Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή εργασία

Η απόκριση των οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων στο οξειδωτικό stress

The response of osteoarthritic chondrocytes to oxidative stress

Σύρρου Χριστίνα

Λάρισα, 2020

Τριμελής Επιτροπή:

Τσέζου Ασπασία: Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τραχανά Βαρβάρα: Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κα.Τσέζου Ασπασία, τον κ.Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο και την κα.Τραχανά Βαρβάρα, για την πολύτιμη βοήθειά τους καθώς και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν καθ΄όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ.Γούτα Ανδρέα καθώς και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για την άψογη συνεργασία. Υπήρξαν πάντα πρόθυμοι να με συμβουλεύσουν και να με βοηθήσουν σε οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Ακόμη επιθυμώ να ευχαριστήσω τον αγαπημένο μου καθηγητή Χημείας, κ.Πρίφτη Αθανάσιο, για όλη την υποστήριξη, τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου προσέφερε στα καθοριστικά χρόνια του Λυκείου, αλλά και μετέπειτα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, που με υποστήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς εσάς δε θα τα είχα καταφέρει.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη 8
ABSTRACT 9
Α. Εισαγωγή 10
Α.1 Οστεοαρθρίτιδα 10
Α.1.1 Γενικές πληροφορίες 10
Α.1.2. παράγοντες κινδύνου 11
Α.1.3 Επιδημιολογία οστεοαρθρίτιδας 14
Α.1.4. Διάγνωση της νοσου 15
Α.1.4. Θεραπεία 16
Α.1.5. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ 17
Α.2 Ελεύθερες ρίζες (ROS) 23
Α.2.2. Οξειδωτικό στρες. 26
Α.2.3. Οξειδωτικό στρες – συσχετισμός με την οστεοαρθρίτιδα. 28
Α.2.4. Συσχετισμός παθολογίας οστεοαρθρίτιδας με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων 30
Σκοπός της εργασίας : 33
Β. Υλικά και μέθοδοι 34
Β.1 ΑΡΘΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ 34
Β.2 Κυτταροκαλιέργειες 35
Β.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ 36
Β.4 πρωτόκολλο ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ 36
Β.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2)- ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ. 38
Β.6 ΧΡΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ 39
Αποτελέσματα 41
Συζήτηση 49
Βιβλιογραφία 51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων και συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο συνήθεις χρόνιες παθήσεις. Ο πόνος και η δυσκαμψία που προκαλεί η πάθηση, επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα ζωής των ασθενών, οι οποίοι ως το 2050 θα αγγίζουν τα 130 εκατομμύρια, σύμφωνα με εκτίμηση των Ηνωμένων Εθνών.

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθολογία της οστεοαρθρίτιδας. Παλιότερες μελέτες έχουν συσχετίσει αλλαγές στην μορφολογία των μιτοχονδρίων έπειτα από την επίδραση οξειδωτικού στρες. Οι αλλαγές αυτές στην μορφολογία των μιτοχονδρίων πιθανά σχετίζονται και με δυσλειτουργία τους. Η διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων ελευθέρων ρίζων, οδηγώντας έτσι σε έναν βρόγχο ανατροφοδότησης. Γνωρίζουμε ότι αρκετές μελέτες στον παρελθόν έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με την αιτιοπαθογένεια της ΟΑ. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να αναλύσουμε τις διαφορές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων ανάμεσα στα χονδροκυττάρα ασθενών που έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα και φυσιολογικών δοτών. Επιπλέον επιδράσαμε τόσο στα φυσιολογικά, όσο και στα παθολογικά κύτταρα με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τα αφήσαμε να ανακάμψουν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1 ώρας, 6 και 24 ωρών) προκειμένου να παρατηρήσουμε πιθανές διαφορές στην απόκριση των κυττάρων στο εξωγενές οξειδωτικό στρες.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων ανάμεσα σε φυσιολογικά κύτταρα και κύτταρα ασθενών με ΟΑ. Το ποσοστό των μιτοχονδρίων με μη φυσιολογική μορφολογία ήταν εξαρχής μεγαλύτερο στα ΟΑ κύτταρα. Επιπλέον, μετά την επίδραση του εξωγενούς οξειδωτικού στρες τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων έδειξαν ικανότητα αποκατάστασης έπειτα από μια περίοδο ανάκαμψης 24 ωρών, ενώ τα ΟΑ κύτταρα παρουσίασαν πολύ μικρότερη δυνατότητα αναστροφής των βλαβών που είχαν προκληθεί στα μιτοχόνδριά τους.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease which affects the joints. Is one of the main causes of disability worldwide. The pain and stiffness caused by OA have a negative impact in the quality of the patients' lives. It is estimated that by 2050 the number of OA patients will reach 130 million worldwide, according to the United Nations.

Mitochondria are subcellular organelles that play a crucial role in OA pathology. Researches have shown morphological changes in mitochondria after exposure of cells to oxidative stress. These morphological changes seem to also reflect mitochondrial dysfunction. This dysfunction could lead to the production of more free radicals constructing a feedback loop. It is well known that oxidative stress is implicated in the pathogenesis of osteoarthritis. In the present study we aimed at analyzing the differences in mitochondrial morphology between normal chondrocytes and chondrocytes from OA patients. We then exposed chondrocytes from OA patients as well as normal donors to H_2O_2 and let them recover for different time points (1 hour, 6 hours and 24 hours) in order to evaluate possible differences in the response of the cells to acute exogenous oxidative stress.

Our results revealed that there are significant differences in mitochondrial morphology between normal cells and osteoarthritic cells. The percentage of mitochondria that have an impaired morphology was higher in OA samples, even before exposure to exogenous oxidative stress. Moreover, the mitochondria of normal cells showed an ability to recover after the 24 hours incubation, an ability that the OA cells did not have to such an extent.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

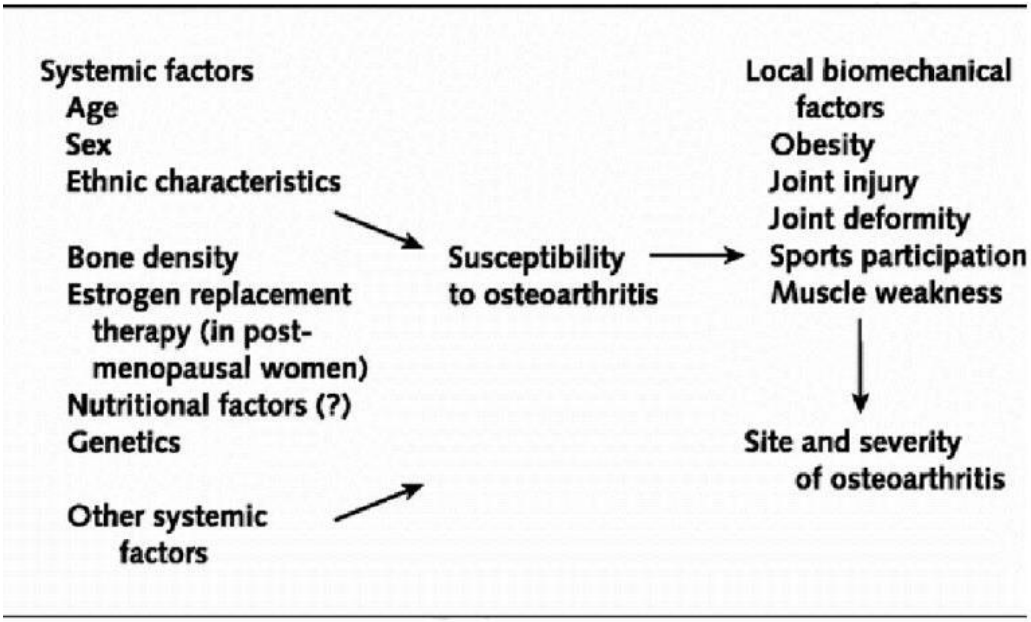
Α.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Πρόκειται για μια χρόνια εκφυλιστική νόσο των αρθρώσεων και τη πλέον συνήθη μυοσκελετική διαταραχή παγκοσμίως [1].Επηρεάζει όλες τις αρθρώσεις με πιο συχνή εμφάνιση στις αρθρώσεις των γονάτων, των χεριών και του ισχύου. Συγκαταλέγεται ανάμεσα στις κύριες αιτίες που προκαλούν αναπηρία σε παγκόσμιο επίπεδο [2]. Προβλέπεται πως όσο ο πληθυσμός της γης συνεχίζει να γερνά, ως το έτος 2050, 130 εκατομμύρια άνθρωποι θα πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα, είτε από κάποια άλλη ασθένεια που εκφυλίζει τις αρθρώσεις.
Εξαιτίας της συχνότητάς της, η πάθηση αποτελεί μια κύρια αιτία μειωμένης κινητικότητας σε ανθρώπους προχωρημένης ηλικίας.

‘Εχει υπολογιστεί ότι η οικονομική επιβάρυνση που επιφέρουν οι ασθενείς με ΟΑ στο κρατικό προϋπολογισμό στις ΗΠΑ, αν συνυπολογιστούν οι ιατρικές δαπάνες και η ελαττωμένη παραγωγικότητα στην εργασία τους, φθάνει τα $3.41 - $13.23 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο [3].

A.1.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατηγοριοποιούνται σε αυτούς που βρίσκονται υπό τον έλεγχό μας και σε αυτούς που δεν είμαστε ικανοί να ελέγξουμε.



Πηγή: Felson DT, et al. *Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The disease and Its Risk Factors*. Ann Intern Med. 2000; 133:635-646.

Μεταξύ των τοπικών εμβιομηχανικών παραγόντων συγκαταλέγονται και οι παρακάτω:

- Η Παχυσαρκία.

  Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με την ΟΑ καθώς έχει αποδειχθεί πως γυναίκες που είχαν χάσει 5 κιλά, είχαν καταφέρει να μειώσουν κατά 50% το ρίσκο ανάπτυξης συμπτωματικής ΟΑ [4]. Ένα ακόμη μεγάλο πλεονέκτημα που προσέφερε η απώλεια κιλών σε ασθενείς με ΟΑ ήταν η μείωση του πόνου και της αναπηρίας.

Η παχυσαρκία εντείνει τη φλεγμονή, καθώς σύμφωνα με έρευνες τα κύτταρα του λιπώδους ιστού παράγουν κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη και ο TNF-α. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι του παράγοντα NF-κB και να αυξήσουν τη συγκέντρωση των μεταλλοπρωτεασών (MMPs), οδηγώντας στην αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου καθώς και της εξωκυτταρικής μήτρας .Η άρθρωση επιβαρύνεται και μηχανικά, αφού το φορτίο που καλείται να σηκώσει είναι αρκετά υψηλότερο από το όριο αντοχής της.

- Διατροφή

  Εξ αιτίας του σημαντικού ρόλου που κατέχει η βιταμίνη D στην υγεία των οστών διερευνάται αν έχει προστατευτική δράση στις αρθρώσεις σε ασθενείς με ΟΑ [5].

- Τραυματισμοί των αρθρώσεων

  Συμπτώματα ΟΑ μπορεί να εμφανιστούν και έπειτα από τραυματισμό της άρθρωσης [6].Σοβαροί τραυματισμοί όπως κατάγματα, ρήξη μηνίσκου ή του χιαστού συνδέσμου οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΑ [7], [8] .

- Μυϊκή αδυναμία

- Επάγγελμα – Αθλητισμός

  Φαίνεται πως η καταπόνηση σε μεγάλο βαθμό των αρθρώσεων που προέκυπτε είτε από τη φύση της εργασίας, είτε από την υπερβολική άθληση, αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης ΟΑ [9].

Στους συστημικούς παράγοντες συγκαταλέγονται οι παρακάτω :

- Ηλικία. Στο πέρασμα των χρόνων ο χόνδρος λεπταίνει, μειώνεται ο όγκος του, η άρθρωση έχει υποστεί οξειδωτική βλάβη και οι μυς που περιβάλλουν την άρθρωση έχουν χάσει την δύναμή τους.

- Φύλο. Έχει αποδειχθεί πως το ποσοστό των γυναικών που πάσχει από ΟΑ ξεπερνά αυτό των ανδρών, 25.9% ποσοστό των γυναικών έναντι 18,3% των ανδρών [10].

Η ασθένεια παρουσιάζεται συχνότερα στο γυναικείο φύλο απ' ότι το ανδρικό, σε παγκόσμιο επίπεδο το 18% των γυναικών και το 9,8 % των ανδρών άνω των 60 ετών έχουν συμπτωματική ΟΑ [1].

Το παραπάνω γεγονός έκανε τους ερευνητές να στραφούν στις ορμόνες και να διερευνήσουν πιο επισταμένα αν διαδραματίζουν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα των ερευνών τους είναι αμφιλεγόμενα [11], [12], [13].

- Η εθνικότητα /φυλή. Αποτελέσματα έρευνας που διεξήχθη στο Πεκίνο όταν συγκρίθηκαν με αυτά της έρευνας Framingham που αφορούσε Καυκάσιους άνδρες διαπιστώθηκε πως το ποσοστό Κινέζων ανδρών με ΟΑ ισχίου και χεριού ήταν πολύ χαμηλότερο σε σύγκριση με τους Καυκάσιους . Αντιθέτως, οι ασιάτισσες που συμμετείχαν στην έρευνα εμφάνιζαν ΟΑ γόνατος με πολύ μεγαλύτερη επικράτηση σε σχέση με τις Καυκάσιες γυναίκες [14].

- Η γενετική προδιάθεση. Η κληρονομικότητα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς με το φαινότυπο της πάθησης έχουν συσχετιστεί περισσότερες από 80 μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με την δομή της άρθρωσης, την ECM και το μονοπάτι του TGF-β. Έχουν ανακαλυφθεί επίσης ποικίλα Single Nucleotide Polymorphisms σε ασθενείς με ΟΑ [15].

Παρ΄ όλα αυτά η παθογένεια της νόσου παραμένει άγνωστη [16].

Α.1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ .

Η οστεοαρθρίτιδα είναι ηλικιοσχετιζόμενη ασθένεια και η συχνότητά της αυξάνει όσο αυξάνεται η ηλικία των ανθρώπων . Έχει παρατηρηθεί πως στο διάστημα μεταξύ 40 με 60 ετών αυξάνεται η συχνότητά της.

Παρ ‘ όλα αυτά, σε σπανιότερες περιπτώσεις άτομα κάτω των 40 ετών μπορεί να εμφανίσουν οστεοαρθρίτιδα , κυρίως έπειτα από τραυματισμό [17].

Η συχνότητα που εμφανίζεται η οστεοαρθρίτιδα στον γενικό πληθυσμό ποικίλλει ανάμεσα σε διάφορες εθνικές ομάδες και τα ποσοστά επικράτησης ανάλογα με την άρθρωση. Έχει παρατηρηθεί πως στην Ελλάδα η συχνότητα εμφάνισης ΟΑ γόνατος είναι περίπου 6,3% ενώ στη Μεγάλη Βρετανία το ποσοστό φθάνει το 68,4%. Στις αρθρώσεις των ισχύων το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 0,9% ενώ στην Κροατία προσεγγίζει το 23%. Στις αρθρώσεις των δακτύλων στην Ελλάδα είναι 2% ενώ στο Ισραήλ το αντίστοιχο ποσοστό φθάνει το 71,1% [1].

Η ΟΑ παρουσιάζεται συχνότερα στο γυναικείο φύλο απ’ ότι το ανδρικό και σε παγκόσμιο επίπεδο το 18% των γυναικών και το 9,8 % των ανδρών άνω των 60 ετών έχουν συμπτωματική ΟΑ [1].

Το παραπάνω γεγονός έκανε τους ερευνητές να στραφούν στις ορμόνες και να διερευνήσουν διεξοδικά το κατά πόσο διαδραματίζουν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα των ερευνών τους είναι αμφιλεγόμενα [11], [12], [13] .

Ακόμη ένας σημαντικός παράγοντας είναι η κληρονομικότητα. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε διδύμους και σε οικογένειες υποστηρίζουν πως η ΟΑ είναι κληρονομική πάθηση σε ποσοστό 50-65% . Η εμφάνιση ΟΑ στο χέρι και στο ισχίο φάνηκε να επηρεάζεται περισσότερο από το γονότυπο, συγκριτικά με άλλες αρθρώσεις [18], [19], [20].

Α.1.4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Το πρώτο στάδιο της διάγνωσης περιλαμβάνει την επίσκεψη του ασθενούς στον ιατρό με συμπτώματα, όπως πόνος και ακαμψία στις αρθρώσεις. Η εξέταση μπορεί να αποκαλύψει και αλλαγές στη μορφολογία της άρθρωσης, όπως πρήξιμο, οστεόφυτα, περιορισμένο εύρος κίνησης της άρθρωσης, μυϊκούς σπασμούς και συσπάσεις του τένοντα.

Στην ακτινογραφία τα συνηθέστερα ευρήματα είναι:

- σχηματισμός οστεόφυτων που αποτελούν τον πλεόν αξιόπιστο δείκτη προχωρημένης ΟΑ.
- στένωση του μεσάρθριου διαστήματος
- κύστεις
- σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού

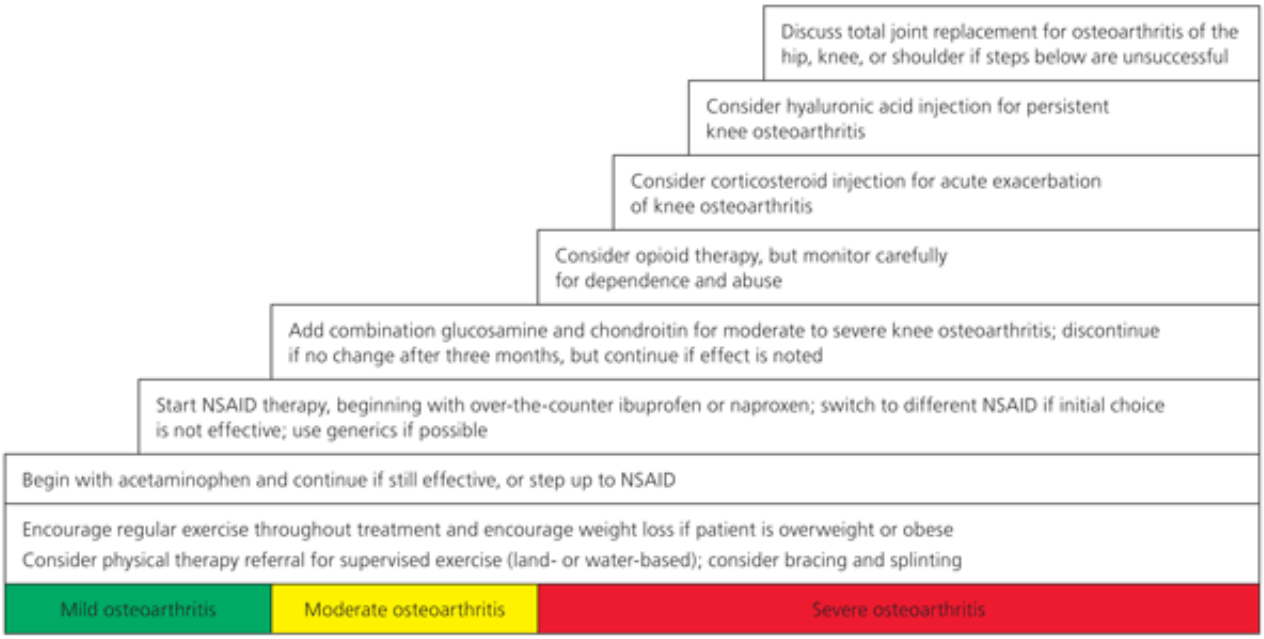
Στη συνέχεια, η ακτινογραφία αξιολογείται και βαθμολογείται με το σύστημα Kellgren –Lawrence (KL). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, μια ακτινογραφία στην οποία η άρθρωση δεν παρουσιάζει συμπτώματα της ΟΑ βαθμολογείται με 0 βαθμούς. Το ανώτατο είναι 4 βαθμοί, και αυτό αφορά προχωρημένου σταδίου νόσο [21].

Τα άτομα με ΟΑ σταδίου μεγαλύτερου ή ίσου του 2 της κλίμακας K/L πάσχουν από ΟΑ [22].

Η πλήρης διάγνωση περιλαμβάνει την καταγραφή του ιστορικού του ατόμου , τα κλινικά ευρήματα και την ακτινολογική εκτίμηση [23]. Η μαγνητική τομογραφία παρέχει ακριβέστερες απεικονίσεις της άρθρωσης, των τενόντων και μπορεί να απεικονίσει τυχόν οίδημα στο οστό. Με αυτά τα δεδομένα , καθιστά πιο εύκολη την διάγνωση αλλοιώσεων , όμως συνήθως δεν συνιστάται, καθώς οι ακτινογραφίες επαρκούν για τη διάγνωση [10].

Α.1.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία για την οστεοαρθρίτιδα . Προτείνονται λύσεις που παρέχουν άμεση ανακούφιση στον ασθενή, μείωση του πόνου ή της φλεγμονής με τη συνταγογράφηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs) και άθληση με σκοπό την ενδυνάμωση των μυών που περιβάλλουν την άρθρωση ώστε να παρέχουν καλύτερη στήριξη. Οι ενέσεις υαλουρονικού οξέος πιθανότατα να ανακούφιζαν ασθενή με προχωρημένη ΟΑ. Στην περίπτωση της σοβαρής και προχωρημένης ΟΑ γόνατος ή ισχύου υπάρχει η δυνατότητα αρθροπλαστικής. Στην ολική αρθροπλαστική αντικαθίσταται η κατεστραμμένη άρθρωση με εμφυτεύματα από κράματα ατσαλιού και τιτανίου και πλαστικού (πολυαιθυλένιο), τα οποία είναι πολύ ανθεκτικά και απολύτως συμβατά με τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι προθέσεις προσομοιάζουν στη φυσιολογική ανατομία της άρθρωσης και λειτουργούν σαν μία φυσιολογική άρθρωση.

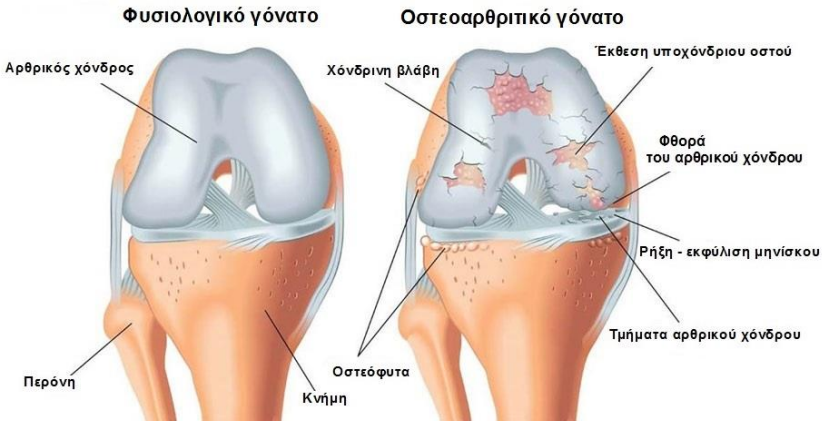


Εικόνα 1: Βήματα για την ανακούφιση διαφόρων σταδίων της οστεοαρθρίτιδας [24]

Α.1.5. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ

Δομή άρθρωσης γόνατος :

Αποτελεί τη μεγαλύτερη άρθρωση του ανθρώπινου σώματος και την πιο συχνά επηρεαζόμενη από ΟΑ. Τρία διαφορετικά οστά συναντώνται στην άρθρωση γόνατος, το μηριαίο οστό, η κνήμη και η επιγονατίδα. Ο αρθρικός χόνδρος καλύπτει την επιφάνεια μεταξύ των οστών. Η κύρια λειτουργία του αρθρικού χόνδρου είναι η απορρόφηση των κραδασμών, της μηχανικής πίεσης και η μείωση του συντελεστή τριβής, αφού δημιουργεί ένα «μαξιλάρι» στην επιφάνεια της άρθρωσης [25], [26].



Εικόνα 2: Σύγκριση φυσιολογικής άρθρωσης γόνατου με οστεοαρθριτική [27]

Δομή και Σύσταση αρθρικού χόνδρου:

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό, δεν αιματώνεται από αγγεία - με αποτέλεσμα να λαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά μέσω διάχυσης, δεν έρχεται σε επαφή με νεύρα και έχει μικρή ικανότητα επιδιόρθωσης και ανάπλασης [26].

Διαθέτει πυκνή εξωκυτταρική μήτρα – η οποία αποτελείται από πλήθος πρωτεϊνών αλλα κυρίως από κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, νερό και χονδροκύτταρα [26].

Τα χονδροκύτταρα προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και αποτελούν το 2% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου. Απαρτίζουν το 1 με 5 % του ιστού της άρθρωσης. Είναι υψηλά διαφοροποιημένα κύτταρα, μεταβολικά ενεργά, με μικρό αριθμό μιτοχονδρίων [28] .

Τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Έχουν σχετικά μικρή ικανότητα αναπαραγωγής και η επιβίωσή τους εξαρτάται σημαντικά από το χημικό και μηχανικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. το περιβάλλον είναι χαμηλό σε οξυγόνο Λόγω της μικρής ικανότητας αναπαραγωγής των χονδροκυττάρων συμπεραίνουμε πως οποιαδήποτε βλάβη προκληθεί στα χονδροκύτταρα είναι μη αναστρέψιμη [26].

Η εξωκυτταρική μήτρα της άρθρωσης (ECM) αποτελείται από χονδροκύτταρα, πρωτεογλυκάνες και ινώδεις πρωτεΐνες . Στις ινώδεις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται ίνες κολλαγόνου , ελαστίνης , φιμπρονεκτίνες και λαμινίνες . Το κολλαγόνο αποτελεί την πιο άφθονη ινώδη πρωτεΐνη της ECM. Επίσης, υπάρχει η χονδροϊτίνη η οποία αυξάνει την παραγωγή υαλουρονικού οξέος και εμποδίζει τη δράση των ενζύμων που προκαλούν διάσπαση και εκφυλισμό του χόνδρου. Ένα ακόμη βασικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας είναι το υαλουρονικό οξύ. Δημιουργεί ένα προστατευτικό κάλυμμα γύρω από κάθε χονδροκύτταρο συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανθεκτικότητα της άρθρωσης.

Η αγγρεκάνη και οι ίνες κολλαγόνου τύπου 2 αποτελούν τις πιο άφθονες πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας του αρθρικού χόνδρου . Συνδέονται μεταξύ τους μέσω πρωτεινών που προσδένουν το κολλαγόνο, όπως οι cartilage oligomeric matrix protein (COMP), chondroadherin και άλλες ίνες κολλαγόνου στην επιφάνειά τους . Η αγγρεκάνη είναι μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεογλυκάνη , που έχει τη δυνατότητα

να προσελκύει μόρια νερού , και συμβάλλει στην απορρόφηση της πίεσης που δέχεται η άρθρωση κατά την κίνηση. Σε συνδυασμό με το υαλουρονικό και την συνδετική πρωτείνη (LP) δημιουργεί σύμπλοκα τα οποία συμβάλλουν στην αντοχή της μηχανικής πίεσης και στην διατήρηση του νερού στην άρθρωση. Επίσης , περιέχουν πρωτεογλυκάνες με περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (SLRPs) –όπως οι decorin, biglycan, fibromodulin και lumican- οι οποίες βοηθούν στην διατήρηση της ακεραιότητας του ιστού και στη ρύθμιση του μεταβολισμού του [29].

Στην οστεοαρθριτική άρθρωση παρατηρείται μείωση της σύνθεσης και της περιεκτικότητας της εξωκυτταρικής μήτρας σε πρωτεογλυκάνες. Ένα μεγάλο ποσοστό δεν βρίσκεται σε μορφή συμπλόκου με το υαλουρονικό, αλλά βρίσκεται μη προσδεμένο.

Η σύνθεση του κολλαγόνου αυξάνει στα πρώτα στάδια της οστεοαρθρίτιδας και παραμένει αυξημένη.

Η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου αποδίδεται κυρίως σε ανισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης προ-φλεγμονωδών παραγόντων και παραγόντων μεσολαβητών του καταβολισμού (κυτοκίνες και χημοκίνες) , σε σχέση με την συγκέντρωση παραγόντων του αναβολισμού , όπως αυξητικοί παράγοντες. Αυτή η ανισορροπία ευνοεί την υπερπαραγωγή μεταλλοπρωτεινασών μήτρας –ένζυμα που αποικοδομούν την εξωκυτταρική μήτρα – και των αγγρεκανασών που διασπούν τον χόνδρο [30].

Οι ίνες κολλαγόνου τύπου ΙΙ τροποποιούνται και μετατρέπονται σε ίνες κολλαγόνου τύπου Ι, αλλάζοντας τη σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας συνεπώς και τις ιδιότητές της , άρα και την ικανότητά της να απορροφά τη μηχανική πίεση που υφίσταται η άρθρωση.

Ο εκφυλισμός της άρθρωσης που συνδέεται με την αύξηση της ηλικίας, καθώς και η μηχανική βλάβη, φαίνεται να πυροδοτούν το μονοπάτι της φλεγμονής. Η φλεγμονή αποτελεί έναν από τους κύριους παίκτες στην παθολογία της οστεοαρθρίτιδας [31], [32]. Η φλεγμονή ωθεί τα χονδροκύτταρα σε συμμετοχή σε καταβολικές δραστηριότητες , εντείνοντας έτσι την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας [33].
Ο ακριβής μηχανισμός έναρξης της φλεγμονής στην οστεοαρθρίτιδα δεν είναι γνωστός, όμως παράγοντες όπως η αυξημένη μηχανική πίεση και το οξειδωτικό στρες φαίνεται να τον πυροδοτούν. Τα χονδροκύτταρα της οστεοαρθριτικής άρθρωσης, εκκρίνουν IL-1, κασπάση 1, και υποδοχέα ισολευκίνης -1 τύπου 1 (IL-1RI). Η IL-1 συντίθεται από τα χονδροκύτταρα σε συγκεντρώσεις που είναι ικανές να επάγουν την έκφραση μεταλλοπρωτεασών (MMPs) και άλλων καταβολικών γονιδίων, και εντοπίζεται μαζί με TNF-α, MMP-1, MMP-3, MMP-8, και MMP-13, και επίτοπους που διαλύουν το κολλαγόνο τύπου II σε περιοχές όπου έχει διασπαστεί η εξωκυτταρική μήτρα στην οστεοαρθριτική άρθρωση. Η έκφραση των MMPs βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο στα φυσιολογικά χονδροκύτταρα, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην χαμηλού ρυθμού αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας [34].

Η IL-1 και ο TNF-α αυξάνουν τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E_2 (PGE_2) επάγοντας τη γονιδιακή έκφραση ή δραστηριοτήτων όπως COX-2, microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1), και της διαλυτής φωσφολιπάσης A2 (sPLA2),και επάγουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Οι IL-1β και TNF-α έχουν τη δυνατότητα να επάγουν την παραγωγή και άλλων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-6, IL-17, IL-18, καθώς και χημοκινών, συμπεριλαμβανομένης της IL-8. Πολλοί από τους παραπάνω παράγοντες δρουν συνεργατικά στην προώθηση καταβολικών διεργασιών στα χονδροκύτταρα [34].

Τόσο το μηχανικό στρες όσο και τα μόρια-μεσολαβητές που ελέγχουν τη φλεγμονώδη διαδικασία επάγουν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των NF-κB και MAPK, τα οποία ενεργοποιούνται μη φυσιολογικά στα οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα.

Το μονοπάτι του NF-κB αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστή της φλεγμονής που επάγεται από δράση κυτοκινών στα χονδροκύτταρα [34]. Το βασικό μονοπάτι του NF-κB πυροδοτείται από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNFα και η IL-1, επάγεται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 και εκφράζονται προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως επίσης και γονίδια απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση (cell survival genes) [35].

Η ενεργοποίηση του NF-κB μονοπατιού σηματοδότησης απαιτείται ώστε τα χονδροκύτταρα να εκφράσουν MMPs, NOS2, COX2, και IL-1. Συνεπώς τα μόρια αυτά που έχουν απελευθερωθεί στην ECM αναγνωρίζονται από υποδοχείς όπως οι ιντεγκρίνες και πυροδοτείται περισσότερα μονοπάτια φλεγμονής και περαιτέρω καταστροφή της άρθρωσης [34].

Μηχανικά και φλεγμονώδη ερεθίσματα ενεργοποιούν το μονοπάτι της (MAPK) κινάσης, μέσω ενεργοποίησης των ERK, c-Jun N-τελικών κινασών (JNK), και της κινάσης p38 στα χονδροκύτταρα. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών επάγει μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε καταβολικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες [34].

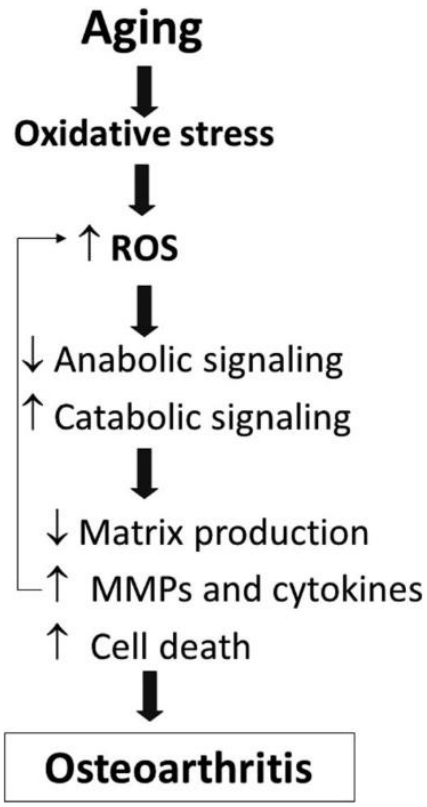
Το NO διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της OA. Τα οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα παράγουν NO. Έχει παρατηρηθεί πως υπερεκφράζεται και η επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, iNOS , με αποτέλεσμα να αυξάνεται ακόμη περισσότερο η συγκέντρωση του NO, να απελευθερώνονται ακόμη περισσότερες κυτοκίνες και να ενεργοποιούνται περισσότερο καταβολικές διαδικασίες. Το NO παρεμποδίζει τη σύνθεση κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών , ενεργοποιεί την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνασών, ελέγχει την απόπτωση των χονδροκυττάρων και επάγει τη φλεγμονή.

Έχει παρατηρηθεί η αυξημένη συσσώρευση γλυκοζυλιωμένων πρωτεινών και λιπιδίων στην οστεοαρθρίτιδα, γεγονός που καθιστά τα μόρια κολλαγόνου λιγότερο ελαστικά.

Κατά την εξέλιξη της νόσου, ο χόνδρος λεπταίνει, αποδομείται , όπως και όλα τα τμήματα που αποτελούν την άρθρωση, όπως το οστό, ο μηνίσκος και ο αρθρικός υμένας [15]. Όλη η μηχανική πίεση που ασκείται κατά την κίνηση επιβαρύνει τα οστά.

Α.2 Ελεύθερες ρίζες (ROS)

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα άτομα ή τα μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και είναι ικανές να υπάρχουν ανεξάρτητα. Η ύπαρξη των ασύζευκτων ηλεκτρονίων προσδίδει στις ελεύθερες ρίζες κοινές ιδιότητες. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες έχουν ασταθή φύση και προκειμένου να αποκτήσουν σταθερότητα αντιδρούν πολύ εύκολα, είτε «δωρίζουν» το ηλεκτρόνιό τους είτε λαμβάνουν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια . Επομένως μπορούν να έχουν είτε οξειδωτική είτε αναγωγική δράση [36]. Οι ελεύθερες ρίζες περιέχουν μόρια οξυγόνου όπως ρίζα OH- ,υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2), ανιόν υπεροξειδίου (O2 -), νιτρικό οξύ (NO) ,OCL -.Οι ελεύθερες ρίζες έχουν μικρή διάρκεια ζωής [37]. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί την πιο σημαντική ελεύθερη ρίζα που συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση. Έχει τη δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να διαχέεται , είναι λιγότερο δραστικό και έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από το $OH\bullet^-$ και τη $O_2^-\bullet$, γι ΄αυτούς τους λόγους αποτελεί καταλληλότερο σηματοδοτικό μόριο [38].



Εικόνα 3: Ο ρόλος της γήρανσης στην εξέλιξη της ΟΑ [79].

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται λόγω γήρανσης αυξάνει τη συγκέντρωση των ROS στα χονδροκύτταρα.

Αλλάζει η ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών σημάτων , μειώνεται η δημιουργία της εξωκυτταρικής μήτρας, ενώ αυξάνεται η έκφραση μεταλλοπρωτεινασών (MMPs) και προ-φλεγμονωδών κυτοκινών [62].

Κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών :

- Μιτοχόνδρια – Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κυρίως στα συστήματα I, III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας [39]. Ενδεικτικά ,ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο CoQ (σύστημα I), είτε κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στον τελικό αποδέκτη (O_2) ώστε να παραχθεί νερό (σύστημα IV) [40]. Εκτιμάται πως ποσοστό 2-3% του συνολικού O_2 που χρησιμοποιείται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων , ανάγεται ατελώς σε O_2^- , αντί σε νερό [37].

- NADPH οξειδάση – Η οξειδάση NADPH είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες και διαθέτει πολλές ισομορφές. Βρίσκεται στη μεμβράνη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυικών κυττάρων καθώς και των ινοβλαστών. Συμμετέχουν στην άμυνα έναντι των παθογόνων [41].

- Οξειδάση της ξανθίνης (XO) –Ένζυμο που καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και έπειτα την μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, το οποίο μπορεί να αποβληθεί από τα νεφρά [42].

Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν ως δεύτεροι διαβιβαστές , συμμετέχοντας στην μεταγωγή σήματος, σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και η απόπτωση [43]. Επίσης , αποτελούν βασικό συστατικό της άμυνας των κυττάρων του ανοσοποιητικού έναντι στην εισβολή βακτηρίων [37].

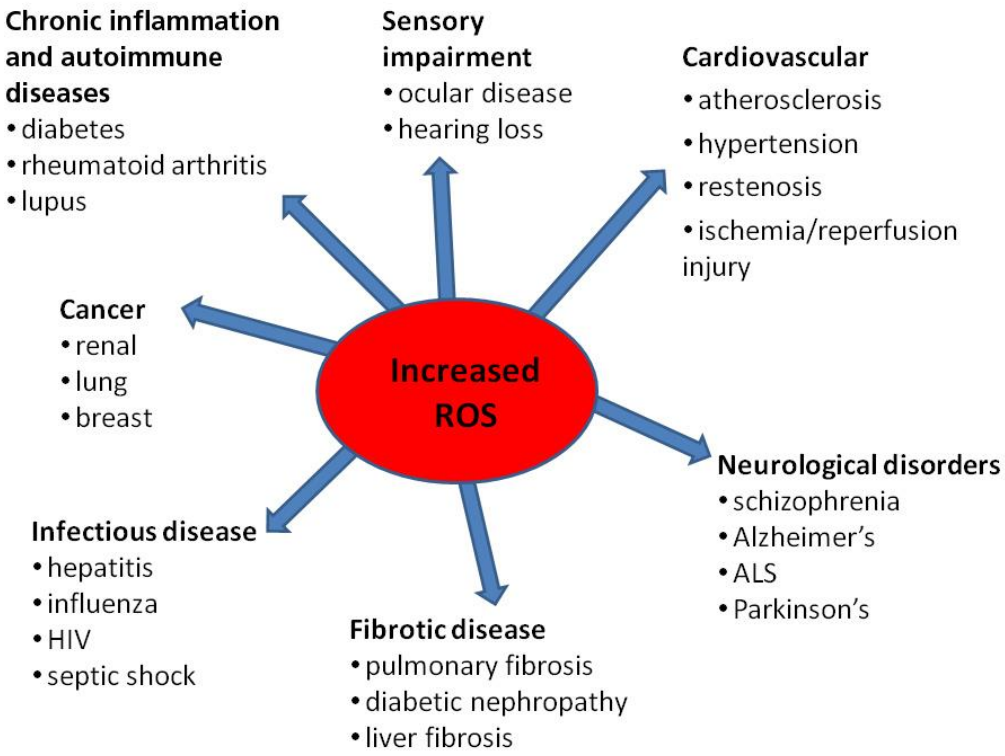
Το H_2O_2 δρα οξειδώνοντας πρωτεΐνες σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Στις πρωτεΐνες των οποίων η δράση μπορεί να τροποποιηθεί από το υπεροξείδιο του υδρογόνου συγκαταλέγονται οι μεταγραφικοί παράγοντες p53 (ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο), Jun (ογκογονίδιο), και η υπομονάδα p50 του NF-Kb (διαδραματίζει σημαντικό ρόλο μεταξύ άλλων στη φλεγμονή και στον καρκίνο).

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είτε καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα , όπως συμβαίνει στην περίπτωση των p53 και Jun, είτε την ενισχύουν (p50) [44] [45]. Επιπλέον , έχει αποδειχθεί εμπλοκή του στο μονοπάτι της ινσουλίνης. Απενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες , αυξάνοντας έτσι το ποσοστό των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και τροποποιεί τη δράση τους.

Η παραγωγή H_2O_2 ενεργοποιεί περαιτέρω την Akt (πρωτεϊνική κινάση B, PKB), η οποία διαδραματίζει ρόλο κλειδί σε διαδικασίες όπως η απόπτωση ,ο μεταβολισμός της γλυκόζης και η μεταγραφή άλλων γονιδίων [46].

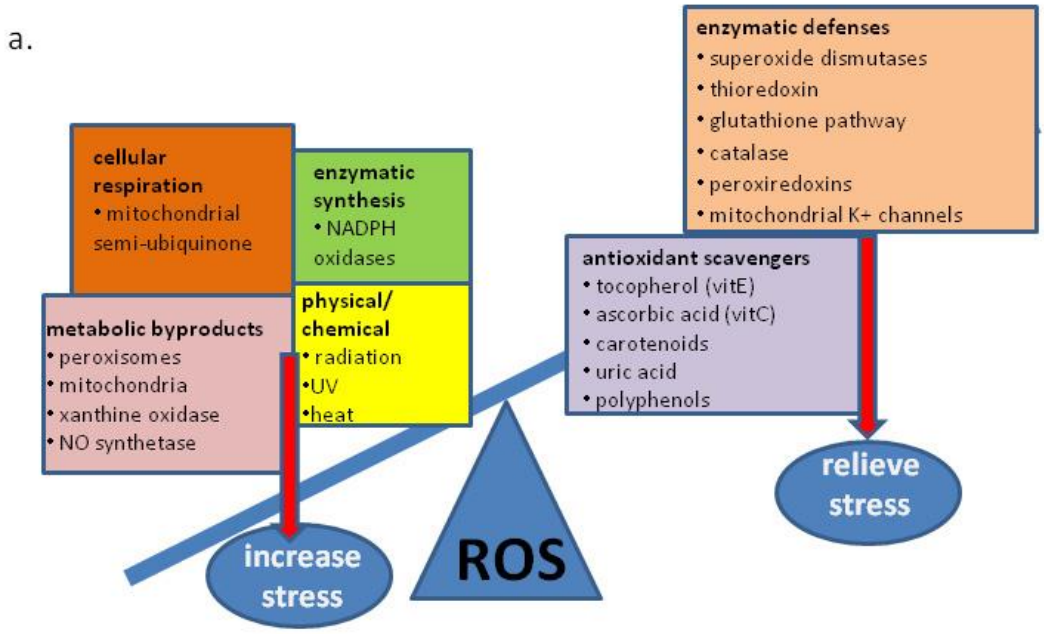
Α.2.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.

Το οξειδωτικό stress προκύπτει όταν η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών που υπάρχουν μέσα στο κύτταρο υπερβαίνει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τις εξουδετερώσουν. Σε φυσιολογικές συνθήκες διατηρείται μια ισορροπία ανάμεσα στις κυτταρικές συγκεντρώσεις ROS και αντιοξειδωτικών. Έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS είναι ικανή να προκαλέσει βλάβη σε DNA, RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Επηρεάζεται η έκφραση γονιδίων, δημιουργούνται αδιάλυτα συμπλέγματα πρωτεϊνών, που αποτελούν την αιτία πληθώρας ασθενειών [47]. Η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών σχετίζεται με την αυξημένη ηλικία και τον κυτταρικό θάνατο. Υψηλά επίπεδα ROS χαρακτηρίζουν πληθώρα ηλικιο-σχετιζόμενων ασθενειών, όπως το Alzheimer, το Parkinson και ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος [48], [49], [50], [51].



Εικόνα 4: Η επίδραση αυξημένου οξειδωτικού στρες σε πληθώρα ασθενειών [47].

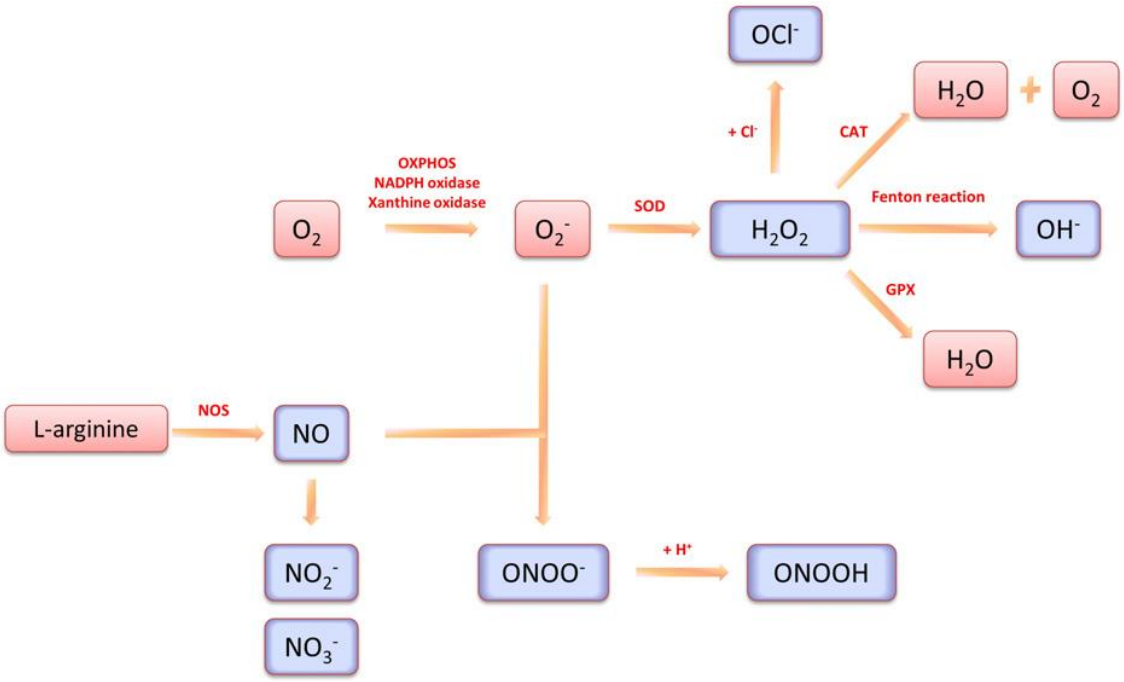
Οι οργανισμοί που χρησιμοποιούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, ώστε να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται και να αποφεύγουν τα βλαβερά αποτελέσματα. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα μπορεί να αποτελούνται είτε από ένζυμα, όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) καθώς και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Ενώ στα μη ενζυμικά συστήματα συγκαταλέγονται η βιταμίνες C, E και τα καροτενοειδή. Αντιδρούν αυτόματα με τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνουν.



Εικόνα 5: Ισορροπία παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικό στρες
είτε το εξουδετερώνουν [47].

Α.2.3. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ.

Ερευνάται επισταμένα ο ρόλος του στην παθολογία και την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

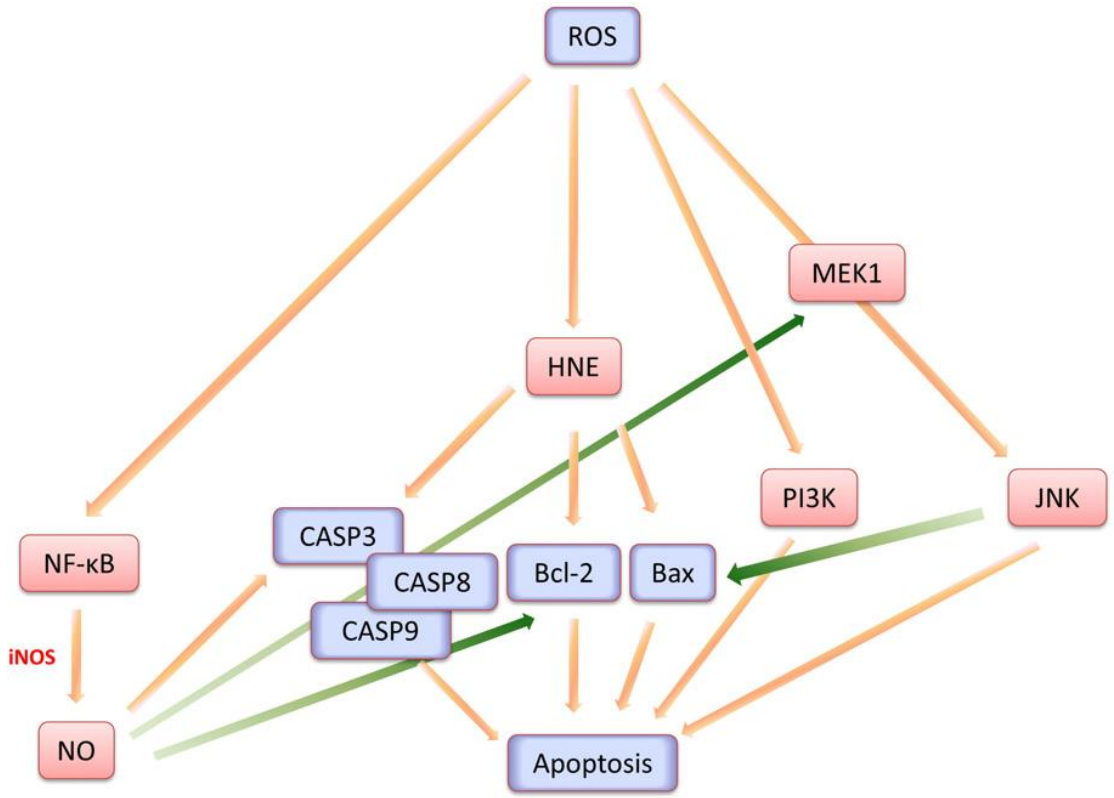


Εικόνα 6: Κυριότερες ελεύθερες ρίζες στην ΟΑ [37].

Χαμηλή συγκέντρωση ελευθέρων ριζών υπάρχει στα χονδροκύτταρα της άρθρωσης και συμβάλλει στον έλεγχο φυσιολογικών διεργασιών στο κύτταρο, όπως η απόπτωση, η σύνθεση εξωκυτταρικής μήτρας καθώς και η γενικότερη διατήρηση της ομοιόστασης .

Οι ελεύθερες ρίζες που είναι καλύτερα χαρακτηρισμένες στο χόνδρο είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το υπεροξείδιο (O^{2-}), καθώς και το μονοξείδιο του αζώτου [52], [53].

Τα ανιόντα του υπεροξειδίου παράγονται από την NADPH οξειδάση, ένζυμο που είναι ευθύνεται για την παραγωγή της μεγαλύτερης συγκέντρωσης δραστικών ριζών οξυγόνου στο αρθρικό υγρό [37].



Εικόνα 7: Σηματοδότηση ROS στην απόπτωση χονδροκυττάρων. [37]

Η ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB, οδηγεί στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, το οποίο με τη σειρά του επάγει την παραγωγή κασπάσης 3 .

Το HNE – προϊόν της λιπιδικής υπεροξείδωσης – ενεργοποιεί τις κασπάσες 3,8,9 , οδηγεί το Bax σε υπερέκφραση, ενώ καταστέλλει το μονοπάτι της κινάσης Akt, και υποεκφράζει το Bcl-2. Η Akt κινάση και το Bcl-2 εμποδίζουν την απόπτωση, οι κασπάσες την ευνοούν, επομένως αφού οι κασπάσες υπερεκφράζονται και τα άλλα μόρια υποεκφράζονται ευνοείται ο κυτταρικός θάνατος των χονδροκυττάρων [37].Είναι γεγονός πως στην οστεοαρθρίτιδα η συγκέντρωση των δραστικών ριζών οξυγόνου είναι αυξημένη σε σχέση με φυσιολογικό ιστό. Επομένως, ο οστεοαρθριτικός χόνδρος έχει υποστεί μεγαλύτερη βλάβη στο DNA από τον φυσιολογικό χόνδρο, και αυτή η βλάβη ελέγχεται από την ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Στα βιολογικά υγρά έχουν ανιχνευτεί προϊόντα λιπιδικής υπεροξείδωσης- όπως οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (ox-LDL), νιτροτυροσίνη- τα οποία συσχετίζουν την ύπαρξη των ROS με την διαδικασία αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου σε άτομα με OA και σε ζωικά μοντέλα OA [37]. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες

συμμετέχουν στην αποδόμηση της ECM, είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσα, προσβάλλοντας τα μόρια κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης και παρεμποδίζοντας τη δημιουργία ινών κολλαγόνου και έμμεσα, αυξάνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνασών. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί γονιδιωματική αστάθεια των τελομερών και δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων στον οστεοαρθριτικό χόνδρο, οδηγώντας σε γήρανση των χονδροκυττάρων και του αρθρικού χόνδρου [54].Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προάγουν την αποδιαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και τη γήρανση μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK [55].

Α.2.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα οργανίδια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, παράγουν ATP, απαραίτητο για την επιτέλεση πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών .

Υπολογίζεται ότι περίπου το 2 με 3 % του οξυγόνου που καταναλώνεται στην φυσιολογική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας αντί να καταλήξει σε νερό, ανάγεται σε O_2^- [37].

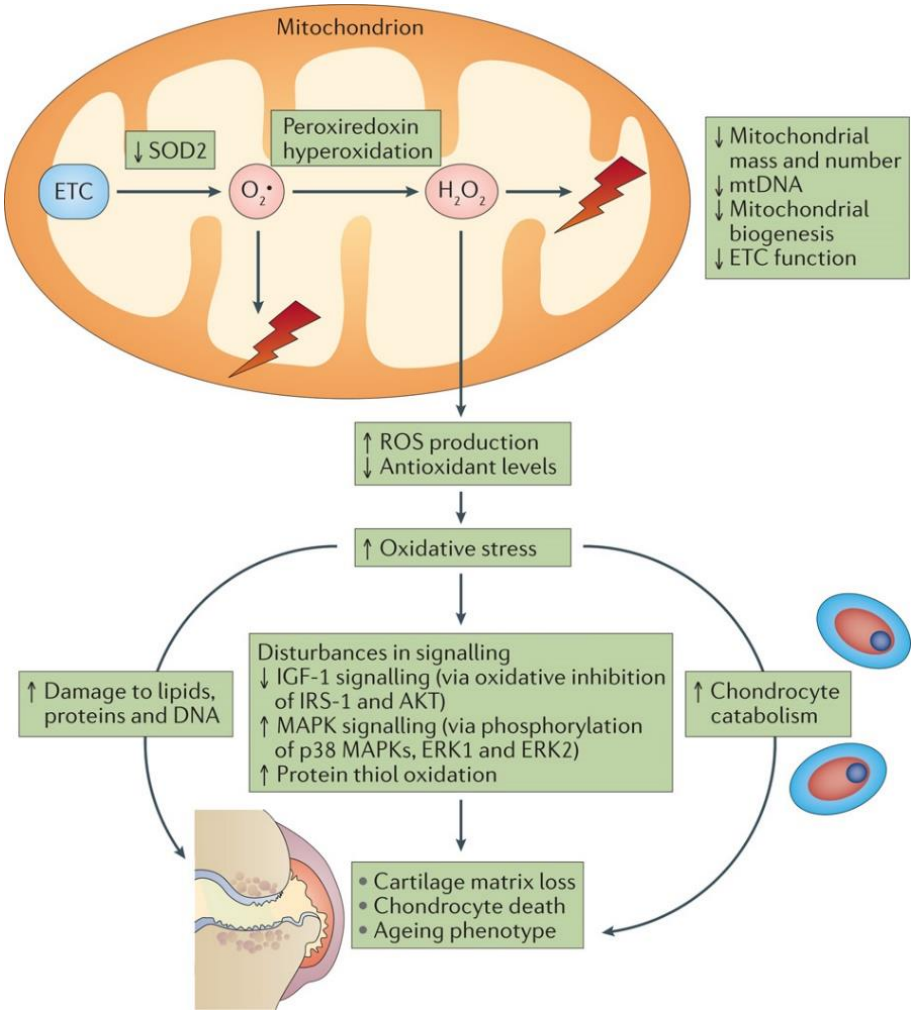
Αλλαγές στα μιτοχόνδρια παρατηρούνται καθώς τα κύτταρα γερνούν [56]. Πιο συγκεκριμένα , η θεωρία των ελεύθερων ριζών (free radicals theory), προτείνει πως η βλάβη που προκαλείται στο κύτταρο εξ΄αιτίας της ύπαρξης αυξημένης συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου, συμβάλλει στην επιτάχυνση εμφάνισης του γηρασμένου φαινότυπου. Δημιουργείται ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης, όπου οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται δημιουργούν βλάβες στις πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων είτε άμεσα, είτε μέσω πρόκλησης βλάβης στο μιτοχονδριακό DNA . Οι πρωτεΐνες είτε έχουν μειωμένη, ή καθόλου λειτουργικότητα. Η βλάβη που προκαλείται στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, προκαλεί τροποποίηση στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία παύει να λειτουργεί εύρυθμα. Οδηγείται λοιπόν το μιτοχόνδριο σε αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου [56].

Επιπρόσθετα, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων φαίνεται να επιταχύνει την πορεία των ηλικιο –σχετιζόμενων ασθενειών [57].

Τα μιτοχόνδρια των ασθενών με ΟΑ παρουσιάζουν διαφορές στη λειτουργία τους σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Η λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων

για την οποία είναι υπεύθυνα τα μιτοχόνδρια διαταράσσεται. Τα συστήματα ΙΙ και ΙΙΙ μειώνονται σημαντικά σε σχέση με τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων, ίσως γι ΄αυτό το λόγο να αυξάνεται η μιτοχονδριακή μάζα στους ασθενείς με ΟΑ. Φαίνεται να αποτελεί μια προσπάθεια του κυττάρου να αντισταθμίσει την ανεπάρκεια των συστημάτων ΙΙ και ΙΙΙ [58].

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου . Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του μιτοχονδρίου υπολειτουργούν, η δισμουτάση του υπεροξειδίου SOD2 υποεκφράζεται. Οδηγούμαστε λοιπόν σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, με μειωμένη ικανότητα αντιοξειδωτική του κυττάρου επομένως η βλάβη που προκαλείται από τις ROS είναι αυξημένη . Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης μειώνεται (Δψm), τα μιτοχόνδρια διογκώνονται και εκφράζουν προ- αποπτωτικά μόρια , όπως το κυτόχρωμα C και η κασπάση – 3 , μόριο που συμμετέχει ενεργά στην διαδικασία της απόπτωσης [59].
Στην οστεοαρθρίτιδα τα μιτοχόνδρια είναι δυσλειτουργικά και διαθέτουν μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη βιογένεση μιτοχονδρίων [60].Επιπλέον, η γήρανση συμβάλλει στην ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και την αδυναμία των αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυττάρου να τα εξουδετερώσουν .Η παραπάνω ανισορροπία συμβάλλει στην εξέλιξη της πάθησης .
Υπάρχει ένα μοντέλο το οποίο προτείνει πως η μείωση του μήκους των τελομερών συνδέεται με την ενεργοποίηση του p53 και την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η έκφραση των PGC-1α και PGC-1β καταστέλλεται. Τα μόρια αυτά αποτελούν ρυθμιστές –κλειδιά της βιογένεσης μιτοχονδρίων . Καταλήγουμε να υπάρχει ελλιπής παραγωγή ATP στα κύτταρα και η συγκέντρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου να είναι αυξημένη . Οι δυο αυτοί παράγοντες προκαλούν διαταραχές στη γονιδιακή έκφραση και κυτταρικό θάνατο [61].



Εικόνα 8: Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οξειδωτικό στρες και αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση στη γήρανση και την οστεοαρθρίτιδα [62].

Τα τελευταία χρόνια μελετώνται οι πολυμορφισμοί στο mtDNA και ερευνάται η συσχέτισή τους με την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΟΑ .

Από το 2003 ξεκίνησε το πρόγραμμα HapMap, με στόχο να καταγραφούν οι συχνότητες των αλληλομόρφων SNPs σε πληθυσμιακά δείγματα αναφοράς αντιπροσωπευτικά της ανθρώπινης ποικιλομορφίας (Καυκάσιοι/Ευρωπαίοι, Κινέζοι, Ιάπωνες, Αφρικανοί). Ως απλότυπος ορίζεται ο Μοναδικός συνδυασμός αλληλομόρφων που υπάρχει σε ένα χρωμόσωμα . Το 95% των Ευρωπαίων ανήκει σε μια από τις παρακάτω ομάδες απλότυπων (haplogroups), που αφορούν το μιτοχονδριακό DNA : H, I, J, K, T, U, V, W, ή X [63].

Άτομα τα οποία φέρουν τον απλότυπο J , διαθέτουν χαμηλότερο ρίσκο ανάπτυξης ΟΑ ισχύου και γόνατος συγκρινόμενοι με άλλους απλότυπους .

Σε άτομα με τον απλότυπο Η, βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση των μεταλλοπρωτεινασών MMP-3 και MMP-13 στον ορό, και μειωμένη συγκέντρωση της καταλάσης που εξουδετερώνει το $H_2O_2^-$ [53]. Ο απλότυπος Η είναι ο πιο συνηθισμένος κλάδος (clade) mtDNA στην Ευρώπη, με συχνότητα περίπου 41% .
Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η έρευνα διεξήχθη σε πληθυσμό της Ευρώπης και πιο συγκεκριμένα, της Ισπανίας [63].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η καταγραφή των πιθανών διαφορών στη μορφολογία των μιτοχονδρίων υπό κανονικές συνθήκες ανάμεσα σε χονδροκύτταρα ασθενών με ΟΑ και φυσιολογικών δοτών. Επιπλέον, επιχειρήσαμε να εκτιμήσουμε διαφορές στην αποκατάσταση των βλαβών που προκύπτουν στα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών και οστεοαρθριτικών κυττάρων έπειτα από την επίδραση οξέος εξωγενούς οξειδωτικού στρες.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.1 ΑΡΘΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ

Για την πραγματοποίηση των επιδράσεων με υπεροξείδιο του υδρογόνου, απομονώσαμε και καλλιεργήσαμε στο εργαστήριο χονδροκύτταρα. Τα δείγματά μας προήλθαν από την Ορθοπεδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων. Για την πρώτη ομάδα απομονώθηκαν χονδροκύτταρα από αρθρώσεις γόνατος ή ισχίου ασθενών με εκτεταμένη βλάβη, εξ ΄αιτίας της οστεοαρθρίτιδας.

Η δεύτερη ομάδα, η επονομαζόμενη ομάδα ελέγχου, αποτελείται από δείγματα ατόμων που δεν έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα. Ήταν ανάγκη να υποβληθούν σε ολική αρθροπλαστική εξαιτίας σοβαρού τραυματισμού, όπως κατάγματος ή ακρωτηριασμού. Στην ομάδα αυτή δεν επιλέχθηκαν άτομα που είχαν ιστορικό κάποιου είδους πάθησης των οστών.

Αποκλείστηκαν δείγματα ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα καθώς πριν την επέμβαση οι ακτινογραφίες των ασθενών αξιολογήθηκαν με βάση το σύστημα Kellgren – Lawrence. Στο σύστημα αυτό οι ακτινογραφίες βαθμολογούνται με μια κλίμακα από το 0 έως το 4.

Η αξιολόγηση μιας ακτινογραφίας με μηδέν μας δείχνει πως το άτομο δεν πάσχει από οστεοαρθρίτιδα, ενώ η αξιολόγηση από 1 έως 4 καταδεικνύει αυξανόμενη σοβαρότητα .

Β.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χόνδρου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Dulbeco' s modified Eagle' s Medium / Ham's F-12 (DMEM / F-12, Gibco BRL, UK). Το θρεπτικό εμπλουτιζόταν με την προσθήκη ορού προερχόμενου από έμβρυο βοός (Fetal Bovine Serum), καθώς και με την προσθήκη μείγματος δύο αντιβιοτικών, της πενικιλίνης και της στρεπτομυκίνης.

Το Fetal Bovine Serum προστίθονταν σε ποσοστό 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM / F-12, ενώ τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστίθονταν σε ποσοστό 1%.

Τα αντιβιοτικά είναι απαραίτητα για να διασφαλίσουν πως δεν θα υπάρχουν επιμολύνσεις μέσα στη φλάσκα. Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) προστίθεται διότι διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην ανάπτυξη των κυττάρων στην καλλιέργεια.

Το θρεπτικό μετά την προσθήκη του ορού και των αντιβιοτικών διατηρείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4° C.

Για τις εκπλύσεις των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε Phosphate Buffer Solution (PBS , Gibco) που δεν περιείχε χλωρίδια του μαγνησίου ($MgCl_2$) και χλωρίδια του ασβεστίου ($CaCl_2$) , διότι το μαγνήσιο και το ασβέστιο διευκολύνουν την κυτταρική πρόσδεση και τη δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων. Το PBS διατηρεί το pH στα επιθυμητά επίπεδα για τα κύτταρα.

Για την αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με σκοπό είτε την ανακαλλιέργειά τους είτε την περαιτέρω επεξεργασία τους, προσθέταμε θρυψίνη. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, μια πρωτεάση σερίνης, και συμβάλλει στην αποκόλληση της στοιβάδας των κυττάρων. Προτού τη χρησιμοποιήσουμε την επωάζαμε στο υδατόλουτρο ώστε η θερμοκρασία της από 4° C που ήταν καθώς φυλάσσεται στο ψυγείο, να ανέβει στους 37° C που είναι θερμοκρασία ταυτόσημη με αυτή των κυττάρων .

Β.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

Τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο της εταιρείας Heraus Instrumanets .Οι συνθήκες επώασης διατηρούνταν σταθερές, με 37° C θερμοκρασία να επικρατεί και σταθερή συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα στο 5%. Ο επωαστικός κλίβανος βρισκόταν σε αίθουσα στείρα εκτός του εργαστηρίου και οι χειρισμοί μας γίνονταν σε συσκευή κάθετης νηματικής ροής, με εξαιρετική προσοχή, ώστε να μην υπάρξουν επιμολύνσεις στην καλλιέργειά μας .

Β.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αμέσως μετά την παραλαβή του δείγματος από το χειρουργείο εκπλέναμε τον ιστό με το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer (PBS w/o Ca2+ , Mg 2+ HyClone), ώστε να καθαριστεί και να διατηρηθεί σταθερό το pH του.

Ακολουθούσε τεμαχισμός του ιστού με αποστειρωμένο νυστέρι και μεταφορά των τεμαχίων ιστού χόνδρου σε τρυβλίο petri χωρητικότητας 2 ml παρουσία θρεπτικού υλικού- DMEM / F-12, Gibco εμπλουτισμένο με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και με ορό βοός. Αμέσως μετά ακολουθούσε προσθήκη προνάσης (Pronase,Roche) 5mg/ml σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο στους 37 ^{o}C, με συγκέντρωση CO_2 5% για 30 λεπτά. Αφαιρούσαμε το υπερκείμενο με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur μιας χρήσης.

Έπειτα, προσθέταμε κολλαγενάση (Collagenase P , Roche) 5mg/ml σε 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και επώαση στον κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C, με συγκέντρωση CO_2 5% για περίοδο 24 ωρών . Η προνάση και έπειτα η κολλαγενάση, χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες με σκοπό την διάσπαση του ιστού.

Μετά το πέρας 24 ωρών :

Ακολουθούσε μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon των 15 ml, φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, απόρριψη υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος σε 2 ml θρεπτικού υλικού και επανάληψη της διαδικασίας 2 φορές ακόμη.

Τέλος, το κυτταρικό ίζημα των μεταφερόταν σε φλάσκα των 25 cm^3 μαζί με 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επωαζόταν στον κλίβανο στις καθορισμένες βέλτιστες συνθήκες (37oC , 5% CO2).

Όταν τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας -η πυκνότητα των κυττάρων στη φλάσκα αγγίξει το 80% - τα ανακαλλιεργούμε , διαιρώντας το περιεχόμενο της μιας φλάσκας σε 2 νέες φλάσκες 25T.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτείται η αποκόλλησή τους. Αρχικά αφαιρούμε το καλλιεργητικό υλικό από τη φλάσκα , εκπλένουμε (δύο φορές) με 5ml PBS και κατόπιν προσθέτουμε 1-1,5ml θρυψίνη και επωάζουμε το δείγμα μας στους 37° βαθμούς στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά, με σκοπό να αποκολληθούν τα κύτταρα από τη φλάσκα. Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα αποκολλήθηκαν. Σε περίπτωση που δεν έχουν αποκολληθεί χρησιμοποιούμε scrapper. Στην συνέχεια με σκοπό τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης προσθέτουμε 5ml θρεπτικού υλικού. Μεταφέρουμε σε falcon 15ml το περιεχόμενο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο κυτταρικό ίζημα 5ml PBS, ώστε να επιτευχθεί η επαναδιάλυσή του. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα ξανά στις 1800 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου . Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο κυτταρικό ίζημα 4ml θρεπτικού υλικού . Ύστερα , μεταφέρουμε από 2 ml του θρεπτικού υλικού όπου έχουν επαναδιαλυθεί τα χονδροκύτταρα σε κάθε μια από τις νέες φλάσκες . Προσθέτουμε 3 ml ακόμη θρεπτικού υλικού σε κάθε φλάσκα και κατόπιν επωάζουμε τις δύο φλάσκες στον κλίβανο (5% συγκέντρωση CO_2 , 37° C) .

Τα χονδροκύτταρα της καλλιέργειας υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία ώστε να είναι κατάλληλα για επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου και χρώση μιτοχονδρίων με το kit MitoTracker της Invitrogen .

Β.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2)- ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.

Μετά την πρώτη καλλιέργεια των χονδροκυττάρων, ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων . Αυτή τη φορά όμως καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε φλάσκες έξι οπών (six-well plates), όπου πραγματοποιήθηκαν και οι επιδράσεις με το υπεροξείδιο του υδρογόνου .

Τα κύτταρα που περιέχονταν σε κάθε φλάσκα, κατανεμήθηκαν σε 4 οπές μιας φλάσκας έξι οπών. Σε κάθε οπή υπήρχε προσαρτημένη μια καλυπτρίδα ώστε να αναπτυχθούν τα χονδροκύτταρα πάνω σε αυτή και αργότερα, μετά την επίδραση με H_2O_2 να μπορέσουμε να την αφαιρέσουμε από τη φλάσκα έξι οπών και να παρατηρήσουμε τα μιτοχόνδρια σε μικροσκόπιο φθορισμού. Επωάσαμε τις φλάσκες έξι οπών στον κλίβανο επώασης τηρώντας τις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως και στην καλλιέργεια χονδροκυττάρων σε φλάσκες .

Ξεκινήσαμε να επιδρούμε με H_2O_2, όταν παρατηρώντας τα κύτταρα στις οπές των φλασκών, διαπιστώσαμε πως είχαν καλύψει το 70% της επιφάνειάς τους . Η επίδραση με το H_2O_2 τελικής συγκέντρωσης 200μΜ σε θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε FBS έγινε 1 ώρα. Σε κάθε οπή διέφερε ο χρόνος που δίναμε στα κύτταρα να ανακάμψουν, έπειτα από την επίδραση με H_2O_2. Τα κύτταρα που βρίσκονταν στη δεύτερη οπή τα αφήναμε να ανακάμψουν για 1 ώρα, τα κύτταρα στην Τρίτη οπή για 6 ώρες, ενώ τα κύτταρα στην τέταρτη οπή τα αφήναμε να ανακάμψουν για διάστημα 24 ωρών.

Αρχικά αφαιρούμε το υπάρχον θρεπτικό με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur από τις οπές των φλασκών. Εκπλένουμε με 2 ml PBS. Ακολούθως προσθέτουμε στις οπές 2ml θρεπτικό που περιέχει το H_2O_2 και το αφήνουμε να επιδράσει για 1 ώρα. Αφαιρούμε το θρεπτικό με το H_2O_2, εκπλένουμε ξανά με 2 ml PBS και προσθέτουμε νέο θρεπτικό υλικό . Μεταφέρουμε τις φλάσκες στον κλίβανο επώασης όπου αφήνουμε τα κύτταρα να ανακάμψουν ανάλογα με τους χρόνους ανάκαμψης που είχαμε θέσει. Όταν παρέλθει ο χρόνος ανάκαμψης που έχει οριστεί για κάθε οπή, τότε αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες και ακολουθούμε το πρωτόκολλο για τη χρώση μιτοχονδρίων.

Β.6 ΧΡΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Για τη χρώση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήσαμε το kit MitoTracker Red CMXRos, μια κόκκινη φθορίζουσα χρωστική η οποία βάφει τα μιτοχόνδρια σε ζωντανά κύτταρα και η πρόσδεσή της εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων απαιτείται η χρήση παραφορμαλδεύδης.

Για να μετατρέψουμε το stock solution σε working solution, το διαλύαμε με DMSO, ώστε η συγκέντρωσή του να είναι 1mM. Όμως το working solution για να το χρησιμοποιήσουμε στις καλυπτρίδες με τα χονδροκύτταρα, επιλέξαμε να το μετατρέψουμε σε 50mM, προσθέτοντας σκέτο θρεπτικό .

Από τις φλάσκες έξι οπών, αφαιρούσαμε το θρεπτικό υλικό, εκπλέναμε προσθέτοντας 2 ml PBS. Ακολουθούσε προσθήκη του σκέτου θρεπτικού υλικού με τους φθορίζοντες probes στη φλάσκα και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37° C στον επωαστικό κλίβανο.

Αφαιρούσαμε το θρεπτικό με τους probes και ξεπλέναμε με σκέτο θρεπτικό DMEM. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήσαμε DAPI (Thermo Fischer Scientific), που προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Για τη μονιμοποίηση του παρασκευάσματος χρησιμοποιούσαμε παραφορμαλδεύδη 3,7% σε πλήρες θρεπτικό για 15 λεπτά. Εκπλέναμε με σκέτο DMEM και αφού τυλίγαμε τα six-well plates με αλουμινόχαρτο ,λόγω του ότι οι probes είναι φωτοευαίσθητοι ,αποθηκεύαμε τα παρασκευάσματα στους -80° C .

Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε στο μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS Axio Imager Z.2 fluorescent microscope.

Σε κάθε δείγμα, control ή OA, αντιστοιχούσαν 4 καλυπτρίδες, τη no treat, όπου δεν είχαμε επιδράσει με υπεροξείδιο του υδρογόνου, και τις 3 καλυπτρίδες όπου τα κύτταρα παρατηρήθηκαν έπειτα από ανάκαμψη 1 ώρας, 6 και 24 ωρών .

Για κάθε μια καλυπτρίδα μετρήσαμε τουλάχιστον 5 πεδία, τυχαία επιλεγμένα, και 200 κύτταρα, χωρίς να γνωρίζουμε αν το παρασκεύασμα ανήκει σε ασθενή με OA ή σε control .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τη χρώση των μιτοχονδρίων ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα μιτοχόνδρια σχηματίζουν δυναμικά δίκτυα μέσα στο κύτταρο και συχνά αλλάζουν σχήμα και υποκυτταρική κατανομή . [64] Η μορφολογία τους μπορεί να διαφέρει ανάλογα τον κυτταρικό τύπο, τη φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου, το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. [65].

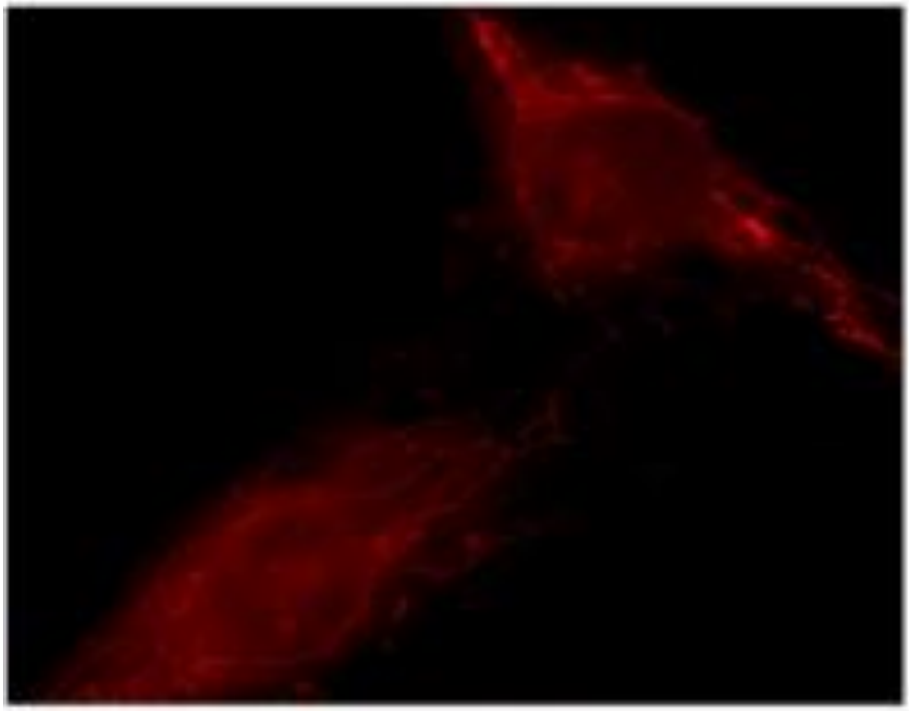
Χωρίσαμε τα μιτοχόνδρια σε 2 κατηγορίες ανάλογα με τη μορφολογία τους. Ως φυσιολογικές θεωρήσαμε τις ακόλουθες μορφές :

- στίγματα (puncta)
- ράβδοι (rods)
- δικτυωμένα (networks)
- ενώ αυτά που ήταν διογκωμένα θεωρήθηκαν παθολογικά (large and round – swollen)

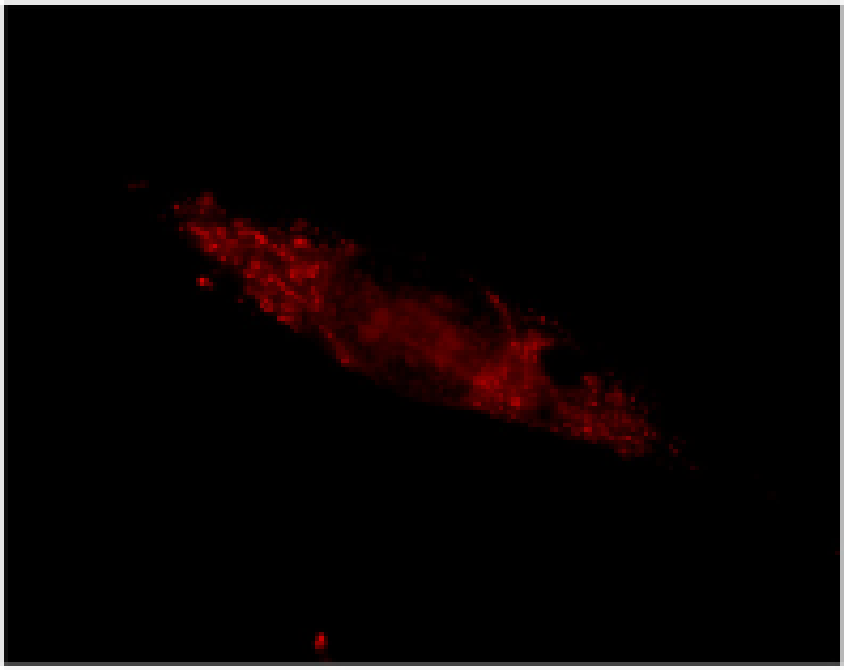
Εικόνα 8 : Μορφολογίες μιτοχονδρίων [66]

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως οι παραπάνω μορφολογίες παρατηρούνται σε όλα τα κύτταρα. Το ποσοστό στο οποίο απαντάται κάθε μορφή διαφοροποιείται ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου. Η τροποποίηση των μορφών των μιτοχονδρίων ελέγχεται από τα φαινόμενα της σχάσης και της σύντηξης. Σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια τα επίπεδα της σχάσης και της σύντηξης μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων [64].
Τα ίδια φαινόμενα καθορίζουν και λειτουργικά τα μιτοχόνδρια καθώς έχει δειχθεί ότι κύτταρα με το μεγαλύτερο ποσοστό των μιτοχονδρίων τους κατακερματισμένα δηλαδή με υψηλά ποσοστά «πολλά ή πολύ μεγάλα puncta» παράγουν λιγότερο ATP και θεωρούνται παθολογικές καταστάσεις [64].

Κατάτμηση του μιτοχονδριακού δικτύου και ο σχηματισμός στρογγυλών (round) μιτοχονδρίων συμβαίνει κατά την επίδραση με τοξίνες που προσβάλλουν τα μιτοχόνδρια [64].
Έτσι τα κύτταρα τα οποία είχαν πολύ υψηλά ποσοστά puncta ή/και αυτά που είχαν διογκωμένα μιτοχόνδρια θεωρήθηκαν μη φυσιολογικά.



Εικόνα 9: Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων. Εικόνα από το μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 10: Μη-φυσιολογική μορφολογία (κατακερματισμένα) μιτοχόνδρια. Εικόνα από το μικροσκόπιο φθορισμού.

Είχαμε στη διάθεσή μας 4 δείγματα, δύο από άτομα χωρίς οστεοαρθρίτιδα ή κάποια άλλη αλλοίωση του χόνδρου. Τα δύο είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική εξαιτίας τραυματισμού. Τα άλλα 2 δείγματα προέρχονταν από ασθενείς με ΟΑ που σε ακτινολογική αξιολόγηση πριν το χειρουργείο βαθμολογήθηκαν σύμφωνα με το σύστημα Kellgren –Lawrence με βαθμό ≥ 2 [21]. Η ηλικία των ατόμων που συμφώνησαν να συμβάλλουν στην έρευνα ξεπερνούσε τα 45 έτη.

Τα δείγματα αυτά προήλθαν από την Ορθοπεδική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας .

Σκοπός μας ήταν να παρατηρήσουμε τυχόν μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια οστεοαρθριτικών κυττάρων συγκριτικά με τα κύτταρα των φυσιολογικών δοτών (control), και να καταγράψουμε τα ποσοστά των διαφορετικών μορφολογιών των μιτοχονδρίων τους. Ακόμη προκειμένου να εκτιμήσουμε την ικανότητα απόκρισης των ΟΑ και control χονδροκυττάρων στο εξωγενές οξειδωτικό στρες επιδράσαμε στα κύτταρα με H_2O_2 και επαναλάβαμε την παραπάνω ανάλυση της μορφολογίας των μιτοχονδρίων τους.

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα ποσοστά φυσιολογικών και διογκωμένων/fragmented μιτοχονδρίων για κάθε δείγμα μου μελετήσαμε.

Πίνακας 1

Δείγμα 1 **Normal αρθρικός χόνδρος**	**Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων**	**Διογκωμένα / Fragmented**
No treat	98 %	2 %
1 h ανάκαμψη	7 %	93%
6 h ανάκαμψη	21%	79%
24 h ανάκαμψη	36%	64%

Πίνακας 2

Δείγμα 2 Normal Αρθρικός χόνδρος	Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων	Διογκωμένα / Fragmented
No treat	97%	3%
1 h ανάκαμψη	2 %	98%
6 h ανάκαμψη	15%	85%
24 h ανάκαμψη	34%	66%

Πίνακας 3

Δείγμα 3 OA	Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων	Διογκωμένα / Fragmented
No treat	59 %	41%
1 h ανάκαμψη	46,7%	53,3%
6 h ανάκαμψη	26%	74%
24 h ανάκαμψη	19 %	81%

Πίνακας 4

Δείγμα 4 OA	Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων	Διογκωμένα / Fragmented
No treat	62%	38%
1 h ανάκαμψη	48,5%	51,5%
6 h ανάκαμψη	22%	78%
24 h ανάκαμψη	24%	76%

Πίνακας 5

Μέσος όρος φυσιολογικών δειγμάτων	Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων	Διογκωμένα / Fragmented
No treat	97,5%	2,5%
1 h ανάκαμψη	4,5%	95,5%
6 h ανάκαμψη	18%	82%
24 h ανάκαμψη	35%	65%

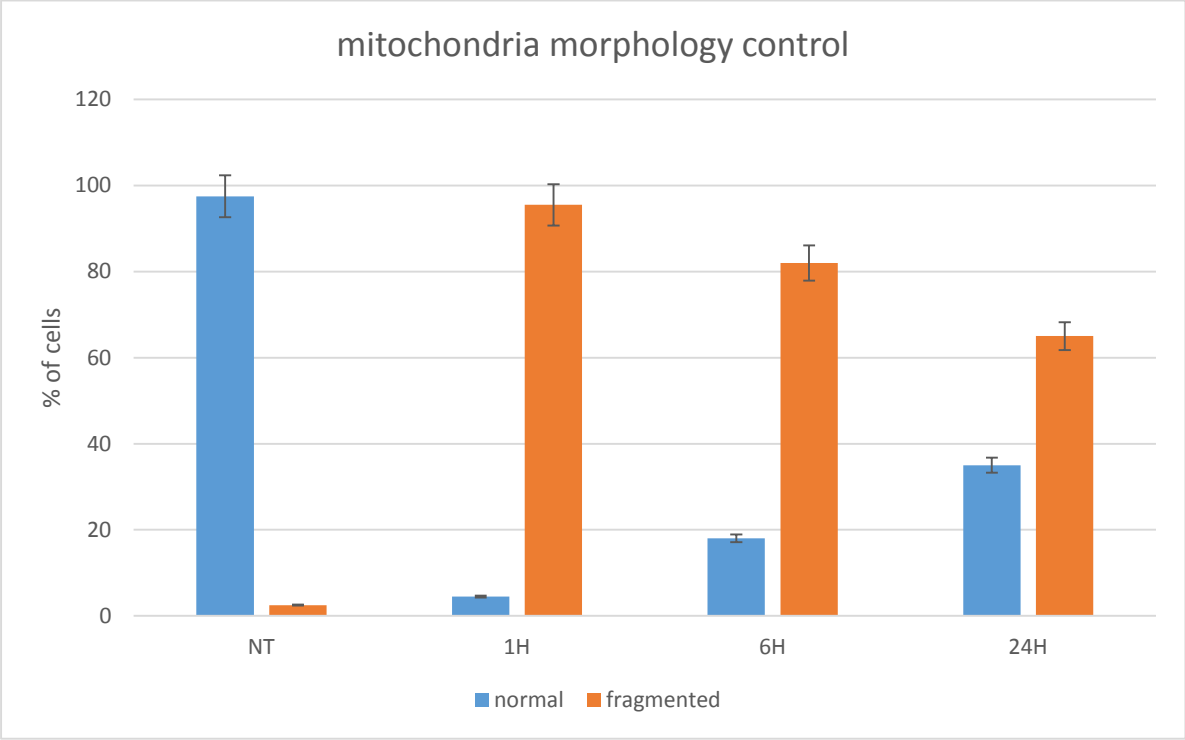
Πίνακας 6

Μέσος όρος ΟΑ δειγμάτων

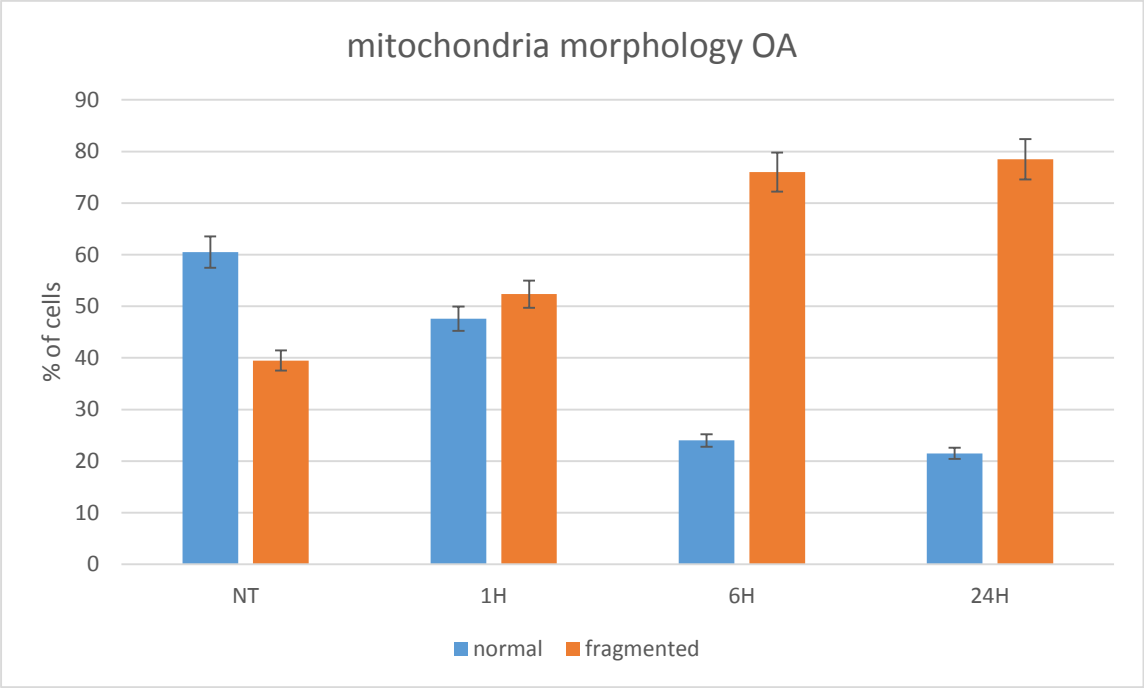
	Φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων	Διογκωμένα / Fragmented
No treat	60,5%	39,5%
1 h ανάκαμψη	47,6%	52,4%
6 h ανάκαμψη	24%	76%
24 h ανάκαμψη	21,5%	78,5%

Τα no treat δείγματα control (δείγμα 1 και 2) παρουσίαζαν φυσιολογική εικόνα μιτοχονδρίων κατά πλειοψηφία. Μετά την επίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου αυξάνονται σημαντικά τα ποσοστά των κυττάρων με μιτοχόνδρια με μη φυσιολογική μορφολογία (95.5%). Τα κύτταρα control με τη φυσιολογική μιτοχονδριακή μορφολογία ξεκίνησαν να αυξάνονται 24 ώρες έπειτα από την επίδραση με το οξειδωτικό στρες (35%). Η ίδια φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων υπήρχε όμως σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό (21.5%) στα ΟΑ κύτταρα την ίδια χρονική στιγμή.

Αντίθετα, τα μιτοχόνδρια των περίπου 39.5% των οστεοαρθριτικών χονδροκυττάρων στα no –treat δείγματα (3 και 4) φαίνεται να έχουν ήδη μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια .Έπειτα από την επίδραση με οξειδωτικό στρες εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά κυττάρων με μη φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων ενώ μετά την πάροδο 24h υψηλό ποσοστό εμφανίζει το διογκωμένο / fragmented φαινότυπο .



Διάγραμμα 1: Ποσοστό φυσιολογικών και μη φυσιολογικών (διογκωμένων/κατακερματισμένων) μιτοχονδρίων υπό κανονικές συνθήκες και έπειτα από την επίδραση με οξειδωτικό στρες σε χονδροκύτταρα δοτών χωρίς οστεοαρθρίτιδα.



Διάγραμμα 2: Ποσοστό φυσιολογικών και μη φυσιολογικών (διογκωμένων/κατακερματισμένων) μιτοχονδρίων υπό κανονικές συνθήκες και έπειτα από την επίδραση με οξειδωτικό στρες σε χονδροκύτταρα ασθενών με οστεοαρθρίτιδα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παθολογία της ΟΑ. Αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), μόρια που εμπλέκονται πολύ σε μηχανισμούς της ασθένειας. Τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια, όπως είχε καταγραφεί σε προηγούμενες έρευνες άλλων ερευνητικών ομάδων, έχουν συγκεκριμένη μορφολογία . Μπορούν να οργανωθούν είτε σε στίγματα, είτε σε ράβδους, είτε σε δίκτυα. Γνωρίζουμε πως τα υποκυτταρικά αυτά οργανίδια είναι δυναμικές δομές, το μέγεθος, το σχήμα και ο αριθμός τους καθορίζονται από διαδικασία διαρκών σχάσεων και συντήξεων. Η διαίρεση των μιτοχονδρίων είναι υψίστης σημασίας για τη διατήρηση του αριθμού τους στα κύτταρα καθώς αυτά αναπτύσσονται, καθώς και στον περιορισμό των μιτοχονδρίων με βλάβη μέσω της διαδικασίας της μιτοφαγίας. Η μιτοφαγία είναι η διαδικασία κατά την οποία απομακρύνονται τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια μέσω αυτοφαγίας.

Η σύντηξη των μιτοχονδρίων συμβαίνει ώστε να αναμειχθεί το περιεχόμενο των μιτοχονδρίων και να διατηρηθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα σε όλα τα μιτοχόνδρια [67]. Όταν η ισορροπία μεταξύ σχάσης και σύντηξης διαταράσσεται , τροποποιείται και η μορφολογία τους και η λειτουργία τους [68]. Σε αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει βρεθεί πως η μιτοχονδριακή σχάση αυξάνεται, το δίκτυο των μιτοχονδρίων κατατέμνεται. Η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη και τελικά το κύτταρο οδηγείται στην απόπτωση [69]. Πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως η γήρανση, ο καρκίνος, οι μεταβολικές διαταραχές έχουν συσχετιστεί με τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ σχάσης και σύντηξης.

Στην μελέτη αυτή αναδείξαμε ότι τα μιτοχόνδρια που βρίσκονται σε οστεοαρθριτικά χονδροκύτταρα έχουν μη φυσιολογική μορφολογία και εμφανίζονται ως διογκωμένα/fragmented. Σε αυτή την κατάσταση θεωρούμε ότι συμβάλλει το αντίξοο για τα κύτταρα περιβάλλον της άρθρωσης, που είναι περιβάλλον υψηλού οξειδωτικού φορτίου. Επιπλέον τα ΟΑ χονδροκύτταρα αδυνατούν να αποκαταστήσουν τις επιπλέον βλάβες που προκύπτουν στα μιτοχόνδριά τους έπειτα από την επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού στρες.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων είναι πολύ πιθανό να σχετίζονται με τη μεταβολική ενεργότητα του οργανιδίου. Τα μιτοχόνδρια που βρίσκονται σε δίκτυα, σύμφωνα με έρευνες χαρακτηρίζουν τα κύτταρα που είναι μεταβολικά ενεργά. Τα μιτοχόνδρια με το κατατμημένο δίκτυο και τον διογκωμένο φαινότυπο βρίσκονται συνήθως σε κύτταρα με διαταραγμένη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας ή κύτταρα που έχουν εισέλθει στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου και δεν πρόκειται να διαιρεθούν ξανά [70]. Δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος, όπου οι ήδη υπάρχουσες ελεύθερες ρίζες δεν μπορούν να εξουδετερωθούν και οι περαιτέρω βλάβες προκαλούνται στα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στην παραγωγή επιπλέον ελεύθερων ριζών [71].

Τόσο το ενδογενές, όσο και το εξωγενές κυτταρικό στρες που προκύπτει από την ύπαρξη ελεύθερων ριζών, κάνει τα μιτοχόνδρια λιγότερο αποτελεσματικά, υποβαθμίζεται η λειτουργία τους και η ικανότητά τους να επιδιορθώνουν τις βλάβες τους [71]. Η συσσώρευση βλαβών οδηγεί στην απόπτωση, γεγονός που συμβάλλει στον εκφυλισμό του χόνδρου, άρα η πάθηση χειροτερεύει [72].

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια πολυπαραγοντική πάθηση, με πολλά βιοχημικά μονοπάτια να εμπλέκονται στην παθολογία της. Οι ερευνητές προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν την ήδη υπάρχουσα γνώση των μοριακών μηχανισμών της ώστε να οδηγηθούν σε αποτελεσματική θεραπεία. Η ανάδειξη του δυσλειτουργικού φαινότυπου των μιτοχονδρίων των ΟΑ χονδροκυττάρων, μέσω της παρούσας μελέτης, ως κεντρικό αιτιοπαθολογικό παράγοντα που επιβαρύνει ήδη αυξημένο οξειδωτικό φορτίο των ΟΑ κυττάρων, θα μπορούσε μελλοντικά να συμβάλλει στην ανάδειξη νέων θεραπευτικών μέσων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] D. Pereira, E. Ramos και J. Branco, «Osteoarthritis,» *Acta Med Port,* αρ. 28, pp. 99-106, 2015.

[2] M. Cross, E. Smith , D. Hoy και . a. et, «The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study,» *Ann Rheum Dis.,* αρ. 73, pp. 1323-1330, 2014.

[3] J. Leigh , W. Seavey και . B. Leistikow, «Estimating the costs of job related arthritis,» *The Journal of rheumatology,* p. 1647–54, 2001.

[4] . D. Felson, . Y. Zhang, . J. Anthony, . A. Naimark και , Ander, «Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study,» *Ann Intern Med. ,* p. 535–9, 1992.

[5] C. Yongjoo Park, «Vitamin D in the Prevention and Treatment of Osteoarthritis: From Clinical Interventions to Cellular Evidence,» *Nutrients. ,* τόμ. 2, αρ. 11, p. 243, 2019.

[6] D. Pereira, E. Ramos και J. Branco, «Osteoarthritis,» *Acta medica portuguesa,* τόμ. 28, pp. 99-106, 2014.

[7] . L. Lohmander, . A. Ostenberg, . M. Englund και . H. Roos, «High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury,» *Arthritis Rheum,* τόμ. 10, αρ. 50, p. 3145–52, 2004.

[8] . E. Roos, . A. Ostenberg, . H. Roos, C. Ekdahl και L. Lohmander , «Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls.,» *Osteoarthritis Cartilage.,* τόμ. 4, αρ. 9, 2001.

[9] A. O. Amoako και . G. Guntur A Pujalte, «Osteoarthritis in Young, Active, and Athletic Individuals,» *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.,* τόμ. 7, pp. 27-32, 2014.

[10] Arthritis Foundation, «Arthritis Foundation,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.arthritis.org/. [Πρόσβαση 24 Σεπτέμβριος 2019].

[11] A. Wluka , F. Cicuttini και T. Spector, «Menopause, oestrogens and arthritis.,» *Maturitas,* αρ. 35, pp. 183-99, 2000.

[12] M. Hannan, . D. Felson, J. Anderson, A. Naimark και Kann, «Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study.,» *Arthritis Rheum.,* αρ. 33, p. 525–32, 1990.

[13] . M. Nevitt, . S. Cummings, N. Lane και . a. et, «Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group.,» *Arch Intern Med,* τόμ. 18, αρ. 156, pp. 2073-80, 1996.

[14] Y. Zhang , . L. Xu, . M. Nevitt και a. et , «Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study,» *Arthritis Rheum,* pp. 2065-71, 2001.

[15] D. Chen, J. Shen, W. Zhao, T. Wang, L. Han, J. L. Hamilton και I. Hee-Jeong, «Bone Research,» 3 Ιανουάριος 2017. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.nature.com/articles/boneres201644#techniques-for-oa-studies. [Πρόσβαση 27 10 2019].

[16] X. Bingjiang , C. Di, Z. Jushi, H. Songfeng, . J. Hongting και . T. Peijian, «Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms,» *Calcified Tissue International,* τόμ. 95, p. 495–505, 2014.

[17] N. Arden και M. Nevvit, «Osteoarthritis: Epidimiology,» *Best Prakt Res Clin Rheumatol,* αρ. 20, pp. 3-25, 2006.

[18] T. Spector , . F. Cicuttini, . J. Baker, . J. Loughlin και Hart, «Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study.,» *Bmj,* τόμ. 312, αρ. 7036, pp. 940-3, 1996.

[19] . A. Palotie, . P. Vaisanen, . J. Ott και . a. et, «Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene.,» *Lancet.,* αρ. 1, pp. 924-7, 1989.

[20] . D. Felson, . N. Couropmitree, C. Chaisson και . a. et, «Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study.,» *Arthritis Rheum.,* τόμ. 46, αρ. 6, pp. 1064-71, 1998.

[21] . J. Kellgren και . J. Lawrence, «Radiological assessment of osteo-arthrosis,» *Ann Rheum Dis,* τόμ. 16, p. 494–502., 1957.

[22] J. Kellgren και . J. Lawrence, σε *Atlas of standard radiographs*, Oxford (UK), Oxford University Press, 1963.

[23] . Y. Zhang και . J. Jordan, «Epidemiology of osteoarthritis.,» *Rheumatic diseases clinics of North America,* pp. 515-29, 2008.

[24] M. KEITH SINUSAS, «Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment,» *Am Fam Physician,* τόμ. 1, αρ. 85, pp. 49-56, 2012.

[25] Z. Meyler , «Arthritis-health,» 21 11 2018. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.arthritis-health.com/types/joint-anatomy/knee-anatomy. [Πρόσβαση 2 12 2019].

[26] A. S. J. Fox , B. Asheesh και S. A. Rodeo , «The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function,» *Sports health,* pp. 461-468, 2009.

[27] «Physio Practica,» 2017. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://physiopractica.gr/pathologies/knee/knee-osteoarthritis/. [Πρόσβαση 3 2 2020].

[28] A. Hemanth και N. Anja , «Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration,» *J.Dev Biology ,* τόμ. 3, αρ. 4, pp. 177-192, 2015.

[29] Z. Y. García-Carvajal, D. Garciadiego-Cázares, C. Parra- Cid, R. Aguilar-Gaytán, C. Velasquillo , C. Ibarra και J. . S. Castro Carmona, «Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies,» σε *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, 2012.

[30] L. RF, «Aging processes and the development of osteoarthritis,» *Curr Opin Rheumatol,* pp. 108-113, 2013.

[31] A. Pearle , R. Warren και . S. Rodeo, «Basic science of articular cartilage and osteoarthritis,» *Clinics in Sports Medicine,* pp. 1-12, 2005.

[32] M. Goldring , «Articular cartilage degradation in osteoarthritis,» *HSS Journal,* τόμ. 8, pp. 7-9, 2012.

[33] P. Hoff , F. Buttgereit , . G. Burmester και . a. et, « Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes,» *International Orthopaedics,* αρ. 37, pp. 145-151, 2013.

[34] M. B. Goldring και . M. Otero, «Inflammation in osteoarthritis.,» *Curr Opin Rheumatol.,* τόμ. 5, αρ. 23, pp. 471-478, 2011.

[35] T. Lawrence, «The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation.,» *Cold Spring Harb Perspect Biol.,* 2009.

[36] . K. Cheeseman και T. Slater , «An introduction to free radicals chemistry,» *Br Med Bull,* αρ. 49, pp. 481-493, 1993.

[37] P. Lepetsos και A. G. Papavassiliou, «ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis,» *Biochimica et Biophysica acta,* τόμ. 1862, αρ. 4, pp. 576-591, 2016.

[38] J. R. Stone και S. Yang, «Hydrogen Peroxide:a signalling messanger,» *Antiox. Redox Signal. ,* τόμ. 8, pp. 243-270, 2006.

[39] M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius και B. Zhivotovsky, «Mitochondria, oxidative stress and cell death,» *Apoptosis,* τόμ. 12, αρ. 5, pp. 913-922, 2007.

[40] R.-Z. Zhao, . J. Shuai, Z. Lin και . Z. Bi, «Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review),» *International Journal of Molecular Medicine,* τόμ. 1, αρ. 44, pp. 3-15, 2019.

[41] J. M. Harre, F. Beigi και K. Tziomalos, «Nitric Oxide and Cardiobiology-Methods for Intact Hearts and Isolated Myocytes,» *Methods in Enzymology,* τόμ. 441, pp. 369-392, 2008.

[42] D. A. Kostić, D. S. Dimitrijević, . S. G. Stojanović, I. . R. Palić, . A. . S. Đorđević και . J. D. Ickovski, «Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition,» *Journal of Chemistry,* τόμ. 2015, 2015.

[43] K. Krause και K. Bedard, «NOX enzymes in immuno-inflammatory pathologies,» *Semin Immunopathol.,* τόμ. 30, αρ. 3, pp. 193-4, 2008.

[44] Y. Sun και W. L. Oberley, «Redox regulation of transcriptional activators,» *Free Radical Biol. Med.,* τόμ. 21, p. 335–348, 1996.

[45] R. Schreck, P. Rieber και . A. P. Baeuerle, «Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κB transcription factor and HIV-1.,» *EMBO J.,* τόμ. 10, pp. 2247-2258, 1991.

[46] M. Ushio-Fukai , W. R. Alexander , M. Akers και . Q. Yin, «Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells.,,» *J. Biol. Chem. ,* τόμ. 274, p. 22699–22704, 1999.

[47] K. Brieger, S. Schiavone, F. . J. Miller Jr και K.-H. Krause, «Reactive oxygen species: from health to disease,» *Swiss Med Wkly.,* τόμ. 142, 2012.

[48] K. Krause, «Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases.,» *Exp Gerontol,* τόμ. 42, αρ. 4, p. 256–62, 2007.

[49] B. Qin, . L. Cartier, M. Dubois-Dauphinx, B. Li, L. Serrander και K. Krause, «A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons,» *Neurobiol Aging,* τόμ. 27, αρ. 11, pp. 1577-1587, 2006.

[50] Y. Zhang, V. Dawson και T. Dawson, « Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease,» *Neurobiology of Disease,* τόμ. 7, αρ. 4, pp. 240-250, 2000.

[51] N. Dhalla, R. Temsah και T. Netticadan, «Role of oxidative stress in cardiovascular diseases,» *Journal of Hypertension,* τόμ. 18, αρ. 6, pp. 655-73, 2000.

[52] M. Minguzzi, S. Cetrullo, S. D' Adamo και a. et, «Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturational Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis,» *Oxid Med Cell Longev.,* 2018.

[53] R. F. Loeser, J. A. Collins και J. A. Bolduc, «Reactive Oxygen Species, Aging and Articular Cartillage Homeostasis,» *Free Radical Biology And Medicine,* 2018.

[54] N. T. N. H. H.-M. K. K. T. N. K. Yudoh K, «Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function.,» *Arthritis Res Ther.,* τόμ. 2, αρ. 7, pp. 380-391., 2005.

[55] K. S. Yu SM, «The thymoquinone-induced production of reactive oxygen species promotes dedifferentiation through the ERK pathway and inflammation through the p38 and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes,» *Int J Mol Med,* τόμ. 2, αρ. 35, pp. 325-332., 2015.

[56] H. Bereiter, M. Vöth , S. Mai και . M. Jendrach, «Structural implications of mitochondrial dynamics.,» *Biotechnology Journal,* τόμ. 3, αρ. 6, pp. 765-80, 2008.

[57] A. Wickens , «Ageing and the free radical theory.,» *Respir Physiol.,* τόμ. 3, αρ. 128, pp. 379-391, 2001.

[58] F. J. Blanco , I. Rego και R.-R. Christina, «The role of mitochondria in osteoarthritis,» *Nature Rev. Rheumathology,* τόμ. 3, αρ. 7, pp. 161-169, 2011.

[59] F. J. Blanco , M. J. Lopez-Armada και E. Maneiro , «Mitochondria dysfunction in osteoarthritis,» *Mitochondrion ,* pp. 715-728, 2004.

[60] Y. Wang, X. Zhao, M. Lotz, R. Terkeltaub και R. Liu-Bryan, «Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α,» *Arthritis Rheumatol,* p. 2141–2153, 2015.

[61] J. Tschopp, «Mitochondria: Sovereign of inflammation? ;41:,» *Eur J Immunol,* p. 1196–202, 2011.

[62] R. L. Loeser , J. A. Collins και B. O. Diekman , «Ageing ant the pathogenesis of osteoarthritis,» *Nat Rev Rheumatol.,* τόμ. 7, αρ. 12, p. 412–420, 2016.

[63] I. Rego-Perez, M. Fernandez-Moreno, C. Fernandez-Lopez, J. Arenas και F. . J. Blanco, «Mitochondrial DNA Haplogroups Role in the Prevalence and Severity of Knee Osteoarthritis,» *ARTHRITIS & RHEUMATISM,* τόμ. 58, αρ. 8, pp. 2387-2396, 2008.

[64] M. Karbowski και . R. Youle, «Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis.,» *Cell Death and Differentiation,* τόμ. 10, pp. 870-880, 2003.

[65] S. Mai, M. Klinkenberg, G. Auburger, J. Bereiter-Hahn και M. Jendrach, «Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1,» *Journal of Cell Science,* τόμ. 123, pp. 917-926, 2010.

[66] A. . P. Leonard, R. B. Cameron, J. . L. Speiser, . B. J. Wolf, Y. K. Peterson, R. G. Schnellmann και C. . C. Beeson, «Quantitative Analysis of Mitochondrial Morphology and Membrane Potential in Living Cells Using High-Content Imaging, Machine Learning, and Morphological Binning.,» *Biophysica et Biochica Acta.,* pp. 348-360, 2015.

[67] R. Madhuparna, R. Hemachandra, I. Miho και H. Sesaki, «Mitochondrial Division and Fusion in Metabolism,» *Curr Opin Cell Biol.,* τόμ. 33, pp. 111-118, 2015.

[68] S. A. Detmer και D. C. Chan , «Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics.,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* τόμ. 8, αρ. 11, p. 870–879, 2007.

[69] C. Hiu-Ling Hung και a. et, «A reciprocal relationship between reactive oxygen species and mitochondrial dynamics in neurodegeneration,» *Redox Biology,* τόμ. 14, pp. 7-19, 2018.

[70] . J. McCarron, C. Wilson, M. Sandison, M. Olson, J. Girkin, C. Saunter και S. Chalmers, «From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle,» *Journal of Vascular Research ,* τόμ. 50, pp. 357-371 , 2013.

[71] C. Guo , L. Sun , C. Xueping και Z. Danshen, «Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases,» *Neural Regen Res.,* pp. 2003-2014, 2013.

[72] A. Goutas , C. Syrrou , I. Papathanasiou , A. Tsezou και V. Trachana , «The autophagic response to oxidative stress in osteoarthritic chondrocytes is deregulated,» *Free Radical Biology and medicine ,* τόμ. 126, pp. 122-132, 2018.

[73] J. Hardln, M. K. Crow και B. Diamond , «Get the facts- Women and Arthritis,» Arthritis Foundation, 2019.

[74] . E. Sahin, . S. Colla, . M. Liesa, . J. Moslehi και F. Muller , «Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise.,» *Nature,* τόμ. 470, pp. 359-65, 2011.

[75] . E. Sahin και . R. Depinho, «Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. .,» *Nature,* τόμ. 464, p. 520–8, 2010.

[76] A. Mobasheri , M. P. Rayman , O. Guallilo, J. Sellam, P. van der Kraan και U. Fearon , «The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis,» *Nature Reviws Rheumatology ,* τόμ. 5, αρ. 13, pp. 302-311, 2017.

[77] . H. C. Randall, B. Simovic Markovic, C. Fellabauma, A. Arsenijevicb και V. Volarevic, «Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives,» *Biomedicine & Pharmacotherapy,* τόμ. 109, pp. 2318-2326, 2019.

[78] S. B. Abramson, «Osteoarthritis and nitric oxide,» *Osteoarthritis and Cartilage,* τόμ. 16, p. 15–20, 2008.

[79] R. F. Loeser , «The Role of Aging in the Development of Osteoarthritis,» *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.,* αρ. 128, pp. 44-54, 2017.

[80] B. J. Martin JA, «Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes.,» *J Gerontol A Biol Sci Med Sci. ,* τόμ. 4, αρ. 56, pp. 172-179, 2001.