



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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNA ΑΠΟ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ**  
**ΑΠΟ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (iMSCs) ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗ**  
**ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ»**

**ΒΑΣΙΛΑΡΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΡΑΦΑΕΛΑ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ, BSc**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

**ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ:** Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Παν/μιου  
Θεσσαλίας, Μέλος

**ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ:** Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, ΕΚΠΑ, Μέλος

**ΛΑΡΙΣΑ, 2022**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR  
GENETICS**

**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM  
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS  
“NON- CODING RNAs FROM MESENCHYMAL CELLS DERIVED FROM IN-  
DUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (iMSCs) IN DEGENERATIVE  
ATHRITIS”**

**VASILAROU PANAGIOTA RAFAELA  
MOLECULAR BIOLOGIST & GENETICIST, BSc**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	6
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1. Φυσιολογική δομή άρθρωσης γονάτου – ο αρθρικός χόνδρος.....	9
1.2. Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ).....	10
1.2.1. Επιδημιολογία της νόσου. ....	11
1.2.2. Παθοφυσιολογία της ΟΑ.....	12
1.2.3. Παράγοντες κινδύνου και κλινικοί φαινότυποι οστεοαρθρίτιδας, ....	14
1.3. Επιγενετική της Οστεοαρθρίτιδας. ....	17
1.4. Θεραπεία οστεοαρθρίτιδας.....	21
1.4.1. Χειρουργική και φαρμακευτική θεραπεία οστεοαρθρίτιδας.....	21
1.4.2. Κυτταρική θεραπεία στην ΟΑ.....	22
1.4.2.1. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) για την θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας.....	23
1.4.2.2. Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). ....	25
1.4.2.3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iMSCs) στην θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας.....	26
1.4.2.4. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ πρωτογενών μεσεγχυματικών βλαστικών κύτταρων (MSCs) και μεσεγχυματικών βλαστικών κύτταρων προερχόμενων από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iMSCs). ....	27
1.5. Μη- κωδικά μόρια RNA στην επαγόμενη χονδρογένεση. ....	29
1.5.1. Ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου.....	29
1.5.2. Παρακρινής δράση των μη- κωδικών μορίων RNA.....	31

1.5.3. Ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην «ανανέωση» (rejuvenation) των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs).	32
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b>	33
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	34
3.1. Είδη κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν.	34
3.1.1. Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια των iPSCs.	34
3.1.2. Δημιουργία εμβρυονικών σωματιδίων.	35
3.1.3. Μεταφορά εμβρυονικών σωματίων σε ζελατίνη.	37
3.2. Βιοπληροφορική αναζήτηση microRNA, mRNA στόχων και lncRNA.	38
3.3. Διερεύνηση έκφρασης μη κωδικών μορίων RNA	42
3.3.1. Απομόνωση RNA	42
3.3.2. Έλεγχος ποιότητας απομονωμένου RNA.	43
3.3.3. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).	45
3.3.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR).	48
3.3.5. Στατιστική ανάλυση.	51
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	52
4.1. Καλλιέργεια των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs).	52
4.1.1. Σχηματισμός των εμβρυονικών σωματίων (Embryoid bodies).	54
4.1.2. Μεταφορά εμβρυονικών σωματίων σε ζελατίνη και ανάπτυξη των επαγόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων.	54
4.2. Δίκτυο αλληλεπίδρασης μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA) και γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs.	56
4.2.1. Δίκτυο αλληλεπίδρασης του hsa-miR-128-3p με τα γονίδια στόχους του.	58
4.2.2. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε OA-MSCs και iMSCs.	59
4.2.3. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε iMSCs προερχόμενα από υγιή άτομα και iMSCs προερχόμενα από άτομα με OA.	60

4.3. Κατασκευή δικτύου αλληλεπίδρασης μακρών μη κωδικών μορίων RNA (lncRNA) με διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs και μικρών μη κωδικών μορίων (miRNA). .....	61
4.4. Κατασκευή ολικού ανταγωνιστικού δικτύου αλληλεπίδρασης μακρών μη κωδικών μορίων RNA (lncRNA), μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNA) και γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs. ....	63
4.5. Μελέτη του «άξονα» αλληλεπίδρασης lncRNA/has-miR-128-3p/γονίδια στόχοι.	65
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>66</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>71</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε 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.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την επιλογή του κατάλληλου θέματος για εμένα. Μου έδωσε την ευκαιρία με αυτόν τον τρόπο να αποκτήσω γνώσεις πάνω σε ένα σύγχρονο αντικείμενο μελέτης της γενετικής. Μέσα σε αυτό απέκτησα απαραίτητα εφόδια, για τη μελλοντική μου ερευνητική πορεία. Επιπλέον, την ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγηση αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Τζέτη Μαρία και την κα. Παπαθανασίου Ιωάννα για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήταν μεγάλη παράληψη μου να μην ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Κοντελέ Βασίλη για την άριστη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε με τις γνώσεις του κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας και της παραμονής στο εργαστήριο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου την Εύη Μουρμούρα (Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια), την Αλίκη Παπαγεωργίου (Υποψήφια Διδάκτορας), την Μαρίνα Βαϊοπούλου, την Γωγώ Σκουμπουρδή καθώς και τη συμφοιτήτρια και συνεργάτη Εύα Βακαλούλη για το γεγονός ότι ήταν πάντα πρόθυμες να βοηθήσουν και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε πάντα στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου αυτή την περίοδο και παρ' όλες τις δυσκολίες, μου παρείχαν δύναμη για να συνεχίσω.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων με πολυπαραγοντικό χαρακτήρα. Μεταξύ άλλων, στην εκδήλωση της παίζουν ρόλο και επιγενετικοί παράγοντες και κυρίως τα μη- κωδικά μόρια RNA. Ωστόσο, τα μόρια αυτά έχει αποδειχτεί πως συμβάλλουν και στην αναγέννηση του εκφυλισμένου αρθρικού χόνδρου ενισχύοντας και καταστέλλοντας σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα τελευταία χρόνια έχουν ξεκινήσει προσπάθειες κυτταρικής θεραπείας για αναστροφή του φαινοτύπου της νόσου. Από όλους τους κυτταρικούς τύπους που θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για θεραπεία, τον πιο υποσχόμενο αποτελούν τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs). Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η περιγραφή της πολυεπίπεδης σχέσης και του ρόλου των μη-κωδικών μορίων RNA στα iMSCs. Για τον σκοπό αυτό καταρχάς επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs) διαφοροποιήθηκαν σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs). Ακολούθησε *in silico* μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων μακρών μη-κωδικών RNAs (lncRNAs) και μικρών μη-κωδικών (miRNAs) και μεταξύ miRNAs και των γονιδίων στόχων τους (mRNA) σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) και σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs) τα οποία προήλθαν από δείγματα μυελού των οστών ατόμων με OA και υγιών ατόμων,. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η έκφραση επιλεγμένων lncRNA (όπως το SNHG14) και miRNA (όπως το hsa-miR-128-3p), τα οποία βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των μεσεγχυματικών κυττάρων στην άρθρωση και σχεδιάστηκε το ανταγωνιστικό δίκτυο αλληλεπίδρασης (lncRNA-miRNA-mRNA) στα iMSCs. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των SNHG14 και hsa-miR-128-3p στα iMSCs ομοιάζει με αυτή των υγιών μεσεγχυματικών κυττάρων. Συμπερασματικά, τα μη-κωδικά μόρια RNA σχηματίζουν πολύπλοκα δίκτυα αλληλεπίδρασης μέσω των οποίων συμβάλλουν τόσο στη διαμόρφωση μιας υγιούς άρθρωσης όσο και στην παθολογία νοσημάτων της. Από την μελέτη του προτύπου έκφρασης των δύο παραπάνω μη-κωδικών μορίων φάνηκε πως, στα iMSCs, η έκφραση των μορίων αυτών ομοιάζει με αυτή των υγιών μεσεγχυματικών κυττάρων προτείνοντας τα iMSCs για τη κυτταρική θεραπεία της OA.

**Λέξεις κλειδιά:** οστεοαρθρίτιδα, επαγόμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, ανταγωνιστικά δίκτυα, μη- κωδικά μόρια RNA

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis is a degenerative joint disease with a multifactorial nature. Epigenetics and mainly non-coding RNA molecules plays a role in its manifestation, among other factors. However, these molecules also contribute to the regeneration of the degraded articular cartilage by enhancing and suppressing signaling pathways. In recent years, different types of cell therapies have been initiated in order to reverse the disease phenotype. Of all cell types that could potentially be used for OA cell therapy, the most promising seem to be the mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells (iMSCs).

The purpose of the present Master thesis is to describe the multi-level relationship and role of non-coding RNAs in iMSCs. For this purpose, at first, induced pluripotent stem cells (iPSCs) were differentiated into mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells (iMSCs). Next, an *in silico* study of the interactions between lncRNAs-miRNAs and miRNAs-mRNAs was performed in MSCs and iMSCs derived from bone marrow samples of OA and healthy individuals. Finally, the expression of selected lncRNAs (as SNHG14) and miRNAs (as hsa-miR-128-3p) that were found to be involved in crucial functions of mesenchymal cells in the joint was evaluated and the competitive interaction network (lncRNA-miRNA-mRNA) in iMSCs was constructed. It was shown that the expression pattern of SNHG14 and hsa-miR-128-3p in iMSCs resembled that of healthy mesenchymal cells..

In conclusion, non-coding RNAs form complex interaction networks through which they contribute not only to the formation of a healthy joint but also to joint disease pathology. The study of the expression of the two non-coding molecules, indicated that, the expression of these molecules in iMSCs, seems to resemble that of healthy mesenchymal cells, suggesting that iMSCs may be an ideal candidate cell type for OA cell therapy.

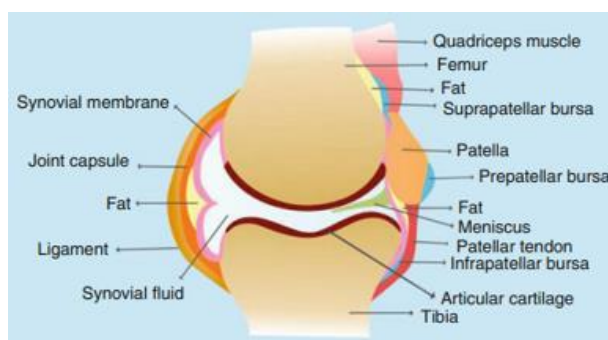
**Key words:** Osteoarthritis, induced mesenchymal stem cells, competitive networks, non- coding RNAs



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Φυσιολογική δομή άρθρωσης γονάτου – ο αρθρικός χόνδρος.

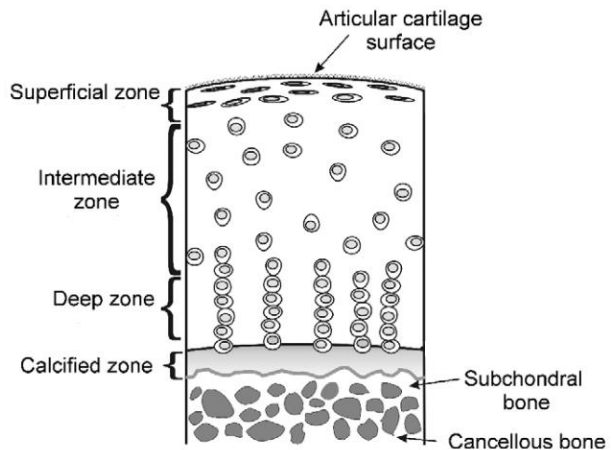
Οι αρθρώσεις του ανθρώπου διαφέρουν δομικά ανάλογα με την ανατομική τους θέση και λειτουργία. Η άρθρωση του γονάτου αποτελεί μια αρκετά περίπλοκη δομή (Ibraheem et al., 2021). Στο εξωτερικό τμήμα εντοπίζεται συνδετικός ιστός, ο οποίος διατηρεί σταθερά τα οστά του γονάτου (κνήμη, περόνη, επιγονατίδα, μηριαίο οστό). Αμέσως μετά βρίσκεται η αρθρική κάψουλα (joint capsule). Στο εσωτερικό της, εντοπίζονται ο αρθρικός υμένας (synovial membrane), ο οποίος εκκρίνει το αρθρικό υγρό (synovial fluid), ο αρθρικός χόνδρος (articular cartilage), ο μηνίσκος (meniscus), οι θύλακες αρθρικού υγρού (bursa) και οι εναποθέσεις λιπώδους ιστού (fat pads) όπως το υποεπιγονατιδικό λιπώδες σώμα (infrapatellar fat pad) (Sawhney & Aggarwal, 2016).



**Εικόνα 1.** Η δομή της άρθρωσης του γονάτου (Sawhney & Aggarwal, 2016).

Ο αρθρικός χόνδρος, είναι μία από τις σημαντικότερες δομές της άρθρωσης, καθώς αποτελεί τον ιστό που καλύπτει τα οστά της, προσφέροντας υποστήριξη και ομοιόμορφη κατανομή της μηχανικής πίεσης. Με αυτόν τον τρόπο, τα οστά προστατεύονται από θραύσεις λόγω τριβής (Wilusz et al., 2014). Αποτελείται αποκλειστικά από έναν μοναδικό κυτταρικό τύπο, τα χονδροκύτταρα (chondrocytes), τα οποία είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου. Πρόκειται, επομένως, για έναν ιστό, ο οποίος δεν φέρει νεύρα, αγγεία και λέμφο γεγονός που δικαιολογεί την περιορισμένη ικανότητα επιδιόρθωσής του σε περίπτωση φθοράς. Γύρω από τα χονδροκύτταρα εντοπίζεται πυκνή εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix-ECM), η οποία προσδίδει στον χόνδρο την χαρακτηριστική μηχανική αντοχή. Η ECM αποτελείται στο μεγαλύτερο μέρος της από νερό (70%) και άλλα συστατικά όπως υαλουρονικό οξύ και διάφορα άλλα οργανικά στοιχεία όπως αγκρεκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο διαφόρων τύπων (II, III, VI, IX, XI), (Primorac, 2020; Wilusz et al., 2014).

Ο αρθρικός χόνδρος χωρίζεται σε τέσσερις ζώνες ανάλογα με την μορφή των χονδροκυττάρων και την οργάνωση του κολλαγόνου: την επιφανειακή ζώνη (Superficial zone), τη μεσαία ζώνη (middle zone), την εν τω βάθει ζώνη (deep zone) και τη ζώνη ασβεστοποίησης (calcified zone). Στην επιφανειακή ζώνη, τα χονδροκύτταρα έχουν πεπλατυσμένο σχήμα, ενώ διατάσσονται οριζόντια ως προς την επιφάνεια του χόνδρου, όπως



**Εικόνα 2:** Οι τέσσερις ζώνες οργάνωσης του αρθρικού χόνδρου (Simon & Jackson, 2018).

και οι ίνες κολλαγόνου, οι οποίες είναι κυρίως τύπου 1. Στην μεσαία ζώνη, τα χονδροκύτταρα έχουν στρογγυλεμένο σχήμα, αλλά εμφανίζονται άτακτα τοποθετημένα. Η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο είναι χαμηλότερη, ενώ οι ίνες εντοπίζονται σε διάγωνα διάταξη και είναι κυρίως τύπου 2. Στην εν τω βάθει ζώνη, τα στρογγυλεμένα χονδροκύτταρα, όπως και οι ίνες κολλαγόνου είναι κάθετα τοποθετημένες, ωστόσο η περιεκτικότητά τους είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τις δύο προηγούμενες. Τέλος στην υπερτροφική ζώνη συναντώνται μόνο υπερτροφικά χονδροκύτταρα (λιγότερα σε ποσοστό από τις άλλες ζώνες) και κολλαγόνο τύπου X (Camarero-Espinosa et al., 2016; Primorac, 2020). Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες, αυτή εμφανίζεται μειωμένη στην επιφανειακή ζώνη, ενώ αυξάνεται στις βαθύτερες ζώνες του αρθρικού χόνδρου έως και 50%. (Carballo et al., 2017).

## 1.2. Οστεοαρθρίτιδα (OA).

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας καθώς και την κυριότερη αιτία αναπηρίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρόκειται για μία χρόνια, εκφυλιστική, μυοσκελετική διαταραχή, με πολυπαραγοντικό χαρακτήρα, η οποία επηρεάζει πάνω από 240 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, η πλειονότητα των οποίων βρίσκονται σε μεγάλη ηλικία, καθώς οι αλλαγές που συμβαίνουν τότε στους ιστούς της άρθρωσης συμβάλουν στην εμφάνισή της. (Boer et al., 2021; Chow & Chin, 2020). Η ταξινόμηση της γίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες την πρωτοπαθή-μη τραυματική OA και την δευτεροπαθή –τραυματική OA (Mobasheri et al., 2021; Mora et al., 2018).

Επιπλέον, χαρακτηρίζεται ως φλεγμονώδης νόσος, η οποία για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι αφορά μόνο τον αρθρικό χόνδρο. Στην πραγματικότητα ωστόσο, πρόκειται για ένα νόσημα ολόκληρης της άρθρωσης, το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλές ανατομικές μεταβολές των ιστών της. Κυριότερες παθολογικές εκδηλώσεις αποτελούν η δημιουργία οστεόφυτων, ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, η αναδιαμόρφωση των υποχόνδριων οστών, η ατροφία των μυών, η υπερτροφία του αρθρικού υμένα και η μη φυσιολογική λειτουργία των συνδέσμων. Η ΟΑ προσβάλλει τόσο αρθρώσεις που φέρουν το βάρος του σώματος (ισχίο, σπονδυλική στήλη και γόνατο), όσο και αυτές που δεν φέρουν το βάρος του σώματος (χέρι, δάχτυλα και αντίχειρας), (Boer et al., 2021; Chow & Chin, 2020). Σε έναν ασθενή μπορεί να εμφανιστεί ταυτόχρονα οστεοαρθρίτιδα σε πολλαπλές αρθρώσεις αν και το πιο σύνηθες είναι η προσβολή ενός μόνο τύπου άρθρωσης (Meliconi & Pulsatelli, 2019). Τα τυπικά κλινικά συμπτώματα της ΟΑ περιλαμβάνουν πόνο στις αρθρώσεις, δυσκαμψία και μειωμένη κινητικότητα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποιότητα ζωής των ασθενών οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγικότητα αλλά και ψυχολογικά και κοινωνικά προβλήματα τόσο για το ίδιο το άτομο όσο και την κοινωνία, όπου αυτό ζει (Allen et al., 2022). Λόγω των σοβαρών αυτών επιπτώσεων, κρίνεται, αναγκαία η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της νόσου από την επιστημονική κοινότητα με άμεσο στόχο την έγκαιρη διάγνωση και την εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων (Mobasheri et al., 2021).

### **1.2.1. Επιδημιολογία της νόσου.**

Η οστεοαρθρίτιδα, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί τον τύπο αρθρίτιδας με τον μεγαλύτερο επιπολασμό σε παγκόσμιο επίπεδο. Υπολογίζεται πως πάνω από 240 εκατομμύρια άτομα πάσχουν από την νόσο, ενώ συνολικά το 40% των ανδρών και το 47% των γυναικών υπολογίζεται πως εμφανίζουν συμπτωματική ΟΑ κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Όσον αφορά τον πληθυσμό ηλικίας 60 ετών και άνω, το ποσοστό των ανδρών αγγίζει το 10% ενώ των γυναικών το 18%. Ωστόσο, καταγράφονται και περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας σε μικρότερες ηλικιακές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, έρευνα στην Ισπανία, με ηλικίες άνω των 20 ετών έδειξε πως το 29% παρουσίαζε ΟΑ σε μία ή περισσότερες αρθρώσεις. Όσον αφορά την ΟΑ σε πολλαπλές αρθρώσεις ταυτόχρονα, ο επιπολασμός κυμαίνεται μεταξύ 5% και 25%. Σχετικά με τις συχνότητες εμφάνισης ΟΑ στις επιμέρους αρθρώσεις, αυτές ποικίλουν μεταξύ των πληθυσμών (Allen et al., 2022; Kim et al., 2022). Ωστόσο, συνολικά την μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζει η οστεοαρθρίτιδα του γονάτου με ακόλουθες αυτές των χεριών, του ισχίου και των

άλλων αρθρώσεων. Η ΟΑ αποτελεί, επομένως, ένα μεγάλο πρόβλημα παγκοσμίως, λόγω του οποίου ξοδεύονται ετησίως πάνω από 89 δισεκατομμύρια δολάρια, ποσό που αποτελεί το 1-2.5% του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος των ανεπτυγμένων χωρών (Long et al., 2022; Primorac, 2020).

### **1.2.2. Παθοφυσιολογία της ΟΑ.**

Για την υγεία και την ακεραιότητα του αρθρικού χόνδρου αλλά και ολόκληρης της άρθρωσης, κρίνεται απαραίτητη η διατήρηση της ομοιόστασης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ύπαρξης μιας ισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και των καταβολικών διεργασιών. Ως αναβολικές ορίζονται οι διεργασίες που συμβάλουν στην σύνθεση του αρθρικού χόνδρου, ενώ αντίστοιχα ως καταβολικές εκείνες που προκαλούν την αποικοδόμηση του. Μέσω αυτής της ισορροπίας επιτυγχάνεται και η επιδιόρθωση των μοριακών βλαβών, οι οποίες προκαλούνται καθημερινά λόγω των μηχανικών καταπονήσεων. Σε μία εκφυλιστική νόσο ωστόσο, όπως η οστεοαρθρίτιδα, οι καταβολικές διαδικασίες υπερτερούν των αναβολικών. Αυτή η κατάσταση οδηγεί σταδιακά στην απώλεια του αρθρικού χόνδρου. Αξίζει να σημειωθεί, πως στα πρώτα στάδια της νόσου, παρατηρείται μια μικρή αύξηση των αναβολικών διεργασιών έναντι των καταβολικών, καθώς τα χονδροκύτταρα καταβάλουν προσπάθεια επιδιόρθωσης της βλάβης. Αυτή τους όμως η απάντηση κρίνεται αναποτελεσματική, με αποτέλεσμα την κυριαρχία καταβολικών μορίων (Mueller & Tuan, 2011).

Μία από τις αρχικές αλλαγές που παρατηρούνται στην ΟΑ αποτελεί η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στην επιφανειακή ζώνη του χόνδρου με ταυτόχρονη απώλεια πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών. Λόγω του στρες, πραγματοποιείται ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων, των αλαρμινών, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας ενεργοποιώντας δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα, τα οποία παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF-α), και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Όσον αφορά τον VEGF, ο φλεγμονώδης ρόλος του περιλαμβάνει την καταστολή παραγωγής αγκρεκανών και κολλαγόνου τύπου II. Μεταξύ άλλων, παρατηρείται και παραγωγή διαφόρων ιντερλευκινών όπως IL-6, IL-8, IL-15, IL-17 και IL-18, μέσω της αυξημένης σύνθεσης ελευθέρων ριζών από τα χονδροκύτταρα, της ενισχυμένης σηματοδότησης TLR2 και TLR4 και μονοπατιών όπως τα ERK, NOTCH, WNT, JACK/STAT με σημαντικότερο το NF-κΒ. Το τελευ-

ταίο αποτελεί το κύριο καταβολικό μονοπάτι που ενεργοποιείται στην ΟΑ. Ωστόσο, μέσω του μονοπατιού αυτού, παράγονται και δύο ακόμα σημαντικοί παράγοντες η συνθετάση νιτρικού οξειδίου (iNOS) και ο παράγοντας υποξίας 2 α (HIF2α) ο οποίος δημιουργεί συνθήκες υποξίας στα χονδροκύτταρα με αποτέλεσμα να αλλάζουν οι μεταβολικές τους συνήθειες και να στρέφονται προς αναερόβια γλυκόλυση. Έτσι, μαζί με το νιτρικό οξείδιο (NO) που παράγεται μέσω της συνθετάσης προκαλείται απόπτωση των κυττάρων η οποία οδηγεί στην τελική απώλεια του χόνδρου. (Bar-Or et al., 2015; Mueller & Tuan, 2011; Primorac, 2020). Άμεση δράση των προ φλεγμονωδών κυτοκινών αποτελεί η ενεργοποίηση δύο ενζύμων της φωσφολιπάσης A2 (PLA2) καθώς και της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2). Η PLA2 δρα τέμνοντας τις κυτταρικές μεμβράνες με άμεσο αποτέλεσμα την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος, το οποίο μέσω του COX-2 μετατρέπεται στις δύο βασικές προσταγλαδίνες, που εντοπίζονται στο αρθρικό υγρό ενός ατόμου με ΟΑ όπως PGE<sub>2</sub> και PGD<sub>2</sub>. (Bar-Or et al., 2015; Primorac, 2020).

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες οδηγούν τελικά στην αύξηση της δράσης πρωτεασών, αρχικά στην επιφανειακή στιβάδα του χόνδρου. Δύο είναι οι τύποι που ενεργοποιούνται: οι μεταλλοπρωτεάσες εξαρτώμενες από ψευδάργυρο (MMPs) και οι μεταλλοπρωτεάσες με μοτίβα θρομβοσπονδίνης ή αγκρεκανάσες (ADAMTS). Όσον αφορά τις MMPs, οι κυριότερες είναι οι MMP1, MMP3 και MMP13 και έχουν ως ρόλο την διάσπαση του κολλαγόνου. Πιο συγκεκριμένα, η MMP13 διασπά το κολλαγόνο τύπου 2. Η αυξημένη παραγωγή των MMPs οφείλεται και στην υπολειτουργία των αναστολέων τους, TIMPs, στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Οι αγκρεκανάσες που εντοπίζονται στην περιοχή περιλαμβάνουν τις ADAMTS-4 και ADAMTS-5, βασική δράση των οποίων αποτελεί η απομάκρυνση των αγκρεκανών από τα μόρια του υαλουρονικού οξέος της ECM. Έτσι, χάνονται οι ιδιότητες της, για τις οποίες είναι υπεύθυνες οι αγκρεκάνες. Η απώλεια των παραπάνω μορίων εντοπίζεται στα πρώτα στάδια της νόσου μόνο στην επιφανειακή ζώνη του χόνδρου και όσο αυτή εξελίσσεται, επεκτείνεται και στις βαθύτερες στιβάδες. Σε αυτό το αρχικό στάδιο, όπως προαναφέρθηκε, τα χονδροκύτταρα αυξάνουν την αναβολική τους δραστηριότητα σε μια προσπάθεια να παράγουν τα μόρια που χάνονται. Ωστόσο, η δράση τους αυτή δεν μπορεί να επαναφέρει τις απώλειες με αποτέλεσμα τελικά να υπερτερούν οι καταβολικές διεργασίες. Αποτέλεσμα αποτελεί η διάβρωση της επιφανειακής ζώνης με την δημιουργία ρωγμών, οι οποίες όσο εξελίσσεται η νόσος επεκτείνονται στις βαθύτερες ζώνες και την

τελική αποκάλυψη της ζώνης ασβεστοποίησης και του υποχόνδριου οστού. Ταυτόχρονα, παρατηρείται συσσωμάτωση των χονδροκυττάρων, τα οποία γίνονται υπερτροφικά και αύξηση της ζώνης ασβεστοποίησης. (Jang et al., 2021; Mueller & Tuan, 2011; Primorac, 2020).

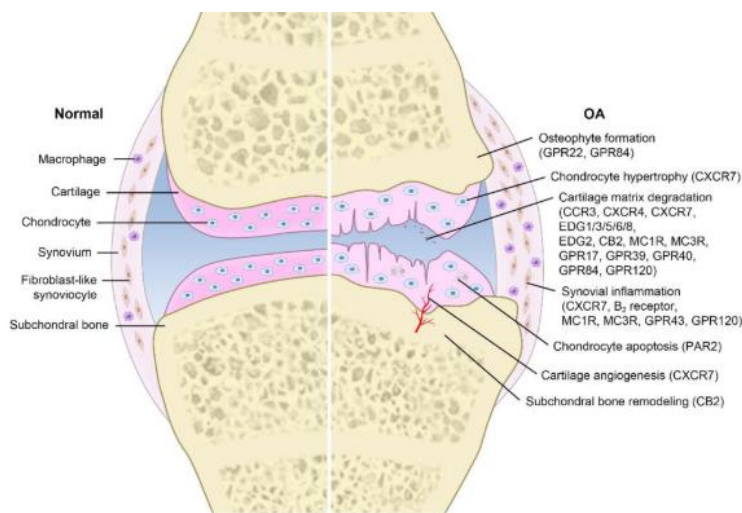
Αλλαγές ωστόσο παρατηρούνται και στις υπόλοιπες δομές της άρθρωσης. Αρχικά, λόγω της αυξημένης φλεγμονής και της υψηλής συγκέντρωσης λεμφοκυττάρων και μακροφάνων, παρατηρείται υπερτροφία του αρθρικού θύλακα. Επιπλέον, στο υποχόνδριο οστό αλλάζει η δραστηριότητα και η ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών με αποτέλεσμα

την αύξηση της μάζας και της πυκνότητάς τους. Ένα ακόμα φαινόμενο που παρατηρείται είναι η δημιουργία οστεοφύτων μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης λόγω της νέκρωσης του οστού. Η αγγειογένεση στην περιοχή είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό. Σημαντικές αλλαγές όμως σημειώνονται και στις εναποθέσεις λιπώδους ιστού, στις οποίες αυξάνεται ο αριθμός των αιμοφόρων αγγείων και η παραγωγή αντιποικινών με κυριότερες τη λεπτίνη και την αντιπονεκτίνη. Τέλος φλεγμονή παρατηρείται και στους μύες, οι οποίοι τελικά ατροφούν (Jang et al., 2021; Primorac, 2020).

Η οστεοαρθρίτιδα, επομένως αποτελεί μια κατάσταση διαρκούς φλεγμονής η οποία έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές τόσο στα συστατικά της ECM όσο και στην συμπεριφορά των χονδροκυττάρων, καταστάσεις που τελικά οδηγούν όχι μόνο στον εκφυλισμό του χόνδρου αλλά και στην καταστροφή ολόκληρης της άρθρωσης.

### 1.2.3. Παράγοντες κινδύνου και κλινικοί φαινότυποι οστεοαρθρίτιδας.

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Αυτό σημαίνει πως εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, στην παθογένεση της νόσου εμπλέκονται και μηχανικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Με βάση την βιβλιογραφία, οι παράγοντες



**Εικόνα 3:** Οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στον αρθρικό χόνδρο ενός ασθενούς με OA (δεξιά), συγκριτικά με ένα υγιές άτομο (αριστερά), (Wen et al., 2021).

κινδύνου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τους μη-τροποποιήσιμους, στους οποίους ανήκουν η γενετική, η εθνικότητα, η ηλικία και το φύλο και τους τροποποιήσιμους, στους οποίους περιλαμβάνονται η παχυσαρκία, οι τραυματισμοί και ο τρόπος ζωής. (Johnson & Hunter, 2014).

#### Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Η ΟΑ είναι μια νόσος με ισχυρή γενετική συνιστώσα. Το 35-65% του κινδύνου εμφάνισης της νόσου καθορίζεται από τους γενετικούς παράγοντες. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 223 γενετικοί τόποι, παραλλαγές των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση του νοσήματος. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με την ανάπτυξη, την επιδιόρθωση του χόνδρου και την σκελετογένεση με πιο σημαντικό το *GDF5* το οποίο ανήκει στην οικογένεια των BMP πρωτεϊνών (Bone Morphogenic Factor), μεταλλάξεις του οποίου σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για ΟΑ. Τα γονίδια κολλαγόνου *COL2A1*, *COL9A1* και *COL11A1* και άλλων συστατικών της ECM όπως της φιβριλίνης (*FBN2*) έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα σε ασθενείς. Ακόμα, σημειακοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί σε γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στον χόνδρο όπως το WNT (*SFRP3*, *WNT1*, *WNT10B*) και το TGF-β/SMAD (*SMAD3*). Τα τελευταία χρόνια μέσω GWAS (genome wide association studies) αναλύσεων έχουν ταυτοποιηθεί επιπλέον γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας, οι οποίοι σχετίζονται με την μυϊκή λειτουργία, την λιπογένεση (με κυριότερο εκπρόσωπο το *FTO*), την ανοσιακή απάντηση, την φλεγμονή, την ανάπτυξη και την λειτουργία των νευρώνων και των μυών. (Aubourg et al., 2021; Boer et al., 2021; D. Chen et al., 2017).

Η εθνικότητα του ατόμου, αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα κινδύνου. Δεδομένα από έρευνες έχουν αποδείξει πως στους Αφρο-Αμερικανικούς πληθυσμούς η επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τους Καυκάσιους, στους οποίους η ΟΑ εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τους Ασιάτες (O'Neill et al., 2018).

Έναν ακόμα μη τροποποιήσιμο παράγοντα αποτελεί η ηλικία, με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζονται άνω των 55 ετών. Τα γηρασμένα χονδροκύτταρα εμφανίζουν τα κλασικά ορόσημα της γήρανσης, τα οποία συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η παύση του πολλαπλασιασμού, η μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων προκαλεί οξειδω-

τικό στρες στα κύτταρα και παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS), καταστάσεις που επάγουν φλεγμονή και καταστροφή των ιστών της άρθρωσης (Bortoluzzi et al., 2018; D. Chen et al., 2017).

Τελευταίο μη-τροποποιήσιμο παράγοντα αποτελεί το φύλο. Ο αριθμός των περιστατικών με ΟΑ σε θηλυκά άτομα μετά την εμμηνόπαυση είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο σε αρσενικά άτομα ίδιας ηλικίας. Η εμπλοκή του φύλου στην παθολόγηση γίνεται μέσω των οιστρογόνων. Η ύπαρξη τους σε νεαρές γυναίκες, δρα προστατευτικά έναντι του εκφυλισμού στην άρθρωση, ενώ η απώλεια τους επιφέρει ενίσχυση των προαναφερθέντων μηχανισμών καταστροφής συμβάλλοντας στην εκδήλωση της νόσου (Bortoluzzi et al., 2018).

#### Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Η παχυσαρκία και ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (BMI) συνδέονται με έναρξη της ΟΑ σε μικρότερη ηλικία και πιο σοβαρό φαινότυπο, λόγω των μηχανικών πιέσεων που υφίστανται οι αρθρώσεις, και κυρίως αυτή του γονάτου. Τα αυξημένα ποσοστά λιπώδους ιστού είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση φλεγμονής μέσω έκκρισης αντιποκινών που αυξάνουν τις καταβολικές διεργασίες στον χόνδρο (D. Chen et al., 2017).

Η μετα-τραυματική ΟΑ, εμφανίζεται στα άτομα μικρότερης ηλικίας και προκαλείται μετά από κάποιο τραυματισμό ή χειρουργείο. Υπολογίζεται πως το 12% της συμπτωματικής ΟΑ στις Η.Π.Α. προέρχεται από κάποιο τραυματισμό, ο οποίος προκαλεί βλάβες στην άρθρωση όπως φθορά του χόνδρου με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της και την χρόνια φλεγμονή. Αυτή τελικά συντελεί στην εκδήλωση του οστεοαρθρικού φαινοτύπου (D. Chen et al., 2017).

Έντονες μηχανικές πιέσεις λόγω εργασιακού φόρτου ή έντονης ενασχόλησης με τον αθλητισμό ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου κυρίως στο γόνατο και το ισχίο. Επιπλέον, η μη σωστή διατροφή με έλλειψη σημαντικών βιταμινών όπως η βιταμίνη D, προκαλεί αυξημένη παραγωγή MMPs συμβάλλοντας στην καταστροφή του ιστού (Bortoluzzi et al., 2018; O'Neill et al., 2018).

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια ετερογενή νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από διαφορετικούς φαινότυπους για την εκδήλωση καθενός από τους οποίους εμπλέκονται διαφορετικοί παράγοντες. Οι βασικότεροι φαινότυποι της ΟΑ σύμφωνα με την βιβλιο-



γραφία είναι: α) ο ηλικιο-συσχετιζόμενος, β) ο σχετιζόμενος με τον χόνδρο, γ) ο σχετιζόμενος με τον τραυματισμό, δ) ο σχετιζόμενος με την φλεγμονή ε) ο σχετιζόμενος με το υποχόνδριο οστό και στ) μεταβολικός φαινότυπος (Dell’Isola et al., 2016; Mobasher et al., 2017).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μεταβολικός φαινότυπος, καθώς έχει συσχετιστεί με το μεταβολικό σύνδρομο (MetS). Η μεταβολική OA, εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία (45-65 έτη) σε άτομα που εμφανίζουν ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά του MetS όπως αντίσταση στην ινσουλίνη, παχυσαρκία, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία. Ο μηχανισμός της νόσου περιλαμβάνει μεταβολές στον μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω αυξημένης εισόδου και σύνθεσης χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα. Ταυτόχρονα, ο λιπώδης ιστός συνεισφέρει στον φαινότυπο μέσω παραγωγής αντιποκινών. Άμεσο αποτέλεσμα η επαγωγή φλεγμονής, η οποία σε συνδυασμό με τις μηχανικές πιέσεις λόγω παχυσαρκίας συμβάλουν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου (Chadha, 2016; Shin, 2014).

### **1.3. Επιγενετική της Οστεοαρθρίτιδας.**

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πολλαπλοί γενετικοί τόποι μέσω GWAS αναλύσεων οι οποίοι έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας. Αυτή την εξέλιξη τα τελευταία χρόνια συνοδεύουν μελέτες, οι οποίες αφορούν τον ρόλο της επιγενετικής στην νόσο, δηλαδή των τροποποιήσεων που μεταβάλλουν την έκφραση των γονιδίων χωρίς ωστόσο να αλλάζουν την αλληλουχία των βάσεων. Δύο είναι τα κυρίαρχα σενάρια για την σύνδεση των επιγενετικών τροποποιήσεων με την OA: α) τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια αυξάνουν ή μειώνουν τον κίνδυνο για την νόσο και β) τραυματισμοί του χόνδρου κατά την διάρκεια της ζωής επάγουν επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν στην έναρξη της OA. Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί που μπλέκονται με το νόσημα είναι: η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα μη κωδικά μόρια RNA (Rice et al., 2020).

#### Μεθυλίωση DNA-Τροποποίηση ιστονών

Εξαιρετικά μελετημένος είναι ο τρόπος που επιδρά η μεθυλίωση του DNA στην παθογένεση της νόσου. Έρευνες έχουν αποδείξει πως τα πρότυπα μεθυλίωσης διαφέρουν μεταξύ ασθενών με OA και υγείων ατόμων. Αυξημένη μεθυλίωση σε CpG νη-

σίδες και αντίστοιχα απομεθυλίωση περιοχών μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, τη σύνθεση της ECM, την ομοιόσταση του χόνδρου και το μεταβολισμό. Επιπλέον, η απώλεια μεθυλοτρανσφερασών, όπως της Dnmt3, συμβάλουν στην εκδήλωση του φαινοτύπου. Με όμοιο τρόπο επιδρούν και οι μεταβολές στην τροποποίηση των ιστονών με σημαντικότερες την ακετυλίωση και την απακετυλίωση. Η αυξημένη και αντίστοιχα μειωμένη έκφραση των ακετυλοτρανσφερασών (HATs) και των απακετυλασών (HDACs), έχουν ως αποτέλεσμα την μεταβολή της έκφρασης γενετικών τόπων που διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του χόνδρου, στην παραγωγή προ-φλεγμονώδων μορίων και στην βιογένεση των μιτοχονδρίων (Rice et al., 2020).

### Μη κωδικά μόρια RNA

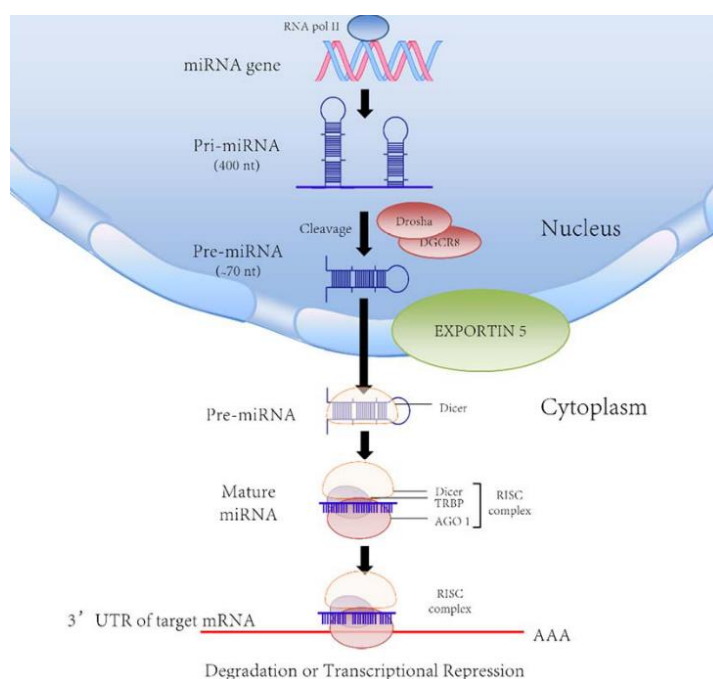
Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί και ο ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας. Διαφορετικά είδη μορίων εμπλέκονται στην παθογένεση με κυριότερα τα μακρά μη κωδικά RNA (long non coding RNA), τα μικρά μη κωδικά RNA και τα κυκλικά μόρια RNA (circular RNA). Μελέτες έχουν αποδείξει πως ορισμένα από αυτά, όπως το miR-140, εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον ιστό της άρθρωσης, χαρακτηρίζονται δηλαδή ως ιστοειδικά. Επιπλέον, η μεταβολή της έκφρασής τους τα καθιστούν πιθανούς βιοδείκτες για την διάγνωση της νόσου και την εξέλιξή της (Ghafouri-Fard et al., 2021).

#### α. Μικρά μη κωδικά μόρια RNA (micro RNA/miR)

Πρόκειται για μόρια RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των κυττάρων ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για αρνητικούς ρυθμιστές καθώς προσδένονται στα mRNA στόχους, με πλήρη ή μερική συμπληρωματικότητα, στις αμετάφραστες περιοχές (κάποια και στην κωδική περιοχή). Αποτέλεσμα αποτελεί ο κατακερματισμός του mRNA στην πρώτη περίπτωση ή η καταστολή της μετάφρασης στην δεύτερη. Νεότερες έρευνες έχουν δείξει πως κάποια microRNA μπορούν να εμφανίζουν αντίθετη δράση, δηλαδή να ενισχύουν την έκφραση ενός γονιδίου αλληλεπιδρώντας όχι άμεσα με το mRNA του γονιδίου αλλά έμμεσα με πρωτεΐνες ρυθμιστές. Ωστόσο, ένα miR μπορεί να στοχεύει πολλά mRNA και αντίστοιχα ένα mRNA μπορεί να αποτελεί στόχο πολλαπλών miR. Με αυτόν τον τρόπο τα microRNAs ρυθμίζουν ταυτό-

χρονα ένα ή περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια (Balaskas et al., 2017; Ratti et al., 2020).

Η βιογένεσή τους είναι αρκετά περίπλοκη και περιλαμβάνει διαδικασίες που πραγματοποιούνται σε δύο περιοχές του κυττάρου τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Αρχικά πραγματοποιείται μεταγραφή από το ένζυμο RNA πολυμεράση II ή III με αποτέλεσμα την παραγωγή του προγονικού microRNA (pri-miRNA), ενός δίκλωνου μορίου RNA μεγάλου σε μέγεθος με βρόγχους και δομή φουρκέτας (hairpin). Έπειτα, μετατρέπεται σε πρόδρομο μόριο (pre-miRNA) μικρότερου μεγέθους μέσω της δράσης ενός συμπλόκου το οποίο αποτελείται από μία RNAαση III (Drosha) και τον DGCR8 παράγοντα (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Στην συνέχεια, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω μια πρωτεΐνης της εξαπορτίνης-5, όπου και επεξεργάζεται από το σύμπλοκο της Dicer, με αποτέλεσμα την μετατροπή του σε ώριμο δίκλωνο microRNA, από το οποίο επιλέγεται ο πιο θερμοδυναμικά σταθερός κλώνος για το τελικό μονόκλωνο μόριο. Τελικό στάδιο αποτελεί η σύνδεση με το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex), για την πλήρη λειτουργικότητά του. (Foo et al., 2021; Yu et al., 2011).



**Εικόνα 4:** Η βιογένεση των microRNA στα κύτταρα. (Pisarello et al., 2015)

Διαφορική έκφραση των miR έχει βρεθεί σε όλους τους ιστούς της οστεοαρθριτικής άρθρωσης. Άλλα από αυτά υπόκεινται σε θετική ρύθμιση (upregulated) καταστέλλο-

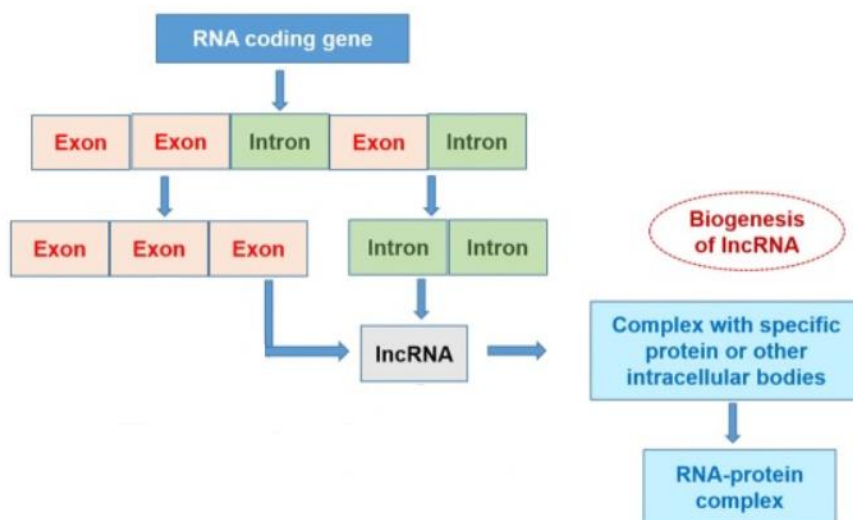
ντας το αντίστοιχο μονοπάτι μέσω των γονιδίων που ρυθμίζουν, ενώ, άλλα υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση (downregulated) ενισχύοντας μονοπάτια, τα οποία στην φυσιολογική άρθρωση ήταν κατεσταλμένα. Με αυτό τον τρόπο τα miR εμπλέκονται άμεσα σε όλα τα στάδια της παθοφυσιολογίας της νόσου και πιο συγκεκριμένα στη φλεγμονή, στην καταστροφή της ECM, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στην αγγειογένεση, στην απόπτωση των χονδροκυττάρων και γενικά στη διαταραχή της ομοιόστασης του χόνδρου (Ann L Coker & Nalawansha, Dhanusha A. Pflum, 2017; Pioroulos et al., 2008).

### β. Μακρά μη κωδικά μόρια RNA (long non coding RNA/lnc RNA)

Τα μακρά μη κωδικά RNA είναι μόρια μεγάλου μεγέθους περίπου 200 bp. Ο ρόλος τους είναι κρίσιμος για την έκφραση γονιδίων και εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυική ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετα-μεταγραφική τροποποίηση και μετάφραση γονιδίων, η διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και η απόπτωση (Jiang et al., 2017). Τα long non-coding RNAs επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, συνδεόμενα άμεσα με πρωτεΐνες διαμόρφωσης της χρωματίνης, συμμετέχουν στην τροποποίηση της δομής της επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων της περιοχής. Επιπλέον, συνδέονται με συμπληρωματικές περιοχές των mRNA, μεταβάλλοντας την σταθερότητα και το μάτισμα τους. Μια ακόμα δράση τους αποτελεί η αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες ρυθμιστές, επιδρώντας είτε αρνητικά είτε θετικά στην μεταγραφή και τη μετάφραση των γονιδίων (Ratti et al., 2020). Ωστόσο, τα long non-coding RNA λειτουργούν κυρίως ως «παγίδες» (sponges) άλλων ρυθμιστικών μορίων, των microRNAs, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο ανταγωνιστικά δίκτυα. Η πρόσδεση τους λόγω συμπληρωματικότητας στα microRNA οδηγεί συνήθως σε καταστολή της δράσης τους. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν έμμεσα την έκφραση γονιδίων, συνήθως θετικά, καταστέλλοντας το μόριο καταστολέα του mRNA τους. Αξίζει να σημειωθεί πως ένα lncRNA μπορεί να απενεργοποιεί πολλά και διαφορετικά miR (Ghafouri-Fard et al., 2021).

Η βιογένεση τους παρομοιάζει αυτή των μορίων mRNA. Μπορούν να προέρχονται από περιοχές εντός ιντρονίων και εξωνίων και μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, ενώ υφίστανται τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των mRNAs. Πιο συγκεκριμένα, πολυαδενιλιώνονται στο 3' άκρο ενώ προστίθεται και καλύπτρα μεθυλο-

γουανίνης στο 5' άκρο τους. Κάποιες φορές είναι δυνατόν να υποστούν εναλλακτικό μάτισμα, κάτι που κρίνεται απαραίτητο για την δράση τους (Abbasifard et al., 2020; Dhanoa et al., 2018).



**Εικόνα 5:** Βιογένεση των long non coding RNA (Dhanoa et al., 2018)

Τα long non-coding RNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινοτύπου της νόσου. Όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα μη-κωδικά ρυθμιστικά μόρια, κάποια μακρά μη κωδικά RNA υπερεκκράζονται ενώ άλλα υποεκκράζονται, ενεργοποιώντας και απενεργοποιώντας μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΟΑ όπως αυτά της παραγωγής MMPs, της αποδόμησης της ECM και της φλεγμονής (Abbasifard et al., 2020).

#### **1.4. Θεραπεία οστεοαρθρίτιδας.**

Παρόλο που η ΟΑ αποτελεί ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα με σημαντικές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, οι μέχρι τώρα θεραπείες να βασίζονται στην μείωση του πόνου και την χειρουργική αντικατάσταση του χόνδρου ή της άρθρωσης. (Parathanasiou et al., 2021).

##### **1.4.1. Χειρουργική και φαρμακευτική θεραπεία οστεοαρθρίτιδας.**

Μία από τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση των συμπτωμάτων αποτελούν οι μη φαρμακευτικές πρακτικές, οι οποίες περιλαμβάνουν τη φυσική άσκηση των ασθενών και τη μείωση του Δείκτη Μάζας Σώματος σε περίπτωση πα-

χυσαρκίας. Όσον αφορά τα φαρμακευτικά σκευάσματα, συνήθως χορηγούνται αντιφλεγμονώδη όπως αναστολείς κυκλο-οξυγενάσης και αναλγητικά. Επιπλέον, πραγματοποιείται και ενδοαρθρική χορήγηση κορτικοστεροειδών και υαλουρονικού οξέος. Τα τελευταία χρόνια βρίσκονται υπό ανάπτυξη νέα φαρμακα αναστολείς, τα οποία στοχεύουν μονοπάτια φλεγμονής και μεταβολικές διεργασίες που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Την τελική επιλογή του ασθενούς, σε περίπτωση που οι προαναφερθείσες επιλογές κριθούν αναποτελεσματικές, αποτελεί η χειρουργική επέμβαση η οποία περιλαμβάνει αρθροπλαστική με σκοπό την αντικατάσταση ολόκληρης της άρθρωσης ή τμηματός της (X. Cai et al., 2021; Jang et al., 2021; Mora et al., 2018).

#### **1.4.2. Κυτταρική θεραπεία στην ΟΑ.**

Το γεγονός ότι οι προαναφερθείσες θεραπευτικές μέθοδοι στοχεύουν μόνο στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης μιας πιο αξιόπιστης προσέγγισης η οποία να στοχεύει στη βάση του προβλήματος, τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου. Μία τέτοια λύση αποτελεί η κυτταρική θεραπεία, δηλαδή η έγχυση ανθρώπινων κυττάρων στην περιοχή της άρθρωσης με σκοπό την αποκατάσταση της βλάβης. Μία από τις πρώτες θεραπείες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αυτόλογη εμφύτευση φυσιολογικών χονδροκυττάρων. Τα χονδροκύτταρα απομονώνονται από το άθικτο τμήμα της άρθρωσης, πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια και εμφυτεύονται στο σημείο της βλάβης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι παροδικά καθώς χάνεται σταδιακά η χονδρογεννητική τους ικανότητα. Λύση σε αυτό το πρόβλημα αποτελεί η χρήση βλαστοκυττάρων, αδιαφοροποίητων δηλαδή κύτταρων τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Βασικό τους πλεονέκτημα η ισχυρή αναγεννητική τους ικανότητα. Τρεις είναι οι βασικοί τύποι μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που χρησιμοποιούνται, με διαφορετικές μεθόδους ο καθένας, σε κυτταρικές θεραπείες: τα μεσεγχυματικά ενήλικα βλαστοκύτταρα (MSCs), τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από iPSCs (iMSCs), (Jang et al., 2021; Loo & Wong, 2021; Ng et al., 2020).

#### **1.4.2.1. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) για την θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας.**

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) αποτελούν ένα ελκυστικό εργαλείο για την θεραπεία της ΟΑ. Πρόκειται για εξειδικευμένα προγονικά κύτταρα, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης. Χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα (multipotent) καθώς μπορούν να αναγεννώνται τους ιστούς στους οποίους εντοπίζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου. Η ικανότητά τους αυτή, να αντικαθιστούν τα γερασμένα και κατεστραμμένα κύτταρα των ιστών, τα καθιστά ένα ελκυστικό εργαλείο για θεραπεία διαφόρων νόσων όπως η οστεοαρθρίτιδα (Primoas, 2020). Τα MSCs εντοπίζονται και μπορούν να απομονωθούν εύκολα από διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού όπως ο ομφάλιος λώρος, ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, ο αρθρικός υμένας (synovium) και το περιφερικό αίμα. Μετά την απομόνωσή τους υπάρχει δυνατότητα καλλιέργειας στο εργαστήριο και διαφοροποίησής τους σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους μέσω της χρήσης κατάλληλων αυξητικών παραγόντων. Οι κυριότεροι κυτταρικοί τύποι στους οποίους διαφοροποιούνται τα MSCs είναι τρεις: χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Ωστόσο, μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως καρδιομυοκύτταρα και αστροκύτταρα. (Kwon et al., 2022; Loo & Wong, 2021).

Μορφολογικά τα MSCs εμφανίζονται ως επίπεδα, επιμήκη και πεπλατυσμένα κύτταρα τα οποία προσομοιάζουν το σχήμα των ινοβλαστών. Τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διακρίνονται από άλλους κυτταρικούς τύπους με βάση κριτήρια, τα οποία έχουν θεσπιστεί από την Διεθνή Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα πρέπει να προσκολλώνται στην επιφάνεια των φλασκών σε συμβατικές συνθήκες καλλιέργειας και να διαφοροποιούνται στους τρεις βασικούς κυτταρικούς τύπους κάτω από συνθήκες διαφοροποίησης. Απαραίτητο χαρακτηριστικό αποτελεί η έκφραση ειδικών αντιγόνων επιφανείας όπως CD105, CD73 και CD90 και η ταυτόχρονη έλλειψη δεικτών όπως CD45, CD34, CD14 ή CD11b, CD79a ή CD19 και MHC τάξης II μόρια, τα οποία εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα λιποκύτταρα (Harrell et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί πως από τους διαφορετικούς υποτύπους των MSCs που συναντώνται, αυτοί που δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου εκφράζουν εκτός

από τους παραπάνω δείκτες και τους CD49f, CD146, CD105, CD271, και Stro-1 (Kwon et al., 2022).

Μέχρι και σήμερα η ικανότητα των MSCs για διαφοροποίηση στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους έχει παρατηρηθεί μόνο εργαστηριακά. Όταν γίνεται έγχυση στην άρθρωση πειραματόζωων δρουν με παρακρινή τρόπο, εκκρίνοντας ανοσορυθμιστικούς και αυξητικούς παράγοντες. Αυτοί στοχεύουν στην ενεργοποίηση των ενδογενών προγονικών κυττάρων του ιστού για αποκατάσταση του χόνδρου. Η δράση των MSCs στον ιστό έγκειται σε τρεις βασικούς άξονες. Αρχικά, μέσω της ανοσορυθμιστικής τους ικανότητας και της παραγωγής κυτοκινών και χημειοκινών, μεταβάλλουν τον φαινότυπο των μακροφάγων προς τον αντιφλεγμονώδη φαινότυπο μέσω της καταστολής των μονοπατιών TLR/NF-κB. Επιπλέον, απενεργοποιούν τα NK κύτταρα και τα T και B λεμφοκύτταρα, μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων. Η καταστολή της έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών και η αύξηση της σύνθεσης των συστατικών της ECM, αποτελούν δύο ακόμα δράσεις τους. Επιπλέον, μέσω της παραγωγής αντι-αποπτωτικών, αγγειογενετικών και μιτογόνων παραγόντων ενεργοποιούν τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του χόνδρου. Ακόμα, ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση των γύρω κυττάρων μέσω της παραγωγής μη κωδικών μορίων RNA. Τέλος, συμβάλλουν στην μείωση του σχηματισμού οστεόφυτων και κυστών οδηγώντας στην ανακούφιση του πόνου. (Harrell et al., 2019; Primorac, 2020).

Παρόλο που τα MSCs δεν χαρακτηρίζονται ούτε από ηθικά διλήματα γύρω από την απομόνωση τους ούτε από ανοσοαπάντηση του ασθενούς μετά την έγχυση στον ιστό, τα αποτελέσματα της χρήσης τους είναι διφορούμενα και περιορίζονται ως τώρα μόνο σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εμφανίζονται πολλά εμπόδια κατά τη χρήση τους για θεραπεία. Αρχικά, ένα πολύ μικρό ποσοστό των χορηγούμενων MSCs καταφέρνει να επιβιώσει, καθιστώντας την κυτταρική θεραπεία εξαιρετικά δύσκολη (Bar-Or et al., 2015). Επιπλέον, η ικανότητα διαφοροποίησης τους επηρεάζεται από την ηλικία του ασθενούς, καθώς όσο αυτή αυξάνεται τόσο μειώνεται το δυναμικό διαφοροποίησής τους. Ακόμα, διάφορες καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, που συχνά συνοδεύει την OA, οδηγεί σε διαφοροποίηση των MSCs σε λιπώδη κύτταρα, εντείνοντας ταυτόχρονα την φλεγμονή. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs χαρακτηρίζονται και από αστάθεια φαινοτύπου καθώς ορισμένες φορές μαζί με τα συστατικά της ECM αυξάνεται και η παραγωγή κολλαγόνου τύπου X και αλκαλικών φωσφατασών οι οποίες οδηγούν σε ασβεστοποίηση και έκτοπη οστεοποίηση



στον χόνδρο. Μία ακόμα πρόκληση αποτελεί η «γήρανση» των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, δηλαδή η μείωση της ικανότητας τους να πολλαπλασιάζονται μετά από πολλές διαιρέσεις στην αρχική καλλιέργεια. (Loo & Wong, 2021).

#### **1.4.2.2. Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs).**

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις στο πεδίο των βλαστοκυττάρων. Πρόκειται για κύτταρα ίδιου δυναμικού με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (ESCs), διαθέτουν, δηλαδή, δυνατότητα διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο των τριών βλαστικών δερμάτων (ενδόδερμα, εξώδερμα και μεσόδερμα) μετά από καλλιέργεια σε κατάλληλες συνθήκες. Αυτή τους η ιδιότητά, τα καθιστά ιδανικά για χρήση σε αναγεννητικές θεραπείες. Εκτός όμως από το διαφοροποιητικό δυναμικό, τα iPSCs προσομοιάζουν με τα ESCs και στην μορφολογία, στην έκφραση γονιδίων και δεικτών επιφανείας καθώς και στην ικανότητα πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, καθώς προέρχονται από κύτταρα του ίδιου του ασθενούς δεν προκαλούν ανοσοαπάντηση και απόρριψη από το ανοσοποιητικό σύστημα (Csobonyei et al., 2021; Rim et al., 2018).

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά από τους Takahashi και Yamanaka το 2006. Προέρχονται από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία υφίστανται μοριακό επαναπρογραμματισμό με εισαγωγή διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι Sox2, Oct3/4, Klf4 και c-Myc, γνωστοί και ως παράγοντες Yamanaka. Η εισαγωγή τους στα κύτταρα αρχικά πραγματοποιούνταν με ιικούς φορείς, ωστόσο λόγω της αυξημένης πιθανότητας για καρκινογένεση γίνεται προσπάθεια να αντικαθιστούν με εναλλακτικά μέσα όπως πλασμιδιακούς φορείς, συνθετικά μόρια mRNA, μικρά νανομόρια και πρωτεΐνες (Csobonyei et al., 2021; Loo & Wong, 2021; Takahashi & Yamanaka, 2006).

Όλα τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα, καθιστούν τα iPSCs θεωρητικά ένα εναλλακτικό τρόπο θεραπείας εκφυλιστικών ασθενειών όπως η οστεοαρθρίτιδα. Ανθρώπινα χονδροκύτταρα από τον χόνδρο ενός ασθενούς με ΟΑ μπορούν να απομονωθούν να αναπρογραμματιστούν σε iPSCs και στην συνέχεια να εισαχθούν στον ασθενή στην περιοχή της άρθρωσης μαζί με αυξητικούς παράγοντες. Μελέτες σε πειραματόζωα απέδειξαν πως μετά την μεταμόσχευση των κυττάρων, αυτά ξεκινούν να διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, τα οποία παράγουν συστατικά της ECM, όπως κολλαγόνο και αγκρεκάνες, επιδιορθώνοντας τους κατεστραμμένους ιστούς

(Csobonyeiova et al., 2021). Ωστόσο, αν και φιλόδοξη, η αυτούσια χρήση τους για την αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου εμφανίζει πολλά εμπόδια που την καθιστούν αδύνατη. Πιο συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα της τεχνικής είναι χαμηλή. Επιπλέον, τα κύτταρα εμφανίζουν γενετική αστάθεια η οποία συνδέεται κυρίως με την χρήση ιικών φορέων για τον επαπρογραμματισμό των κυττάρων. Τέλος, το μεγαλύτερο εμπόδιο αποτελεί η δημιουργία τερατωμάτων μετά την έγχυση, λόγω του ισχυρού πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού. Γι' αυτό τον λόγο κρίνονται ακατάλληλα για κυτταρική θεραπεία (Loo & Wong, 2021).

#### **1.4.2.3. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iMSCs) στην θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας.**

Η δυσκολία της χρήσης των iPSCs και των MSCs στην κυτταρική θεραπεία της ΟΑ λόγω των πολλών μειονεκτημάτων τους δημιουργεί την ανάγκη εύρεσης ενός νέου κυτταρικού τύπου που θα μπορούσε να αποτελέσει τη λύση του προβλήματος. Το μεγάλο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των iPSCs και ο χαρακτηρισμός τους ως μια ανεξάντλητη πηγή κυττάρων άνοιξε τον δρόμο για την χρήση τους με σκοπό την παραγωγή των iMSCs, δηλαδή μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα. Καθώς τα iMSCs προέρχονται από τα iPSCs, μπορούν να παραχθούν από οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο του οργανισμού χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση επεμβατικών μεθόδων για λήψη τους. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια των MSCs που έχει θεσπίσει η Διεθνής Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας, τα οποία προαναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα. Μορφολογικά εμφανίζονται επιμήκη και πεπλατυσμένα ενώ παρουσιάζουν όχι μόνο τους αντιγονικούς δείκτες επιφανείας των MSCs αλλά και παράγοντες πολυδυναμίας όπως το Oct4, αλλά σε μικρότερο ποσοστό από τα iPSCs (Sabapathy & Kumar, 2016).

Η πιο κοινή τεχνική σχηματισμού iMSCs περιλαμβάνει την παραγωγή τους από iPSCs μέσω της δημιουργίας εμβρυονικών σωματίων (embryoid bodies-EB). Πρόκειται για πολυκυτταρικές δομές που αναπτύσσονται από εναιώρημα iPSCs, οι οποίες προσομοιάζουν την διαδικασία της γαστριδίωσης στα πρώιμα στάδια εμβρυικής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από τις τρεις βλαστικές στιβάδες, το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Εφόσον τα μεσεγχυματικά κύτταρα προέρ-

χονται από το μεσόδερμα πραγματοποιείται ενίσχυσή του έναντι των υπόλοιπων βλαστικών στιβάδων μέσω κατάλληλων αυξητικών παραγόντων (Guo et al., 2020).

Τα iMSCs αποτελούν μια πολύ φιλόδοξη μέθοδο κυτταρικής θεραπείας για την ΟΑ όπως έχει αποδειχτεί σε προκλινικές μελέτες. Αυτό οφείλεται στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν συγκριτικά με τις προηγούμενες υποψήφιες κυτταρικές θεραπείας. Αρχικά, αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή κυττάρων για θεραπεία καθώς έχουν την δυνατότητα καλλιέργειας για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να εμφανίσουν σημάδια γήρανσης σε αντίθεση με τα MSCs. Ακόμα, δεν επάγουν τερατώματα μετά την μεταμόσχευσή τους σε αντίθεση με τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα από τα οποία προέρχονται, ενώ μιας και είναι αυτόλογα του ασθενούς δεν προκαλείται ανοσιακή απάντηση. Επιπλέον, η δράση τους όταν πραγματοποιηθεί έγχυση τους στον ιστό, υπερτερεί της δράσης των MSCs και των iPSCs. Πιο συγκεκριμένα, ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον της περιοχής με την παραγωγή χημοκινών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων, ενώ διαφοροποιούνται προς χονδροκύτταρα, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τα MSCs. (Sabapathy & Kumar, 2016; Y. Zhu et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί, πως ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρακρινής δράση τους μέσω της παραγωγής μορίων, όπως μη κωδικά μόρια RNA τα οποία μπορούν και μεταβάλουν τον φαινότυπο της ΟΑ συμμετέχοντας και ρυθμίζοντας μοριακά μονοπάτια όπως η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων, ο υπερτροφικός φαινότυπος, η οστεοποίηση και η προστασία από το οξειδωτικό στρες. Εξαιτίας όλων αυτών των προτερημάτων τα iMSCs μπορούν να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή κυττάρων για μελλοντική κυτταρική θεραπεία (Dubey et al., 2018; Sabapathy & Kumar, 2016).

#### **1.4.2.4. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ πρωτογενών μεσεγχυματικών βλαστικών κύτταρων (MSCs) και μεσεγχυματικών βλαστικών κύτταρων προερχόμενων από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iMSCs).**

Τα MSCs και τα iMSCs αποτελούν δύο τύπους κυττάρων, οι οποίοι εμφανίζουν αρκετές διαφορές και ομοιότητες που παρατηρούνται σε διαφορετικό βαθμό σε όλα τα επίπεδα όπως στη μορφολογία, στη γονιδιακή έκφραση, στην επιγενετική ταυτότητα καθώς και στο εκκρίτωμα.

Όσον αφορά τη μορφολογία, όπως προαναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες, τα κύτταρα και των δύο τύπων είναι επιμήκη και πεπλατυσμένα στην καλλιέργεια. Επιπλέον, ανοσοφαινοτυπική ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής απέδειξε ότι παρουσιάζουν κοινά αντιγόνα επιφανείας CD73, CD90, CD105, ενώ ταυτόχρονα και από τους δύο τύπους μεσεγχυματικών κυττάρων απουσιάζουν οι αιμοποιητικοί δείκτες CD14, CD20, CD34 και CD45. Η μόνη μορφολογική διαφορά ανάμεσά τους είναι το γεγονός ότι τα επαγόμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα εμφανίζουν επιπλέον κάποιους δείκτες πολυδυναμίας, κυρίως Oct4, οι οποίοι οφείλονται στα iPSCs από τα οποία προέρχονται. Οι υπόλοιποι δείκτες των iPSCs όπως οι Nanog και Sox2 απουσιάζουν. Επιπλέον, ομοιάζουν στο αναγεννητικό τους δυναμικό καθώς τόσο τα MSCs όσο και τα iMSCs έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης προς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (X. Meng et al., 2013; Spitzhorn et al., 2019).

Σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση, μεταξύ των μεσεγχυματικών και των επαγόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων μελέτες έχουν αποδείξει πως υπάρχει κοινή έκφραση στα μεσοδερμικά γονίδια. Γενικά τα iMSCs αποτελούν κύτταρα, τα οποία μέσω του επαναπρογραμματισμού υφίστανται μια «ανανέωση» (rejuvenation). Αυτό σημαίνει πως ακόμα κι αν τα αρχικά κύτταρα από τα οποία σχηματίστηκαν τα iMSCs ήταν γερασμένα, αυτά μέσω του επαναπρογραμματισμού επιστρέφουν σε μια νεαρή κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από διαφορετική έκφραση κάποιων κατηγοριών γονιδίων. Δύο τέτοιες χαρακτηριστικές κατηγορίες αποτελούν τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA καθώς και τα ηλικιο-συσχετιζόμενα. Σχετικά με τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών, αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη έκφραση στα iMSCs από ότι στα MSCs. Η μειωμένη έκφραση τους στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα γίνεται φανερή από το γεγονός ότι ως γερασμένα κύτταρα εμφανίζουν πολλαπλές βλάβες στο DNA, κάτι που οφείλεται στη μη σωστή λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Αντίθετα, στα iMSCs όπου η έκφραση αυτών των γονιδίων είναι μεγάλη, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης λειτουργούν σωστά και δεν εντοπίζονται βλάβες στο DNA. Σχετικά με τα γονίδια που σχετίζονται με την ηλικία, η έκφρασή τους είναι μειωμένη στα iMSCs. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν γονίδια που εξυπηρετούν λειτουργίες που αφορούν την ανάπτυξη, την προσκόλληση των κυττάρων και την μεταγραφική ρύθμιση. Αξίζει να σημειωθεί πως στα iMSCs μεταξύ άλλων έχει αποδειχτεί πως εμφανίζεται μειωμένη έκφραση και σε γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την έναρξη ανοσιακής απάντη-

σης και πολλαπλασιασμού των T κυττάρων. Αυτό αποτελεί ένα χαρακτηριστικό, που τα καθιστά ιδανική επιλογή για θεραπείες. (Frobel et al., 2014; Spitzhorn et al., 2019).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται και από την πλευρά των επιγενετικών τροποποιήσεων. Οι αλλαγές που παρατηρούνται είναι πολύ μικρές και σχετίζονται κυρίως με την «ανανέωση» που παρουσιάζουν τα iMSCs (Frobel et al., 2014). Αρχικά μεταβάλλεται το ηλικιο-συσχετιζόμενο προφίλ της μεθυλίωσης. Ωστόσο, διατηρούν τις βασικές μεθυλίώσεις που είναι χαρακτηριστικές του ατόμου (donor methylation signature). Συνολικά, όμως, τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA παρουσιάζονται υψηλότερα στα iMSC σε σύγκριση με τα MSC. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη έκφραση γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη de novo μεθυλίωση όπως τα Dnmt3β και Dnmt1 (Spitzhorn et al., 2019; Wruck et al., 2021).

Ωστόσο τα iMSCs διαφέρουν από τα MSCs και ως προς το εκκριτόμα τους. Μελετώντας το εκκριτόμα των επαγόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή αντι-φλεγμονωδών και προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (VGEF, IL-8 και IL-11 μεταξύ άλλων). Αυτές συμμετέχουν σε μονοπάτια όπως το JAK/STAT και ρυθμίζουν θετικά διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και την δράση των αυξητικών παραγόντων (Spitzhorn et al., 2019).

## **1.5. Μη κωδικά μόρια RNA στην επαγόμενη χονδρογένεση.**

### **1.5.1. Ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου.**

Αποτελεί γεγονός ότι διάφοροι παράγοντες συνεισφέρουν στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου μετά από εκφυλισμό του. Μια ποικιλία μορίων και πρωτεϊνών συμβάλουν στη διαδικασία αυτή. Ωστόσο, μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τους γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναγέννηση του χόνδρου. Από αυτούς, τους πιο σημαντικούς αποτελούν τα μη κωδικά μόρια RNA και κυρίως τα microRNA και τα lncRNA.

Αναφορικά με τα μικρά μη κωδικά RNA, η δράση τους είναι ποικίλη. Αρχικά, ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω στόχευσης των mRNA γονιδίων, των οποίων η έκφραση εντοπίζεται αυξημένη στον κατεστραμμένο οστεοαρθρικό χόνδρο. Ένα τέτοιο μόριο αποτελεί η απακετυλάση των ιστονών

4 (*HDAC4*), η οποία χαρακτηρίζεται ως παράγοντας υπερτροφίας των χονδροκυττάρων και καταστροφής του χόνδρου. Επιπλέον, καταστέλλουν την έκφραση πρωτεασών όπως MMPs και ADAMTS από τα χονδροκύτταρα, ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν την παραγωγή των συστατικών της ECM όπως κολλαγόνο τύπου II και αγκρεκάνες. Η καταστολή σηματοδοτικών μονοπατιών αποτελεί μια ακόμα συμβολή τους στην αναγέννηση του χόνδρου. Δύο από τα βασικά μονοπάτια που καταστέλλονται από τα μικρά μη κωδικά RNA αποτελούν τα NF-κβ και MAPK. Όσον αφορά το MAPK μονοπάτι, η καταστολή του αίρει τον φαινότυπο γήρανσης που παρατηρείται στον χόνδρο ενός ασθενούς με OA. Έτσι, μειώνεται η παραγωγή πρωτεασών και φλεγμονωδών κυτοκινών χαρακτηριστικών των γηρασμένων κυττάρων (IL-1β και IL-6). Αποτέλεσμα η καταστολή της IL-1β επαγόμενης καταστροφής του χόνδρου. Επιπρόσθετα, τα microRNA συμβάλουν στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου καταστέλλοντας την απόπτωση των χονδροκυττάρων που επάγεται μέσω του NF-κβ μονοπατιού. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύοντας σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο TNF factor 2, αίρεται η ενεργότητα του μονοπατιού με αποτέλεσμα να μειώνεται η έκφραση προ-αποπτωτικών και να αυξάνεται η έκφραση αντι-αποπτωτικών παραγόντων προστατεύοντας τελικά από την απόπτωση. Τέλος, καταστέλλουν την δράση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος στα χονδροκύτταρα, συμβάλλοντας στην μείωση της παραγωγής νιτρικού οξέος, προστατεύοντας τον χόνδρο (Endisha et al., 2018; Razmara et al., 2019; Swingler et al., 2019; Wu et al., 2014).

Όπως τα miRNA έτσι και τα lncRNA διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου. Αυτά εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, και δρουν με δύο τρόπους. Αρχικά, στοχεύουν τα mRNA και ρυθμίζουν αρνητικά τη μετάφραση πρωτεϊνών. Μελέτες έχουν αποδείξει τον σχηματισμό συμπλόκων με πρωτεΐνες (όπως τις CREB), μέσω των οποίων επάγουν την διαφοροποίηση των μεσενχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα. Επιπλέον, όπως και τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA στοχεύουν παράγοντες σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία στην OA είναι ενισχυμένα και τα καταστέλλουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα Notch, NF-κβ και τα μονοπάτια ιντερφερονών. Ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων και η διαφοροποίηση των μεσενχυματικών κυττάρων επιτυγχάνεται επίσης και μέσω της θετικής ρύθμισης που προκαλούν διαφορα lncRNA στα mRNA σημαντικών γονιδίων για αυτές τις διαδικασίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν τα MYC, SMAD3, και STAT3. Τα μακρά μη κωδικά RNA μπορούν επί-

σης να λειτουργήσουν ως «παγίδες» για τα miRNA (sponges), αποτρέποντας έτσι την ανασταλτική επίδραση της δέσμευσης των miRNA στα mRNA-στόχους τους. Χαρακτηριστική αποτελεί η καταστολή microRNA, τα οποία, όταν εντοπίζονται αυξημένα, εμποδίζουν την διαφοροποίηση των MSCs σε χονδροκύτταρα. Τέλος δεσμεύουν και απενεργοποιούν μικρά μη κωδικά μόρια RNA τα οποία συμμετέχουν στην απόπτωση των χονδροκυττάρων καθώς και στην παραγωγή πρωτεασών καταστροφής των προϊόντων της εξωκυττάριας ουσίας (Razmara et al., 2019; J. Zhu et al., 2019).

### **1.5.2. Παρακρινής δράση των μη- κωδικών μορίων RNA.**

Τα μη κωδικά μόρια RNA έκτος από τα ίδια τα κύτταρα που παράγονται, μπορούν να δράσουν και σε γειτονικά. Εμφανίζουν δηλαδή και παρακρινή ρόλο. Η μεταφορά τους σε αυτά, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω διάχυσης είτε με την βοήθεια μικρών εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs). Με αυτό τον τρόπο, τα μόρια αυτά ρυθμίζουν την δράση των κυττάρων. Έτσι συμβάλλουν σε όλες τις διαδικασίες ανάπτυξης του εκφυλισμένου ιστού, στοχεύοντας τόσο τα χονδροκύτταρα όσο και άλλους τύπους κυττάρων οι οποίοι συμμετέχουν στον φαινότυπο της OA (Lara-Barba et al., 2021).

Η παρακρινής δράση των μη κωδικών μορίων RNA στα χονδροκύτταρα ομοιάζει την δράση τους εντός των κυττάρων που παράγονται. Πιο συγκεκριμένα, καταστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων αλλά και την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων για αναγέννηση του χόνδρου. Επιπλέον, καταστέλλοντας απακετυλάσες ιστονών ενισχύουν την ακετυλίωση αυτών των πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα της ιστόνης H3. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την ενίσχυση των αναβολικών διεργασιών προς την παραγωγή των πρωτεϊνών της ECM. Η αρνητική ρύθμιση της έκκρισης πρωτεασών, αποτελεί μία ακόμα δράση τους (Li et al., 2021). Όσον αφορά τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς, τα μη κωδικά μόρια RNA, ελαττώνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Με αυτόν τον τρόπο καταστέλλουν την φλεγμονή που σημειώνεται στην άρθρωση με OA, μειώνοντας τον πληθυσμό των ενεργοποιημένων μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων. Επιπλέον, στοχεύουν τα Th17 λεμφοκύτταρα, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους και την υπέρτερη παραγωγή κυτοκινών. Τέλος, εμποδίζοντας την δράση του VEGF παράγοντα μειώνουν την ανώμαλη αγγειογένεση που εντοπίζεται στο χόνδρο και στο οστό

συμβάλλοντας τελικά στην επιδιόρθωση των δομών αυτών (Born et al., 2020; Lara-Barba et al., 2021). Γίνεται, επομένως, εύκολα αντιληπτό πως η παρακρινής δράσης των μη κωδικών μορίων RNA είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αναγέννηση του χόνδρου αλλά και για την επιδιόρθωση ολόκληρης της άρθρωσης.

### **1.5.3. Ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην «ανανέωση» (rejuvenation) των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs).**

Μεταξύ των παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην «ανανέωση» των MSCs ανήκουν τα μη κωδικά μόρια RNA. Μια από τις πρώτες αλλαγές που σημειώνονται εξαιτίας της δράσης τους αποτελεί η αποκατάσταση της έκφρασης αντι-γηραντικών παραγόντων όπως η τελομεράση, της οποίας η ενεργότητα χάνεται κατά τη γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Okada et al., 2016). Με αυτό τον τρόπο, επαναφέρεται η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους (Q. S. Meng et al., 2020). Επιπλέον, τα μη κωδικά μόρια RNA, συμβάλλουν στο rejuvenation ρυθμίζοντας και καταστέλλοντας σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία συμβάλλουν στο φαινότυπο της γήρανσης. Ένα από αυτά αποτελεί το mTOR, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απόπτωση των κυττάρων και το μεταβολισμό των μιτοχονδρίων. Με αυτόν τον τρόπο βελτιώνεται η δράση αυτών των κυτταρικών οργανιδίων και μειώνεται η σύνθεση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), οι οποίες παράγονται υπέρμετρα στα γηρασμένα κύτταρα λόγω της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, ενισχύοντας περαιτέρω τον φαινότυπο (J. Cai et al., 2021; Zhou et al., 2020). Μελέτες έχουν δείξει πως, και η ρύθμιση των p53/p21 και p16/RB μονοπατιών από μη κωδικά μόρια RNA κρίνεται απαραίτητη για την «ανανέωση» των MSCs. Αποτελεί γεγονός πως η υπέρμετρη ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών συμβάλλει στη γήρανση του κυττάρου (Shang et al., 2016). Η καταστολή της ηλικιο-συσχετιζόμενης αντίστασης στην ινσουλίνη αποτελεί μία ακόμα δράση των μη κωδικών μορίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αρνητικής ρύθμισης του IGF-1 μονοπατιού, το οποίο είναι συντηρημένο μεταξύ των οργανισμών και ρυθμίζει τη γήρανση. Η αποσιώπηση του κρίνεται απαραίτητη για την «ανανέωση» των MSCs (Zhou et al., 2020).

Τα μη κωδικά μόρια RNA επομένως, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην «ανανέωση» των MSCs, κάτι το οποίο κρίνεται απαραίτητο για τη χρήση τους για θεραπεία, καθώς μεταξύ άλλων ενισχύει την ικανότητα επιβίωσής τους στον ιστό που εγχέονται (Q. S. Meng et al., 2020).



## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η περιγραφή της πολυεπίπεδης σχέσης καθώς και του ρόλου των μη-κωδικών μορίων RNA σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs).

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Διαφοροποίηση επαγόμενων βλαστοκυττάρων (iPSCs) σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs)
- *In silico* μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων μακρών μη-κωδικών RNAs (lncRNAs) και μικρών μη-κωδικών (miRNAs) και μεταξύ miRNAs και των γονιδίων στόχων τους (mRNA), σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) και σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs), τα οποία προήλθαν από δείγματα μυελού των οστών ατόμων με ΟΑ και υγιών ατόμων.
- Διερεύνηση της έκφρασης επιλεγμένων lncRNA (όπως το SNHG14) και miRNA (όπως το hsa-miR-128-3p), τα οποία βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των μεσεγχυματικών κυττάρων στην άρθρωση και σχεδιασμός του ανταγωνιστικού δικτύου αλληλεπίδρασης (lncRNA-miRNA-mRNA) στα iMSCs.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Είδη κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι κυττάρων, οι οποίοι φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Τύποι κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν

Τύπος κυττάρων
Μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από άτομα με οστεοαρθρίτιδα.
Επαγόμενα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από υγιή άτομα.
Επαγόμενα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από άτομα με οστεοαρθρίτιδα.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα παράχθηκαν στα πλαίσια προηγούμενου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής.

##### 3.1.1. Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια των iPSCs

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες χρησιμοποιώντας θάλαμο νηματικής ροής Bluebeam 4 Class II biohazard cabinet. Επιπλέον για τις διαδικασίες αυτές έγινε χρήση της Megafuge φυγόκεντρου της Heraeus Instruments και ανάστροφου μικροσκοπίου τύπου Axiovert 5100. Επιπλέον, η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο με σταθερές συνθήκες και πιο συγκεκριμένα, θερμοκρασία 37° C, διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) 5% και σταθερή υγρασία.

Όταν παρατηρηθεί ότι η πληρότητα των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων στην φλάσκα έχει φτάσει στο 85% πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε νέες φλάσκες. Για την ανακαλλιέργεια είναι απαραίτητα τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Υπόστρωμα μίγματος εξωκυττάριας ουσίας Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free
2. Θρεπτικό υλικό mTeSR™1
3. Ένζυμο αποκόλλησης Dispase 1U/ml

#### 4. Θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 με 15mM HEPES

##### Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαδικασίες.

- Μια ώρα πριν την ανακαλλιέργεια, γίνεται επίστρωση φλασκών 25cm<sup>2</sup> με Matrigel
- Το υλικό καλλιέργειας των κυττάρων αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται με περίπου 2ml DPBS για απομάκρυνση τυχόν αιωρούμενων κυττάρων.
- Τοποθετείται στη φλάσκα 1 ml από το ένζυμο Dispase. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 1-2 λεπτά με κλειστό καπάκι για να δράσει το ένζυμο, έως ότου τα περιθώρια των αποικιών αρχίσουν να σηκώνονται. Ακολουθεί παρατήρηση τους στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
- Στη συνέχεια αφαιρείται η Dispase και η φλάσκα ξεπλένεται 2 φορές με DPBS.
- Ακολουθεί προσθήκη 3 ml DMEM/F-12 για απενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου. Χρησιμοποιώντας ξύστρα κυττάρων πραγματοποιείται αποκόλληση των μερικώς αποκολλημένων αποικιών από το υπόστρωμα. Με πιπέττα μιας χρήσης γίνεται ξέπλυμα των τοιχωμάτων της φλάσκας με το εναιώρημα, ώστε να σηκωθούν όλες οι αποικίες.
- Το εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου και πραγματοποιείται ξέπλυμα άλλες 2-3 φορές μέχρι να συγκεντρωθούν όλες τις αποικίες. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 500 x g για 6 λεπτά.
- Από τις νέες επικαλυμμένες με Matrigel φλάσκες αφαιρείται το DMEM/F-12 και προστίθεται φρέσκο υλικό καλλιέργειας mTeSR1.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αναδιαλύεται με mTeSR1 προσεκτικά, ώστε να μην σπάσουν τελείως τα συσσωματώματα.
- Τέλος τα κύτταρα μοιράζονται στις καινούριες φλάσκες και τοποθετούνται στον κλίβανο. Ακολουθεί καθημερινή ανανέωση του θρεπτικού μέσου με 4ml mTeSR1.

#### 3.1.2. Δημιουργία εμβρυονικών σωματίων.

Απαραίτητο βήμα, για τη διαφοροποίηση των iPSCs σε iMSCs είναι ο σχηματισμός των εμβρυονικών σωματίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των εμβρυονικών σωματίων ήταν τα εξής:

1. Knockout Serum Replacement, KSR
2. 2-Mercaptoethanol, 55mM
3. L-Glutamine, 200mM

4. Knockout DMEM
5. Bone Morphogenetic Protein 4, BMP-4
6. MEM Non-essential aminoacids (NEAA)
7. Ένζυμο αποκόλλησης Dispase 1U/ml

Προκειμένου να παραχθούν τα ΕΣ ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

- Αρχικά, προετοιμάζεται το υλικό διαφοροποίησης των iPSCs σε εμβρυονικά σωματίδια. Οι ακριβείς ποσότητες των συστατικών περιγράφονται στον Πίνακα 2:

**Πίνακας 2:** Η τελική σύσταση του θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης.

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Knockout DMEM	1X	2400μl
Knockout Serum Replacement	20%	600μl
NEAA	1%	30μl
L-Glutamine	1mM	30μl
2-Mercaptoethanol	0.1 mM	5,4μl

- Σε κάθε τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης προστίθενται 3 ml υλικού διαφοροποίησης.
- Από τη φλάσκα με τα αδιαφοροποίητα ολοδύναμα κύτταρα αφαιρείται το mTeSR1 και συλέγονται τα κύτταρα, με την χρήση του ενζύμου Dispase με προσοχή ώστε να μη σπάσουν τα συσσωματώματα.
- Τα συσσωματώματα μεταφέρονται με την χρήση πιπέτας μια χρήσης στο τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης και τοποθετούνται στον κλίβανο.
- Μετά από 24 ώρες, πραγματοποιείται αλλαγή του υλικού των εμβρυονικών σωματίων αφαιρώντας το εναιώρημα των κυττάρων και φυγοκεντρώντας στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή, και το ίζημα αναδιαλύεται σε νέο θρεπτικό χωρίς ανάδευση ώστε να μην καταστραφούν τα σχηματισμένα σωματίδια. Στο θρεπτικό έγινε και προσθήκη 2μl BMP-4 για ενίσχυση του μεσοδέρματος. Το ίζημα τοποθετείται στο τρυβλίο με υλικό διαφοροποίησης και επωάζεται στον κλίβανο.

- Ακολουθεί καθημερινή μικροσκοπική παρατήρηση των εμβρυονικών σωματίων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και ανανέωση του υλικού κάθε 2 μέρες προσθέτοντας BMP-4. Τα σωματίδια μπορούν να διατηρηθούν σε αυτές τις συνθήκες έως 7 ημέρες.

### **3.1.3. Μεταφορά εμβρυονικών σωματίων σε ζελατίνη.**

Όταν τα εμβρυονικά σωματίδια αποκτήσουν το κατάλληλο μέγεθος και ταυτόχρονα έχει πραγματοποιηθεί σε αυτά επιτυχώς η επαγωγή του μεσοδέρματος, μεταφέρονται σε φλάσκες καλυμμένες με ζελατίνη ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική ανάπτυξη των iMSCs. Για τη μεταφορά αυτή, χρειάζονται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS
2. Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (FGF-2)
3. MEM Non-essential aminoacids (NEAA)
4. Gelatin 0.1% in water
5. Knockout Serum Replacement, KSR

Η μεταφορά στην ζελατίνη και η ανάπτυξη των iMSCs πραγματοποιείται ως εξής:

- Αρχικά, σε νέα φλάσκα καλλιέργειας 25cm<sup>2</sup> πραγματοποιείται επίστρωση με ζελατίνη. Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 3ml διαλύματος 0.1% ζελατίνης και η φλάσκα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα η ζελατίνη αφαιρείται και ακολουθεί στέγνωμα του διαλύματος με ανοιχτό καπάκι σε ασηπτικές συνθήκες.
- Όταν απομακρυνθεί όλο το υγρό, τοποθετείται στη φλάσκα 5 ml υλικού διαφοροποίησης σε iMSCs, το οποίο περιέχει 4 ml DMEM/F12 εμπλουτισμένο με 0.5ml KSR, 0.4 μl (5ng/ml) FGF-2, 25 μl (1mM) L-Glutamine και 50μl (1%) NEAA.
- Τα Εμβρυονικά σωματίδια συλλέγονται από το τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης αφαιρώντας το εναιώρημα των κυττάρων, ξεπλένοντας με DPBS το τρυβλίο και φυγοκεντρώντας στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αναδιαλύεται σε υλικό διαφοροποίησης iMSCs. Τέλος, με μια αποστειρωμένη σύριγγα με βελόνα 21G, τα σωματίδια διαχωρίζονται.
- Τα ΕΣ τοποθετούνται στην νέα φλάσκα και επωάζονται στον κλίβανο. Πραγματοποιείται αλλαγή υλικού κάθε 3 ημέρες.

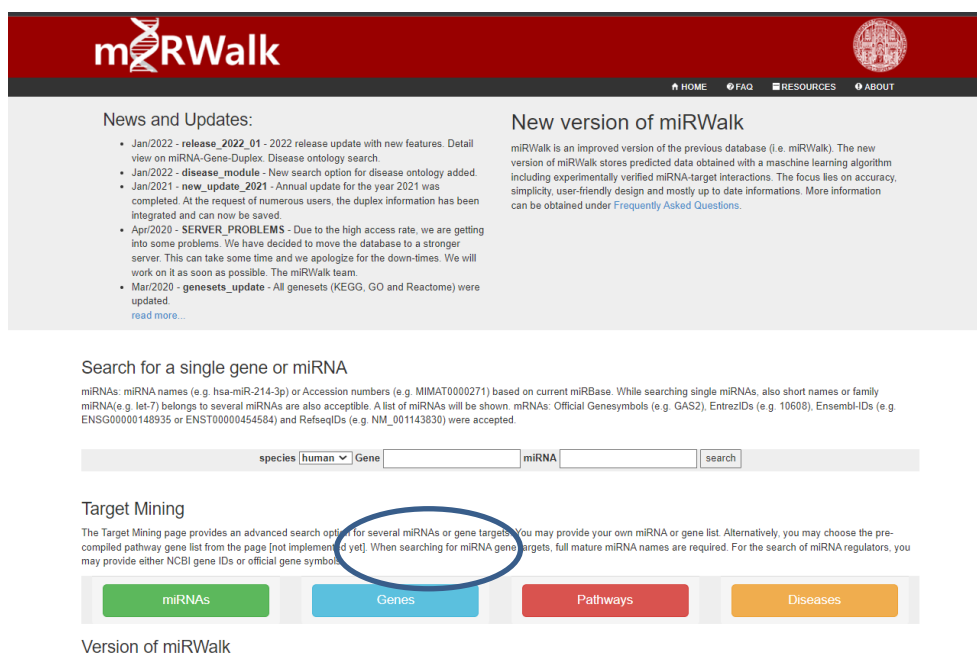
### 3.2. Βιοπληροφορική αναζήτηση microRNA, mRNA στόχων και lncRNA

• Η αναζήτηση των μη- κωδικών μορίων RNA έγινε με βάση γονίδια τα οποία βρέθηκαν πειραματικά ότι εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs, μετά από αλληλούχιση ολικού RNA με την τεχνολογία NGS στο πλαίσιο άλλης μελέτης.

Για την εύρεση των μη- κωδικών μορίων πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, η αναζήτηση των microRNA έγινε στη βάση δεδομένων miRWalk, η οποία προσφέρει τις εξής δυνατότητες:

1. Εύρεση των microRNA που στοχεύουν ένα συγκεκριμένο γονίδιο.
2. Εύρεση των γονιδίων που στοχεύει ένα microRNA.
3. Δημιουργία δικτύων microRNA-γονιδίων.
4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης γονιδίων και microRNA που σχετίζονται με μια νόσο.

Για την αναζήτηση ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:



**Εικόνα 6:** Το περιβάλλον της βάσης δεδομένων miRWalk και οι επιλογές αναζήτησης που προσφέρει. Ο κύκλος υποδηλώνει την επιλογή αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκε.

• Στη συνέχεια αφού γίνει καταγραφή των γονιδίων προκύπτει μια λίστα microRNA, τα οποία στοχεύουν τα επιθυμητά γονίδια (Εικόνα 8). Σε αυτή τη λίστα πραγματοποιείται φιλτράρισμα των δεδομένων με βάση τρεις παραμέτρους:

1. Το prediction score, δηλαδή το score που δηλώνει το πόσο ειδικά συνδέεται το microRNA με το mRNA του γονιδίου στόχου. Επιλέγεται ως κατώτερο όριο το 0.8.
2. Τη θέση (position), η οποία αφορά την περιοχή που συνδέεται το microRNA στο mRNA. Για τον σκοπό του πειράματος επιλέγονται και οι τρεις περιοχές (3' UTR, 5'UTR, Coding region) διαδοχικά.
3. Τη διασταύρωση με άλλες βάσεις για μεγαλύτερη εγκυρότητα του αποτελέσματος. Εδώ επιλέγονται οι δύο από τις τρεις και πιο συγκεκριμένα οι MirDB και Targetscan, βάσεις οι οποίες προβλέπουν τους στόχους των microRNAs.



**mRWalk**

HOME FAQ

### Target Mining

Search for gene targets with official genesymbols (e.g. GAS2), EntrezIDs (e.g. 10608), Ensembl-IDs (e.g. ENSG00000148935 or ENST00000454584).

species: human

Type of IDs: GeneSymbol

Example

HDAC4

IDs:

Submit

**Εικόνα 7:** το πλαίσιο αναζήτησης microRNA βάση γονιδίων

The screenshot shows the mRWalk website interface. At the top, there is a navigation bar with 'HOME', 'FAQ', 'RESOURCES', and 'ABOUT'. Below the navigation bar, there is a search area with fields for 'miRNAID', 'GeneSymbol', and a search term '0,8'. A dropdown menu is open, showing options for '3UTR', '5UTR', and 'CDS'. The main content is a table with columns: miRNA, RefseqID, GeneSymbol, Duplex, Score, Position, Binding Site, Au, Me, N Pairings, Targetscan, Mirdb, and Mirtarbase. The table lists various miRNAs targeting HDAC4, with details like prediction scores and binding sites.

miRNA	RefseqID	GeneSymbol	Duplex	Score	Position	Binding Site	Au	Me	N Pairings	Targetscan	Mirdb	Mirtarbase
hsa-miR-22-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.87	3UTR	6243,6261	0.41	-9.847	16	LINK	Link	MIRT004035
hsa-miR-106a-5p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7252,7294	0.44	-6.618	19	LINK	Link	—
hsa-miR-29c-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.85	3UTR	7545,7566	0.57	-6.97	19	LINK	Link	—
hsa-miR-302b-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	8566,8587	0.6	-6.549	16	LINK	Link	MIRT054097
hsa-miR-302d-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	8567,8587	0.6	-6.549	16	LINK	Link	—
hsa-miR-370-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.85	3UTR	4977,5000	0.41	-5.925	18	LINK	Link	—
hsa-miR-20b-5p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7252,7294	0.44	-6.618	19	LINK	Link	—
hsa-miR-485-3p	NM_006037	HDAC4	details	1.00	3UTR	5893,5927	0.48	-3.938	21	LINK	Link	—
hsa-miR-485-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7943,7958	0.6	-20.666	13	LINK	Link	—
hsa-miR-520a-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7011,7031	0.38	-6.515	13	LINK	Link	—
hsa-miR-520a-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.85	3UTR	4248,4268	0.32	-10.203	18	LINK	Link	—
hsa-miR-526b-3p	NM_006037	HDAC4	details	1.00	3UTR	7000,7036	0.41	-3.938	20	LINK	Link	—
hsa-miR-519d-3p	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7011,7031	0.38	-9.547	16	LINK	Link	—
hsa-miR-520d-3p	NM_006037	HDAC4	details	1.00	3UTR	7011,7031	0.38	-6.515	18	LINK	Link	—
hsa-miR-506-3p	NM_006037	HDAC4	details	1.00	3UTR	6493,6522	0.46	-9.959	14	LINK	Link	—
hsa-miR-613	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7015,7036	0.41	-4.85	18	LINK	Link	—
hsa-miR-613	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	6042,6065	0.35	-7.039	18	LINK	Link	—
hsa-miR-613	NM_006037	HDAC4	details	0.92	3UTR	7534,7555	0.62	-6.107	17	LINK	Link	—
hsa-miR-302e	NM_006037	HDAC4	details	0.85	3UTR	7250,7267	0.48	-6.246	14	LINK	Link	—

**Εικόνα 8:** Η λίστα microRNA. Στην πρώτη στήλη καταγράφονται τα ονόματα των mi-croRNA, στη δεύτερη ο κωδικός τους στη βάση δεδομένων NCBI, στην τρίτη το γονίδιο στόχος, στην πέμπτη το prediction score, στην έκτη η θέση πρόσδεσης και στην έβδομη η ακριβής περιοχή πρόσδεσης. Στις 3 τελευταίες στήλες σημειώνονται οι σύνδεσμοι του κάθε mi-croRNA στις άλλες βάσεις δεδομένων.

Όσον αφορά την αναζήτηση των lncRNA, αυτή πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων «LncBase v.3-Dianna Tools». Αυτή η βάση δεδομένων προσφέρει τις εξής δυνατότητες:

1. Εύρεση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ lncRNA και microRNA και οπτικοποίηση τους σε διάγραμμα.
2. Εύρεση πληροφοριών σχετικά με τους ιστούς που αυτά εκφράζονται και τη θέση που εντοπίζεται η δράση τους στο κύτταρο (πυρήνας/κυτταρόπλασμα). Και σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται σε διαγράμματα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, αρχικά καταγράφεται στο πλαίσιο αναζήτησης «lncRNA», το επιθυμητό μόριο και επιλέγεται φιλτράρισμα με βάση το είδος του οργανισμού, στο οποίο πραγματοποιείται η αναζήτηση (εδώ Homo sapiens).



**Εικόνα 9:** Το περιβάλλον της βάσης δεδομένων LncBase v.3-Dianna Tools, με το φίλτρο που επιλέγεται.

Από την αναζήτηση προκύπτει μια λίστα με όλα τα microRNA που στοχεύει το κάθε ένα από τα lncRNA. Από αυτά επιλέγονται μόνο όσα έχουν υψηλή ειδικότητα σύνδεσης στο microRNA στόχο (Εικόνα 10). Η τελική λίστα μακρών μη κωδικών μορίων RNA αποτελείται από αυτά που στοχεύουν microRNA τα οποία εντοπίζονται εξίσου στις 2 βάσεις δεδομένων (LncBase v.3-Dianna Tools και mirWalk).

Από αυτή τη λίστα, τα μη κωδικά μόρια RNA που επιλέγονται για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, προέρχονται από βιβλιογραφική έρευνα του ρόλου και των μονοπατιών που συμμετέχουν στην άρθρωση. Με αυτόν τον τρόπο επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη το hsa-miR-128-3p καθώς και τα lncRNA που το στοχεύουν.

Gene name	miRNA name	Experiments	Publications	Cell Lines	Tissues	miRNA Conf.	DIANA Links
C8orf31	hsa-let-7b-5p	1	1	1	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP
C8orf31	hsa-let-7c-5p	1	1	1	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP
C8orf31	hsa-let-7d-5p	1	1	1	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP
C8orf31	hsa-miR-15b-5p	1	1	0	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP
C8orf31	hsa-miR-15b-5p	1	1	0	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP
C8orf31	hsa-miR-210-3p	1	1	0	1	High	INC RNA Expr UCSC mT TB InP mP

**Εικόνα 10:** Η λίστα microRNA που στοχεύει κάθε lncRNA.

### 3.3. Διερεύνηση έκφρασης μη κωδικών μορίων RNA

#### 3.3.1. Απομόνωση RNA

Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

1. Trizol (Life Technologies)
2. Χλωροφόρμιο (Merck)
3. Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
4. 70% αιθανόλη (Scharlau)
5. RNase-free water (Qiagen)
6. Θρυψίνη (Gibco, 253000054)
7. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του RNA από τα κύτταρα, οι καλλιέργειες επεξεργάζονται σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Αρχικά το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αφαιρείται, και προστίθενται περίπου 5ml DPBS, για να ξεπλυθεί η επιφάνεια. Μετά το πέρας της πλύσης αφαιρείται προσεκτικά με πιπέτα μιας χρήσης.
- Έπειτα προστίθενται 2ml θρυψίνης προκειμένου να συλλεχθούν τα κύτταρα καθώς το ένζυμο διασπά τη σύνδεση των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησης της φλάσκας.

- Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 5 με 10 λεπτά, μικροσκοπικός έλεγχος και προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού DMEM/F12 ώστε να ανασταλεί η δράση του ενζύμου.
- Επόμενο βήμα η συγκέντρωση του «pellet» των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 1500g για 6 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται, και ακολουθεί μια πλύση του ιζήματος των κυττάρων με 5ml DPBS και φυγοκεντρηση στα 1500g για 6 λεπτά.
- Τέλος προστίθεται 1ml Trizol και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με vortex για λύση των κυττάρων και μετουσίωση των πρωτεϊνών.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 2mL (eppendorf)
- Έπειτα προστίθενται 0,2ml χλωροφορμίου (για κάθε 1ml Trizol) προκειμένου να μεταφερθεί το RNA από το ίζημα στο υπερκείμενο και πραγματοποιείται ανάδευση με vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε eppendorf των 2ml.
- Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης (για κάθε 1ml Trizol) για κατακρήμιση του RNA και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης για καθαρισμό του RNA.
- Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρούνται στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα eppendorf τοποθετούνται για στέγνωμα στον κλίβανο, μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Τέλος, το RNA διαλύεται σε 30μl RNase-free water και επωάζεται για 10 λεπτά στους 57°C στο υδατόλουτρο.
- Μέχρι να χρησιμοποιηθούν, τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C.

### **3.3.2. Έλεγχος ποιότητας απομονωμένου RNA.**

Για τον έλεγχο ποιότητας του απομονωμένου RNA χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Bioanalyzer Agilent 2100 και το RNA 6000 Nano kit. Για την πραγματοποίηση του ελέγχου είναι απαραίτητα τα παρακάτω αντιδραστήρια.

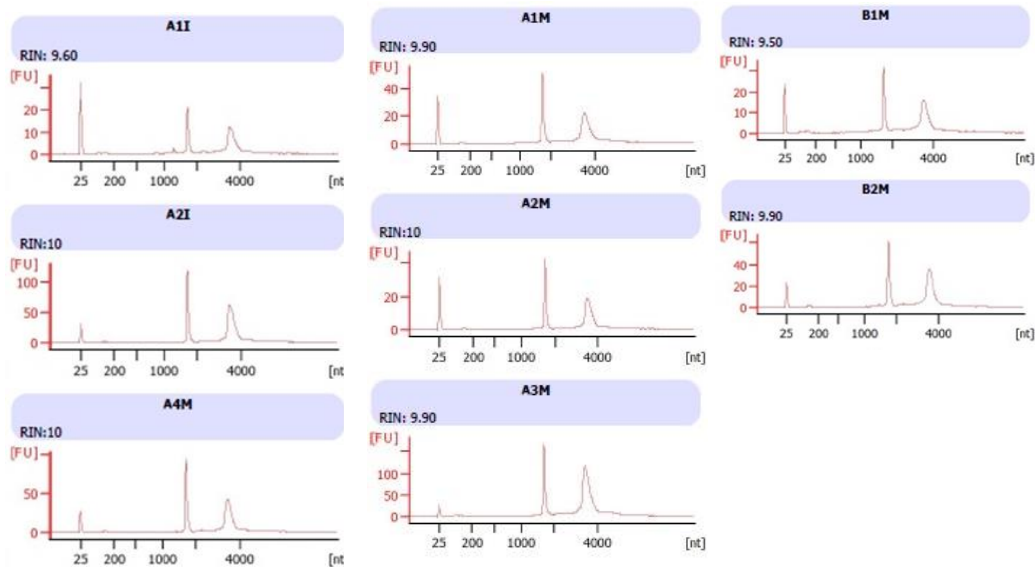
#### **1. Πλακέτα RNA Nano Chip**

2. Συσκευή εφαρμογής πίεσης (Chip priming station #5065- 4401)
3. Σωληνάρια φυγοκέντρωσης με φίλτρο χωρίς RNAάση.
4. Διάλυμα καταστροφής RNAασών (RNaseZAP, Ambion, Inc. cat. no. 9780)
5. RNase-free water
6. Μάρτυρας μοριακού βάρους (Agilent RNA 6000 Ladder #5067-1529)
7. Φθορίζουσα χρωστική (RNA Nano Dye Concentrate)
8. Μάρτυρας ελάχιστου και μέγιστου μοριακού βάρους (Agilent RNA 6000 Nano Marker)
9. Gel ηλεκτροφόρησης (Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος του απομονωμένου RNA ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο.

- Αρχικά πραγματοποιείται πλύση των τριχοειδών σωληναρίων του αναλυτή. Η πλύση περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο τοποθετούνται στην πλακέτα πλύσης 350μl διαλύματος καταστροφής RNAασών (RNaseZAP) και στην συνέχεια η πλακέτα αφήνεται στο μηχάνημα για 1 λεπτό. Στο δεύτερο στάδιο τοποθετούνται σε μια δεύτερη πλακέτα πλύσης 350μl RNase-free water και πραγματοποιείται δεύτερη πλύση που διαρκεί 10sec.
- Στη συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία του gel ηλεκτροφόρησης. Σε ένα σωληνάριο ηλεκτροφόρησης με φίλτρο τοποθετούνται με την βοήθεια μια πιπέτας 65μl από το Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 4000rpm για 10min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης η στήλη με το φίλτρο απορρίπτεται.
- Έπειτα, προστίθεται στο gel 1μl χρωστικής (RNA Nano Dye Concentrate) και το μείγμα αναδεύεται με την βοήθεια της συσκευής vortex μέχρι ότου να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μείγμα.
- Από το μείγμα αυτό 9μl τοποθετούνται σε μια πλακέτα RNA Nano Chip στη θέση με το σύμβολο «G».
- Η πλακέτα τοποθετείται στη συσκευή πίεσης, όπου και εφαρμόζεται πίεση για 30sec προκειμένου να στεγνώσει το gel.
- Στη συνέχεια, 9μl gel τοποθετούνται στις δύο θέσεις που βρίσκονται πάνω από την θέση «G».
- Ακολουθεί η φόρτωση 1μl του μάρτυρα μοριακού βάρους στο «πηγαδάκι» που βρίσκεται ακριβώς κάτω από τη θέση «G» καθώς και 5μl του μάρτυρα ελάχιστου και μέγιστου μοριακού βάρους.

- Έπειτα, τα δείγματα προετοιμάζονται με θερμική αποδιάταξη στους 70°C για 2 min και 1μl από το κάθε ένα τοποθετείται στα «πηγαδάκια» της πλακέτας που αντιστοιχούν στα δείγματα, μαζί με 5μl του μάρτυρα ελάχιστου και μέγιστου μοριακού βάρους. Σε όσες θέσεις δεν τοποθετηθεί δείγμα, αυτό αντικαθίσταται με την αντίστοιχη ποσότητα RNase-free water.
- Η πλακέτα εισάγεται στο μηχάνημα Bioanalyzer Agilent 2100 και επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα στον υπολογιστή για την ανάλυση των δειγμάτων RNA.



**Εικόνα 11:** Απεικόνιση της ποιότητας των 7 RNA δειγμάτων με την χρήση RNA 6000 Nano Bioanalyzer kit. Οι κορυφές των διαγραμμάτων απεικονίζουν κατά σειρά την αλληλουχία μάρτυρα (25nt), την 18S ριβοσωμική υπομονάδα και την 28S ριβοσωμική υπομονάδα. Η ποιότητα των δειγμάτων κρίνεται ως ικανοποιητική σε όλα τα δείγματα (RNA Integrity Number-RIN>8.5)

### 3.3.3. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).

Μετά την απομόνωση του RNA ακολουθεί η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέσω της μεθόδου της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια και το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript III. Για εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες stem loop τεχνολογίας ειδικό για κάθε μη κωδικό μόριο RNA. Συμπληρωματικό DNA συντίθεται και για το microRNA U6, το οποίο χρησιμοποιείται ως «γονίδιο αναφοράς», επειδή εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Το μηχάνημα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση cDNA είναι το Veriti 96-Well Thermal Cycler της εταιρίας Applied Biosystems. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κάθε δείγματος αναγράφονται παρακάτω:

#### 1<sup>ο</sup> στάδιο σύνθεσης συμπληρωματικού DNA

1. Stem loop primers: 1μl (οι αλληλουχίες καταγράφονται στον Πίνακα 3)
2. dNTPs: 1μl
3. RNA κάθε δείγματος (ο ακριβής όγκος για κάθε δείγμα καταγράφεται στον πίνακα 4)
4. dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 13μl

**Πίνακας 3:** Καταγραφή των αλληλουχιών των stem loop primer που χρησιμοποιήθηκαν.

MicroRNA	Αλληλουχία stem loop primer
U6	5'-CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCGTTC-3'
miR-128-3p	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGAAAAGAGA-3'

**Πίνακας 4:** Καταγραφή της ποσότητας RNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Κωδικός δείγματος	Ποσότητα RNA (μl)
MOA13	3μl
MOA7	5μl
MOA1	3μl
BMS-MOA7	3μl
MOA4	2μl
Thal1	3μl
B3A	2μl

#### 2<sup>ο</sup> στάδιο σύνθεσης συμπληρωματικού DNA

1. 5x Buffer: 4μl
2. DTT: 9μl
3. SuperScript III (200U/μl): 0,5μl

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με βάση το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Αρχικά, τοποθετούνται σε eppendorf όλα τα αντιδραστήρια κάθε δείγματος για τον 1<sup>ο</sup> κύκλο της αντίδρασης (συνολικός όγκος 13μl).
- Έπειτα, τα δείγματα θερμαίνονται στους 65°C για 5 λεπτά προκειμένου να αναδιαταχτούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA.
- Μετά το πέρας αυτών, παραμένουν στον πάγο για 5 λεπτά ώστε να σταματήσει η αντίδραση.
- Στο 2<sup>ο</sup> στάδιο της αντίδρασης, προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (συνολικός όγκος 18.5μl) και τα eppendorf τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA ακολουθώντας τα παρακάτω στάδια:
  - 25°C, 5 λεπτά
  - 50°C, 60 λεπτά
  - 70°C, 15 λεπτά
  - 4°C

Για την επιβεβαίωση της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιείται ενίσχυση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα μη κωδικά RNA με τη χρήση primers μέσω της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Πρόκειται για μια τεχνική, όπου μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται η επιμήκυνση ενός τμήματος DNA μέσω της χρήσης κατάλληλων ευκίνητων οι οποίοι υβριδοποιούνται δεξιά και αριστερά του τμήματος που θα ενισχυθεί. Εκτός από το εκμαγείο DNA (cDNA σε αυτή την περίπτωση) και τους εκκινητές προστίθενται νουκλεοτίδια και η κατάλληλη DNA πολυμεράση. Την πιο συνηθισμένη αποτελεί η Taq πολυμεράση, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στο γεγονός ότι είναι θερμοανθεκτική και λειτουργική στις υψηλές συνθήκες αποδιάταξης της αλυσίδας του DNA.

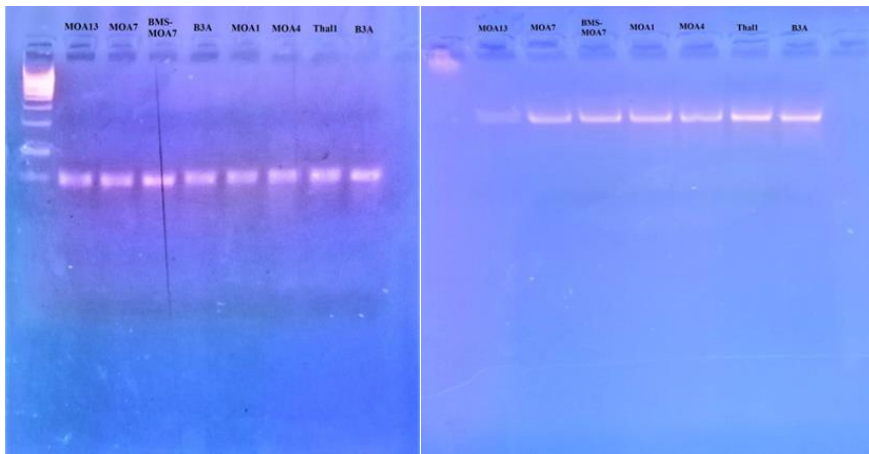
Κάθε μείγμα της αντίδρασης περιέχει:

- cDNA 2μl
- Εκκινητής Forward 1μl
- Εκκινητής Reverse 1μl
- Master Mix (Dream Taq Green MM) 12,5 μl
- Δις απεσταγμένο νερό 7,5 μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόζονται για την ενίσχυση των δειγμάτων είναι οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95°C για 90sec
- Ακολουθούν 35 κύκλοι:
  - Αποδιάταξη στους 95°C για 30sec
  - Υβριδισμός εκκινητών στους 60°C για 30sec
  - Επιμήκυνση στους 72°C για 60sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά
- Τερματισμός αντίδρασης στους 4°C

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης της PCR, για τον έλεγχο της παρουσίας των επιθυμητών τμημάτων, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% με χρήση μάρτυρα πρότυπου μοριακού βάρους 50bp (GeneON, Ludwigshafen, Germany). Στην Εικόνα 12 απεικονίζεται το αποτέλεσμα των ηλεκτροφορήσεων των δύο μη κωδικών μορίων: του microRNA αναφοράς U6 (αριστερά) και του hsa-miR-128-3p (δεξιά). Όπως γίνεται φανερό, σε όλα τα δείγματα εντοπίζονται τα συγκεκριμένα microRNA. Επιπλέον, όλες οι μπάντες τόσο για το U6 όσο και για το microRNA 128-3p εντοπίζονται στο αναμενόμενο μέγεθος.



**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση του microRNA U6 (αριστερά) και του hsa-miR-128-3p (δεξιά).

### 3.3.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time polymerase chain reaction), πρόκειται για μια τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA. Η μέθοδος της real time PCR βασίζεται στην απλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Χαρακτηριστικό της αποτελεί το γεγονός, ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται σε πραγματικό χρόνο, στην εκθετική φάση, στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης. Η real-



time PCR στηρίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών ουσιών, με πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αυτές που προσδένονται στο DNA, καθώς και στην ανίχνευση του σήματος του φθορισμού που παράγεται από την σύνδεση. Αύξηση στην ανίχνευση του σήματος παρατηρείται στο στάδιο επιμήκυνσης, όπου το DNA πολλαπλασιάζεται με αποτέλεσμα να προσδένονται σε αυτό όλο και περισσότερα μόρια χρωστικής. Ωστόσο, εκτός από τις τεχνικές που χρησιμοποιούν φθορίζουσες ουσίες που παρεμβάλλονται στο DNA, υπάρχουν και άλλες, οι οποίες βασίζονται στη χρήση Μοριακών σηματοδοτών, Μορίων υβριδισμού και υδρολυόμενων μορίων. Στο τέλος της αντίδρασης, σχηματίζεται μια γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot), ένα γράφημα δηλαδή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης. Σημαντικό σημείο της παράστασης αποτελεί το Ct (Cycle threshold), το οποίο αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης, όπου ο αριθμός των αντιγράφων του DNA είναι τέτοιος ώστε να γίνει ανιχνεύσιμο το σήμα. Η τιμή Ct είναι απαραίτητη για τη σχετική ποσοτικοποίηση, δηλαδή για την συγκριτική ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα, σε σχέση με ένα άλλο δείγμα calibrator (βαθμονομητής). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος συγκριτικού Ct, η οποία ορίζεται από τον τύπο  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγμα}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$  με την χρήση ενός γονιδίου αναφοράς (σταθερής έκφρασης) για κανονικοποίηση.

Στην παρούσα εργασία, η Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μικρών μη κωδικών μορίων RNA U6 και hsa-miR-128-3p. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green η οποία απορροφά στα 497nm και προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Η διαδικασία της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95<sup>0</sup>C
2. Σύνδεση των εκκινητών σε θερμοκρασία ανάλογη της σύνθεσής τους.
3. Θέρμανση του μίγματος στους 68-72<sup>0</sup>C, ώστε η Taq πολυμεράση να

πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA, με χρήση dNTPs

Αξίζει να σημειωθεί πως η χρονική διάρκεια κάθε σταδίου δεν είναι συγκεκριμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από το μήκος (bp) του DNA-τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί.

Για την πραγματοποίηση της real time PCR είναι απαραίτητα τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. cDNA των δειγμάτων
2. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
3. Εκκινητές (5μM) για τα μη κωδικά μόρια RNA, οι αλληλουχίες των οποίων καταγράφονται στον Πίνακα 5.
4. Δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) (DEMO S.A.)

**Πίνακας 5:** Αλληλουχίες εκκινητών για την real time PCR.

MicroRNA	Forward primer	Reverse primer
U6	5'GCTTCGGCAGCACATATAC TAAAAT-3'	5'-CTCACACCGTGTCTGTTCCA-3'
miR-128-3p	5'ACACTCCAGCTGGGTCAC AGTGAACCGGTC-3'	5'TGGTGTCTGTTGGAGTCTG-3'

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου περιγράφεται παρακάτω.

- Τα μείγματα της αντίδρασης προετοιμάζονται, παρασκευάζοντας διαφορετικό μείγμα με διαφορετικούς εκκινητές για κάθε μη κωδικό RNA. Σε κάθε μείγμα περιέχονται 5μl SYBR Select Master Mix, 0,3μl του forward εκκινητή, 0,3μl του reverse εκκινητή και 2,4μl ddH<sub>2</sub>O.
- Στην συνέχεια 8μl του μείγματος τοποθετείται σε κάθε πηγαδάκι του ειδικού πιάτου Real Time PCR 96 θέσεων.
- Έπειτα προστίθενται 2μl από το κατάλληλο δείγμα cDNA σε κάθε πηγαδάκι και πραγματοποιείται ανάδευση με την χρήση πιπέτας.
- Το πιάτο τοποθετείται στο μηχάνημα Real Time PCR όπου ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:
  - Αποδιάταξη στους 95<sup>0</sup>C
  - 45 κύκλοι με 3 στάδια στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου
    - Αποδιάταξη στους 95<sup>0</sup>C
    - Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60<sup>0</sup>C
    - Επιμήκυνση στους 72<sup>0</sup>C

- Τελική επιμήκυνση στους 72<sup>0</sup>C

### **3.3.5. Στατιστική ανάλυση.**

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS και πιο συγκεκριμένα η μη παραμετρική δοκιμασία Mann Whitney test. Η τιμή p-value<0,05 ορίστηκε ως όριο στατιστικής σημαντικότητας.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Καλλιέργεια των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs).

Πρώτο βήμα για την ανάπτυξη των iMSCs αποτέλεσε η καλλιέργεια των iPSCs, που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια προηγούμενου ερευνητικού project, μέχρι ο αριθμός κυττάρων να φτάσει σε ικανοποιητικό βαθμό, ώστε να πραγματοποιηθεί η διαφοροποίησή τους σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Η ανάπτυξη τους και οι επακόλουθες αλλαγές στη μορφολογία τους παρατηρούνταν καθημερινά με την χρήση του ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου και του 40x φακού.

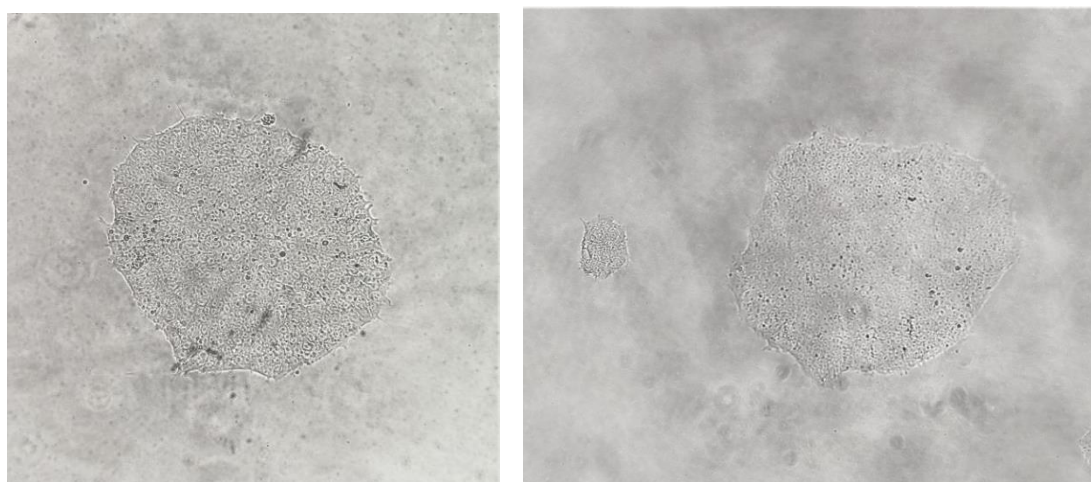
Η πρώτη παρατήρηση έγινε την πρώτη μέρα καλλιέργειας τους, δηλαδή 24h μετά το ξεπάγωμα και τη τοποθέτηση τους σε 25T φλάσκες με θρεπτικό υλικό mTeSR1 και αναστολέα του μονοπατιού ROCK (Rho inhibitor). Στην Εικόνα 13 απεικονίζεται μια αποικία iPSCs, όπου τα iPSCs κύτταρα προήλθαν μετά από επαναπρογραμματισμό MSCs απόμου με οστεοαρθρίτιδα. Η αποικία φαίνεται πως έχει ένα χαρακτηριστικό «ατρακτοειδές» σχήμα με προεξοχές, κάτι το οποίο οφείλεται στην προσθήκη του αναστολέα Rho. Αξίζει να σημειωθεί, πως γύρω από την αποικία γίνεται φανερός ο χαρακτηριστικός λευκός, φωτεινός δακτύλιος κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο αφού τα κύτταρα αυτά είναι σε αδιαφοροποίητη κατάσταση.



**Εικόνα 13:** Αποικία iPSCs προερχόμενα από άτομα με ΟΑ, 24h μετά το ξεπάγωμα. Φωτογραφία ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου με χρήση 40x φακού.

Από την ημέρα αυτή και έπειτα, η καλλιέργεια των iPSCs παρατηρούνταν καθημερινά με τη χρήση του ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου. Ενδεικτικά, στην Εικόνα 14 παρουσιάζεται η αποικία της Εικόνας 13, την 2<sup>η</sup> (αριστερά) και την 3<sup>η</sup> (δεξιά) μέρα

καλλιέργειας. Από αυτές τις φωτογραφίες γίνεται εύκολα αντιληπτό, πως το μέγεθος της αποικίας έχει αυξηθεί. Επιπλέον, εντοπίζεται και μια ακόμα σημαντική διαφορά: οι αποικίες δεν έχουν πια τη χαρακτηριστική «ατρακτοειδή» μορφή με τις προεξοχές που είχαν την πρώτη μέρα καλλιέργειας. Αντίθετα, είναι σφαιρικές με λιγότερες μικρές προεξοχές την 2<sup>η</sup> μέρα (αριστερά) και σχεδόν καθόλου προεξοχές την 3<sup>η</sup> (δεξιά). Αυτό οφείλεται στην προσθήκη θρεπτικού χωρίς αναστολέα Rho. Στην Εικόνα 15 απεικονίζονται οι αποικίες των iPSCs μετά την ανακαλλιέργεια τους, όπου έχουν σπάσει σε μικρότερες. Μορφολογικά ομοιάζουν αυτές της Εικόνας 14 εφόσον το θρεπτικό που χρησιμοποιείται και μετά την ανακαλλιέργεια τους δεν περιέχει αναστολέα Rho.



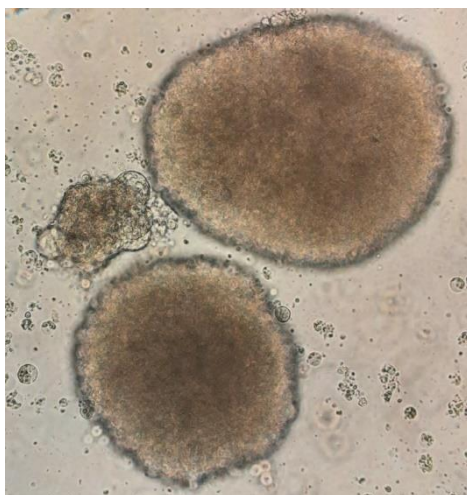
**Εικόνα 14:** Αποικία iPSCs προερχόμενα από άτομα με ΟΑ, την 2<sup>η</sup> (αριστερά) και την 3<sup>η</sup> (δεξιά) μέρα καλλιέργειας. Φωτογραφία οπτικού ανάστροφου μικροσκοπίου με χρήση 40x φακού.



**Εικόνα 15:** Αποικίες iPSCs προερχόμενα από άτομα με ΟΑ μετά την ανακαλλιέργεια τους σε νέα φλάσκα. Φωτογραφία οπτικού ανάστροφου μικροσκοπίου με χρήση 40x φακού.

#### **4.1.1. Σχηματισμός των εμβρυονικών σωματίων (Embryoid bodies).**

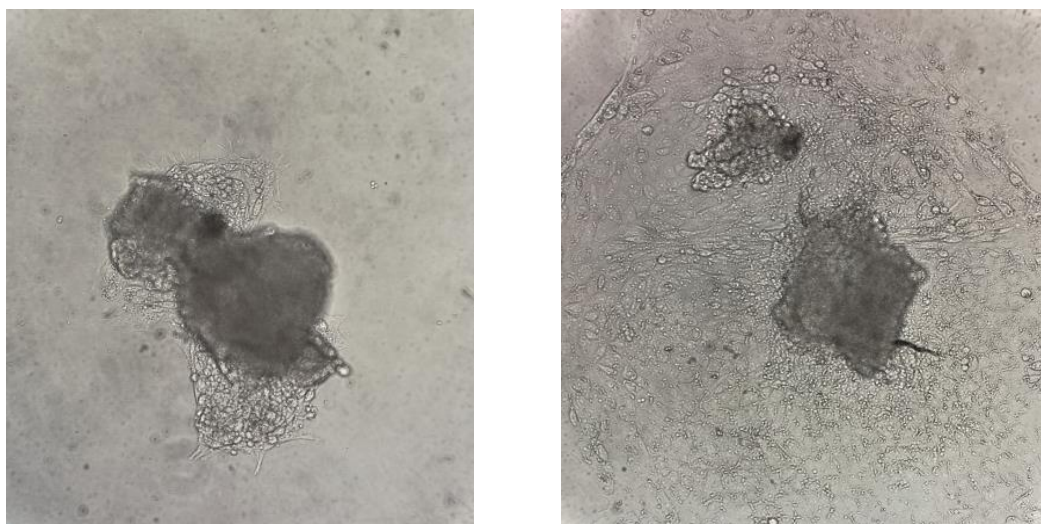
Η διαφοροποίηση των iPSCs σε iMSCs πραγματοποιήθηκε μέσω της δημιουργίας εμβρυονικών σωματίων. Στην Εικόνα 16 απεικονίζονται οι δομές των εμβρυονικών σωματίων όπως φαίνονται στον 40x φακό του ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου. Όπως γίνεται αντιληπτό από την εικόνα, τα σωματίδια έχουν χαρακτηριστική σφαιρική δομή γεγονός που οφείλεται στο ότι προσομοιάζουν το στάδιο της γαστριδίωσης στην βλαστοκύστη, όπου πραγματοποιείται ο σχηματισμός των τριών βλαστικών δερμάτων. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν καταφέρνουν όλα τα κύτταρα να γίνουν εμβρυονικά σωματίδια. Τα μεμονωμένα κύτταρα πεθαίνουν. Αυτό εμφανίζεται στην εικόνα ως μαύρα στίγματα γύρω από τα σχηματισμένα εμβρυονικά σωματίδια.



**Εικόνα 16:** Τα εμβρυονικά σωματίδια (embryoid bodies) όπως φαίνονται στον 40x φακό του ανάστροφου μικροσκοπίου.

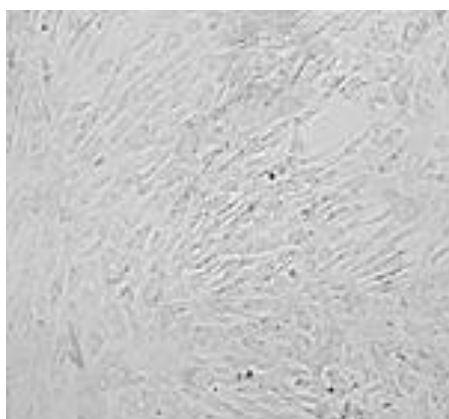
#### **4.1.2. Μεταφορά εμβρυονικών σωματίων σε ζελατίνη και ανάπτυξη των επαγόμενων μεσεγχυματικών κυττάρων.**

Στην Εικόνα 17 απεικονίζεται η μορφή των εμβρυονικών σωματίων 24h (δεξιά) και 48h (αριστερά) μετά την μεταφορά τους με σύριγγα σε 25T φλάσκα μετά από επίστρωση με ζελατίνη. Παρατηρείται πως πλέον δεν είναι σφαιρικά καθώς έχει πραγματοποιηθεί κατακερματισμός τους με τη βοήθεια της σύριγγας. Επιπλέον, τόσο στη δεξιά όσο και στην αριστερή εικόνα φαίνεται πως έχει αρχίσει να πραγματοποιείται «άπλωμα» των κυττάρων του μεσοδέρματος πάνω στη ζελατίνη, ώστε να αρχίσουν να διαφοροποιούνται σε μεσεγχυματικά με τη βοήθεια του αυξητικού παράγοντα FGF-2.



**Εικόνα 17:** Τα εμβρυονικά σωματίδια μετά την μεταφορά τους σε ζελατίνη 24h (δεξιά) και 48h (αριστερά). Τα μεσοδερμικά κύτταρα έχουν ξεκινήσει να απλώνονται πάνω στην ζελατίνη για την έναρξη της διαφοροποίησης τους σε iMSCs. Φωτογραφία οπτικού ανάστροφου μικροσκοπίου με χρήση 40x φακού.

Στην Εικόνα 18 απεικονίζονται τα επαγόμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέκυψαν, επτά μέρες μετά την μεταφορά των εμβρυονικών σωματίων σε ζελατίνη και με χρήση θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Η μορφολογία τους είναι η χαρακτηριστική των μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα κύτταρα εμφανίζονται πεπλατισμένα και έχουν επίμηκες σχήμα όπως ακριβώς και τα MSCs.



**Εικόνα 18:** Επαγόμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (iMSCs). Φωτογραφία οπτικού ανάστροφου μικροσκοπίου με χρήση 40x φακού.

#### **4.2. Δίκτυο αλληλεπίδρασης μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA) και γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs.**

Για τη δημιουργία του δικτύου αλληλεπιδράσεων microRNA και γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από πειραματικό project του εργαστηρίου, στο οποίο μετά από αλληλούχιση ολικού RNA με την τεχνολογία του Next Generation Sequencing (NGS), προέκυψε μια λίστα γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs. Στη συνέχεια, τα γονίδια αυτά εισηχθήσαν σε βάσεις δεδομένων αναζήτησης μικρών μη κωδικών μορίων RNA (mirWalk, MirDB και Targetscan), μέσα από τις οποίες προέκυψε μια λίστα microRNA, τα οποία εμφανίζουν συμπληρωματικότητα και αλληλεπιδρούν με την 3' ή την 5' αμετάφραση περιοχή (ακόμα και την κωδική περιοχή σε κάποιες περιπτώσεις) των mRNA αυτών των γονιδίων. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων microRNA με γονίδια-στόχους τους (Εικόνας 19) μέσω του προγράμματος Cytoscape.

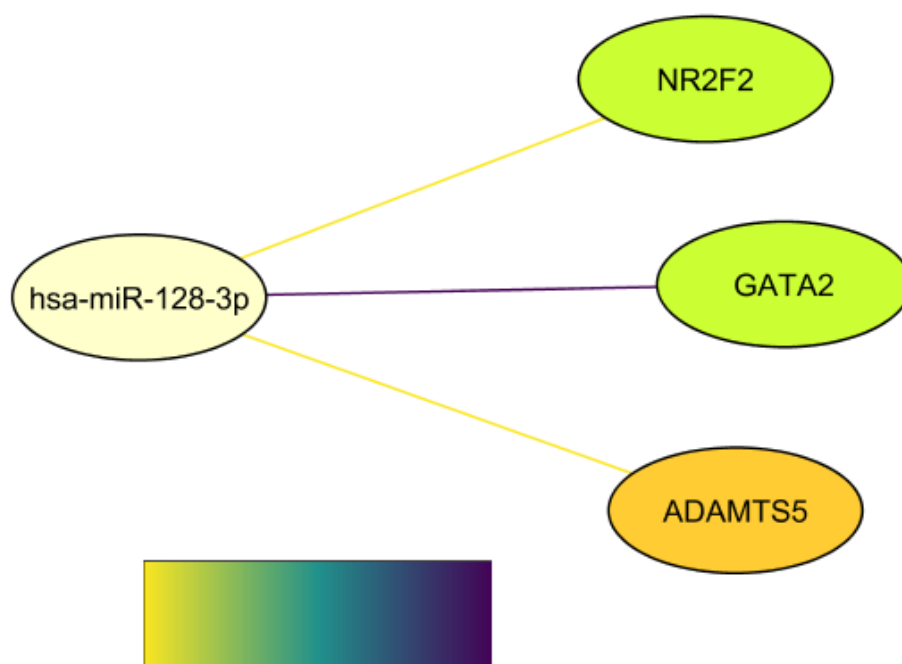
Στο δίκτυο αυτό, με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση είναι αυξημένη στα iMSCs σε σχέση με τα OA-MSCs. Αντίστοιχα, με πορτοκαλί συμβολίζονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση εμφανίζεται μειωμένη στα iMSCs συγκριτικά με τα OA-MSCs. Επιπλέον, με κίτρινο απεικονίζονται τα microRNA. Όσον αφορά την ειδικότητα αλληλεπίδρασης του κάθε microRNA με το mRNA του γονιδίου στόχου, αυτή σημειώνεται με διαφορετικό χρώμα, η σημασία του οποίου φαίνεται στο υπόμνημα της εικόνας. Αναλυτικότερα, όσο αυξάνεται η ειδικότητα πρόσδεσης τόσο γίνεται πιο σκούρο το χρώμα στην κλίμακα των χρωμάτων.





#### 4.2.1. Δίκτυο αλληλεπίδρασης του hsa-miR-128-3p με τα γονίδια στόχους του.

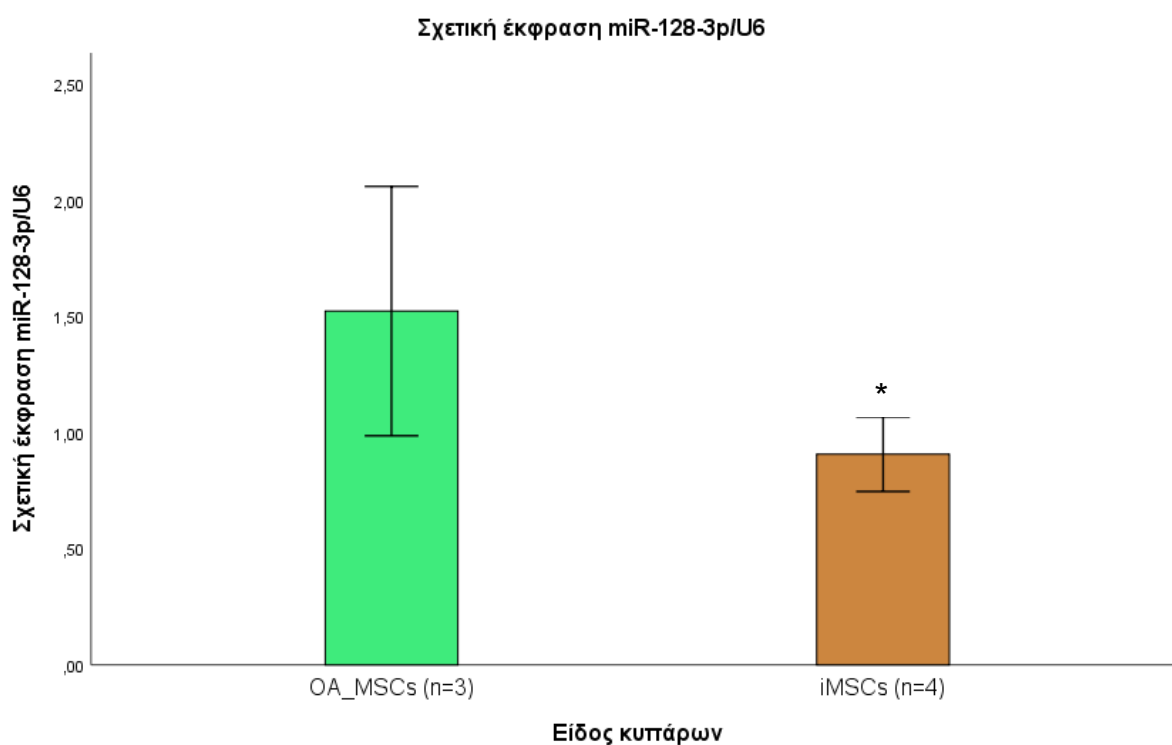
Την κατασκευή του παραπάνω δικτύου αλληλεπιδράσεων ακολούθησε η επιλογή ενός microRNA για μελέτη των επιπέδων έκφρασης μέσω real time PCR σε μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από άτομα με οστεοαρθρίτιδα (OA-MSCs) και σε επαγόμενα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από υγιή άτομα (iMSCs(normal)) και άτομα που νοσούν (iMSCs(OA)). Έτσι, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιλέχθηκε για μελέτη το hsa-miR-128-3p. Η επιλογή βασίστηκε σε βιβλιογραφική αναζήτηση του ρόλου του συγκεκριμένου microRNA τόσο στη νόσο όσο και στα υγιή κύτταρα. Στην Εικόνα 20 απεικονίζεται το δίκτυο αλληλεπίδρασης του hsa-miR-128-3p με τα τρία βασικά γονίδια των οποίων ρυθμίζει την έκφραση: *NR2F2*, *GATA2* και *ADAMTS5*.



**Εικόνα 20:** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-128-3p και των γονιδίων που ρυθμίζει την έκφραση. Δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος Cytoscape v\_3.7.2.

#### 4.2.2. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε OA-MSCs και iMSCs.

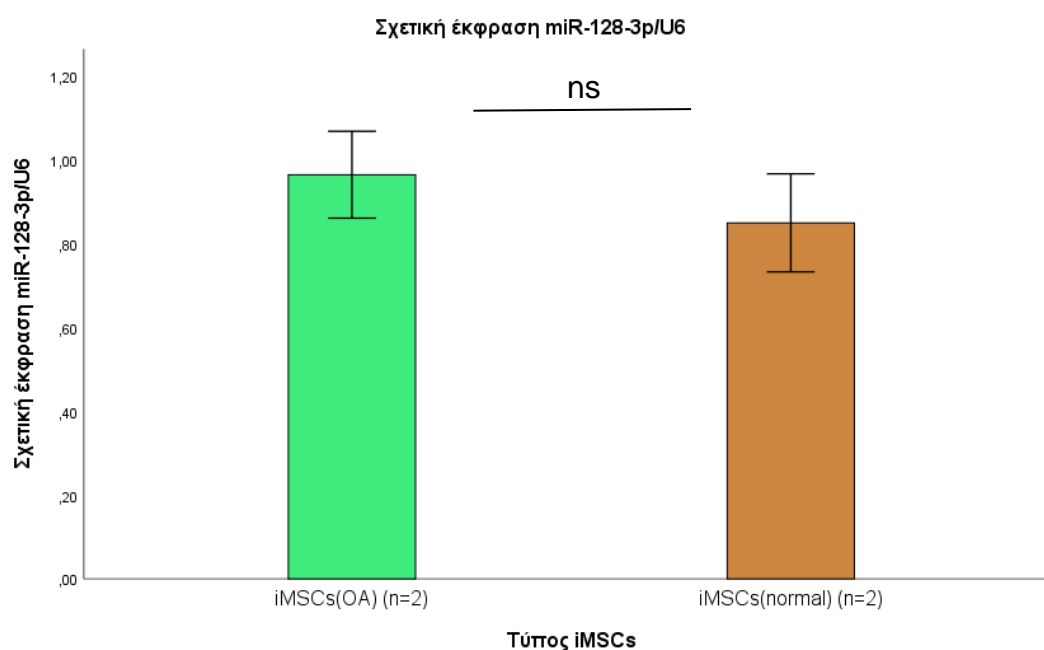
Από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, τόσο οστεοαρθρικά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα όσο και επαγόμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, απομονώθηκε RNA, μετατράπηκε σε cDNA και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μικρού μη κωδικού RNA hsa-miR-128-3p. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης του hsa-miR-128-3p μεταξύ των δύο ειδών κυττάρων (Εικόνα 21). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-128-3p ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα οστεοαρθρικά MSCs συγκριτικά με τα iMSCs ( $p=0,034$ , μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney).



**Εικόνα 21:** Τα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε OA-MSCs και iMSCs. Τα επίπεδα είναι ομαλοποιημένα ως προς το miRNA αναφοράς U6. \* $p<0,05$ .

#### 4.2.3. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε iMSCs προερχόμενα από υγιή άτομα και iMSCs προερχόμενα από άτομα με ΟΑ.

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνησουμε αν τα iMSCs που προέρχονται από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ομοιάζουν το προφίλ έκφρασης του hsa-miR-128-3p των iMSCs από υγιή άτομα πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου microRNA στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο της real time PCR, έδειξαν πως δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του hsa-miR-128-3p μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών iMSCs (Εικόνα 22). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-128-3p ήταν σχεδόν όμοια ( $p=0,121$ , μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney).



**Εικόνα 22:** Τα επίπεδα έκφρασης του hsa-miR-128-3p σε iMSCs(OA) και iMSCs(normal). Τα επίπεδα είναι ομαλοποιημένα ως προς το microRNA αναφοράς U6.  $p>0,05$ .

### **4.3. Κατασκευή δικτύου αλληλεπίδρασης μακρών μη κωδικών μορίων RNA (lncRNA) με διαφορική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs και μικρών μη κωδικών μορίων (miRNA).**

Για τη δημιουργία του δικτύου αλληλεπιδράσεων long non coding RNA και microRNA χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από πειραματικό project του εργαστηρίου, όπου μετά από ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης RNA (NGS) σε MSCs και iMSCs κύτταρα, προέκυψε μια λίστα με συγκεκριμένα lncRNA, τα οποία παρουσίαζαν διαφορική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs. Έπειτα, τα lncRNA εισήχθησαν στη βάση δεδομένων LncBase v.3-Dianna Tools, μέσα από την οποία εντοπίστηκε ποια από τα microRNA του δικτύου της Εικόνας 19 στοχεύει το κάθε long non-coding RNA. Χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα, μέσω του προγράμματος Cytoscape κατασκευάστηκε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων long non-coding RNA-microRNA της Εικόνας 23.

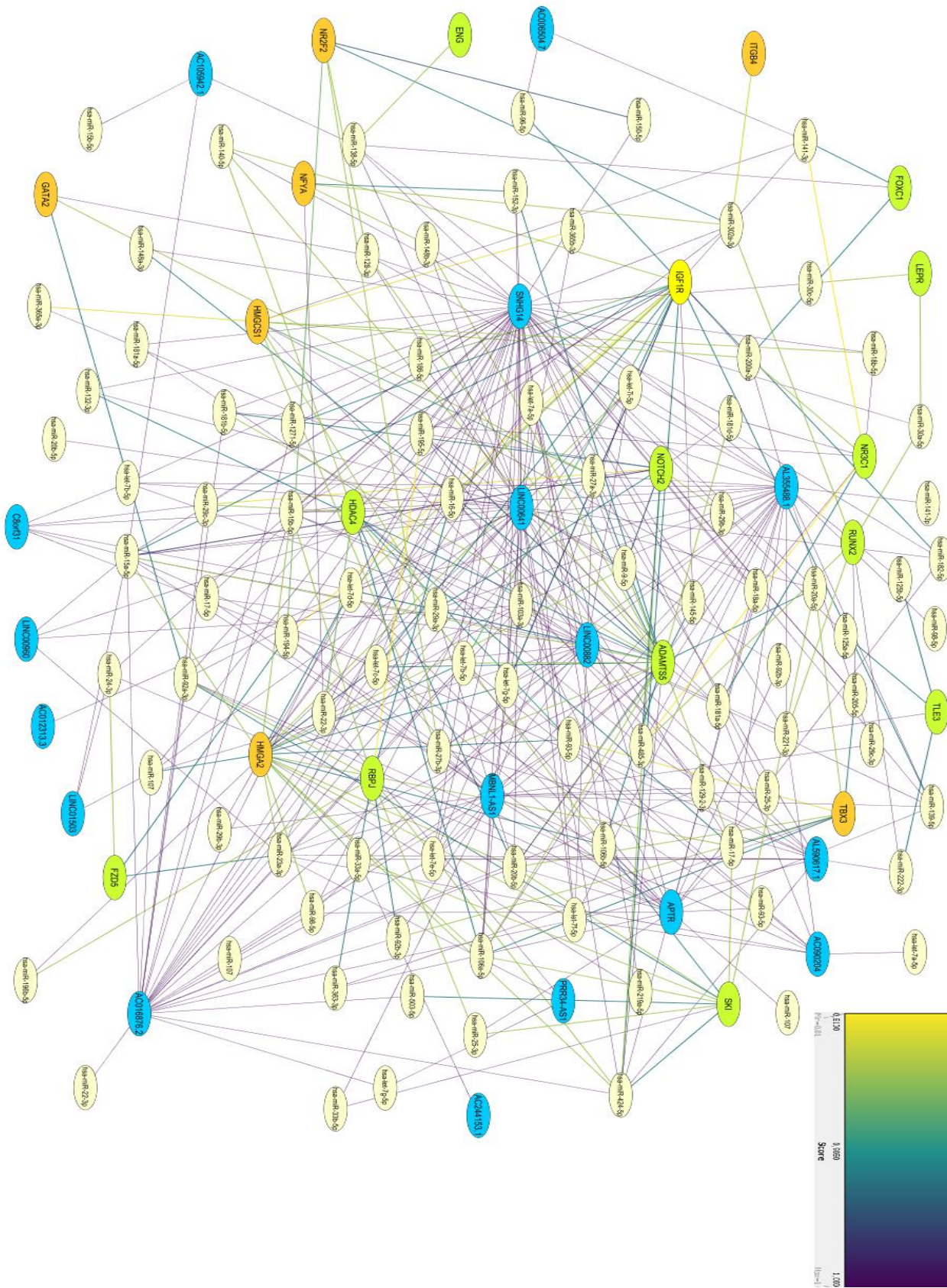
Στο παρών ανταγωνιστικό δίκτυο αλληλεπίδρασης με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα long non-coding RNA ενώ με κίτρινο τα microRNA, όπως και στο δίκτυο της Εικόνας 19. Σχετικά με την ειδικότητα σύνδεσης των μακρών με τα μικρά μη κωδικά RNA, αυτή θεωρήθηκε παντού η ίδια και υψηλή, όπως προέκυψε από την βάση δεδομένων.



#### **4.4. Κατασκευή ολικού ανταγωνιστικού δικτύου αλληλεπίδρασης μακρών μη κωδικών μορίων RNA (lncRNA), μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNA) και γονιδίων με διαφορεική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs.**

Για την απεικόνιση όλων των αλληλεπιδράσεων σε ένα συνολικό δίκτυο, συνδυάστηκε το σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των επιμέρους δικτύων των Εικόνων 19 και 23. Η δημιουργία του δικτύου της Εικόνας 24 έγινε μέσω της χρήσης του προγράμματος Cytoscape. Αυτό περιλαμβάνει τις σχέσεις μεταξύ long non-coding RNA, microRNA και γονιδίων.

Στην Εικόνα 24, ομοίως με τα δίκτυα των Εικόνων 19 και 23, με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια, με αυξημένη έκφραση στα iMSCs σε σχέση με τα OA-MSCs ενώ με πορτοκαλί συμβολίζονται τα γονίδια με μειωμένη. Αντίστοιχα, με μπλε συμβολίζονται τα long non-coding RNA και με κίτρινο τα microRNA. Όσον αφορά την ειδικότητα αλληλεπίδρασης, αυτή για τα μακρά με τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA θεωρήθηκε παντού η ίδια και υψηλή, ενώ για τα microRNA με τα mRNA των γονιδίων στόχων, απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα, η σημασία του οποίου φαίνεται στο υπόμνημα της εικόνας.



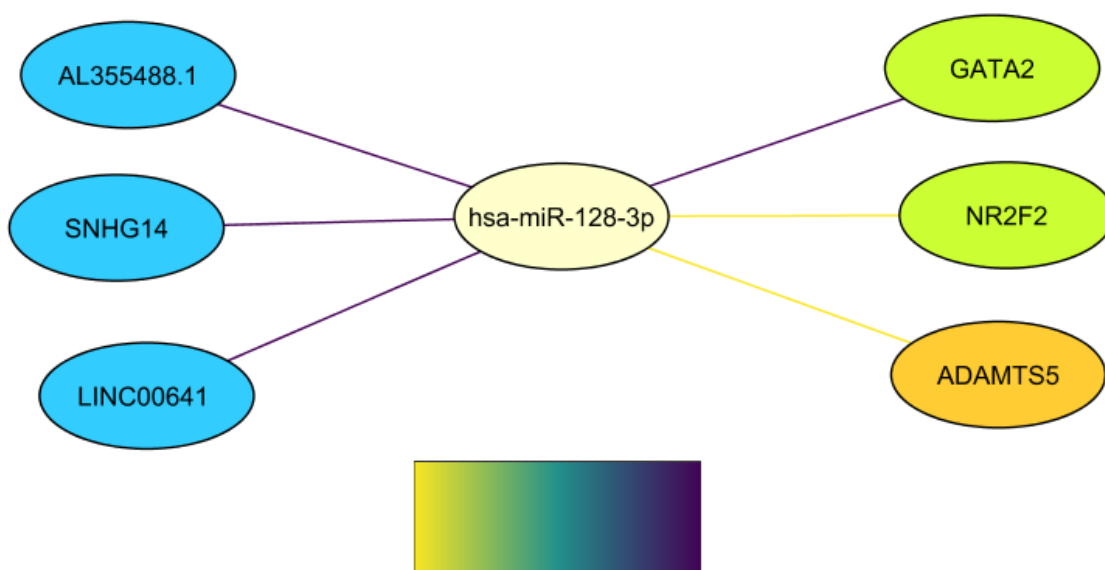
**Εικόνα 24:** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων long non-coding RNA-microRNA-γονιδίων. Δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος Cytoscape v\_3.7.2.



#### 4.5. Μελέτη του «άξονα» αλληλεπίδρασης lncRNA/has-miR-128-3p/γονίδια στόχοι.

Από το σύνολο των long non-coding RNA που βρέθηκε πως έχουν διαφορετική έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs, επιλέχθηκαν για μελέτη στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αυτά που στοχεύουν το hsa-miR-128-3p. Αναλυτικότερα, αυτά είναι τρία: το LINK00641, το AL355488.1 και το SNHG14. Έτσι, μέσω του προγράμματος Cytoscape κατασκευάστηκε το ολικό ανταγωνιστικό δίκτυο που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο microRNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 25.

Οι χρωματικοί συμβολισμοί των μη κωδικών μορίων και των γονιδίων είναι οι ίδιοι με τα δίκτυα των Εικόνων 19, 20, 23 και 24. Σχετικά με το συμβολισμό της ειδικότητας αλληλεπίδρασης των μορίων, ακολουθήθηκε το ίδιο μοτίβο με τα προαναφερθέντα δίκτυα, όπως φαίνεται και από το υπόμνημα της Εικόνας.



**Εικόνα 25:** Το ανταγωνιστικό δίκτυο των long non-coding RNA, που στοχεύουν το hsa-miR-128-3p, καθώς και των γονιδίων των οποίων ρυθμίζει την έκφραση το microRNA. Δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος Cytoscape v\_3.7.2.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου έχουν και οι επιγενετικοί παράγοντες και κυρίως τα μη-κωδικά μόρια RNA (microRNA και long non-coding RNA). Τα μόρια αυτά μέσω της αυξημένης ή της μειωμένης έκφρασής τους στον παθολογικό ιστό, ενισχύουν ή καταστέλλουν μοριακά μονοπάτια, συμμετέχοντας σε όλα τα στάδια της παθογένεσης της νόσου (Abbasifard et al., 2020; Pioroulos et al., 2008). Μάλιστα, το ενδιαφέρον που παρουσιάζεται για την μελέτη των μη κωδικών μορίων είναι μεγάλο, καθώς έχει αποδειχτεί η μεγάλη συμβολή τους στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου, είτε μέσω της αυτοκρινούς, είτε μέσω της παρακρινούς δράσης τους. Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος τους έγκειται στην επαγωγή της χονδρογένεσης, στην αποφυγή της απόπτωσης μέσω καταστολής σηματοδοτικών μονοπατιών που την επάγουν όπως το NF-κβ, στην παραγωγή των συστατικών της ECM, καθώς και στη μείωση της παραγωγής φλεγμονοδών μορίων και της ανώμαλης αγγειογένεσης (Born et al., 2020; Lara-Barba et al., 2021; Razmara et al., 2019).

Η προσπάθεια αναγέννησης του αρθρικού χόνδρου αποτέλεσε το βασικό λόγο της έναρξης προσπαθειών για κυτταρική θεραπεία του νοσήματος με χρήση διάφορων κυτταρικών τύπων, που θα μπορούσαν να αναστρέψουν το φαινότυπο της ΟΑ, αναγεννώντας τον ιστό και αποκαθιστώντας τη φυσιολογική δομή της άρθρωσης. Έναν από αυτούς αποτελούν τα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs) προερχόμενα από μυελό των οστών (BM-MSCs), τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα και να ενεργοποιήσουν τα προγονικά κύτταρα της άρθρωσης, μέσω της παρακρινούς δράσης τους, για αποκατάσταση του χόνδρου. Όμως, λόγω των μειονεκτημάτων που εμφανίζουν μεταξύ των οποίων η γήρανση, το μικρό ποσοστό επιβίωσης και η ετερογένεια κυτταρικού πληθυσμού, έγινε προσπάθεια χρήσης των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) (Loo & Wong, 2021; Primorac, 2020). Τα κύτταρα αυτά, παρόλο το μεγάλο πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και την ικανότητα διαφοροποίησης τους σε χονδροκύτταρα μόλις εισαχθούν στην άρθρωση, η αυτούσια χρήση τους για θεραπεία είναι αδύνατη λόγω γενετικής αστάθειας και δημιουργίας τερατωμάτων (Loo & Wong, 2021). Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί σε ένα νέο κυτταρικό τύπο των MSCs προερχόμενων από iPSCs (iMSCs). Τα κύτταρα αυτά, αν και ομοιάζουν μορφολογικά με τα MSCs, φέρουν κάποιες διαφορές σε γενετικό και επιγενετικό επίπεδο, καθώς προσομοιάζουν τα νεαρά κύτταρα. Επιπλέον,

εμφανίζουν όμοιο αναγεννητικό δυναμικό με τα iPSCs, χωρίς να έχουν την ικανότητα ογκογένεσης. (Sabarathy & Kumar, 2016; Spitzhorn et al., 2019).

Λαμβάνοντας υπόψη τα προτερήματα των iMSCs για κυτταρική θεραπεία, καθώς και τη συμβολή των μη-κωδικών μορίων RNA, τόσο στη νόσο όσο και στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου, σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της πολυεπίπεδης σχέσης καθώς και ρόλου μη-κωδικών μορίων RNA σε iMSCs. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχισης ολικού RNA (RNA-seq) με την τεχνολογία του Next Generation Sequencing από προηγούμενο ερευνητικό πρόγραμμα του εργαστηρίου, από τα οποία προέκυψε ένας αριθμός γονιδίων, τα οποία εμφανίζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ MSCs και iMSCs προερχόμενα από άτομα με OA. Στη συνέχεια, μέσω αναζήτησης σε βάσεις δεδομένων προέκυψε μια λίστα microRNAs, τα οποία στοχεύουν τα προαναφερθέντα γονίδια και πιθανά να εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ OA-MSCs και iMSCs κυττάρων. Από αυτή τη λίστα επιλέχτηκε για μελέτη το hsa-miR-128-3p. Βιβλιογραφική έρευνα για το συγκεκριμένο miRNA, έδειξε πως η έκφρασή του μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία των κυττάρων που μελετώνται. Πιο συγκεκριμένα πειραματική μελέτη των Xu et al. σε ποντίκια απέδειξε πως η παρουσία του hsa-miR-128-3p είναι αυξημένη στα εξωσώματα των γερασμένων μεσεγχυματικών κυττάρων, συγκριτικά με την αντίστοιχη στα εξωσώματα των νεαρών MSCs (Xu et al., 2020). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την συγκριτική μελέτη έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA μεταξύ OA-MSCs και iMSCs στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αναλυτικότερα, σε συμφωνία με τη παραπάνω μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του hsa-miR-128-3p μεταξύ των OA-MSCs και των iMSCs. Μάλιστα, στα OA-MSCs η έκφραση ήταν σχετικά αυξημένη. Τα OA-MSCs που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία προέρχονται από ασθενείς μεγάλης ηλικίας, πρόκειται δηλαδή για γερασμένα κύτταρα. Αντίθετα, τα iMSCs, σύμφωνα με την βιβλιογραφία προσομοιάζουν τα νεαρά υγιή κύτταρα (Frobel et al., 2014; Spitzhorn et al., 2019; Wruck et al., 2021). Συνεπώς, η έκφραση του συγκεκριμένου microRNA αναμένεται μειωμένη συγκριτικά με την αντίστοιχη στα OA-MSCs, κάτι το οποίο φάνηκε να παρατηρείται στην παρούσα διπλωματική εργασία. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως η σχετικά αυξημένη έκφραση στα OA-MSCs, συμφωνεί με προηγούμενες πειραματικές μελέτες κατά τις οποίες αποδείχτηκε πως στα χονδροκύτ-

ταρα και στα MSCs ασθενών με OA το hsa-miR-128-3p εμφανίζει αυξημένη έκφραση (S. Chen & Li, 2020; Lian et al., 2018; Mihanfar et al., 2020).

Όσον αφορά τη μελέτη των long non-coding RNA στα iMSCs, χρησιμοποιήθηκαν προηγούμενα δεδομένα αλληλούχισης ολικού RNA του εργαστηρίου, από τα οποία μελετήθηκε η έκφραση ορισμένων lncRNA σε OA-MSCs και iMSCs. Έτσι προέκυψε μια λίστα μακρών μη-κωδικών μορίων RNA με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων. Από αυτά τα lncRNA μόλις τρία στοχεύουν το hsa-miR-128-3p όπως προέκυψε από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων. Αυτά είναι τα: LINK00641, AL355488.1 και SNHG14. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το SNHG14, το οποίο όπως προέκυψε από την αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων προσδένεται με μεγάλη ειδικότητα στο hsa-miR-128-3p καταστέλλοντας την δράση του. Αυτό φαίνεται να συνάδει με τη μειωμένη έκφραση του hsa-miR-128-3p που βρέθηκε στα iMSCs.

Ωστόσο, πολύ λίγες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τον ρόλο του SNHG14. Οι Du et al., απέδειξαν, πως το SNHG14 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των οστεοβλαστών και την οστεογένεση κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, μια διαδικασία η οποία εμφανίζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την OA (Du et al., 2020). Κατά τα αρχικά στάδια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, στην αυξητική πλάκα (growth plate) τα χονδροκύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς, ενώ στη συνέχεια αυξάνονται σε μέγεθος και μετατρέπονται σε υπερτροφικά. Σε αυτή τη φάση, τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα ξεκινούν να παράγουν πρωτεΐνες για καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας και τον παράγοντα VEGF, ο οποίος οδηγεί σε αγγειογένεση στην περιοχή. Αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι η οστεοποίηση της αυξητικής πλάκας (Park et al., 2021). Μέσα από την περιγραφή αυτή φαίνονται τα κοινά χαρακτηριστικά με την OA: η έκφραση υπερτροφικών δεικτών στα χονδροκύτταρα (κολλαγόνο X), η αγγειογένεση, η παραγωγή πρωτεϊνών (MMP-13) για καταστροφή της ECM και η ασβεστοποίηση της άρθρωσης (Dreier, 2010). Είναι λογικό επομένως οι δύο καταστάσεις να μοιράζονται κοινά γονίδια και μη κωδικά μόρια RNA (Fan et al., 2021).

Στη παρούσα διπλωματική επίσης, μέσω της δημιουργίας του ολικού ανταγωνιστικού δικτύου αλληλεπιδράσεων για το hsa-miR-128-3p έγινε φανερό πως όπως το lncRNA που το στοχεύει, έτσι και το hsa-miR-128-3p εμπλέκεται ενεργά στην διαδικασία της

οστεογένεσης. Αυτό γίνεται φανερό από τα γονίδια που αυτό ρυθμίζει. Πιο συγκεκριμένα, έναν από τους στόχους του hsa-miR-128-3p αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την μεταλλοπρωτεΐνάση με μοτίβα θρομβοσπονδίνης 5 (*ADAMTS5*). Αυτό το ένζυμο είναι απαραίτητο κυρίως στα τελικά στάδια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης για την καταστροφή της ECM στην περιοχή που θα δημιουργηθεί το νέο οστό, ώστε να πραγματοποιηθεί είσοδος των οστεοβλαστών στην περιοχή (Djouad et al., 2007). Όσον αφορά τα άλλα δύο γονίδια στόχους του hsa-miR-128-3p, τα *NR2F2* και *GATA2*, αυτά σχετίζονται με το δυναμικό διαφοροποίησης των MSCs. Αναλυτικότερα, ο μεταγραφικός παράγοντας *NR2F2* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην χονδρογένεση ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας *GATA2* στη διαφοροποίηση των MSCs σε λιποκύτταρα (Gao et al., 2017; Kamata et al., 2014). Πρέπει ωστόσο να τονιστεί πως η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων στα iMSCs δεν ρυθμίζεται αποκλειστικά από το hsa-miR-128-3p αλλά από μια πληθώρα μη κωδικών μορίων όπως προέκυψε μέσα από τα ολικά δίκτυα αλληλεπιδράσεων που δημιουργήθηκαν.

Συμπερασματικά, μέσα από την παρούσα διπλωματική εργασία έγινε φανερό πως τα μη-κωδικά μόρια RNA μέσω πολύπλοκων ρυθμιστικών δικτύων συμβάλλουν τόσο στη διαμόρφωση των οστών και της άρθρωσης, όσο και στην παθολογία εκφυλιστικών νοσημάτων, όπως η οστεοαρθρίτιδα. Τόσο στα χονδροκύτταρα, όσο και στα MSCs μιας άρθρωσης με OA, πολλά μη-κωδικά μόρια RNA υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται συμβάλλοντας τελικά στην διαμόρφωση του φαινοτύπου. Ένα τέτοιο μη-κωδικό μόριο αποτελεί το hsa-miR-128-3p, το οποίο υπερεκφράζεται στον χόνδρο με OA και ο ρυθμιστής του το lncRNA SNHG14, που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Σχετικά με την κυτταρική θεραπεία της νόσου, ένας από τους νεότερους κυτταρικούς τύπους που θα μπορούσε δυνητικά να αναστρέψει τον OA φαινότυπο θα μπορούσε να είναι τα iMSCs, κύτταρα επαναπρογραμματισμένα με μεγάλη αναγεννητική ικανότητα, τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προσομοιάζουν τα νεαρά κύτταρα. Μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής διαδικασίας, η έκφραση των hsa-miR-128-3p και SNHG14 στα iMSCs φαίνεται να ομοιάζει αυτή των υγιών νεαρών κυττάρων. Από αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό πως μια θεραπεία βασισμένη σε χρήση αυτόλογων iMSCs ή εξωσωμάτων τους, χορηγούμενα μόνα τους ή συνδυαστικά με μόρια μιμητές ή ανταγωνιστές μη κωδικών μορίων, θα μπορούσε πιθανά να επαναφέρει τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης των miRNA και lncRNA, βοηθώντας σε

μερική, αν όχι πλήρη, αναστροφή του οστεοαρθρικού φαινοτύπου. Ωστόσο, για να συμβεί αυτό, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελλοντικά περισσότερες εργασίες, ώστε να γίνει πλήρως κατανοητός ο ρόλος των hsa-miR-128-3p και SNHG14 στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω πειραμάτων καταστολής τους με μόρια ανταγωνιστές ή πειραμάτων ενίσχυσης τους με μόρια μιμητές. Επιπρόσθετα, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περισσότερων μελετών σχετικά με το αν τα συγκεκριμένα μόρια συμμετέχουν στην «ανανέωση» των iMSCs καθώς και με ποιο τρόπο.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbasifard, M., Kamiab, Z., Bagheri-Hosseinabadi, Z., & Sadeghi, I. (2020). The role and function of long non-coding RNAs in osteoarthritis. *Experimental and Molecular Pathology*, *114*(January), 104407.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104407>
- Allen, K. D., Thoma, L. M., & Golightly, Y. M. (2022). Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *30*(2), 184–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.04.020>
- Ann L Coker, & Nalawansa, Dhanusha A. Pflum, M. K. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(5), 139–148.  
<https://doi.org/10.1007/s11926-016-0604-x>.The
- Aubourg, G., Rice, S. J., Bruce-Wootton, P., & Loughlin, J. (2021). Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *xxxx*.  
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.03.002>
- Balaskas, P., Goljanek-Whysall, K., Clegg, P., Fang, Y., Cremers, A., Emans, P., Welting, T., & Peffers, M. (2017). MicroRNA Profiling in Cartilage Ageing. *International Journal of Genomics*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/2713725>
- Bar-Or, D., T. Rael, L., W. Thomas, G., & N. Brody, E. (2015). Inflammatory Pathways in Knee Osteoarthritis: Potential Targets for Treatment. *Current Rheumatology Reviews*, *11*(1), 50–58.  
<https://doi.org/10.2174/1573397111666150522094131>
- Boer, C. G., Hatzikotoulas, K., Southam, L., Stefánsdóttir, L., Zhang, Y., Coutinho de Almeida, R., Wu, T. T., Zheng, J., Hartley, A., Teder-Laving, M., Skogholt, A. H., Terao, C., Zengini, E., Alexiadis, G., Barysenka, A., Bjornsdottir, G., Gabrielsen, M. E., Gilly, A., Ingvarsson, T., ... Zeggini, E. (2021). Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. *Cell*, *184*(18), 4784–4818.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.038>
- Born, L. J., Harmon, J. W., & Jay, S. M. (2020). Therapeutic potential of extracellular vesicle-associated long noncoding RNA. *Bioengineering and Translational Medicine*, *5*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1002/btm2.10172>
- Bortoluzzi, A., Furini, F., & Scirè, C. A. (2018). Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, *17*(11), 1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.06.002>

- Cai, J., Qi, H., Yao, K., Yao, Y., Jing, D., Liao, W., & Zhao, Z. (2021). Non-Coding RNAs Steering the Senescence-Related Progress, Properties, and Application of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(March), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.650431>
- Cai, X., Yuan, S., Zeng, Y., Wang, C., Yu, N., & Ding, C. (2021). New Trends in Pharmacological Treatments for Osteoarthritis. *Frontiers in Pharmacology*, 12(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.645842>
- Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J., & Weder, C. (2016). Articular cartilage: From formation to tissue engineering. *Biomaterials Science*, 4(5), 734–767. <https://doi.org/10.1039/c6bm00068a>
- Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, 36(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>
- Chadha, R. (2016). Revealed aspect of metabolic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedics*, 13(4), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2016.06.029>
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Research*, 5(August 2016). <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
- Chen, S., & Li, B. (2020). MiR-128-3p Post-Transcriptionally Inhibits WISP1 to Suppress Apoptosis and Inflammation in Human Articular Chondrocytes via the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Cell Transplantation*, 29(8), 1–13. <https://doi.org/10.1177/0963689720939131>
- Chow, Y. Y., & Chin, K. Y. (2020). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8293921>
- Csobonyeiova, M., Polak, S., Nicodemou, A., Zamborsky, R., & Danisovic, L. (2021). Ipscs in modeling and therapy of osteoarthritis. *Biomedicines*, 9(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020186>
- Dell'Isola, A., Allan, R., Smith, S. L., Marreiros, S. S. P., & Steultjens, M. (2016). Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1286-2>
- Dhanao, J. K., Sethi, R. S., Verma, R., Arora, J. S., & Mukhopadhyay, C. S. (2018).



- Long non-coding RNA: Its evolutionary relics and biological implications in mammals: A review. *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0183-7>
- Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Canovas, F., Charbord, P., Noël, D., & Jorgensen, C. (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, 9(2), 1–12. <https://doi.org/10.1186/ar2153>
- Dreier, R. (2010). Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: The developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Research and Therapy*, 12(5). <https://doi.org/10.1186/ar3117>
- Du, M., Wu, B., Fan, S., Liu, Y., Ma, X., & Fu, X. (2020). SNHG14 induces osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vitro by downregulating miR-2861. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12891-020-03506-9>
- Dubey, N. K., Mishra, V. K., Dubey, R., Syed-Abdul, S., Wang, J. R., Wang, P. D., & Deng, W. P. (2018). Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: A review. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5421019>
- Endisha, H., Rockel, J., Jurisica, I., & Kapoor, M. (2018). The complex landscape of microRNAs in articular cartilage: biology, pathology, and therapeutic targets. *JCI Insight*, 3(17). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121630>
- Fan, X., Wu, X., Crawford, R., Xiao, Y., & Prasad, I. (2021). Macro, Micro, and Molecular. Changes of the Osteochondral Interface in Osteoarthritis Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.659654>
- Foo, J. B., Looi, Q. H., How, C. W., Lee, S. H., Al-Masawa, M. E., Chong, P. P., & Law, J. X. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes and micrnas in cartilage regeneration: Biogenesis, efficacy, mirna enrichment and delivery. *Pharmaceuticals*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/ph14111093>
- Froebel, J., Hemeda, H., Lenz, M., Abagnale, G., Jousen, S., Denecke, B., Šarić, T., Zenke, M., & Wagner, W. (2014). Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 3(3), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.07.003>

- Gao, G., Zhang, X. F., Hubbell, K., & Cui, X. (2017). NR2F2 regulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in bioprinted cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*(1), 208–216. <https://doi.org/10.1002/bit.26042>
- Ghafouri-Fard, S., Poulet, C., Malaise, M., Abak, A., Mahmud Hussien, B., Taheriazam, A., Taheri, M., & Hallajnejad, M. (2021). The Emerging Role of Non-Coding RNAs in Osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, *12*(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.773171>
- Guo, N. N., Liu, L. P., Zheng, Y. W., & Li, Y. M. (2020). Inducing human induced pluripotent stem cell differentiation through embryoid bodies: A practical and stable approach. *World Journal of Stem Cells*, *12*(1), 25–34. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i1.25>
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., & Volarevic, V. (2019). Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *109*(October 2018), 2318–2326. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.099>
- Ibraheem, M. R., Adel, J., Balbaa, A. E., El-Sappagh, S., Abuhmed, T., & Elmogy, M. (2021). Timing and Classification of Patellofemoral Osteoarthritis Patients Using Fast Large Margin Classifier. *Computers, Materials and Continua*, *67*(1), 393–409. <https://doi.org/10.32604/cmc.2021.014446>
- Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE*, *3*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003740>
- Jackson, S. A., Schiesser, J., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2010). Differentiating embryonic stem cells pass through “temporal windows” that mark responsiveness to exogenous and paracrine mesendoderm inducing signals. *PLoS ONE*, *5*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010706>
- Jang, S., Lee, K., & Ju, J. H. (2021). Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22052619>
- Jiang, S. de, Lu, J., Deng, Z. han, Li, Y. sheng, & Lei, G. hua. (2017). Long noncoding RNAs in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, *84*(5), 553–556. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.006>

- Johnson, V. L., & Hunter, D. J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 28(1), 5–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.berh.2014.01.004>
- Kamata, M., Okitsu, Y., Fujiwara, T., Kanehira, M., Nakajima, S., Takahashi, T., Inoue, A., Fukuhara, N., Onishi, Y., Ishizawa, K., Shimizu, R., Yamamoto, M., & Harigae, H. (2014). GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica*, 99(11), 1686–1696.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2014.105692>
- Kim, S. K., Kwak, S. G., & Choe, J. Y. (2022). Decline of Lung Function in Knee and Spine Osteoarthritis in the Korean Population: Cross-Sectional Analysis of Data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Healthcare (Switzerland)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/healthcare10040736>
- Kwon, D. G., Kim, M. K., Jeon, Y. S., Nam, Y. C., Park, J. S., & Ryu, D. J. (2022). State of the Art: The Immunomodulatory Role of MSCs for Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3).  
<https://doi.org/10.3390/ijms23031618>
- Lara-Barba, E., Araya, M. J., Hill, C. N., Bustamante-Barrientos, F. A., Ortloff, A., García, C., Galvez-Jiron, F., Pradenas, C., Luque-Campos, N., Maita, G., Elizondo-Vega, R., Djouad, F., Vega-Letter, A. M., & Luz-Crawford, P. (2021). Role of microRNA Shuttled in Small Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Osteoarticular Disease Treatment. *Frontiers in Immunology*, 12(November), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.768771>
- Li, H., Zheng, Q., Xie, X., Wang, J., Zhu, H., Hu, H., He, H., & Lu, Q. (2021). Role of Exosomal Non-Coding RNAs in Bone-Related Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(December), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.811666>
- Lian, W. S., Ko, J. Y., Wu, R. W., Sun, Y. C., Chen, Y. S., Wu, S. L., Weng, L. H., Jahr, H., & Wang, F. S. (2018). MicroRNA-128a represses chondrocyte autophagy and exacerbates knee osteoarthritis by disrupting Atg12. *Cell Death and Disease*, 9(9). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0994-y>
- Long, H., Liu, Q., Yin, H., Wang, K., Diao, N., Zhang, Y., Lin, J., & Guo, A. (2022). Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis and Rheumatology*,

- 74(7), 1172–1183. <https://doi.org/10.1002/art.42089>
- Loo, S., & Wong, N. (2021). Advantages and challenges of stem cell therapy for osteoarthritis (Review). *Biomedical Reports*, 15(2).  
<https://doi.org/10.3892/br.2021.1443>
- Meliconi, R., & Pulsatelli, L. (2019). Are mechanisms of inflammation joint-specific in osteoarthritis? *Rheumatology (United Kingdom)*, 58(5), 743–745.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/key300>
- Meng, Q. S., Liu, J., Wei, L., Fan, H. M., Zhou, X. H., & Liang, X. T. (2020). Senescent mesenchymal stem/stromal cells and restoring their cellular functions. *World Journal of Stem Cells*, 12(9), 966–985.  
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i9.966>
- Meng, X., Su, R. J., Baylink, D. J., Neises, A., Kiroyan, J. B., Lee, W. Y. W., Payne, K. J., Gridley, D. S., Wang, J., Lau, K. H. W., Li, G., & Zhang, X. B. (2013). Rapid and efficient reprogramming of human fetal and adult blood CD34 + cells into mesenchymal stem cells with a single factor. *Cell Research*, 23(5), 658–672.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.40>
- Mihanfar, A., Shakouri, S. K., Khadem-Ansari, M. H., Fattahi, A., Latifi, Z., Nejabati, H. R., & Nouri, M. (2020). Exosomal miRNAs in osteoarthritis. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4737–4748. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05443-1>
- Mobasheri, A., Rayman, M. P., Gualillo, O., Sellam, J., Van Der Kraan, P., & Fearon, U. (2017). The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(5), 302–311.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.50>
- Mobasheri, A., Trumble, T. N., & Byron, C. R. (2021). Editorial: One Step at a Time: Advances in Osteoarthritis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(July), 1–6.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.727477>
- Mora, J. C., Przkora, R., & Cruz-Almeida, Y. (2018). Knee osteoarthritis: Pathophysiology and current treatment modalities. *Journal of Pain Research*, 11, 2189–2196. <https://doi.org/10.2147/JPR.S154002>
- Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2011). Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM & R: The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation*, 3(6 Suppl 1), 3–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.05.009>
- Ng, J., Little, C. B., Woods, S., Whittle, S., Lee, F. Y., Gronthos, S., Mukherjee, S.,

- Hunter, D. J., & Worthley, D. L. (2020). Stem cell-directed therapies for osteoarthritis: The promise and the practice. *Stem Cells*, *38*(4), 477–486. <https://doi.org/10.1002/stem.3139>
- O’Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, *32*(2), 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.007>
- Okada, M., Kim, H. W., Matsu-Ura, K., Wang, Y. G., Xu, M., & Ashraf, M. (2016). Abrogation of Age-Induced MicroRNA-195 Rejuvenates the Senescent Mesenchymal Stem Cells by Reactivating Telomerase. *Stem Cells*, *34*(1), 148–159. <https://doi.org/10.1002/stem.2211>
- Papathanasiou, I., Anastasopoulou, L., & Tsezou, A. (2021). Cholesterol metabolism related genes in osteoarthritis. *Bone*, *152*(June), 116076. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116076>
- Park, S., Bello, A., Arai, Y., Ahn, J., Kim, D., Cha, K. Y., Baek, I., Park, H., & Lee, S. H. (2021). Functional duality of chondrocyte hypertrophy and biomedical application trends in osteoarthritis. *Pharmaceutics*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081139>
- Pisarello, M. J. L., Loarca, L., Ivanics, T., Morton, L., & LaRusso, N. (2015). MicroRNAs in the cholangiopathies: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Clinical Medicine*, *4*(9), 1688–1712. <https://doi.org/10.3390/jcm4091688>
- Primorac, D. (2020). Knee Osteoarthritis : A Review of Pathogenesis and. *Genes*, *11*(8), 854–889.
- Ratti, M., Lampis, A., Ghidini, M., Salati, M., Mirchev, M. B., Valeri, N., & Hahne, J. C. (2020). MicroRNAs (miRNAs) and Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) as New Tools for Cancer Therapy: First Steps from Bench to Bedside. *Targeted Oncology*, *15*(3), 261–278. <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00717-x>
- Razmara, E., Bitaraf, A., Yousefi, H., Nguyen, T. H., Garshasbi, M., Cho, W. C. S., & Babashah, S. (2019). Non-coding RNAs in cartilage development: An updated review. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184475>
- Rice, S. J., Beier, F., Young, D. A., & Loughlin, J. (2020). Interplay between genetics and epigenetics in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(5), 268–281.

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0407-3>

Rim, Y. A., Nam, Y., Park, N., Lee, J., Park, S. hwan, & Ju, J. H. (2018). Repair potential of nonsurgically delivered induced pluripotent stem cell-derived chondrocytes in a rat osteochondral defect model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(8), 1843–1855.

<https://doi.org/10.1002/term.2705>

Sabapathy, V., & Kumar, S. (2016). hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(8), 1571–1588.

<https://doi.org/10.1111/jcmm.12839>

Sawhney, S., & Aggarwal, A. (2016). Pediatric rheumatology: A clinical viewpoint. *Pediatric Rheumatology: A Clinical Viewpoint*, 1–638.

<https://doi.org/10.1007/978-981-10-1750-6>

Shang, J., Yao, Y., Fan, X., Shangguan, L., Li, J., Liu, H., & Zhou, Y. (2016). MiR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(4), 520–532.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.005>

Shin, D. (2014). Association between metabolic syndrome, radiographic knee osteoarthritis, and intensity of knee pain: Results of a national survey. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(9), 3177–3183.

<https://doi.org/10.1210/jc.2014-1043>

Simon, T. M., & Jackson, D. W. (2018). Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 26(1), 146–154.

<https://doi.org/10.1097/JSA.000000000000182>

Spitzhorn, L. S., Megges, M., Wruck, W., Rahman, M. S., Otte, J., Degistirici, Ö., Meisel, R., Sorg, R. V., Oreffo, R. O. C., & Adjaye, J. (2019). Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1209-x>

Swingler, T. E., Niu, L., Smith, P., Paddy, P., Le, L., Barter, M. J., Young, D. A., & Clark, I. M. (2019). The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 37(5), 40–47.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from

- Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Wen, Z. Q., Liu, D., Zhang, Y., Cai, Z. J., Xiao, W. F., & Li, Y. S. (2021). G Protein-Coupled Receptors in Osteoarthritis: A Novel Perspective on Pathogenesis and Treatment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(October). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.758220>
- Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J., & Guilak, F. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*, 39, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>
- Wruck, W., Graffmann, N., Spitzhorn, L. S., & Adjaye, J. (2021). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Acquire Rejuvenation and Reduced Heterogeneity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(September), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717772>
- Wu, C., Tian, B., Qu, X., Liu, F., Tang, T., Qin, A., Zhu, Z., & Dai, K. (2014). MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), 13–23. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1743>
- Xu, T., Luo, Y., Wang, J., Zhang, N., Gu, C., Li, L., Qian, D., Cai, W., Fan, J., & Yin, G. (2020). Exosomal miRNA-128-3p from mesenchymal stem cells of aged rats regulates osteogenesis and bone fracture healing by targeting Smad5. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00601-w>
- Yu, C., Chen, W. P., & Wang, X. H. (2011). MicroRNA in osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 39(1), 1–9. <https://doi.org/10.1177/147323001103900101>
- Zhou, X., Hong, Y., Zhang, H., & Li, X. (2020). Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00364>
- Zhu, J., Yu, W., Wang, Y., Xia, K., Huang, Y., Xu, A., Chen, Q., Liu, B., Tao, H., Li, F., & Liang, C. (2019). LncRNAs: Function and mechanism in cartilage development, degeneration, and regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1458-8>
- Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., Zhang, J., Ding, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2017). Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived

mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0510-9>