



**Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο**  
**Σχολή Χημικών Μηχανικών**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ**  
**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη της επίδρασης συστατικών της  
εξωκυττάριας μήτρας στα μονοπάτια  
σηματοδότησης των χονδροκυττάρων**

**Γρατσία Εμμανουέλα**

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής**  
**Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

**Αθήνα 2016**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική με θέμα: “Μελέτη της επίδρασης συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας στα μονοπάτια σηματοδότησης των χονδροκυττάρων” πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια προσκόμισης Προπτυχιακού Διπλώματος για τη σχολή Χημικών Μηχανικών Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Το πειραματικό μέρος της εργασίας έλαβε χώρα στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του κ. Αλεξόπουλου Λεωνίδα, στον τομέα Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου, στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο που δέχτηκε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας. Μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ πάνω σε ένα αντικείμενο που με ενδιέφερε πολύ να ανακαλύψω. Μου δόθηκε η ευκαιρία να συμμετάσχω σε μια διεπιστημονική ομάδα με ανθρώπους που αγαπούν την επιστήμη και να γνωρίσω την ερεύνα ως τρόπο ζωής.

Δεύτερον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτριο Τζεράνη για όλη τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Νίκο Φατσή Καβαλόπουλο, τον Θεόδωρο Σακελλαρόπουλο, τη Μαρίνα Ιωάννου, την Αγγελική Μήνια και τη Βίκυ Πλακιά οι οποίοι μου μετέφεραν τις γνώσεις τους και ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Ιωάννα, την Κατερίνα, τον Αλέξανδρο, το Δημήτρη Π., το Δημήτρη Μ., το Γιώργο, τον Αντώνη, τον Ηλία, το Χρήστο, την Αναστασία, τον Παναγιώτη, τη Γεωργία, την Ιλόνα, τον Ορφέα, τη Μάρω και τον Jan καθώς χωρίς αυτούς η παραμονή μου στο εργαστήριο δεν θα ήταν το ίδιο ευχάριστη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου, την αδερφή μου Ειρήνη αλλά και τους φίλους μου που μου πρόσφεραν την ανιδιοτελή υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου αλλά και των σπουδών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων .....	1
Περίληψη .....	1
Abstract .....	2
1. Εισαγωγή .....	4
1.1 Αρθρικός Χόνδρος.....	4
1.1.1. Δομή και Λειτουργία .....	4
1.1.2. Εξωκυτάρια Μήτρα .....	6
1.2. Αλληλεπιδράσεις Χονδροκυττάρων – Εξωκυτάριας Μήτρας.....	16
1.3. Στόχοι της Διπλωματικής .....	17
2. Πειραματικές Μέθοδοι .....	18
2.1 Απομόνωση και Καλλιέργεια Χονδροκυττάρων .....	18
2.1.1. Απομόνωση Χονδροκυττάρων .....	18
2.1.2. Καλλιέργεια Χονδροκυττάρων .....	18
2.2. Μοντέλα Εξωκυτάριας Μήτρας Χόνδρου με Βάση Γέλες Αλγινικού Οξέως .....	19
2.2.1. Συστατικά της Εξωκυτάριας Μήτρας του Χόνδρου Υπό Εξέταση .....	19
2.2.2. Προετοιμασία των Γελών Αλγινικού Οξέως.....	20
2.2.3. Βιωσιμότητα Χονδροκυττάρων Μέσα σε Γέλες Αλγινικού Οξέως.....	23
2.2.4. Απόκριση Χονδροκυττάρων Μέσα σε Γέλες Αλγινικού Οξέως.....	23
2.2.5. Πρωτεομική Ποσοτικοποίηση με την Μέθοδο xMAP ELISA.....	24
3. Πειραματικά Αποτελέσματα.....	25
3.1. Βιωσιμότητα Χονδροκυττάρων Μέσα στις Γέλες Αλγινικού Οξέως .....	25
3.2. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυτάριας Μήτρας στα Επίπεδα Φωσφορυλίωσης των Χονδροκυττάρων .....	26
3.3. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυτάριας Μήτρας στην Έκκριση Κυτταροκινών από Χονδροκύτταρα.....	28
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	30
4.1. Αναπτύσσοντας Μοντέλα της Εξωκυτάριας Μήτρας του Χόνδρου Με Βάση Γέλες Αλγινικού Οξέος .....	30
4.2. Επίδραση Βασικών Συστατικών της Εξωκυτάριας Μήτρας του Χόνδρου στα Χονδροκύτταρα .....	31
4.2.1. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυτάριας Μήτρας στα Επίπεδα Έκκρισης Κυτταροκινών από τα Χονδροκύτταρα .....	31
4.2.2. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυτάριας Μήτρας στα Επίπεδα Φωσφορυλίωσης των Χονδροκυττάρων .....	35
4.3. Ανάλυση εμπλουτισμού για τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες.....	38
4.4. Μελλοντική Εργασία .....	39

Παράρτημα .....	41
A.1 Απομόνωση Αρθρικού Χόνδρου – Χονδροκυττάρων .....	41
A.2 Καλλιέργεια και Διαχωρισμός Χονδροκυττάρων .....	42
A.3 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο.....	43
A.4 Πάγωμα Χονδροκυττάρων.....	45
A.5 Απόψυξη κυττάρων .....	47
A.6 Δημιουργία Δισκίων Αλγινικού Οξέος με Χονδροκύτταρα.....	48
A.7 Δημιουργία Δισκίων Αλγινικού Οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας .....	50
A.8 Αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος – Συλλογή των χονδροκυττάρων.....	52
A.9 Αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος – Συλλογή Φωσφοπρωτεϊνών.....	53
A.10 Συλλογή Κυτταροκινών .....	54
A.11 Μέτρηση Πρωτεϊνών με την Μέθοδο Sandwich ELISA xMAP .....	54
Βιβλιογραφία.....	56
Ιστότοποι.....	57



## Περίληψη

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας τύπος υαλώδους χόνδρου που λειτουργεί ως συνδετικός ιστός των διαρθρωτικών οστών και των μεσοσπονδύλιων δίσκων. Ο αρθρικός χόνδρος είναι υψίστης σημασίας καθώς κατανέμει τις δυνάμεις και μειώνει την τριβή μεταξύ των αρθρώσεων, βοηθώντας έτσι στην κίνηση. Ωστόσο, λόγω της φυσιολογίας του - αποτελείται κυρίως από εξωκυττάρια μήτρα, λίγα κύτταρα και καθόλου αρτηρίες- έχει πολύ περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης.

Η μηχανική ιστών συνδυάζει ικριώματα, κύτταρα και βιοενεργά ερεθίσματα για τη δημιουργία λειτουργικών ιστών για τη θεραπεία των τραυματισμών του χόνδρου ή της οστεοαρθρίτιδας. Η συστηματική μελέτη της κυτταρικής σηματοδότησης είναι υψίστης σημασίας για την αποκάλυψη της αιτιολογίας των εκφυλιστικών ασθενειών, δεδομένου ότι οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι σημαντικοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές.

Σε αυτή τη μελέτη, ανθρώπινα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε γέλες αλγινικού οξέος που ενήργησαν ως ικριώματα και ως φορείς των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου και μελετήθηκε η πρωτεομική τους απόκριση. Τα συστατικά που μελετήθηκαν ήταν τα κολλαγόνο τύπου I, φιμπρονεκτίνη, θειική χονδροϊτίνη 6, η θειική χονδροϊτίνη A και το υαλουρονικό οξύ, τα οποία συναντώνται είτε στο φυσιολογικό ή στον οστεοαρθρικό χόνδρο. Τα χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν στις γέλες για 11 ημέρες και για την πρωτεομική μελέτη συλλέχθηκαν κυτταροκίνες και φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες για 6 χρονικά σημεία: 1 ημέρα, 3 ημέρες, 5 ημέρες, 7 ημέρες, 9 ημέρες, 11 ημέρες μετά τον εγκλεισμό τους στις γέλες. Η έκκριση των κυτταροκινών και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών μετρήθηκαν με τη μέθοδο Elisa μέσω σύζευξης μαγνητικών μικροσφαιριδίων. Επίσης κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκε η βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων μέσα στις γέλες του αλγινικού οξέος.

Για την έκκριση των κυτταροκινών, τα δισκία αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 και φιμπρονεκτίνη εμφάνισαν σημαντική έκκριση των κυτταροκινών IL-6, IL-8 για όλα τα χρονικά σημεία γεγονός που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση. Όλοι οι τύποι των δίσκων αλγινικού, εκτός από τα δισκία αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 έδειξαν παρόμοια μειορύθμιση φολλιστατίνης στα χρονικά σημεία ημέρα 9 και ημέρα 11.

Για τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, το κολλαγόνο τύπου I και η θειική χονδροϊτίνη 6, ενεργοποίησαν πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την επιβίωση και τη διαφοροποίηση, όπως AKT1, CREB1 και WNK1 αλλά επίσης και πρωτεΐνες σχετίζονται με φλεγμονώδη απόκριση, όπως οι IKBA και STAT6.

Αυτή η μελέτη έδειξε ότι συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας ενεργούν ως ερεθίσματα και έχουν σημαντικές επιπτώσεις όταν αναμιγνύονται με αλγινικό οξύ για την καλλιέργεια χονδροκυττάρων σε τρισδιάστατο περιβάλλον. Από τις μήτρες που μελετήθηκαν εδώ, το αλγινικό οξύ με θειική χονδροϊτίνη 6 και το αλγινικό οξύ με φιμπρονεκτίνη φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην έκκριση κυτταροκινών ενεργοποιώντας μονοπάτια φλεγμονώδους αποκρίσεως, ενώ το αλγινικό οξύ με θειική χονδροϊτίνη 6 και το αλγινικό οξύ με κολλαγόνο τύπου I έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην φωσφορυλίωση πρωτεϊνών ενεργοποιώντας μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού καθώς και φλεγμονώδους αποκρίσεως.

## Abstract

Articular cartilage is a type of hyaline cartilage that works as a connective tissue of diarthrodial joints and intervertebral disks. Articular cartilage is of high importance as it distributes forces and reduces friction between joints, thus helping in movement. However, due to its physiology – it mainly consists of extracellular matrix, few cells and no blood vessels- articular cartilage has a very limited capability of self repair.

Cartilage tissue engineering combines scaffolds, cells and bioactive stimuli to create functional tissue replacements to treat cartilage injuries or osteoarthritis.

Systematic study of cell signaling is of the utmost importance for uncovering the etiology of degenerative diseases since cytokines, chemokines and metalloproteinases are major inflammatory mediators.

In this study, human osteoarthritic chondrocytes were seeded in different alginate gels that acted as scaffolds and as carriers of cartilage's extracellular matrix components and their proteomic response was measured. The components examined were collagen type I, fibronectin, chondroitin sulfate 6, chondroitin sulfate A and hyaluronic acid, which are found either in normal or osteoarthritic cartilage. Chondrocytes were seeded for 11 days and cytokines and phosphorylated proteins were collected for 6 time points: day1, day3, day5, day 7, day 9 and day 11 after seeding. Cytokine secretion and protein phosphorylation levels were quantified using Microbead Sandwich Elisa Method. Viability during the experiment was also measured using the Hemocytometer.

For cytokine secretion, alginate disks with chondroitin sulfate 6 and fibronectin showed significant IL-6, IL-8 secretion for all timepoints which suggest inflammatory response. All types of alginate disks, except alginate with chondroitin sulfate 6 showed a similar downregulation of follistatin in day 9 and day 11.

For protein phosphorylation, collagen type I and chondroitin sulfate 6, both triggered proteins that are correlated with surviving and differentiation, such as AKT1, CREB1 and WNK1 but also proteins correlated with inflammatory response such as IKBA and STAT6.

In conclusion, extracellular matrix components, do act as stimuli and have important effects when mixed with alginate for chondrocyte culture in a 3D gel environment. From the components studied here, chondroitin sulfate 6 and fibronectin seem to have the greatest effect for cytokine secretion, upregulating inflammation pathways while chondroitin sulfate 6 and collagen type I have the greatest effect on protein phosphorylation, upregulating both inflammation pathways and pathways for survival and proliferation.





# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Αρθρικός Χόνδρος

### 1.1.1. Δομή και Λειτουργία

Ο χόνδρος είναι ένας αδιαφανής, ελαστικός, αναγγειακός υποστηρικτικός ιστός, ο οποίος αποτελείται από ένα είδος κυττάρων, τα χονδροκύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από μια εξωκυττάρια μήτρα. Ο χόνδρος εναποτίθενται μέσω των χονδροκυττάρων. Συμμετέχει στην σκελετική ανάπτυξη μέσω της ενδοχονδριακής οστεοποίησης. Τα χονδροκύτταρα διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω της περικυτταρικής και εξωκυτταρικής μήτρας. Υπάρχουν τρία είδη χόνδρου τα οποία διαφέρουν ως προς τη σύστασή τους : ελαστικός, ινώδης και υαλώδης.<sup>1,2</sup>

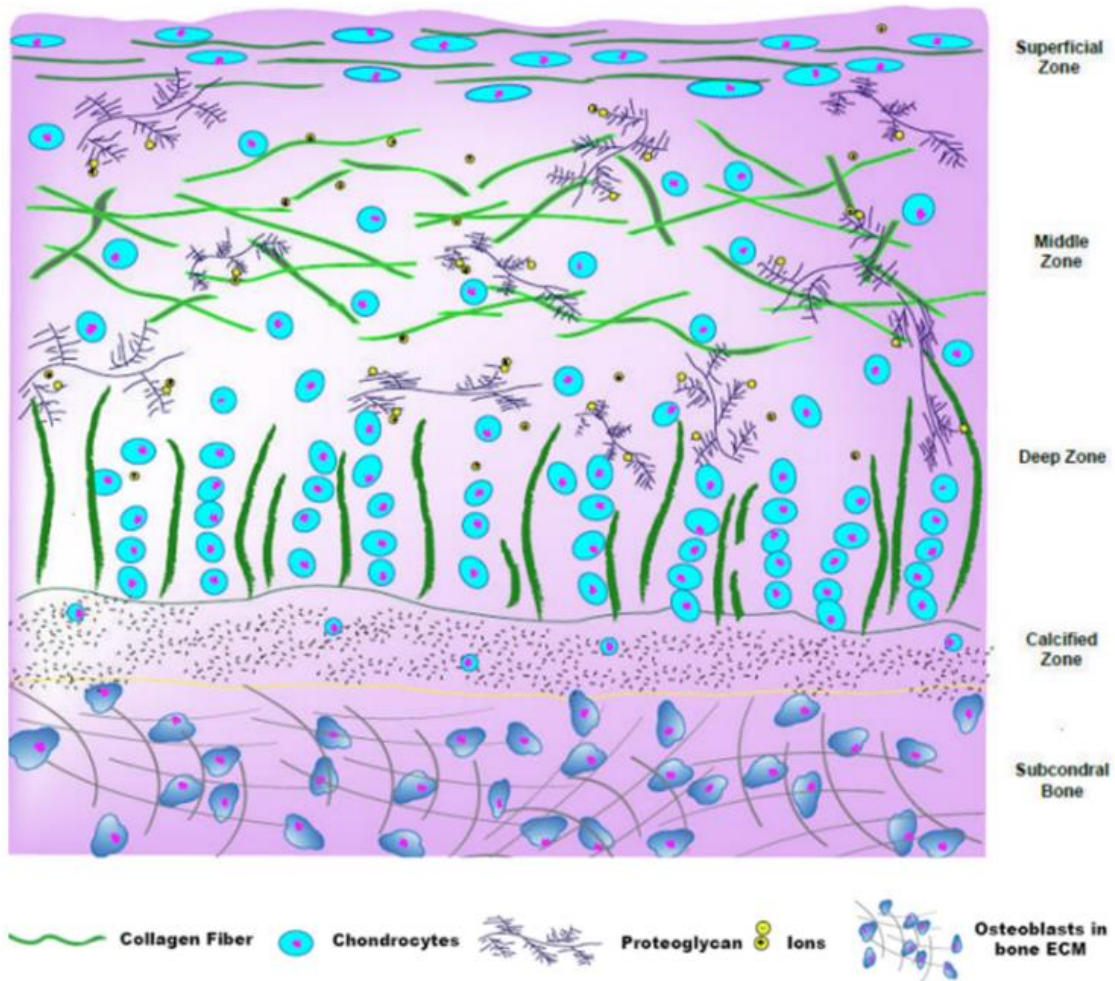
Ο υαλώδης αρθρικός χόνδρος, είναι ένας λεπτός συνδετικός ιστός ο οποίος καλύπτει τα άκρα των διαρθρωτικών οστών. Είναι ένας ιστός χαμηλής τριβής, ικανός να δέχεται φορτία ο οποίος επιτρέπει την κίνηση μεταξύ των οστών. Στις περισσότερες αρθρώσεις το πάχος του κυμαίνεται από 1,5 έως 3 χιλιοστά και έχει τη δυνατότητα να υποστηρίξει δυνάμεις της τάξεως 1-4 MPa σε κατά μέσο όρο δύο εκατομμύρια φορές το χρόνο. Αποτελείται από δύο φάσεις, μια υγρή και μια στερεή. Γενικά, το 60 έως 80 % του συνολικού βάρους είναι υγρό (νερό και ηλεκτρολύτες) ενώ το υπόλοιπο 20 – 40 % είναι στερεή εξωκυττάρια μήτρα και χονδροκύτταρα. Αποτελείται από εξειδικευμένες πρωτεΐνες και μακρομόρια, το κολλαγόνο και τις πρωτεογλυκάνες τα οποία επιτρέπουν στον ιστό να λειτουργήσει σε μεγάλης εντάσεως μηχανικές καταπονήσεις στις αρθρώσεις του γονάτου, ισχίου και ώμου. Το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες αλληλεπιδρούν με το φορτισμένο περιβάλλον υγρό, αποδίδοντας τις μοναδικές ιδιότητες του χόνδρου.



Εικόνα 1: Αρθρώσεις γονάτου, ισχίου και ώμου. <sup>1</sup>

Ο αρθρικός χόνδρος έχει μία εξαιρετικά οργανωμένη ιεραρχική δομή που αποτελείται από 4 ζώνες (εικόνα 2):

- i. Την **επιφανειακή ζώνη** (superficial zone): Αποτελεί το 10-20 % του συνολικού πάχους του αρθρικού χόνδρου (περίπου 200μm) και περιέχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα κολλαγόνου. Τα χονδροκύτταρα παράγουν κυρίως κολλαγόνο τύπου II καταμετρημένο σε παράλληλη διάταξη με την επιφάνεια του ιστού. Ακόμη ένας μικρός αριθμός χονδροκυττάρων έχει πεπλατυσμένη μορφή και διατάσσεται παράλληλα με την επιφάνεια και την κατεύθυνση διατμητικών τάσεων. Η εξωκυττάρια μήτρα έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες σε αντίθεση με τις άλλες ζώνες. Πιστεύεται ότι η σύσταση και η οργάνωση της επιφανειακής ζώνης συνεισφέρει στην αντοχή σε εφελκυσμό, αντιτίθεται στη διάτμηση και προσαρμόζει τη διαπερατότητα του υγρού.
- ii. Τη **μεσαία ζώνη** (middle zone): Χαρακτηρίζεται από τυχαία προσανατολισμένες ίνες κολλαγόνου και μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες. Τα χονδροκύτταρα σε αυτή τη ζώνη έχουν στρογγυλό σχήμα και έχουν σύνθετα οργανίδια.
- iii. Τη **βαθιά ζώνη** (deep zone): Εντοπίζεται μεταξύ του χόνδρου και του οστού και εδώ οι ίνες κολλαγόνου ευθυγραμμίζονται κάθετα προς την επιφάνεια. Ο λειτουργικός ρόλος των κολλαγόνων εδώ είναι να ενδυναμώνουν το δεσμό μεταξύ χόνδρου και οστού. Τα χονδροκύτταρα είναι οργανωμένα σε στήλες παράλληλες με τις ίνες κολλαγόνου και παρουσιάζουν δέκα φορές υψηλότερη συνθετική ικανότητα από τα χονδροκύτταρα της επιφανειακής ζώνης.
- iv. Την **ασβεστοποιημένη ζώνη** (calcified zone): Χωρίζει τον αρθρικό χόνδρο και το οστό και περιέχει λίγα χονδροκύτταρα τα οποία είναι εγκλωβισμένα μέσα σε ασβεστοποιημένη εξωκυττάρια μήτρα, έχουν μικρό μέγεθος και χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα. Είναι η μόνη ζώνη που περιέχει κολλαγόνο τύπου IX, το οποίο συνεισφέρει στην εναπόθεση ασβεστίου στον χόνδρο και παρέχει ακεραιότητα στη δομή.



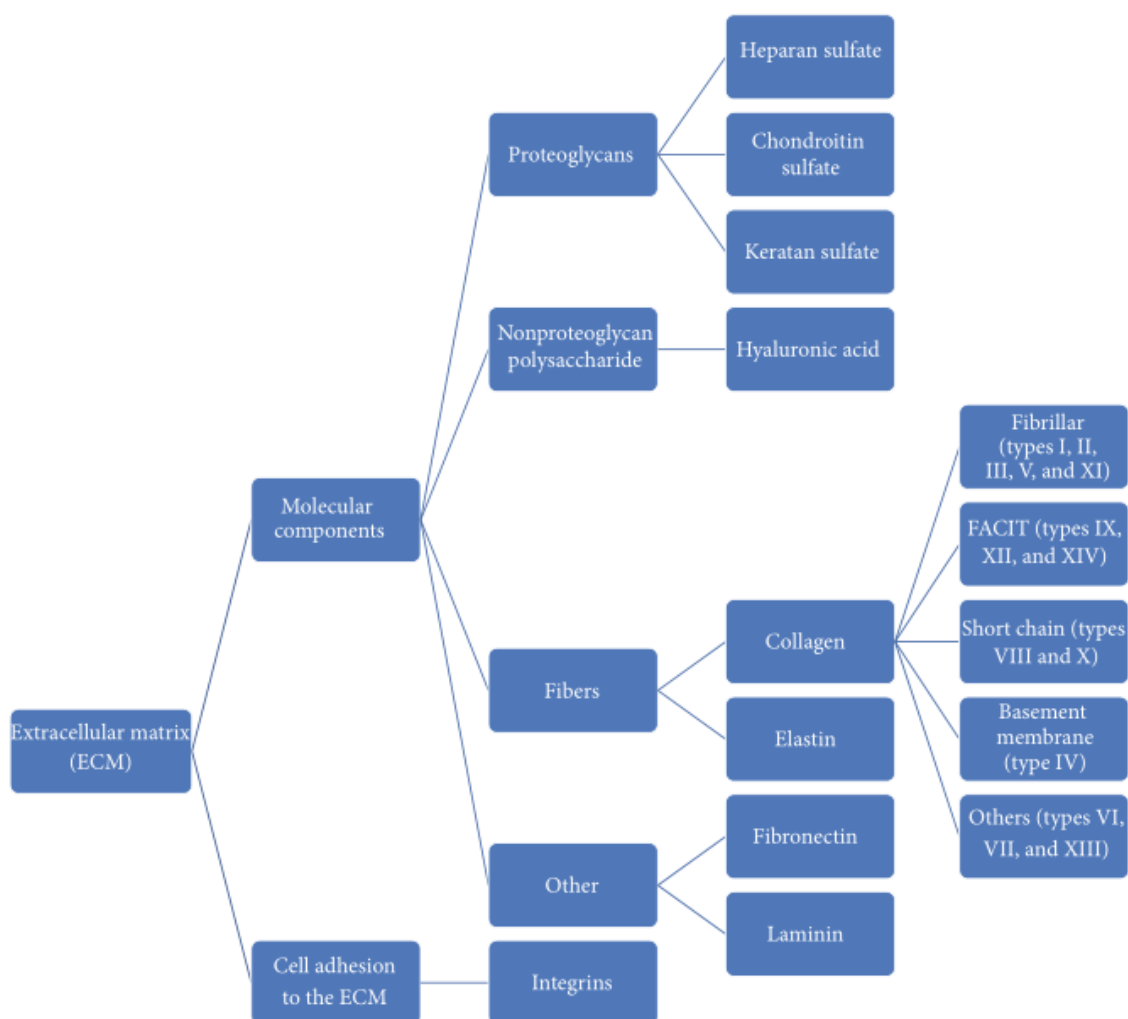
Εικόνα 2: Σύνθεση και δομή αρθρικού χόνδρου.<sup>1</sup>

Η σύνθεση του αρθρικού χόνδρου μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη του ιστού. Ο ώριμος αρθρικός χόνδρος αποτελείται κυρίως από νερό σε ποσοστό 70 έως 80 % κατά βάρος. Το στερεό μέρος του ιστού αποτελείται από κολλαγόνο (50 έως 75%) και πρωτεογλυκάνες (15-30%) καθώς και μικρά πρωτεϊνικά μόρια και χονδροκύτταρα.

### 1.1.2. Εξωκυττάρια Μήτρα

Η εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) είναι ο εξωκυττάριος χώρος μιας πολυκυτταρικής δομής (πχ. ενός ιστού), ο οποίος προσφέρει δομική και βιοχημική υποστήριξη στα κύτταρα. Η εξωκυττάρια μήτρα ρυθμίζει τη δυναμική συμπεριφορά του κυττάρου και επιπλέον είναι χώρος αποθήκευσης κυτταρικών αυξητικών παραγόντων. Στο χόνδρο, η εξωκυττάρια μήτρα αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου II και μεγάλα δίκτυα πρωτεογλυκανών που περιέχουν γλυκοζαμινογλυκάνες όπως υαλουρονικό οξύ και θειικές

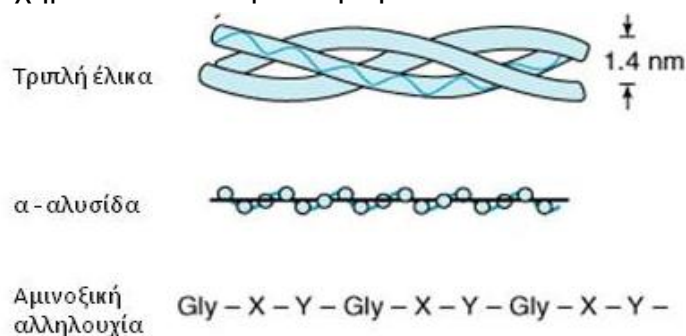
χονδροϊίνες. Η εξωκυττάρια μήτρα έχει σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά διόγκωσης και το ωσμωτικό περιβάλλον των χονδροκυττάρων. Ακόμη, διαδραματίζει καίριο ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών των χονδροκυττάρων μέσω αλληλεπιδράσεων κυττάρου-μήτρας, του οργανωμένου κυτταροσκελετού, και τη σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που μεσολαβούν στη σύνδεση μεταξύ ενός κυττάρου και του περιβάλλοντος του, όπως άλλα κύτταρα ή η εξωκυττάρια μήτρα περνώντας τις πληροφορίες για τη χημική σύνθεση και τη χημική κατάσταση της εξωκυττάριας μήτρας στο κύτταρο. Οι ιντεγκρίνες ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες των χονδροκυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης, της αναδιαμόρφωσης της μήτρας, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, το σχήμα των κυττάρων και τη κινητικότητα τους, αποκρίσεις σε μηχανική διέγερση, και τη κυτταρική επιβίωση. Επίσης, τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας δρουν μέσω των ιντεγκρινών και συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση, οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, και στην εξάπλωση των κυττάρων. Η εξωκυττάρια μήτρα του χόνδρου αναδιαμορφώνεται συνεχώς με ένα συνδυασμό της καταστροφής της μέσω μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και της αναπαραγωγής της με την αναστολή της δραστηριότητας των MMPs.



Εικόνα 3: Δομή και Σύσταση Εξωκυττάριας Μήτρας Αρθρικού Χόνδρου.<sup>41</sup>

### 1.1.2.1. Ισόμορφα Κολλαγόνου

Η δομή του χόνδρου εξαρτάται από το δίκτυο κολλαγόνων, η δομή του οποίου παρέχει το πλαίσιο για την παγίδευση πρωτεογλυκανών, άλλων πρωτεϊνών και νερού. Από την υπεροικογένεια κολλαγόνων, η οποία αποτελείται από είκοσι διαφορετικά είδη, στον υαλώδη αρθρικό χόνδρο συναντώνται οι τύποι II, VI, IX, X, XI. Όλα τα είδη κολλαγόνων έχουν τμήματα με τριπλή ελικοειδή διαμόρφωση. Αυτές οι περιοχές σχηματίζονται από τρεις υπομονάδες, οι οποίες ονομάζονται άλφα αλυσίδες. Κάθε αλυσίδα κολλαγόνου περιέχει μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία, όπου κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη (Gly – X – Y) . Η γλυκίνη, λόγω του μικρού μεγέθους της, επιτρέπει στις αλυσίδες να συμπυκνώνονται έτσι ώστε να μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της τριπλής έλικας κολλαγόνου. Αποτελείται από τρεις α αλυσίδες και κάθε αλυσίδα κολλαγόνου περιέχει ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο στο οποίο το τρίτο αμινοξύ είναι η γλυκίνη (X-Y-Gly-X-Y)<sup>7</sup>

Κολλαγόνο τύπου II	75% στον εμβρυικό χόνδρο, >90% στον ενήλικο χόνδρο
Κολλαγόνο τύπου III	>10% στον ενήλικο χόνδρο
Κολλαγόνο τύπου IX	covalently fibril-associated collagen, 10% στον εμβρυικό χόνδρο, 1% στον ενήλικο χόνδρο
Κολλαγόνο τύπου X	Μόνο σε υπερτροφικό χόνδρο
Κολλαγόνο τύπου XI	Περίγραμμα ινιδίων, 10% στον εμβρυικό χόνδρο, 3% στον ενήλικο χόνδρο
Κολλαγόνο τύπου VI	Μικρονημάτια <1%
Κολλαγόνο τύπου XII/XIV	Μη- ομοιοπολικά ινίδια κολλαγόνου
Κολλαγόνο τύπου XIII	Διαμεμβράνη

Πίνακας 1: Είδη κολλαγόνων στη μήτρα του υαλώδη αρθρικού χόνδρου (ποσοστά επί του συνολικού κολλαγόνου).<sup>8</sup>

#### 1.1.2.1.1 Κολλαγόνο τύπου II

Το κολλαγόνο τύπου II είναι ένα ομοιοτριμερές αποτελούμενο από τρεις  $\alpha 1(\text{II})$  αλυσίδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα γονίδιο, το COL2A1. Συντίθεται σχεδόν αποκλειστικά από χονδροκύτταρα και είναι πλήρως επεξεργάσιμο από N- και C- πρωτεϊνάσες με τον ίδιο τρόπο όπως και το προκολλαγόνο I.<sup>9</sup>

#### 1.1.2.1.2 Κολλαγόνο τύπου III

Το κολλαγόνο τύπου III ανιχνεύεται συστηματικά σε φυσιολογικά και οστεοαρθρικά δείγματα υαλώδη αρθρικού χόνδρου μέσω ανοσοφθορισμού. Με μελέτες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει βρεθεί ότι συνεντοπίζεται με κολλαγόνο τύπου II στα ίδια κλιμακωτά ινίδια και διατηρεί τον τομέα N- προπεπτιδίου. Σε οστεοαρθρικό χόνδρο το κολλαγόνο τύπου III έχει την τάση να συγκεντρώνεται στην επιφανειακή και άνω μέση ζώνη και να συντίθεται από τα χονδροκύτταρα απουσία έκφρασης του κολλαγόνου τύπου I.

#### 1.1.2.1.3 Κολλαγόνο τύπου VI

Το κολλαγόνο τύπου VI αποτελεί λιγότερο από το 2% επί των συνολικών κολλαγόνων που βρίσκονται στον χόνδρο. Το μόριο σχηματίζει ένα ετεροτριμερές, αποτελούμενο από τρεις γενετικά διαφορετικές  $\alpha$  αλυσίδες, τις  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$ ,  $\alpha 3(\text{VI})$ . Τα μονομερή του κολλαγόνου τύπου VI διατάσσονται ως διμερή και τετραμερή, τα οποία σχηματίζουν ένα ξεχωριστό δίκτυο κολλαγόνων.

Σε φυσιολογικό χόνδρο, το κολλαγόνο τύπου VI συγκεντρώνεται περικυτταρικά των χονδροκυττάρων σε όλες τις ζώνες του χόνδρου.

Στη μεσαία και στη βαθιά ζώνη το κολλαγόνο τύπου VI βρίσκεται επίσης στην ενδοεδαφική μήτρα. Έκφραση του mRNA για το κολλαγόνο τύπου VI ανιχνεύθηκε σε χονδροκύτταρα από όλες τις ζώνες του χόνδρου.

*In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι το κολλαγόνο τύπου VI έχει ικανότητες σύνδεσης με διάφορα μόρια όπως κολλαγόνο τύπου I, II και XIV καθώς και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες όπως η ντεκορίνη.<sup>24</sup>

Έχει αποδειχθεί ότι κατά την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας, η έκφραση του κολλαγόνου τύπου IV αυξάνεται, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας.<sup>23</sup>

#### 1.1.2.1.4 Κολλαγόνο τύπου IX

Το κολλαγόνο τύπου IX είναι μέλος της οικογένειας κολλαγόνων FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices). Τα κολλαγόνα της οικογένειας FACIT, πιστεύεται ότι λειτουργούν στην εξωκυττάρια μήτρα σε συνδυασμό με επιφάνειες ινιδίων κολλαγόνου. Το κολλαγόνο IX είναι ένα ετεροτριμερές αποτελούμενο από  $\alpha 1(\text{IX})$ ,  $\alpha 2(\text{IX})$ ,  $\alpha 3(\text{IX})$  αλυσίδες. Περιέχει τρία τριπλά ελικοειδή τμήματα, τα οποία διακόπτονται από μη τριπλοειδή ελικοειδή

τμήματα. Το κολλαγόνο IX ευθύνεται για την οργάνωση του δικτύου ινιδίων κολλαγόνου τύπου II. Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στα τρία γονίδια που κωδικοποιούν το κολλαγόνο τύπου IX σχετίζονται με πολλαπλή δυσπλασία επίφυσης, η οποία εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια έναρξης της οστεοαρθρίτιδας.<sup>10</sup>

#### 1.1.2.1.5 Κολλαγόνο τύπου X

Το κολλαγόνο τύπου X μαζί με τον τύπο XIII αποτελούν ένα υποσύνολο κολλαγόνων βραχείας αλυσίδας. Αποτελούνται από τρεις αλυσίδες, α1(VIII), α2 (VIII), α1(XI) και ονομάζονται βραχείας αλυσίδας λόγω των μικρών υπομονάδων τους, μοριακού βάρους 60kDa. Το κολλαγόνο τύπου X είναι ένα ομοιοτριμερές από α1(X) αλυσίδες. Το κολλαγόνο X εκφράζεται τόσο σε υπερτροφικά εμβρυικά και ενήλικα χονδροκύτταρα, και είναι επομένως ένας χρήσιμος δείκτης για την ωρίμανση των χονδροκυττάρων και υπερτροφία. Θεωρείται ότι παρέχει ένα ικρίωμα για την αποτροπή της κατάρρευσης της υπερτροφικής εξωκυτταρικής μήτρας κατά την ενδοχονδρική οστεοποίηση.<sup>11,12</sup>

#### 1.1.2.1.6 Κολλαγόνου τύπου XI

Το κολλαγόνου τύπου XI, όπως και το κολλαγόνο II είναι ινώδες και αποτελεί το 3% των κολλαγόνων που βρίσκονται στον χόνδρο. Είναι ένα ετεροτριμερές από τρεις διακριτές α αλυσίδες, τις α1(XI), α2(XI) και α3(XI). Η σύσταση των αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου XI αλλάζει κατά την ωρίμανση του υαλώδη αρθρικού χόνδρου μέσω υποκατάστασης της 1α(XI) από 1(V) ειδική αλυσίδα. Ο ρόλος του κολλαγόνου τύπου XI θεωρείται ότι είναι οι σταυροειδείς δεσμοί που σχηματίζει με το κολλαγόνο τύπου II, προκειμένου να ρυθμίσει το μέγεθος των ινιδίων κολλαγόνου τύπου II που σχηματίζεται.<sup>13</sup>

### Γλυκοζαμινογλυκάνες

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ενός δισακχαρίτη που αποτελείται από μια N-ακετυλιωμένη ή μια N-θειωμένη εξοζαμίνη μαζί με είτε ουρονικό οξύ (γλυκουρονικό οξύ ή ιδουρονικό οξύ) ή γαλακτόζη. Το υαλουρονικό στερείται θειικές ομάδες, αλλά το υπόλοιπο των γλυκοζαμινογλυκανών περιέχουν θειικές ομάδες σε διάφορες θέσεις.

#### 1.1.2.2.1 Θειική Χονδροϊτίνη

Ένας τύπος γλυκοζαμινογλυκάνης που ορίζεται από τη μονάδα δισακχαρίτη (GalNAcβ1-4GlcΑβ 1-3)η, τροποποιημένη με θείο μέσω εστερικού δεσμού σε συγκεκριμένες θέσεις. Συναντάται συνήθως ομοιοπολικά συνδεδεμένη με έναν πρωτεϊνικό πυρήνα πρωτεογλυκάνης.

Οι πρωτεογλυκάνες που περιέχουν θειική χονδροϊτίνη σχηματίζουν μια οικογένεια μορίων που ονομάζονται λεκτικάνες και συμπεριλαμβάνουν την αγκρεκάνη, μπρεβικάνη και νευρκάνη. Έλλειψη θειικής χονδροϊτίνης στο χόνδρο είναι αίτιο της οστεοαρθρίτιδας.<sup>20</sup>

Τύπος Θειικής Χονδροϊτίνης	Ακολουθία Δισακχαρίτη	Πηγή
A	GlcAβ1–3GalNAc4S	Χόνδρος, λοιποί ιστοί
B	IdoAα1–3GalNAc4S	Δέρμα, Τένοντας
C	GlcAβ1–3GalNAc6S	Χόνδρος, λοιποί ιστοί
D	GlcA2Sβ1–3GalNAc6S	Χόνδρος καρχαρία, εγκέφαλος
E	GlcAβ1–3GalNAc4,6diS	Καλαμάρι

Πίνακας 2: Τύποι θειικής χονδροϊτίνης και η πηγή προέλευσης τους.<sup>20</sup>

#### 1.1.2.2.2 Θειική Κερατάνη

Ένας τύπος πολυ-N-ακετυλλακτοζαμίνης [Galβ1-4GlcNAcβ 1-3] η με θειικούς εστέρες στο C-6 της N-ακετυλογλυκοζαμίνης και των υπολειμμάτων γαλακτόζης, που συναντώνται ως πλευρικές αλυσίδες στη πρωτεογλυκάνη θειικής κερατάνης.<sup>20</sup>

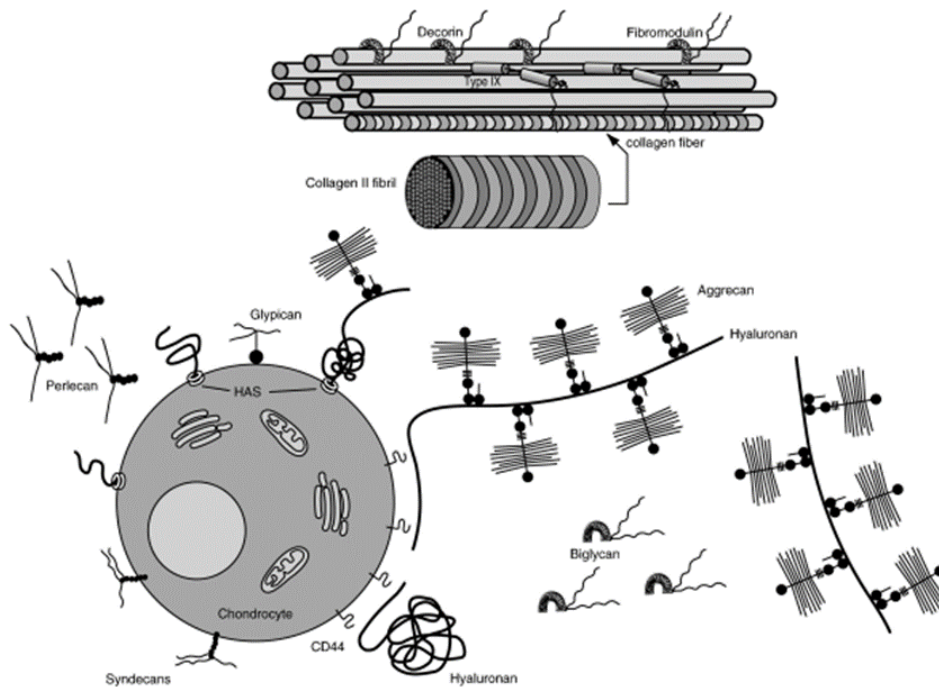
#### 1.1.2.2.3 Υαλουρονικό Οξύ

Το υαλουρονικό οξύ διαφέρει από τα υπόλοιπα είδη γλυκοζαμινογλυκανών καθώς δεν έχει θειωμένα τμήματα, έχει πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος έως και εκατομμύρια Daltons και το μήκος του μπορεί να φτάσει πάνω από 15μm. Ακόμη, συντίθεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω της υαλουρονικής συνθάσης (HAS), σε αντίθεση με τις υπόλοιπες γλυκοζαμινογλυκάνες που συντίθενται στο σύμπλεγμα Golgi. Τα θηλαστικά κατέχουν τρία HAS γονίδια, τα HAS1, HAS2, HAS3 σε διαφορετικές περιοχές του χρωμοσώματος. Λόγω του τρόπου σύνθεσης του, το υαλουρονικό εξέρχεται κατευθείαν στον εξωκυττάριο χώρο και βρίσκεται περικυτταρικά των χονδροκυττάρων.<sup>16,19</sup>

### Πρωτεογλυκάνες

Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από ένα πυρήνα πρωτεΐνης πάνω στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι γραμμικά πολυσακχαρίδια που συντίθεται ως επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαριτών.





Εικόνα 5: Επισκόπηση των πρωτεογλυκανών που υπάρχουν στον υαλώδη αρθρικό χόνδρο.<sup>15</sup>

Οι πρωτεογλυκάνες δημιουργούν ένα δίκτυο, το οποίο είναι πεπλεγμένο με το οργανωμένο δίκτυο των κολλαγόνων. Η παρουσία θειικών ομάδων και καρβοξυλομάδων στη δομή των πρωτεογλυκανών, τις φορτίζουν αρνητικά, το οποίο προσδίδει στην εξωκυττάρια μήτρα ένα σταθερής πυκνότητας αρνητικό φορτίο. Εξαιτίας αυτού του φορτίου, η μήτρα προσροφάει υγρό, διογκώνοντας τον ιστό ώστε να διατηρείται ισορροπία. Η διόγκωση εξισορροπείται με τον ελαστικό περιορισμό που προκύπτει από το δίκτυο κολλαγόνων. Καθώς η παρουσία των πρωτεογλυκανών συμβάλλει στην αναρρόφηση του νερού, προκύπτει ότι η έλλειψη τους μπορεί να οδηγήσει σε ανικανότητα συμπίεσης του νερού και επομένως ακατάλληλη μηχανική λειτουργία του χόνδρου, η οποία παρουσιάζεται σε προχωρημένα στάδια ασθενειών όπως η οστεοαρθρίτιδα.

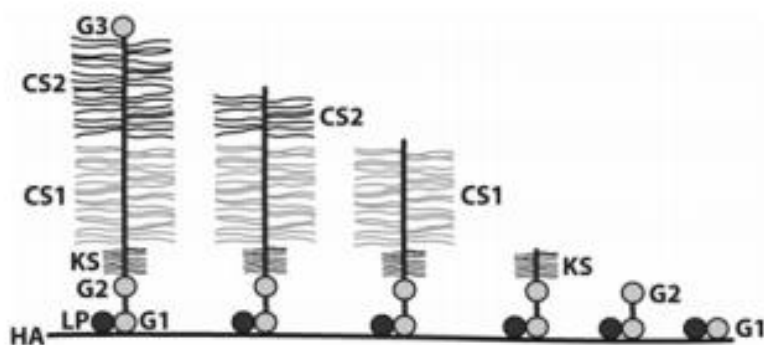
#### 1.1.2.3.1 Αγгреκάνη

Η αγгреκάνη είναι σπονδυλωτή πρωτεογλυκάνη με πολλαπλές λειτουργικές περιοχές. Ο πυρήνας της αποτελείται από τρεις σφαιρικές περιοχές, τις G1, G2 και G3, κάθε μια από τις οποίες περιέχει τμήματα κυστεΐνης, τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Η περιοχή G1 βρίσκεται στο αμινο-άκρο του πρωτεΐνικού πυρήνα και αλληλεπιδρά με το υαλουρονικό οξύ. Η περιοχή G2 δεν αλληλεπιδρά με το υαλουρονικό οξύ και ο ρόλος της δεν έχει βρεθεί ακόμα. Η περιοχή G3 βρίσκεται στο καρβοξύ - άκρο του πρωτεΐνικού πυρήνα και είναι σημαντική για την μετά-μεταφραστική επεξεργασία του πρωτεΐνικού πυρήνα της αγгреκάνης. Η αγгреκάνη έχει τρεις περιοχές υπεύθυνες για την πρόσδεση γλυκοζαμινογλυκανών. Η περιοχή πρόσδεσης της θειικής κερατάνης βρίσκεται κοντά στην περιοχή G2 και αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα, ο αριθμός των οποίων διαφέρει ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Η περιοχή πρόσδεσης της θειικής χονδροϊτίνης χωρίζεται σε δύο τομείς, τους CS1 και CS2. Ο τομέας CS1 βρίσκεται δίπλα στον τομέα της

θειικής κερατάνης και στον άνθρωπο παρουσιάζει πολυμορφισμό με αποτέλεσμα διαφορετικά άτομα να φέρουν διαφορετικό αριθμό αλυσίδων θειικής χονδροϊτίνης.

Τα μόρια αγγρεκάνης δεν υπάρχουν μεμονωμένα στην εξωκυττάρια μήτρα αλλά ως συσσωματώματα πρωτεογλυκανών. Κάθε συσσωμάτωμα αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα υαλουρονικού οξέος, πάνω στην οποία προσδένονται μέχρι 100 μόρια αγγρεκάνης μέσω μιας πρωτεΐνης σύνδεσης. Η δομή κάθε συσσωματώματος εξαρτάται από το μήκος του υαλουρονικού οξέος, την ποσότητα της πρωτεΐνης σύνδεσης και το βαθμό επεξεργασίας των αγγρεκανών.

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες των αγγρεκανών προσφέρουν την υψηλή πυκνότητα ανιονικού φορτίου η οποία προσδίδει στις αγγρεκάνες μοναδικές ωσμωτικές ιδιότητες. Η απώλεια της ακεραιότητας του χόνδρου στην αρθρίτιδα σχετίζεται με διαταραχές στη λειτουργία των αγγρεκανών, που οφείλονται είτε σε πρωτεολυτική διάσπαση του βασικού πυρήνα πρωτεΐνης της αγγρεκάνης, η οποία μειώνει το ανιονικό φορτίο, είτε λόγω διάσπασης του υαλουρονικού οξέος, το οποίο μειώνει το μέγεθος των συσσωματωμάτων. <sup>14</sup>



Εικόνα 6: Η δομή της αγγρεκάνης <sup>14</sup>

#### 1.1.2.3.2 Πρωτεογλυκάνες ειδικές για τη βασική μεμβράνη

Η βασική μεμβράνη είναι ένα οργανωμένο στρώμα της εξωκυττάριας μήτρας των ιστών και αποτελείται κυρίως από λαμινίνη, εντακτίνη, κολλαγόνα και πρωτεογλυκάνες. Οι μεμβράνες αυτές, περιέχουν τουλάχιστον τέσσερις τύπους πρωτεογλυκανών ανάλογα με τον τύπο του ιστού: περλεκάνη, αγρίνη, κολλαγόνο τύπου XVIII, το οποίο φέρει αλυσίδες CS στο χόνδρο και λεπρεκάνη, η οποία επίσης φέρει CS αλυσίδες.

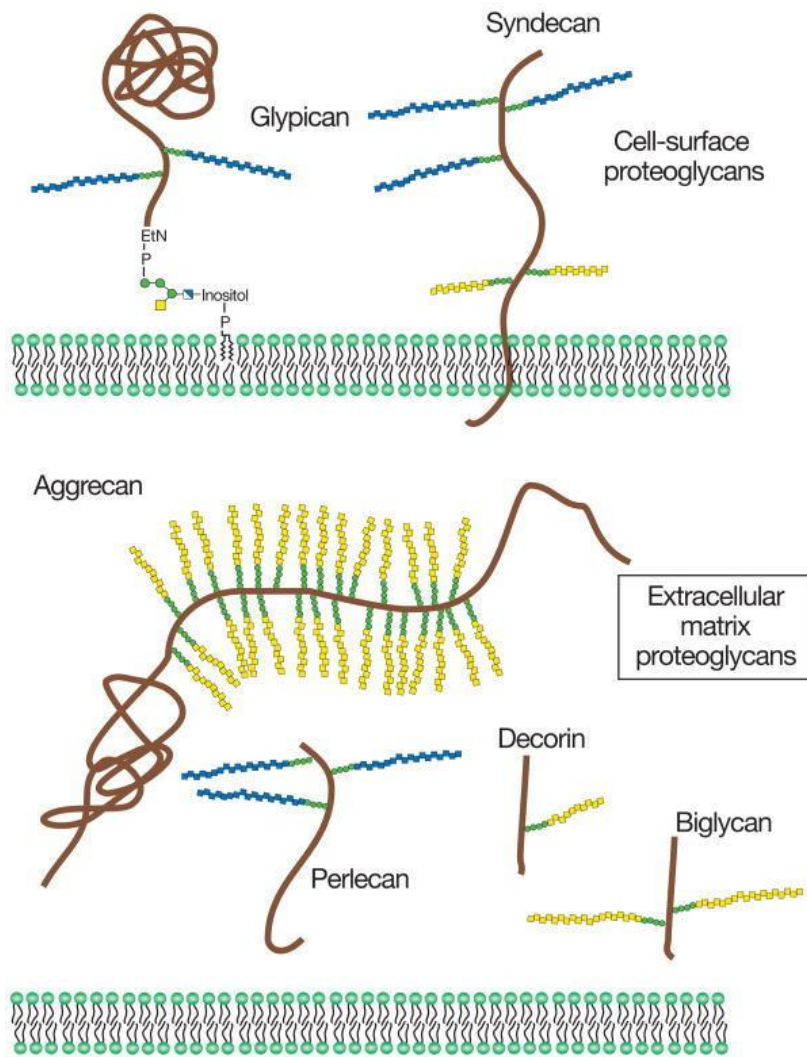
#### 1.1.2.3.3 Περλεκάνη

Η περλεκάνη είναι μια μεγάλη ηπαράνη θειικής πρωτεογλυκάνης με μάζα 400-450 kD και αποτελείται από πολλούς τομείς που έχουν πολλές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, περιέχει πέντε τομείς που περιλαμβάνουν μονάδες που χρησιμοποιούνται από διακριτές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες, από την πρόσληψη λιπιδίων και το μεταβολισμό για κυτταρική προσκόλληση και κυτταρική ανάπτυξη. Μελέτες ανοσόχρωσης ιστών υαλώδους χόνδρου και χονδροσαρκώματος έχουν δείξει ότι η περλεκάνη κυρίως αποτίθεται και διατηρείται στη περικυτταρική μήτρα των χονδροκυττάρων.

Αν και ο ακριβής ρόλος της περλεκάνης στο χόνδρο είναι άγνωστη, οι πρωτεΐνες περλεκάνης και το αγγελιαφόρο RNA μαζί με αλυσίδες θειικής ηπαρίνης έχουν ανιχνευτεί σε σημαντικά επίπεδα κατά την ανάπτυξη του χόνδρου ποντικών. <sup>21,22</sup>

#### 1.1.2.3.4 Μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη

Αυτό το είδος πρωτεογλυκανών χαρακτηρίζεται από πολλαπλές γειτονικές περιοχές οι οποίες φέρουν ένα κοινό μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη. Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες υποοικογένειες βάσει την οργάνωση των γονιδίων τους, τον αριθμό των μοτίβων πλούσιων σε λευκίνη και τον τύπο υποκατάστασης της αλυσίδας γλυκοζαμινογλυκανών. Στην περίπτωση των δεκορίνη, διγλυκάνη, φιμπρομοντουλίνη και λουμικάνη υπάρχουν δέκα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη τα οποία πλαισιώνονται από τομείς δεσμευμένους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δεκορίνη και η διγλυκάνη δεν περιέχουν θειικές αλυσίδες εντός της κεντρικής περιοχής λευκίνης, ενώ διαθέτουν σημεία προσκόλλησης για αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης στο αμινοτελικό τους άκρο. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η διγλυκάνη συσσωρεύεται με την αύξηση της ηλικίας του χόνδρου, ενώ η δεκορίνη υπάρχει ανεξάρτητα από την ηλικία. Αντιθέτως, η κεντρική περιοχή πλούσια σε λευκίνη της ινωδομοντουλίνης και της λουμικάνης διαθέτει περιοχές που περιέχουν ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν να υποστούν θείωση και να σχηματίσουν γλυκοζαμινογλυκάνες θειικής κερατάνης. Η ινωδομοντουλίνη και η λουμικάνη συναντώνται ως μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη σε νεαρό χόνδρο, ενώ ως γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε λευκίνη σε ενήλικο χόνδρο.



Εικόνα 7 : Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από ένα πυρήνα πρωτεΐνης (καφέ χρώμα) και ένα ή περισσότερα ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών(μπλε,κίτρινο χρώμα). Οι μεμβρανικές πρωτεογλυκάνες είτε καλύπτουν τη μεμβράνη πλάσματος (μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I), ή συνδέονται με μια άγκυρα GPI. Οι πρωτεογλυκάνες εξωκυττάριας μήτρας συνήθως εκκρίνονται, αλλά μερικές πρωτεογλυκάνες μπορεί να διασπώνται πρωτεολυτικά και να αποβάλλονται από την κυτταρική επιφάνεια (δεν φαίνεται στην εικόνα).<sup>20</sup>

## Φιμπρονεκτίνη

Η φιμπρονεκτίνη είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία υπάρχει σε χαμηλά επίπεδα στην εξωκυττάρια μήτρα του φυσιολογικού χόνδρου. Η βασικότερη λειτουργία της είναι ο ρόλος της στην προσκόλληση και μετανάστευση των κυττάρων και έχει προταθεί ότι η φιμπρονεκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο την επιδιόρθωση συνδετικών ιστών. Η φιμπρονεκτίνη εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της χονδρογένεσης και εκφράζεται στον φυσιολογικό χόνδρο και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά της μήτρας.

Η συγκέντρωση της αυξάνεται στον οστεοαρθρικό χόνδρο και η έκφραση της διεγείρεται σε μηχανική υπερφόρτιση. In vitro, η φιμπρονεκτίνη προωθεί την προσκόλληση υποστρώματος, τη διασπορά και επιμήκυνση των κυττάρων, την αναδιοργάνωση της

ενδοκυττάριας ακτίνης σε ίνες και το σχηματισμό εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions).<sup>17,18</sup>

## **Αρθρικό Υγρό**

Το αρθρικό υγρό αποτελείται από νερό και ανόργανα άλατα νατρίου, ασβεστίου, χλωρίου και καλίου. Το περισσότερο νερό στον ιστό περιέχεται στους πόρους της εξωκυττάριας μήτρας αλλά διαχέεται και σε όλο τον όγκο του ιστού. Μέσω της διάχυσης αυτής επιτελούνται δύο λειτουργίες : αρχικά ο χόνδρος λαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά καθώς δεν τον διαπερνούν αγγεία και δεύτερον κατά τη μηχανική καταπόνηση του ιστού, το υγρό διαχέεται έξω από τον ιστό ώστε ο ιστός να μην καταστρέφεται.

## **Χονδροκύτταρα**

Τα χονδροκύτταρα είναι το μόνο είδος κυττάρων που συναντάται στον αρθρικό υαλώδη χόνδρο και προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Αποτελούν λιγότερο από 5 – 10% του συνολικού όγκου του ιστού. Τα χονδροκύτταρα δεν συμβάλλουν άμεσα στις μηχανικές ιδιότητες του χόνδρου αλλά μπορούν να αισθανθούν και να αποκριθούν σε μηχανικά ερεθίσματα μέσα στο μεμονωμένο μικροπεριβάλλον τους. Ακόμη, χονδροκύτταρα από διαφορετικές ζώνες του αρθρικού χόνδρου αποκρίνονται διαφορετικά στις μηχανικές καταπονήσεις και παρουσιάζουν διάφορες μορφολογίες. Τα ώριμα χονδροκύτταρα είναι εγκλωβισμένα σε εξωκυττάρια μήτρα μεγάλης πυκνότητας και δεν έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύσουν ή να πολλαπλασιαστούν σε σημαντικό βαθμό, όπως τα κύτταρα οστών, περιορίζοντας τις αναγεννητικές ικανότητες του χόνδρου μετά από τραυματισμούς.<sup>6</sup>

## **1.2. Αλληλεπιδράσεις Χονδροκυττάρων – Εξωκυττάριας Μήτρας**

Μόρια από την εξωκυττάρια μήτρα ρυθμίζουν όχι μόνο τη κυτταρική συμπεριφορά με την παροχή σημάτων στα κύτταρα μέσω δέσμμευσης ιντεγκρινών ή άλλων υποδοχέων αλλά και με την πρόσδεση, αποθήκευση και απελευθέρωση μεσολαβητών.

Τα χονδροκύτταρα έχουν υποδοχείς για τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, πολλοί από τους οποίους αποκρίνονται σε μηχανική διέγερση και καταβολικούς ενεργοποιητές . Αυτά περιλαμβάνουν: τις ιντεγκρίνες , υποδοχείς για φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου II που διεγείρουν την έκφραση πρωτεϊνών , φλεγμονωδών κυτταροκινών , χημειοκινών ως μηχανισμούς ενίσχυσης ανάδρασης άπαξ έχει καθιερωθεί η αποικοδόμηση της μήτρας.<sup>28</sup>

Επίσης φαίνεται ότι υπάρχει μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της εξωκυττάριας μήτρας και των μεσολαβητών σε ενδοκυτταρικό επίπεδο. Η δέσμμευση των ιντεγκρινών των χονδροκυττάρων από συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, όπως η φιμπρονεκτίνη οδηγεί στον ενδοκυτταρικό σχηματισμό πλακών εστιακής προσκόλλησης. Η δημιουργία αυτών των πλακών εστιακής προσκόλλησης είναι σημαντική ώστε τα χονδροκύτταρα να αποκρίνονται σε αυξητικούς παράγοντες όπως οι FGF και IGF-I. Η κυτταρική προσκόλληση μέσω ιντεγκρινών ρυθμίζει την ενεργοποίηση υποδοχέων για

αυξητικούς παράγοντες. Υπάρχει λοιπόν, μια αμοιβαία εξάρτηση μεταξύ της πρόσδεσης χονδροκυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα και της ρύθμισης των χονδροκυττάρων από αυξητικούς παράγοντες. Έτσι, κατά την ανάπτυξη των νέων ικριωμάτων για την ιστομηχανική, τα κύτταρα δεν θα πρέπει να παρέχονται μόνο με το σωστή τρισδιάστατη αρχιτεκτονική αλλά και με επαρκή σήματα τόσο από την ECM και αυξητικούς παράγοντες. Χωρίς αυτά τα σήματα, δε θα μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αναγέννηση του χόνδρου. Στη διάρκεια της διαδικασίας αναγέννησης, αναμένεται ότι τα ίδια τα χονδροκύτταρα θα παράγουν τα απαραίτητα σήματα για περαιτέρω αναγέννηση του χόνδρου και ομοιόσταση. <sup>24</sup>

### **1.3. Στόχοι της Διπλωματικής**

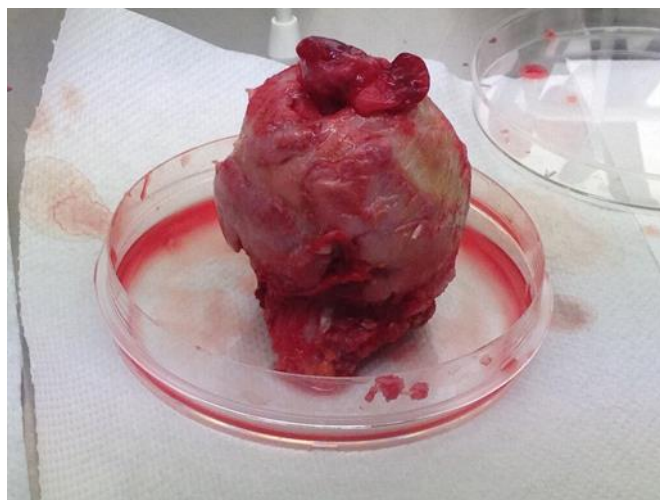
Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη της επίδρασης διαφόρων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του αρθρικού χόνδρου σε χονδροκύτταρα όταν αυτά καλλιεργούνται σε γέλες αλγινικού οξέους *in vitro*. Η εργασία αυτή έχει ως στόχο, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της ιστομηχανικής και χρησιμοποιώντας ικριώματα, κύτταρα και βιομόρια, να γίνει μια βαθύτερη κατανόηση της λειτουργίας διαφόρων μορίων που συναντώνται στο περιβάλλον των χονδροκυττάρων μέσω της επίδρασης τους στα σηματοδοτικά μονοπάτια των χονδροκυττάρων. Σκοπός είναι η ανάπτυξη ικριωμάτων και η επιλογή ερεθισμάτων όσο το δυνατόν ιδανικότερα για τη δημιουργία καλλιέργειας χονδροκυττάρων που θα προωθεί την επιβίωση αλλά και κυτταρική ανάπτυξη και θα προωθεί την βιοσύνθεση συστατικών του χόνδρου με τελικό σκοπό την επιδιόρθωση πληγών στον αρθρικό χόνδρο. Επίσης, η κατανόηση της λειτουργίας των μορίων αυτών καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες και των αλλαγών που συμβαίνουν σε ασθένειες του αρθρικού χόνδρου, όπως η οστεοαρθρίτιδα συμβάλλουν στην ανακάλυψη φαρμάκων, αλλά και τεχνικών για την επιτυχημένη θεραπεία ή αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου. Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής, αναπτύχθηκαν διάφορα ικριώματα με βάση το αλγινικό οξύ, τα οποία έδρασαν σαν φορείς συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου σε χονδροκύτταρα και στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση τους στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αλλά και στην έκκριση κυτταροκινών. Τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας που χρησιμοποιήθηκαν συναντώνται είτε στον υγιή χόνδρο είτε σε προχωρημένα στάδια της οστεοαρθρίτιδας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν σαφείς διαφορές στην απόκριση των χονδροκυττάρων σε διαφορετικά ερεθίσματα και μπορούν άμεσα να χρησιμοποιηθούν για μια στοχευμένη και εκτενέστερη μελέτη συγκεκριμένων μορίων στη σηματοδότηση των χονδροκυττάρων και το ρόλο τους στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας .

## 2. Πειραματικές Μέθοδοι

### 2.1 Απομόνωση και Καλλιέργεια Χονδροκυττάρων

#### 2.1.1. Απομόνωση Χονδροκυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι πρωτογενή ανθρώπινα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα. Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν από γόνατα και ισχία ασθενών εντός 12 ωρών έπειτα από αρθροπλαστική επέμβαση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α.1.



*Εικόνα 8: Δείγμα ανθρώπινου οστεοαρθρικού χόνδρου από άρθρωση γονάτου*

#### 2.1.2. Καλλιέργεια Χονδροκυττάρων

Τα χονδροκύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικά πλαστικά δοχεία, τις φλάσκες, οι οποίες φέρουν ειδική επιφάνεια πάνω στην οποία προσδένονται τα κύτταρα και πολλαπλασιάζονται. Οι φλάσκες με τα καλλιεργημένα κύτταρα τοποθετούνται σε υγροποιημένο κλίβανο επώασης σε θερμοκρασία 37 °C και συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα 5% CO<sub>2</sub>. Ο διαχωρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πυκνότητα των κυττάρων εντός της φλάσκας καλλιέργειας είναι τόση ώστε να καλύπτεται περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας πάνω στην οποία προσδένονται τα κύτταρα. Τα κύτταρα, τα οποία απομονώνονται από ιστούς συνήθως ακολουθούν τη διαδικασία του παγώματος προκειμένου να είναι διαθέσιμα και να μπορούν να ανασυρθούν όποτε κάποιο πειραματικό πρωτόκολλο απαιτεί την χρήση τους.

## **2.2. Μοντέλα Εξωκυττάριας Μήτρας Χόνδρου με Βάση Γέλες Αλγινικού Οξέως**

### **2.2.1. Συστατικά της Εξωκυττάριας Μήτρας του Χόνδρου Υπό Εξέταση**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του αρθρικού χόνδρου σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα για μεγάλο χρόνο έκθεσης in vitro. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν 5 διαφορετικά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας του υαλώδους αρθρικού χόνδρου και δημιουργήθηκαν 6 διαφορετικά είδη βιουλικών με βάση το αλγινικό οξύ, όπως περιγράφεται στο παράρτημα Α.7.

Τα συστατικά που επιλέχθηκαν ήταν χονδροϊτίνη 6 (CS6), θειική χονδροϊτίνη Α (CSA), φιμπρονεκτίνη (FN), υαλουρονικό οξύ (HA), κολλαγόνο τύπου Ι (COL Ι).

Η θειική χονδροϊτίνη 6 (CS6) και η θειική χονδροϊτίνη Α (CSA) είναι γλυκοζαμινογλυκάνες που βρίσκονται φυσιολογικά στην εξωκυττάρια μήτρα και αποτελούν συστατικά των πρωτεογλυκανών, οι οποίες λόγω του αρνητικού φορτίου τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναρρόφηση του αρθρικού υγρού και στην φυσιολογική λειτουργία του χόνδρου.

Η θειική χονδροϊτίνη έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεογλυκανών <sup>44</sup> ενώ φαίνεται να έχει χονδροπροστατευτικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο.<sup>45,46</sup>

Η φιμπρονεκτίνη εκφράζεται στον φυσιολογικό χόνδρο και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά της μήτρας. Η συγκέντρωσή της αυξάνεται στον οστεοαρθρικό χόνδρο και η έκφρασή της διεγείρεται σε μηχανική υπερφόρτιση.

Το υαλουρονικό οξύ είναι η σημαντικότερη γλυκοζαμινογλυκάνη του χόνδρου και συστατικό της αγκρεκάνης. Ενέσεις υαλουρονικού οξέος σε οστεοαρθρικές αρθρώσεις έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την βισκοελαστικότητα<sup>42</sup> ενώ η ενσωμάτωση υαλουρονικού οξέος σε γέλες αλγινικού οξέος προωθεί την επιδιόρθωση πληγών στον χόνδρο.<sup>43</sup>

Το κολλαγόνο τύπου Ι, δεν συναντάται στον φυσιολογικό χόνδρο αλλά παράγεται από τα χονδροκύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής, όπως η οστεοαρθρίτιδα, έναντι του κολλαγόνου τύπου ΙΙ.



Επομένως, τα υλικά που δημιουργήθηκαν ήταν :

- i. αλγινικό οξύ 1,2% w/v (Alginate)
- ii. αλγινικό οξύ 1,2% w/v & 10% θειική χονδροϊτίνη 6 (CS6)
- iii. αλγινικό οξύ 1,2% w/v & 10% θειική χονδροϊτίνη A (CSA)
- iv. αλγινικό οξύ 1,2% w/v & 10% φιμπρονεκτίνη (FN)
- v. αλγινικό οξύ 1,2% w/v & 10% υαλουρονικό οξύ (HA)
- vi. αλγινικό οξύ 1,2% w/v & 10% κολλαγόνο τύπου I (COL I)

Σε κάθε δισκίο εγκλείστηκαν 50.000 κύτταρα και καλλιεργήθηκαν εντός των δισκίων για 11 ημέρες.

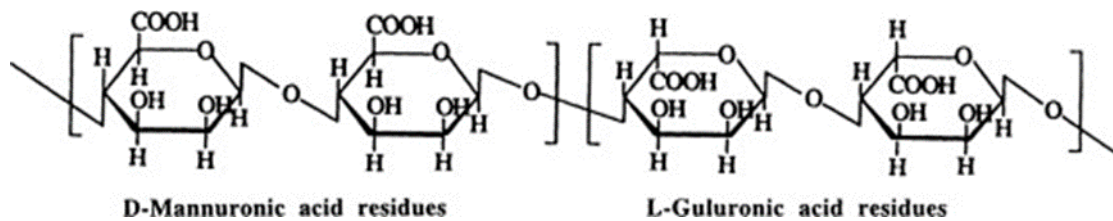
Οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν για 6 χρονικά σημεία : 1<sup>η</sup> μέρα, 3<sup>η</sup> μέρα, 5<sup>η</sup> μέρα, 7<sup>η</sup> μέρα, 9<sup>η</sup> μέρα, 11<sup>η</sup> μέρα από την ημέρα εγκλεισμού των κυττάρων στις γέλες αλγινικού οξέος.

## 2.2.2. Προετοιμασία των Γελών Αλγινικού Οξέως

### ■ Αλγινικό Οξύ

Το αλγινικό οξύ (alginic acid) είναι ένα υδροκολλοειδές, υδατοδιαλυτό βιοπολυμερές, το οποίο συναντάται στα θαλάσσια φύκη και εκχυλίζεται από την οικογένεια των καφέ αλγών (Phaeophyceae), συμπεριλαμβανομένων των *Laminaria hyperborean*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* και *Macrocystis pyrifera*, μέσω επεξεργασίας με αλκαλικά διαλύματα, συνήθως υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Το αλγινικό οξύ ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από τον E.C. Stanford το 1881. Αυτό το πολυσακχαρίδιο αναγνωρίστηκε ως δομικό συστατικό της θαλάσσιας καφέ γέλης (Phaeophyceae), όπου αποτελεί έως το 40% της στερεής μάζας και συναντάται κυρίως ενδοκυτταρικά του γλυκράσματος (mucilage, ένα ζελατινώδες συστατικό διαφόρων φυτών που περιέχει πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια) ως ένα αδιάλυτο μείγμα αλάτων ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου. Η παρουσία του αλγινικού οξέος παρέχει μηχανική αντοχή και ευλυγισία στα θαλάσσια φύκη και λειτουργεί ως αποθεματικό νερού προστατεύοντας από αφυδάτωση όταν τα φύκη έρθουν σε επαφή με τον αέρα. Έτσι, το αλγινικό οξύ μπορεί να αντιστοιχηθεί με τη κυτταρίνη και τις πηκτίνες στα χερσαία φυτά.

Τα αλγινικά είναι μια οικογένεια γραμμικών μη διακλαδισμένων πολυσακχαριτών που περιέχουν διακυμαινόμενες ποσότητες δύο ουρονικών σακχάρων, του 1,4' β-D-μαννουρονικού οξέος (M) και του α-L-γουλουρονικού οξέος (G) .



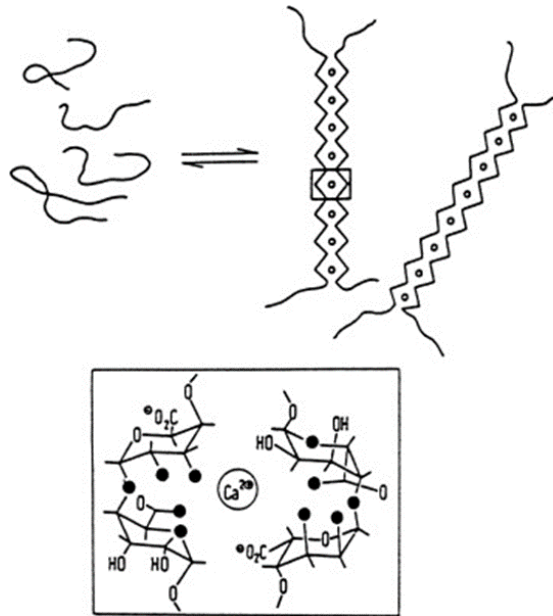
Εικόνα 9: Αριστερά, μαννουρονικό οξύ (M), Δεξιά, γουλουρονικό οξύ (G) <sup>39</sup>

Τα δύο σάκχαρα μπορούν να ποικίλουν ευρέως ως προς τη σύνθεση και αλληλουχία και διατάσσονται σε ομάδες κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτές οι ομοπολυμερείς περιοχές του β-D-μαννουρονικού οξέος και α-L-γουλουρονικού οξέος είναι διασκορπισμένες με περιοχές με εναλλασσόμενες δομή (β-D-μαννουρονικού οξέος-α-L-γουλουρονικού οξέος). Η σύνθεση και η έκταση των αλληλουχιών και το μοριακό βάρος καθορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των αλγινικών αλάτων. Οι περιοχές του γουλουρονικού οξέος (G) προσδίδουν την ικανότητα σχηματισμού γέλης, ενώ οι μονάδες (MM), (MG) παρέχουν ευελιξία στις αλυσίδες του ουρονικού οξέος. Η μεταβλητότητα του μοριακού βάρους εξαρτάται από τον οργανισμό και ιστό από τον οποίο απομονώνονται τα αλγινικά. Για παράδειγμα, τα αλγινικά που παρασκευάζονται από ίνες φυκών *L. hyperborea* περιέχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υπολείμματα α-L-γουλουρονικού οξέος ενώ τα αλγινικά από *A. nodosum* και *L. japonica* έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε α-L-γουλουρονικό οξύ. Τα αλγινικά δεν έχουν μια σταθερή επαναλαμβανόμενη μονάδα και η κατανομή των μονομερών κατά μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς δεν μπορεί να περιγραφεί από την κατανομή Bernoulli.

## Γέλες Αλγινικού Οξέως

Υδρογέλες ή ικρίώματα αλγινικού μπορούν να παρασκευαστούν με ένα εύρος παραγόντων σταυροσύνδεσης, που είναι κυρίως ουσίες με βάση το ασβέστιο.

Τα σύμπλοκα του γουλουρονικού οξέος ενός μορίου αλγινικού οξέος ενώνονται με τα αντίστοιχα σύμπλοκα άλλου μορίου αλγινικού οξέος με τη βοήθεια των ιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>). Τα ιόντα ασβεστίου ταιριάζουν στη δομή του γουλουρονικού οξέος όπως τα αυγά στην αυγοθήκη. Με αυτό τον τρόπο, τα πολυμερή του αλγινικού οξέος ενώνονται σχηματίζοντας τη γέλη.



Εικόνα 10: Πολυμερισμός αλγινικού οξέος <sup>39</sup>

Τα ικρίωματα αλγινικού διερευνώνται ενεργά για την ικανότητά τους να διευκολύνουν την αναγέννηση ιστών και οργάνων, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών οστών, του δέρματος, των νεύρων, του ήπατος και του παγκρέατος.

Για την προετοιμασία του αλγινικού χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένων λυοφιλοποίηση, ηλεκτρόκλυση, σταυροσύνδεση, ιοντική διασύνδεση, κελί διασταύρωσης, πολυμερισμός ελευθέρων ριζών. Η παραδοσιακή μέθοδος για την παραγωγή ικριωμάτων αλγινικού βιοπολυμερούς είναι η μέθοδος της ξηρής λυοφιλοποίησης.

Η σύσταση, το μοριακό βάρος, την καθαρότητα και η συγκέντρωση αλγινικού που χρησιμοποιείται στα ικρίωματα παίζει το μεγαλύτερο ρόλο στην παροχή μηχανικής αντοχής, βιοσυμβατότητας, κυτταρική πρόσφυσης, πολλαπλασιασμού και οστεογόνο διαφοροποίηση.

Οι υδρογέλες αλγινικού, είναι τρισδιάστατα εγκάρσια συνδεδεμένα δίκτυα που αποτελούνται από υδρόφιλα πολυμερή με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Η εγκάρσια σύνδεση των υδρόφιλων πολυμερών είναι είτε χημική είτε φυσική και οι φυσικοχημικές ιδιότητες τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο σύνδεσης και την ποσότητα των παραγόντων εγκάρσιας σύνδεσης. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και μέθοδος παρασκευής του αλγινικού πηκτώματος περιλαμβάνει διασταυρούμενη σύνδεση με χλωριούχο ασβέστιο, ανθρακικό ασβέστιο, θειικό ασβέστιο και εξαμεταφωσφορικό νάτριο (ιοντικοί παράγοντες σταυρωτής σύνδεσης). Έχει αποδειχθεί ότι οι υδρογέλες αλγινικού βελτιώνουν το νεο-σχηματισμό χόνδρου και οστού. Οι υδρογέλες αλγινικού χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα για αρκετές βιοϊατρικές εφαρμογές όπως η μηχανική των ιστών, η μεταφορά φαρμάκων και η επούλωση τραυμάτων, λόγω της δομικής ομοιότητας τους με τις εξωκυτταρικούς ιστούς.

Οι αλγινικές γέλες έχουν πλεονεκτήματα στην αναγέννηση ιστών λόγω της ικανότητάς τους να εισάγονται μέσα στο σώμα με ελάχιστο επεμβατικό τρόπο, την ικανότητά τους να γεμίζουν ακανόνιστου σχήματος πληγές και την ευκολία της χημικής τροποποίησης με συνδέτες προσκόλλησης και δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης παραγόντων επαγωγής ιστού.

Κατά το πρωτόκολλο δημιουργίας ικριωμάτων αλγινικού οξέος σε μορφή δισκίων με χονδροκύτταρα, αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα αποστειρωμένου αλγινικού οξέος μέσα στο οποίο διαλύονται τα κύτταρα στην επιθυμητή συγκέντρωση και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό πολυμερίζεται μέσω του αποστειρωμένου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου στο επιθυμητό καλούπι.

Κατά το πρωτόκολλο δημιουργίας ικριωμάτων αλγινικού οξέος σε μορφή δισκίων με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και χονδροκύτταρα, αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα αποστειρωμένου αλγινικού οξέος, στο οποίο προστίθεται κάθε διάλυμα με το εκάστοτε επιθυμητό συστατικό καθώς και τα χονδροκύτταρα στην επιθυμητή συγκέντρωση. Το διάλυμα πολυμερίζεται μέσω του αποστειρωμένου διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου στο επιθυμητό καλούπι.

### **2.2.3. Βιωσιμότητα Χονδροκυττάρων Μέσα σε Γέλες Αλγινικού Οξέως**

Για τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων απαιτείται ο αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος και η συλλογή των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α.6.

Τα ζωντανά κύτταρα μετρούνται στο αιμοκυτταρόμετρο σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α.3.

### **2.2.4. Απόκριση Χονδροκυττάρων Μέσα σε Γέλες Αλγινικού Οξέως**

Για την συλλογή των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, απαιτείται ο αποπολυμερισμός των γελών αλγινικού οξέος, καθώς και η λύση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α7.

Η συλλογή των κυτταροκινών γίνεται μέσω του υλικού καλλιέργειας που περιβάλλει τα δισκάκια αλγινικού οξέος, καθώς οι κυτταροκίνες βρίσκονται στο περιβάλλον κοντά στο κύτταρο.

Η φύλαξη των πρωτεϊνών γίνεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2.5. Πρωτεομική Ποσοτικοποίηση με την Μέθοδο xMAP ELISA

Με την χρήση της πλατφόρμας LUMINEX καθίσταται εφικτή η ανάλυση ενός δείγματος με υψηλή απόδοση. Συνδυάζει προηγμένα συστήματα μικροροής, οπτικής και επεξεργασίας ψηφιακού σήματος σε συνδυασμό με κατάλληλη τεχνολογία μικροσφαιριδίων. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση πρωτεϊνικών ή και γονιδιακών στόχων σε βιολογικά δείγματα ή διαλύματα. Η τεχνολογία LUMINEX χρησιμοποιεί μικροσκοπικά σφαιρίδια τα οποία κωδικοποιούνται με βάση το χρώμα σε 500 διαφορετικές ομάδες. Κάθε μικροσφαιρίδιο μπορεί να επικαλυφθεί με συγκεκριμένο αντιδραστήριο ειδικό για την αντίστοιχη βιοδοκιμασία, επιτρέποντας τη σύνδεση και την ανίχνευση συγκεκριμένων αναλυτών του δείγματος. Στο εσωτερικό του αναλυτή LUMINEX, μία πηγή φωτός διεγείρει τις εσωτερικές χρωστικές που αναγνωρίζουν κάθε μικροσφαιρίδιο και τη χρωστική αναφοράς που έχει δεσμευτεί κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Η σύνδεση και ανίχνευση συγκεκριμένων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και εκκρινόμενων κυτταροκινών από πρωτογενή ανθρώπινα χονδροκύτταρα, κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων (π.χ. μηχανικά φορτία) δύναται να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη μεταγωγή των μηχανικών σημάτων και την απόκριση των χονδροκυττάρων στη μηχανική φόρτιση.

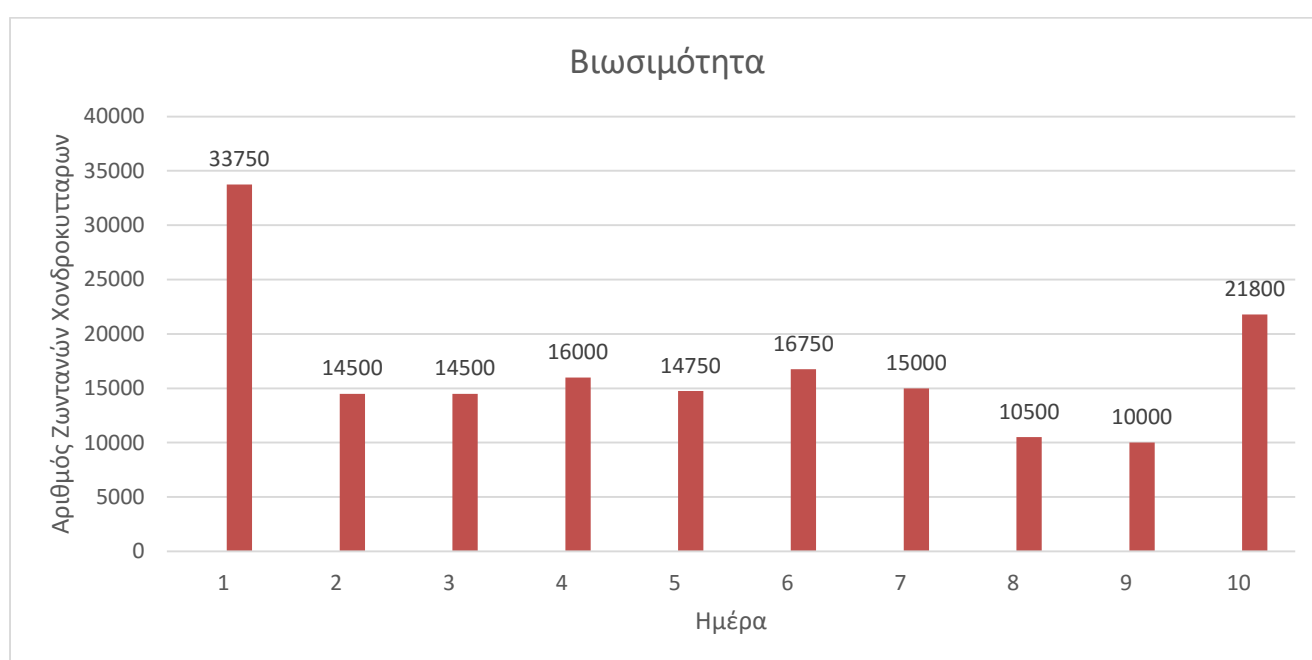


*Εικόνα 11: Μηχάνημα LUMINEX 200 με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που θα παρουσιαστούν στην παρούσα διπλωματική εργασία.*

### 3. Πειραματικά Αποτελέσματα

#### 3.1. Βιωσιμότητα Χονδροκυττάρων Μέσα στις Γέλες Αλγινικού Οξέως

Για τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων απαιτείται ο αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος και η συλλογή των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α.8. Για τη μέτρηση των ζωντανών κυττάρων γίνεται χρήση της χρωστικής Trypan blue, της πλάκας Neubauer και του φωτονικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 12: Χρονικό γράφημα για την απεικόνιση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων μέσα στις γέλες του αλγινικού οξέος

Αρχικά, παρατηρείται ότι παρά την μεγάλη περίοδο εγκλεισμού των κυττάρων στις γέλες του αλγινικού οξέος, τα κύτταρα επιβίωσαν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Ακόμη, παρατηρείται μια μεγάλη μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων από την πρώτη ημέρα στη δεύτερη ενώ δεν παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων από τη δεύτερη ημέρα και μετά. Η μεγάλη μείωση από την πρώτη ημέρα στη δεύτερη μπορεί να οφείλεται σε ανομοιογενή κατανομή των κυττάρων κατά την ανάμιξη τους με το αλγινικό οξύ σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παραρτήματος Α.6.

Τέλος, παρατηρείται ότι παρότι τα κύτταρα επιβίωσαν μέσα στις γέλες, δεν πολλαπλασιάστηκαν μέσα στις γέλες του αλγινικού οξέος.

### 3.2. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυττάριας Μήτρας στα Επίπεδα Φωσφορυλίωσης των Χονδροκυττάρων

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των χονδροκυττάρων.

Τα χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν στις έξι διαφορετικές μήτρες για 11 ημέρες. Οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν για 6 χρονικά σημεία : 1<sup>η</sup> μέρα, 3<sup>η</sup> μέρα, 5<sup>η</sup> μέρα, 7<sup>η</sup> μέρα, 9<sup>η</sup> μέρα, 11<sup>η</sup> μέρα από την ημέρα εγκλεισμού των κυττάρων στις γέλες αλγινικού οξέος.

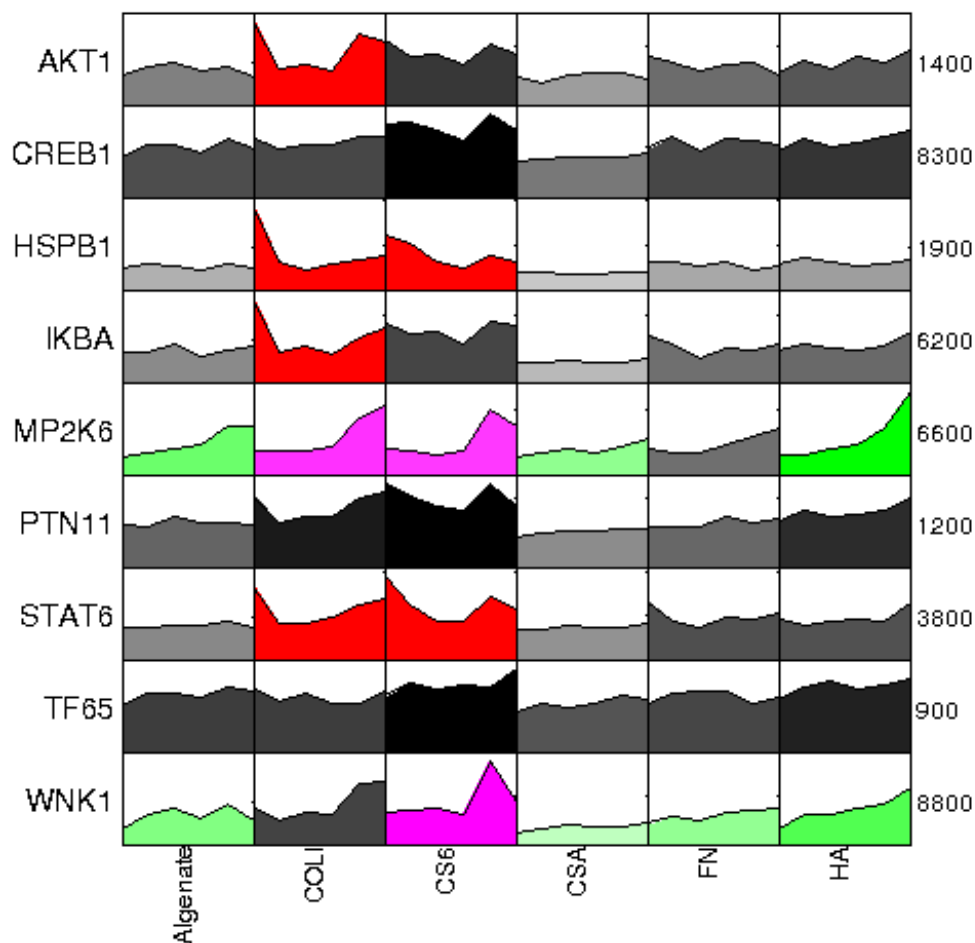
Ο αποπολυμερισμός των δισκίων και η απομόνωση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που παρουσιάζεται στο παράρτημα Α.7. Τέλος, για την μέτρηση των επιπέδων των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών έλαβε χώρα δοκιμασία sandwich ELISA με την χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητη η προετοιμασία των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε μορφή μίγματος με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις και αναλογίες.

Οι 19 φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που μετρήθηκαν ήταν οι εξής:

**AKT 1, CREB1, FAK1, GSK3B, HSPB1, IKBA, JUN, KS6A1, LCK, MK12, MP2K6, NRF2, PGFRB, PTN11, RS6, STAT3, STAT6, TF65, WNK1**

Συγκρίνοντας με τα δείγματα ελέγχου (control) σημειώθηκε υπερέκφραση 9 από τις 19 φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες (>2 φορές έκφραση δειγμάτων/έκφραση δειγμάτων ελέγχου) για τις **AKT 1, CREB1, HSPB1, IKBA, MP2K6, PTN11, RS6, STAT6, TF65, WNK1**.

Προέκυψαν γραφήματα τύπου DataRail (Saez Rodriguez, 2008) για τις 9 από τις 19 φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες. Τα χρονικά γραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται παρακάτω :



Εικόνα 13: Data Rail γραφήματα για την απεικόνιση των αλλαγών στα επίπεδα των 9 φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών έπειτα από τη καλλιέργεια των κυττάρων στις τρισδιάστατες καλλιέργειες για διάστημα 11 ημερών. Η συλλογή των κυτταροκινών έγινε για τα time points : day1, day3, day5, day7, day9, day11.

Αριστερά: το γράφημα αντιστοιχεί στην πρώτη ημέρα δεξιά: το γράφημα αντιστοιχεί στην ενδέκατη μέρα. Ο κάθετος άξονας κάθε γραφήματος στην αριστερή πλευρά φέρει τους συμβολισμούς των πρωτεϊνών που μετρήθηκαν, ενώ στη δεξιά πλευρά τις μέγιστες τιμές σήματος που ελήφθησαν σε μονάδες μέσης έντασης φθορισμού (MFI – Median Fluorescence Intensity). Κάθε υπό – γράφημα αντιστοιχεί σε μια από τις 6 διαφορετικές μήτρες.

Παρατηρούμε ότι σημαντικές μεταβολές στην φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου παρουσίασαν οι γέλες του αλγινικού οξέος με κολλαγόνο τύπου I και θειική χονδροϊτίνη 6.



### 3.3. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυττάριας Μήτρας στην Έκκριση Κυτταροκινών από Χονδροκύτταρα

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας στα επίπεδα έκκρισης κυτταροκινών από τα χονδροκύτταρα.

Τα χονδροκύτταρα καλλιεργήθηκαν στις έξι διαφορετικές μήτρες για 11 ημέρες. Έπειτα, ακολούθησε η συλλογή του υλικού καλλιέργειας από κάθε φρεάτιο της πλάκας εντός του οποίου βρισκόταν το κάθε δισκίο αλγινικού οξέος. Η συλλογή των κυτταροκινών έγινε μετά το πέρας 1, 3, 5, 7, 9, 11 ημερών από το χρονικό σημείο τοποθέτησης των χονδροκυττάρων μέσα στα δισκία. Στο υλικό καλλιέργειας απελευθερώνονται οι κυτταροκίνες που εκκρίνουν τα χονδροκύτταρα. Η συλλογή έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που παρουσιάζεται στο παράρτημα Α.8.

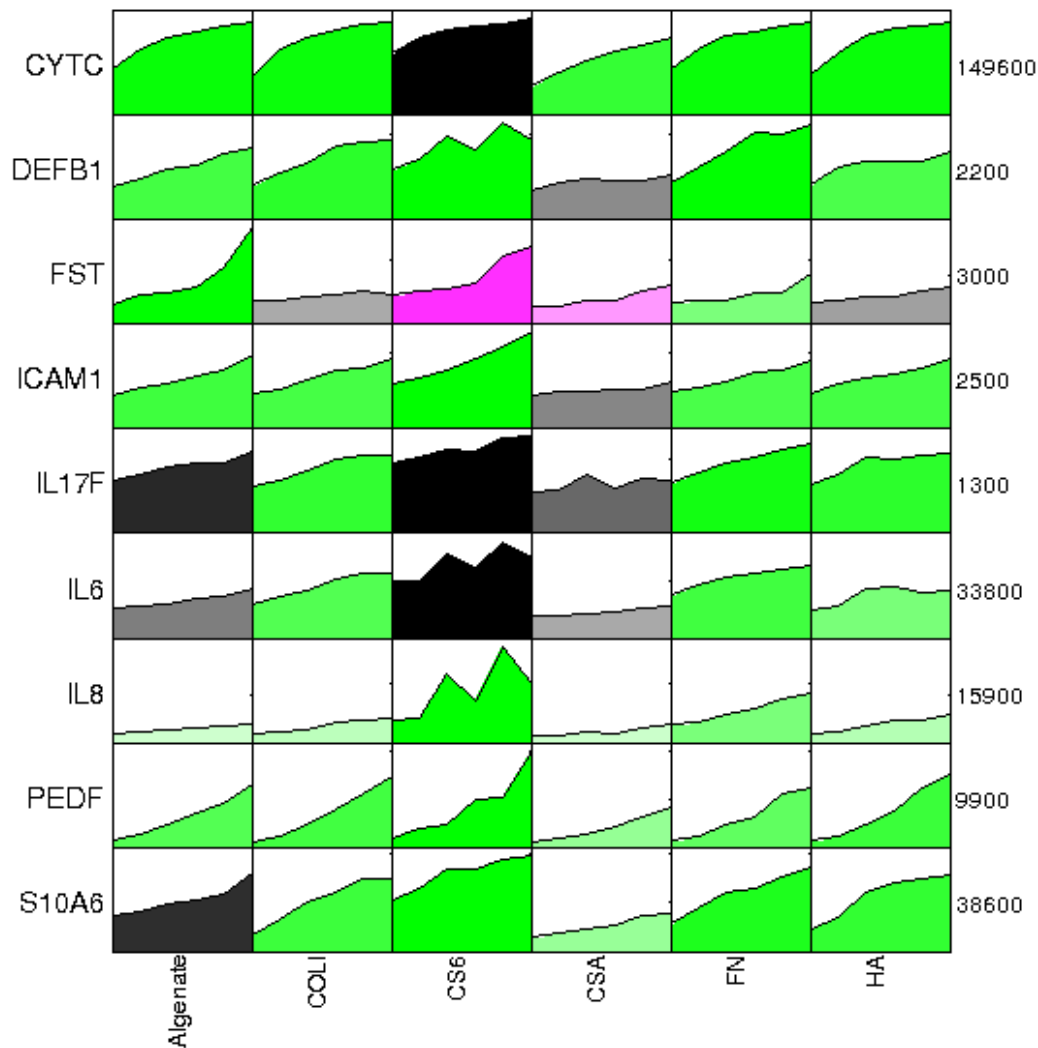
Οι 29 κυτταροκίνες που μετρήθηκαν ήταν οι εξής: **CCL3, CCL5, CSF3, CXL10, CXL11, CYTC, DEFB1, FST, ICAM1, IFNG, IL12A, IL13, IL17F, IL1A, IL20, IL3, IL4, IL6, IL8, NRG1, PEDF, PROK1, RETN, S10A6, TFF3, TNF10, TNF12, TNFA, ZG16.**

Τα πρωτογενή αντισώματα που είχαν συζευχθεί με μαγνητικά μικροσφαιρίδια με τη χρήση ειδικού πρωτοκόλλου σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν σε ποσότητα 1700 μικροσφαιρίδια ανά αντίσωμα. Τα δευτερογενή αντισώματα προστέθηκαν με βάση τις συγκεντρώσεις που είχαν προκύψει από κατάλληλα πειράματα τιτλοδότησης.

Με το πέρας της δοκιμασίας ELISA, η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκε στο ειδικό μηχάνημα LUMINEX 200, όπου μετρήθηκε το σήμα που προερχόταν τόσο από τις χρωστικές των μαγνητικών μικροσφαιριδίων όσο και από τα βιοτινιλιωμένα δευτερογενή αντισώματα. Τα αποτελέσματα εξήλθαν σε μορφή αρχείου csv και αναλύθηκαν με την χρήση ειδικού λογισμικού Matlab. Συγκρίνοντας με τα δείγματα ελέγχου (control) σημειώθηκε υπερέκφραση 9 από τις 19 κυτταροκίνες (>2 φορές έκφραση δειγμάτων/έκφραση δειγμάτων ελέγχου), τις εξής :

**CYTC, DEFB1, FST, ICAM1, IL17F, IL6, IL8, PEDF, S10A6.**

Προέκυψαν γραφήματα τύπου DataRail (Saez Rodriguez, 2008) για τις 9 από τις 29 κυτταροκίνες. Τα χρονικά γραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται παρακάτω :



Εικόνα 12: Data Rail γραφήματα για την απεικόνιση των αλλαγών στα επίπεδα των 9 κυτταροκινών έπειτα από τη καλλιέργεια των κυτάρων στις τρισδιάστατες καλλιέργειες για διάστημα 11 ημερών. Η συλλογή των κυτταροκινών έγινε για τα time points : day1, day3, day5, day7, day9, day11. Αριστερά: το γράφημα αντιστοιχεί στην πρώτη ημέρα δεξιά: το γράφημα αντιστοιχεί στην ενδέκατη μέρα.

Ο κάθετος άξονας κάθε γραφήματος στην αριστερή πλευρά φέρει τους συμβολισμούς των πρωτεϊνών που μετρήθηκαν, ενώ στη δεξιά πλευρά τις μέγιστες τιμές σήματος που ελήφθησαν σε μονάδες μέσης έντασης φθορισμού (MFI – Median Fluorescence Intensity). Κάθε υπό – γράφημα αντιστοιχεί σε μία από τις 6 διαφορετικές μήτρες.

Παρατηρούμε ότι με την πάροδο των ημερών, η συγκέντρωση της έκκρισης κυτταροκινών αυξάνεται, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς οι κυτταροκίνες συσσωρεύονται στο θρεπτικό υλικό που υπάρχει γύρω από τις γέλες.

## 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 4.1. Αναπτύσσοντας Μοντέλα της Εξωκυττάριας Μήτρας του Χόνδρου Με Βάση Γέλες Αλγινικού Οξέος

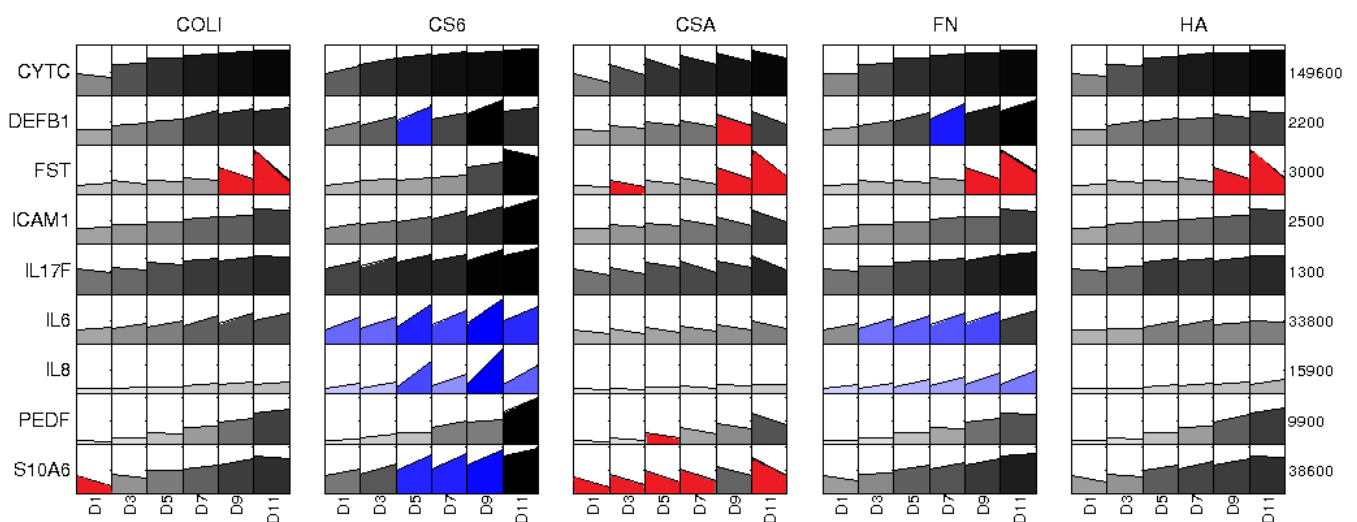
Ένα σημαντικό ζήτημα στην μηχανική ιστών είναι η ανάπτυξη ενός βελτιστοποιημένου περιβάλλοντος καλλιέργειας που θα υποστηρίζει την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, διατηρώντας ταυτόχρονα τον φαινότυπο των χονδροκυττάρων και τη βιοσύνθεση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη των χονδροκυττάρων σε μονοδιάστατες καλλιέργειες, όπως οι πλάκες καλλιέργειας οδηγεί στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, με ταυτόχρονη παραγωγή κολλαγόνου τύπου I έναντι κολλαγόνου τύπου II που παράγεται φυσιολογικά στον υαλώδη αρθρικό χόνδρο καθώς και μειωμένη έκφραση αγγρεκανών. Αντίθετα, η καλλιέργεια χονδροκυττάρων σε γέλες που αποτελούνται από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή, βοηθά τα κύτταρα να διατηρήσουν το φαινότυπο τους και τη φυσιολογική γονιδιακή τους έκφραση.

Εφόσον η κυτταρική συμπεριφορά επηρεάζεται σημαντικά από σήματα που λαμβάνουν τα κύτταρα από την εξωκυττάρια μήτρα, είναι κρίσιμο ότι τα τεχνητά ικριώματα θα παρέχουν κατάλληλα σήματα ώστε τα εισαγόμενα κύτταρα να επάγουν ή να διατηρήσουν τα κύτταρα στο επιθυμητό στάδιο της διαφοροποίησης.

## 4.2. Επίδραση Βασικών Συστατικών της Εξωκυττάριας Μήτρας του Χόνδρου στα Χονδροκύτταρα

### 4.2.1. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυττάριας Μήτρας στα Επίπεδα Έκκρισης Κυτταροκινών από τα Χονδροκύτταρα

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας συγκρίθηκε το επίπεδο έκκρισης κάθε κυτταροκίνης από τα χονδροκύτταρα κάθε μήτρας με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, με το επίπεδο έκκρισης από τα χονδροκύτταρα της μήτρας του αλγινικού οξέος.



Εικόνα 135: Data Rail γραφήματα για την απεικόνιση των αλλαγών στα επίπεδα των 9 κυτταροκινών έπειτα από τη καλλιέργεια των κυττάρων στις τρισδιάστατες καλλιέργειες για διάστημα 11 ημερών. Η συλλογή των κυτταροκινών έγινε για τα time points : day1, day3, day5, day7, day9, day11. Αριστερά: το γράφημα αντιστοιχεί στην απόκριση των χονδροκυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε δισκία αλγινικού οξέος.

Δεξιά : το γράφημα αντιστοιχεί στην απόκριση των χονδροκυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε δισκία αλγινικού οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Ο κάθετος άξονας κάθε γραφήματος στην αριστερή πλευρά φέρει τους συμβολισμούς των πρωτεϊνών που μετρήθηκαν, ενώ στη δεξιά πλευρά τις μέγιστες τιμές σήματος που ελήφθησαν σε μονάδες μέσης έντασης φθορισμού (MFI – Median Fluorescence Intensity). Κάθε υπό – γράφημα αντιστοιχεί σε μια από τις 6 διαφορετικές μήτρες.

Αρχικά παρατηρούμε ότι στις γέλες αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 και φιμπρονεκτίνη παρατηρήθηκε αύξηση της έκκρισης των κυτταροκινών ιντερλευκίνη 6 (IL6) και ιντερλευκίνη 8 (IL-8) για όλες τις χρονικές στιγμές συλλογής κυτταροκινών.

Δεύτερον, παρατηρούμε ότι για τις γέλες του αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη Α, κολλαγόνο τύπου Ι, φιμπρονεκτίνη και υαλουρονικό οξύ παρατηρήθηκε παρόμοια μείωση της πρωτεΐνης φολλιστατίνη (FST) για τα χρονικά σημεία ημέρα 9 και ημέρα 11.

Τέλος, παρατηρούμε ότι στις γέλες αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 4 παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης της πρωτεΐνης S10A6 για όλα τα χρονικά σημεία συλλογής των κυτταροκινών εκτός από την 9<sup>η</sup> ημέρα.

Οι 9 κυτταροκίνες που είναι στατιστικά σημαντικές συγκρινόμενες με τα δείγματα ελέγχου είναι οι εξής :

<b>CYTC</b>	Κυτόχρωμα C, μικρή πρωτεΐνη αίμης, κωδικοποιείται από το γονίδιο CYCS. Συμμετέχει στην απόπτωση και είναι συστατικό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια.
<b>DEBF1</b>	Πρωτεΐνη της οικογένειας των ντεφενσινών. Αποτελείται από μικροβιοκτόνα και κυτταροτοξικά πεπτιδία παραγόμενα από ουδετερόφιλα. Εμπλέκεται στην αντίσταση των επιθηλιακών επιφανειών στο μικροβιακό αποικισμό. Μεταδίδει το σήμα στις MAP(mitogen activated protein) κινάσες.
<b>FST</b>	Αυτοκρινής γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους ιστών των ανωτέρων ζώων. Ενώνεται και βιοουδετεροποιεί μέλη της TGF-β υπεροικογένειας.
<b>ICAM1</b>	Μόριο κυτταρικής προσκόλλησης
<b>IL17F</b>	Ιντερλευκίνη, εκφράζεται από ενεργοποιημένα T- κύτταρα, ενεργοποιεί την παραγωγή άλλων κυτταροκινών, των IL6, IL8 και CSF2/GM-CSF.
<b>IL6</b>	Κυτταροκίνη που παίζει καθοριστικό ρόλο στη φλεγμονή του χόνδρου.
<b>IL8</b>	Κυτταροκίνη που παίζει καθοριστικό ρόλο στη φλεγμονή του χόνδρου.
<b>PEDF</b>	Εκκρινόμενη πρωτεΐνη με αντι-αγγειογόνο, αντι-ογκογόνο και νευροτροφική δράση.
<b>S10A6</b>	Μέλος της S100 οικογένειας πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση διάφορων κυτταρικών λειτουργιών, όπως η εξέλιξη του κύκλου ζωής του κυττάρου και η διαφοροποίηση.

Κυτταροκίνες όπως οι IL-1 και TNF-alpha που παράγονται από ενεργοποιημένες συνοβιοκύττες, μονοπύρρηνα κύτταρα ή και από τον ίδιο τον αρθρικό χόνδρο, υπερεκφράζουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Οι κυτταροκίνες επίσης ενεργοποιούν μονοπάτια σύνθεσης, απαραίτητα για την επαναφορά της αποδομημένης εξωκυττάριας μήτρας.<sup>26</sup>

Τρεις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, οι IL-4, IL-10 και IL-13 βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με οσθοαρθρίτιδα. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μειωμένη παραγωγή του IL-1 beta, TNF- alpha και των MMPs και την υπερέκφραση των IL-1Ra και TIMP-1 και την αναχαίτιση της απελευθέρωσης του PGE<sub>2</sub>.

Σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι η αγωγή φιμπρονεκτίνης σε χονδροκύτταρα οδήγησε στην έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και IL-8 (>1,5 φορές έκφραση δειγμάτων/έκφραση δειγμάτων ελέγχου). Επίσης άλλες μελέτες έχουν δείξει την έκφραση των IL-6 και IL-8 μέσω ιντεγκρινών.<sup>26</sup>

Η ιντερλευκίνη IL-1 θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές κυτταροκίνες με καταβολική δραστηριότητα στα χονδροκύτταρα, συμμετέχοντας τόσο στην οσθοαρθρίτιδα όσο και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η ιντερλευκίνη IL-1 μειώνει την έκφραση αναβολικών γονιδίων όπως η αγγκρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II. Για την μεταγωγή σήματος της ιντερλευκίνης IL-1, ο καταρράκτης μιτογόνου- ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών (MAPK) είναι ένα βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι σε πολλά κύτταρα. Στα κύτταρα θηλαστικών, υπάρχουν τρεις σημαντικές ομάδες μονοπατιών κινασών που αποτελούν την οικογένεια MAPK, οι εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενες κινάσες (ERK1/2), οι p38 MAPK και η τερματική κινάση c-Jun NH-2. Ο καταρράκτης ERK1/2 φαίνεται να διαμεσολαβεί σε σήματα που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση.

Οι καταρράκτες p38 MAPK και c-Jun NH-2 συμμετέχουν σε κυτταρικές αποκρίσεις σε στρες. Ακόμη, το μονοπάτι NFκB μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια πληθώρα ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων της ιντερλευκίνης IL-1 και του TNF-α .

Σε μη διεγερμένα κύτταρα, τα διμερή NF-κB διατηρούνται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα μέσω σύνδεσης με μία από τις πρωτεΐνες IκB ανασταλτικών. Κατά τη διέγερση, τα IκB μόρια είναι φωσφορυλιωμένα και υποβαθμισμένα, επιτρέποντας στο NFκB να μετατοπίζεται στον πυρήνα και να ρυθμίζουν μεταγραφή μέσω της σύνδεσης προς το γονιδιωματικό DNA σε θέσεις κB.<sup>25</sup>

Η πρωτεΐνη DEFB1 μεταδίδει το σήμα στις MAP (mitogen activated protein) κινάσες και τελικά ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Hsp27, η οποία συμμετέχει στην εμφάνιση φλεγμονής στο χόνδρο. Η πρωτεΐνη Hsp27, στη συνέχεια, συμμετέχει στην έκφραση των IL6 και IL8 μέσω της επαγωγής τους από την IL1. Επομένως, παρατηρούνται υψηλά επίπεδα των κυτταροκινών IL6 και IL8, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων.

Η πρωτεΐνη DEBF1 δρα μέσω του HSP27 και ενεργοποιεί τις IL-6 και IL-8 συμμετέχοντας στη φλεγμονώδη απόκριση.

Η πρωτεΐνη φολλιστατίνη (follistatin, FST) δρα σαν ανταγωνιστικός παράγοντας έναντι των οστικών μορφογεννητικών πρωτεϊνών (bmps) που υπερεκφράζονται στον οστεοαρθρικό χόνδρο.<sup>28</sup>

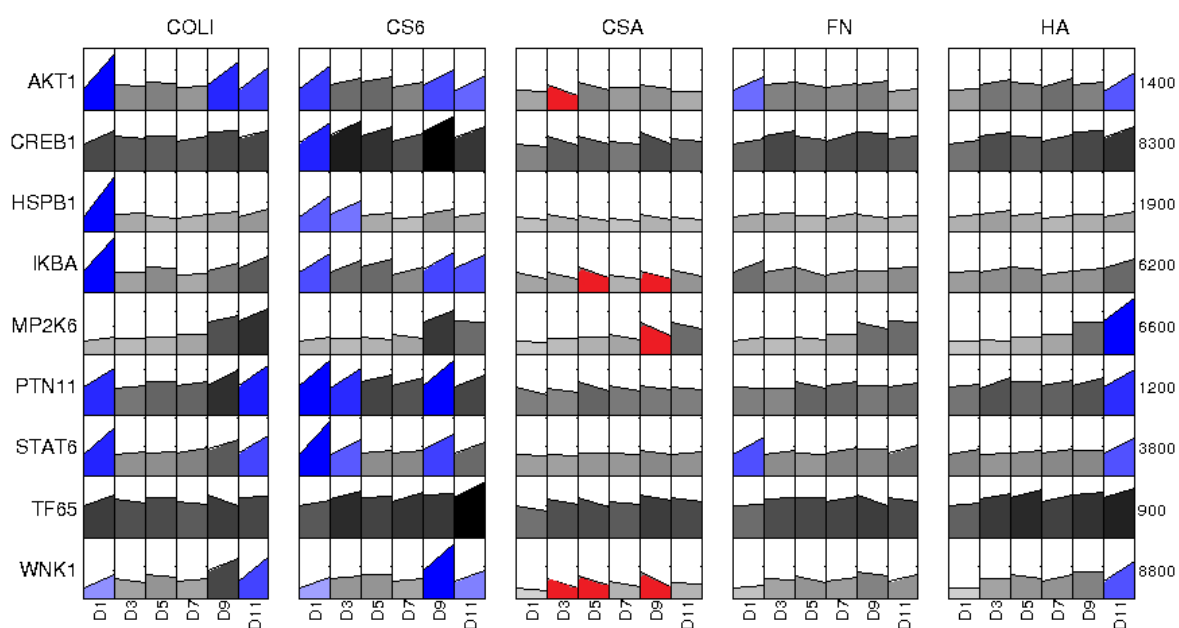
Η πρωτεΐνη S10A6 αποτελεί μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών S100, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση διάφορων κυτταρικών λειτουργιών, όπως η εξέλιξη του κύκλου ζωής του κυττάρου και η διαφοροποίηση. Μπορεί να λειτουργήσει ως αισθητήρας ασβεστίου και διαμορφωτής, συμβάλλοντας στην κυτταρική σηματοδότηση ασβεστίου. Μπορεί να λειτουργεί μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι TPR, καθώς και να παίζουν έναν έμμεσο ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και στην κυτταρική κινητικότητα.<sup>29</sup>

Συνοπτικά, σχετικά με την έκκριση των κυτταροκινών, τα δισκία αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 και φιμπρονεκτίνη εμφάνισαν σημαντική έκκριση των κυτταροκινών ιντερλευκίνη 6 και ιντερλευκίνη 8 για όλα τα χρονικά σημεία καθώς και της ντεφενσίνης 1 για τα χρονικά σημεία μέρα 5 και μέρα 7 αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση.

Επίσης, όλοι οι τύποι των δίσκων αλγινικού οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, εκτός από τα δισκία αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 έδειξαν παρόμοια μειορύθμιση φολλιστατίνης στα χρονικά σημεία ημέρα 9 και ημέρα 11. Η φολλιστατίνη δρα σαν ανταγωνιστικός παράγοντας έναντι των οστικών μορφογεννητικών πρωτεϊνών (bmps) που υπερεκφράζονται στον οστεοαρθρικό χόνδρο.<sup>28</sup>

## 4.2.2. Επίδραση των Συστατικών της Εξωκυττάριας Μήτρας στα Επίπεδα Φωσφορυλίωσης των Χονδροκυττάρων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων συγκρίθηκε το επίπεδο έκφρασης κάθε φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης στις μήτρες με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας με τη μήτρα του αλγινικού οξέος.



Εικόνα 16: Data Rail γραφήματα για την απεικόνιση των αλλαγών στα επίπεδα των 9 φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών έπειτα από τη καλλιέργεια των κυττάρων στις τρισδιάστατες καλλιέργειες για διάστημα 11 ημερών. Η συλλογή των κυτταροκινών έγινε για τα time points : day1, day3, day5, day7, day9, day11. Αριστερά: το γράφημα αντιστοιχεί στην απόκριση των χονδροκυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε δισκία αλγινικού οξέος. Δεξιά : το γράφημα αντιστοιχεί στην απόκριση των χονδροκυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί σε δισκία αλγινικού οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Ο κάθετος άξονας κάθε γραφήματος στην αριστερή πλευρά φέρει τους συμβολισμούς των πρωτεϊνών που μετρήθηκαν, ενώ στη δεξιά πλευρά τις μέγιστες τιμές σήματος που ελήφθησαν σε μονάδες μέσης έντασης φθορισμού (MFI – Median Fluorescence Intensity). Κάθε υπό – γράφημα αντιστοιχεί σε μια από τις 6 διαφορετικές μήτρες.

Αρχικά παρατηρούμε ότι υπήρξαν σημαντικές φωσφορυλίωσεις στις γέλες αλγινικού οξέος με κολλαγόνο τύπου I και θειική χονδροϊτίνη 6. Συγκεκριμένα, στις γέλες αλγινικού οξέος με κολλαγόνο τύπου I παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης για τις πρωτεΐνες AKT1, CREB1, HSPB1, IKBA, PTN11, STAT6 και WNK1 για την πρώτη και την ενδέκατη ημέρα καλλιέργειας.



Δεύτερον, στις γέλες αλγινικού οξέος με θειική χονδροϊτίνη 6 παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης για τις πρωτεΐνες AKT1, HSPB1, IKBA, PTN11, STAT6 και WNK1 για την πρώτη, τρίτη και ένατη ημέρα καλλιέργειας.

Οι 9 φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που είναι στατιστικά σημαντικές συγκρινόμενες με τα δείγματα ελέγχου είναι οι εξής:

<b>AKT1</b>	Πρωτεΐνη κόμβος που συμμετέχει στην καταστολή απόπτωσης, εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση.
<b>CREB1</b>	Μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε ένα στοιχείο απόκρισης του κυκλικού AMP και επάγει τη μεταγραφή.
<b>HSPB1</b>	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ, συμμετέχει στην επαγωγή κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης και στην αναστολή της απόπτωσης.
<b>IKBA</b>	Μέλος μιας οικογένειας κυτταρικών πρωτεϊνών που λειτουργούν για να αναστέλλουν τον παράγοντα μεταγραφής του NF-κΒ.
<b>MP2K6</b>	Πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAP kinase. Ρυθμίζει την κυτταρική απόκριση σε κυτταροκίνες και όλα τα είδη στρες. Ενεργοποιεί τις MAPK11, MAPK13 που σχετίζονται με περιβαλλοντικό στρες.
<b>PTN11</b>	Φωσφατάση τυροσίνης, ρυθμίζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras VMAPK, σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση.
<b>STAT6</b>	Λαμβάνει κεντρικό ρόλο, ασκώντας βιολογικές αποκρίσεις μέσω του IL4. Προωθεί την έκφραση του BSL2L1/BCL-XL, το οποίο ευθύνεται για την αντι-αποπτωτική διαστηριότητα των IL4 μεσολαβητικών αποκρίσεων.
<b>TF65</b>	Πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Rela
<b>WNK1</b>	Κινάση σερίνης – θρεονίνης. Συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση για επιβίωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η AKT1 είναι μία κινάση σερίνης – θρεονίνης, η οποία συμβάλλει στην καταστολή της απόπτωσης και εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση.

Η πρωτεΐνη CREB1 είναι μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε ένα στοιχείο απόκρισης του κυκλικού AMP και επάγει τη μεταγραφή, ενώ σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση .

Η WNK1 είναι μία κινάση σερίνης – θρεονίνης και μέλος του μονοπατιού ERK5 MAP κινάσης ανορροϊκά των MEKK2/MEKK3. Ακόμα, ενεργοποιεί ένα επιθηλιακό κανάλι ασβεστίου και συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό (UNIPROT).

Οι πρωτεΐνες αυτές, λοιπόν, παίζουν ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μπορούν να θεωρηθούν παράγοντες κυτταρικής ανάπτυξης.

Η πρωτεΐνη IκBα (αναστολέας του κB) απενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής του NF-κB, συγκαλύπτοντας τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) των πρωτεϊνών του NF-κB και διατηρώντας τα απομονωμένα σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα.<sup>32,33,34</sup>

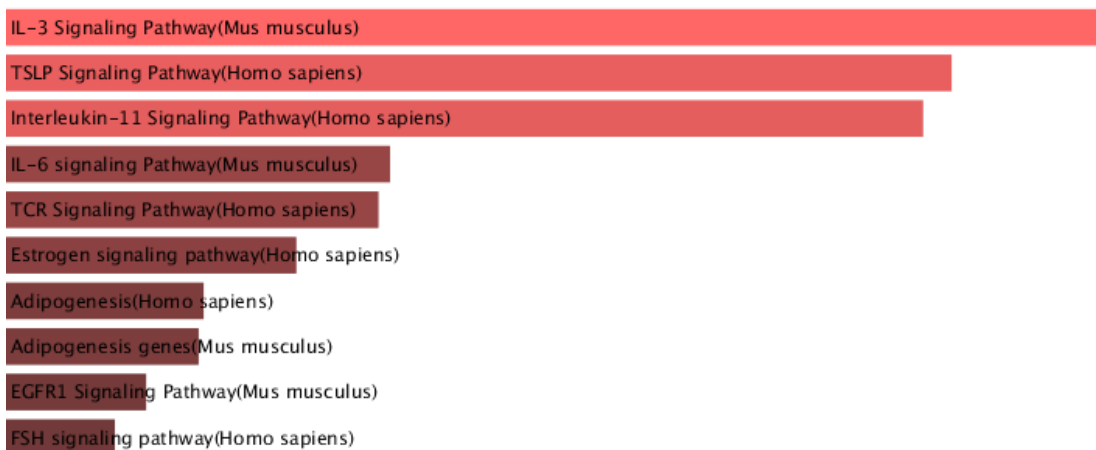
Οι πρωτεΐνες HsPB1 (Hsp27) και JUN είναι μέλη των μονοπατιών p38 MAPK (Hsp27) και JNK (JUN), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση. Επίσης, έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι οι πρωτεΐνες αυτές προωθούν τη φλεγμονή στο χόνδρο.

Η πρωτεΐνη STAT6 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά σημάτων και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αυτές οι πρωτεΐνες μεταδίδουν σήματα από ένα σύμπλοκο υποδοχέων προς τον πυρήνα και ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων. Τα επτά μέλη της οικογένειας STAT ενεργοποιούνται κυρίως από παράγοντες ανάπτυξης και κυτταροκίνες. Η πρωτεΐνη STAT6 κατά κύριο ενεργοποιείται από δύο κυτταροκίνες, την ιντερλευκίνη-4 και την ιντερλευκίνη-13 (IL-4 & IL-13).<sup>35</sup> Ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης STAT-6 εμφάνισαν λιγότερο επιθετική μορφή οστεοαρθρίτιδας σε σχέση με ποντίκια με έλλειψη πρωτεΐνης STAT-4.<sup>29</sup>

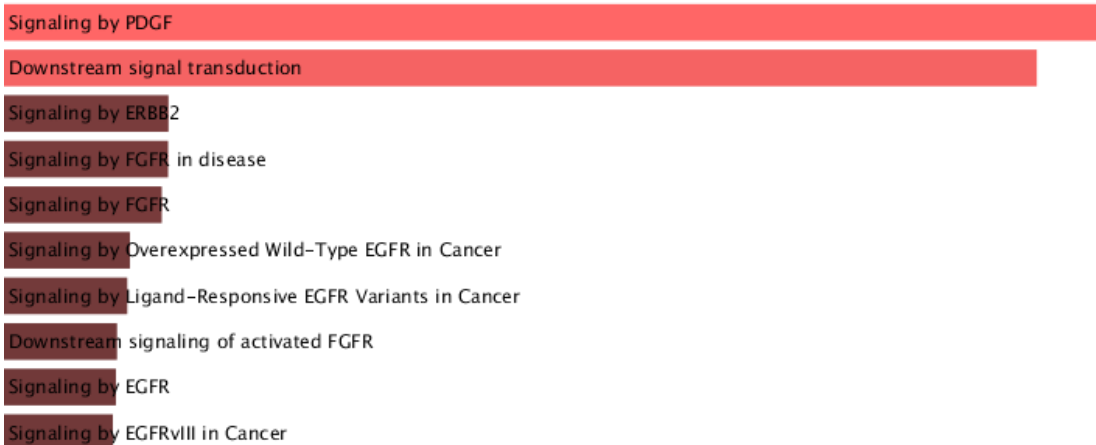
Συνοπτικά, σχετικά με τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, σημαντική απόκριση έδειξαν τα δισκία αλγινικού οξέος με κολλαγόνο τύπου I και θειική χονδροϊτίνη 6, τα ενεργοποίησαν πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την επιβίωση και τη διαφοροποίηση, όπως η ακτίνη 1, ο μεταγραφικός παράγοντας CREB1 και η κινάση σερίνης – θρεονίνης WNK1 αλλά επίσης και πρωτεΐνες σχετίζονται με φλεγμονώδη απόκριση, όπως ο ανασταλτικός παράγοντας IKBA και η STAT6.

### 4.3. Ανάλυση εμπλουτισμού για τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες

Έπειτα από τις μετρήσεις και τη στατική ανάλυση των αποτελεσμάτων, ακολούθησε ανάλυση εμπλουτισμού με τη χρήση του εργαλείου Enrichr<sup>49</sup> και των βάσεων δεδομένων WikiPathways και Reactome. Η λειτουργία του εργαλείου αυτού βασίζεται στη δυνατότητα προσθήκης της ονοματολογίας των πρωτεϊνών που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα προς μελέτη δείγματα ως προς τα δείγματα ελέγχου και την εξαγωγή μιας λίστας σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία είναι εμπλουτισμένα στις πρωτεΐνες αυτές. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια εξήχθησαν από τις βάσεις δεδομένων WikiPathways και Reactome. Τα γραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση αυτή παρουσιάζονται στις εικόνες 17 και 18. Για τη δημιουργία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν οι φωσφοπρωτεΐνες καθώς και οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες, που διέφεραν στατιστικά σημαντικά για την κάθε κατάσταση που μελετήθηκε.



Εικόνα 17: Γραφήματα εμπλουτισμού με τη χρήση του εργαλείου Enrichr και της βάσης δεδομένων Wiki Pathways για τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και τις εκκρινόμενες κυτταροκίνες που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα προς μελέτη δείγματα ως προς τα δείγματα ελέγχου.



Εικόνα 14 : Γραφήματα εμπλουτισμού με τη χρήση του εργαλείου Enrichr και της βάσης δεδομένων Wiki Reactome για τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και τις εκκρινόμενες κυτταροκίνες που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα προς μελέτη δείγματα ως προς τα δείγματα ελέγχου.

#### 4.4. Μελλοντική Εργασία

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία βρέθηκε ότι συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας, συγκεκριμένα το κολλαγόνο τύπου I, η θειική χονδροϊτίνη 6, η θειική χονδροϊτίνη 4, η φιμπρονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ ενεργούν ως ερεθίσματα και έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην πρωτεομική απόκριση των χονδροκυττάρων όταν αναμιγνύονται με το αλγινικό οξύ για την καλλιέργεια χονδροκυττάρων σε τρισδιάστατο περιβάλλον. Από τις μήτρες που μελετήθηκαν εδώ, το αλγινικό οξύ με θειική χονδροϊτίνη 6 και το αλγινικό οξύ με φιμπρονεκτίνη φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην έκκριση κυτταροκινών, ενώ το αλγινικό οξύ με θειική χονδροϊτίνη 6 και το αλγινικό οξύ με κολλαγόνο τύπου I έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η φιμπρονεκτίνη ενεργοποιεί μονοπάτια φλεγμονώδους απόκρισης ενώ η θειική χονδροϊτίνη 6 και το κολλαγόνο τύπου I ενεργοποιούν τόσο μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού αλλά και φλεγμονώδης απόκρισης.

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας που μελετήθηκαν στη παρούσα διπλωματική προτείνεται αρχικά επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας με περισσότερα δείγματα ανά είδος γελών ώστε να είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Δεύτερον προτείνεται, μια διεξοδικότερη μελέτη της επίδρασης των τριών συστατικών, θειική χονδροϊτίνη 6, κολλαγόνο τύπου I και φιμπρονεκτίνη σε τρισδιάστατες καλλιέργειες φυσιολογικών και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων ώστε να προσδιοριστούν οι διαφορές στην κυτταρική σηματοδότηση μεταξύ φυσιολογικών χόνδρου και οστεοαρθρικών χονδροκυττάρων. Ακόμη προτείνεται η μελέτη και άλλων συστατικών του χόνδρου, όπως το κολλαγόνο τύπου II, το οποίο είναι ο βασικός

τύπος κολλαγόνου που συναντάται στον χόνδρο, το κολλαγόνο τύπου VI, το οποίο λαμβάνει ρόλο στη χονδρογένεση αλλά και στην οστεοαρθρίτιδα <sup>23</sup>, καθώς και της γλυκοζαμινογλυκάνης θειϊκή κερατάνη.

Τέλος, προτείνεται η χρήση φυσικών πολυμερών τύπων ικτριωμάτων, όπως το κολλαγόνο τύπου II, το οποίο είναι και η πιο συχνή μορφή κολλαγόνου που συναντάται στον υαλώδη αρθρικό χόνδρο ή και η δημιουργία ικτριωμάτων απομονώνοντας την εξωκυττάρια μήτρα υαλώδους αρθρικού χόνδρου είτε ανθρώπινης είτε ζωικής προέλευσης.

## Παράρτημα

### A.1 Απομόνωση Αρθρικού Χόνδρου – Χονδροκυττάρων

#### Υλικά:

- PBS (Biosera, LM – 52041/500)
- Penicillin – Streptomycin (Gibco, 15140 – 122)
- DMEM (Biosera, LM – D1113/500)
- Collagenase Grade II (MP Biomedicals, 00502)

#### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

#### Διαδικασία:

- Μεταφορά του δείγματος σε τρυβλίο Petri και εμποτισμός σε διάλυμα PBS και 1% (v/v) πενικιλίνη (100u/ml)/στρεπτομυκίνη(100u/ml).
- Αποκοπή του χόνδρου από το οστό με τη χρήση νυστεριού.
- Τεμαχισμός του χόνδρου σε μικρότερα και λεπτά κομμάτια εντός τρυβλίου Petri dish, το οποίο περιέχει το υλικό καλλιέργειας (Dulbecco's modified Eagle's medium ή DMEM), 1% (v/v) πενικιλίνη (100u/ml)/ στρεπτομυκίνη (100u/ml) και 10% (v/v) ορό από έμβρυο μοσχαριού (Fetal bovine serum ή FBS).
- Μεταφορά των κομματιών σε σωλήνα τύπου falcon που περιέχει κολλαγενάση τύπου II διαλυμένη 1:10 στο υλικό καλλιέργειας DMEM μαζί με τα αντιβιοτικά και τον ορό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.
- Ενζυμική πέψη του χόνδρου υπό συνεχή ανάδευση (600 στροφές) για 16 ώρες στους 37°C.
- Συλλογή των κυττάρων με φιλτράρισμα του περιεχομένου του σωληναρίου falcon με τη βοήθεια «κυτταρικού σουρωτηριού» διαμέτρου 40μm προκειμένου να απομακρυνθούν τα άπεπτα κομμάτια.
- Φυγοκέντρηση στα 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου – επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος με υλικό καλλιέργειας (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μοσχαριού (FBS) και 1% πενικιλίνη (100u/ml)/ στρεπτομυκίνη (100u/ml).
- Συλλογή 20μl από αυτό το διάλυμα και ανάμιξη με 20μl Trypan blue – Μεταφορά 10μl στο θάλαμο του αιμοκυτταρόμετρου για τη μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, όπως αναφέρεται στη μέθοδο 3.
- Τοποθέτηση των κυττάρων σε μία φλάσκα πολυστυρενίου 75cm<sup>2</sup> με τελική πυκνότητα 20000 κύτταρα/cm<sup>2</sup>.
- Τοποθέτηση της φλάσκας με τα κύτταρα στον υγροποιημένο κλίβανο επώασης με συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## A.2 Καλλιέργεια και Διαχωρισμός Χονδροκυττάρων

### Υλικά:

- PBS (Biosera, LM – 52041/500)
- Penicillin – Streptomycin (Gibco, 15140-122)
- DMEM (Biosera, LM – D1113/500)
- Trypsin – EDTA (1x) (Thermo Fisher Scientific, R-001-100)
- 

### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

### Διαδικασία:

Ο διαχωρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πυκνότητα των κυττάρων εντός της φλάσκας καλλιέργειας είναι τόσο ώστε να καλύπτεται περίπου το 80% της επιφάνειας από κύτταρα.

- Απομάκρυνση του θρεπτικού καλλιέργειας από τη φλάσκα και πλύσιμο των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline) – απομάκρυνση του PBS.
- Προσθήκη του διαλύματος τρυψίνης (ένζυμο αποκόλλησης) – EDTA (200mg/L EDTA, 500mg/L τρυψίνη) και τοποθέτηση της φλάσκας με τα κύτταρα στον κλίβανο επώασης για 5 λεπτά. Προστίθενται 40 μl διαλύματος ενζύμου για κάθε cm<sup>2</sup> της φλάσκας καλλιέργειας.
- Παρατήρηση της κυτταρικής αποκόλλησης στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Προσθήκη της διπλάσιας ποσότητας του υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για την αδρανοποίηση της τρυψίνης.
- Μεταφορά του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα – φυγοκέντρηση στα 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου και τη χρωστική Trypan blue 0,4% (που εισχωρεί και βλάφει με μπλε χρώμα μόνο τα νεκρά κύτταρα, ενώ στέκεται στο περίγραμμα των ζωντανών κυττάρων).
- Επαναδιάλυση του ιζήματος στον κατάλληλο όγκο του υλικού καλλιέργειας και διαχωρισμός των κυττάρων σε δύο φλάσκες.
- Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο επώασης.

### A.3 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

#### Υλικά:

- Trypan blue solution 0.4% (Gibco, 15250 – 061)

#### Εξοπλισμός:

- Φωτονικό Μικροσκόπιο

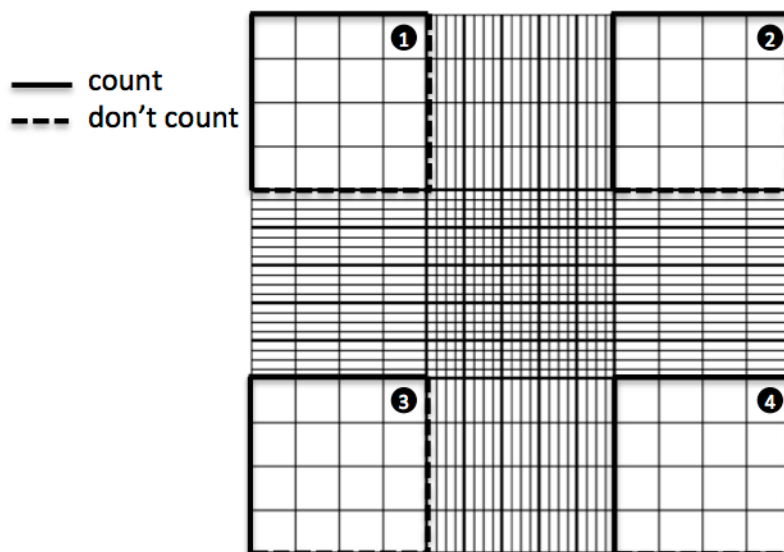
#### Διαδικασία:

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια συσκευή που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο.

Αποτελείται από μια παχιά γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με μια οριζόντια εσοχή που δημιουργεί ένα θάλαμο γνωστού βάθους. Η πλάκα καλύπτεται με γυάλινη καλυπτρίδα η οποία τοποθετείται πάνω από το θάλαμο μέτρησης. Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται στην άκρη της καλυπτρίδας ώστε να εισχωρήσει στο κενό ανάμεσα στον θάλαμο και την καλυπτρίδα και να γεμίσει εντελώς ο θάλαμος με το δείγμα.



Ο θάλαμος είναι χαραγμένος ώστε να δημιουργεί ένα πλέγμα κάθετων γραμμών γνωστής οριοθέτησης. Το πλέγμα φαίνεται παρακάτω :





Στη παρούσα διπλωματική, η χρώση των κυττάρων γίνεται με βαφή Trypan Blue η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα μπλε ενώ τα ζωντανά φαίνονται διάφανα. Στην καλυπτρίδα προσθέτονται 10  $\mu$ l εναιωρήματος κυττάρων και χρωστικής Trypan Blue σε αναλογία 1:1.

Για να μετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων στο αρχικό δείγμα λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός κυττάρων που μετρήθηκε, ο όγκος του προς μέτρηση δείγματος και οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Δηλαδή:

$$C_{cells} = \frac{N_{cells}}{R_{chamber} V_{squares}} \frac{V_{dilution}}{V_{sample}}$$

Όπου:

- $C_{cells}$ : η συγκέντρωση των κυττάρων στο προς μέτρηση δείγμα
- $N_{cells}$ : ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκε
- $R_{chamber}$ : αναλογία των θαλάμων που μετρήθηκαν
- $V_{squares}$ : ο όγκος των τετραγώνων που μετρήθηκαν
- $V_{dilution}$ : ο όγκος του δείγματος μετά από αραιώση και
- $V_{sample}$ : ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος χωρίς την αραιώση

Στις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιούνται τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα στις γωνίες, όπως υποδεικνύεται και στην παραπάνω εικόνα καθώς για να είναι στατιστικά σωστό το αποτέλεσμα μέτρησης των κυττάρων αρκεί να μετρηθεί ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων που περιέχονται σε καθένα από τα 16 μικρότερα τετράγωνα του πλέγματος που βρίσκονται γύρω από τον κεντρικό σταυρό.

Ο συνολικός αριθμός  $N$  των κυττάρων υπολογίζεται ως:

$$N = \mu \cdot d \cdot 10^4 \cdot V$$

Όπου  $\mu$  είναι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου (προκύπτει από τη μέτρηση στο μικροσκόπιο),  $d$  είναι ο λόγος αραιώσης του δείγματος πριν τη μέτρηση (με τη χρωστική Trypan blue για τη βιωσιμότητα των κυττάρων) και  $V$  είναι ο όγκος του μίγματος από όπου συλλέξαμε το δείγμα σε ml.

## A.4 Πάγωμα Χονδροκυττάρων

### Υλικά:

- PBS (Biosera, LM – 52041/500)
- Penicillin – Streptomycin (Gibco, 15140 – 122)
- DMEM (Biosera, LM – D1113/500)
- DMSO (Sigma – Aldrich, RNBC 2779)

### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

### Διαδικασία:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού καλλιέργειας από τη φλάσκα και πλύσιμο των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline) – απομάκρυνση του PBS.
- Προσθήκη του διαλύματος τρυψίνης (ενζύμο αποκόλλησης) – EDTA (200mg/L EDTA, 500mg/L τρυψίνη) και τοποθέτηση της φλάσκας με τα κύτταρα στον κλίβανο επώασης για 5 λεπτά. Προστίθενται 40 μl διαλύματος ενζύμου για κάθε cm<sup>2</sup> της φλάσκας καλλιέργειας.
- Παρατήρηση της κυτταρικής αποκόλλησης στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Προσθήκη της διπλάσιας ποσότητας του υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για την αδρανοποίηση της τρυψίνης.
- Μεταφορά του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα – φυγοκέντρηση στα 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων.
- Συλλογή 20μl από αυτό το διάλυμα και ανάμιξη με 20μl Trypan blue – Μεταφορά 10μl στο θάλαμο του αιμοκυτταρόμετρου για τη μέτρηση των ζωντανών κυττάρων.
- Πραγματοποίηση υπολογισμών για τον όγκο διαλύματος που περιέχει την κατάλληλη για πάγωμα ποσότητα κυττάρων – Μεταφορά του όγκου αυτού σε νέο σωληνάριο falcon και φυγοκέντρηση 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου – επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μοσχαριού (FBS) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη καθώς και 10% DMSO που είναι κρυστοπροστατευτική ουσία. Το DMSO δρα αφαιρώντας σταδιακά το νερό από τα κύτταρα και έτσι αποφεύγεται η λύση τους και η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό τους κατά τη διαδικασία του παγώματος. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην μεγαλύτερη ανάκτηση κυττάρων κατά την διαδικασία απόψυξής τους. Σε θερμοκρασία δωματίου, όμως, προκαλεί κυτταροτοξικότητα για αυτό η διαδικασία πρέπει να λαμβάνει χώρα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

- Το κυτταροδιάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικό σωληνάριο (cryovial) το οποίο μεταφέρεται σε ένα ειδικό δοχείο που ονομάζεται Mr Frosty και έχει την ικανότητα να ρίχνει τη θερμοκρασία κατά 1°C ανά ένα λεπτό όταν τοποθετείται στους -80°C. Τα κύτταρα παραμένουν εκεί για μία ημέρα.
- Μεταφορά του cryovial με τα κύτταρα σε δεξαμενή υγρού αζώτου, όπου τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

## **A.5 Απόψυξη κυττάρων**

### **Υλικά:**

- DMEM (Biosera, LM – D1113/500)

### **Εξοπλισμός:**

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

### **Διαδικασία:**

- Αφαίρεση του cryovial με τα κύτταρα από τη δεξαμενή υγρού αζώτου
- Τοποθέτηση των κυττάρων σε falcon με προσθήκη θρεπτικού DMEM
- Φυγοκέντρηση (1500 rpm, 25° C, 7 min)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση σε θρεπτικό και τοποθέτηση σε φλάσκα καλλιέργειας κυττάρων
- Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

## A.6 Δημιουργία Δισκίων Αλγινικού Οξέος με Χονδροκύτταρα

### Υλικά:

- Sodium Chloride – NaCl (Applichem, A2942,0500)
- Alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma, 71238)
- Calcium Chloride Solution (Sigma, 21115)
- PBS (Biosera, LM – 52041/500)
- Penicillin – Streptomycin (Gibco, 15140-122)
- DMEM (Biosera, LM – D1113/500)

### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

### Διαδικασία:

- Προετοιμασία διαλύματος αλγινικού οξέος (1,2 % w/v αλγινικό οξύ, 1,5% w/v αλγινικό οξύ, 2,4% w/v αλγινικό οξύ, 150 mM NaCl/ dH<sub>2</sub>O, pH 7.4)
  - Αρχικά υπολογίζονται οι απαραίτητες ποσότητες μάζας σκόνης αλγινικού οξέος και χλωριούχου νατρίου.
  - Δημιουργείται διάλυμα 150 mM NaCl σε απεσταγμένο νερό, το οποίο θερμαίνεται σε θερμοκρασία 60 οC.
  - Στη συνέχεια προστίθεται η ποσότητα αλγινικού οξέος έως ότου το διάλυμα να ομοιογενοποιηθεί.
  - Το διάλυμα ποστειώνεται σε αυτόκαυστο (121οC, 2 atm, 20 λεπτά).
- Προετοιμασία διαλύματος 102 mM CaCl<sub>2</sub>
  - υπολογίζεται η μάζα σκόνης χλωριούχου ασβεστίου που απαιτείται για συγκεκριμένο όγκο διαλύματος.
  - Η σκόνη διαλύεται σε απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Το διάλυμα ποστειώνεται σε αυτόκαυστο (121οC, 2 atm, 20 λεπτά).
- Προετοιμασία δισκίων γελών αλγινικού οξέος με χονδροκύτταρα
  - Υπολογισμός των κύτταρων που θα τοποθετηθούν ανά δισκίο αλγινικού οξέος
  - Εκτέλεση του πρωτόκολλου ενζυμικής αποκόλλησης
  - Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο
  - Υπολογισμός του υλικού καλλιέργειας που απαιτείται για την επαναδιάλυση των ζωντανών κυττάρων και του αλγινικού οξέος που πρέπει να προστεθεί ώστε κάθε δισκίο να περιέχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , όπου

C1: η αρχική συγκέντρωση του αλγινικού οξέος

V1: ο όγκος του αλγινικού οξέος που πρέπει να προστεθεί

C2: η τελική συγκέντρωση του αλγινικού οξέος (1,2% w/v)

V2: ο τελικός όγκος για να δημιουργηθούν όλα τα δισκία που έχουν υπολογιστεί

- Προσεχτική ανάμιξη του αλγινικού οξέος με τα κύτταρα
- Διαχωρισμός του διαλύματος σε μία πλάκα μικροπιτλοδότησης με 96 οπές. Σε κάθε οπή/πηγάδι προστίθενται 70μl διαλύματος αλγινικού οξέος και κυττάρων.
- Προσθήκη 200μl  $\text{CaCl}_2$  (102mM) με προσεκτικές κινήσεις και τοποθέτηση της πλάκας στον κλίβανο επώασης για μία ώρα προκειμένου να πολυμεριστεί το αλγινικό οξύ.
- Μετά το πέρας της μίας ώρας γίνεται απομάκρυνση του  $\text{CaCl}_2$  με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υπάρξει καταστροφή του δισκίου.
- Μεταφορά του κάθε δισκίου σε ξεχωριστό φρεάτιο πλάκας μικροπιτλοδότησης με 24 φρεάτια.
- Προσθήκη σε κάθε φρεάτιο 1mL υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μοσχαριού (FBS) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
- Τοποθέτηση των δισκίων με τα χονδροκύτταρα στον κλίβανο επώασης

## A.7 Δημιουργία Δισκίων Αλγινικού Οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας

### Υλικά:

- Sodium Chloride – NaCl (Applichem, A2942,0500)
- Alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma, 71238)
- Calcium Chloride Solution (Sigma,21115)
- PBS (Biosera, LM – 52041/500)
- Penicillin – Streptomycin (Gibco)
- DMEM (Biosera)
- Collagen type II from chicken sternal cartilage (Sigma, C9301)
- Hyaluronic Acid (Sigma, 53747)
- Chondroitin Sulfate A from Bovine Trachea (Calbiochem, 230687)
- Fibronectin from bovine plasma solution (Sigma, F1141)

### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Water jacket CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific)

### Διαδικασία:

- Προετοιμασία διαλύματος αλγινικού οξέος (2,4% w/v αλγινικό οξύ, 150 mM NaCl/ dH<sub>2</sub>O, pH 7.4)
  - Αρχικά υπολογίζονται οι απαραίτητες ποσότητες μάζας σκόνης αλγινικού οξέος και χλωριούχου νατρίου.
  - Δημιουργείται διάλυμα 150 mM NaCl σε απεσταγμένο νερό, το οποίο θερμαίνεται σε θερμοκρασία 60 οC.
  - Στη συνέχεια προστίθεται η ποσότητα αλγινικού οξέος έως ότου το διάλυμα να ομοιογενοποιηθεί.
  - Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (121οC, 2 atm, 20 λεπτά).
- Προετοιμασία διαλύματος 102 mM CaCl<sub>2</sub>
  - Υπολογίζεται η μάζα σκόνης χλωριούχου ασβεστίου που απαιτείται για συγκεκριμένο όγκο διαλύματος.
  - Η σκόνη διαλύεται σε απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (121οC, 2 atm, 20 λεπτά).
- Προετοιμασία διαλυμάτων με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (10% w/v)
  - Υπολογισμός της απαιτούμενης ποσότητας κάθε συστατικού για τελική συγκέντρωση 10% ως προς το αλγινικό οξύ, δηλαδή 1,2 mg/ml
  - Δημιουργία διαλυμάτων με διαλύτη PBS

- Προετοιμασία δισκίων γελών αλγινικού οξέος με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας
  - Υπολογισμός των κύτταρων που θα τοποθετηθούν ανά δισκίο αλγινικού οξέος
  - Εκτέλεση του πρωτόκολλου ενζυμικής αποκόλλησης
  - Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο
  - Υπολογισμός του υλικού καλλιέργειας που απαιτείται για την επαναδιάλυση των ζωντανών κυττάρων και του αλγινικού οξέος που πρέπει να προστεθεί ώστε κάθε δισκίο να περιέχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :  $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ , όπου
    - C1: η αρχική συγκέντρωση του αλγινικού οξέος
    - V1: ο όγκος του αλγινικού οξέος που πρέπει να προστεθεί
    - C2: η τελική συγκέντρωση του αλγινικού οξέος (1,2% w/v)
    - V2: ο τελικός όγκος για να δημιουργηθούν όλα τα δισκία που έχουν υπολογιστεί
  - Προσεχτική ανάμιξη του αλγινικού οξέος με το εκάστοτε διάλυμα με το διάλυμα που περιέχει κάθε συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας
  - Προσεχτική ανάμιξη του διαλύματος με τα κύτταρα
  - Διαχωρισμός του διαλύματος σε μία πλάκα μικροπιτλοδότησης με 96 οπές. Σε κάθε οπή/πηγάδι προστίθενται 70μl διαλύματος αλγινικού οξέος και κυττάρων.
  - Προσθήκη 200μl  $CaCl_2$  (102mM) με προσεκτικές κινήσεις και τοποθέτηση της πλάκας στον κλίβανο επώασης για μία ώρα προκειμένου να πολυμεριστεί το αλγινικό οξύ.
  - Μετά το πέρας της μίας ώρας γίνεται απομάκρυνση του  $CaCl_2$  με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υπάρξει καταστροφή του δισκίου.
  - Μεταφορά του κάθε δισκίου σε ξεχωριστό φρεάτιο πλάκας μικροπιτλοδότησης με 24 φρεάτια.
  - Προσθήκη σε κάθε φρεάτιο 1mL υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μοσχαριού (FBS) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
  - Τοποθέτηση των δισκίων με τα χονδροκύτταρα στον κλίβανο επώασης



## **A.8 Αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος – Συλλογή των χονδροκυττάρων**

### **Υλικά:**

- Sodium Citrate Dihydrate
- Sodium Chloride (Applichem)
- EDTA

### **Εξοπλισμός:**

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)

### **Διαδικασία:**

- Προετοιμασία διαλύματος αποπολυμερισμού:
  - Απεσταγμένο νερό
  - 55 mM κιτρικό νάτριο (sodium citrate) για τη διατήρηση του pH
  - 50 mM χλωριούχο νάτριο (sodium chloride)
  - 20 mM EDTA , χηλικός παράγοντας, δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου προκαλώντας τον αποπολυμερισμό της γέλης
- Αποπολυμερισμός:
  - Τοποθέτηση κάθε δισκίου σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf
  - Προσθήκη του διαλύματος πολυμερισμού για 10 λεπτά στους 25oC
  - Φυγοκέντρωση (380g, 25oC, 5 λεπτά)
  - Απομάκρυνση υπερκειμένου
  - Επαναδιάλυση κυττάρων σε υλικό καλλιέργειας
  - Μέτρηση αριθμού ζωντανών κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο

## A.9 Αποπολυμερισμός των δισκίων αλγινικού οξέος – Συλλογή Φωσφοπρωτεϊνών

### Υλικά:

- Sodium Citrate Dihydrate
- Sodium Chloride (Applichem)
- EDTA
- Lysis Buffer (Applichem)
- PI (Applichem)
- PMSF (Applichem, A0999,0025)

### Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Vortex

### Διαδικασία:

- Προετοιμασία διαλύματος αποπολυμερισμού:
  - Απεσταγμένο νερό
  - 55 mM κιτρικό νάτριο (sodium citrate) για τη διατήρηση του pH
  - 50 mM χλωριούχο νάτριο (sodium chloride)
  - 20 mM EDTA , χηλικός παράγοντας, δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου προκαλώντας τον αποπολυμερισμό της γέλης
- Διάλυμα λύσης :
  - Lysis Buffer
  - Αναστολείς πρωτεασών (PI) σε αναλογία 1: 100
  - Διάλυμα PMSF σε αναλογία 1:50
- Αποπολυμερισμός & Λύση:
  - Ανάμιξη διαλύματος αποπολυμερισμού και διαλύματος λύσης με Vortex
  - Τοποθέτηση κάθε δισκίου σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf
  - Προσθήκη διαλύματος για 10 λεπτά στους 25<sup>ο</sup> C
  - Φυγοκέντρηση (380g, 4oC, 15 λεπτά)
  - Συλλογή υπερκλειμένου σε erpendorfs
  - Φύλαξη των erpendorfs στους -20<sup>ο</sup> C ή στους -80<sup>ο</sup> C

## A.10 Συλλογή Κυτταροκινών

### Διαδικασία:

- Συλλέγεται ποσότητα του θρεπτικού υλικού που περιβάλλει τα δισκία του αλγινικού οξέος σε erpendorfs
- Φύλαξη των erpendorfs στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$

## A.11 Μέτρηση Πρωτεϊνών με την Μέθοδο Sandwich ELISA xMAP

### Υλικά:

- SAPE
- Assay Buffer

### Εξοπλισμός:

- Sonicator
- Luminex

### Διαδικασία:

- Τα σωληνάρια τύπου erpendorf με τις φωσφοπρωτεΐνες και τις κυτταροκίνες που έχουν τοποθετηθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ανασύρονται και ξεπαγώνονται.
- Τα μικροσφαιρίδια, τα οποία είναι συζευγμένα με συγκεκριμένα αντισώματα και είναι φωτοευαίσθητα, υφίστανται ανάδευση και sonication για 10 δευτερόλεπτα. Φυλάσσονται σε συγκέντρωση 5000 μικροσφαιριδίων/μl και επαναδιαλύονται σε τελική συγκέντρωση 50 μικροσφαιρίδια/μl με την χρήση κατάλληλου διαλύματος εργασίας (Assay buffer).
- Ακολουθεί προετοιμασία του μίγματος των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων ανίχνευσης όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται και πάλι το διάλυμα εργασίας.
- Στη συνέχεια, 50μl από το μίγμα των μικροσφαιριδίων μεταφέρονται σε κάθε φρεάτιο πλάκας μικροπιλοδότησης 96 θέσεων. Η πλάκα τοποθετείται πάνω στον μαγνητικό διαχωριστή (μαγνητική πλάκα) και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε φρεάτιο και η πλάκα μεταφέρεται στον μαγνητικό διαχωριστή και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Ακολούθως, 50μl δείγματος πρωτεΐνης μεταφέρονται στα κατάλληλα φρεάτια της πλάκας.

- Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 90 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με το πέρας των 90 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας.
- Το βήμα 8 επαναλαμβάνεται και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Ακολουθεί μεταφορά 20μl μίγματος αντισωμάτων ανίχνευσης συζευγμένου με βιοτίνη σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροπιλοδότησης.
- Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με το πέρας των 60 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε πηγάδι, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε φρεάτιο και η πλάκα μεταφέρεται στον μαγνητικό διαχωριστή και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Προετοιμάζεται το μίγμα της στρεπταβιδίνης – φυκοερυθρίνης (SAPE) (που συνδέεται στην βιοτίνη του αντισώματος ανίχνευσης) σε αραιώση 1:200 (φυλάσσεται σε συγκέντρωση 1mg/ml) σε διάλυμα εργασίας.
- Προστίθενται 50μl διαλύματος SAPE σε κάθε φρεάτιο.
- Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με το πέρας των 15 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας.
- Η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 130μl διαλύματος εργασίας.
- Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ειδικό κάλυμμα αφαιρείται, η πλάκα εισάγεται στο μηχάνημα LUMINEX και ακολουθεί ανάλυση 100μl από κάθε φρεάτιο σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του συστήματος.
- Τα δεδομένα που προκύπτουν αναλύονται με την χρήση του λογισμικού Matlab και του προγράμματος excel.

## Βιβλιογραφία

1. Illustrated Encyclopedia of Human Histology, R.V Krstic, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984
2. Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology
3. Articular Cartilage Lesions : A Practical Guide to Assessment and Treatment, Brian J.Cole, M. Mike Malek, 2004
4. Articular Cartilage Tissue Engineering, Kyriacos A.Athanasiou, 2009
5. Principles of Cartilage Repair, Christoph Erggelt, 2001
6. The role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration
7. Chhabra, N. *Biochemistry for Medics*. 2013
8. Articular Cartilage Collagen : An Irreplaceable Framework, David R. Eyre, Mary Ann Weis and Jiann-Jiu Wu University of Washington, Seattle, 2006
9. Structure and Fuction of Cartilage Collagens, Peter Bruckner and Michel Van Der Rest, 1994
10. Matrix deposition of tryptophan-containing allelic variants of type IX collagen in developing human cartilage, David R. Eyre, 2003
11. Chondrons from articular cartilage, Poole CA, Ayad S, 1998
12. Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, Kreis T., Vale R., 1999
13. Collagen of Articular Cartilage, David Eyre, 2002
14. The Structure and Function of Cartilage Proteoglycans, P.J. Roughley et al, 2006
15. Cartilage Proteoglycans, Cheryl B. Knudson, Warren Knudson, 2001
16. Hyaluronan : it's nature, distribution, functions and turnover, Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB, 1997
17. Fibronectin, Cartilage and Osteoarthritis, Xavier Chevalier, 1993
18. Effects of Fibronectin on Articular Cartilage Chondrocyte Proteoglycan Synthesis and Response to Insulin-like Growth Factor-I, James A. Martin and Joseph A. Buckwalter, 1998
19. The chondrocyte pericellular matrix: a model for hyaluronan-mediated cell-matrix interactions C. B. Knudson', G. A. Nofal, L. Pamintuan and D. J. Aguiar', 1998
20. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, Jeffrey D Esko, Koji Kimata, and Ulf Lindahl, Essentials of Glycobiology, 2nd edition.
21. Perlecan : an important component of cartilage pericellular matrix, R. Gomes et al, 2006
22. Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment, Nirmala SundarRaj et al, 1996
23. Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage, Pullig Oliver, 1999
24. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI, D. J. Bidanset, 1992
25. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering, P.M. van der Kraan, 2002

26. IL-1b induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkB signaling pathways, Zhiyong Fan et al., 2004
27. NF- kB Mediates the Stimulation of Cytokine and Chemokine Expression by Human Articular Chondrocytes in Response to Fibronectin Fragments, Judit I. Pulai et al., 2005
28. The BMP antagonists follistatin and gremlin in normal and early osteoarthritic cartilage: an immunohistochemical study, G Tardif, 2009
29. Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis, Mary B. Goldring, 2012
30. Arthritis induced with cartilage – specific antibodies is IL-4 dependent, Kutty Selva Nandakumar, Rikard Holmdahl, 2006
31. Role of PTPN11 in Cartilage Stem Cells and Tumorigenesis, Yang, Wentian, 2015
32. Effects of mesenchymal stem cells on interleukin-1β-treated chondrocytes and cartilage in a rat osteoarthritic model, Jiley Tang et al, 2015
33. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, Jacobs MD, Harrison SC, 1998
34. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex, Régnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M, 1997
35. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation, Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A, 1997
36. Transcriptional regulation by STAT6, Shreevrat Goenka, Mark H. Kaplan, 2011
37. Alginates : Biology and Applications, Bernd H.A. Rehm, Springer, 2009
38. Protein release from alginate matrices, W.R. Gombotz, 2012
39. Alginate composites for bone tissue engineering, Venkatesan et al., 2014
40. Chondrogenesis of Adult Stem Cells from Adipose Tissue and Bone Marrow: Induction by Growth Factors and Cartilage-Derived Matrix, Brian O. Diekman et al., 2010
41. The Cell – ECM Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes, Yue Gao et al., 2014
42. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review, Riccardo A.A. Muzzarelli et al., 2012
43. Alginate–hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process, O. Catanzano et al., 2015
44. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1b on human articular chondrocytes cultivated in clusters, Bassleer CT et al., Osteoarthritis Cartilage, 1998
45. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants, Chan PS, Caron JP, Orth MW, 2005
46. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E2 in articular cartilage explants, Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW, 2005

## ΙΣΤΌΤΟΠΟΙ

47. <http://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3>
48. <http://genecards.com>
49. <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>