



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη προτύπου έκφρασης βλαστικών κυττάρων προερχόμενων
από επαγόμενα βλαστοκύτταρα στην εκφυλιστική αρθρίτιδα»**

ΒΑΚΑΛΟΥΛΗ ΕΥΔΟΞΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ (Μέλος): Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας

**ΜΠΑΛΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ (Μέλος): Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ),
Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής γενετικής**

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF MEDICINE



**LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR
GENETICS**

MASTER PROGRAMME

“HUMAN GENETICS- GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS

**“Expression profile of induced pluripotent stem cell-derived stem
cells in degenerative arthritis”**

VAKALOULI EVDOXIA

BIOLOGIST

LARISSA

2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του ανθρώπου- Γενετική συμβουλευτική» υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας. Τσέζου Ασπασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Τσέζου Ασπασία που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, αλλά και για τη συνεχή υποστήριξη, εμπιστοσύνη και καθοδήγηση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ πολύ επίσης την Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής γενετικής κα. Παπαθανασίου Ιωάννα και τον κο. Μπαλή Χαράλαμπο μέλος ΕΔΙΠ που δέχθηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κοντελέ Βασίλη ο οποίος με συμβούλευε και με στήριζε μεταφέροντας μου τις γνώσεις του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τους Δρ Μουρμούρα Ευανθία, Βασίλαρου Παναγιώτα, Παπαγεωργίου Αλίκη, Κουτεντάκη Γεωργία, Σκουμπουρδή Γεωργία και Βαϊοπούλου Μαρίνα για την άποψη συνεργασία, καθημερινή βοήθεια και ενθάρρυνση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου οι οποίοι ήταν δίπλα μου και με στήριζαν σε όλο το διάστημα της πανεπιστημιακής μου εκπαίδευσης. Μου έδωσαν την ευκαιρία και τη δύναμη να ασχοληθώ με αυτό το αντικείμενο και να φτάσω μέχρι τέλους αυτή τη διπλωματική εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ).....	10
1.1 Γενικά στοιχεία	10
1.2 Επιδημιολογία	10
1.3 Ρόλος της άρθρωσης- Φυσιολογία αρθρικού χόνδρου	11
1.4 Παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας	13
1.4.1 Φαινότυποι της ΟΑ.....	16
1.4.2 Ταξινόμηση- Παράγοντες κινδύνου	17
1.4.3 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου	18
2. Βλαστικά κύτταρα	19
2.1 Γενικά στοιχεία	19
2.2 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs)	20
2.3 Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs).....	23
2.4 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)	24
3. Θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΟΑ.....	25
3.1 Θεραπεία με Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) και Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs).....	26
4. Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)	29
ΣΚΟΠΟΣ	31
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
5.1 Αρθρικά δείγματα ασθενών- μαρτύρων	32

5.2	Απόψυξη και πολλαπλασιασμός ανθρώπινων επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs).....	32
5.2.1	Απόψυξη των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)	33
5.2.2	Ανακαλλιέργεια των σειρών επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs).....	34
5.3	Διαφοροποίηση των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) μέσω εμβρυικών σωματιδίων (EB)	35
5.3.1	Δημιουργία εμβρυονικών σωμάτων (ΕΣ).....	35
5.3.2	Μεταφορά εμβρυονικών σωμάτων (ΕΣ) σε ζελατίνη	37
5.4	Απομόνωση RNA από καλλιεργημένα MSCs, iPSCs και iMSCs	37
5.5	Έλεγχος της ποιότητας του RNA μέσω ηλεκτροφόρησης	38
5.6	Αλληλούχιση του mRNA επιλεγμένων γονιδίων: Targeted RNAseq-NGS...38	
5.6.1	Δημιουργία βιβλιοθηκών	39
5.6.2	Καθαρισμός των ενισχυμένων τμημάτων	41
5.7	Ανάλυση των αποτελεσμάτων	43
5.7.1	Ποιοτικός έλεγχος.....	44
5.7.2	Ευθυγράμμιση- Στοίχιση των fragments (Mapping)	44
5.7.3	Ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης.....	45
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
6.1	Ποιοτικός έλεγχος.....	46
6.1.2	Ευθυγράμμιση- Στοίχιση των fragments (Mapping)	48
6.2	Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs), Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) μεταξύ ασθενών- μαρτύρων	49
6.3	Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)	51

6.4 Συγκριτική ανάλυση Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)	55
6.7 Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)	59
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μία εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων με πολυπαραγοντική αιτιοπαθογένεια. Αν και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες αναπηρίας στις μεγαλύτερες ηλικίες, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία που να προλαμβάνει και να αναστρέφει το φαινότυπο της νόσου. Εντατικό πεδίο μελέτης αποτελεί η κυτταρική θεραπεία της ΟΑ και κυρίως η έγχυση βλαστοκυττάρων. Συγκεκριμένα, μελετάται η χρήση των Μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) λόγω των αναγεννητικών ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν. Τα MSCs όμως χαρακτηρίζονται από κάποια βασικά μειονεκτήματα, επομένως μελετώνται και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από iPSCs (iMSCs) ως εναλλακτική επιλογή. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των πιθανών διαφορών σε επίπεδο μεταγραφικής έκφρασης μεταξύ των MSCs και των iMSCs. Για τη πραγματοποίηση του σκοπού αυτού, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση και σύγκριση των επιπέδων της μεταγραφικής έκφρασης 183 γονιδίων σε MSCs, iPSCs και iMSCs, τα οποία είχαν προέλθει από δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΟΑ και υγιών ατόμων. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τα επίπεδα της μεταγραφικής έκφρασης μεταξύ ασθενών με ΟΑ και μαρτύρων στα MSCs, iPSCs και iMSCs. Διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς την έκφραση μεταξύ των MSCs και iPSCs σε 85 γονίδια, τα οποία βρέθηκε με βιοπληροφορική ανάλυση ότι συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες διαφοροποίησης προς όλα τα βλαστικά δέρματα, γεγονός που επιβεβαίωσε και την αποδιαφοροποίηση των MSCs. Επίσης, διαφορές μεταξύ iPSCs και iMSCs παρατηρήθηκαν σε 93 γονίδια, που συμμετείχαν σε διεργασίες μεσοδερμικής διαφοροποίησης και ενίσχυσης της πολυδυναμίας και που επιβεβαίωσε τη σωστή διαφοροποίηση τους. Η πιο σημαντική σύγκριση ήταν αυτή των MSCs και iMSCs. Οι κυτταρικοί αυτοί τύποι αν και πανομοιότυποι διαφέρουν ως προς την έκφραση 28 από τα 183 γονίδια που ελέγχθηκαν. Τα γονίδια αυτά βρέθηκε ότι συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διατήρηση της βλαστικότητας κ.α. και έχουν ρόλο στη διαφοροποίηση των MSCs σε χονδροκύτταρα, την ενδοχόνδρια οστεοποίηση κ.α.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως τα iMSCs, σε σχέση με τα MSCs, είναι ανανεωμένα κύτταρα που έχουν χάσει την ταυτότητα του δότη, δεν αποτελούν πλέον γερασμένα κύτταρα και έχουν επανακτήσει το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους και την πολυδυναμία τους, ενώ διατηρούν τις αναγεννητικές ιδιότητες των MSCs. Η μελλοντική μελέτη του συνολικού μεταγραφώματος καθώς και της παρακρινούς τους

δράσης των iMSCs θα επιβεβαιώσει τη καταλληλότητα της χρήσης τους ως εναλλακτική επιλογή των MSCs στη κυτταρική θεραπεία της ΟΑ.

Λέξεις κλειδιά: Οστεοαρθρίτιδα, Κυτταρική θεραπεία, Βλαστοκύτταρα, MSCs, iMSCs

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease with multifactorial etiology. Although it is one of the main causes of disability in the elderly, to date there is no treatment that prevents and reverses the disease phenotype. An intensive field of study is the cellular therapy of OA and mainly the infusion of stem cells. In particular, the use of Mesenchymal stem cells (MSCs) is being studied due to their regenerative properties. MSCs, however, are characterized by some key disadvantages, so mesenchymal stem cells derived from iPSCs (iMSCs) are also being studied as an alternative option. The purpose of this thesis was to investigate the possible differences in transcriptional expression between MSCs and iMSCs. To achieve this goal, a targeted analysis and comparison of the transcriptional expression levels of 183 genes was performed in MSCs, iPSCs and iMSCs, which were derived from bone marrow samples of OA patients and healthy individuals. No difference in transcript expression levels was observed between OA patients and controls in MSCs, iPSCs and iMSCs. Differences were observed in terms of expression between MSCs and iPSCs in 85 genes, which were found after bioinformatic analysis to be involved in cellular processes of differentiation towards all germ layers, which also confirmed the dedifferentiation of MSCs. Also, differences between iPSCs and iMSCs were observed in 93 genes, involved in processes of mesodermal differentiation and enhancement of pluripotency and which confirmed their correct differentiation. The most important comparison was that of MSCs and iMSCs. These cell types, although identical, differ in the expression of 28 of the 183 genes tested. These genes were found to be involved in cell proliferation, the maintenance of vegetative state, etc. and have a role in the differentiation of MSCs into chondrocytes, endochondral ossification, etc.

In conclusion, it seems that iMSCs, in relation to MSCs, are renewed cells that have lost their donor identity, are no longer senescent cells and have regained their proliferative potential and pluripotency, while maintaining the regenerative properties of MSCs. The future study of the total transcriptome as well as their paracrine action of iMSCs will confirm the appropriateness of their use as an alternative choice of MSCs in the cellular therapy of OA.

Keywords: Osteoarthritis, Cell therapy, Stem cells, MSCs, iMSCs

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ)

1.1 Γενικά στοιχεία

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία χρόνια εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες αναπηρίας των ατόμων μεγάλης ηλικίας (Boer et al., 2021; Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a). Προσβάλλει περίπου 250 εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο, και ειδικότερα το 9.6% των ανδρών και το 18% των γυναικών (Fu et al., 2018; Mora et al., 2018). Η εκδήλωσή της ακολουθείται από έντονο πόνο, απώλεια λειτουργικότητας των αρθρώσεων και αναπηρία που έχουν ως επακόλουθο τη μείωση της ποιότητας ζωής των προσβεβλημένων ατόμων (Van Spil et al., 2019). Εκτιμάται ότι δαπανώνται για τη νόσο ετησίως περίπου 303 δις. δολάρια σε ιατρικά έξοδα, αναδεικνύοντας το σημαντικό κοινωνικό αλλά και οικονομικό αντίκτυπό της (Abramoff & Caldera, 2020). Πρόκειται για μία εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων που παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και επηρεάζει όλες τις δομές της άρθρωσης. Οδηγεί στην εκδήλωση ποικίλων παθολογικών αλλαγών με κυριότερο χαρακτηριστικό τον σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, τη πάχυνση του υποχόνδριου οστού, σχηματισμό οστεοφύτων, αρθρική φλεγμονή και δομικές αλλοιώσεις της αρθρικής κάψουλας, των συνδέσμων και των περιαρθρικών μυών (Freeman et al., 2016; Κονάς et al., 2019; Rim et al., 2020). Οι πιο συχνά προσβεβλημένες αρθρώσεις είναι αυτές της σπονδυλικής στήλης καθώς και οι αρθρώσεις των δαχτύλων των χεριών, των γονάτων και των γοφών (Charlier et al., 2019). Αναμένεται αύξηση των προσβεβλημένων ατόμων, με την αύξηση του μέσου όρου ζωής και τις επιπτώσεις της γήρανσης, αλλά και με την εμφάνιση της παχυσαρκίας η οποία αποτελεί έναν από τους παράγοντες κινδύνου εκδήλωσής της (Geusens & Van Den Bergh, 2016; Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a).

Συνεπώς, η οστεοαρθρίτιδα είναι μία σύνθετη νόσος των αρθρώσεων με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Ακόμη δεν είναι σαφή τα αίτια που οδηγούν στην εκδήλωσή της ούτε οι παθογενετικοί μηχανισμοί της (Mora et al., 2018).

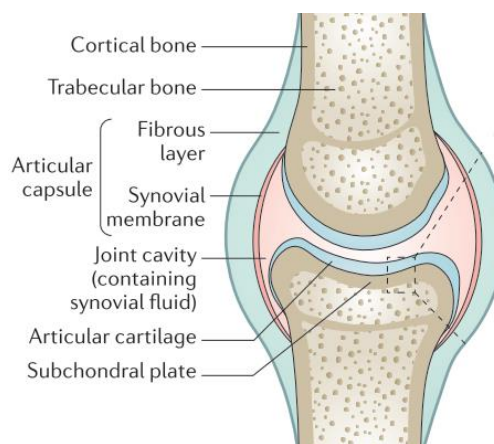
1.2 Επιδημιολογία

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο κοινή νόσος των αρθρώσεων σε παγκόσμιο επίπεδο (Rim et al., 2020). Προσβάλλει κυρίως ηλικιακές ομάδες άνω των 60 ετών και υπολογίζεται

πως το 10% των ανδρών και το 18% των γυναικών έχουν συμπτωματική οστεοαρθρίτιδα κυρίως στο γόνατο, το χέρι και το γοφό (Allen et al., 2022). Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως το 27% των ατόμων ηλικίας 63- 70 ετών έχουν ακτινολογικά ευρήματα, ενώ το ποσοστό φθάνει στο 44% καθώς η ηλικία αυξάνει άνω των 80 ετών (Abramoff & Caldera, 2020). Αν και η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να προσβάλει και τα δύο φύλα, οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου στα πόδια και τα χέρια, σε σχέση με τους άντρες που εμφανίζουν πιο συχνά στη σπονδυλική στήλη (Vina & Kent Kwoh, 2018). Περίπου, 1 στα 8 άτομα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), δηλαδή περίπου 27- 31 εκατομμύρια άτομα, έχουν συμπτωματική οστεοαρθρίτιδα, ενώ υπολογίζεται ότι 250 εκατομμύρια άτομα σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν οστεοαρθρίτιδα γόνατος. Επίσης, η ΟΑ γοφού και γόνατος αποτελούν το 2.2% των αιτιών αναπηρίας. Συνεπώς, η νόσος έχει σημαντικές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις. Υπολογίζεται ότι στις ανεπτυγμένες χώρες η ΟΑ καταλαμβάνει το 1 με 2.5% του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (ΑΕΠ). Το μεγαλύτερο μέρος των εξόδων, περίπου 85%, προέρχεται από τις αρθροπλαστικές που πραγματοποιούνται (O'Neill et al., 2018).

1.3 Ρόλος της άρθρωσης- Φυσιολογία αρθρικού χόνδρου

Οι αρθρώσεις είναι σημεία του σώματος στα οποία υπάρχει γειτνίαση μεταξύ των οστών. Βασικός ρόλος τους είναι να παρέχουν σταθερότητα και ισορροπία κατά τη διάρκεια των διαφόρων κινήσεων του σώματος. Δημιουργούνται κατά την εμβρυική περίοδο ανάπτυξης ταυτόχρονα με τα οστά. Υπάρχουν δύο τύποι ταξινόμησής τους, η λειτουργική όπου στηρίζεται στο βαθμό κίνησης τους και η δομική που βασίζεται στον τύπο του συνδετικού ιστού μεταξύ των αρθρικών επιφανειών. Με βάση τη δομική ταξινόμηση κατηγοριοποιούνται σε ινώδεις αρθρώσεις, αρθρώσεις χόνδρων και διαρθρώσεις που αποτελούν τις πιο κοινές αρθρώσεις του σώματος, στις οποίες ανήκει και ο αρθρικός χόνδρος. Πιο συγκεκριμένα, οι διαρθρώσεις αποτελούνται από τον αρθρικό χόνδρο που προστατεύει τα οστά, την αρθρική μεμβράνη, το αρθρικό υγρό,



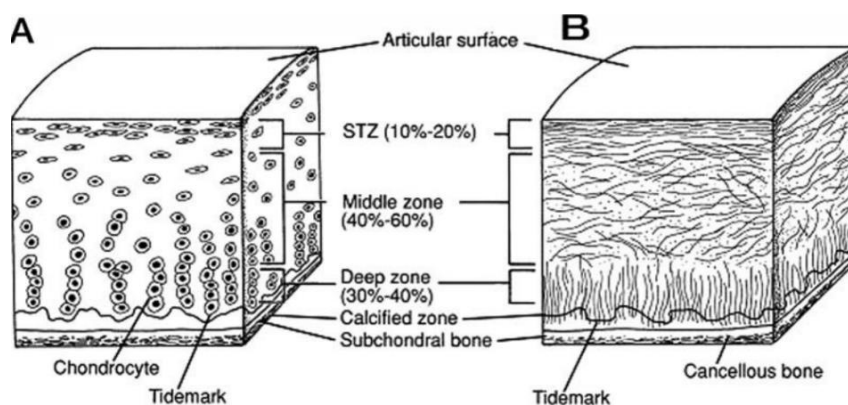
Εικόνα 1: Η δομή της αρθρικής άρθρωσης. (Martel-Pelletier et al., 2016)

την αρθρική κάψουλα, ενώ σε αυτές προσδένονται διάφορα νεύρα, τένοντες και σύνδεσμοι (Εικόνα 1) (Sawhney & Aggarwal, 2016).

Ο αρθρικός χόνδρος είναι υαλοειδής χόνδρος που προστατεύει τα οστά από τη μηχανική τάση και την τριβή (Huber et al., 2000). Έχει πάχος 2-4 mm και δεν διαθέτει αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα (Sophia Fox et al., 2009), επομένως η μόνη πηγή θρεπτικών συστατικών είναι το αρθρικό υγρό. Αποτελείται από εξωκυττάρια ουσία (ECM) η οποία αποτελεί το 65- 80% του συνολικού όγκου και περιέχει κυρίως νερό, διαφόρων τύπων κολλαγόνο (κυρίως κολλαγόνο τύπου II αλλά και τύπου III, IX, XI, VI και X), πρωτεογλυκάνες (κυρίως αγγρεκάνη) και άλλες μη κολλαγόνες πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες όπως η φμπρονεκτίνη (Carballo et al., 2017; Roseti et al., 2019). Η εξωκυττάρια ουσία περιέχει και χονδροκύτταρα, ο μοναδικός κυτταρικός τύπος που συναντάται στον αρθρικό χόνδρο, τα οποία είναι άκρως διαφοροποιημένα και μεταβολικά ενεργά κύτταρα που προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα μέσω της χονδρογένεσης και αποτελούν το 1-5% του συνολικού όγκου (Rim et al., 2020). Ρόλος τους είναι η σύνθεση ή η αποικοδόμηση της ECM, συνεισφέροντας έτσι στην διατήρηση της ομοιοστασίας του χόνδρου μέσω εξισορρόπησης των αναβολικών και καταβολικών διεργασιών που επιτελούνται (Sophia Fox et al., 2009).

Στο εσωτερικό του αρθρικού χόνδρου δημιουργούνται 4 ζώνες διαφορετικής σύστασης, η επιφανειακή ζώνη (superficial zone), η μεσαία ζώνη (middle zone), η εν τω βάθει ζώνη (deep zone) και η ζώνη ασβεστοποίησης (calcified zone) (Εικόνα 2). Η πρώτη ζώνη, είναι η επιφανειακή ζώνη και αποτελεί το 10-20% του συνολικού πάχους του αρθρικού χόνδρου. Βρίσκεται στην επιφάνεια και ρόλος της είναι η προστασία των βαθύτερων στρωμάτων από το μηχανικό στρες. Η ζώνη αυτή περιέχει μεγάλο αριθμό χονδροκυττάρων και μικρότερο αριθμό πρωτεογλυκάνων, των οποίων ο αριθμός αυξάνεται έως και 50% όσο προχωράμε σε βαθύτερα στρώματα (Roseti et al., 2019). Τα χονδροκύτταρα αυτής της ζώνης είναι πεπλατυσμένα και διατεταγμένα παράλληλα με την επιφάνεια του αρθρικού χόνδρου, όπως επίσης και το κολλαγόνο (κυρίως τύπου II και IX). Η συγκεκριμένη ζώνη έρχεται σε επαφή με το αρθρικό υγρό, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη λίπανση, μηχανική λειτουργία και θρέψη του χόνδρου μέσω της δράσης των τριών κύριων συστατικών του, δηλαδή του υαλουρονικού οξέος, της λουμπρικίνης (πρωτεΐνη της επιφανειακής ζώνης) και των φωσφολιπιδίων (Carballo et al., 2017). Η μεσαία ζώνη αποτελεί το 40-60% του πάχους του αρθρικού χόνδρου και λειτουργεί σαν ανατομική και λειτουργική γέφυρα μεταξύ της επιφανειακής ζώνης και

της εν τω βάθει ζώνης του. Αποτελείται από σφαιρικά χονδροκύτταρα, σε μικρότερο αριθμό από ότι στην επιφανειακή ζώνη, πλαγιαστή διάταξη κολλαγόνου, καθώς και πρωτεογλυκάνες. Ακολουθεί η εν τω βάθει ζώνη, που αποτελεί το 30% του συνολικού πάχους του και είναι υπεύθυνη για την παροχή αντοχής στις δυνάμεις συμπίεσης για το λόγο αυτό διαθέτει και μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεογλυκάνων. Σε αυτή τη ζώνη τα χονδροκύτταρα είναι διατεταγμένα σε κάθετες με την επιφάνεια στήλες, όπως επίσης και τα ινίδια κολλαγόνου (Sophia Fox et al., 2009). Στο σημείο ανάμεσα στην εν τω βάθει ζώνη και τη ζώνη ασβεστοποίησης συναντάται το tidemark, μία λεπτή βασεόφιλη γραμμή. Τέλος, η ζώνη ασβεστοποίησης στερεώνει ουσιαστικά το χόνδρο στο οστό, καρφώνοντας τα ινίδια κολλαγόνου στο υποχόνδριο οστό. Αποτελείται από πολύ μικρό αριθμό χονδροκυττάρων, τα οποία είναι υπερτροφικά, καθώς και κολλαγόνο τύπου X (Carballo et al., 2017; Sophia Fox et al., 2009).



Εικόνα 2: Οι τέσσερις ζώνες του αρθρικού χόνδρου. Α. Η κυτταρική οργάνωση των ζωνών, Β. Η διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου (Sophia Fox et al., 2009).

1.4 Παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας

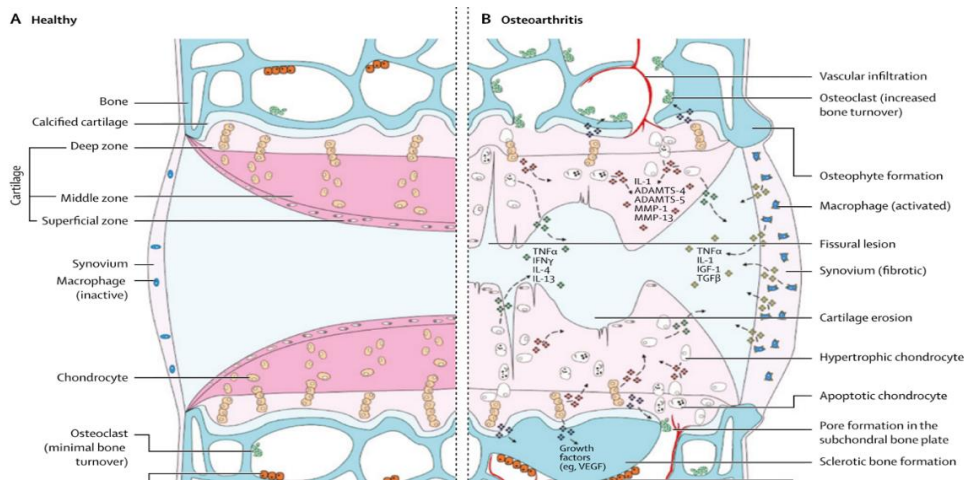
Η ΟΑ είναι μία νόσος η οποία, όπως προαναφέρθηκε, επηρεάζει ολόκληρη την άρθρωση. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί δομικές αλλοιώσεις στον αρθρικό χόνδρο, το υποχόνδριο οστό, τους συνδέσμους, την αρθρική κάψα, τον αρθρικό υμένα αλλά και στους περιαρθρικούς μύες (McCulloch et al., 2017). Πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου όπως μεταβολικοί, φλεγμονώδεις αλλά και μηχανικής φθοράς, καθιστώντας τη μία περίπλοκη νόσο, με τελικό αποτέλεσμα την ολική καταστροφή της άρθρωσης (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a).

Κατά την εξέλιξη της ΟΑ ο αρθρικός χόνδρος σταδιακά αλλοιώνεται και χάνεται η δομή και η σύστασή του, με αποτέλεσμα την αλλαγή των ιδιοτήτων του και την αύξηση της ευαισθησίας του. Αρχικά, παρατηρούνται επιφανειακές αλλοιώσεις (ρωγμές) οι οποίες προοδευτικά φθάνουν στη ζώνη ασβεστοποίησης. Τα χονδροκύτταρα, που αποτελούν το μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό του χόνδρου, στην προσπάθειά τους να αποκαταστήσουν τις βλάβες αποκτούν υπερτροφικό φαινότυπο. Αυξάνεται η μεταβολική τους δραστηριότητα, όμως η αύξηση αυτή έχει ως επακόλουθο τη σύνθεση προϊόντων αποικοδόμησης της ECM και προ φλεγμονωδών μορίων, αλλά και την επαγωγή έντονης πολλαπλασιαστικής ικανότητας. Ακολουθεί η υπερτροφία του αρθρικού υμένα και η επαγωγή της αγγειογένεσης. Με την πρόοδο της νόσου προκαλούνται βλάβες και στο υποχόνδριο οστό όπου, εκτός των δομικών αλλοιώσεων, παρατηρείται επίσης εισροή αγγειογενετικών παραγόντων από το μυελό των οστών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα μίας οστεοαρθρικής άρθρωσης είναι και η παρουσία οστεόφυτων, οστικών δηλαδή εκβλαστήσεων που προκύπτουν ως προσπάθεια προσαρμογής του χόνδρου (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a).

Αναλυτικότερα, στα αρχικά στάδια της ΟΑ η ECM υφίσταται αλλαγές επαγόμενες από ένζυμα που συμβάλουν στην αποδόμησή της. Πιο συγκεκριμένα, αγγρεκανάσες ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), κυρίως οι ADAMTS-4 και ADAMTS-5 αποδομούν την αγγρεκάνη. Τα χονδροκύτταρα ενεργοποιούνται προκειμένου να αποκαταστήσουν την αποδομημένη αγγρεκάνη αυξάνοντας τις συνθετικές τους αντιδράσεις. Απορρυθμίζεται όμως η λειτουργία τους με αποτέλεσμα να παράγουν επιπλέον μόρια αποδόμησης ενισχύοντας περαιτέρω αυτό το φαινόμενο. Συγκεκριμένα παράγουν ADAMTS-4, ADAMTS-5 και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs, Matrix Metalloproteinases). Η πιο συχνά εκφραζόμενη MMP στην ΟΑ είναι η MMP-13, η οποία έχει ως κύριο στόχο την αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου II (Primorac, 2020; Roseti et al., 2019). Τα χονδροκύτταρα δημιουργούν συστάδες κυττάρων προκειμένου να διατηρήσουν σε υψηλά επίπεδα τη συνθετική τους δραστηριότητα και πολλαπλασιάζονται. Αυτή η συνεχής αποδόμηση οδηγεί στην έκκριση και προ φλεγμονωδών μορίων, κυρίως κυττοκινών και χημειοκινών, μέσω ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του Notch, NF-Kb (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) καθώς και στην απορρύθμιση της έκφρασης διαφόρων microRNAs. Η ενεργοποίηση των προ φλεγμονωδών μορίων σε συνδυασμό με την αύξηση των καταβολικών αντιδράσεων,

οδηγούν στην εμφάνιση πρώιμων επιφανειακών ρωγμών. Οι ρωγμές εκτείνονται τόσο περιφερικά όσο και σε βάθος αφού φθάνουν στη ζώνη ασβεστοποίησης, αλλά και στο υποχόνδριο οστό. Η έκθεση της ζώνης ασβεστοποίησης οδηγεί στην περαιτέρω ασβεστοποίηση του χόνδρου και την αύξηση των καταβολικών αντιδράσεων. Η δομή του υποχόνδριου οστού υφίσταται αλλαγές μέσω της δράσης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, η ισορροπία των οποίων απορρυθμίζεται (Primorac, 2020; Roseti et al., 2019). Λόγω της λέπτυνσης πλέον του αρθρικού χόνδρου αλλά και της αυξημένης δράσης των οστεοκλαστών στο υποχόνδριο οστό, δημιουργούνται κανάλια στο tidemark από τα οποία μεταφέρονται φλεγμονώδη κύτταρα, αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) αλλά και νεύρα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (Martel-Pelletier et al., 2016). Οι συστάδες χονδροκυττάρων παράγουν φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, δηλαδή κυτοκίνες όπως IL-1β (Interleukin 1β), IL-6 (Interleukin 6), TNF-α (Tumour Necrosis Factor-α), δραστικές μορφές οφυγόνου ROS (reactive oxygen species) και νιτρικό οξείδιο NO (Nitric Oxide), βασικά φλεγμονώδη μόρια της OA. Επίσης, ο παράγοντας TGF-β (Transforming growth factor beta) που φυσιολογικά ρυθμίζει την ομοιοστασία του αρθρικού χόνδρου αλλά και του υποχόνδριου οστού, απορρυθμίζεται (Carballo et al., 2017). Με αυτό τον τρόπο ενισχύεται κι' άλλο η αποδόμηση του χόνδρου αλλά και η απόπτωση. Τα χονδροκύτταρα αποκτούν υπερτροφικό φαινότυπο και υφίστανται γήρανση (McCulloch et al., 2017). Εκφράζουν κολλαγόνο τύπου X και εκκρίνουν MMP-13, ενώ εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό το μεταγραφικό παράγοντα RUNX2 (Runt-related transcription factor 2). Τα υπερτροφικά πλέον χονδροκύτταρα εναποθέτουν ασβέστιο στην ECM, χαρακτηριστικό της ενδοχώρας οστεοποίησης (EO). Τελικώς το υποχόνδριο οστό υφίσταται σκλήρυνση μέσω πάχυνσης της υποχόνδριας πλάκας, ενώ ακολουθεί ο σχηματισμός οστεόφυτων και κύστεων (Primorac, 2020; Roseti et al., 2019).

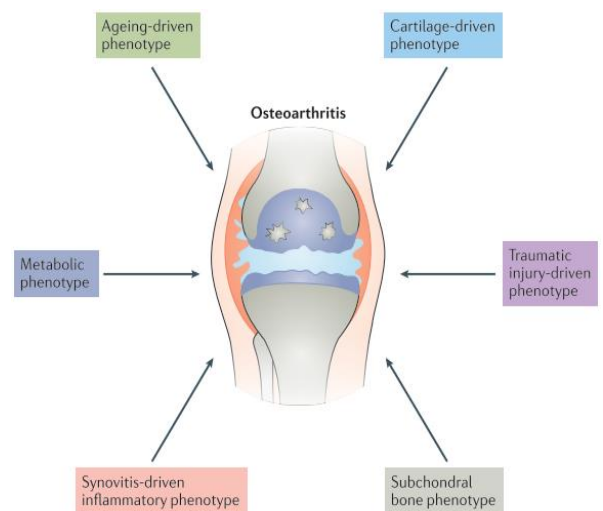
Εκτός του αρθρικού χόνδρου και του υποχόνδριου οστού, χαρακτηριστικές αλλοιώσεις υφίσταται και ο αρθρικός θύλακας. Ο αρθρικός θύλακας περιλαμβάνει τον αρθρικό υμένα και το αρθρικό υγρό. Η συνολική φλεγμονή που σταδιακά αυξάνεται κατά την OA, οδηγεί στην υπερτροφία του, την εισροή T και B λεμφοκυττάρων και την αυξημένη έκφραση προ φλεγμονωδών μορίων όπως IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, LIF (Leukemia Inhibitory Factor) και PGE2 (Prostaglandin E2) (Primorac, 2020).



Εικόνα 3: Σηματοδοτικά μονοπάτια και δομικές αλλαγές στον αρθρικό χόνδρο OA (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a).

1.4.1 Φαινότυποι της OA

Η OA δε χαρακτηρίζεται από ομοιογένεια αλλά αντιθέτως παρουσιάζει ποικίλους φαινοτύπους (Mobasher et al., 2017). Οι φαινότυποι αυτοί μπορούν να θεωρηθούν και ως υπότυποι της νόσου. Χαρακτηρίζονται από ξεχωριστούς παθολογικούς μηχανισμούς ο καθένας, αλλά και δομικές και λειτουργικές συνέπειες. Ωστόσο, είναι πιθανό να μοιράζονται κάποια βασικά στοιχεία όπως η ηλικία, μηχανικοί παράγοντες και μεταβολικές αλλοιώσεις. Οι θεραπείες μπορεί να είναι αποτελεσματικές ως προς ένα φαινότυπο και αναποτελεσματικές σε κάποιον άλλο, ενώ ένα άτομο μπορεί να εμφανίζει περισσότερους από έναν φαινοτύπους (Van Spil et al., 2019). Οι φαινότυποι της OA αναφέρονται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Οι φαινότυποι της OA (Mobasher et al., 2017).

Ο μεταβολικός φαινότυπος αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους φαινοτύπους της OA, λόγω της συσχέτισής του με το μεταβολικό σύνδρομο MetS. Το MetS-OA (Metabolic syndrome-associated osteoarthritis) προκύπτει από τη συσχέτιση των χαρακτηριστικών των μεταβολικών συνδρόμων, δηλαδή την παχυσαρκία, το διαβήτη, την ινσουλινοαντίσταση, τη δυσλιπιδαιμία και την υπέρταση, με την

οστεοαρθρίτιδα (Courties et al., 2017). Αυτή η συσχέτιση οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι προαναφερθέντες μεταβολικές συνιστώσες θα μπορούσαν να ρυθμίζουν και το μεταβολισμό των αρθρικών αρθρώσεων εκτός των λοιπών οργάνων, και εξαιτίας αυτού το πεδίο βρίσκεται υπό εντατική μελέτη .

1.4.2 Ταξινόμηση- Παράγοντες κινδύνου

Η ΟΑ όντας μία πολυπαραγοντική νόσος ταξινομείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, την πρωτοπαθή ή αλλιώς ιδιοπαθή και τη δευτεροπαθή ΟΑ. Στην πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή ΟΑ τα αίτια εκδήλωσης είναι άγνωστα (Abramoff & Caldera, 2020). Στη δευτεροπαθή, κάποια από τα αίτια εκδήλωσής της είναι κάποιος προηγούμενος τραυματισμός, οι συγγενείς και μεταβολικές διαταραχές, οι ενδοκρινικές και νευρολογικές ασθένειες, λοιμώξεις, διαταραχές που μεταβάλλουν τη φυσιολογική δομή και λειτουργία του αρθρικού χόνδρου, καθώς και διάφορες εργασίες και αθλητικές δραστηριότητες (Roseti et al., 2019).

Ο κίνδυνος εμφάνισης της ΟΑ καθορίζεται από συστημικούς αλλά και από τοπικούς παράγοντες. Οι συστημικοί παράγοντες που έχουν βρεθεί έως τώρα δρουν αυξάνοντας την ευαισθησία των αρθρώσεων είτε μέσω τραυματισμών, είτε μέσω παρεμπόδισης των επιδιορθωτικών μηχανισμών τους. Οι τοπικοί παράγοντες δεν επηρεάζουν άμεσα την άρθρωση αλλά επηρεάζουν τις δυνάμεις που ασκούνται σε αυτή (Litwic et al., 2013).

Ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου της ΟΑ είναι η ηλικία. Η αύξηση του επιπολασμού και της συχνότητας εμφάνισης της ΟΑ στις μεγαλύτερες ηλικίες ίσως σχετίζεται με τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια έκθεσης των ατόμων αυτών στους διάφορους παράγοντες κινδύνου. Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται κάθε δεκαετία ζωής από 33% στις ηλικιακές ομάδες 60- 70 ετών, σε 43,7% σε ηλικίες άνω των 80 ετών (Abramoff & Caldera, 2020). Η γήρανση των χονδροκυττάρων με επακόλουθη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, αποτελούν επίσης αίτια αύξησης της συχνότητας εμφάνισης (Bortoluzzi et al., 2018).

Το φύλο αποτελεί επίσης έναν παράγοντα κινδύνου. Χαρακτηριστικές διαφορές στις συχνότητες εμφάνισης ΟΑ μεταξύ των φύλων συναντώνται έντονα στα χέρια, τα γόνατα και τους γοφούς. Υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισής τους στις

γυναίκες. (Litwic et al., 2013). Άτομα διαφορετικής εθνικότητας παρουσιάζουν επίσης διαφορές ως προς την πιθανότητα εμφάνισης ΟΑ. Συναντάται πιο συχνά στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) από ότι στην Ασία και την Αφρική (Abramoff & Caldera, 2020).

Σημαντικός παράγοντας κινδύνου θεωρείται και η γενετική προδιάθεση των ατόμων, καθώς αφορά περίπου το 30- 65% των περιπτώσεων (Υποενότητα 1.4.3) (Vina & Kent Kwoh, 2018), όπως και η επιγενετική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων μέσω μεθυλίωσης, ακετυλίωσης, τροποποίησης των ιστονών, ενώ σημαντικό ρόλο έχουν και τα microRNAs και lncRNAs (Abramoff & Caldera, 2020). Ακόμη, η παχυσαρκία είναι ένας από τους ισχυρότερους και καλύτερα μελετημένους παράγοντες κινδύνου. Χαρακτηρίζεται από αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ΟΑ γόνατος (Litwic et al., 2013). Για κάθε 5 μονάδες αύξησης του BMI (Body Mass Index) προκύπτει αύξηση κατά 35% στις πιθανότητες για ΟΑ γόνατος (Johnson & Hunter, 2014). Σχετίζεται επίσης και με το μεταβολικό σύνδρομο, MetS (Abramoff & Caldera, 2020). Τέλος, παράγοντες όπως οι διατροφικές συνήθειες, η οστική σύσταση, η μυϊκή δύναμη, καθώς και ο συνολικός τρόπος ζωής των ατόμων παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα εμφάνισης της ΟΑ (Litwic et al., 2013; Martel-Pelletier et al., 2016; Vina & Kent Kwoh, 2018).

1.4.3 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου

Τα τελευταία χρόνια μέσω διαφόρων μελετών GWAS (Genome Wide Association Studies) διερευνώνται γονίδια που πιθανά σχετίζονται με τη γενετική συνιστώσα της νόσου (Boer et al., 2021). Το πιο σημαντικό και καλά μελετημένο γονίδιο που αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης της ΟΑ είναι το *GDF5* (Growth Differentiation Factor 5). Κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της οικογένειας των BMP (Bone Morphogenetic Protein) εντός της υπεροικογένειας του TGF-β. Εκφράζεται στην άρθρωση και συντελεί βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστών όπως και των αρθρώσεων (Lettre, 2017). Σημαντικά γονίδια είναι και τα *CHST3* (Carbohydrate sulfotransferase 3) και *SMAD3* (SMAD family member 3). Το *CHST3* κωδικοποιεί τη θειική χονδροϊτίνη, την κύρια πρωτεογλυκάνη του χόνδρου, ενώ το *SMAD3* δρα στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β (Boer et al., 2021).

Με την ΟΑ έχουν συσχετισθεί και τα γονίδια *COMP* (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) και *CHADL* (*Chondroadherin-like*). Το *COMP* κωδικοποιεί μία δομική πρωτεΐνη του χόνδρου και τα επίπεδά της αποτελούν δείκτες αποδόμησης του, ενώ το *CHADL* ρυθμίζει τη δομή των κολλαγόνων του (Styrkarsdottir et al., 2017). Άλλα γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί μέσω μελετών συσχέτισης είναι τα *COL2A1* (*Collagen type II alpha 1 chain*), *FBN2* (*Fibrillin 2*), *WNT1* (*Wnt family member 1*) και *WNT10B* (*Wnt family member 10B*). Τα *WNT* γονίδια συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΟΑ. Επίσης, αξίζει να αναφερθούν και το γονίδιο *IGF1R* (*Insulin like growth factor 1 receptor*), το οποίο έχει δράση τυροσινικής κινάσης και ρυθμίζει την ασβεστοποίηση του χόνδρου, το *LMX1B* (*LIM homeobox transcription factor 1 beta*) δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και το *NOS3* (*Nitric oxide synthase 3*) το οποίο κωδικοποιεί την αγγειακή ισόμορφή του eNOS (*Endothelium isoform of nitric oxide synthase*) (Boer et al., 2021). Προστατευτική δράση ως προς την ΟΑ φαίνεται να έχει το γονίδιο *DIO2* (*Iodothyronine Deiodinase 2*) και πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός Ala92 (Butterfield et al., 2021).

Το πεδίο του γενετικού υπόβαθρου της νόσου βρίσκεται υπό εντατική μελέτη καθώς η ΟΑ αν και πολυπαραγοντική νόσος, έχει υψηλή κληρονομική συνιστώσα (Ratneswaran & Kapoor, 2021). Εώς και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 223 γενετικοί τόποι που πιθανά σχετίζονται με την εκδήλωση της ΟΑ και βρίσκονται υπό διερεύνηση, εκ των οποίων οι 96 εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Boer et al., 2021).

2. Βλαστικά κύτταρα

2.1 Γενικά στοιχεία

Τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα τα οποία συναντώνται στα εμβρυονικά, εμβρυικά και ενήλικα στάδια της ζωής των ανθρώπων. Στους μεταγεννητικούς και ενήλικους ιστούς έχουν ως ρόλο την αποκατάσταση των τραυματισμένων οργάνων. Για να θεωρηθεί ένα κύτταρο βλαστικό θα πρέπει απαραίτητως να διαθέτει τρία βασικά χαρακτηριστικά. Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα αυτοανανέωσης, δηλαδή η δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται απεριόριστα, το δεύτερο αφορά την κλωνικότητα και το τρίτο την ικανότητά του να διαφοροποιείται

σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους μέσω συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων (Daley, 2015; Kalamegam et al., 2018; Kolios & Moodley, 2012; Ulloa-Montoya et al., 2005).

Το δυναμικό διαφοροποίησης διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τύπων βλαστικών κυττάρων και εξαρτάται από την προέλευσή τους. Τα βλαστικά κύτταρα με το μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης είναι τα παντοδύναμα και συναντώνται στα πολύ αρχικά στάδια ανάπτυξης, δηλαδή στο ζυγωτό και τα κύτταρα των δύο πρώτων διαιρέσεων. Ακολουθούν τα ολοδύναμα που διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο των τριών βλαστικών στοιβάδων: εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα. Απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης στο στάδιο των 5 κυττάρων και σε αυτά ανήκουν τα Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs), αλλά και τα Επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs) (βλέπε ενότητα 2.3). Μικρότερο ακόμη δυναμικό διαφοροποίησης έχουν τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα τα οποία συναντώνται στους περισσότερους ιστούς και διαφοροποιούνται σε κύτταρα ενός εκ των τριών βλαστικών στοιβάδων και σε αυτά ανήκουν τα Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) (βλέπε ενότητα 2.2). Τελικώς, ακολουθούν τα ολιγοδύναμα και τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα (Kolios & Moodley, 2012).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά συνιστούν τα βλαστοκύτταρα μία ελκυστική επιλογή για εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής και αποτελούν σημαντικό πεδίο μελέτης και για την κυτταρική θεραπεία της ΟΑ (Daley, 2015; Kalamegam et al., 2018).

2.2 Μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs)

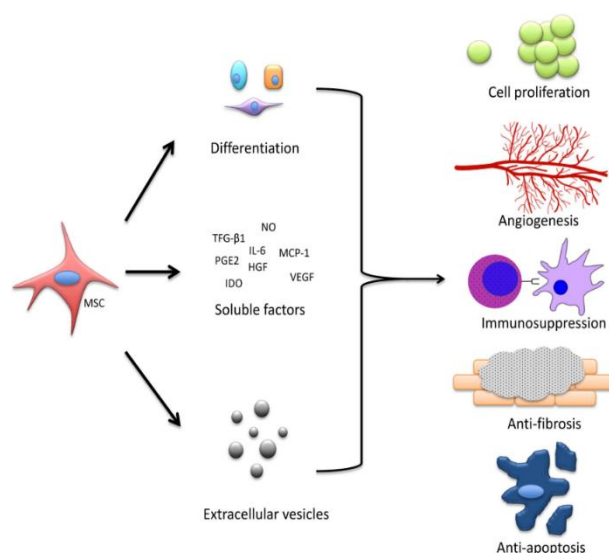
Τα MSCs εντοπίστηκαν πρώτη φορά το 1966 στο μυελό των οστών (MO) (Friedenstein et al., 1966). Πρόκειται για πολυδύναμα ενήλικα βλαστοκύτταρα τα οποία προέρχονται από το μεσόδερμα. Αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού (Barry & Murphy, 2004) αλλά συναντώνται και στο λιπώδη ιστό, τη γέλη του Wharton, τον ομφάλιο λώρο, τον πλακούντα, τον πολφό των δοντιών, το συκώτι και την καρδιά (Kolios & Moodley, 2012). Υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο του μεσοδέρματος, αλλά και σε κυτταρικούς τύπους του ενδοδέρματος και εξωδέρματος (Sun et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, διαφοροποιούνται κυρίως σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα και οστά,

καθώς επίσης και σε μύες, τένοντες αιμοποιητικό-υποστηρικτικό στρώμα μυελού αλλά και σε άλλους τύπους ιστών όπως ηπατοκύτταρα και νευρικούς ιστούς (Kolios & Moodley, 2012; Ulloa-Montoya et al., 2005).

Πρόκειται για έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό για τον οποίο δεν υπάρχουν ειδικοί δείκτες αναγνώρισής του. Το σχήμα τους είναι ατρακτοειδές και πολλαπλασιάζονται σε αποικίες που προσομοιάζουν αυτές των ινοβλαστών (Gultian et al., 2022). Σύμφωνα με τα πρότυπα κριτήρια της Διεθνούς Εταιρείας Κυτταρικής Θεραπείας για να θεωρηθεί ένας κυτταρικός πληθυσμός ως MSCs θα πρέπει να είναι θετικός για τους επιφανειακούς δείκτες CD73, CD90, CD105, Stro-1 (Stromal antigen 1), CD44, CD166, CD54, CD49 και αρνητικός για δείκτες των αιμοποιητικών κυττάρων (CD14, CD45, CD11a, CD34 και HLA-DR), ερυθροκυττάρων (Γλυκοφορίνη A) και αιμοπεταλίων (CD31) (F. H. Chen & Tuan, 2008; Freitag et al., 2016; Minguell et al., 2001; Ullah et al., 2015). Επίσης, θα πρέπει να προσκολλάται σε πλαστικές επιφάνειες σε καλλιέργειες και να μπορεί να διαφοροποιηθεί σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροβλάστες *in vitro* (F. H. Chen & Tuan, 2008; Yin et al., 2019).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των MSCs είναι το ότι συμμετέχουν στην αναγέννηση των ιστών μετά από τραυματισμό. Η μετανάστευσή τους από το μ.ο. στην περιοχή του τραύματος ονομάζεται “homing” και έχει μελετηθεί εκτενώς. Ειδικότερα, φεύγουν από το μ.ο. μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορες ειδικές κυτοκίνες, όπως τη stromal- derived factor 1 (SDF-1 ή CXCL12) που αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα CXCR4 και μέσω του κυκλοφορικού συστήματος φθάνουν στην περιοχή στόχο. Στη συνέχεια, μεταναστεύουν σε βάθος της περιοχής μέσω αλληλεπίδρασης με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω μορίων προσκόλλησης όπως οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες και τέλος προχωρούν στην επιδιόρθωση του τραύματος.

Σημαντικό πεδίο μελέτης αποτελεί και το εκκρίτωμα (secretome) των MSCs, καθώς περιλαμβάνει πολλά σημαντικά μόρια, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες και μεσολαβητές λιπιδίων, τα οποία συγκροτούν κατάλληλο μικροπεριβάλλον για κυτταρική αναγέννηση. Έχουν ανοσορυθμιστική δράση. Συμμετέχουν στην καταστολή φλεγμονωδών αποκρίσεων μέσω: μετατροπής ενεργών μακροφάγων σε αντιφλεγμονώδη, καταστολής των NK



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των MSCs (Sun et al., 2019).

κυττάρων (Natural Killers), καταστολής της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων και ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ προ φλεγμονωδών και αντι φλεγμονωδών T λεμφοκυττάρων. Είναι πιθανό να επιτελούν όλες τις παραπάνω δράσεις μέσω έκκρισης διαλυτών παραγόντων όπως TGF-β1, PGE2, NO, IL-6, και IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase). Επίσης, έχουν αγγειογενετική δράση καθώς εκκρίνουν τον παράγοντα VEGF αλλά και άλλους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες. Τέλος, ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω κυττοκινών, ενώ έχουν και αντι-αποπτωτική δράση (Sun et al., 2019; Yin et al., 2019).

Τα MSCs αποτελούν έναν από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους τύπους ενήλικων κυττάρων με σημαντικές αναγεννητικές ιδιότητες. Πέρα όμως από τα τόσα πλεονεκτήματά τους, παρουσιάζουν και σημαντικά μειονεκτήματα τα οποία αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για τη θεραπευτική τους χρήση. Παράγοντες όπως ο μικρός πληθυσμός τους στους ιστούς ενηλίκων και η επίπονη διαδικασία απομόνωσής τους, η ετερογένεια που παρουσιάζουν ανάλογα με την παθολογική κατάσταση του δότη αλλά και την ηλικία του (σε επίπεδο μεταγραφώματος, επιγενώματος, εκκριτώματος και πρωτεώματος) το χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού αλλά και η πρόιμη γήρανσή τους, περιορίζουν τη χρήση τους (Choudhery & Mahmood, 2022; Dupuis & Oltra, 2021; Wruck et al., 2021).

Λόγω του αναγεννητικού δυναμικού τους τα MSCs αποτελούν εντατικό πεδίο μελέτης για τη χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική, όπως και για την κυτταρική θεραπεία της OA (Υποενότητα 3.1) (Barry & Murphy, 2004; Choudhery & Mahmood,

2022; Harrell et al., 2019; Sun et al., 2019). Ως αποτέλεσμα, εκατοντάδες προ κλινικές και κλινικές μελέτες έχουν καταγραφεί προσπαθώντας να αξιολογήσουν την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χρήσης τους (Barry & Murphy, 2004; Choudhery & Mahmood, 2022; Harrell et al., 2019; Sun et al., 2019).

2.3 Επαγόμενα ολοδόναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs)

Τα iPSCs είναι ολοδόναμα βλαστοκύτταρα τα οποία προέρχονται από σωματικά κύτταρα ενηλίκων. Ανακαλύφθηκαν το 2006 από τους Takahashi και Yamanaka οι οποίοι απέδειξαν πως τα σωματικά κύτταρα, μέσω προσθήκης κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων, υφίστανται γενετικό επαναπρογραμματισμό (Takahashi et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, με τη μεταφορά των μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), Sox2 (SRV-Box Transcription Factor 2), Klf4 (Kruppel Like Factor 4), c-Myc (MYC Proto-Oncogene) μέσω ιικών φορέων, πλασμιδίων κλπ., τα σωματικά κύτταρα γίνονται ολοδόναμα βλαστοκύτταρα φθάνοντας το επίπεδο βλαστικότητας των ESCs. Αποκτούν επίσης μορφολογία, δυναμικό πολλαπλασιασμού, γονιδιακή έκφραση, επιγενετικό προφίλ, δραστηριότητα τελομεράσης και επιφανειακά αντιγόνα παρόμοια με τα ESCs. (Hwang et al., 2021; Rohani et al., 2014; Takahashi et al., 2007).

Η χρήση των iPSCs έλυσε τα σοβαρά ηθικά διλλήματα που κατακλύζουν τη χρήση των ESCs (King & Perrin, 2014), καθώς μπορούν να παραχθούν χωρίς να προϋποθέτουν τη χρήση εμβρύου για την απομόνωσή τους. Αντιθέτως, εφόσον προκύπτουν από σωματικά κύτταρα, μπορούν να απομονωθούν από ποικίλα σημεία του ανθρώπινου σώματος όπως το αίμα, το δέρμα και τα ούρα. Ακόμη, επειδή δύναται να απομονωθούν από τους ίδιους τους ασθενείς είναι απίθανο να απορριφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς σε περίπτωση μεταμόσχευσης. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά τους τα καθιστούν ιδανικά για χρήση στην αναγεννητική ιατρική, στη δημιουργία μοντέλων ασθενειών, σε τοξικολογικές μελέτες κ.ο.κ. Έτσι μελετώνται για την πιθανή χρήση τους για τη θεραπεία της OA (Csobonyeiova et al., 2021; G. Liu et al., 2020; Polanco et al., 2020; Ratajczak, 2019).

Παρά τα τόσα πλεονεκτήματά τους, τα iPSCs εξακολουθούν να αποτελούν ένα ανοικτό πεδίο εντατικής μελέτης διότι δεν είναι ακόμη απόλυτα σαφές το ποσοστό επαναπρογραμματισμού τους, αλλά και η γενετική και επιγενετική τους σταθερότητα.

Υπάρχει κίνδυνος ογκογένεσης ύστερα από μεταμόσχευσή τους καθώς τείνουν να δημιουργούν τερατώματα (Dubey et al., 2018; Hwang et al., 2021; Rohani et al., 2014; Ruiz et al., 2012; Studer, 2010). Για το λόγο αυτό μελετάται η δυνατότητα χρήσης τους για τη θεραπεία της ΟΑ ύστερα από διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα αλλά και σε iMSCs (Υποενότητα 2.4) (Cheng et al., 2014; Guzzo et al., 2013; Kalamegam et al., 2018; Ko et al., 2014; Pichard et al., 2020).

2.4 Μεσεγχοματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)

Τα MSCs, όπως αναφέρεται στην υποενότητα 2.2, χαρακτηρίζονται από πολλά πλεονεκτήματα αλλά και από σημαντικά μειονεκτήματα τα οποία περιορίζουν τη χρήση τους ως θεραπευτικά μέσα. Για το λόγο αυτό υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τη δημιουργία MSCs από εναλλακτικές πηγές (Choudhery & Mahmood, 2022). Η ολοδυναμία των iPSCs δίνει τη δυνατότητα διαφοροποίησης τους σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο υπό κατάλληλες συνθήκες. Η μετατροπή τους σε εμβρυονικά σωματίδια (Embryoid Bodies, EBs) είναι ένας από τους τρόπους δημιουργίας των iMSCs (Cao et al., 2015; Munir et al., 2019; Wruck et al., 2021). Τα iMSCs είναι πολυδύναμα βλαστοκύτταρα παρόμοια με τα MSCs. Διαθέτουν ίδιους επιφανειακούς δείκτες με τα MSCs, ενώ επίσης δε διαθέτουν επιφανειακούς δείκτες αιμοποιητικών κυττάρων (Dupuis & Oltra, 2021).

Χάριν της ευκολίας απομόνωσης αλλά και της αφθονίας των iPSCs, η δημιουργία των iMSCs φαίνεται να αποτελεί ιδανική επιλογή, καθώς αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν να παραχθούν σε απεριόριστο αριθμό από γενετικά ομοιογενείς κυτταρικές σειρές iPSCs. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά φέρουν όλες τις αναγεννητικές και θεραπευτικές ιδιότητες των MSCs μαζί με επιπλέον πλεονεκτήματα, ενώ δε χαρακτηρίζονται από τα μειονεκτήματα των MSCs, όπως αναφέρεται παρακάτω στην υποενότητα 4 (Cao et al., 2015; Wruck et al., 2021). Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη ενδιαφέροντες ως προς την ασφάλεια της χρήσης τους διότι έχουν χαμηλότερο δυναμικό οστεογένεσης σε σχέση με τα MSCs, είναι πιθανό να οδηγήσουν στο σχηματισμό τερατωμάτων μετά από έγχυσή τους, ενώ το πρωτόκολλο δημιουργίας τους μέσω EBs είναι δύσκολο με χαμηλή αποτελεσματικότητα (Hua et al., 2022).

Λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που χαρακτηρίζουν τα iMSCs, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των σύγχρονων μελετών ώστε να διασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της χρήσης τους, ενώ αποτελούν και σημαντική εναλλακτική για την κυτταρική θεραπεία της ΟΑ (Lach et al., 2022).

3. Θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΟΑ

Η ΟΑ, όπως προαναφέρθηκε είναι μία χρόνια πολυπαραγοντική νόσος με σημαντικό κοινωνικό αλλά και οικονομικό αντίκτυπο. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί καμία αποτελεσματική μέθοδος που να προλαμβάνει ή να θεραπεύει αυτή την εκφυλιστική νόσο (Wyles et al., 2015). Στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων εφαρμόζεται ένας συνδυασμός θεραπευτικών μεθόδων ο οποίος προσαρμόζεται στις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς. Με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες και αναλόγως του σταδίου της ΟΑ, εφαρμόζονται κατά σειρά μη φαρμακευτικές θεραπείες, φαρμακευτικές θεραπείες και τέλος εάν κριθεί απαραίτητο χειρουργικές επεμβάσεις (Hunter & Felson, 2006). Πλέον εφαρμόζονται και θεραπείες με έγχυση κυττάρων ή αλλιώς κυτταρικές θεραπείες όπως θα αναφερθεί παρακάτω (Harrell et al., 2019).

Στα αρχικά στάδια της ΟΑ εφαρμόζεται η μη φαρμακευτική θεραπευτική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, ύστερα από κατάλληλη ενημέρωση, συνίσταται στους νοσούντες να αλλάξουν τρόπο ζωής εντάσσοντας την άσκηση στην καθημερινότητά τους. Μερικά από τα οφέλη της άσκησης είναι η ενδυνάμωση των περιαρθρικών μυών, όπως επίσης και του τετρακέφαλου. Η ενδυνάμωση αυτών των μυών συνεισφέρει στη μείωση του πόνου αλλά και στη βελτίωση της λειτουργικότητας της άρθρωσης. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της άσκησης αποτελεί η απώλεια βάρους, μία επίσης σημαντική μη φαρμακευτική προσέγγιση που κρίνεται απαραίτητη σε περιπτώσεις υπέρβαρων ατόμων. Τέλος, σημαντικό είναι τα άτομα να λαμβάνουν και φυσικοθεραπείες με στόχο την ύφεση του πόνου και των συμπτωμάτων με ταυτόχρονη αύξηση του εύρους κίνησης της άρθρωσης (Hunter & Felson, 2006; Zhang et al., 2016).

Η φαρμακευτική θεραπεία αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση στην ΟΑ. Τα περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα στοχεύουν κυρίως στην καταπράυνση του πόνου και τη μείωση της φλεγμονής, ενώ κανένα δεν αναστρέφει τη φθορά που έχει επέλθει στην άρθρωση. Χορηγούνται κυρίως πέντε τύποι φαρμακευτικών σκευασμάτων. Η ακεταμινοφαίνη ή αλλιώς παρακεταμόλη, μη

στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ), οπιοειδή αναλγητικά, εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (ΕΑΕΣ), καθώς και ενδοαρθρικές ενέσεις κορτικοστεροειδών και υαλουρονικού οξέος (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019b; Hunter & Felson, 2006; Zhang et al., 2016). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως πολλά από αυτά τα σκευάσματα χαρακτηρίζονται από έντονες ανεπιθύμητες ενέργειες, επομένως πολλές επιστημονικές μελέτες στρέφονται σε αυτό το πεδίο και το επίκεντρό τους αποτελούν οι IL-1β, IL-6, Nerve growth factor (NGF) κ.α. ως εναλλακτικές φαρμακευτικές επιλογές (Abramoff & Caldera, 2020; Quicke et al., 2022; Zhang et al., 2016).

Η χειρουργική επέμβαση συστήνεται σε πολύ προχωρημένο στάδιο της νόσου, όταν πλέον δε μπορούν να εφαρμοστούν άλλες θεραπείες. Σε αυτό το στάδιο ο πόνος είναι εξαιρετικά έντονος, ενώ οι καθημερινές απλές και απαραίτητες κινήσεις, όπως για παράδειγμα κινήσεις που απαιτούνται για το περπάτημα, είναι αδύνατο να πραγματοποιηθούν. Η ολική αρθροπλαστική είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη θεραπεία της ΟΑ γόνατος και ισχίου, δίνοντας τη δυνατότητα πλήρους αποκατάστασης της άρθρωσης στους ασθενείς (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019a; Hunter & Felson, 2006; Martel-Pelletier et al., 2016) . Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν επιπλοκές, όπως το γεγονός ότι οι προθέσεις που χρησιμοποιούνται δεν όμοιες μίας φυσικής άρθρωσης (Wyles et al., 2015), ενώ επεμβάσεις αυτού του είδους συστήνονται σε μεγαλύτερες ηλικίες (>60 ετών) διότι τα αρθρικά πρόσθετα που χρησιμοποιούνται έχουν μικρό προσδόκιμο ζωής περίπου 15 έτη (Hunter & Felson, 2006; Martel-Pelletier et al., 2016).

3.1 Θεραπεία με Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) και Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)

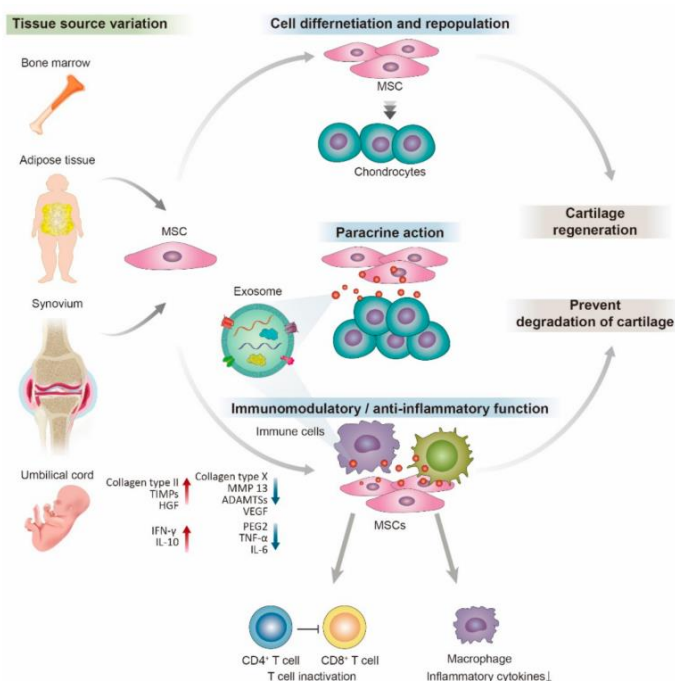
Οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες θεραπείες για την ΟΑ έχουν ως κύριο στόχο την εξάλειψη των συμπτωμάτων της και δεν οδηγούν σε πλήρη αναγέννηση της άρθρωσης αποτρέποντας τον περαιτέρω εκφυλισμό της. Για το λόγο αυτό διερευνάται η κυτταρική θεραπεία της. Επί του παρόντος, μόνο η αυτόλογη μεταμόσχευση χονδροκυττάρων έχει λάβει έγκριση για κλινική χρήση από την Αμερικάνικη Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων και των Φαρμάκων (FDA), υπάρχουν όμως πολλά

ερωτήματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της (Harrell et al., 2019). Επομένως πλέον εντατικό πεδίο μελέτης αποτελεί η χρήση των MSCs ως κυτταρική θεραπεία της OA (Chang et al., 2016; Harrell et al., 2019; Kwon et al., 2022; Song et al., 2020).

Τα MSCs αποτελούν το επίκεντρο των σύγχρονων μελετών ως κυτταρική θεραπεία της OA. Αυτό συμβαίνει λόγω των ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν (βλέπε υποενότητα 2.2), με πιο σημαντικές το δυναμικό διαφοροποίησής τους, την ανοσορρυθμιστική τους δράση, αλλά και την παρακρινή τους δράση (Kwon et al., 2022; Quicke et al., 2022; Zhao et al., 2020). Συμβάλουν αποτελεσματικά στην αναγέννηση του χόνδρου και βελτίωση της μορφολογίας του, στη μείωση του πόνου και στην καταστολή της φλεγμονής (Kwon et al., 2022; Yan et al., 2021; Zhao et al., 2020). Ο τρόπος χορήγησης τους αρχικά γινόταν με ενδοαρθρική ένεση όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά, οπότε στο προσκήνιο έχουν έρθει εναλλακτικοί τρόποι, όπως χρησιμοποιώντας διάφορες χειρουργικές τεχνικές με ικρίωματα αλλά και η χρήση εξωσωμάτων των MSCs αντί των ίδιων των κυττάρων (Kwon et al., 2022).

Ειδικότερα, τα MSCs λόγω του ισχυρού δυναμικού διαφοροποίησης που διαθέτουν, όντας πολυδύναμα, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα και να εγχυθούν στην άρθρωση. Τα χονδροκύτταρα αυτά θα αντικαταστήσουν τα ήδη υπάρχοντα. Προτιμώνται τα MSCs έναντι των χονδροκυττάρων διότι απομονώνονται με μεγαλύτερη ευκολία, καλλιεργούνται για μεγάλο διάστημα διατηρώντας το φαινότυπο τους, πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη ταχύτητα και πιο σημαντικά δεν είναι πλήρως διαφοροποιημένα οπότε μπορούν να επέμβουν σε όλους τους ιστούς της άρθρωσης (Wyles et al., 2015). Όσον αφορά την ανοσορρυθμιστική τους δράση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω επαφής μεταξύ των κυττάρων είτε παρακρινώς. Παράγουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια όπως ο TGF-β, PGE2, IDO, IL-10 κ.α. τα οποία επηρεάζουν την πόλωση, την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των μακροφάγων αλλά ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ακόμη, καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων ενισχύοντας την απόπτωσή τους παίζοντας έτσι κρίσιμο ρόλο στην ανοσορρύθμιση τους, ενώ μέσω επαφής είτε παρακρινώς συμβάλουν στην ανοσορρύθμιση και των B λεμφοκυττάρων (Zhao et al., 2020). Τα εξωσώματα είναι μικρά εξωκυττάρια κυστίδια με διάμετρο 30-150 nm που εκκρίνονται από τα κύτταρα με στόχο τη διακυτταρική επικοινωνία. Φαίνεται πως τα εξωσώματα των MSCs έχουν τη δυνατότητα να επαναφέρουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού των

χονδροκυττάρων της άρθρωσης, να ενισχύουν τη σύνθεση της ECM, να μειώνουν τον πόνο κ.α. (Gao et al., 2018; Zhao et al., 2020). Συνοπτικά η δράσεις τους κατά την εφαρμογή τους ως κυτταρική θεραπεία της ΟΑ φαίνονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των δράσεων των MSCs κατά την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου (Kwon et al., 2022).

Παρά τα πλεονεκτήματα των MSCs που τα καθιστούν ιδανικά ως επιλογή για τη θεραπεία της ΟΑ, χαρακτηρίζονται και από σημαντικούς περιορισμούς. Κάποιοι από αυτούς αφορούν την ετερογένειά τους και την έντονη βλαστικότητα τους, ενώ δυσμενείς επιπτώσεις πιθανόν να ακολουθήσουν τη χορήγησή τους, όπως η ανοσολογική ασυμβατότητα δότη με δέκτη, η πρόκληση ογκογένεσης και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως αυξάνουν το ρίσκο υπερτροφίας και οστεοποίησης κατά την αναγέννηση του χόνδρου (Chang et al., 2016; Gao et al., 2018). Για την αποφυγή των παραπάνω περιορισμών χρησιμοποιούνται τα iMSCs. Τα κύτταρα αυτά, όπως προαναφέρθηκε, διατηρούν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των MSCs χωρίς όμως να φέρουν χαρακτηριστικά του δότη και γήρανσης, καθώς έχουν υποστεί “rejuvenation” (ανανέσωση). Για το λόγο αυτό μελετάται η

πιθανή χρήση τους για τη θεραπεία της OA αντί των MSCs (Piñeiro Ramil et al., 2019; Pourakbari et al., 2019; Spitzhorn et al., 2019).

4. Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)

Τα MSCs όπως και τα iMSCs αποτελούν πεδία εντατικής μελέτης προκειμένου να εκτιμηθούν οι ιδιότητές τους, η ασφάλεια χρήσης τους καθώς και η αποτελεσματικότητά τους. Μεγάλο ενδιαφέρον επίσης υπάρχει και για την ταυτοποίηση των διαφορών και ομοιοτήτων τους. Είναι γνωστό πως και οι δύο κυτταρικοί τύποι προέρχονται από το μεσόδερμα, αλλά σίγουρα δεν πρόκειται για πανομοιότυπα κύτταρα (M. Xu et al., 2019). Τα iMSCs καθώς προκύπτουν από τα iPSCs είναι ανανεωμένα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας τους υφίστανται επιγενετική αναδιαμόρφωση και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με την ανανέωση τους (rejuvenation). Ξεπερνούν έτσι το βασικό πρόβλημα της γήρανσης και ετερογένειας που χαρακτηρίζει τα MSCs.

Μορφολογικά οι δύο κυτταρικοί τύποι είναι πανομοιότυποι, το σχήμα τους είναι ατρακτοειδές και σχηματίζουν αποικίες παρόμοιες των ινοβλαστών. Πανομοιότυπος επίσης είναι και ο ανοσοφαινότυπος τους. Τα iMSCs εκφράζουν τους τυπικούς επιφανειακούς δείκτες των MSCs όπως π.χ. CD73, CD90 και CD105 με παράλληλη απουσία αιμοποιητικών δεικτών αλλά και δεικτών πολυδυναμίας όπως π.χ. του OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4). Έχει παρατηρηθεί πως εκφράζουν το δείκτη CD105 σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ενώ δεν εκφράζουν το δείκτη Stro-1 (Frobel et al., 2014; Kimbrel et al., 2014; Piñeiro-Ramil et al., 2021). Επιπλέον, το δυναμικό διαφοροποίησής τους προς οστεοβλάστες είναι ισοδύναμο ή και μεγαλύτερο των MSCs αλλά διαθέτουν μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα και χονδροβλάστες (Frobel et al., 2014; Piñeiro-Ramil et al., 2021; M. Xu et al., 2019). Τα iMSCs μπορούν ακόμη να προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες. Επομένως, παρά τις κάποιες διαφορές τους με τα MSCs, πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια για τον ορισμό τους ως MSCs (Frobel et al., 2014).

Τα iMSCs διατηρούν τις αναγεννητικές και θεραπευτικές ιδιότητες των MSCs. Το εκκρίτωμα τους προσομοιάζει αυτό των MSCs. Εκκρίνουν μία σειρά κυττοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των IL-10, IDO και PGE2 αναλόγως του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται (Kimbrel et al., 2014; Wruck et al., 2021). Πανομοιότυπη είναι επίσης και η παρακρινής τους δράση. Αξίζει όμως να αναφερθεί πως τα iMSCs έχουν πιο ενισχυμένες αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, ενώ υπερτερούν και ως προς την ικανότητα τους να μεταναστεύουν σε τραυματισμένους ιστούς (“homing”). Επίσης, μειώνουν πιο δραστικά τις κυτταρολυτικές ικανότητες των NK κυττάρων και έτσι μπορούν να ταξινομηθούν ως χρήσιμη θεραπευτική επιλογή για την πρόληψη της απόρριψης αλλομοσχεύματος (Rajasingh et al., 2021; Sabapathy & Kumar, 2016).

Κατά τη δημιουργία των iMSCs, η επιγενετική αναδιαμόρφωση και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης έχουν ως αποτέλεσμα ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με την ανανέωση τους. Το rejuvenation αναφέρεται σε μία διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αντιστρέφονται σε πιο εμβρυϊκή κατάσταση. Έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια, π.χ. *PM20D2* (*Peptidase M20 Domain Containing 2*), *IGSF3* (*Immunoglobulin Superfamily Member 3*), *CXADR* (*CXADR Ig-Like Cell Adhesion Molecule*), *FAM84B* (*Family with sequence similarity 84*), *INHBE* (*Inhibin Subunit Beta E*), *DNMT3B* (*DNA Methyltransferase 3 Beta*) και *HRASLS* (*H-RAS-like suppressor*), που εκφράζονται στα iMSCs και τα iPSCs αλλά δεν εκφράζονται σε πρωτογενή MSCs τα οποία χαρακτηρίζονται ως υπογραφή ανανέωσης (rejuvenation signature). Αντιθέτως, γονίδια που εκφράζονται στα πρωτογενή MSCs αλλά όχι στα iPSCs και iMSCs αναφέρονται ως η υπογραφή γήρανσης π.χ. *FAM109B* (*Family With Sequence Similarity 109 Member B*), *COX7A* (*Cytochrome c oxidase polypeptide 7A1*), *EZA2*, *EFEMP1* (*EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1*), *ENPP2* (*Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2*), *TMEM119* (*Transmembrane Protein 119*) και *EDIL3* (*EGF Like Repeats And Discoidin Domains 3*) (Spitzhorn et al., 2019). Τα MSCs όπως και τα iMSCs εκφράζουν γονίδια μεσοδερμικής προελεύσεως σε παρόμοιο επίπεδο. Αν και τα iMSCs προέρχονται από τα iPSCs, δεν εκφράζουν γονίδια ολοδυναμίας και επίσης δε φέρουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης μετά από έγχυσή τους, σε αντίθεση με τα iPSCs που μπορεί να οδηγήσουν σε δημιουργία τερατώματος (Wruck et al., 2021). Επίσης, γονίδια που συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση, την κυτταρική προσκόλληση και την ανάπτυξη

υπερεκφράζονται στα iMSCs, ενώ γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των T κυττάρων και την ανασοαπόκριση υπερεκφράζονται στα MSCs (Frobel et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) που εκφράζεται σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όπως και το *Oct4* που σχετίζεται με πολυδυναμία υπερεκφράζονται στα iMSCs. Όσον αφορά γονίδια που σχετίζονται με την οστεογένεση, τα iMSCs χαρακτηρίζονται από υψηλότερη έκφραση του παράγοντα RUNX2 και Sp7 (Sp7 Transcription Factor), ενώ τα MSCs εκφράζουν σε υψηλότερα επίπεδα την οστεοκαλσίνη (OCN) (Piñeiro-Ramil et al., 2021). Ωστόσο, πέρα από τις διαφορές που παρατηρούνται στη γονιδιακή τους έκφραση οι δύο κυτταρικοί τύποι παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες σε μεταγραφικό επίπεδο (Wruck et al., 2021).

Το επιγενετικό προφίλ των iMSCs εάν και διατηρεί ομοιότητες με εκείνο των MSCs, παρουσιάζει και χαρακτηριστικές διαφορές. Όπως προαναφέρθηκε, τα iMSCs βρίσκονται σε ανανεωμένη κατάσταση σε σύγκριση με τα πρωτογενή MSC. Έχει δειχθεί λοιπόν, πως κατά το rejuvenation που υφίστανται χάνουν το προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε περιοχές που σχετίζονται με την ηλικία του δότη αλλά και σε ιστοειδικές περιοχές, ενώ διατηρούν μία ειδική υπογραφή μεθυλίωσης DNA χαρακτηριστική του δότη (Frobel et al., 2014; Wruck et al., 2021).

Συνεπώς, τα iMSCs όντας πανομοιότυπα με τα MSCs αποτελούν μία εναλλακτική πηγή βλαστοκυττάρων επόμενης γενιάς με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές στην αναγεννητική ιατρική όπως και στη θεραπεία της ΟΑ. Η διερεύνηση της σχέσης τους με τα MSCs έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών νέων μελετών, καθώς θα δώσουν φως στην ακριβή δράση και λειτουργία τους (Choudhery & Mahmood, 2022; Spitzhorn et al., 2019; Wruck et al., 2021).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση τυχόν διαφορών σε επίπεδο μεταγραφώματος, μεταξύ των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs).

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν MSCs από οστεοαρθρικούς ασθενείς και υγιή άτομα, καθώς και iPSCs προερχόμενα από τα συγκεκριμένα MSCs, τα οποία επαναδιαφοροποιήθηκαν σε iMSCs.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση και σύγκριση των επιπέδων της μεταγραφικής έκφρασης 183 γονιδίων σε MSCs, iPSCs και iMSCs με στοχευμένη αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Αρθρικά δείγματα ασθενών- μαρτύρων

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) τα οποία απομονώθηκαν από το μυελό των οστών υγείων δοτών καθώς και ασθενών με οστεοαρθρίτιδα. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια προηγούμενου προγράμματος του εργαστηρίου «Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα για την κυτταρική θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας- iStemTheOS». Ειδικότερα, η απομόνωση έγινε από ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική για την αποκατάσταση της άρθρωσης στην Ορθοπεδική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα των αρθρώσεων όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, χονδροδυσπλασία, μολυσματική ΟΑ, και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Όσον αφορά τα δείγματα υγίων ατόμων, η απομόνωσή τους έγινε από υγιή άτομα τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση λόγω κατάγματος ή ακρωτηριασμού, είτε υγίων δοτών από τη Μονάδα Μεταμόσχευσης ΜΟ του Νοσοκομείου Αγ. Σοφία, και δεν παρουσίαζαν κάποιο ιστορικό για παθήσεις των οστών ή αλλοιώσεις συνυφασμένες με ΟΑ όπως προέκυψε ύστερα από ακτινολογικό έλεγχο.

5.2 Απόψυξη και πολλαπλασιασμός ανθρώπινων επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)

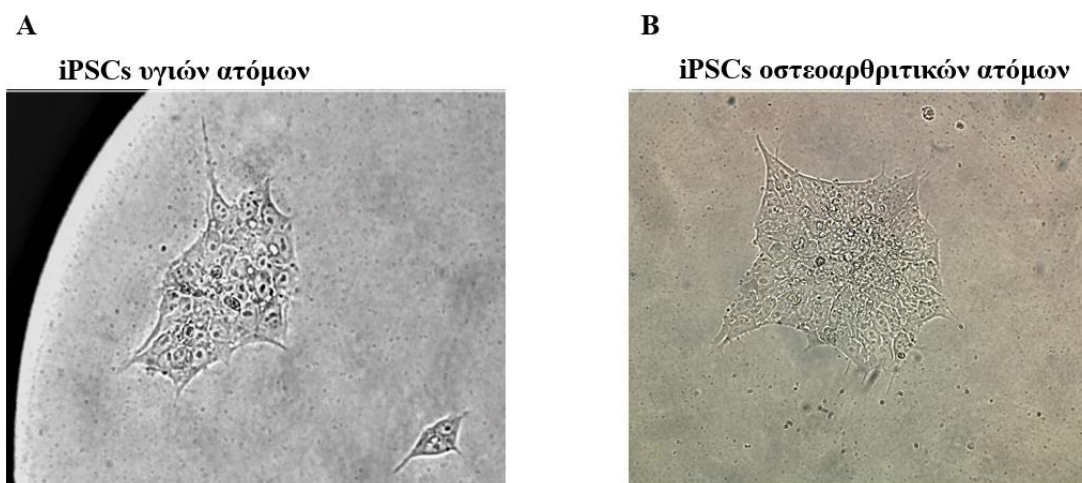
Ο επαναπρογραμματισμός των MSCs σε iPSCs έγινε μέσω λιποσωματικής μεταφοράς συνθετικών μορίων mRNA, των μεταγραφικών παραγόντων όλοδυναμίας Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28. Οι σειρές αυτές εκφράζουν τους δείκτες όλοδυναμίας Oct3/4, Rex-1, Sox2, Nanog, ενώ in vivo δημιουργούν τερατώματα (βλέπε υποενότητα 2.3). Προκειμένου να παραχθεί επαρκής αριθμός κυττάρων, ώστε να είναι δυνατή η διαφοροποίηση τους σε iMSCs, αλλά και να ανανεωθεί το απόθεμα τους, είναι αναγκαίος ο πολλαπλασιασμός των iPSCs μέσω καλλιέργειας τους.

Η καλλιέργεια όλων των ολοδύναμων κυττάρων έγινε χωρίς την παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων (feeder cells). Τα iPSCs, όπως και τα MSCs αποψύχθηκαν από το υγρό άζωτο και πολλαπλασιάστηκαν σε καλλιέργειες ως προσκολλημένες αποικίες. Ο πολλαπλασιασμός τους παρακολουθούνταν καθημερινά σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss). Όταν μεγάλωναν τόσο ώστε να αποκτήσουν πυκνό κέντρο και να αρχίσει η μεταξύ τους συγχώνευση (κάθε 4- 6 μέρες), ανακαλλιεργούνταν με μεταφορά σε τριπλάσιο αριθμό φλασκών. Η αποκόλληση των κυττάρων γινόταν με τη δράση του ενζύμου dispase (1U/ml STEMCELL). Κατά τις ανακαλλιέργειες κάποιες φλάσκες καταψύχθηκαν, προς ανανέωση του κυτταρικού αποθέματος, μία φλάσκα από κάθε σειρά χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση σε MSCs και μία φλάσκα για έλεγχο της γενετικής σταθερότητας πριν από τη διαφοροποίηση.

5.2.1 Απόψυξη των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)

Τουλάχιστον μια ώρα πριν την απόψυξη, γίνεται επίστρωση μίας νέας φλάσκας 25cm² (Sarstedt) με υπόστρωμα Matrigel (Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free). Το Matrigel περιέχει πρωτεΐνες όπως η λαμινίνη, το κολλαγόνο 4, το νιδογόνο και πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης. Πιο συγκεκριμένα, 31,3μl Matrigel διαλύονται σε 2.5ml υλικού DMEM/F-12 με 15mM HEPES (STEMCELL). Με το πέρας της μίας ώρας αφαιρείται από το υγρό άζωτο μία αμπούλα που περιέχει τα iPSCs. Ακολουθεί απόψυξη της σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μόλις παραμείνει ένα πολύ μικρό κομμάτι πάγου μεταφέρεται γρήγορα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και ψεκάζεται με 70% αιθανόλη προς αποφυγή μόλυνσεων. Συλλέγεται από την αμπούλα το υλικό που περιέχει τα κύτταρα και μεταφέρεται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου 15ml (Corning). Η αμπούλα ξεπλένεται δύο φορές με DMEM/F-12 για τη συλλογή των εναπομείναντων κυττάρων. Προστίθενται στο σωληνάριο 9 ml DMEM/F-12 για να αραιωθεί η συγκέντρωση 10% του DMSO (Sigma Aldrich), κρυοπροστατευτικό τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 320 xg (1300 rpm) για 6 λεπτά. Από τη νέα επικαλυμμένη με Matrigel φλάσκα αφαιρείται το DMEM/F-12 και προστίθενται 4 ml φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας mTeSR1 (STEMCELL). Το mTeSR1 είναι κατάλληλο για καλλιέργειες χωρίς υποστηρικτικά κύτταρα, έχει καθορισμένη σύσταση και περιέχει ανασυνδυασμένους τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β και FGF-2 που σχετίζονται με

τη διατήρηση της πολυδυναμίας των iPSCs, ενώ είναι συμβατό με τις συνθήκες GMP (Good Manufacturing Practices) και δεν περιέχει ορό. Στη συνέχεια, προστίθενται 10μl Rho kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632 (STEMCELL), το οποίο βοηθά στην επιβίωση των iPSCs μετά την κατάψυξη. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε φρέσκο mTeSR1. Τα κύτταρα μεταφέρονται ως συσσωματώματα 3-10 κυττάρων στη νέα φλάσκα και η φλάσκα ανακινείται για την ομοιόμορφη διασπορά τους. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο (Heraeus Instrumanets), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώνεται καθημερινά, χωρίς προσθήκη του Rock inhibitor, Y-27632.



Εικόνα 7: Μικροσκοπική παρατήρηση των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) A. Υγιών ατόμων (μαρτύρων) και B. Ασθενών με οστεοαρθρίτιδα.

5.2.2 Ανακαλλιέργεια των σειρών επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)

Τουλάχιστον μία ώρα πριν την ανακαλλιέργεια, γίνεται επίστρωση φλασκών 25cm² με Matrigel, τριπλάσιων σε αριθμό από αυτές της τρέχουσας καλλιέργειας. Το υλικό καλλιέργειας των κυττάρων αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται με Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco). Προστίθεται στη φλάσκα 1 ml ενζύμου Dispase και τοποθετείται στον κλίβανο για 1-2 λεπτά για να δράσει το ένζυμο, έως ότου τα περιθώρια των αποικιών αρχίσουν να ανασηκώνονται. Οι αποικίες παρακολουθούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Μόλις ανασηκωθούν, αφαιρείται το ένζυμο dispase και ακολουθεί ξέπλυμα της φλάσκας δύο φορές με DPBS, ενώ ύστερα

προστίθενται 3 ml DMEM/F-12. Χρησιμοποιώντας ξύστρα αποκολλούνται οι μερικώς αποκολλημένες αποικίες από το υπόστρωμα. Με πιπέτα μίας χρήσεως ξεπλένονται τα τοιχώματα της φλάσκας με το εναιώρημα, ώστε να ανασηκωθούν όλες οι αποικίες. Το εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου και η φλάσκα ξεπλένεται ακόμη 2-3 φορές μέχρι να συγκεντρωθούν όλες οι αποικίες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 320xg (1300 rpm) για 6 λεπτά. Από τις νέες επικαλυμμένες με Matrigel φλάσκες αφαιρείται το DMEM/F-12 και προστίθεται φρέσκο υλικό καλλιέργειας mTeSR1. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, αφαιρείται το υπερκείμενο και αναδιαλύεται το ίζημα με mTeSR1 προσεχτικά ώστε να μη σπάσουν τελείως τα συσσωματώματα. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται στις καινούριες φλάσκες και τοποθετούνται στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂). Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώνεται καθημερινά.

5.3 Διαφοροποίηση των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) μέσω εμβρυονικών σωμάτων (EB)

Κατά τη διαδικασία αυτή επάγεται η δημιουργία εμβρυονικών σωμάτων (ΕΣ) από τα iPSCs. Τα ΕΣ είναι σφαιρικές συναθροίσεις κυττάρων μέσα στις οποίες ξεκινά αυτόματα η διαφοροποίηση προς τα τρία βλαστικά δέρματα ενδόδερμα, μεσοδερμα και εξώδερμα. Στόχος είναι η μετέπειτα ενίσχυση του μεσοδέρματος με την προσθήκη των παραγόντων Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (FGF-2) (R&D Systems) και Bone Morphogenetic Protein 4, BMP-4 (Miltenyi Biotec). Αφού δημιουργηθούν τα ΕΣ μεταφέρονται σε φλάσκες επικαλυμμένες με ζελατίνη όπου και παραμένουν μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια της φλάσκας κατά 80-90%. Μετέπειτα ακολουθεί ανακαλλιέργεια (p0) των ΕΣ σε νέες φλάσκες με ζελατίνη. Τέλος, τα iMSCs που προκύπτουν καλλιεργούνται, μετά τις 2 πρώτες ανακαλλιέργειες, σε πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας, χωρίς επίστρωση με ζελατίνη.

5.3.1 Δημιουργία εμβρυονικών σωμάτων (ΕΣ)

Σε τρυβλίο χαμηλής προσκολλητικότητας 6 θέσεων (Corning) προστίθενται 3 ml υλικού διαφοροποίησης σε ΕΣ (Πίνακας 1). Από τη φλάσκα με τα iPSCs αφαιρείται το θρεπτικό υλικό mTeSR1 και συλλέγονται τα κύτταρα, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.2.2, με τη διαφορά ότι το ίζημα επαναδιαλύεται σε υλικό

διαφοροποίησης σε ΕΣ, με μεγάλη προσοχή ούτως ώστε να μη σπάσουν καθόλου τα συσσωματώματα. Στη συνέχεια, μεταφέρονται με προσοχή σε τρυβλίο χαμηλής προσκολλητικότητας και τοποθετούνται στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂). Την επόμενη ημέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού των ΕΣ αφαιρώντας το εναιώρημα των κυττάρων και φυγοκεντρώντας στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο, αναδιαλύεται το ίζημα, και πάλι με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη σπάσουν τα ΕΣ, και μεταφέρονται στο τρυβλίο με φρέσκο υλικό διαφοροποίησης στο οποίο προστίθεται επίσης και 50ng/ml BMP-4. Τέλος, το τρυβλίο τοποθετείται στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂) και το υλικό ανανεώνεται κάθε δύο ημέρες προσθέτοντας και BMP-4. Τα ΕΣ διατηρούνται συνολικά για επτά ημέρες.

Πίνακας 1: Υλικό διαφοροποίησης των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) σε εμβρυονικά σωματίδια (ΕΣ).

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση
Knockout DMEM (Gibco)	1X
Knockout Serum Replacement, KSR (Gibco)	20%
MEM Non-essential aminoacids (NEAA) (Gibco)	1%
L-Glutamine, 200mM (Gibco)	1mM
2-Mercaptoethanol, 55mM (Gibco)	0.1 mM



Εικόνα 8: Μικροσκοπική παρατήρηση των εμβρυονικών σωματίων (ΕΣ).

5.3.2 Μεταφορά εμβρυονικών σωμάτων (ΕΣ) σε ζελατίνη

Υπό στείρες συνθήκες, κάτω από θάλαμο κάθετης νηματικής ροής πραγματοποιείται επίστρωση με ζελατίνη μίας φλάσκας 25cm². Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 3ml διαλύματος 0.1% ζελατίνης σε νερό (STEMCELL) στη φλάσκα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου αναμονής, η ζελατίνη αφαιρείται και η φλάσκα αφήνεται με ανοιχτό καπάκι για περίπου 1 ώρα μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το διάλυμα. Στη συνέχεια, στη φλάσκα προστίθενται 5 ml υλικού διαφοροποίησης σε iMSCs, το οποίο περιέχει DMEM/F12 εμπλουτισμένο με 10% KSR, 5ng/ml FGF-2, 1mM L-Glutamine και 1% NEAA. Τα ΕΣ συλλέγονται από το τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης με τον παρακάτω τρόπο, αφαιρείται το εναιώρημα των κυττάρων, το τριβλίο ξεπλένεται με DPBS και το διάλυμα που έχει συλλεχθεί φυγοκεντρείται στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρείται το υπερκείμενο, το ίζημα διαλύεται σε υλικό διαφοροποίησης σε iMSCs και με μια αποστειρωμένη σύριγγα με βελόνα 21G διαχωρίζονται καλά τα ΕΣ, καθώς δεν πρέπει να σχηματίζουν συσσωματώματα. Μετά το διαχωρισμό των ΕΣ, τοποθετούνται ως μονήρη πλέον κύτταρα στη νέα επιστρωμένη με ζελατίνη φλάσκα και επωάζονται στον κλίβανο (37 °C, 5% Co₂), ενώ γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού κάθε τρεις ημέρες.

5.4 Απομόνωση RNA από καλλιιεργημένα MSCs, iPSCs και iMSCs

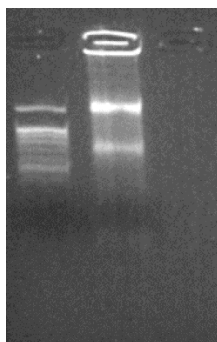
Προκειμένου να απομονωθεί το RNA από τα καλλιιεργημένα κύτταρα ακολουθήθηκε μία διαδικασία φυγοκεντρήσεων, πλύσεων και επώσεων με διαφορετικές αλκοόλες. Τελικώς, απομονώθηκε το mRNA των κυττάρων με σκοπό τη διερεύνηση της μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων.

Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλούνται από τη φλάσκα με τη ζελατίνη, ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφηκε στην υποενότητα 5.2.2 αλλά αντί του ενζύμου dispase χρησιμοποιείται το ένζυμο θρυψίνη. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε φιαλίδιο eppendorf και προστίθενται 1ml Trizol (Invitrogen, life Technologies, Paisley, UK) με στόχο τη λύση των κυττάρων. Ακολουθεί επώση των δειγμάτων για 5min στο υδατόλουτρο στους 15-30 °C. Μετά την επώση, προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο (Merck), ανακινούνται έντονα για 15 sec και επωάζονται για ακόμη 2-3 min στο υδατόλουτρο στους 15-30 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 13000

rpm για 15 min στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτουν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει Trizol/χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία βρίσκεται το RNA. Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2ml όπου πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης (Amersco). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 10 min στο υδατόλουτρο στους 15-30 °C και φυγοκέντρηση τους στις 12000 rpm για 10 min στους 4 °C. Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθενται 500μl κρύας αιθανόλης 70% (Scharlau) στο ίζημα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 10000 rpm στους 4 °C. Αφαιρείται το υπερκείμενο, και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά, διαλύεται σε 30 μl RNase-free water (Qiagen). Τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν στο υδατόλουτρο για 10 min στους 55-60 °C.

5.5 Έλεγχος της ποιότητας του RNA μέσω ηλεκτροφόρησης

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή αγαρόζης 2%.

5.6 Αλληλούχιση του mRNA επιλεγμένων γονιδίων: Targeted RNAseq-NGS

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αλλά και την ποσοτικοποίηση της μεταγραφικής έκφρασης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση νέας γενιάς σε επιλεγμένα γονίδια. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση με τη χρήση ενός πάνελ 183 γονιδίων προκειμένου να ταυτοποιηθεί η διαφορική, πιθανόν, μεταγραφική έκφραση των κυττάρων. Αρχικά, δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες ενισχύοντας τα εξώνια των υπό μελέτη γονιδίων με τη χρήση ειδικών αλληλουχιών. Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες

φορτώθηκαν σε μία ειδική κασέτα που ονομάζεται cartridge, η οποία περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την ενίσχυση και αλληλούχιση των βιβλιοθηκών. Τα αντιδραστήρια του cartridge μεταφέρονται μέσω συστήματος της συσκευής σε μία ειδική γυάλινη πλάκα (flowcell), όπου εκεί πραγματοποιείται η ενίσχυση των βιβλιοθηκών με ενίσχυση γέφυρας (bridge amplification). Τα παραπάνω αποτελούν μία συνοπτική περιγραφή των βημάτων που θα αναλυθούν παρακάτω. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Illumina MiSeq.

5.6.1 Δημιουργία βιβλιοθηκών

Αρχικά, πραγματοποιείτε μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA που απομονώθηκε με χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) και στη συνέχεια αραιώνεται αναλόγως σε συγκέντρωση 50 ng/μl με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Έπειτα, γίνεται αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA. Χρησιμοποιήθηκε το AmpliSeq cDNA Synthesis kit της Illumina. Το RNA θερμαίνεται στους 80°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε ένα 96-well PCR plate τοποθετούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix (2 μl)
- RNA σε ποσότητα που καθορίζεται αναλόγως του αποτελέσματος του Qubit
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες μέχρι τελικού όγκου 10μl

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων το plate τοποθετείτε στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιήτη Veriti™ 96 Well thermal cycler, Applied Biosystems (California, USA) και ξεκινά η αντίδραση της PCR (Polymerase Chain Reaction) σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

- 42°C για 30 λεπτά
- 85°C για 5 λεπτά
- Συντήρησή στους 10°C

Με το πέρας της σύνθεσης του cDNA, ξεκινά η ενίσχυση των εξωνίων των υπό μελέτη γονιδίων με χρήση του κατάλληλου kit της Illumina. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιούνται εκκινητές (One primer pool) και η ενίσχυση γίνεται

μέσω Multiplex PCR. Πιο συγκεκριμένα, στο 96 well plate που περιείχε 10μl από το νεοσυντιθέμενο cDNA προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 5X AmpliSeq HiFi Mix (4 μl)
- 5X AmpliSeq Custom RNA Panel (4μl)
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (2 μl)

Ύστερα από σωστή ανάδευση, το 96 well plate μεταφέρεται στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, όπου ξεκινά η αντίδραση της PCR υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 99°C για 2 λεπτά

18 κύκλοι με τις εξής θερμοκρασίες και χρόνους:

- 99°C for 15 δευτερόλεπτα
- 60°C για 4 λεπτά
- Συντήρηση στους 10°C

Ακολουθεί κατακερματισμός (fragmentation) των ενισχυμένων τμημάτων του cDNA σε μικρότερα τμήματα, περίπου 150- 800bp, καθώς και πέψη των διμερών των εκκινητών που έχουν προκύψει ως σφάλμα της PCR, με τη χρήση του ενζύμου FuPa που περιέχεται στο kit της Illumina. Στα ενισχυμένα δείγματα προστίθενται 2μl FuPa Reagent. Το plate μεταφέρεται στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, και πραγματοποιείται η αντίδραση της PCR με τις παρακάτω συνθήκες:

- 50°C για 10 λεπτά
- 55°C για 10 λεπτά
- 62°C για 20 λεπτά
- Συντήρηση στους 10°C για το πολύ 1 ώρα

Σε αυτό το σημείο τα τμήματα ενδιαφέροντος έχουν πλέον ενισχυθεί, έχουν απομακρυνθεί τυχόν σφάλματα της PCR π.χ. διμερή εκκινητών, και τέλος έχουν κοπεί τα υπό μελέτη γονίδια σε μικρότερα κομμάτια (fragments). Για την ταυτοποίηση των fragments, αλλά και τη μετέπειτα πρόσδεσή τους στα ολιγονουκλεοτίδια του flowcell, είναι απαραίτητη η προσθήκη κατάλληλων αντάπτορων στα άκρα τους, πιο συγκεκριμένα προστίθενται οι Index 1 (i7) and Index 2 (i5) στα δύο άκρα κάθε ενός (Εικόνα 10). Στο 96 well plate της προηγούμενης αντίδρασης, που περιέχει τα fragments των δειγμάτων προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια της Illumina:

- Switch Solution (4μl)
- AmpliSeq CD Indexes ή UD Indexes for Illumina (2 μl)
- DNA Ligase (2 μl)

Στη συνέχεια το 96 well plate μεταφέρθηκε στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιήτη και πραγματοποιήθηκε η PCR με τις εξής συνθήκες:

- 22°C για 30 λεπτά
- 68°C για 5 λεπτά
- 72°C για 5 λεπτά
- Συντήρηση στους 10°C μέχρι και 24 ώρες



Εικόνα 10: Η τελική μορφή ενός fragment με προσδεμένους αντάπτορες στα 5' και 3' άκρα του (Bioinformatics Workshop for Helminth Genomics, 2015).

5.6.2 Καθαρισμός των ενισχυμένων τμημάτων

Τα δείγματα πλέον είναι κατακεραματισμένα σε μικρότερα τμήματα (fragments) τα οποία είναι σημασμένα με αντάπτορες και στα δύο τους άκρα για την ταυτοποίησή τους. Επομένως, ακολουθεί ο καθαρισμός των δειγμάτων για την τυχόν απομάκρυνση διμερών, μικρότερων fragments ή και τμημάτων τα οποία δεν έχουν ενισχυθεί ώστε να βελτιωθεί η καθαρότητά τους. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιούνται κατάλληλα μεταλλικά AMPure XP beads της Illumina, στα οποία θα δεσμευθούν μόνο τα fragments που έχουν το απαιτούμενο μέγεθος.

Για τον καθαρισμό των δειγμάτων λοιπόν, προστίθενται 30μl AMPure XP beads σε κάθε βιβλιοθήκη, αναδεύονται και αφού το μείγμα γίνει ομοιογενές πραγματοποιείται μία σύντομη φυγοκέντρηση και αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να δεσμευθεί το DNA. Έπειτα το plate μεταφέρεται και τοποθετείται επάνω σε μία μαγνητική πλάκα για περίπου 2 λεπτά, η οποία λόγω του μαγνητικού πεδίου της θα προσελκύσει τα AMPure XP beads στη μία πλευρά από το πηγαδάκι. Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί πλύση των AMPure XP beads. Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 150 μl 70% αιθανόλης,

αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 δευτερόλεπτα, έως ότου το διάλυμα φανεί διαυγές, και στη συνέχεια αφαιρείται και πάλι το υπερκείμενο. Τέλος, αφαιρείται όσο το δυνατόν περισσότερη αιθανόλη και το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί πλήρως.

Ακολουθεί μία ακόμη ενίσχυση των βιβλιοθηκών ώστε να εξασφαλισθεί επαρκής ποσότητα τους για την αλληλούχιση. Αυτή η αντίδραση ενίσχυσης περιέχει τα AMPure XP beads, στα οποία παραμένουν προσδεμένες οι βιβλιοθήκες. Αρχικά, συντίθεται το Master mix της ενίσχυσης με την εξής σύσταση:

- 1X Lib Amp Mix (45μl)
- 10X Library Amp Primers (5μl)

Προστίθενται 50 μl από το Master mix στο πηγαδάκι με τη βιβλιοθήκη και στη συνέχεια το 96 well plate μεταφέρεται στον αυτόματο θερμοκόκυκλο όπου ξεκινά η αντίδραση της PCR με τις εξής συνθήκες:

- 98°C για 2 λεπτά

7 κύκλοι με τις εξής συνθήκες:

- 98°C για 15 δευτερόλεπτα
- 64°C για 1 λεπτό
- Συντήρηση στους 10°C για μέχρι και 24 ώρες

Ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού το οποίο χωρίζεται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση καθαρισμού, η βιβλιοθήκη και οι εκκινητές διατηρούνται στο υπερκείμενο και μεταφέρονται σε μία νέα πλάκα. Αρχικά, προστίθενται 25μl AMPure XP beads στο δείγμα και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης, το plate μεταφέρεται στη μαγνητική πλάκα και παραμένει εκεί για περίπου 5 λεπτά, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Το υπερκείμενο που πλέον περιέχει τη βιβλιοθήκη μεταφέρεται σε ένα νέο 96 well plate. Στη δεύτερη φάση καθαρισμού, οι βιβλιοθήκες συλλαμβάνονται από τα σφαιρίδια ενώ οι εκκινητές παραμένουν στο υπερκείμενο. Τα σφαιρίδια αποθηκεύονται και οι βιβλιοθήκες εκλύονται από αυτά. Προστίθενται 60 μl AMPure XP beads, επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα μεταφέρονται στη μαγνητική πλάκα όπου μένουν για ακόμη ~5 λεπτά έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Αφαιρείται και πάλι το υπερκείμενο και ακολουθεί η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω με την προσθήκη αιθανόλης

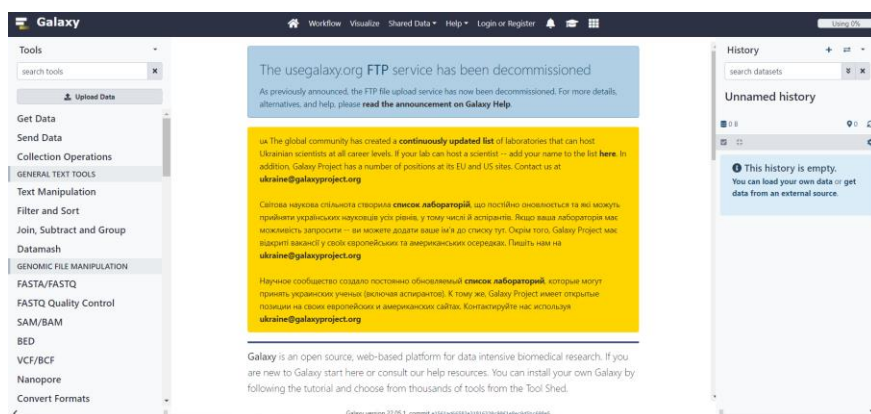
70%. Σε αυτό το στάδιο καθαρισμού αφού εξατμιστεί η αιθανόλη, προστίθενται 30 μl Low TE (Illumina), το plate αφήνεται στη μαγνητική πλάκα μέχρι το διάλυμα να είναι διαυγές και στη συνέχεια 27 μl του υπερκειμένου, που περιέχει τη βιβλιοθήκη, μεταφέρονται σε ένα LoBind PCR plate.

Προτού ξεκινήσει η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών, απαιτείται ο έλεγχος της ποιότητας αλλά και της συγκέντρωσης τους. Το βήμα αυτό κρίνεται απαραίτητο καθώς τα clusters του flowcell που θα χρησιμοποιηθεί είναι περιορισμένα και είναι σημαντικό τα δείγματα να κατανεμηθούν ισόποσα σε κάθε θέση για καλύτερη ποιότητα αποτελεσμάτων. Για την ποσοτικοποίηση αλλά και τον έλεγχο της ποιότητας των βιβλιοθηκών χρησιμοποιείται η μέθοδος του Bioanalyzer.

Αναλόγως του μεγέθους των fragments, μία πληροφορία που δίνεται από το Bioanalyzer, οι βιβλιοθήκες αραιώνονται με LowTE, ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 7–9pM. Τέλος, η βιβλιοθήκη μεταφέρεται στο cartridge v3 το οποίο τοποθετείται στο μηχανήμα της αλληλούχισης.

5.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση επόμενης γενιάς (βλέπε υποενότητα 5.6) χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (Εικόνα 11). Η συγκεκριμένη πλατφόρμα αποτελεί ένα εργαλείο ανάλυσης μεγάλων βιοϊατρικών δεδομένων, όπως αυτά της γονιδιωματικής, που προκύπτουν από την τεχνική NGS (Next Generation Sequencing) που περιλαμβάνει όλες τις εντολές της γλώσσας προγραμματισμού R, αλλά με ένα φιλικό ως προς τον χρήστη περιβάλλον εργασίας.



Εικόνα 11: Η διαδικτυακή πλατφόρμα Galaxy (Galaxy, n.d.).

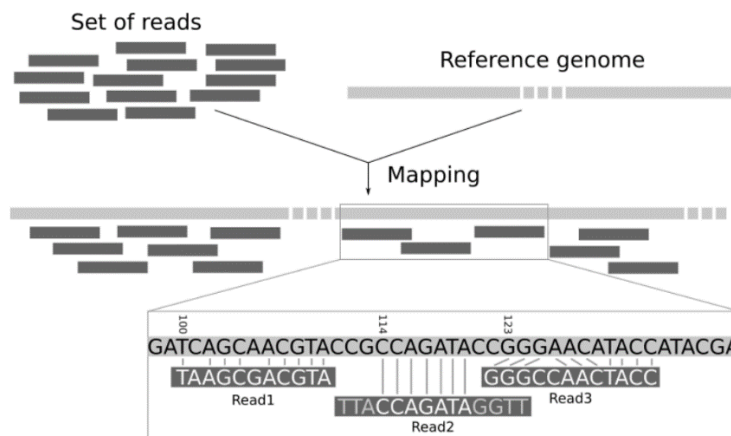
5.7.1 Ποιοτικός έλεγχος

Κατά την αλληλούχιση των δειγμάτων, μπορεί να προκύψουν σφάλματα, όπως η αναγνώριση λανθασμένων νουκλεοτιδίων. Τα σφάλματα αυτά είναι τυχαία και μπορεί να οφείλονται σε τεχνικούς περιορισμούς της εκάστοτε συσκευής αλληλούχισης, όμως ενδέχεται να επηρεάσουν την ανάλυση και να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Τέτοιου είδους σφάλματα πιθανόν να προκύψουν και από την ύπαρξη των αντάπτρων, οπότε η περικοπή αυτών μπορεί να βοηθήσει. Επομένως, ο ποιοτικός έλεγχος είναι το πρώτο βήμα της ανάλυσης των δεδομένων.

Για την διεξαγωγή του ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιούνται τα εργαλεία *FastQC* για τη δημιουργία μίας αναφοράς σχετικά με την ποιότητα της αλληλούχισης, *MultiQC* για τη συγκέντρωση των αναφορών που προκύπτουν από όλα τα δείγματα και *Cutadapt* για την περικοπή των ανταπτρών και τη βελτίωση της ποιότητας. Σημαντικός δείκτης της ποιότητας της αλληλούχισης είναι η τιμή Q ($Q = -10 \log_{10} P$). Η τιμή Q μας δείχνει την πιθανότητα μία βάση να μην έχει διαβαστεί σωστά από τον αναλυτή.

5.7.2 Ευθυγράμμιση- Στοιχισμός των fragments (Mapping)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ακριβής αλληλουχία που διαβάστηκε από τη συσκευή αλληλούχισης, είναι απαραίτητο τα fragments να στοιχηθούν στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh38) (Εικόνα 12). Για την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιείτε το εργαλείο *RNA STAR* και στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος της ποιότητας της στοιχισής με το εργαλείο *MultiQC*. Το εργαλείο αυτό δίνει ως αποτέλεσμα και ένα αρχείο (RNA STAR on sample X: reads per gene) που περιλαμβάνει το πόσες φορές διαβάστηκε κάθε υπό μελέτη γονίδιο το οποίο χρειάζεται σε επόμενο βήμα (βλέπε υποενότητα 5.7.3).



Εικόνα 12: Σύντομη απεικόνιση της διαδικασίας στοίχισης στο γονιδίωμα αναφοράς (Mapping, n.d.).

5.7.3 Ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης

Από το προηγούμενο βήμα έχει προκύψει το αρχείο με τον αριθμό διαβασμάτων κάθε γονιδίου. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς πως αναλόγως του αριθμού των διαβασμάτων μπορεί να εξαχθεί το ανάλογο συμπέρασμα για το ποιο γονίδιο εκφράζεται περισσότερο π.χ. αν διαβάστηκε περισσότερες φορές τότε εκφράζεται περισσότερο. Ωστόσο, αυτό το συμπέρασμα θα ήταν λανθασμένο καθώς ο αριθμός διαβασμάτων κάθε γονιδίου εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

1. Βάθος διαβάσματος: Τα δείγματα που αλληλουχήθηκαν σε μεγαλύτερο βάθος θα έχουν περισσότερες αναγνώσεις σε κάθε γονίδιο.
2. Το μήκος του γονιδίου: Τα μεγαλύτερα γονίδια θα έχουν περισσότερες αναγνώσεις που αντιστοιχίζονται σε αυτά καθώς κατακερματίζονται σε περισσότερα τμήματα τα οποία ύστερα καταλαμβάνουν περισσότερες θέσεις στο flowcell.

Επομένως, προκειμένου να γίνει σωστή σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων ο αριθμός διαβασμάτων πρέπει να κανονικοποιηθεί. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **DESeq2** το οποίο συνδυάζει σε έναν πίνακα των αριθμό των διαβασμάτων των γονιδίων κάθε δείγματος και τα κανονικοποιεί ως προς το βάθος αλληλούχισης και τη σύνθεση της βιβλιοθήκης (διαφορική έκφραση γονιδίων λόγω ιστοειδικότητας). Δε χρησιμοποιεί ως παράγοντα το μήκος του γονιδίου επειδή συγκρίνει τις μετρήσεις μεταξύ ομάδων δειγμάτων για το ίδιο γονίδιο. Από το συγκεκριμένο εργαλείο προκύπτει ένα αρχείο με τον κανονικοποιημένο αριθμό

διαβασμάτων κάθε γονιδίου, ένα αρχείο με γραφήματα που απεικονίζουν τη διαφορική έκφραση και ένα ακόμη αρχείο όπου περιλαμβάνει στατιστικά αποτελέσματα που αφορούν κάθε γονίδιο π.χ. η τιμή p, η τυπική απόκλιση και η τιμή $\log_2(\text{FC})$ κ.α. όπως φαίνεται στην Εικόνα 13.

GeneID	Base mean	$\log_2(\text{FC})$	StdErr	Wald-Stats	P-value	P-adj
--------	-----------	---------------------	--------	------------	---------	-------

Εικόνα 13: Η μπάρα των στατιστικών αποτελεσμάτων του DESeq2.

Στη συνέχεια, επιλέγονται τα γονίδια με διαφορική έκφραση, δηλαδή αυτά με τιμή $\text{adjusted } p\text{-value} < 0.05$ και $\text{abs}(\log_2\text{FC}) > 1$). Ακολούθως υπολογίζεται το z-score, το οποίο δίνει τον αριθμό των τυπικών αποκλίσεων που απέχει μία τιμή από το μέσο όρο των όλων τιμών του ίδιου γονιδίου. Τέλος, πραγματοποιείται η απεικόνιση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων, με τη χρήση του z-score που υπολογίστηκε προηγουμένως, μέσω δημιουργίας θερμικών χαρτών (heatmaps).

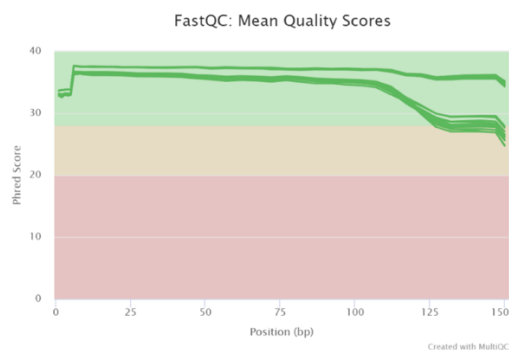
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Ποιοτικός έλεγχος

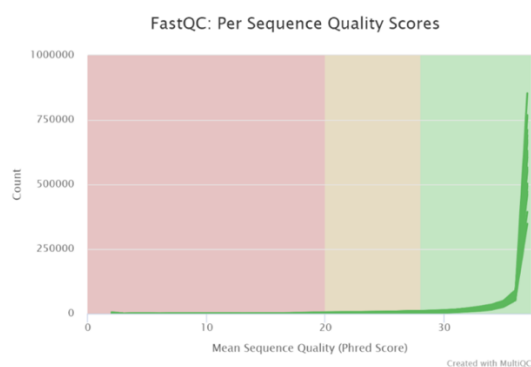
Ύστερα από την απομόνωση του RNA από τα καλλιεργημένα κύτταρα, δηλαδή τα MSCs, iPSCs και iMSCs, ακολούθησε ενίσχυση 183 γονιδίων μέσω Targeted RNA sequencing. Όπως προαναφέρθηκε (βλέπε υποενότητα 5.7.1), κατά την αλληλούχιση είναι πιθανό να προκύψουν σφάλματα, οπότε ο ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων κρίνεται απαραίτητος.

Για την ανάλυση της ποιότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο *FastQC* και στη συνέχεια το *MultiQC* για τη δημιουργία μίας πιο συγκεντρωτικής αναφοράς της ποιότητας όλων των δειγμάτων. Φάνηκε πως η αλληλούχιση των δειγμάτων είχε Phred score 30 μέχρι περίπου τη θέση 125 ζ.β. Επομένως, η ποιότητα των δεδομένων είναι πολύ καλή, καθώς το όριο του Phred score ώστε να θεωρηθεί το αποτέλεσμα καλό τίθεται στο 28-30. Προς το τέλος της αλληλούχισης είναι σύνηθες η ποιότητα να πέφτει είτε λόγω του ότι τα αντιδραστήρια της συσκευής αλληλούχισης

φθίνουν, οι αντιδράσεις δεν είναι εξίσου ακριβείς και φτάνουν σε πλατό, είτε λόγω των ανταπτόρων που έχουν τοποθετηθεί προηγουμένως στα δείγματα.

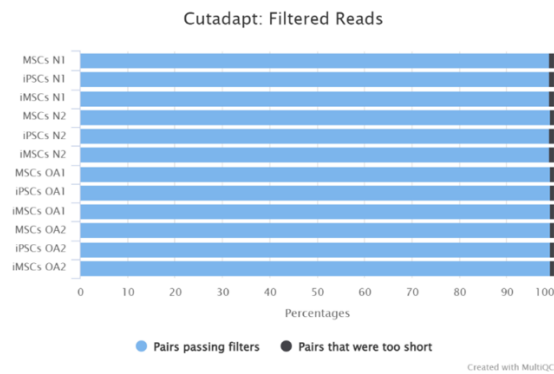


Εικόνα 14: Διάγραμμα μέσης τιμής της ποιότητας των δειγμάτων ανά βάση.



Εικόνα 15: Διάγραμμα μέσης τιμής της ποιότητας των δειγμάτων ανά αλληλούχηση.

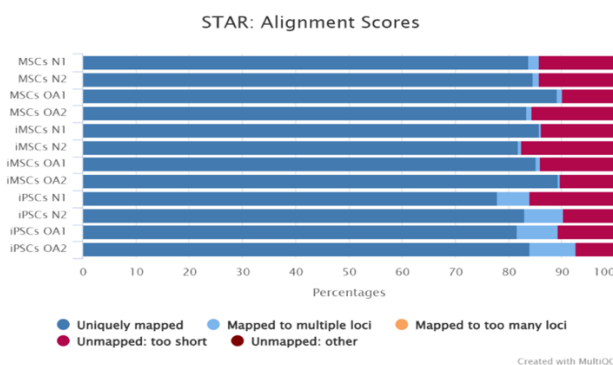
Για την αύξηση της ποιότητας των δειγμάτων και τη μετέπειτα στοίχιση των fragments στο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh38) πραγματοποιήθηκε αποκοπή των ανταπτόρων με τη χρήση του εργαλείου *cutadapt*.



Εικόνα 16: Διάγραμμα απεικόνισης του ποσοστού των τμημάτων που αποκόπηκαν με τη χρήση του εργαλείου cutadapt.

6.1.2 Ευθυγράμμιση- Στοιχισμός των fragments (Mapping)

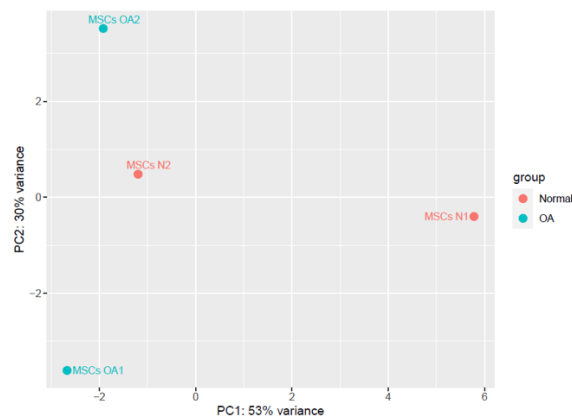
Ύστερα από την εξακρίβωση και μετέπειτα επιβεβαίωση της καλής ποιότητας των δεδομένων αλληλούχισης, ακολούθησε η στοιχισμός των fragments στο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh38) με το εργαλείο *RNA STAR*. Για τον έλεγχο της ποιότητας της στοιχισμός χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο *MultiQC*. Φάνηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό των fragments στοιχίστηκε σε ξεχωριστές θέσεις του γονιδιώματος αναφοράς, ένα μικρό ποσοστό στοιχίστηκε σε πολλαπλές περιοχές και ένα πολύ μικρό ποσοστό είχε πολύ μικρό μέγεθος για να αντιστοιχεί κάπου. Το πιο σημαντικό είναι το μεγαλύτερο ποσοστό να στοιχίζεται σε μοναδικές θέσεις, γεγονός το οποίο έχει επιτύχει στη συγκεκριμένη περίπτωση, όποτε και συμπεραίνουμε πως η στοιχισμός είναι σωστή και μπορούμε να προχωρήσουμε στην ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων.



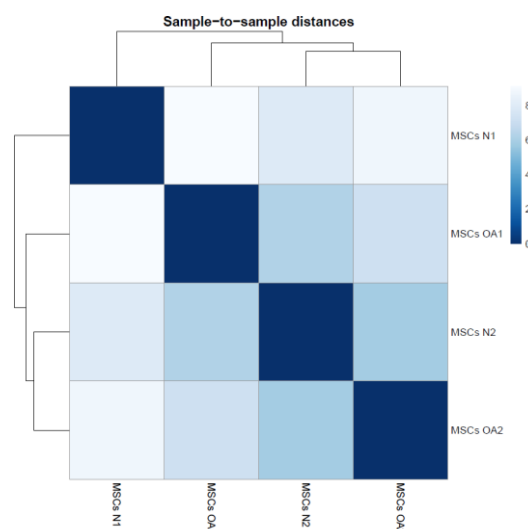
Εικόνα 17: Διάγραμμα απεικόνισης των ποσοστών των fragments που έχουν στοιχισθεί στο γονιδίωμα αναφοράς σε μοναδικές θέσεις, πολλαπλές θέσεις ή και καθόλου.

6.2 Συγκριτική ανάλυση Μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs), Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) και Μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs) μεταξύ ασθενών- μαρτύρων

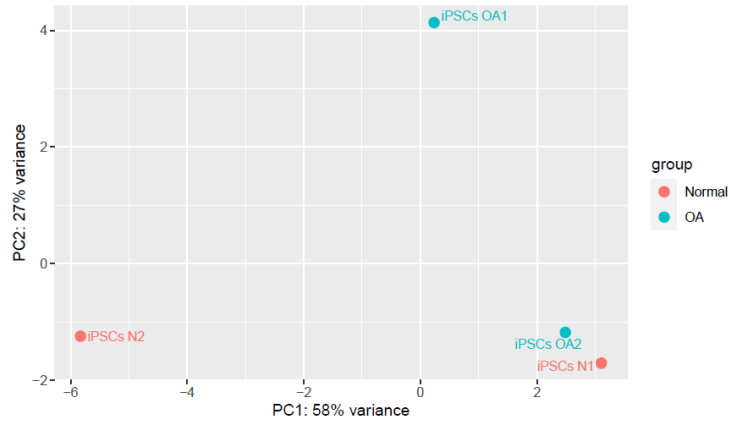
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των τριών κυτταρικών τύπων (MSCs, iPSCs, iMSCs) μεταξύ ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν εντοπίζονται διαφορές στην έκφραση των κυττάρων οστεοαρθρικών ατόμων με αυτά των υγιή ατόμων. Φάνηκε λοιπόν πως τα δείγματα δεν εμφανίζουν καμία διαφορά ως προς την έκφραση κανενός από τα 183 γονίδια που μελετώνται, αντιθέτως τα δείγματα ομαδοποιούνται κατά τη συγκριτική ανάλυση.



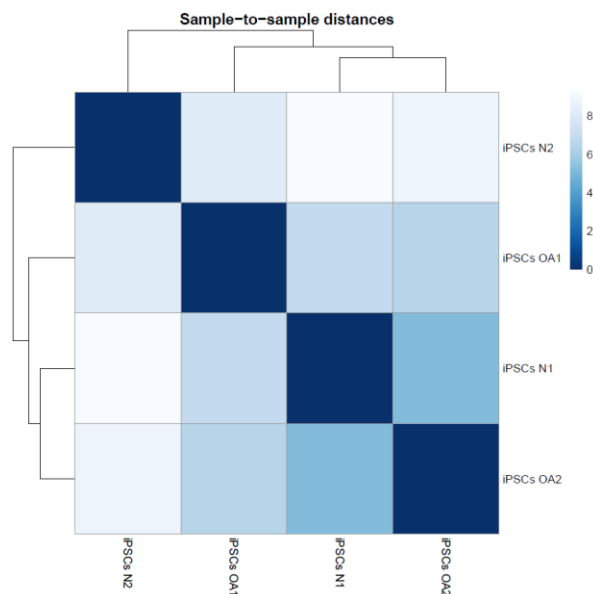
Εικόνα 18: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) των MSCs μεταξύ ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).



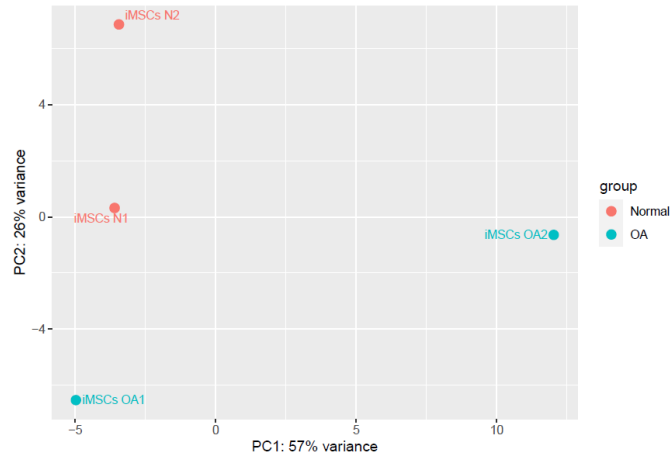
Εικόνα 19: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων MSCs ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).



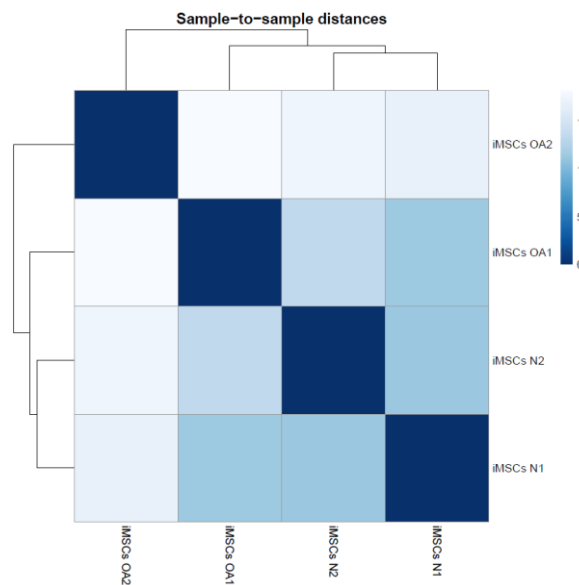
Εικόνα 20: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) των iPSCs μεταξύ ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).



Εικόνα 21: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων iPSCs ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).



Εικόνα 22: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) των iMSCs μεταξύ ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).

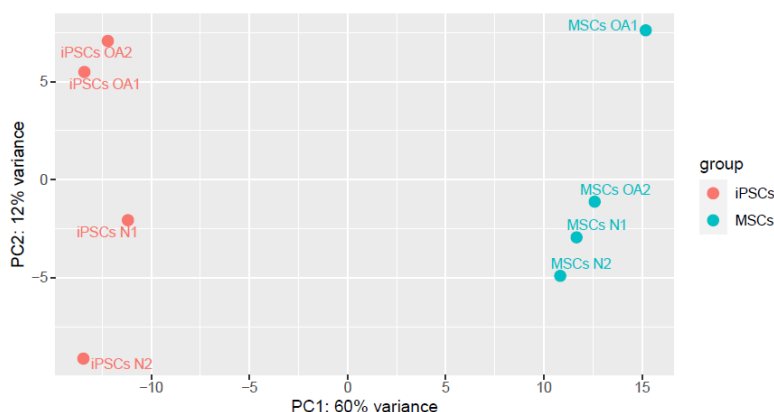


Εικόνα 23: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων iMSCs ασθενών (OA1, OA2) και μαρτύρων (N1, N2).

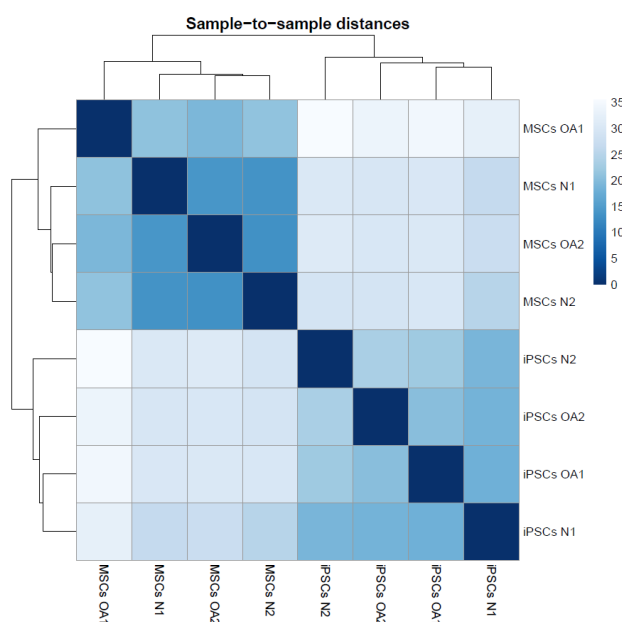
6.3 Συγκριτική ανάλυση Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs)

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η αποδιαφοροποίηση των MSCs σε iPSCs πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, έγινε συγκριτική μεταγραφική ανάλυση μεταξύ αυτών των δύο κυτταρικών τύπων. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των 183 γονιδίων ενδιαφέροντος μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων.

Παρατηρήθηκε πως τα δείγματα πράγματι ομαδοποιούνται ξεχωριστά ως προς την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων, επομένως τα MSCs έχουν αποδιαφοροποιηθεί (Εικόνα 24 και 25).



Εικόνα 24: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) μεταξύ των MSCs και iPSCs.



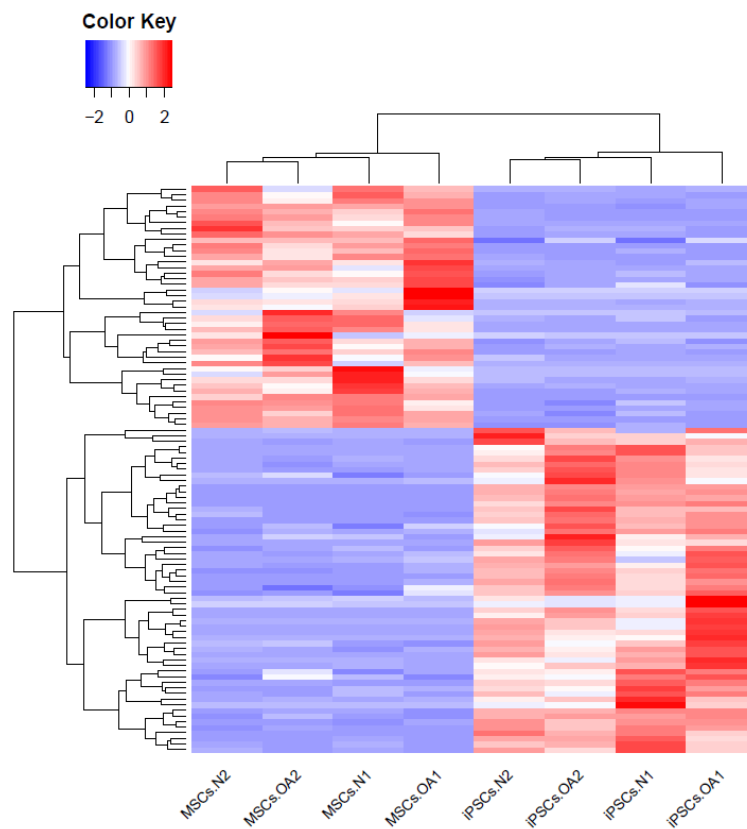
Εικόνα 25: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων MSCs και iPSCs.

Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι δύο κυτταρικοί τύποι διαφέρουν ως προς την έκφραση 85 γονιδίων από τα 183 υπό μελέτη γονίδια (Πίνακας 2). Τα 43 γονίδια υπερεκφραζόταν στα MSCs και υποεκφραζόταν στα iPSCs και αντιστοίχως τα υπόλοιπα 42 υπερεκφραζόταν στα iPSCs και υποεκφραζόταν στα MSCs.

Πίνακας 2: Γονίδια με διαφορετική έκφραση μεταξύ των MSCs και iPSCs.

Υπερέκφραση στα MSCs		Υπερέκφραση στα iPSCs	
<i>KLF2</i>	Kruppel Like Factor 2	<i>SUMO1P3</i>	SUMO1 pseudogene 3
<i>GATA6</i>	GATA Binding Protein 6	<i>SIN3A</i>	SIN3 transcription regulator family member A
<i>ENG</i>	Endoglin	<i>TCF7L2</i>	Transcription factor 7 like 2
<i>HOXA1</i>	Homeobox A1	<i>AXIN1</i>	Axin 1
<i>RUNX2</i>	RUNX family transcription factor 2	<i>EID2</i>	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2
<i>FOXC1</i>	forkhead box C1	<i>KDM6A</i>	Lysine demethylase 6A
<i>TBX3</i>	T-box transcription factor 3	<i>IGF1R</i>	Insulin like growth factor 1 receptor
<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase ecto	<i>TCF4</i>	Transcription factor 4
<i>WNT5A</i>	Wnt family member 5A	<i>NCAPG2</i>	Non-SMC condensin II complex subunit G2
<i>DKK1</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	<i>NOTCH1</i>	Notch receptor 1
<i>FNI</i>	Fibronectin 1	<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor
<i>MEIS1</i>	Meis homeobox 1	<i>CTBP2</i>	C-terminal binding protein 2
<i>INHBA</i>	Inhibin subunit beta A	<i>ATF3</i>	Activating transcription factor 3
<i>CEBPD</i>	CCAAT enhancer binding protein delta	<i>TRERF1</i>	Transcriptional regulating factor 1
<i>COL1A2</i>	Collagen type I alpha 2 chain	<i>MBP</i>	Myelin basic protein
<i>LEPR</i>	Leptin receptor	<i>TCF7L1</i>	Transcription factor 7 like 1
<i>CD14</i>	CD14 molecule	<i>CTBP2P4</i>	CTBP2 pseudogene 4
<i>COL1A1</i>	Collagen type I alpha 1 chain	<i>MAP3K7</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
<i>BHLHE40</i>	Basic helix-loop-helix family member e40	<i>FZD7</i>	Frizzled class receptor 7
<i>NR2F2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2	<i>TOX</i>	Thymocyte selection associated high mobility group box
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>FZD9</i>	Frizzled class receptor 9
<i>RUNX3</i>	RUNX family transcription factor 3	<i>MBTD1</i>	Mbt domain containing 1
<i>ADAMTS5</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1
<i>DLX5</i>	Distal-less homeobox 5	<i>FOXO1</i>	Forkhead box O1
<i>YAP1P1</i>	YAP1 pseudogene 1	<i>POU5F1P3</i>	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 3
<i>TGFBR2</i>	Transforming growth factor beta receptor 2	<i>MAP4K1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	<i>HMGA2</i>	High mobility group AT-hook 2
<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta 1	<i>POU5F1B</i>	POU class 5 homeobox 1B
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	<i>TNFRSF13C</i>	TNF receptor superfamily member 13C

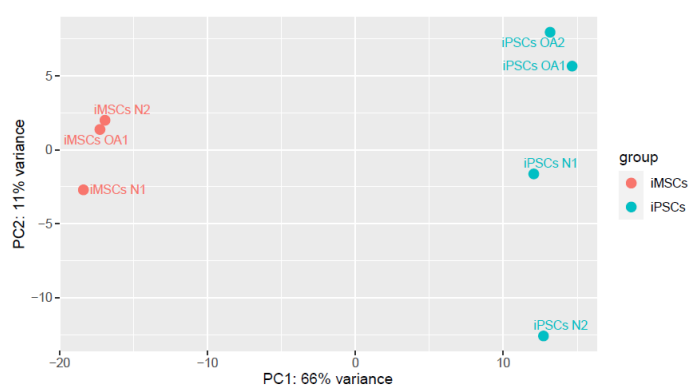
<i>KLF4</i>	Kruppel like factor 4	<i>AXIN2</i>	Axin 2
<i>DDAH1</i>	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	<i>OLIG3</i>	Oligodendrocyte transcription factor 3
<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	<i>FZD5</i>	Frizzled class receptor 5
<i>CAV1</i>	Caveolin 1	<i>FGFR3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3
<i>KLF6</i>	Kruppel like factor 6	<i>NANOGP4</i>	Nanog homeobox pseudogene 4
<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	<i>PARD6A</i>	Par-6 family cell polarity regulator alpha
<i>BMPR2</i>	Bone morphogenetic protein receptor type 2	<i>JARID2</i>	Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2
<i>GAS2L1</i>	Growth arrest specific 2 like 1	<i>WNT4</i>	Wnt family member 4
<i>TGFBR1</i>	Transforming growth factor beta receptor 1	<i>ITGB4</i>	Integrin subunit beta 4
<i>NOTCH2</i>	Notch receptor 2	<i>NGFR</i>	Nerve growth factor receptor
<i>PPARD</i>	Peroxisome proliferator activated receptor delta	<i>FGF8</i>	Fibroblast growth factor 8
<i>TEAD1</i>	TEA domain transcription factor 1	<i>TBXT</i>	T-box transcription factor T
<i>TWSG1</i>	Twisted gastrulation BMP signaling modulator 1	<i>CD34</i>	CD34 molecule
<i>BINI</i>	Bridging integrator 1		



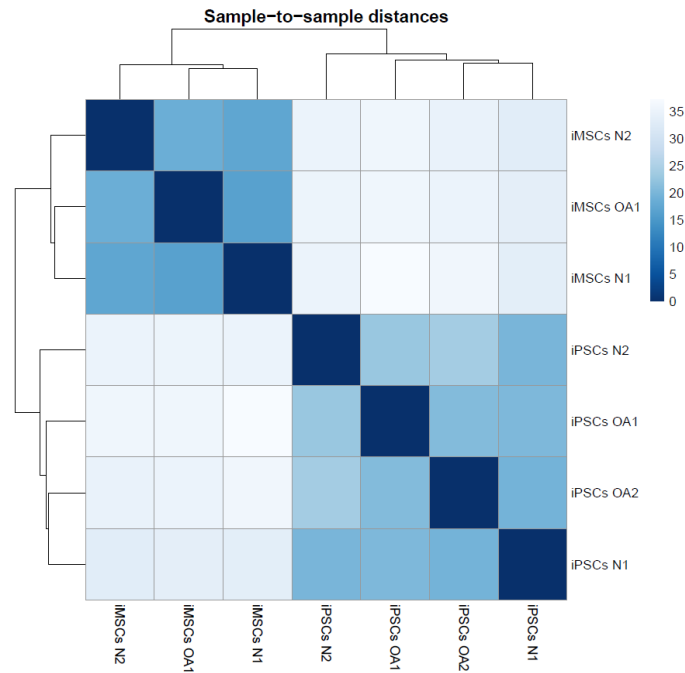
Εικόνα 26: Θερμικός χάρτης (heatmap) απεικόνισης της διαφορικής μεταγραφικής έκφρασης των 85 γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων MSCs και iPSCs. ($adj\ p\text{-value} < 0.05$, $abs(\log_2FC) > 1$)

6.4 Συγκριτική ανάλυση Επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) και Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)

Ακολούθως, ήταν απαραίτητο να επιβεβαιωθεί πως τα iPSCs διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε iMSCs. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η διαφορική έκφραση των 183 γονιδίων στόχων στα iPSCs αλλά και στα iMSCs, ώστε να εντοπιστούν τυχόν διαφορές. Πράγματι φάνηκε πως τα κύτταρα αποτελούν πλέον δύο ξεχωριστούς κυτταρικούς τύπους και ομαδοποιούνται ξεχωριστά (Εικόνα 27 και 28). Είναι λοιπόν κατανοητό πως τα iPSCs έχουν διαφοροποιηθεί επιτυχώς.



Εικόνα 27: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) μεταξύ των iPSCs και iMSCs.



Εικόνα 28: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων iPSCs και iMSCs.

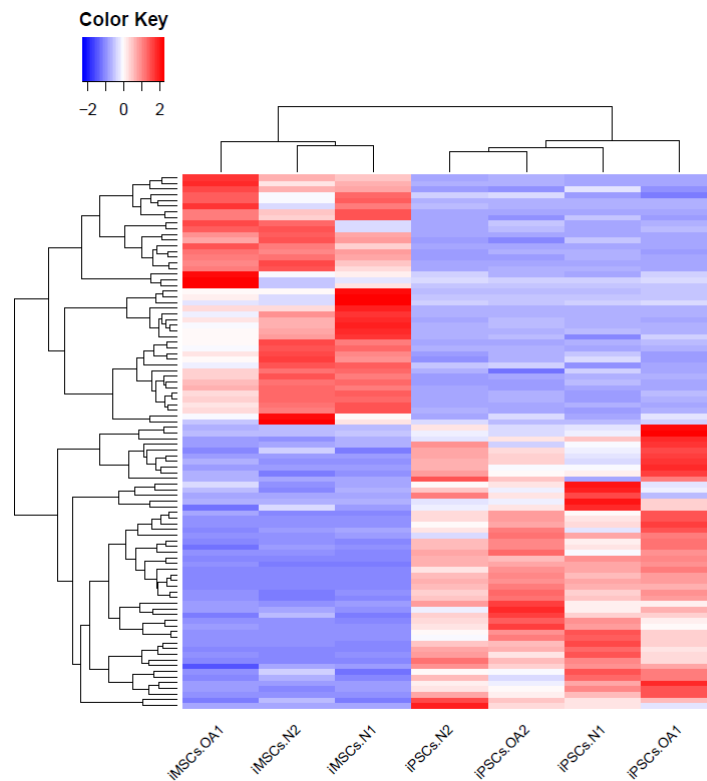
Πιο συγκεκριμένα, οι δύο κυτταρικοί τύποι παρουσιάζουν διαφορά στην έκφραση 93 γονιδίων. Τα iPSCs υπερεκφράζουν 49 από τα 93 γονίδια, τα οποία υποεκφράζονται στα iMSCs, και αντιστοίχως τα iMSCs υπερεκφράζουν 44 γονίδια τα οποία υποεκφράζονται στα iPSCs. Τα γονίδια που εμφανίζουν διαφορετική έκφραση φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Γονίδια με διαφορετική έκφραση μεταξύ των iPSCs και iMSCs.

Υπερέκφραση στα iPSCs		Υπερέκφραση στα iMSCs	
<i>TRIM71</i>	Tripartite motif containing 71	<i>MEF2A</i>	Myocyte enhancer factor 2A
<i>DNMT3B</i>	DNA methyltransferase 3 beta	<i>NOTCH2</i>	Notch receptor 2
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase	<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1
<i>SOX2</i>	SRY-box transcription factor 2	<i>BINI</i>	Bridging integrator 1
<i>BMP7</i>	Bone morphogenetic protein 7	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A
<i>NANOGP8</i>	Nanog homeobox retrogene P8	<i>TEAD1</i>	TEA domain transcription factor 1
<i>NANOGP1</i>	Nanog homeobox pseudogene 1	<i>PPARD</i>	Peroxisome proliferator activated receptor delta
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	<i>TWSG1</i>	Twisted gastrulation BMP signaling modulator 1

<i>TOX3</i>	TOX high mobility group box family member 3	<i>LEPR</i>	Leptin receptor
<i>VAV3</i>	Vav guanine nucleotide exchange factor 3	<i>MECOM</i>	MDS1 and EVI1 complex locus
<i>POU5F1P4</i>	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 4	<i>CCND1</i>	Cyclin D1
<i>FZD5</i>	Frizzled class receptor 5	<i>GAS2L1</i>	Growth arrest specific 2 like 1
<i>FOXD3</i>	Forkhead box D3	<i>KLF4</i>	Kruppel like factor 4
<i>OLIG3</i>	Oligodendrocyte transcription factor 3	<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
<i>COL2A1</i>	Collagen type II alpha 1 chain	<i>CDH2</i>	Cadherin 2
<i>TBXT</i>	T-box transcription factor T	<i>KLF6</i>	Kruppel like factor 6
<i>FGFR3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	<i>DDAH1</i>	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
<i>FGF8</i>	Fibroblast growth factor 8	<i>BMPR2</i>	Bone morphogenetic protein receptor type 2
<i>POU5F1B</i>	POU class 5 homeobox 1B	<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
<i>RAC1P4</i>	Rac family small GTPase 1 pseudogene 4	<i>CAV1</i>	Caveolin 1
<i>PRKCZ</i>	Protein kinase C zeta	<i>KLF5</i>	Kruppel like factor 5
<i>WNT4</i>	Wnt family member 4	<i>TGFBR2</i>	Transforming growth factor beta receptor 2
<i>NANOGP4</i>	Nanog homeobox pseudogene 4	<i>ISL1</i>	ISL LIM homeobox 1
<i>JARID2</i>	Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2	<i>MSX2</i>	Msh homeobox 2
<i>FOXO1</i>	Forkhead box O1	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta 1
<i>ASTN1</i>	Astrotactin 1	<i>CEBPD</i>	CCAAT enhancer binding protein delta
<i>PARD6A</i>	Par-6 family cell polarity regulator alpha	<i>BHLHE40</i>	Basic helix-loop-helix family member e40
<i>POU5F1P3</i>	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 3	<i>FN1</i>	Fibronectin 1
<i>MAP4K1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
<i>AXIN2</i>	Axin 2	<i>COL1A2</i>	Collagen type I alpha 2 chain
<i>MBTD1</i>	Mbt domain containing 1	<i>SOX17</i>	SRY-box transcription factor 17
<i>MAP3K7</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	<i>FOXC1</i>	Forkhead box C1
<i>ITGB4</i>	Integrin subunit beta 4	<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
<i>MMP9</i>	Matrix metalloproteinase 9	<i>DKK1</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
<i>KDM6A</i>	Lysine demethylase 6A	<i>INHBA</i>	Inhibin subunit beta A
<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	<i>WNT5A</i>	Wnt family member 5A
<i>NOTCH3</i>	Notch receptor 3	<i>MEIS1</i>	Meis homeobox 1

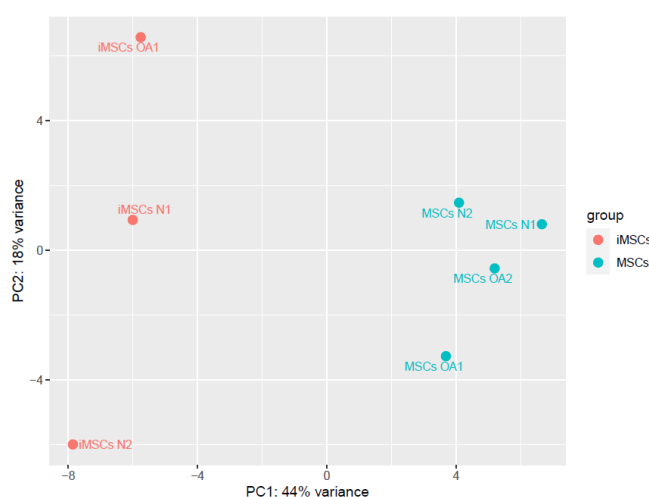
<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1	<i>NR2F2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
<i>TCF7L1</i>	Transcription factor 7 like 1	<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase ecto
<i>CTBP2P4</i>	CTBP2 pseudogene 4	<i>ENG</i>	Endoglin
<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1	<i>KLF2</i>	Kruppel like factor 2
<i>TCF7L2</i>	Transcription factor 7 like 2	<i>GATA6</i>	GATA binding protein 6
<i>TCF4</i>	Transcription factor 4	<i>TBX3</i>	T-box transcription factor 3
<i>TLE3</i>	TLE family member 3, transcriptional corepressor	<i>RUNX2</i>	RUNX family transcription factor 2
<i>FZD7</i>	Frizzled class receptor 7		
<i>NOTCH1</i>	Notch receptor 1		
<i>CTBP2</i>	C-terminal binding protein 2		
<i>SKIL</i>	SKI like proto-oncogene		
<i>AXIN1</i>	Axin 1		



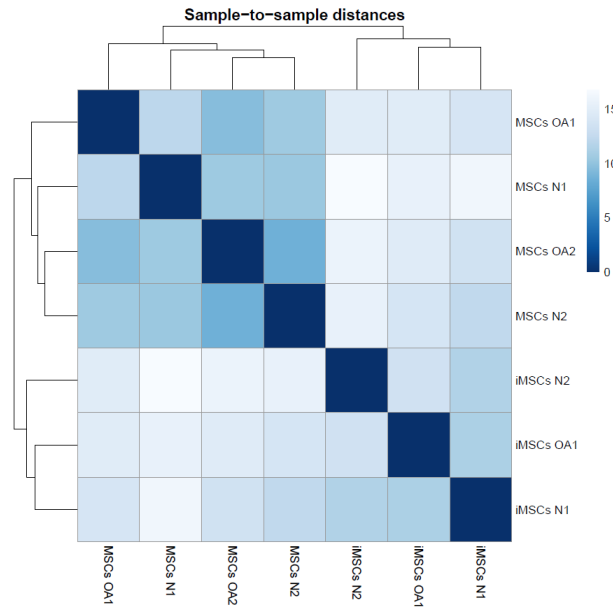
Εικόνα 29: Θερμικός χάρτης (heatmap) απεικόνισης της διαφορικής μεταγραφικής έκφρασης των 93 γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων iPSCs και iMSCs. ($adj\ p\text{-value} < 0.05, abs(\log_2FC) > 1$)

6.7 Συγκριτική ανάλυση Μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και Μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSCs)

Η τελευταία και πιο σημαντική συγκριτική ανάλυση αφορούσε τους κυτταρικούς τύπους MSCs και iMSCs. Συγκεκριμένα αναλύθηκε η έκφραση των 183 γονιδίων μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στη μεταγραφική τους έκφραση. Φάνηκε λοιπόν πως οι δύο κυτταρικοί τύποι δεν αποτελούν έναν όμοιο κυτταρικό πληθυσμό αλλά αντιθέτως ομαδοποιούνται ξεχωριστά, άρα αποτελούν δύο ξεχωριστούς κυτταρικούς τύπους (Εικόνα 30 και 31).



Εικόνα 30: Διάγραμμα συσχετίσεων PCA (Principal Component Analysis) μεταξύ των MSCs και iMSCs.



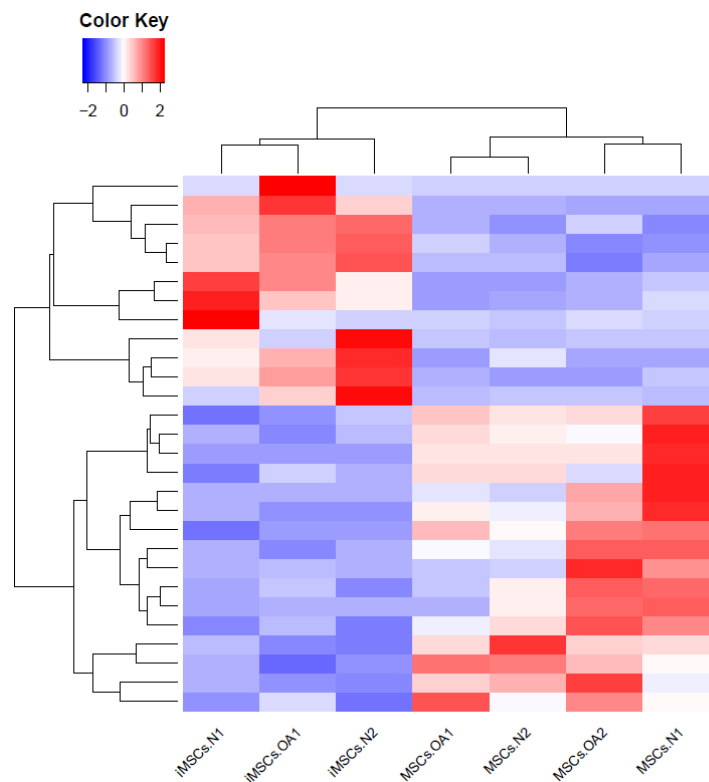
Εικόνα 31: Θερμικός χάρτης (heatmap) της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων MSCs και iMSCs.

Από τα 183 υπό μελέτη γονίδια, διαφορική έκφραση μεταξύ των MSCs και iMSCs εντοπίστηκε στα 28, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Αναλυτικότερα, τα 16 γονίδια υπερεκφραζόταν στα MSCs και υποεκφραζόταν στα iMSCs, ενώ τα υπόλοιπα 12 υπερεκφραζόταν στα iMSCs και υποεκφραζόταν στα MSCs.

Πίνακας 4: Γονίδια με διαφορική έκφραση μεταξύ των MSCs και iMSCs.

Υπερέκφραση στα MSCs		Υπερέκφραση στα iMSCs	
<i>DLX5</i>	Distal-less homeobox 5	<i>IGF1R</i>	Insulin like growth factor 1 receptor
<i>CD14</i>	CD14 molecule	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1
<i>LEPR</i>	Leptin receptor	<i>CTBP2P8</i>	CTBP2 pseudogene 8
<i>ADAMTS5</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5	<i>FZD9</i>	Frizzled class receptor 9
<i>FZD5</i>	Frizzled class receptor 5	<i>PRKCZ</i>	Protein kinase C zeta
<i>CEBPD</i>	CCAAT enhancer binding protein delta	<i>NR2F2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
<i>YAP1P1</i>	YAP1 pseudogene 1	<i>ITGB4</i>	Integrin subunit beta 4
<i>FOXC1</i>	Forkhead box C1	<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
<i>RUNX2</i>	RUNX family transcription factor 2	<i>ASTN1</i>	Astrotactin 1
<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	<i>HMGA2</i>	High mobility group AT-hook 2

<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	<i>MSX2</i>	Msh homeobox 2
<i>TLE3</i>	TLE family member 3, transcriptional corepressor	<i>CD34</i>	CD34 molecule
<i>NOTCH3</i>	Notch receptor 3		
<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1		
<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1		
<i>HDAC4</i>	Histone deacetylase 4		



Εικόνα 32: Θερμικός χάρτης (heatmap) απεικόνισης της διαφορικής μεταγραφικής έκφρασης των 28 γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων MSCs και iMSCs. ($adj\ p\text{-value} < 0.05, abs(\log_2FC) > 1$)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα τα όποια συναντώνται στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της ζωής των ανθρώπων και διαθέτουν ικανότητα αυτοανανέωσης, κλωνικότητα, ενώ μπορούν να διαφοροποιούνται σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους μέσω συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων. Το δυναμικό διαφοροποίησης διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τύπων βλαστικών κυττάρων και εξαρτάται από την προέλευσή τους. Το μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης

διαθέτουν τα παντοδύναμα βλαστοκύτταρα και ακολουθούν κατά σειρά τα ολοδύναμα, όπως είναι τα Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs), αλλά και τα Επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs), τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα όπου σε αυτά ανήκουν τα Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs), τα ολιγοδύναμα και τα μονοδύναμα.

Τα MSCs αποτελούν έναν από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους τύπους ενήλικων κυττάρων. Βρίσκονται στο επίκεντρο των σύγχρονων μελετών ως κυτταρική θεραπεία της ΟΑ, λόγω των ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν με πιο σημαντικές το δυναμικό διαφοροποίησής τους, την ανοσορυθμιστική τους δράση, αλλά και την παρακρινή τους δράση. Συμβάλουν αποτελεσματικά στην αναγέννηση του χόνδρου και στη βελτίωση της μορφολογίας του, στη μείωση του πόνου και καταστολή της φλεγμονής. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται και από σημαντικούς περιορισμούς όπως η ετερογένεια, η έντονη βλαστικότητα και η πρόωμη γήρανσή τους. Κάποιες δυσμενείς επιπτώσεις μπορούν να ακολουθήσουν και τη χορήγησή τους, όπως η ανοσολογική ασυμβατότητα δότη με δέκτη, η πρόκληση ογκογένεσης και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ αυξάνουν το ρίσκο υπερτροφίας και οστεοποίησης κατά την αναγέννηση του χόνδρου.

Λόγω των μειονεκτημάτων που φέρει η χρήση των MSCs, πλέον οι νέες μελέτες στρέφονται στη χρήση των iMSCs για την κυτταρική θεραπεία της ΟΑ. Τα iMSCs πληρούν όλα τα απαραίτητα κριτήρια για τον ορισμό τους ως MSCs και φέρουν όλες τις αναγεννητικές τους ιδιότητες. Προέρχονται από τη διαφοροποίηση των iPSCs σε iMSCs, μέσω δημιουργίας εμβρυονικών σωμάτων (Embryoid Bodies, EBs). Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας τους υφίστανται γονιδιωματική και επιγενετική αναδιαμόρφωση, καθώς και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με την ανανέωση (rejuvenation) τους. Ξεπερνούν έτσι το βασικό πρόβλημα της γήρανσης και ετερογένειας που χαρακτηρίζει τα MSCs. Επομένως, είναι σημαντικό να διερευνηθεί η ακριβής σχέση τους με τα MSCs προκειμένου να βρεθεί η ακριβής δράση και λειτουργία τους, ώστε να εξασφαλισθεί η ασφάλεια της χρήσης τους.

Με βάση τα παραπάνω, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος MSCs, iPSCs και iMSCs. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η έκφραση 183 γονιδίων μέσω Targeted RNA sequencing, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή διαφορική έκφραση τους μεταξύ των τριών

κυτταρικών τύπων. Τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση αποτελεσμάτων μελετών μεγάλης κλίμακας, εφόσον εκφράζονταν σε μεσεγγυματικά και επαγόμενα βλαστοκύτταρα.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν MSCs από δύο υγιείς δότες και δύο οστεοαρθρικούς ασθενείς, και iPSCs προερχόμενα από τα συγκεκριμένα MSCs (που είχαν δημιουργηθεί στο πλαίσιο προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου), τα οποία τελικώς επαναδιαφοροποιήθηκαν σε iMSCs. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ ασθενών και μαρτύρων κάθε κυτταρικού τύπου και στην συνέχεια συγκρίθηκαν οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι μεταξύ τους.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μεταγραφική ανάλυση όμοιων κυτταρικών τύπων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Πιο συγκεκριμένα, έγινε μεταγραφική σύγκριση μεταξύ των MSCs οστεοαρθρικών και υγιών ατόμων, όπως και των iPSCs και iMSCs. Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως και στους τρεις κυτταρικούς τύπους δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση κανενός από τα 183 γονίδια μεταξύ ασθενών και μαρτύρων και πως οι κυτταρικοί τύποι ομαδοποιούνται μαζί. Αξίζει να διευκρινισθεί πως δε μπορεί κανείς να συμπεράνει πως γενικότερα δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, αλλά πιθανόν στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρείται διότι μελετώνται στοχευμένα 183 γονίδια και όχι το σύνολο των γονιδίων του ανθρώπου που φθάνουν περίπου τα 30.000. Επομένως, στις συγκρίσεις που ακολούθησαν τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων ομαδοποιούνταν για κάθε κυτταρικό τύπο, αφού δεν εμφανίζουν διαφορά στην έκφραση αυτών των γονιδίων.

Στη συνέχεια, από τη σύγκριση μεταξύ ασθενών και μαρτύρων πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των MSCs και των iPSCs. Ο λόγος που έγινε αυτή η ανάλυση ήταν προκειμένου να διερευνηθεί και να επιβεβαιωθεί πως ο επαναπρογραμματισμός των MSCs έγινε σωστά και με επιτυχία. Από την ανάλυση της έκφρασης φάνηκε πως οι δύο κυτταρικοί τύποι διαφέρουν ως προς την έκφραση 85 γονιδίων, εκ των οποίων τα 43 υπερεκφράζονται στα MSCs και υποεκφράζονται στα iPSCs ενώ αντίστοιχα τα υπόλοιπα 42 υπερεκφράζονται στα iPSCs. Κάποια από τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα MSCs είναι χαρακτηριστικά της οστεογένεσης και χονδρογένεσης, όπως τα *RUNX2*, *BMP2* και *DLX5*. Τα γονίδια αυτά παρατηρήθηκε πως συμμετέχουν στις ανωτέρω διεργασίες και στη μελέτη των Houschyar et al. 2019.

Επίσης, εκφράζουν και γονίδια που επάγουν την αγγειογένεση όπως τα *VEGFA*, *ENG*, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες των Rossi et al. το 2019 και Yang et al. το 2012, μία διαδικασία απαραίτητη κατά την οστεογένεση και χαρακτηριστική της ΟΑ. Υπερέκφραση παρατηρήθηκε και σε γονίδια που επάγουν τη λιπογένεση όπως τα *PPARG* και *PPARD*. Η συμμετοχή των γονιδίων αυτών στη λιπογένεση έχει επιβεβαιωθεί και με τις μελέτες των Hyun et al. το 2020 και Li et al. το 2017. Αξίζει να αναφερθεί όμως το γεγονός πως εκφράζουν και γονίδια που, σύμφωνα με την ανάλυση των Zhou et al. το 2020, ενισχύουν τη βλαστικότητα των κυττάρων όπως το *KLF2*, αλλά και το γονίδιο *GATA6* που αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη γήρανσης όπως φαίνεται και από τη μελέτη των Jiao et al. το 2021. Φαίνεται λοιπόν πως τα MSCs αν και διατηρούν την πολυδυναμία τους έχουν αποκτήσει μία τάση προς διαφοροποίηση, έχουν χάσει τη νεανικότητά τους και χαρακτηρίζονται από ετερογένεια. Όσον αφορά τα iPSCs, παρουσιάζουν υψηλή έκφραση γονιδίων που ενισχύουν τη βλαστικότητα και των επαναπρογραμματισμό των κυττάρων όπως τα *SIN3A*, *KDMGA* και *TCF4*. Οι λειτουργίες αυτές των γονιδίων επιβεβαιώνονται και από τις μελέτες των Saunders et al. το 2017, Jiang et al. το 2020 και Ritchie et al. το 2013 αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως εκφράζουν και ψευδογονίδια γονιδίων που αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες ολοδυναμίας και χρησιμοποιούνται για τον επαναπρογραμματισμό, σύμφωνα με τη μέθοδο Yamanaka, όπως τα *NANOGGP4* (ψευδογονίδιο του *NANOG*) και *POU5F1* (ψευδογονίδιο του *OCT4*). Η έκφραση ψευδογονιδίων των γονιδίων που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό είναι συνήθης στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, όπως αναφέρεται και στη μελέτη της Turinetto το 2017. Συνεπώς, τα MSCs επαναπρογραμματίστηκαν επιτυχώς αφού έπαψε πλέον η έκφραση γονιδίων που τα ωθούν στη διαφοροποίηση, ενώ αυξήθηκε η έκφραση γονιδίων που επάγουν τον επαναπρογραμματισμό και ενισχύουν τη βλαστικότητα και την ολοδυναμία των κυττάρων, ενώ σημαντικό είναι το γεγονός πως τα iPSCs χαρακτηρίζονται από ομοιογένεια.

Τον επαναπρογραμματισμό των MSCs, ακολούθησε η διαφοροποίηση των iPSCs σε iMSCs. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε συγκριτική γονιδιακή ανάλυση μεταξύ των κυτταρικών τύπων iPSCs και iMSCs προκειμένου να εξακριβωθεί εάν τα iPSCs διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς. Μεταξύ των δύο αυτών κυτταρικών τύπων 93 γονίδια παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, 49 γονίδια υπερεκφράζονταν στα iPSCs και υποεκφράζονταν στα iMSCs, ενώ 44 γονίδια υπερεκφραζόταν στα iMSCs.

Πολλά από τα γονίδια που είχαν αυξημένη έκφραση στα iPSCs ενίσχυαν την ολοδυναμία και βλαστικότητα των κυττάρων όπως είναι τα *SOX2*, *FOXD3*, *NANOG* μαζί με τα ψευδογονίδια του *NANOGP8* και *NANOGP1*, όπως και τα ψευδογονίδια του *OCT4* *POUF5F1P4*, *POUF5F1B* και *POUF5F1P3*. Οι συμμετοχή των γονιδίων αυτών στις παραπάνω διεργασίες φάνηκε και στις μελέτες των Parchem et al. το 2017 και Yamaguchi et al. το 2011. Αυξημένη έκφραση στα iPSCs είχε και το γονίδιο της τελομεράσης *TERT*, γεγονός που υποδηλώνει πως η τελομεράση είναι ενεργή σε αυτά τα κύτταρα. Η τελομεράση είναι ένζυμο απαραίτητο για τη συντήρηση των τελομερών και τη μακροπρόθεσμη αυτοανανέωση και πολυδυναμία των κυττάρων, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται στη μελέτη των Liu et al. το 2016. Ακόμη, σε υψηλά επίπεδα συναντώνται και τα γονίδια του μονοπατιού Wnt (Wingless). Το Wnt αποτελεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι εξελικτικά συντηρημένο μεταξύ των οργανισμών το οποίο ωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων αναλόγως των συνθηκών, ορισμένα από τα γονίδια του μονοπατιού Wnt είναι το *WNT4* και ο υποδοχέας του *FZD7*, όπως παρατηρείται και στα ευρήματα των Fernadez et al. το 2014, Merrill το 2012 και Xu et al. το 2016. Όπως διαπιστώθηκε και στην παραπάνω σύγκριση τα iPSCs έχουν αυξημένη βλαστικότητα, ικανότητα αυτοανανέωσης και δυναμικό πολλαπλασιασμού. Στα iMSCs παρατηρείται υπερέκφραση σε γονίδια πολυδυναμίας, όπως αποδεικνύεται και στις μελέτες των Chandran et al. το 2021, Date et al. το 2015, Kamata et al. το 2014 και Tolkachov et al. το 2018, και συγκεκριμένα στα *KLF4*, *KLF6*, *KLF2* και *GATA2*. Ακόμη, παρατηρείται υψηλή έκφραση γονιδίων που προωθούν τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε κύτταρα μεσοδερμικής προελεύσεως όπως είναι τα *CCND1* και *ISL1*, αλλά και σε διαφοροποίηση προς κυτταρικούς τύπους του ενδοδέρματος όπως είναι το *SOX17*, γεγονός το οποίο συνάδει με τα ευρήματα των μελετών των Kamata et al. το 2014 και Pauklin et al. το 2016. Επίσης, υψηλή έκφραση παρατηρείται και σε γονίδια που ενισχύουν την οστεοβλαστογένεση όπως τα *RUNX2* και *BMP2*, σε γονίδια ρυθμιστές της λιπογένεσης όπως είναι τα *PPARD* και *PPARG*, αλλά και σε γονίδια που σχετίζονται με την αγγειογένεση όπως τα *VEGFA* και *ENG*. Επομένως, είναι κατανοητό πως τα iPSCs διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε iMSCs καθώς υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στο είδος των γονιδίων που εκφράζουν οι δύο, ξεχωριστοί πλέον, κυτταρικοί τύποι. Τα iPSCs είναι αποδιαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία διατηρούν την ολοδυναμία, τη βλαστικότητα και την ικανότητα αυτοανανέωσης τους, ενώ αντιθέτως τα iMSCs χαρακτηρίζονται από πολυδυναμία και αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού,

αποκτώντας επίσης μία τάση προς διαφοροποίηση σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

Αφού επιβεβαιώθηκε πως η αποδιαφοροποίηση και η μετέπειτα επαναδιαφοροποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, ακολούθησε η τελευταία και πιο σημαντική σύγκριση. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των MSCs και iMSCs. Οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι είχαν διαφορά στην έκφραση 28 γονιδίων, εκ των οποίων τα 16 υπερεκφραζόταν στα MSCs και αντίστοιχα υποεκφραζόταν στα iMSCs, ενώ τα υπόλοιπα 12 υπερεκφραζόταν στα iMSCs. Στα MSCs παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση γονιδίων που αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της οστεογένεσης όπως το *RUNX2* και το *DLX5*, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα στο μονοπάτι της οστεογένεσης. Το *DLX5* αφού ενεργοποιηθεί από το μεταγραφικό παράγοντα BMP2 ενεργοποιεί απευθείας το *RUNX2*, επάγοντας έτσι τη διαδικασία της οστεογένεσης. Ωστόσο, στο ίδιο μονοπάτι συναντώνται, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους εμμέσως, και τα γονίδια *TLE3*, *FOXC1*, *STAT1*, *FZD5*, *NR3C1*, *NOTCH3*, *PRKCZ* και *HDAC4*. που υπερεκφράζονται στα MSCs. Η αλληλεπίδραση και λειτουργία αυτή των παραπάνω γονιδίων επιβεβαιώνεται από τις μελέτες των Han et al. το 2019, H. J. Kim et al. το 2003, S. Kim et al. το 2003, Kokabu et al. το 2014, Ouyang et al. το 2020 και Rutkovskiy et al. το 2016. Χαρακτηριστική είναι επίσης και η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *ADAMTS5* που κωδικοποιεί μεταλλοπρωτεϊνάση, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε αποδομούν την ECM και συμβάλλουν στην εξέλιξη της OA, όπως επίσης και του γονιδίου *VEGFA* που κωδικοποιεί παράγοντα βασικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός πως τα MSCs υπερεκφράζουν και το γονίδιο του υποδοχέα της λεπτίνης (*LEPR*) που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμά του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) της OA. Ακόμη, αυξημένη έκφραση παρατηρείται και στο γονίδιο *FGFR1* που ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, σύμφωνα με τη μελέτη των Mossahebi-mohammadi et al. το 2020, κυρίως ως προς τη διαμόρφωση του μεσοδέρματος και τη σκελετογένεση, αλλά και του *CEBPD* που ενισχύει τη λιπογένεση, γεγονός που αποδεικνύεται στη μελέτη των Robert et al. το 2020. Όσον αφορά τα iMSCs, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση σε γονίδια τα οποία σύμφωνα και με τις μελέτες των Bierie et al. το 2017 και P. C. Chen et al. το 2021 ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως είναι τα *IGFR*, *FZD9* και *ITGB4*. Ακόμη αυξημένη έκφραση είχαν και τα γονίδια *GATA2* και *NR2F2* που συντελούν στη

διατήρηση της βλαστικότητας των κυττάρων, γεγονός που συνάδει με το εύρημα της μελέτης των Zhu et al. το 2016, αλλά και το γονίδιο *HMGGA2* που σύμφωνα με τη μελέτη των Z. Zhang et al. το 2020 έχει προστατευτική δράση κατά της γήρανσης. Υψηλή ακόμη ήταν και η έκφραση του γονιδίου *MSX2* το οποίο συμμετέχει στην οστεοβλαστογένεση, του *ASTNI* που συμβάλει στην ανάπτυξη των αστροκυττάρων του εγκεφάλου και του *CD34* που αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCs). Η συμμετοχή των γονιδίων αυτών στις παραπάνω διεργασίες επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες των Rutkovskiy et al. το 2016, Q. F. Chen et al. το 2020 και Satterthwaite et al. το 1992. Τέλος, αυξημένη ήταν και η έκφραση του γονιδίου *HMGCSI* το οποίο, σύμφωνα με τη μελέτη των Wruck et al. το 2021, αυξάνει τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων, μία διαδικασία που συνήθως φθίνει στα γηραιότερα κύτταρα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως τα MSCs παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στη γονιδιακή τους έκφραση σε σχέση με τα iMSCs. Φαίνεται πως τα MSCs είχαν τάση ως προς την οστεογένεση, καθώς 10 από τα 16 υπερεκφραζόμενα γονίδια συμμετέχουν στο μονοπάτι της οστεογένεσης και έχουν ρυθμιστική δράση μεταξύ τους. Ακόμη, αξιοσημείωτη είναι και η αυξημένη έκφραση γονιδίων που συνήθως συμβάλουν στην εξέλιξη της OA, όπως είναι τα *ADAMTS*, *VEGFA* και *LEPR*. Φαίνεται πως τα MSCs είναι γερασμένα και έχουν χάσει την πολυδυναμία τους σε μεγάλο βαθμό. Αντιθέτως, τα iMSCs δεν εκφράζουν πλέον αυτά τα γονίδια αλλά υπερεκφράζουν γονίδια που ενισχύουν τη βλαστικότητα (*GATA2*, *NR2F2*) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*IGFR*) και που τα προστατεύουν από τη γήρανση (*HMGGA2*). Η αυξημένη έκφραση που εμφανίζουν τα iMSCs σε γονίδια που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση προς ένα κυτταρικό τύπο, επιβεβαιώνουν το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών και την πολυδυναμία τους. Τα iMSCs έχουν υποστεί επομένως ανανέωση “rejuvenation”, ενώ είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός πως δεν εμφανίζουν την ετερογένεια που χαρακτηρίζει τα MSCs.

Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Wruck et al., 2021, ερευνήθηκε το κατά πόσο η ετερογένεια και γήρανση των MSCs παύει να υφίσταται με τη δημιουργία των iMSCs. Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε, μετά από μετα-ανάλυση και εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση, πως τα iMSCs πράγματι ξεπερνούν τα παραπάνω εμπόδια και ανακτούν τη «νεανικότητά» τους μέσω επιγενετικών αλλά και μεταγραφικών αλλαγών. Με αυτό τον τρόπο, αποκτούν αλληλεπικαλυπτόμενες

αναπτυξιακές βιολογικές διεργασίες με νεαρά MSCs, τα οποία εντοπίζονται σε εμβρυικούς ιστούς και στον ομφάλιο λώρο. Το εύρημα αυτό συνάδει με το αποτέλεσμα της παρούσης διπλωματικής εργασίας, όπου παρατηρήθηκε ότι τα iMSCs υπερεκφράζουν γονίδια όπως τα *GATA2* και *NR2F2* που συμβάλλουν στη διατήρηση της βλαστικότητας των κυττάρων. Το 2019 πραγματοποιήθηκε μία ακόμη μελέτη από τους Spitzhorn et al. με στόχο την ταυτοποίηση της υπογραφής της ανανέωσης (rejuvenation signature) των iMSCs, δηλαδή γονίδια τα οποία εκφράζονται στα iPSCs και iMSCs αλλά όχι στα MSCs. Στην παραπάνω μελέτη αναλύθηκε το μεταγραφικό προφίλ αλλά και το εκκρίτωμα των κυττάρων. Όπως και στην προηγούμενη μελέτη, φάνηκε πως τα iMSCs υφίστανται ανανέωση και έχουν περισσότερα κοινά με τα MSCs κύτταρα νεαρότερων ιστών. Τα αποτελέσματα και αυτής της μελέτης επίσης συνάδουν με τη παρούσα διπλωματική εργασία.

Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε, πως τα iMSCs με βάση το μεταγραφικό τους προφίλ είναι πράγματι ανανεωμένα κύτταρα τα οποία έχουν χάσει τα χαρακτηριστικά της γήρανσης και τα χαρακτηριστικά του δότη που έφερε τα MSCs, ενώ έχουν ανακτήσει το δυναμικό διαφοροποίησης τους, τη βλαστικότητά τους και αποτελούν έναν ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως τα iMSCs μπορούν, πιθανόν, να αντικαταστήσουν τα MSCs στις κυτταρικές θεραπείες, καθώς διαθέτουν όλα τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των MSCs που τα καθιστούν ιδανικά για χρήση στις κυτταρικές θεραπείες, χωρίς όμως να διαθέτουν τα αρνητικά χαρακτηριστικά τους.

Προκειμένου να επέλθει πλήρης κατανόηση του ποσοστού επαναπρογραμματισμού αλλά και των τυχόν διαφορών που μπορεί να υπάρχουν στη δράση των MSCs και iMSCs, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη του συνολικού μεταγραφώματος αλλά και επιγενώματος, των ncRNAs (non-coding RNAs), όπως και της παρακρινούς δράσης των iMSCs σε μελλοντικές μελέτες. Η παρακρινής δράση είναι αυτή που προσδίδει τις σημαντικές αναγεννητικές ιδιότητες στα MSCs, καθιστώντας τα κατάλληλα για κυτταρική θεραπεία. Με αυτό τον τρόπο θα επιβεβαιωθεί εάν τα iMSCs διαθέτουν όλα τα πλεονεκτήματα των MSCs και αποτελούν κατάλληλη εναλλακτική επιλογή για την κυτταρική θεραπεία της ΟΑ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Medical Clinics of North America*, *104*(2), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>
- 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>
- Anne B. Satterthwaite, Timothy C. Burn, Michelle M. Le Beau, D. G. T. (1992). *Structure of the Gene Encoding CD34, a Human Hematopoietic Stem Cell Antigen*. *794*, 788–794. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90310-o](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90310-o).
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *36*(4), 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>
- Bierie, B., Pierce, S. E., Kroeger, C., Stover, D. G., Pattabiraman, D. R., Thiru, P., Donaher, J. L., Reinhardt, F., Chaffer, C. L., Keckesova, Z., & Weinberg, R. A. (2017). Integrin-β4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(12), E2337–E2346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618298114>
- Bioinformatics Workshop for Helminth Genomics*. (2015). 1–112.
- 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>
- 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>
- Butterfield, N. C., Curry, K. F., Steinberg, J., Dewhurst, H., Komla-Ebri, D., Mannan, N. S., Adoum, A. T., Leitch, V. D., Logan, J. G., Waung, J. A., Ghirardello, E., Southam, L., Youlten, S. E., Wilkinson, J. M., McAninch, E. A., Vancollie, V. E., Kussy, F., White, J. K., Lelliott, C. J., ... Bassett, J. H. D. (2021). Accelerating functional gene discovery in osteoarthritis. *Nature Communications*, *12*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20761-5>
- Cao, Y., Song, M., Kim, E., Shon, W., Chugal, N., Bogen, G., Lin, L., Kim, R. H., Park, N. H., & Kang, M. K. (2015). Pulp-dentin regeneration: Current state and future prospects. *Journal of Dental Research*, *94*(11), 1544–1551. <https://doi.org/10.1177/0022034515601658>
- 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>
- Chandran, R. R., Xie, Y., Gallardo-Vara, E., Adams, T., Garcia-Milian, R., Kabir, I.,

- Sheikh, A. Q., Kaminski, N., Martin, K. A., Herzog, E. L., & Greif, D. M. (2021). Distinct roles of KLF4 in mesenchymal cell subtypes during lung fibrogenesis. *Nature Communications*, *12*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27499-8>
- Chang, Y. H., Liu, H. W., Wu, K. C., & Ding, D. C. (2016). Mesenchymal stem cells and their clinical applications in osteoarthritis. *Cell Transplantation*, *25*(5), 937–950. <https://doi.org/10.3727/096368915X690288>
- Charlier, E., Deroyer, C., Ciregia, F., Malaise, O., Neuville, S., Plener, Z., Malaise, M., & de Seny, D. (2019). Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochemical Pharmacology*, *165*(March), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.036>
- Chen, F. H., & Tuan, R. S. (2008). Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research and Therapy*, *10*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1186/ar2514>
- Chen, P. C., Kuo, Y. C., Chuong, C. M., & Huang, Y. H. (2021). Niche Modulation of IGF-1R Signaling: Its Role in Stem Cell Pluripotency, Cancer Reprogramming, and Therapeutic Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(January). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.625943>
- Chen, Q. F., Shi, F., Huang, T., Huang, C., Shen, L., Wu, P., & Li, W. (2020). ASTN1 is associated with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma, and inhibits the migratory and invasive capacity of liver cancer via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Reports*, *44*(4), 1425–1440. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7704>
- Cheng, A., Kapacee, Z., Peng, J., Lu, S., Lucas, R. J., Hardingham, T. E., & Kimber, S. J. (2014). Cartilage Repair Using Human Embryonic Stem Cell-Derived Chondroprogenitors. *Stem Cells Translational Medicine*, *3*(11), 1287–1294. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0101>
- Choudhery, M. S., & Mahmood, R. (2022). Insight into generation of induced mesenchymal stem cells from induced pluripotent cells. *World Journal of Stem Cells*, *14*(1), 142–145. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V14.I1.142>
- Courties, A., Sellam, J., & Berenbaum, F. (2017). Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, *29*(2), 214–222. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000373>
- 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>
- Daley, G. Q. (2015). Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1680). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0376>
- Date, D. A., Das, R., Clinic, C., Narla, G., & Simon, D. I. (2014). *Kruppel-like Transcription Factor 6 Regulates Inflammatory Macrophage Polarization* *. January. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526749>
- 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>
- Dupuis, V., & Oltra, E. (2021). Methods to produce induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: Mesenchymal stem cells from induced pluripotent stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 13(8), 1094–1111.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i8.1094>
- Fernandez, A., Huggins, I. J., Perna, L., Brafman, D., Lu, D., Yao, S., Gaasterland, T., Carson, D. A., & Willert, K. (2014). The WNT receptor FZD7 is required for maintenance of the pluripotent state in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1409–1414. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323697111>
- Freeman, Starr, D. A., & O’connor. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.008>.Osteoarthritis
- Freitag, J., Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., & Tenen, A. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1085-9>
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3), 381–390. <https://doi.org/10.1242/dev.16.3.381>
- Frobel, 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>
- Fu, K., Robbins, S. R., & McDougall, J. J. (2018). Osteoarthritis: The genesis of pain. *Rheumatology (United Kingdom)*, 57, iv43–iv50.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex419>
- Galaxy. (n.d.).
- Gao, K., Zhu, W., & Cao, Y. (2018). Exosomes in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 22(36), 5858–5864. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.0264>
- Geusens, P. P., & Van Den Bergh, J. P. (2016). Osteoporosis and osteoarthritis: Shared mechanisms and epidemiology. *Current Opinion in Rheumatology*, 28(2), 97–103. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000256>
- Gultian, K. A., Gandhi, R., Sarin, K., Sladkova-Faure, M., Zimmer, M., de Peppo, G. M., & Vega, S. L. (2022). Human induced mesenchymal stem cells display increased sensitivity to matrix stiffness. *Scientific Reports*, 12(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12143-2>
- Guzzo, R. M., Gibson, J., Xu, R. H., Lee, F. Y., & Drissi, H. (2013). Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(2), 480–490.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24388>

- Han, L., Wang, B., Wang, R., Gong, S., Chen, G., & Xu, W. (2019). The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1498-0>
- 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*(November 2018), 2318–2326. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.099>
- Houschyar, K. S., Tapking, C., Borrelli, M. R., Popp, D., Duscher, D., Maan, Z. N., Chelliah, M. P., Li, J., Harati, K., Wallner, C., Rein, S., Pörringer, D., Reumuth, G., Grieb, G., Mouraret, S., Dadras, M., Wagner, J. M., Cha, J. Y., Siemers, F., ... Behr, B. (2019). Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00170>
- Hu, X., Ning, X., Zhao, Q., Zhang, Z., Zhang, C., & Xie, M. (n.d.). *Supporting information Islet-1 Mesenchymal Stem Cells-derived exosomes incorporated Angiogenin-1 Hydrogel for Enhanced Acute Myocardial Infarction Therapy Author Affiliations* : 1–4.
- Hua, Z., Li, S., Liu, Q., Yu, M., Liao, M., Zhang, H., Xiang, X., & Wu, Q. (2022). Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promotes Osteogenic Potential of iPSC-Derived MSCs but Fails to Simplify the iPSC-EB-MSC Differentiation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.841778>
- Huber, M., Trattnig, S., & Lintner, F. (2000). Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Investigative Radiology*, *35*(10), 573–580. <https://doi.org/10.1097/00004424-200010000-00003>
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019a). Osteoarthritis. *The Lancet*, *393*(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019b). Osteoarthritis. *The Lancet*, *393*(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Hunter, D. J., & Felson, D. T. (2006). Osteoarthritis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *332*(7542), 639–642. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7542.639>
- Hwang, J. J., Choi, J., Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2021). Application of induced pluripotent stem cells for disease modeling and 3d model construction: Focus on osteoarthritis. *Cells*, *10*(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cells10113032>
- Hyun, D., Hwan, D., Heck, B. E., Shaffer, M., Hee, K., & Hur, J. (2020). PPAR- δ agonist affects adipo-chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through the expression of PPAR- γ . *Regenerative Therapy*, *15*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.07.003>
- Jiang, Q., Hu, X., Shan, Z., Wu, Y., & Wu, G. (2020). Histone demethylase KDM6A promotes somatic cell reprogramming by epigenetically regulating the PTEN and IL-6 signal pathways. *November 2019*. <https://doi.org/10.1002/stem.3188>

- Jiao, H., Walczak, B. E., Lee, M.-S., Lemieux, M. E., & Li, W.-J. (2021). GATA6 regulates aging of human mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells*, *39*(1), 62–77. <https://doi.org/10.1002/stem.3297>
- 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>
- Kalamegam, G., Memic, A., Budd, E., Abbas, M., & Mobasheri, A. (2018). A comprehensive review of stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1089*, 23–36. https://doi.org/10.1007/5584_2018_205
- 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, H. J., Kim, J. H., Bae, S. C., Choi, J. Y., Kim, H. J., & Ryoo, H. M. (2003). The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(1), 319–326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203750200>
- Kim, S., Koga, T., Isobe, M., Kern, B. E., Yokochi, T., Chin, Y. E., Karsenty, G., Taniguchi, T., & Takayanagi, H. (2003). Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes and Development*, *17*(16), 1979–1991. <https://doi.org/10.1101/gad.1119303>
- Kimbrel, E. A., Kouris, N. A., Yavarian, G. J., Chu, J., Qin, Y., Chan, A., Singh, R. P., McCurdy, D., Gordon, L., Levinson, R. D., & Lanza, R. (2014). Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells and Development*, *23*(14), 1611–1624. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0554>
- King, N. M. P., & Perrin, J. (2014). Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, *5*(4), 1–6. <https://doi.org/10.1186/scrt474>
- Ko, J. Y., Kim, K. Il, Park, S., & Im, G. Il. (2014). In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*, *35*(11), 3571–3581. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.009>
- Kokabu, S., Sato, T., Ohte, S., Enoki, Y., Okubo, M., Hayashi, N., Nojima, J., Tsukamoto, S., Fukushima, Y., Sakata, Y., Katagiri, T., Rosen, V., & Yoda, T. (2014). Expression of TLE3 by bone marrow stromal cells is regulated by canonical Wnt signaling. *FEBS Letters*, *588*(4), 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.031>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, *85*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Kovács, B., Vajda, E., & Nagy, E. E. (2019). Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in

- osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18).
<https://doi.org/10.3390/ijms20184653>
- 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>
- Lach, M. S., Rosochowicz, M. A., Richter, M., Jagiełło, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2022). The Induced Pluripotent Stem Cells in Articular Cartilage Regeneration and Disease Modelling: Are We Ready for Their Clinical Use? *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030529>
- Lette, G. (2017). The osteoarthritis and height GDF5 locus yields its secrets. *Nature Genetics*, 49(8), 1165–1166. <https://doi.org/10.1038/ng.3924>
- Li, Y., Jin, D., Xie, W., Wen, L., Chen, W., Xu, J., Ding, J., & Ren, D. (2017). PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(3), 185–192.
<https://doi.org/10.2174/1574888x12666171012141908>
- Litwic, A., Registrar, S., Edwards, M., & Clinical, M. (2013). *Europe PMC Funders Group Epidemiology and Burden of Osteoarthritis*. 44(0), 185–199.
<https://doi.org/10.1093/bmb/lds038.Epidemiology>
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>
- Liu, L. (2016). Linking Telomere Regulation to Stem Cell Pluripotency. *Trends in Genetics*, xx, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.10.007>
- Mapping*. (n.d.).
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., Goldring, S. R., Jones, G., Teichtahl, A. J., & Pelletier, J. P. (2016). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.72>
- McCulloch, K., Litherland, G. J., & Rai, T. S. (2017). Cellular senescence in osteoarthritis pathology. In *Aging Cell* (Vol. 16, Issue 2, pp. 210–218).
<https://doi.org/10.1111/accel.12562>
- Merrill, B. J. (2012). Wnt pathway regulation of embryonic stem cell self-renewal. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), 1–17.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007971>
- Minguell, J. J., Erices, A., & Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226(6), 507–520.
<https://doi.org/10.1177/153537020122600603>
- 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>

- 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>
- Mossahebi-mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J., Li, X., & Kelly, G. (2020). *FGF Signaling Pathway : A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency*. *8*(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>
- Munir, F., Jamshed, M. B., Shahid, N., Muhammad, S. A., Ghanem, N. B., & Qiyu, Z. (2019). Current status of diagnosis and Mesenchymal stem cells therapy for acute pancreatitis. *Physiological Reports*, *7*(21), 1–10. <https://doi.org/10.14814/phy2.14170>
- 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>
- Ouyang, N., Li, H., Wang, M., Shen, H., Si, J., & Shen, G. (2020). The Transcription Factor Foxc1 Promotes Osteogenesis by Directly Regulating Runx2 in Response of Intermittent Parathyroid Hormone (1–34) Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00592>
- Parchem, J., Labosky, P. A., & Blelloch, R. (2017). *FOXD3 Regulates Pluripotent Stem Cell Potential by Simultaneously Initiating and Repressing Enhancer Activity*. *18*(1), 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.003>
- Pauklin, S., Madrigal, P., Bertero, A., & Vallier, L. (2016). *Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D*. 421–433. <https://doi.org/10.1101/gad.271452.115>.
- Pichard, L., Brondelo, J. M., Becker, F., Desprat, R., De Ceuninck, F., Pastoureau, P., Noel, D., Jorgensen, C., & Lemaitre, J. M. (2020). Generation of human pluripotent stem cell lines (iPSCs) from mesenchymal stem cells (MSCs) from three elderly patients with osteoarthritis. *Stem Cell Research*, *44*(December 2019), 101721. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101721>
- Piñeiro-Ramil, M., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Castro-Viñuelas, R., Hermida-Gómez, T., Blanco-García, F. J., Fuentes-Boquete, I., & Díaz-Prado, S. (2021). Generation of mesenchymal cell lines derived from aged donors. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910667>
- Piñeiro Ramil, M., Castro Viñuelas, R., Sanjurjo Rodríguez, C., Rodríguez Fernández, S., Hermida Gómez, T., Blanco García, F., Fuentes Boquete, I., & Díaz Prado, S. (2019). Immortalization of “osteoarthritis” and “healthy” mesenchymal stromal cells without loss of mesenchymal features. *Osteoarthritis and Cartilage*, *27*(2019), S424–S425. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.02.443>
- Polanco, A., Kuang, B., & Yoon, S. (2020). Bioprocess Technologies that Preserve the Quality of iPSCs. *Trends in Biotechnology*, *38*(10), 1128–1140. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.006>
- Pourakbari, R., Khodadadi, M., Aghebati-Maleki, A., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2019). The potential of exosomes in the therapy of the cartilage and

- bone complications; emphasis on osteoarthritis. *Life Sciences*, 236(June).
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116861>
- Primorac, D. (2020). Knee Osteoarthritis : A Review of Pathogenesis and. *Genes*, 11(8), 854–889.
- Quicke, J. G., Conaghan, P. G., Corp, N., & Peat, G. (2022). Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.10.003>
- Rajasingh, S., Sigamani, V., Selvam, V., Gurusamy, N., Kirankumar, S., Vasanthan, J., & Rajasingh, J. (2021). Comparative analysis of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(18), 8904–8919.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16851>
- Ratajczak, M. Z. (Mariusz Z. (2019). *Stem cells : therapeutic applications*.
- Ratneswaran, A., & Kapoor, M. (2021). Osteoarthritis year in review: genetics, genomics, epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 29(2), 151–160.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.11.003>
- Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2020). The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072358>
- Ritchie Ho, Bernadett Papp, Jackson A. Hoffman, Bradley J. Merrill, and K. P. (2013). *Stage-specific regulation of reprogramming to iPSCs by Wnt signaling and Tcf proteins*. 3(6), 2113–2126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
- Robert, A. W., Marcon, B. H., Dallagiovanna, B., & Shigunov, P. (2020). Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(July). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00561>
- Rohani, L., Johnson, A. A., Arnold, A., & Stolzing, A. (2014). The aging signature: A hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell*, 13(1), 2–7.
<https://doi.org/10.1111/acel.12182>
- Roseti, L., Desando, G., Cavallo, C., Petretta, M., & Grigolo, B. (2019). Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells*, 8(11), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/cells8111305>
- Rossi, E., Bernabeu, C., & Smadja, D. M. (2019). Endoglin as an adhesion molecule in mature and progenitor endothelial cells: A function beyond TGF- β . *Frontiers in Medicine*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00010>
- Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A. D., Montserrat, N., Plongthongkum, N., Kumar, S., Fung, H. L., Giorgetti, A., Bilic, J., Batchelder, E. M., Zaehres, H., Kan, N. G., Schöler, H. R., Mercola, M., Zhang, K., & Belmonte, J. C. I. (2012). Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16196–16201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1202352109>
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast Differentiation

at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*, 22, 95–106.
<https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>

- 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>
- Saunders, A., Huang, X., Fidalgo, M., Jr, M. H. R., Ding, J., Sánchez-priego, C., Guallar, D., & Sáenz, C. (2017). *with Nanog to promote pluripotency*. 18(7), 1713–1726. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.055>.The
- 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>
- Song, Y., Zhang, J., Xu, H., Lin, Z., Chang, H., Liu, W., & Kong, L. (2020). Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Translation*, 24(November 2019), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2020.03.015>
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468.
<https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- 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>
- Studer. (2010). Stem Cell in Disease Review. *Ethnicity & Disease*, 20(1 Supplement), 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrg3563.Pluripotent>
- Styrkarsdottir, U., Helgason, H., Sigurdsson, A., Norddahl, G. L., Agustsdottir, A. B., Reynard, L. N., Villalvilla, A., Halldorsson, G. H., Jonasdottir, A., Magnúsdottir, A., Oddson, A., Sulem, G., Zink, F., Sveinbjornsson, G., Helgason, A., Johannsdottir, H. S., Helgadóttir, A., Stefansson, H., Gretarsdottir, S., ... Stefansson, K. (2017). Whole-genome sequencing identifies rare genotypes in COMP and CHADL associated with high risk of hip osteoarthritis. *Nature Genetics*, 49(5), 801–805. <https://doi.org/10.1038/ng.3816>
- Sun, D. Z., Abelson, B., Babbar, P., & Damaser, M. S. (2019). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology. *Nature Reviews Urology*, 16(6), 363–375. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0169-3>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Tolkachov, A., Fischer, C., Ambrosi, T. H., Bothe, M., Han, C.-T., Muenzner, M., Mathia, S., Salminen, M., Seifert, G., Thiele, M., Duda, G. N., Meijnsing, S. H., Sauer, S., Schulz, T. J., & Schupp, M. (2018). Loss of the Hematopoietic Stem Cell Factor GATA2 in the Osteogenic Lineage Impairs Trabecularization and

- Mechanical Strength of Bone. *Molecular and Cellular Biology*, 38(12).
<https://doi.org/10.1128/mcb.00599-17>
- Turinetto, V. (2017). *Induced Pluripotent Stem Cells : Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process*.
<https://doi.org/10.3390/ijms18091952>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35.
<https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M., & Hu, W. S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 12–27.
<https://doi.org/10.1263/jbb.100.12>
- Van Spil, W. E., Kubassova, O., Boesen, M., Bay-Jensen, A. C., & Mobasher, A. (2019). Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*, 165(March), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.037>
- Vina, E. R., & Kent Kwok, C. (2018). Epidemiology of Osteoarthritis: Literature Update Ernest. *Physiology & Behavior*, 30(2), 160–167.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000479> Epidemiology
- 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>
- Wyles, C. C., Houdek, M. T., Behfar, A., & Sierra, R. J. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: Current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 117–124. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S68073>
- Xu, M., Shaw, G., Murphy, M., & Barry, F. (2019). Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells Are Functionally and Genetically Different From Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells*, 37(6), 754–765. <https://doi.org/10.1002/stem.2993>
- Xu, Z., Robitaille, A. M., Berndt, J. D., Davidson, K. C., Fischer, K. A., Mathieu, J., Potter, J. C., Ruohola-Baker, H., & Moon, R. T. (2016). Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6382–E6390.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1613849113>
- Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S., & Tada, T. (2011). Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. *Stem Cell Research*, 6(2), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.09.004>
- Yan, X., Yang, B., Chen, Y., Song, Y., Ye, J., Pan, Y., Zhou, B., Wang, Y., Mao, F., Dong, Y., Liu, D., & Yu, J. (2021). Anti-Friction MSCs Delivery System Improves the Therapy for Severe Osteoarthritis. *Advanced Materials*, 33(52), 1–11. <https://doi.org/10.1002/adma.202104758>
- Yang, Y. Q., Tan, Y. Y., Wong, R., Wenden, A., Zhang, L. K., & Rabie, A. B. M. (2012). The role of vascular endothelial growth factor in ossification.

International Journal of Oral Science, 4(2), 64–68.
<https://doi.org/10.1038/ijos.2012.33>

- Yang, Z., Liu, X., Wang, L., Wang, T., Chen, Y., Teng, X., Li, J., Shao, L., Hui, J., Ye, W., & Shen, Z. (2020). The protective effects of HMGA2 in the senescence process of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(4), 588–599.
<https://doi.org/10.1002/term.3023>
- Yin, J. Q., Zhu, J., & Ankrum, J. A. (2019). Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nature Biomedical Engineering*, 3(2), 90–104.
<https://doi.org/10.1038/s41551-018-0325-8>
- Zhang, W., Ouyang, H., Dass, C. R., & Xu, J. (2016). Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*, 4(December 2015). <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.40>
- Zhao, X., Zhao, Y., Sun, X., Xing, Y., Wang, X., & Yang, Q. (2020). Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(October), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.575057>
- Zhou, Y., Liu, C., He, J., Dong, L., Zhu, H., Zhang, B., Feng, X., Weng, W., Cheng, K., Yu, M., & Wang, H. (2020). KLF2+ stemness maintains human mesenchymal stem cells in bone regeneration. *Stem Cells*, 38(3), 395–409.
<https://doi.org/10.1002/stem.3120>
- Zhu, N., Wang, H., Wang, B., Wei, J., Shan, W., Feng, J., & Huang, H. (2016). A Member of the Nuclear Receptor Superfamily, Designated as NR2F2, Supports the Self-Renewal Capacity and Pluripotency of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/5687589>