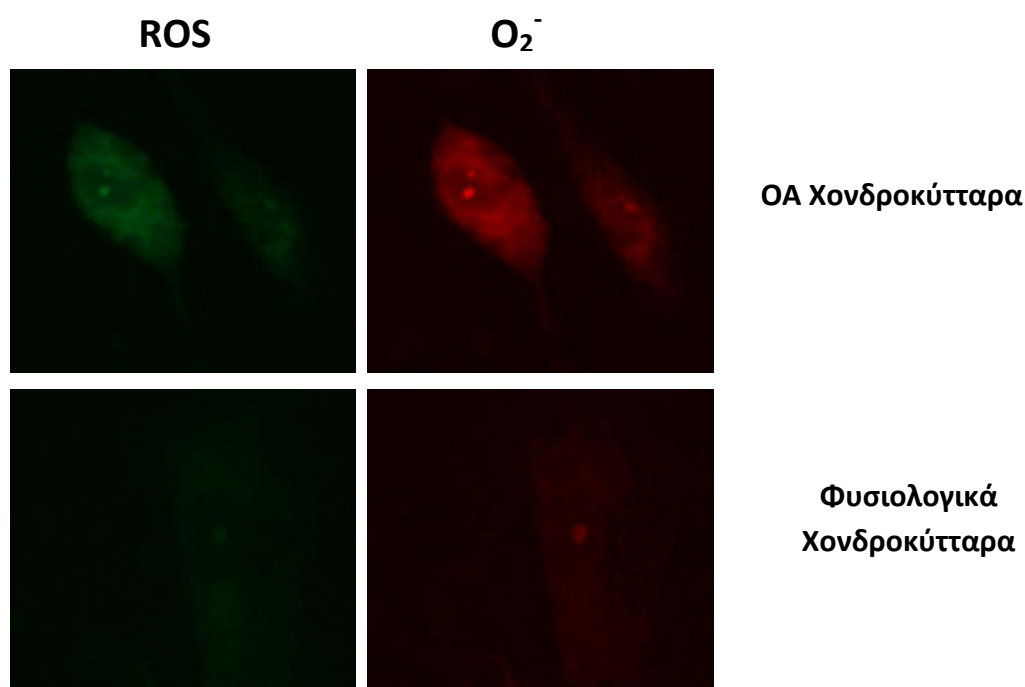


Εικόνα 15: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου p22phox σε φυσιολογικά (normal) και οστεοαρθρική (ΟΑ) χονδροκύτταρα. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. NS=non significant

Δ.2 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των ριζών οξυγόνου (O_2^-) τόσο σε OA όσο και σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού όπου η ένταση του φθορισμού αντιπροσωπεύει τα επίπεδα O_2^- και ROS.

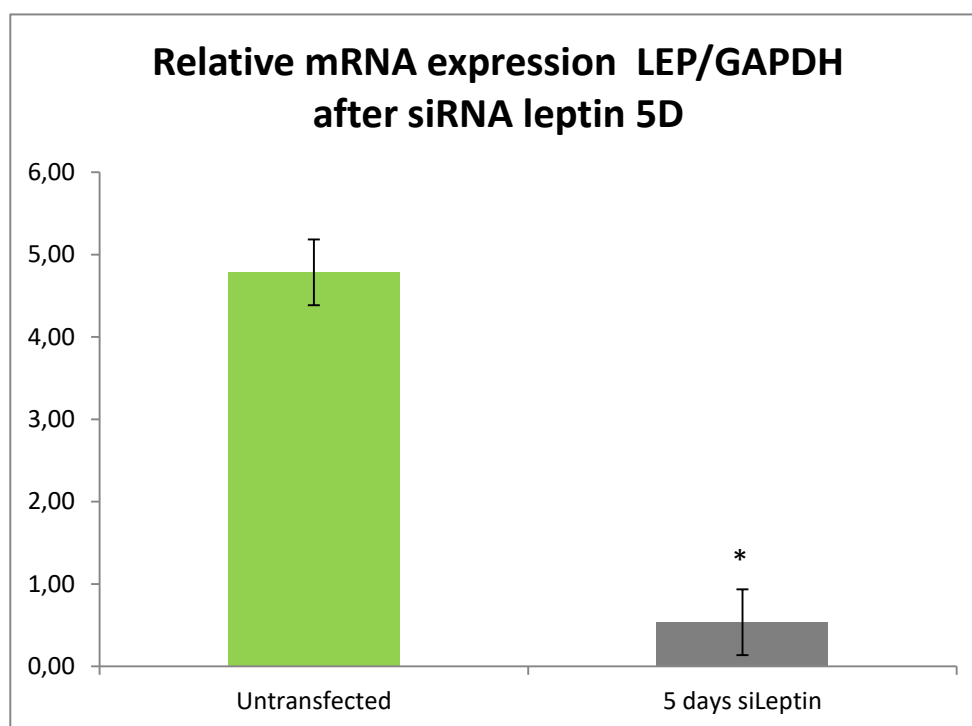
Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται έντονος πράσινος φθορισμός, ενδεικτικός των επιπέδων ROS στα OA χονδροκύτταρα, ενώ πολύ χαμηλά είναι τα επίπεδά του στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα σε OA συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ομοίως, έντονα κόκκινος φθορισμός που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα των ριζών οξυγόνου εντοπίζονται σε χονδροκύτταρα ασθενών με OA σε σύγκριση με αυτά των υγιών ατόμων (Εικόνα 16)



Εικόνα 16: Στην εικόνα απεικονίζονται η ύπαρξη ύπαρξη ROS και O_2^- σε OA και φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Τα ROS φθορίζουν στο πράσινο, ενώ τα μόρια O_2^- φθορίζουν στο κόκκινο.

Δ.3 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων NOX4 και p22phox μετά από επιμόλυνση με siRNA για το γονίδιο της λεπτίνης σε καλλιέργειες οστεοαρθριτικών (OA) χονδροκυττάρων.

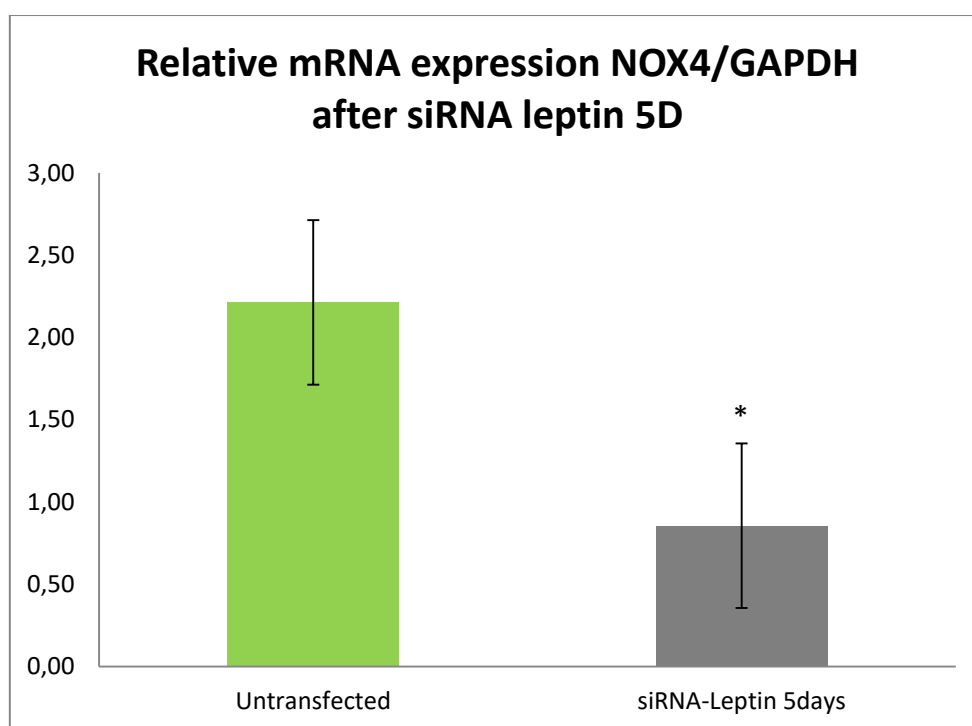
Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνησουμε αν η NOX4 ρυθμίζεται από τη λεπτίνη, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση OA χονδροκυττάρων, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα λεπτίνης, με siRNA κατά του γονιδίου της λεπτίνης (LEP). Τα χονδροκύτταρα επώαστηκαν για 5 μέρες με το siRNA. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με μελέτη της έκφρασης του γονιδίου LEP. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο της ποσοτικής PCR έδειξαν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης ήταν επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της στα κύτταρα που χορηγήθηκε το siRNA συγκριτικά σε αυτά που δεν χορηγήθηκε ($p=0,018$, Mann-Whitney test) (Εικόνα 17)



Εικόνα 17: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης (LEP) σε OA χονδροκύτταρα μετά από χορήγηση siRNA για 5 μέρες. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $p<0,05$

Δ.3.1 Επίπεδα mRNA του γονιδίου της NOX4 μετά από siRNA-LEP

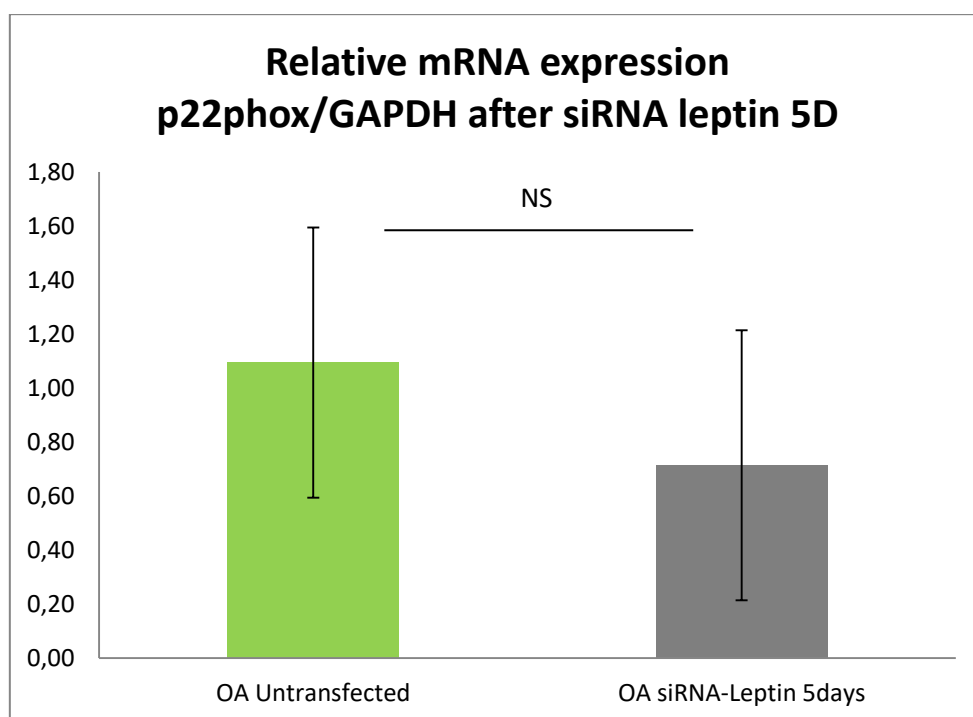
Ακολούθως, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NOX4 μετά την επιτυχημένη αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου LEP. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 7 ΟΑ δείγματα και μελετήθηκε η έκφραση της NOX4 πριν και μετά απο επιμόλυνση με siRNA. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η αναστολή του γονιδίου της λεπτίνης οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης mRNA του NOX4 στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το siRNA συγκριτικά με αυτά που δεν χορηγήθηκε ($p=0,018$, Mann-Whitney test) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NOX4 σε ΟΑ χονδροκύτταρα μετά από χορήγηση siRNA για 5 μέρες. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. * $p<0,05$

Δ.3.2 Επίπεδα mRNA του γονιδίου της υπομονάδας p22phox μετά από siRNA-LEP

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο της λεπτίνης στη ρύθμιση της NOX4, μελετήσαμε και τα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας της NOX4, της p22phox. Παρόλο που παρατηρείται σχετική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της υπομονάδας p22phox, αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ των κυττάρων που χορηγήθηκε το siRNA συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε ($p=0,176$, Mann-Whitney test) (Εικόνα 19)



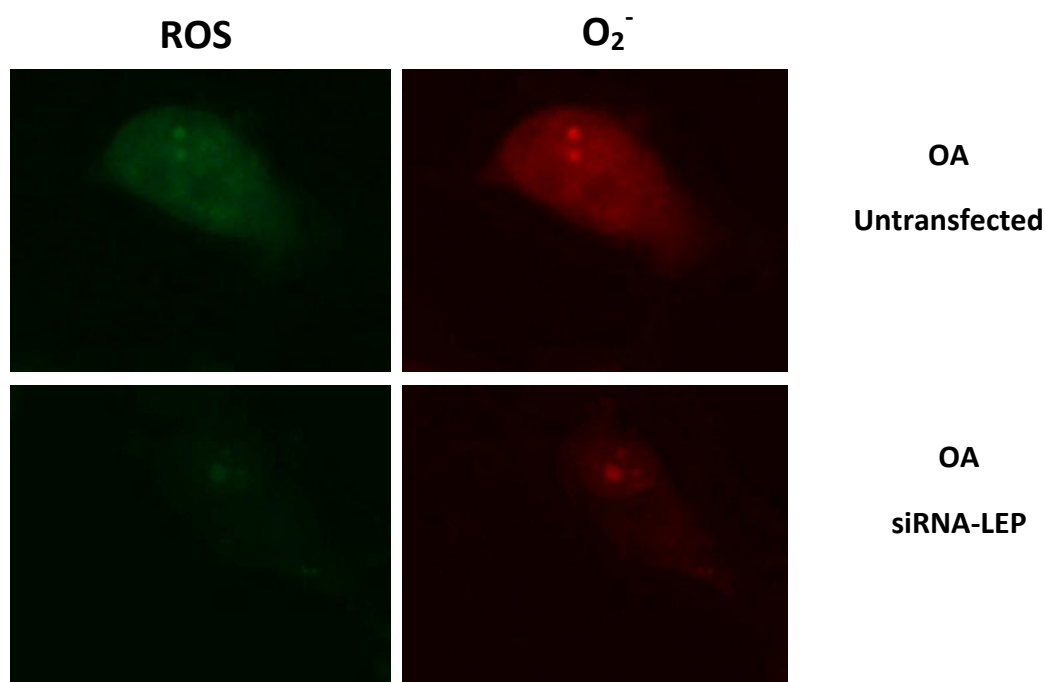
Εικόνα 19: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου p22phox σε OA χονδροκύτταρα μετά από χορήγηση siRNA για 5 μέρες. Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. NS=non significant

Δ.4 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες οστεοαρθριτικών (OA) χονδροκυττάρων μετά από επιμόλυνση τους με siRNA-LEP

Εφόσον βρέθηκε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της NOX4 μειώνονται μετά από την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν επηρεάζονται και τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες διερευνώντας την υπόθεση ότι η

λεπτίνη επηρεάζει και την κατάσταση του οξειδωτικού στρες που παρατηρείται στη νόσο. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων O_2^- και των ROS μετά από χορήγηση του siRNA για το γονίδιο της λεπτίνης για χρονικό διάστημα 5 ημερών χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού όπου η ένταση του φθορισμού αντιπροσωπεύει τα επίπεδα O_2^- και ROS .

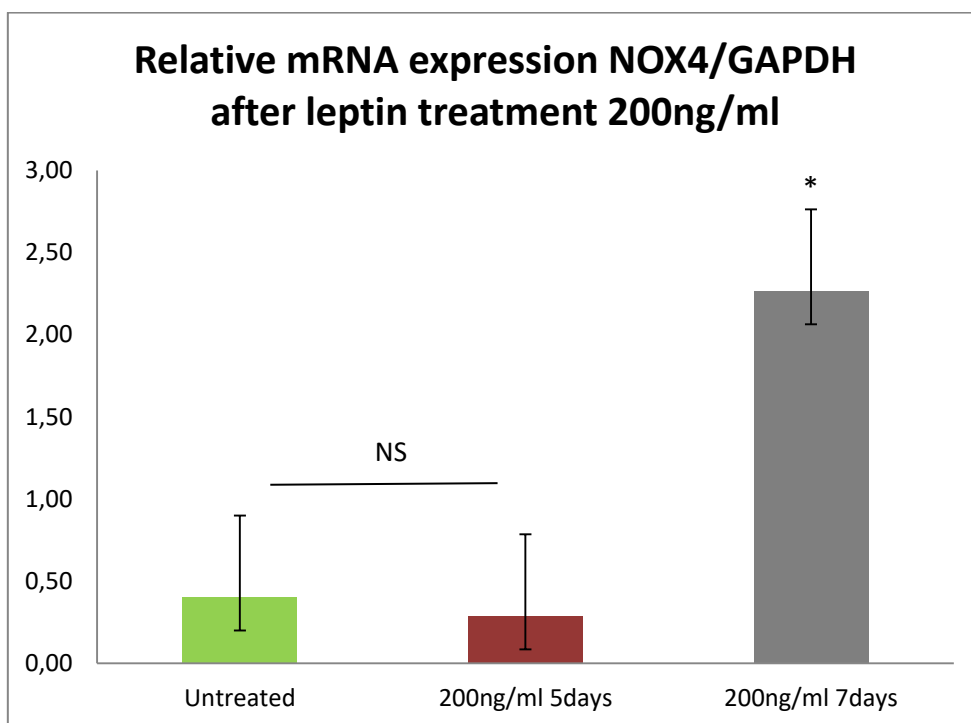
Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται σημαντικά μειωμένος πράσινος φθορισμός ενδεικτικός των επιπέδων ROS στα OA χονδροκύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το siRNA για τη λεπτίνη, ενώ έντονος είναι ο φθορισμός που παρατηρείται σε OA χονδροκύτταρα που δεν επιμολύνθηκαν με το siRNA. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου ανιχνεύονται σε μειωμένα επίπεδα σε OA χονδροκύτταρα μετά από την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ομοίως, μειωμένα είναι και τα επίπεδα των ριζών οξυγόνου όπως υποδεικνύεται από τον εξασθενημένο κόκκινο φθορισμό που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα των O_2^- στα κύτταρα που έγινε χορήγηση του siRNA (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: Στην εικόνα απεικονίζονται η ύπαρξη ύπαρξη ROS και O_2^- σε OA χονδροκύτταρα χωρίς επιμόλυνση με siRNA-LEP (OA Untransfected) και μετά από χορήγηση του siRNA για 5 μέρες (OA siRNA-LEP). Τα ROS φθορίζουν στο πράσινο, ενώ τα μόρια O_2^- φθορίζουν στο κόκκινο.

Δ.5 Μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων NOX4 και p22phox σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από εξωκυττάρια χορήγηση λεπτίνης.

Αφού μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της λεπτίνης σε ΟΑ χονδροκύτταρα στα γονίδια NOX4 και p22phox, πραγματοποιήθηκε αντίστροφο πείραμα με χορήγηση λεπτίνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα λεπτίνης. Ειδικότερα, χορηγήσαμε λεπτίνη σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα (συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα) σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml. Τα χονδροκύτταρα επώαστηκαν με την ορμόνη για το χρονικό διάστημα των 5 και 7 ημερών. Η επιλογή της συγκέντρωσης χορήγησης πραγματοποιήθηκε με βάση προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κύτταρα. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση της NOX4 σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα τόσο πριν την χορήγηση λεπτίνης (Untreated) όσο και μετά από χρονικό διάστημα 5 και 7 ημερών (Εικόνα 21).

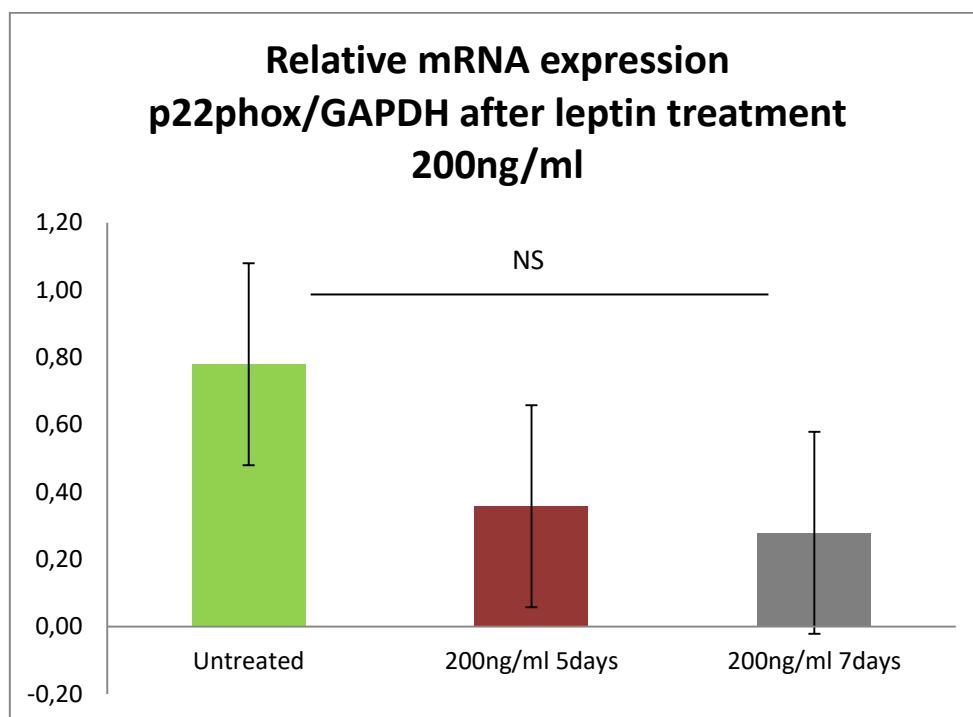


Εικόνα 21: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NOX4 σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα πριν (Untreated) και μετά από χορήγηση λεπτίνης για 5 και 7 μέρες (200ng/ml 5 days & 200ng/ml 7 days). Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. NS=non significant, * $p < 0,05$

Από το παραπάνω διάγραμμα διακρίνονται τα εξής:

- Μετά από 5 μέρες επώασης των φυσιολογικών χονδροκυττάρων με λεπτίνη δεν παρατηρείται σχεδόν καμία διαφορά στα επίπεδα mRNA του γονιδίου της NOX4 συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε λεπτίνη.
- Αντιθέτως, μετά από 7 μέρες επώασης παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της NOX4 ($p=0,043$).

Εκτός από την NOX4, μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου της υπομονάδας p22phox. Αντίθετα με την οξειδάση η έκφραση της p22phox μειώνεται μετά από χορήγηση λεπτίνης, τόσο μετά από 5 όσο και μετά από 7 μέρες. Ωστόσο, η παρατηρούμενη μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 22).

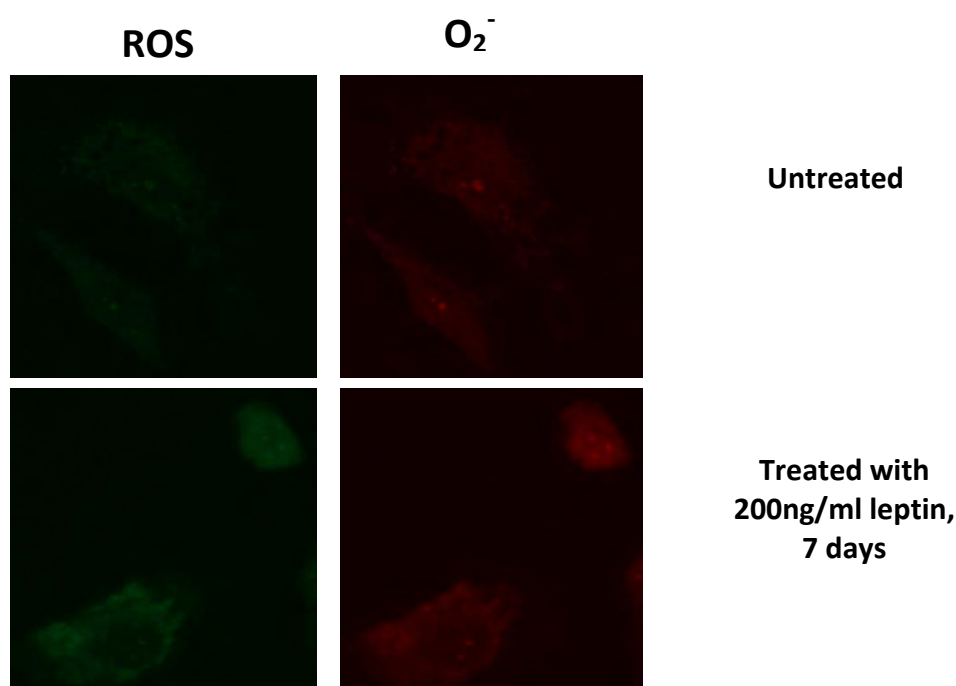


Εικόνα 22: Μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου p22phox σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα πριν (Untreated) και μετά από χορήγηση λεπτίνης για 5 και 7 μέρες (200ng/ml 5 days & 200ng/ml 7 days). Τα επίπεδα mRNA είναι ομαλοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH. NS=non significant

Δ.6 Προσδιορισμός των μορίων O_2^- και των ROS σε καλλιέργειες φυσιολογικών χονδροκυττάρων μετά από εξωκυττάρια χορήγηση λεπτίνης.

Και στο τρίτο πείραμα προσδιορισμού των μορίων O_2^- και των ROS χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού ακολουθώντας την ίδια αρχή της μεθόδου όπου η ένταση του φθορισμού αντιπροσωπεύει τα επίπεδα O_2^- και ROS .

Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται σημαντικά αυξημένος πράσινος φθορισμός ενδεικτικός των επιπέδων ROS στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα στα οποία χορηγήθηκε η λεπτίνη, ενώ μειωμένος είναι ο φθορισμός που παρατηρείται σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα που δεν χορηγήθηκε η λεπτίνη. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα μετά από την χορήγηση της λεπτίνης συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις. Ομοίως, αυξημένα παρουσιάζονται και τα επίπεδα των ριζών οξυγόνου όπως υποδεικνύεται από τον έντονο κόκκινο φθορισμό που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα των O_2^- στα κύτταρα που χορηγήθηκε η λεπτίνη (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Στην εικόνα απεικονίζονται η ύπαρξη ύπαρξη ROS και O_2^- σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα χωρίς τη χορήγηση λεπτίνης (Untreated) και μετά από χορήγηση 200ng/ml λεπτίνης για 7 ημέρες. Τα ROS φθορίζουν στο πράσινο, ενώ τα μόρια O_2^- φθορίζουν στο κόκκινο.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οστεοαρθρίτιδα είναι χρόνια ρευματική πάθηση που εντοπίζεται σε περιφερικές αρθρώσεις αλλά και σε αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης αποτελώντας την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και κύρια αιτία πόνου και αναπηρίας σε μεγάλες ηλικίες. Το ευρύ φάσμα των παραγόντων κινδύνου συγκροτεί την ποικίλη ομάδα φαινοτύπων της νόσου. Ο μεταβολικός φαινότυπος της οστεοαρθρίτιδας (MetS-OA) προκύπτει από τη συσχέτιση των παθολογικών χαρακτηριστικών της OA με τις διάφορες μεταβολικές συνιστώσες του Μεταβολικού Συνδρόμου (Μ.Σ.) όπως την παχυσαρκία. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη μάζα του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία, γίνεται αντιληπτό ότι η απελευθέρωση των λιποκινών είναι αυξημένη στο σύνολο του λιπώδους ιστού. Η λεπτίνη είναι εκείνη η λιποκίνη που παρουσιάζει χαρακτηριστική αύξηση κατά τη διάρκεια της παχυσαρκίας και ταυτόχρονα λειτουργεί καταλυτικά και στην παθολογία της OA, διαμορφώνοντας ουσιαστικά τον μεταβολικό φαινότυπο της νόσου. Η OA επίσης, αποτελεί μια κατάσταση χρόνιου οξειδωτικού στρες, στοιχείο το οποίο παρατηρείται και στην παχυσαρκία η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στη παθολογία της OA. Ενώ το οξειδωτικό στρες σε χαμηλά επίπεδα παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, σε υψηλά επίπεδα προκαλεί τόσο βλάβες στον χόνδρο όσο και στην εμφάνιση φλεγμονής. Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ της λεπτίνης και της παραγωγής ROS σε παθήσεις όπως ο καρκίνος, ενώ επίσης έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η λεπτίνη ενέχεται στη ρύθμιση της παραγωγής τους. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν μελέτες για τη σχέση λεπτίνης και οξειδωτικού στρες, δύο χαρακτηριστικών μονοπατιών της παθολογίας της OA, στη νόσο.

Με δεδομένη την σύνδεση της παχυσαρκίας και της βιολογικής δράσης της λεπτίνης με την OA, καθώς και την παραγωγή ROS και εμφάνιση Οξειδωτικού Στρες τόσο με την παχυσαρκία όσο και με την OA, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η σύνδεση ανάμεσα σε λεπτίνη και παραγωγή ROS. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της υπόθεσης αν η λεπτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή του Οξειδωτικού Στρες σε OA χονδροκυτταρα. Στην παρούσα εργασία επικεντρωθήκαμε στο μονοπάτι παραγωγής ROS μέσω της μη-μιτοχονδριακής οδού και ως εκ τούτου βασικό αντικείμενο μελέτης ήταν οι NADPH-οξειδάσες (NOX)

καθώς και υπομονάδες οι οποίες παίζουν ρόλο στην λειτουργικότητά τους όπως η p22phox.

Αρχικά συγκρίθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων NOX4 και p22phox σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα σε σχέση με χονδροκύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, από περιοχές του χόνδρου με μεγάλο βαθμό εκφυλισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα OA χονδροκύτταρα εμφανίζουν υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου της NOX4, βασικού μορίου που εμπλέκεται στην παραγωγή των ROS. Τα αποτελέσματα της παρούσης διπλωματικής εργασίας έρχονται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες^{57,88,91}, ενισχύοντας την άποψη ότι η NOX4 πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθολογία της πάθησης.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε και από πειράματα στα οποία διερευνήθηκε το οξειδωτικό στρες στην OA. Συγκεκριμένα με τη χρήση της μικροσκοπίας φθορισμού, μελετήθηκαν τόσο τα επίπεδα των ROS όσο και τα επίπεδα των ριζών οξυγόνου (O_2^-), τα οποία αποτελούν βασικά προϊόντα οξειδωτικού στρες. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των O_2^- και των ROS είναι σημαντικά αυξημένα σε OA χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά, κάτι που επιβεβαιώνει την κατάσταση του αυξημένου οξειδωτικού στρες που έχει συσχετιστεί με την παθολογία της νόσου. Σε σύνδεση και με τα αυξημένα επίπεδα της NOX4 στη OA, ενισχύεται ο αρχικός ισχυρισμός της εργασίας, ότι τα αυξημένα επίπεδα mRNA της NOX4 που παρατηρούνται στην OA ενοχοποιούνται για το αυξημένο οξειδωτικό στρες που χαρακτηρίζει την πάθηση.

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο και την ενεργοποίηση της NOX4 στην OA, μελετήσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας p22phox, η οποία θεωρείται σημαντικός παράγοντας ενεργοποίησης του ενζύμου. Παρόλα αυτά, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο της p22phox στην ενεργοποίηση της NOX4 είναι αντικρουόμενα. Παρόλο που στην πλειοψηφία της ισχύουσας βιβλιογραφίας η p22phox καταγράφεται ως η πλέον απαραίτητη υπομονάδα για την λειτουργία των NOX (συμπεριλαμβανομένης και της NOX4)^{55,88}, υπάρχουν μελέτες οι οποίες περιγράφουν την NOX4 ως το μόνο ένζυμο της οικογένειας των NOX που δεν χρειάζεται την υπομονάδα p22phox για την λειτουργία του⁸⁸. Το τελευταίο παρατηρείται και στην OA δεδομένου ότι η αύξηση

που παρατηρήθηκε στα μεταγραφικά επίπεδά της δεν είναι στατιστική σημαντική. Οι παρατηρήσεις μας υποδεικνύουν ότι πιθανότατα η υπομονάδα p22phox δεν ενέχεται στην ενεργοποίηση της NOX4 στην OA και κάποια άλλη υπομονάδα να είναι καθοριστική για την ενεργοποίησή της.

Ορμώμενοι από τα παραπάνω αποτελέσματα τα οποία υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση της NOX4 ενοχοποιείται για τα αυξημένα επίπεδα των ROS στην OA, στη συνέχεια διερευνήθηκε ο τρόπος ρύθμισης των παραπάνω μορίων. Βασισμένοι σε μελέτες που διεξήχθησαν σε άλλες παθήσεις και αναφέρουν συσχέτιση της λεπτίνης και του οξειδωτικού στρες, θελήσαμε να δούμε αν η λεπτίνη είναι εκείνη που επηρεάζει τα μεταγραφικά επίπεδα της NOX4 και κατ' επέκταση και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στην πάθηση. Για το σκοπό αυτό και δεδομένου ότι τα επίπεδα της λεπτίνης είναι αυξημένα στην OA, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA (siRNA), έγινε αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων. Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της NOX4 αλλά και της p22phox πριν και μετά από επιμόλυνση με siRNA. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η αναστολή του γονιδίου της λεπτίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης mRNA της NOX4, υποδεικνύοντας ότι η λεπτίνη επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου στα OA χονδροκύτταρα, ενώ δεν είχε κάποια επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας p22phox. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων των ROS και των O_2^- μετά από την επιμόλυνση των OA χονδροκυττάρων με το siRNA για το γονίδιο της λεπτίνης και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση και των δύο προϊόντων μετά την αποσιώπηση του γονιδίου. Βασικό συμπέρασμα των παραπάνω πειραμάτων είναι ότι η μείωση των επιπέδων λεπτίνης από ένα κύτταρο με αυξημένα επίπεδα προς μια φυσιολογική κατάσταση, οδηγεί τόσο σε αναλογική πτώση των μεταγραφικών επιπέδων της NOX4, όσο και σε μείωση των επιπέδων O_2^- και ROS. Η συσχέτιση των επιπέδων λεπτίνης με τα επίπεδα της NOX4, ισχυροποιεί τον ισχυρισμό της εργασίας για τον κομβικό ρόλο της παραπάνω ορμόνης στην εμφάνιση Οξειδωτικού Στρες στα OA χονδροκυττάρων και κατ' επέκταση στην νόσο, παρ'όλα αυτά δεν τον επιβεβαιώνει ακόμα απόλυτα.

Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης εργασίας μας, εκτός από το αποτέλεσμα που έχει η μείωση της λεπτίνης σε OA χονδροκύτταρα, θα έπρεπε να παρατηρηθεί και το αντίστροφο: το αποτέλεσμα δηλαδή της αύξησης λεπτίνης σε φυσιολογικά

χονδροκύτταρα. Στόχος του πειράματος είναι να ελεγχθεί αν το «θετικό» αποτέλεσμα της λεπτίνης επιβεβαιώνει και το «αρνητικό» αποτέλεσμά της, προσαρμόζοντας ένα φυσιολογικό χονδροκύτταρο σε μια παθολογική κατάσταση αυξημένης παραγωγής λεπτίνης (όπως δηλαδή και στην ΟΑ). Γι' αυτό τον λόγο χορηγήθηκε σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα λεπτίνη σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml και τα οποία επώαστηκαν με την ορμόνη για για το χρονικό διάστημα των 5 και 7 ημερών. Τόσο για την τελική συγκέντρωση της λεπτίνης όσο και για το χρονικό διάστημα επώασης των κύτταρων χρησιμοποιήθηκαν προηγούμενα πειραματικά ευρήματα του εργαστηρίου σχετικά με την λεπτίνη και τον τρόπο δράσης της στα ΟΑ χονδροκύτταρα. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κύτταρα και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των γονιδίων NOX4 και p22phox, καθώς και εκ νέου προσδιορισμός των επιπέδων O₂⁻ και ROS πριν και μετά την χορήγηση λεπτίνης στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα. Ενώ μετά από 5 μέρες επώασης των φυσιολογικών χονδροκυττάρων με λεπτίνη δεν παρατηρείται σχεδόν καμία διαφορά στις τιμές της έκφρασης του γονιδίου της NOX4, μετά από 7 μέρες επώασης υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της NOX4. Η παρατηρούμενη διαφορά στον χρόνο δράσης της λεπτίνης έναντι στην NOX4 ίσως να αναδεικνύει τον απαιτούμενο χρόνο που χρειάζεται η ορμόνη για να δράσει και να εμφανίσει τα αποτελέσματά της γύρω από το οξειδωτικό στρες. Επίσης άλλες μελέτες^{92,93,94} που ασχολούνται με την επίδραση που έχει η λεπτίνη πάνω στα ένζυμα NOX, σε διαφορετικούς βέβαια κυτταρικούς τύπους, καταλήγουν και σε διαφορετικά συμπεράσματα τόσο ως προς τον χρόνο δράσης όσο και ως προς την συγκέντρωση της λεπτίνης. Αυτό υποδεικνύει το διαφορετικό τρόπο λειτουργίας της λεπτίνης στους διάφορους ιστούς, ανοίγοντας ένα νέο πεδίο διερεύνησης ως προς τις συνθήκες χρόνου και συγκέντρωσης που λειτουργεί η ορμόνη στον οστεοαρθρικό χόνδρο.

Τα αποτελέσματα της χορήγησης λεπτίνης σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα καλλιέργειας επαληθεύουν τα αποτελέσματα του πειράματος αποσιώπησης του γονιδίου της, καθώς επιβεβαιώνουν την θετική επίδραση που έχουν τα επίπεδα λεπτίνης στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της NOX4. Η επίδραση χαρακτηρίζεται ως «θετική» αφού μείωση των επιπέδων της λεπτίνης οδηγεί σε ταυτόχρονη μείωση της NOX4, και αύξηση των επιπέδων της ορμόνης αυξάνει αντίστοιχα την έκφραση του γονιδίου της NADPH-οξειδάσης 4. Ο παραπάνω μηχανισμός θετικής επίδρασης της λεπτίνης πάνω στο Οξειδωτικό Στρες επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της

μικροσκοπίας φθορισμού, αφού η ένταση του σήματος φθορισμού που δίνουν τα προϊόντα O_2^- και ROS είναι σαφώς μεγαλύτερη στα χονδροκύτταρα μετά από χορήγηση λεπτίνης, παρομοιάζοντας πολύ με την εικόνα που έχουν τα OA χονδροκύτταρα.

Συμπερασματικά, επιβεβαιώνεται ο ισχυρισμός ότι η λεπτίνη είναι ένα μόριο, που εκτός των άλλων λειτουργιών που παίζει στην οστεοαρθρίτιδα, διαδραματίζει έναν κομβικό ρόλο στην αυξημένη παραγωγή ROS και την επαγωγή οξειδωτικού στρες στην νόσο. Ταυτόχρονα είναι εκείνη η ορμόνη η οποία συνενώνει πολλές από τις παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζουν την OA, όπως τη παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και το οξειδωτικό στρες, αναδεικνύοντας ακόμα περισσότερο την πολυπαραγοντική φύση της νόσου, δίνοντας ταυτόχρονα νέα δεδομένα τα οποία στοιχειοθετούν την OA ως μια μεταβολική νόσο.

Είτε με έμμεσο τρόπο, λόγω την επίδρασης της πάνω στα μεταγραφικά επίπεδα γονιδίων που βιολογική τους λειτουργία είναι η παραγωγή ROS, είτε με άμεσο τρόπο με απευθείας προσδιορισμό O_2^- και ROS, με την παραπάνω πειραματική διαδικασία διαμορφώνεται ένα μηχανιστικό μοντέλο για τον τρόπο με τον οποίο η λεπτίνη επηρεάζει την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Προκειμένου να επέλθει καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την επίδραση της λεπτίνης πάνω στο οξειδωτικό στρες, αναγκαίες είναι μελλοντικές μελέτες που στόχο θα έχουν την αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο η λεπτίνη ρυθμίζει το οξειδωτικό στρες στην OA και την ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goldring, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 1916–26 (2000).
2. Liu-Bryan, R. Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1835–42 (2015).
3. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism* (2012). doi:10.1002/art.34453
4. Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A. & Jordan, K. P. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* (2010). doi:10.1016/j.joca.2009.08.010
5. Deveza, L. A. & Loeser, R. F. Is osteoarthritis one disease or a collection of many? *Rheumatol. (United Kingdom)* **57**, iv34–iv42 (2018).
6. Hunter, D. J. & Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **393**, 1745–1759 (2019).
7. Hilgsmann, M. *et al.* Health economics in the field of osteoarthritis: An Expert’s consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin. Arthritis Rheum.* (2013). doi:10.1016/j.semarthrit.2013.07.003
8. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **54**, 465–80 (2005).
9. Vincent, T. L. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: A focus on the pericellular matrix. *Current Opinion in Pharmacology* (2013). doi:10.1016/j.coph.2013.01.010
10. Kim, H. A. *et al.* The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* (2006). doi:10.1002/art.21951

11. Yan, M., Zhang, J., Yang, H. & Sun, Y. The role of leptin in osteoarthritis. *Med. (United States)* **97**, (2018).
12. Weinans, H. *et al.* Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone* **51**, 190–6 (2012).
13. Jin, X. *et al.* Circulating C reactive protein in osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* (2015). doi:10.1136/annrheumdis-2013-204494
14. Yusuf, E. *et al.* Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 761–5 (2010).
15. Louati, K., Vidal, C., Berenbaum, F. & Sellam, J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD open* **1**, e000077 (2015).
16. Van Spil, W. E., Kubassova, O., Boesen, M., Bay-Jensen, A. C. & Mobasher, A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochem. Pharmacol.* **165**, 41–48 (2019).
17. Gonzalez, A. Osteoarthritis year 2013 in review: Genetics and genomics. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1443–1451 (2013).
18. Puenpatom, R. A. & Victor, T. W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: An analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.* (2009). doi:10.3810/pgm.2009.11.2073
19. Courties, A., Sellam, J. & Berenbaum, F. Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **29**, 214–222 (2017).
20. Laiguillon, M. C. *et al.* Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: Toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* (2015). doi:10.1016/j.joca.2015.04.026
21. Duclos, M. Osteoarthritis, obesity and type 2 diabetes: The weight of waist circumference. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 157–160 (2016).

22. Williams, M. F., London, D. A., Husni, E. M., Navaneethan, S. & Kashyap, S. R. Type 2 diabetes and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *J. Diabetes Complications* **30**, 944–50 (2016).
23. De Munter, W., Van der Kraan, P. M., Van den Berg, W. B. & Van Lent, P. L. E. M. High systemic levels of low-density lipoprotein cholesterol: Fuel to the flames in inflammatory osteoarthritis? *Rheumatology (United Kingdom)* (2016). doi:10.1093/rheumatology/kev270
24. Crewe, C., An, Y. A. & Scherer, P. E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **127**, 74–82 (2017).
25. Schrover, I. M., Spiering, W., Leiner, T. & Visseren, F. L. J. Adipose Tissue Dysfunction: Clinical Relevance and Diagnostic Possibilities. *Hormone and Metabolic Research* (2016). doi:10.1055/s-0042-103243
26. Vuolteenaho, K., Koskinen, A. & Moilanen, E. Leptin - A link between obesity and osteoarthritis: Applications for prevention and treatment. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **114**, 103–108 (2014).
27. Martel-Pelletier, J., Raynauld, J. P., Dorais, M., Abram, F. & Pelletier, J. P. The levels of the adipokines adiponin and leptin are associated with knee osteoarthritis progression as assessed by MRI and incidence of total knee replacement in symptomatic osteoarthritis patients: A post hoc analysis. *Rheumatol. (United Kingdom)* (2016). doi:10.1093/rheumatology/kev408
28. Abella, V. *et al.* Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 100–109 (2017).
29. Tu, C., He, J., Wu, B., Wang, W. & Li, Z. An extensive review regarding the adipokines in the pathogenesis and progression of osteoarthritis. *Cytokine* **113**, 1–12 (2019).
30. Simopoulou, T. *et al.* Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthr. Cartil.* **15**, 872–883 (2007).

31. Urban, H. & Little, C. B. The role of fat and inflammation in the pathogenesis and management of osteoarthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **57**, iv10–iv21 (2018).
32. Morrison, H. M. and C. D. & Pennington Biomedical Research Center, LSU System, Baton Rouge, L. Structure, production and signaling of lept. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
33. Olivia M. Farr†, Anna Gavrieli†,*, and C. S. M. & Division. Leptin applications in 2015: What have we learned about leptin and obesity? **25**, 289–313 (2016).
34. Zhang, F. *et al.* Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* (1997). doi:10.1038/387206a0
35. Myers, M. G., Cowley, M. A. & Münzberg, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 537–56 (2008).
36. Münzberg, H., Flier, J. S. & Bjørbaek, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* **145**, 4880–9 (2004).
37. Dalamaga, M. *et al.* Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab.* **18**, 29–42 (2013).
38. Tong, K. M. *et al.* Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-κB/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell. Signal.* (2008). doi:10.1016/j.cellsig.2008.04.003
39. Yaykasli, K. O. *et al.* Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF-κB signaling pathways in human chondrocytes. *Cell Biol. Int.* **39**, 104–12 (2015).
40. Vuolteenaho, K., Koskinen, A., Moilanen, T. & Moilanen, E. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 and sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: A link between obesity and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2012). doi:10.1136/annrheumdis-2011-

201242

41. Scotece, M. *et al.* Adipokines as drug targets in joint and bone disease. *Drug Discovery Today* (2014). doi:10.1016/j.drudis.2013.07.012
42. Gualillo, O. Further evidence for leptin involvement in cartilage homeostases. *Osteoarthritis and Cartilage* (2007). doi:10.1016/j.joca.2007.04.015
43. Conde, J. *et al.* Differential expression of adipokines in infrapatellar fat pad (IPFP) and synovium of osteoarthritis patients and healthy individuals. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2013-204189
44. Distel, E. *et al.* The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: An important source of interleukin-6 and its soluble receptor. *Arthritis Rheum.* (2009). doi:10.1002/art.24881
45. Otero, M., Gomez Reino, J. J. & Gualillo, O. Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: In vitro effect of leptin and interferon- γ in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum.* (2003). doi:10.1002/art.10811
46. Hui, W. *et al.* Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases. *Ann. Rheum. Dis.* (2012). doi:10.1136/annrheumdis-2011-200372
47. Conde, J. *et al.* Adipokines and Osteoarthritis: Novel Molecules Involved in the Pathogenesis and Progression of Disease. *Arthritis* (2011). doi:10.1155/2011/203901
48. Gómez, R. *et al.* Adiponectin and leptin increase IL-8 production in human chondrocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2011). doi:10.1136/ard.2010.145672
49. Findlay, D. M. & Atkins, G. J. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Current Osteoporosis Reports* (2014). doi:10.1007/s11914-014-0192-5
50. Mutabaruka, M. S., Aoulad Aissa, M., Delalandre, A., Lavigne, M. & Lajeunesse, D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts

- may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Res. Ther.* (2010). doi:10.1186/ar2925
51. Scotece, M. *et al.* Adipokines induce pro-inflammatory factors in activated Cd4+ T cells from osteoarthritis patient. *J. Orthop. Res.* (2017). doi:10.1002/jor.23377
 52. Lepetsos, P. & Papavassiliou, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 576–591 (2016).
 53. Blanca, A. J. *et al.* Leptin Induces Oxidative Stress Through Activation of NADPH Oxidase in Renal Tubular Cells: Antioxidant Effect of L-Carnitine. *J. Cell. Biochem.* **8**, 2281–2288 (2016).
 54. Franz, A. *et al.* The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint. *Orthop. Rev. (Pavia)*. **10**, 1–7 (2018).
 55. Zhang, L. NADPH oxydase Nox4 : structure / fonction protéomique recombinante et approche immunologique To cite this version : HAL Id : tel-00622550 NADPH oxydase Nox4 : structure / fonction Prot é omique recombinante et approche immunologique. (2011).
 56. Sinha, K., Das, J., Pal, P. B. & Sil, P. C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.* **87**, 1157–80 (2013).
 57. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
 58. Ki, S. K., Hae, W. C., Hee, E. Y. & Ick, Y. K. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **285**, 40294–40302 (2010).
 59. SBARRA, A. J. & KARNOVSKY, M. L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **234**, 1355–62 (1959).
 60. Royer-Pokora, B. *et al.* Cloning the gene for an inherited human disorder -

- Chronic granulomatous disease - On the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**, 32–38 (1986).
61. Cross, A. R. & Segal, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes - Prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1657**, 1–22 (2004).
 62. Zeng, M. Y., Miralda, I., Armstrong, C. L., Uriarte, S. M. & Bagaitkar, J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral Microbiol.* **34**, 27–38 (2019).
 63. Tejada-Simon, M. V. *et al.* Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**, 97–106 (2005).
 64. Bánfi, B. *et al.* NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.* **279**, 46065–72 (2004).
 65. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E. G. V. & Lambeth, J. D. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140 (2001).
 66. Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P. & Leto, T. L. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8010–8014 (2000).
 67. Robinson, J. M., Ohira, T. & Badwey, J. A. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* **122**, 293–304 (2004).
 68. Herkert, O. *et al.* NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* **105**, 2030–2036 (2002).
 69. Henderson, L. M., Banting, G. & Chappell, J. B. The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* **270**, 5909–16 (1995).
 70. Groemping, Y. & Rittinger, K. Activation and assembly of the NADPH

- oxidase: A structural perspective. *Biochemical Journal* **386**, 401–416 (2005).
71. Karimi, G., Houée Levin, C., Dagher, M. C., Baciou, L. & Bizouarn, T. Assembly of phagocyte NADPH oxidase: A concerted binding process? *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 3277–3283 (2014).
 72. Sumimoto, H., Miyano, K. & Takeya, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 677–86 (2005).
 73. Sumimoto, H. *et al.* Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 22152–8 (1996).
 74. Seno, T. *et al.* Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb. Res.* **103**, 399–409 (2001).
 75. Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H. & Lambeth, J. D. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J. Biol. Chem.* **274**, 22999–3005 (1999).
 76. Clark, R. A., Epperson, T. K. & Valente, A. J. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, S22-3 (2004).
 77. Jackson, H. M., Kawahara, T., Nisimoto, Y., Smith, S. M. E. & Lambeth, J. D. Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains. *J. Biol. Chem.* **285**, 10281–10290 (2010).
 78. Goyal, P. *et al.* Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 32–39 (2005).
 79. Shiose, A. *et al.* A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* **276**, 1417–1423 (2001).
 80. Wingler, K. *et al.* Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1456–1464 (2001).

81. Martyn, K. D., Frederick, L. M., Von Loehneysen, K., Dinauer, M. C. & Knaus, U. G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal.* **18**, 69–82 (2006).
82. Gorin, Y. *et al.* Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J. Biol. Chem.* **280**, 39616–26 (2005).
83. Inoguchi, T. *et al.* Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S227-32 (2003).
84. Pember, S. O., Heyl, B. L., Kinkade, J. M. & Lambeth, J. D. Cytochrome b558 from (bovine) granulocytes. Partial purification from Triton X-114 extracts and properties of the isolated cytochrome. *J. Biol. Chem.* **259**, 10590–5 (1984).
85. Huang, J., Hitt, N. D. & Kleinberg, M. E. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in Phagocyte Cytochrome b558. *Biochemistry* **34**, 16753–16757 (1995).
86. Park, J. Y. *et al.* NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. *J. Appl. Physiol.* **99**, 1905–1911 (2005).
87. Takeya, R. *et al.* Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* **290**, 6003 (2015).
88. Rousset, F. *et al.* IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22phox and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1972–1980 (2015).
89. Marchev, A. S. *et al.* Oxidative stress and chronic inflammation in osteoarthritis: can NRF2 counteract these partners in crime? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1401**, 114–135 (2017).
90. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y. & Dinkova-Kostova, A. T. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem. J.* **457**, 415–24 (2014).
91. Issa, R. & Griffin, T. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating

- biomechanics and inflammation. *Pathobiol. Aging Age-related Dis.* **2**, 17470 (2012).
92. Muñoz, M. *et al.* Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biol.* **19**, 92–104 (2018).
 93. Ray, R. *et al.* Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1368–1376 (2011).
 94. Mahboubi, S. *et al.* Leptin induces ROS via NOX5 in healthy and neoplastic mammary epithelial cells. *Oncol. Rep.* **38**, 3254–3264 (2017).
 95. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartil* 2009
 97. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AWt, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 2009;
 98. Poole AR, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Eds. *Osteoarthritis: Diagnosis/Surgical Management*. Philadelphia: WB Saunders; 2001:29e47