



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Τομέας Μηχανολογικού Σχεδιασμού και Αυτομάτου Ελέγχου

Εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων για την ανακάλυψη μηχανισμών παθογένειας στην οστεοαρθρίτιδα

Διπλωματική εργασία

Σμαράγδα Δημητρακοπούλου

Υπό την επίβλεψη του

Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Αλεξόπουλου

2019

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	1
1.1	Οστεοαρθρίτιδα	1
1.2	Φάρμακα	2
1.3	Υπολογιστική Βιολογία	2
2	Θεωρία	3
3	Αποτελέσματα	5
3.1	Δεδομένα	5
3.2	Αφαίρεση Θορύβου και Κανονικοποίηση μετρήσεων	6
3.3	Γονιδιακή Ανάλυση	6
3.4	Ανάλυση δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων	9
3.5	Μετα-Ανάλυση	11
3.6	Σταθερότητα έναντι θορύβου	13
3.7	Φάρμακα	14
3.8	Σύγκριση με πειράματα	14
4	Συμπεράσματα	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια χρόνια και προοδευτικά εξελισσόμενη ασθένεια των αρθρώσεων, που επηρεάζει τόσο τις μικρές αρθρώσεις (όπως οι αρθρώσεις των δαχτύλων) όσο και τις μεγάλες (πχ. άρθρωση γονάτου). Η πιθανότητα εμφάνισης οστεοαρθρίτιδας αυξάνεται με την ηλικία. Περίπου 80 % του πληθυσμού έχει εμφανίσει κλινικά σημάδια οστεοαρθρίτιδας μέχρι την ηλικία των 65 χρόνων. Βασικά συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας αποτελούν ο πόνος στις αρθρώσεις καθώς και η ακαμψία τους που μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια και αναπηρία.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας με την ηλικία και τη παχυσαρκία να αποτελούν τους πιο σημαντικούς. Άλλοι παράγοντες αποτελούν το φύλο καθώς και γενετικοί παράγοντες. Επιπλέον η εμφάνιση της ασθένειας συνδέεται και με τραυματικούς παράγοντες όπως τραυματισμούς, χειρουργεία και εκ γενετής παραμορφώσεις των αρθρώσεων.

Η οστεοαρθρίτιδα πλέον έχει αναγνωριστεί ως ασθένεια όλης της άρθρωσης και περιλαμβάνει αλλαγές στον αρθρικό χόνδρο, στο εμπλεκόμενο οστό, στην αρθρική μεμβράνη και στο μηνίσκο. Τελικό στάδιο της ασθένειας αποτελεί η πλήρης καταστροφή της άρθρωσης.

1.2 Φάρμακα

Μέχρι σήμερα η οστεοαρθρίτιδα είναι μία μη αντιμετωπίσιμη ασθένεια και τα φάρμακα που συνταγογραφούνται αφορούν αποκλειστικά την μείωση του συνεπαγόμενου πόνου (πχ. παρακεταμόλη). Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την εύρεση φαρμάκου κατά της οστεοαρθρίτιδας αλλά δεν έχουν ακόμα αποφέρει αποτελέσματα. Παρόλα αυτά η πιθανότητα εύρεσης φαρμάκου αυξάνεται συνεχώς καθώς η επιστημονική κοινότητα έχει αρχίσει να επικεντρώνεται στην υπολογιστική βιολογία.

1.3 Υπολογιστική Βιολογία

Η υπολογιστική βιολογία προσφέρει τη δυνατότητα εύρεσης καινοτόμων θεραπειών για πολύπλοκες ασθένειες όπως η οστεοαρθρίτιδα. Η υπολογιστική βιολογία αντιμετωπίζει τα κύτταρα και τους ιστούς σαν βιολογικά συστήματα. Βιολογικό σύστημα ονομάζεται μία ομάδα στοιχείων (πχ. γονίδια, πρωτείνες, ένζυμα) με πολλαπλές και ποικίλλες λειτουργίες. Αυτά τα στοιχεία αλληλεπιδρούν με ένα συγκεκριμένο και μη γραμμικό τρόπο δημιουργώντας σαφή δίκτυα αλληλεπίδρασης. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης βοηθούν στην κατανόηση των βιολογικών συστημάτων και στην εύρεση στοιχείων που παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτά. Η υπολογιστική βιολογία έχει υιοθετήσει την υπόθεση ότι γονίδια ή πρωτείνες που σχετίζονται με κάποια ασθένεια βρίσκονται κοντά τοπολογικά. Συνεπώς, η γνώση των δικτύων αλληλεπίδρασης βοηθάει στον εντοπισμό σημαντικών για την ασθένεια στοιχείων του βιολογικού συστήματος.

Η υπολογιστική βιολογία αντιμετωπίζει την οστεοαρθρίτιδα ως μία διαταραχή όλης της άρθρωσης η οποία προέρχεται από τη δυσλειτουργία πολλών δικτύων αλληλεπίδρασης σε όλους τους εμπλεκόμενους ιστούς και οστά. Επομένως, προκειμένου να βρεθεί φάρμακο για την οστεοαρθρίτιδα ο τρόπος που αυτά τα δίκτυα αλληλοεπηρεάζονται πρέπει να μελετηθεί.

Σήμερα οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται στην μελέτη συγκεκριμένης ομάδας στοιχείων (πχ. γονίδια) από έναν ιστό ή οστό μια δεδομένη χρονική στιγμή. Η ανάγκη για μία διαφορετική προσέγγιση είναι εμφανής προκειμένου να ενσωματώνονται πληροφορίες από όλους τους ιστούς που εμπλέκονται στην οστεοαρθρίτιδα.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρησιμοποιούνται δίκτυα συνεχφραζόμενων γονιδίων προκειμένου να συνδυαστούν και οι τέσσερις, εμπλεκόμενοι στην ασθένεια, ιστοί/ οστά. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση παθολογικών μηχανισμών κοινών και στους τέσσερις ιστούς/ οστά καθώς και η αξιολόγηση υπάρχοντων φαρμάκων ως προς την ικανότητα τους να αντιστρέψουν τους μηχανισμούς αυτούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρία

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι :

Αφαίρεση Θορύβου

Για την αφαίρεση του θορύβου από τα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος **RMA**. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη θεώρηση ότι οι μετρούμενες τιμές έκφρασης των γονιδίων αποτελούν άθροισμα της πραγματικής τιμής έκφρασης επί έναν συντελεστή που εξαρτάται από την μικροσυστοιχία και ενός σφάλματος που ακολουθεί κανονική κατανομή.

Κανονικοποίηση

Για την κανονικοποίηση των μετρήσεων η μέθοδος **quantile normalisation** χρησιμοποιήθηκε. Η μέθοδος αυτή προσαρμόζει έτσι τις τιμές έκφρασης των γονιδίων σε κάθε δείγμα, ώστε τα δείγματα να έχουν ακριβώς την ίδια κατανομή.

Γονιδιακή Ανάλυση

Κατα τη γονιδιακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ένα μέτρο σημαντικότητας και ένα μέτρο σπουδαιότητας προκειμένου να βρεθούν τα γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση μεταξύ υγιών και άρρωστων δειγμάτων. Για την εύρεση του μέτρου σπουδαιότητας ελέγχθηκε η στατιστική υπόθεση ” η εμφανιζόμενη διαφορά δεν έχει προέλθει από τυχαιότητα”.

Ανάλυση Έυρεσης Μονοπατιών

Για την ανάλυση εύρεσης μονοπατιών η μέθοδος **GSEA** χρησιμοποιήθηκε. Η μέθοδος **GSEA** αναθέτει σε κάθε βιολογικό μονοπάτι μία πιθανότητα. Η πιθανότητα αυτή εξαρτάται από το αν τα γονίδια που το αποτελούν είναι διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ των υγιών και άρρωστων δειγμάτων.

Ανάλυση δικτύων αλληλοσυσχέτισης των γονιδίων

Για τη δημιουργία των δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ως βάση η στατιστική συσχέτιση των δεδομένων των πειραμάτων κατά **Pearson**. Για την εύρεση των συνόλων χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός της ιεραρχικής ομαδοποίησης και της ομαδοποίησης **k-means**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αποτελέσματα

3.1 Δεδομένα

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι να βρει κοινούς παθολογικούς μηχανισμούς μεταξύ των τεσσάρων ιστών/ οστών που σχετίζονται με την παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας στο γόνατο : του χόνδρου, της κνήμης, της αρθριτικής μεμβράνης και του μηνίσκου. Για το σκοπό αυτό τα δεδομένα από τέσσερα πειράματα σε μικροσυστοιχίες χρησιμοποιήθηκαν ,ένα για τον κάθε ιστό, όπως φαίνεται στο πίνακα 3.1. Σε κάθε ένα από τα πειράματα αφαιρέθηκε ιστός τόσο από υγιή όσο και από οστεοαρθρικά δείγματα. Η πειραματική επεξεργασία των ιστών αυτών οδήγησε στην ανάκτηση τιμών έκφρασης για όλα τα γονίδια κάθε δείγματος. Όλα τα δεδομένα προήλθαν από τη βάση δεδομένων GEO.

Πειράματα	GEO
Αρθριτική Μεμβράνη	GSE55235
Χόνδρος	GSE117999
Κνήμη	GSE51588
Μηνίσκος	GSE98918

Table 3.1: Ο αριθμός GEO που αντιστοιχεί στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την ανάλυση

3.2 Αφαίρεση Θορύβου και Κανονικοποίηση μετρήσεων

Για την αφαίρεση του θορύβου και την κανονικοποίηση των μετρήσεων η μέθοδος **RMA** και **quantile normalisation** χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα, καθώς ήταν ο μοναδικός συνδυασμός που οδήγησε σε **MA** διαγράμματα που οι διορθωμένες μετρήσεις ήταν διασκορπισμένες γύρω από τη μηδενική γραμμή.

3.3 Γονιδιακή Ανάλυση

Μετά την απομάκρυνση δειγμάτων με προβληματικά διαφορετικές τιμές μετρήσεων από τα υπόλοιπα δείγματα, πραγματοποιήθηκε γονιδιακή ανάλυση. Συγκεκριμένα, γονίδια τα οποία είναι διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ των υγιών και των οστεοαρθριτικών δειγμάτων βρέθηκαν. Τα γονίδια αυτά ονομάζονται διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια και συχνά ευθύνονται για τη εμφάνιση κάποιας συγκεκριμένης παθολογείας. Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια ονομάστηκαν εκείνα για τα οποία ίσχυαν οι συνθήκες της εξίσωσης 3.1

$$\log_2 \text{FoldChange} \geq 1.5 \quad (3.1)$$

$$\text{adj.}p\text{value} \leq 0.05 \quad (3.2)$$

Από την εικόνα 3.1 μέχρι την εικόνα 3.4 τα διαγράμματα ηφαιστείου για κάθε ιστό/οστό εμφανίζονται. Κάθε σημείο του διαγράμματος αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο. Τα πορτοκαλί σημεία αντιστοιχούν σε διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια, ενώ το κόκκινο χρώμα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να υπογραμμιστούν γονίδια των οποίων η έκφραση είτε τετραπλασιάζεται, είτε υποτετραπλασιάζεται μεταξύ των υγιών και των άρρωστων δειγμάτων. Τέλος στο διάγραμμα απεικονίζονται και οι ονομασίες των γονιδίων που έχουν $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 2.5$.

Το διάγραμμα **Venn** των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων των τεσσάρων ιστών απεικονίζεται στο σχήμα 3.5. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, δεν υπάρχει κοινό διαφορετικά εκφρασμένο γονίδιο και στους τέσσερις ιστούς/οστά. Επίσης στο διάγραμμα φαίνεται ότι μόνο οχτώ διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια είναι κοινά σε τρεις από τους τέσσερις ιστούς/οστά.

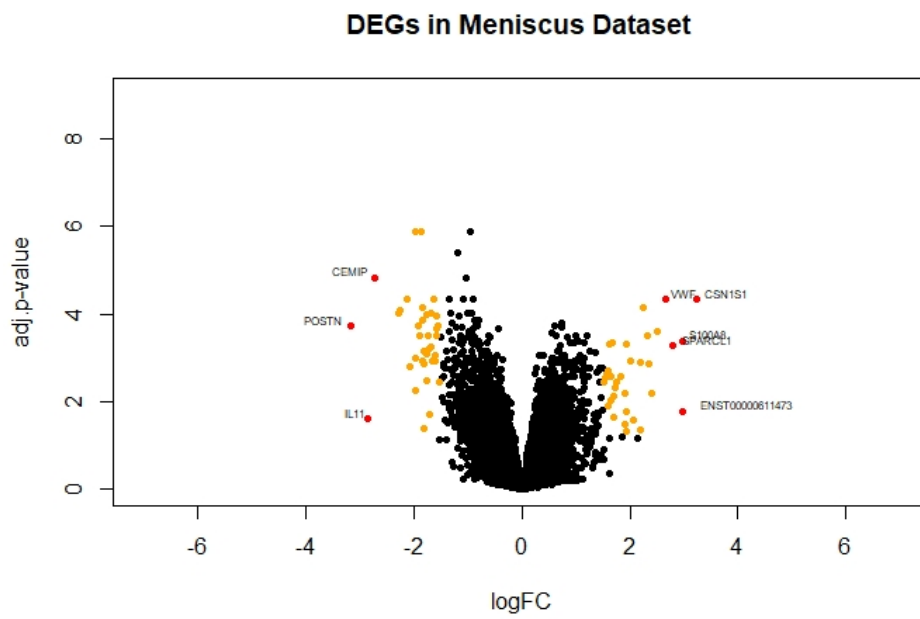


Figure 3.1: Διάγραμμα ηφαιστείου του μηνίσκου

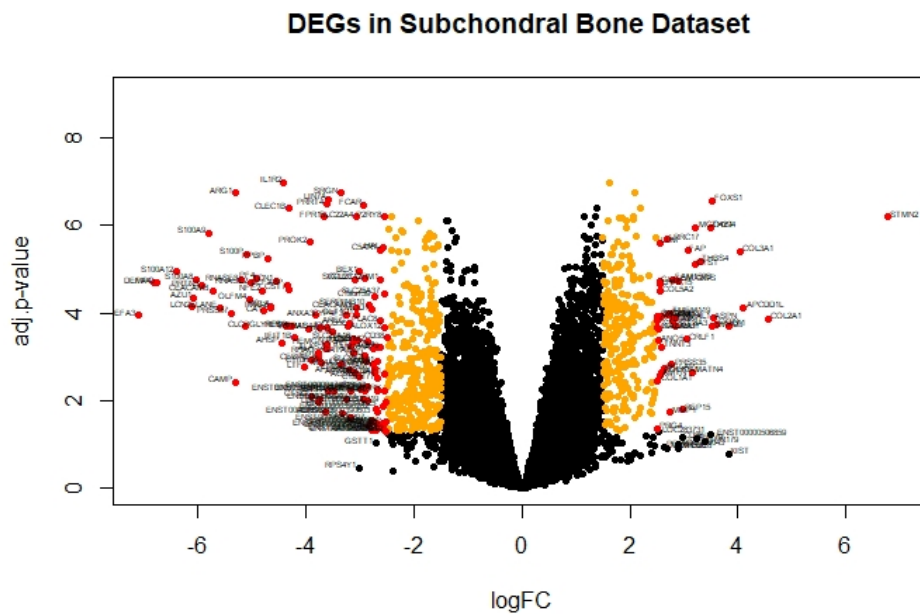


Figure 3.2: Διάγραμμα ηφαιστείου της κνήμης

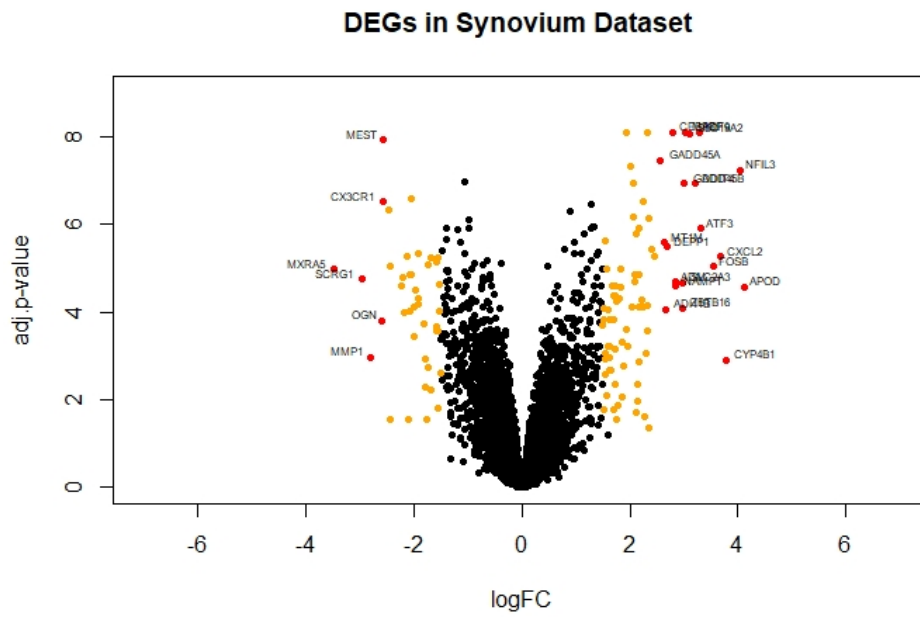


Figure 3.3: Διάγραμμα ηφαιστείου της αρθριτικής μεμβράνης

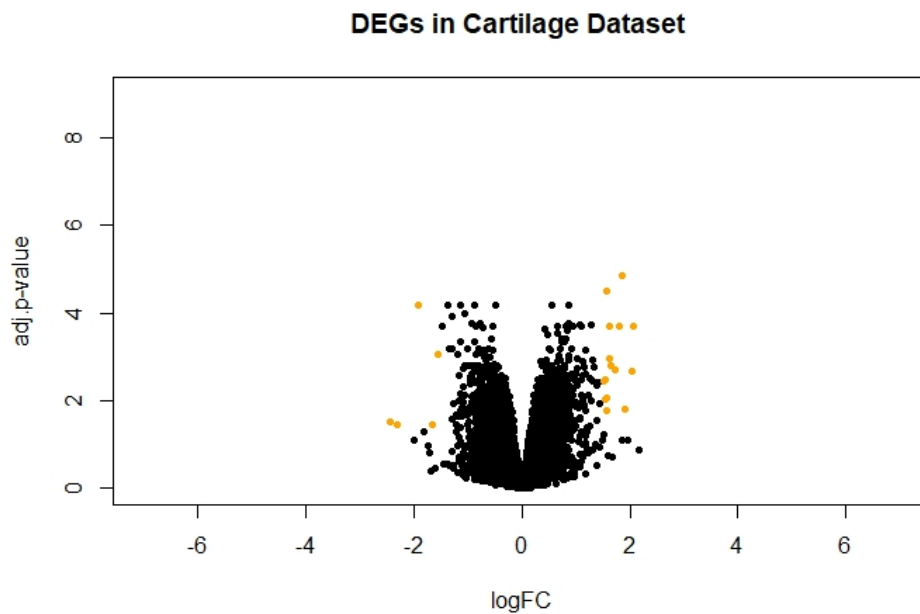
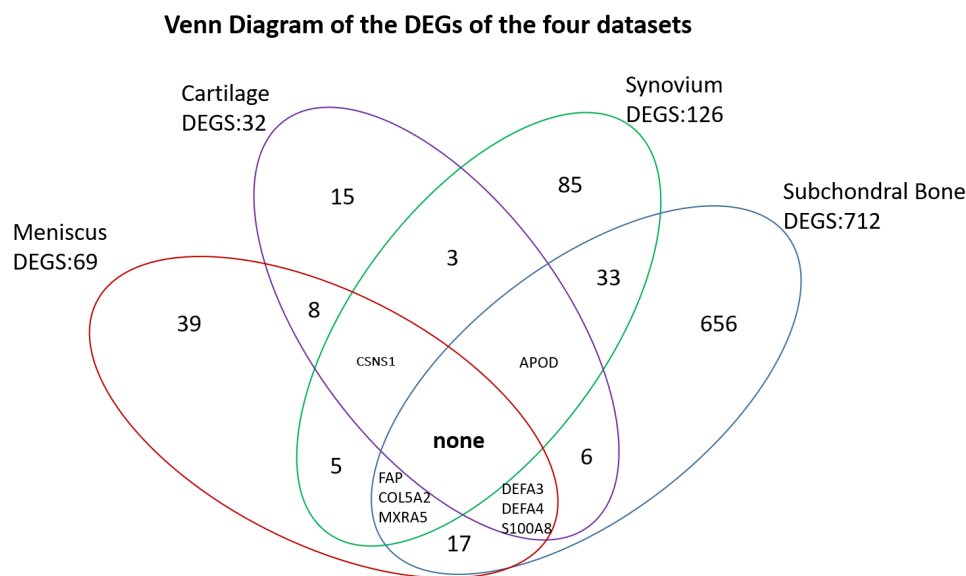


Figure 3.4: Διάγραμμα ηφαιστείου του χόνδρου

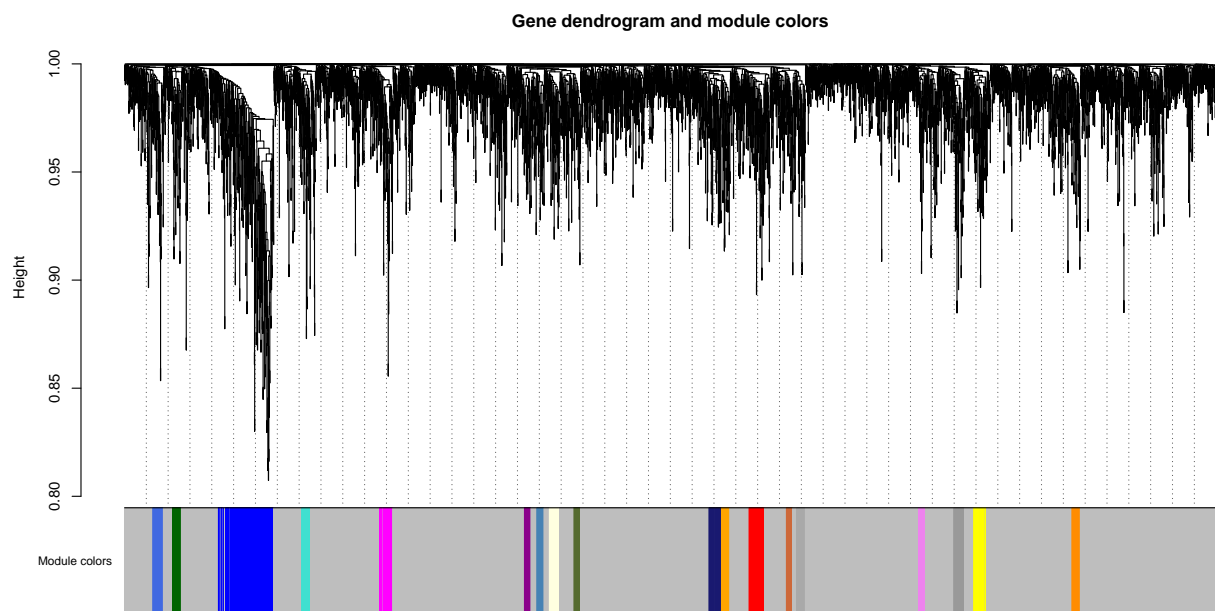
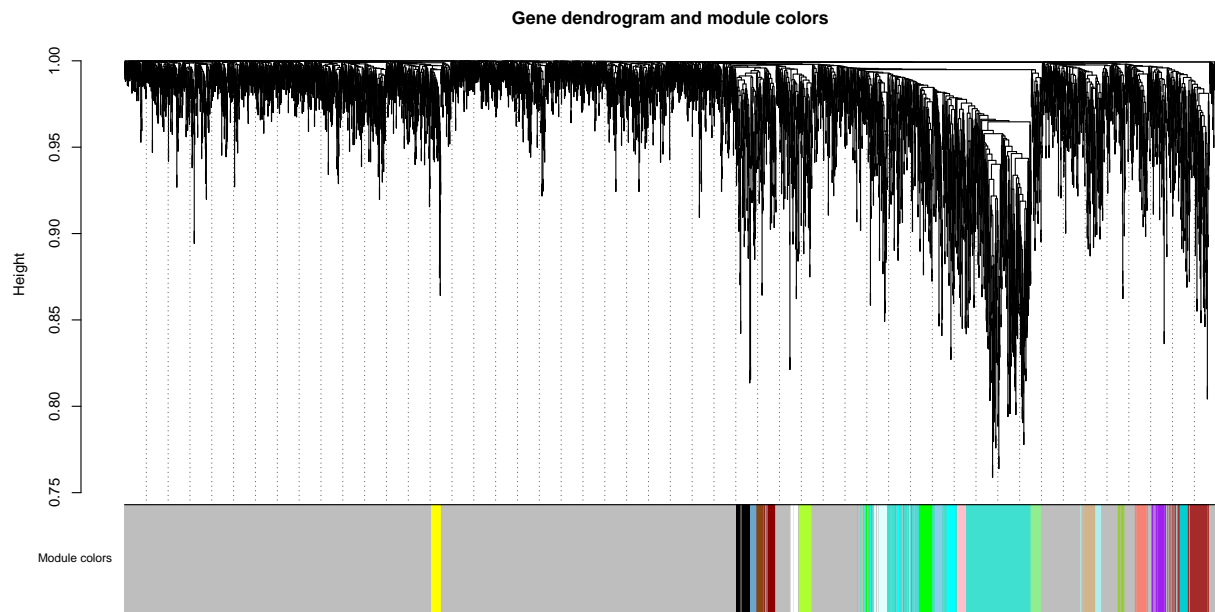


Σχήμα 3.5: Το διάγραμμα Venn των τεσσάρων ιστών

3.4 Ανάλυση δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων

Για την ανάλυση δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων μόνο τα δείγματα που είχαν οστεοαρθρίτιδα χρησιμοποιήθηκαν. Σκοπός της ανάλυσης δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων είναι η εύρεση γονιδίων που εκφράζονται με παρόμοιο τρόπο μεταξύ όλων των δειγμάτων. Βασική θεώρηση της ανάλυσης αυτής είναι ότι τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο και σχετίζονται άμεσα με την ασθένεια. Γονίδια που εκφράζονται με παρόμοιο τρόπο μεταξύ όλων των δειγμάτων ενσωματώνονται σε ένα σύνολο. Για την εύρεση των συνόλων απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η δημιουργία ενός δικτύου συνεκφραζόμενων γονιδίων το οποίο είναι ανεξάρτητο της κλίμακας τοπολογικά.

Από τα 11461 γονίδια που συμμετείχαν στην ανάλυση, μόνο τα 2850 συσχετίζονταν, δημιουργώντας 37 σύνολα. Το δίκτυο που δημιουργήθηκε καθώς και τα σύνολα που βρέθηκαν απεικονίζονται στο σχήμα 3.6. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα διαφορετικά σύνολα. Όλα τα γονίδια που δεν εντάχθηκαν σε κανένα σύνολο ενσωματώθηκαν σε ένα " ψεύτικο " σύνολο που του ανατέθηκε το γκρι χρώμα.



Σχήμα 3.6: Το δίκτυο που δημιουργήθηκε καθώς και τα σύνολα που βρέθηκαν. Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα διαφορετικά σύνολα

3.5 Μετα-Ανάλυση

Τα σύνολα που βρέθηκαν δεν είναι όλα ανεξάρτητα μεταξύ τους. Κάποια αλληλοσυσχετίζονται. Επομένως, τα αλληλοσυσχετιζόμενα μπορούν να ενωθούν δημιουργώντας μετα-σύνολα. Ο τρόπος που θα ενωθούν εξαρτάται από το πείραμα του οποίου τα δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον υπολογισμό των στατιστικών συσχετίσεων. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του πειράματος που αφορά την αρθριτική μεμβράνη και έτσι τα 37 σύνολα ενσωματώθηκαν σε 6 μετα-σύνολα. Στη συνέχεια σε κάθε ένα από τα μετα-σύνολα πραγματοποιήθηκε ανάλυση βιολογικών μονοπατιών προκειμένου να βρεθούν βιολογικά μονοπάτια και λειτουργίες που σχετίζονται με κάθε ένα μετα-σύνολο.

Στην εικόνα 3.7 εμφανίζεται το δίκτυο που κατασκευάζουν τα 2850 γονίδια σύμφωνα με τον τρόπο που συσχετίζονται στο πείραμα της αρθριτικής μεμβράνης. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στα διαφορετικά μετα-σύνολα. Από τον πίνακα 3.2 μέχρι τον πίνακα 3.7 παρουσιάζονται τα σημαντικά βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν σε κάθε μετα-σύνολο.

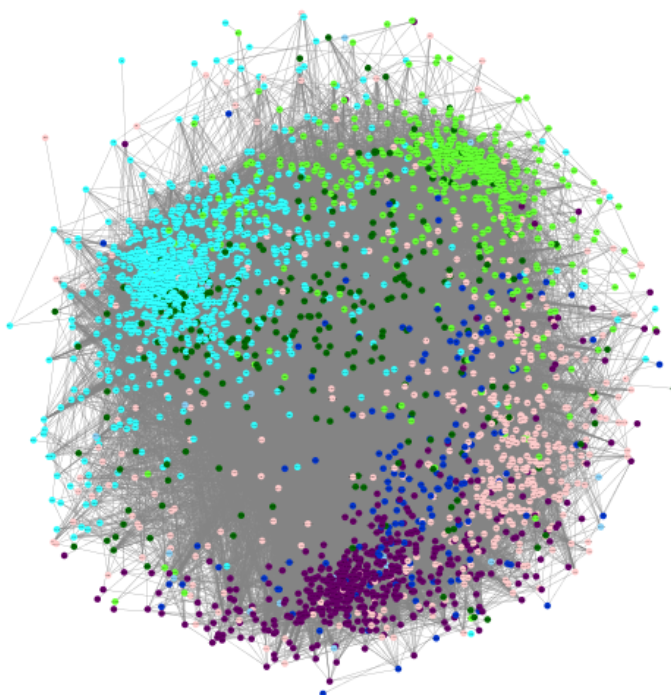


Figure 3.7: Το κατασκευασμένο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της αρθριτικής μεμβράνης δίκτυο των 2850 γονιδίων. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στα διαφορετικά μετα-σύνολα.

Purple meta-module

REACTOME SIGNALING BY RHO GTPASES
 REACTOME TRANSCRIPTION
 REACTOMEPOST_TRANSLATIONAL_PROTEIN_MODIFICATION

Table 3.2: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο μοβ μετα-σύνολο.

Royal blue meta-module

none

Table 3.3: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο σκούρο μπλε μετα-σύνολο.

Pink meta-module

REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION
 NABA_COLLAGENS

Table 3.4: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο ροζ μετα-σύνολο.

Dark green meta-module

KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS
 KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION
 KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION
 KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS
 KEGG_LEISHMANIA_INFECTION
 KEGG_ASTHMA
 KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE
 KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS
 KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION
 KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE
 KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS
 REACTOME_MHC_CLASS_II_ANTIGEN_PRESENTATION
 REACTOME_IMMUNE_SYSTEM
 REACTOME_ADAPTIVE_IMMUNE_SYSTEM

Table 3.5: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο σκούρο πράσινο μετα-σύνολο.

Light cyan meta-module
KEGG_SPLICEOSOME
KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON
ST_JNK_MAPK_PATHWAY
PID_TAP63_PATHWAY
REACTOME_TCA_CYCLE_AND_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT
REACTOME_TRANSPORT_OF_MATURE_TRANSCRIPT_TO_CYTOPLASM
REACTOME_INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS
REACTOME_MRNA_PROCESSING
REACTOME_CLEAVAGE_OF_GROWING_TRANSCRIPT_IN_THE_TERMINATION_REGION_

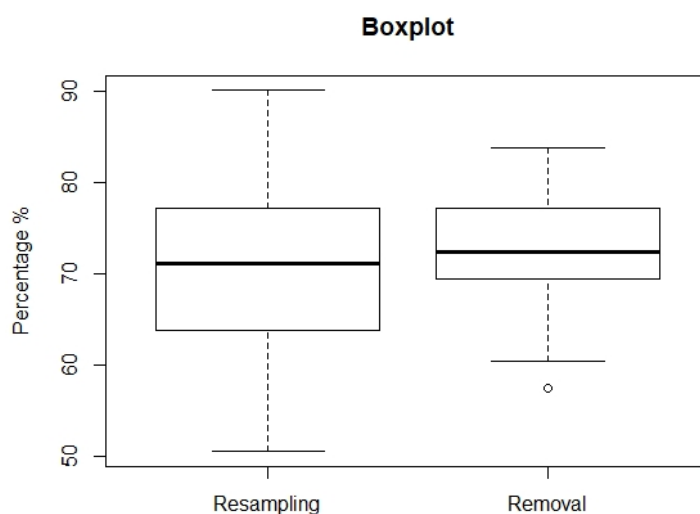
Table 3.6: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο ανοιχτό μπλε μετα-σύνολο.

Light green meta-module
REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION
NABA_MATRISOME_ASSOCIATED
NABA_MATRISOME

Table 3.7: Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν στο ανοιχτό πράσινο μετα-σύνολο.

3.6 Σταθερότητα έναντι θορύβου

Προκειμένου τα σύνολα που βρέθηκαν από την ανάλυση δικτύων συνεχφραζόμενων γονιδίων να αποτελούν σημαντικά βιολογικά ευρήματα δεν θα πρέπει να επηρεάζονται από μικρές μεταβολές στα δεδομένα των πειραμάτων. Προκειμένου να εξασφαλιστεί αυτό δύο διερευνήσεις πραγματοποιήθηκαν. Στην πρώτη διερεύνηση 10 % των δειγμάτων διαγράφηκαν τυχαία από τα δεδομένα κάθε πειράματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πάλι η ανάλυση δικτύων συνεχφραζόμενων γονιδίων και συγκρίθηκαν τα σύνολα που βρέθηκαν με τα αρχικά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 50 φορές. Στην δεύτερη διερεύνηση δημιουργήθηκαν νέα δεδομένα πειραμάτων επιλέγοντας τυχαία δείγματα από τα αρχικά και επιτρέποντας την πολλαπλή επιλογή ενός δείγματος. Στη συνέχεια η διαδικασία της πρώτης διερεύνησης ακολουθήθηκε. Και αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 50 φορές. Τέλος υπολογίστηκε το ποσοστό των αρχικών γονιδίων που βρίσκονταν κατα μέσο όρο στις δύο διερευνήσεις όπως φαίνεται στο σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8: Το ποσοστό των αρχικών γονιδίων που βρίσκονταν κατα μέσο όρο στις δύο διερευνήσεις

3.7 Φάρμακα

Σαν τελευταίο κομμάτι της διπλωματικής εργασίας μία λίστα φαρμάκων που είτε υπήρχαν στο εργαστήριο, είτε είχαν δοκιμαστεί σε προηγούμενες έρευνες αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταπολεμήσουν την οστεοαρθρίτιδα. Αρχικά οι βασικοί στόχοι του κάθε φαρμάκου εντοπίστηκαν μέσω της βάσης δεδομένων **DrugBank**. Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν κάποιος από τους στόχους αποτελεί γονίδιο ενός μετα-συνόλου. Τα φάρμακα που αξιολογήθηκαν καθώς και οι βασικοί στόχοι τους παρουσιάζονται στον πίνακα 3.8

Από τα φάρμακα που αξιολογήθηκαν, τα **Raloxifene**, **PD169316** και **Sorafenib** είχαν στόχους που περιλαμβάνονταν σε κάποιο μετα-σύνολο.

3.8 Σύγκριση με πειράματα

Κάποια από τα φάρμακα που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.8 χρησιμοποιήθηκαν σε μία ανεξάρτητη πειραματική διερεύνηση για την θεραπεία οστεοαρθριτικού χόνδρου. Από τα φάρμακα αυτά τα **PD169316** και **Sorafenib** ήταν αυτά που επίσης έδειξαν τις καλύτερες προοπτικές.

Drugs	Targets
Canakinumab	IL1B
Adalimumab	TNF, IL1A
Celecoxib	PTGS2, PDPK1, CA2, CA3, ABCB5, ABCG2, ABCB1
Carprofen	PTGS2, PTGS1
SP600125	MAPK inhibitor
Raloxifene	ESR1, ESR2, SEPRINB9, TFF1
PD169316	TGFB, TGFA
SB202190	TBRI
Sorafenib	BRAF, RAF1,FLT4 KDR, FLT3, PDGFR, KIT, FGFR1, RET, FLT1
Clomifene	ER1, SHBG
Imperatorin	ERK

Table 3.8: Τα φάρμακα που αξιολογήθηκαν και οι βασικοί στόχοι τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Συμπεράσματα

Η οστεοαρθρίτιδα έχει πλέον αναγνωριστεί ως ασθένεια όλης της άρθρωσης και οδηγεί σε μεταβολές στη κνήμη και στο χόνδρο, καθώς και σε εμφάνιση φλεγμονών στην αρθρική μεμβράνη και στο μηνίσκο. Σκοπός αυτή της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η εύρεση κοινών παθολογικών μηχανισμών μεταξύ των τεσσάρων εμπλεκόμενων στην ασθένεια ιστών/κοκκάλων. Για το σκοπό αυτό Διαφορική Γονιδιακή Ανάλυση και Ανάλυση δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δεδομένα από τέσσερα πειράματα, ένα για κάθε ιστό/οστό. Μέσω της Ανάλυσης δικτύων συνεκφραζόμενων γονιδίων 37 σύνολα έντονα αλληλοσυσχετιζόμενων γονιδίων βρέθηκαν. Σύνολα τα οποία είχαν ισχυρή συσχέτιση ενώθηκαν δημιουργώντας 6 μετα-σύνολα. Τα γονίδια που περιλαμβάνονταν σε κάθε μετα-σύνολο χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση σημαντικών βιολογικών μονοπατιών μέσω της αντίστοιχης ανάλυσης. Τέλος υποψήφια φάρμακα κατα της οστεοαρθρίτιδας αξιολογήθηκαν.

Μέσω της προαναφερθείσας ανάλυσης, ανακαλύψαμε μετα-σύνολα τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα το ροζ και ανοιχτό πράσινο μετα-σύνολο σχετίζονται με την εξωκυττάρια μήτρα, κάτι που αποτελεί πολύ ενδιαφέρον εύρημα αφού μέχρι σήμερα λειτουργίες σχετιζόμενες με την εξωκυττάρια μήτρα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μόνο σχετικά με το χόνδρο. Τα βιολογικά μονοπάτια που βρέθηκαν μέσω της ανάλυσης στο σκούρο πράσινο μετα-σύνολο σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και την αντίδραση του κυττάρου σε φλεγμονή. Επιπλέον περιλαμβάνει βιολογικά μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με άλλες σημαντικές αυτοάνοσες ασθένειες. Για την αντιμετώπιση μεγάλου

ποσοστού αυτών των ασθενειών εξετάζονται φάρμακα που αρχικά είχαν εξεταστεί για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών αρθρίτιδας συμπεριλαμβανομένου και της οστεοαρθρίτιδας. Τέλος στο ανοιχτό γαλάζιο μετα-σύνολο περιλαμβάνονται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια για τα οποία έχουν γίνει αναφορές πρόσφατα σχετικά με την σχέση τους με την οστεοαρθρίτιδα.

Η αξιολόγηση των φαρμάκων κατέληξε στα **Raloxifene**, **PD169316** και **Sorafenib** ως τα πιο ελπιδοφόρα για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Τέλος, μία ανεξάρτητη πειραματική έρευνα κατέληξε στα **PD169316** και **Sorafenib** επίσης ως τα πιο ελπιδοφόρα φάρμακα.

Εν συντομία, υπάρχουν πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία που προσπαθούν να βρουν φάρμακο κατά της οστεοαρθρίτιδας χρησιμοποιώντας δεδομένα μόνο από κάποιο εμπλεκόμενο ιστό/οστό. Όμως η οστεοαρθρίτιδα προσβάλλει όλη την άρθρωση, με αποτέλεσμα η ενσωμάτωση δεδομένων από όλους τους ιστούς/ οστά να είναι απαραίτητη προκειμένου να καταλάβουμε την ασθένεια. Αυτή η διπλωματική εργασία αποτελεί μια πρώτη τέτοια προσπάθεια με σημαντικά αποτελέσματα. Καταφέραμε να βρούμε βιολογικά μονοπάτια ήδη γνωστά για το σημαντικό ρόλο που παίζουν στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας όπως το **rho GTPases**. Επίσης ανακαλύψαμε νέα βιολογικά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο και στους τέσσερις ιστούς /οστά και μπορούν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας της ασθένειας. Τέλος, πιθανά φάρμακα κατά της οστεοαρθρίτιδας βρέθηκαν.

Μελλοντικά σκοπεύουμε να επεκτείνουμε τα υποψήφια φάρμακα για αξιολόγηση καθώς και να συμπεριλάβουμε στην αξιολόγηση των φαρμάκων τόσο τα δίκτυα συνεκφρασμένων γονιδίων όσο και τα αποτελέσματα την ανάλυσης βιολογικών μονοπατιών. Επιπλέον θα διεξάγουμε νέα πειράματα.