



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
« Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες »

Στούμπου Αναστασία

*Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης
πολυμορφισμού rs1129055 στο γονίδιο CD86 και
ανταπόκριση στην θεραπεία με Abatacept σε ασθενείς
με ρευματοειδή αρθρίτιδα στον ελληνικό πληθυσμό*

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015



Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμού rs1129055 στο γονίδιο CD86 και ανταπόκριση στην θεραπεία με Abatacept σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στον ελληνικό πληθυσμό.

Pharmacogenetic association analysis of polymorphism rs1129055 in the CD86 gene and response to treatment with Abatacept in patients with rheumatoid arthritis in Greek population.

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Σαραφίδου Θεολογία

*Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Μαμούρης Ζήσης

*Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Σακκάς Λάζαρος

*Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Στους γονείς μου.
Λόγια δεν έχω,
μόνο ευχαριστώ...*

Ευχαριστίες

Στην προσπάθεια της συγγραφής αυτής της εργασίας είχα την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση ανθρώπων, δίνοντας μου τα εφόδια, τόσο για το θεωρητικό μέρος της, όσο και το υλικό για το πρακτικό της μέρος. Ελπίζω, η εργασία αυτή να ανταποκρίνεται στις προσδοκίες τους και να επιτύχει αυτό που εξαρχής είχα ως σκοπό, να αποτελεί ένα απλό και συνάμα ενδιαφέρον τεκμηριωμένο επιστημονικά σύγγραμμα. Για τον λόγο αυτό, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς που με βοήθησαν.

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο χρονικό διάστημα 30/09/2013 έως 30/04/2014. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης μεταπτυχιακής διατριβής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας : «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες».

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, γιατί τους οφείλω αυτό που εγώ είμαι σήμερα. Την εισηγήτρια μου, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία, για την βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της προετοιμασίας και της εμπιστοσύνης της για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Τον Διδάσκοντα, κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για τις συμβουλές και την υποστήριξη. Τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Σταμάτη Κωνσταντίνο, Σαρρή Κωνσταντίνα και Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και στο Νοσοκομείο Άγιος Πάυλος Θεσσαλονίκης για την συλλογή των δειγμάτων και των πληροφοριών που σχετίζονται με τους ασθενείς, και που χωρίς την βοήθεια τους θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ τον κ. Σακκά Λάζαρο και τον κ. Μαμούρη Ζήση για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Σε όλους αυτούς ανωτέρω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στις σελίδες αυτής της εργασίας, αντικατοπτρίζεται ξεχωριστά ο καθένας τους...

Περίληψη

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) αποτελεί άγνωστης αιτιολογίας χρόνιο αυτοάνοσο φλεγμονώδες νόσημα με αρθρικές και συστημακές εκδηλώσεις που οδηγεί σε βλάβη των αρθρώσεων. Για την αντιμετώπιση της ΡΑ χρησιμοποιούνται κλασικά φάρμακα που τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARDs), και βιολογικές θεραπείες έναντι των μορίων που παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Εντούτοις, ένα ποσοστό (30-40%) των ασθενών δεν ανταποκρίνεται θετικά στην θεραπεία και έτσι κρίνεται σκόπιμο η ανεύρεση γενετικών δεικτών που θα προέβλεπαν την ανταπόκριση στη θεραπεία κάτι το οποίο αποτελεί τον στόχο του νεοσύστατου κλάδου της φαρμακογενετικής. Ένα από τα βιολογικά φάρμακα είναι το abatacept. Το Abatacept αποτελεί βιολογική θεραπεία η οποία έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ της αλληλεπίδρασης CD80/86 και CD28 ή CTLA-4 αποτρέποντας την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων.

Σκοπός της μελέτης ήταν να ερευνηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1129055 (G>A; Ala304Thr) στο γονίδιο *CD86* με την ανταπόκριση στη θεραπεία με Abatacept στη ΡΑ.

Περιλήφθηκαν 29 ασθενείς με ΡΑ που έλαβαν θεραπεία με το Abatacept για 12 και 24 μήνες και τα δείγματα ελήφθησαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και το Νοσοκομείο Άγιος Παύλος Θεσσαλονίκης. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1129055 και της απάντησης στη θεραπεία με abatacept σ' αυτό το μικρό πληθυσμό ασθενών (P=0.66). Μεγαλύτερες μελέτες απαιτούνται να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν αυτό το εύρημα

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease with articular and systemic manifestations. For the treatment of rheumatoid arthritis drugs are used that modify disease progression (DMARDs) and biological therapies against molecules that play a central role in the pathogenesis of the disease. However, a percentage (30-40%) of patients are not responding positively to treatment, so it is appropriate to find genetic markers that would predict the response to treatment, which is the target of pharmacogenetics. One of the biological medicines is Abatacept. The Abatacept is a biological treatment which has the capacity to interfere the interaction between CD80/86 and CD28 or CTLA-4, and prevents the activation of T lymphocytes.

In this study, we analyzed the association of the polymorphism rs1129055 (G>A; Ala304Thr) of the gene *CD86* in response to treatment with the drug Abatacept.

The pilot study was conducted in 29 patients with rheumatoid arthritis treated with Abatacept for 12 and 24 months. The samples were taken from the University Hospital of Larissa and the Hospital Agios Pavlos in Thessaloniki. No correlation was found between rs1129055 polymorphism and response of patients treated with Abatacept, in this small patient population (P=0.66).

Larger studies are needed to confirm or reject this finding.

Περιεχόμενα

Μέρος 1^ο - Εισαγωγή

1.1 Γενική εισαγωγή.....	2
2.1 Γενικά στοιχεία και γενετικοί παράγοντες.....	4
2.2 Παθοφυσιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας	7
2.3 Το ανοσολογικό σύστημα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα	9
2.4 Κλινικά χαρακτηριστικά – Δείκτες ενεργότητας	15
2.5 Βιοχημικοί δείκτες – Ακτινολογικά ευρήματα	18
2.6 Θεραπεία ρευματοειδούς αρθρίτιδας.....	20
2.6.1 Συστημικές θεραπείες (DMARDs).....	21
2.6.2 Βιολογικές θεραπείες.....	22
2.6.3 Αβατασέπτη (abatacept, Orencia®)	28
3.1 Φαρμακογενετική.....	32
3.2 Φαρμακογενετικές μελέτες στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα-Βιολογικές θεραπείες	33
3.3 <i>CD80/86</i> ως θεραπευτικοί στόχοι	35
3.4 Οικογένεια <i>B7</i>	36
3.5 Γονίδια <i>CD80</i> και <i>CD86</i>	37
3.5.1 Γενωμική οργάνωση των γονιδίων <i>CD80</i> και <i>CD86</i>	38
3.5.2 Πολυμορφισμοί των γονιδίων <i>CD80</i> και <i>CD86</i>	39

Μέρος 2^ο - Υλικά και Μέθοδοι

1.1 Συλλογή Δειγμάτων.....	45
1.2 Απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος.....	45
1.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	45
1.2.2 Πρωτόκολλο.....	46
1.3 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA.....	48
1.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	48
1.3.2 Πρωτόκολλο.....	48
1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR.....	49
1.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	49
1.4.2 Πρωτόκολλο.....	51
1.5 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	52
1.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	52
1.5.2 Πρωτόκολλο.....	53

1.5.3 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)	55
1.6 Αλληλούχηση (Sequencing)	55
1.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης	56

Μέρος 3^ο - Αποτελέσματα

1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών	57
1.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	58
1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	58
1.4 Ανάλυση SSCP.....	59
1.5 Αλληλούχηση	59
1.6 Γονοτύπηση.....	61
1.7 Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1129055 του γονιδίου <i>CD86</i> με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία	62

Μέρος 4^ο - Συζήτηση

1.1 Συζήτηση.....	65
Βιβλιογραφία	67

Εισαγωγή

1

Εισαγωγή



1.1 Γενική εισαγωγή

Η απόδειξη ότι το DNA αποτελεί φορέα γενετικής πληροφορίας συγκλόνισε την επιστημονική κοινότητα, διότι για αρκετά χρόνια πραγματοποιούνταν προσπάθειες προσδιορισμού των μορίων που ευθύνονται για την κληρονομικότητα. Το 1953, οι James Watson και Francis Crick, περιγράφουν για πρώτη φορά τη δομή του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος, δηλαδή του DNA, προτείνοντας το μοντέλο της διπλής έλικας.

Το DNA είναι οργανωμένο σε νηματοειδής δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα και βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος. Οι άνθρωποι έχουν 22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και 2 φυλετικά χρωμοσώματα.

Σημαντικό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας του DNA είναι αποθηκευμένο στα γονίδια. Κάθε γονίδιο είναι υπεύθυνο για μια συγκεκριμένη λειτουργία, ενώ είναι δυνατόν να παρατηρηθούν παραλλαγές οι οποίες οφείλονται σε μεταλλάξεις και πιθανώς επηρεάζουν την πληροφορία που φέρει το γονίδιο. Οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ή την αυξημένη προδιάθεση σε κάποια νοσήματα μονογονιδιακά ή πολυπαραγοντικά. Υπάρχουν γενετικά νοσήματα που ακολουθούν μενδελικό τρόπο κληρονόμησης και προκαλούνται από μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου και ονομάζονται μονογονιδιακά. Το 1857 ήταν που ο μοναχός Μέντελ ανέπτυξε την θεωρία της κληρονομικότητας αρκετές δεκαετίες πριν παρατηρηθούν τα χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο και γίνει κατανοητή η συμπεριφορά τους. Έτσι, με την βοήθεια της θεωρίας του μελετήθηκαν μονογονιδιακές ασθένειες ώστε να εξακριβωθεί ο τρόπος κληρονόμησης των γονιδίων αλλά και να υπολογιστούν οι πιθανότητες επανεμφάνισης (Campbell – Reece et al, 2008).

Εντούτοις, υπάρχουν και γενετικά νοσήματα τα οποία οφείλονται σε μεταλλάξεις περισσότερων του ενός γονιδίου και ονομάζονται πολυπαραγοντικά. Στην εμφάνιση τους συμβάλλει η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβάλλοντος και γενετικών παραγόντων. Τέτοια νοσήματα αποτελούν οι αυτοάνοσες ασθένειες, οι ψυχιατρικές διαταραχές, οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο καρκίνος αλλά και συγγενείς δυσπλασίες όπως βλάβες του νωτιαίου μυελού, συγγενείς καρδιοπάθειες, χειλοσχιστία και υπερωιοσχιστία κλπ. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα διάφορα γονίδια μεταξύ τους και οι τρόποι παρέμβασης των περιβαλλοντικών παραγόντων βρίσκονται σε στάδιο μελέτης. Για την μελέτη της επανεμφάνισης τους δεν ισχύουν οι νόμοι του Μέντελ. Για την ταυτοποίηση των γενετικών παραγόντων ακολουθείται συνήθως μια προσέγγιση που ονομάζεται γενετική συσχέτιση και απαιτεί τη συλλογή κλινικών στοιχείων και δειγμάτων DNA από ασθενείς. Για τις μελέτες αυτές απαιτείται μεγάλος αριθμός ασθενών καθώς και ατόμων αναφοράς (δηλαδή μη προσβεβλημένα άτομα). Στις συγκεκριμένες μελέτες οι επιστήμονες εκτιμούν την συχνότητα ορισμένων παραλλαγών της αλληλουχίας DNA, συνήθως μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), μεταξύ ασθενών και ατόμων αναφοράς.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα δεν είναι απόλυτα ίδιο σε όλους τους ανθρώπους παρά μόνο στους μονοζυγωτικούς διδύμους. Για την γενετική ποικιλότητα που παρατηρείται στον ανθρώπινο πληθυσμό σημαντική συνεισφορά έχουν οι πολυμορφισμοί. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί οφείλονται σε υποκατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Οι περισσότεροι από τους πολυμορφισμούς πιθανώς δεν έχουν λειτουργικό ρόλο και δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Ωστόσο, ένας ή περισσότεροι πολυμορφισμοί μπορεί να καθορίζουν μια σειρά από χαρακτηριστικά όπως την πιθανότητα εκδήλωσης ασθενειών, την ευαισθησία μας σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες, την επιρρέπεια μας σε μολύνσεις και τον βαθμό απόκρισής μας σε μια φαρμακευτική αγωγή (J. D. Watson et al, 2007).

2.1 Γενικά στοιχεία και γενετικοί παράγοντες

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) αποτελεί άγνωστης αιτιολογίας χρόνιο αυτοάνοσο φλεγμονώδες νόσημα με αρθρικές και συστημακές εκδηλώσεις. Χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και υπερπλασία (πρήξιμο) του αρθρικού υμένα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων (ρευματοειδής παράγοντας RF και αντι-κιτρουλινικά αντισώματα ACPA), προσβολή των αρθρώσεων και των οστών καθώς και συστημακά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών, πνευμονικών, ψυχολογικών και σκελετικών διαταραχών (I. B. McInnes and G. Schett, 2011). Πρόκειται για πολυπαράγοντικό νόσημα που επηρεάζει το 0,5 – 1,0% των ενηλίκων, με 5-50 ανά 100.000 νέες περιπτώσεις ετησίως (D. L. Scott et al, 2010).

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα παρατηρείται πιο συχνά στις γυναίκες από τους άνδρες, πιθανώς λόγω των ορμονικών διαφορών. Συνήθως, εμφανίζεται στην πέμπτη δεκαετία της ζωής κατά την οποία παρατηρούνται ορμονικές αλλαγές (G. J. Tobon et al, 2010). Έχει παρατηρηθεί αυξημένη εμφάνιση της νόσου μεταξύ συγγενών πρώτου βαθμού και μονοζυγωτικών διδύμων. Προηγούμενες μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα αναφέρουν ότι ένα ποσοστό 15% οφείλεται στην κληρονομικότητα, ωστόσο σύμφωνα με περαιτέρω γενετικές αναλύσεις η ρευματοειδής αρθρίτιδα οφείλεται σε ποσοστό 60% στην κληρονομικότητα (A. J. Macgregor et al, 2000). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ενδέχεται να επιδρούν στον οργανισμό αρκετά χρόνια πριν την κλινική της εμφάνιση. Κύριοι παράγοντες αποτελούν το κάπνισμα, οι λοιμώξεις, οι διατροφικές συνήθειες και οι μολύνσεις (G. J. Tobon et al, 2010).

Γονίδια που έχουν μελετηθεί και συσχετίζονται με την εμφάνιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 είναι:

- Γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στην αναγνώριση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR). Ειδικότερα, ορισμένα αλληλόμορφα γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II, όπως οι παραλλαγές του *HLA-DRB1* *01 και *04 (στους Καυκάσιους), τα οποία παίζουν κεντρικό ρόλο στην παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στα T λεμφοκύτταρα. Επίσης, σε ασθενείς, οι οποίοι είναι θετικοί για αντι-κιτρουλινικά αντισώματα υπάρχει συσχέτιση με το γονίδιο *PADI4*. Τα αντι-κιτρουλινικά αντισώματα δρουν ως

αυτοαντιγόνα με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου,

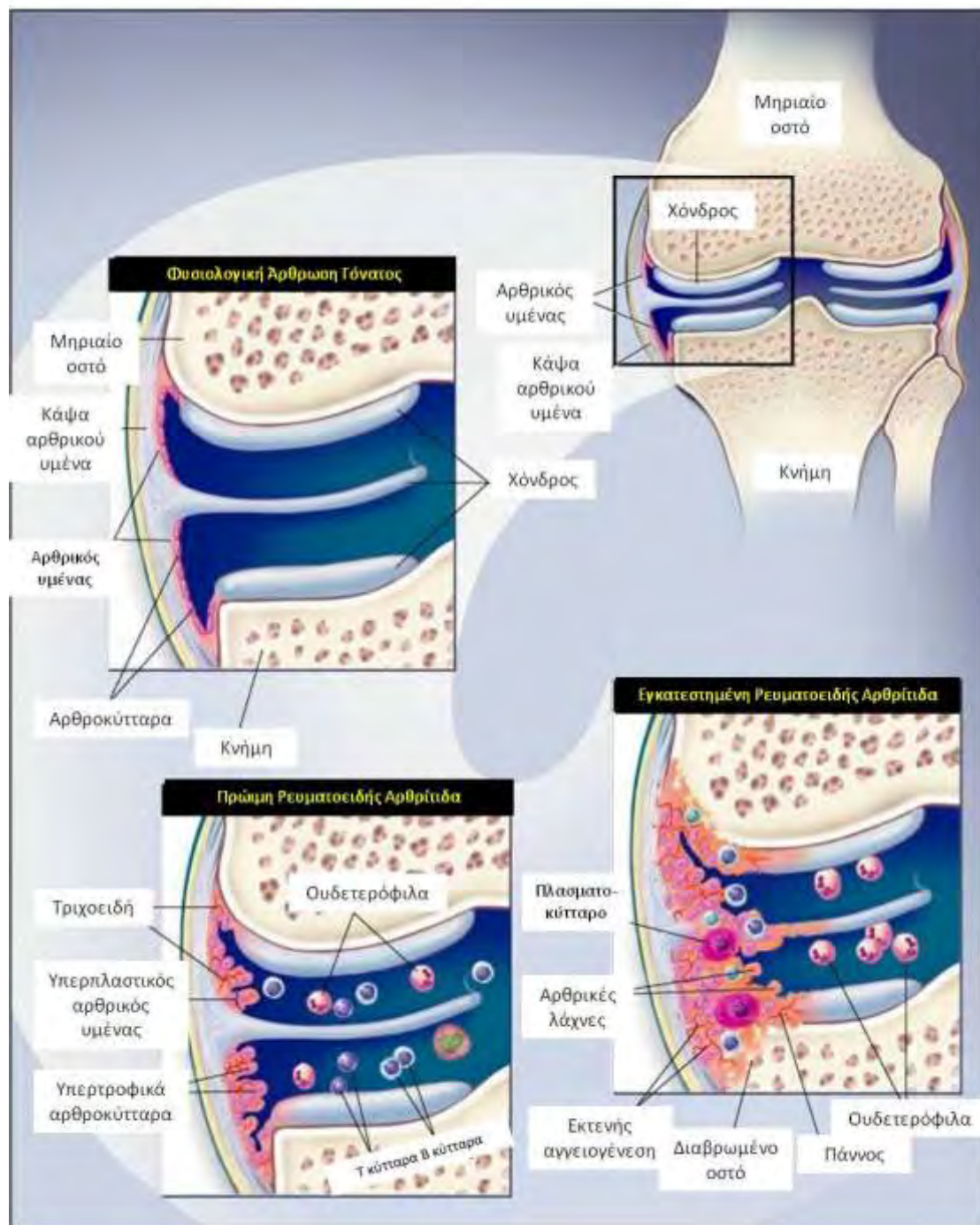
- Γονίδια που συμμετέχουν στα μονοπάτια ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων, όπως το γονίδιο της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης *PTPN22*,
- Γονίδια που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των υποδοχέων κυτταροκινών IL-2R και IL-7R,
- Γονίδια που συμμετέχουν στην καταστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων, όπως η κυτταροτοξική T λεμφοκυτταρική πρωτεΐνη 4 (*CTLA-4*) και
- Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *STAT4* (ειδική πρωτεΐνη που συμμετέχει στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης), το οποίο διαμεσολαβεί σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις (L. Klareskog et al, 2011, U. Fiocco et al, 2008).

Πίνακας 1: Γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ρευματοειδή αρθρίτιδα και ο ρόλος τους στην παθογένεια (I. B. McInnes and G. Schett, 2011).

Candidate Gene and Pathway	SNP Locus	Function Relevant to Pathogenesis
T-cell activation		
HLA-DRB1	6p21	HLA-DRB1 allele (also known as the shared epitope) involved in MHC molecule-based antigen presentation and responsible for self-peptide selection and T-cell repertoire; first discovered and still by far the strongest genetic link to rheumatoid arthritis
PTPN22	1p13.2	Lymphocyte-specific nonreceptor tyrosine phosphatase involved in regulation of activation threshold of lymphocytes; second genetic link described in rheumatoid arthritis
AFF3	2q11.2	Transcription factor for lymphoid development
CD28	2q33.2	Costimulatory molecule for T-cell activation
CD40	20q13.12	Costimulatory molecule that enhances interactions between T and B cells and increases auto-antibody production
CTLA4	2q33.2	Costimulation suppressor that regulates interactions between T cells and antigen presenting cells
IL2RA	10p15.1	High-affinity receptor for interleukin-2 on lymphocyte subsets
IL2	4q27	Cytokine that regulates activation of T cells, particularly regulatory T cells
IL-21	4q27	Cytokine that regulates differentiation of T cells, particularly Th17, and activation of B cells
PRKCQ	10p15.1	Member of the protein kinase C family that regulates T-cell and macrophage activation
STAT4	2q32.3	Transducer of cytokine signals that regulate proliferation, survival, and differentiation of lymphocytes
TAGAP	6q25.3	Rho-GTPase enzyme involved in T-cell activation
NF-κB pathway		
REL	2p16.1	Proto-oncogene member of the NF-κB family that regulates leukocyte activation and survival
TNFFAJP3	6q23.3	Signaling protein and negative regulator of TNF-α-induced NF-κB activation
TRAF1	9q33.1	Regulator of TNF-α-receptor superfamily signaling (e.g., to NF-κB and JNK)
Other pathways		
BLK	8p23.1	B-lymphoid tyrosine kinase involved in B-cell receptor signaling and B-cell development
CCL21	9q13.3	Chemokine implicated in germinal-center formation
FCGR2A	1q23.2	Low-affinity IgG Fc receptor that regulates macrophage and neutrophil activation and immune-complex clearance
PADI4	1p36.2	Enzyme that converts arginine to citrulline, creating autoantigens in rheumatoid arthritis
PRDM1	6q21	Protein that acts as a repressor of β-interferon gene expression
TNFRSF14	1p36.32	TNF-α-receptor superfamily member with proinflammatory activity

2.2 Παθοφυσιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η φυσιολογική, υγιής άρθρωση αποτελείται από ένα στρώμα αρθρικού χόνδρου ο οποίος καλύπτει και προστατεύει τα οστά των άκρων. Εξωτερικά παρατηρείται ο αρθρικός υμένας, πάχους μιας ή δύο στοιβάδων κυττάρων και στο εσωτερικό το αρθρικό υγρό, το οποίο διευκολύνει την κίνηση των αρθρικών επιφανειών και παρέχει θρεπτικές ουσίες για τον αρθρικό χόνδρο. Στην πρώιμη ρευματοειδή αρθρίτιδα ο αρθρικός υμένας πυκνώνει, λόγω της υπερπλασίας και της υπερτροφίας των αρθρικών κυττάρων. Επίσης, παρατηρείται συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στις επιφανειακές στιβάδες, καθώς και μονοπύρηνων κυττάρων (T λεμφοκύτταρα CD4+ και πλασματοκύτταρα) στους βαθύτερους ιστούς του υμένα. Στα πρώιμα στάδια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας τα παραπάνω κύτταρα προσελκύουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως είναι η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), συντελώντας στον πολλαπλασιασμό των επενδυτικών κυττάρων του αρθρικού υμένα και των ινοβλαστών, με αποτέλεσμα την μαζική υπερτροφία του αρθρικού υμένα. Στην εγκατεστημένη ρευματοειδή αρθρίτιδα ο αρθρικός υμένας μετατρέπεται σε φλεγμονώδη ιστό που ονομάζεται πάννος (Εικόνα 1). Αυτός ο ιστός διηθεί και καταστρέφει τον γειτονικό χόνδρο. Η ατροφία του οστού διαταράσσει την συνάρθρωση των δύο οστών, προκαλώντας μυϊκή δυστροφία και μερικές εξarthρώσεις. Τέλος, ο ιστός ασβεστοποιείται και παρατηρείται αγκύλωση και ολική ακινησία (R. Soto - Velez, 2011).

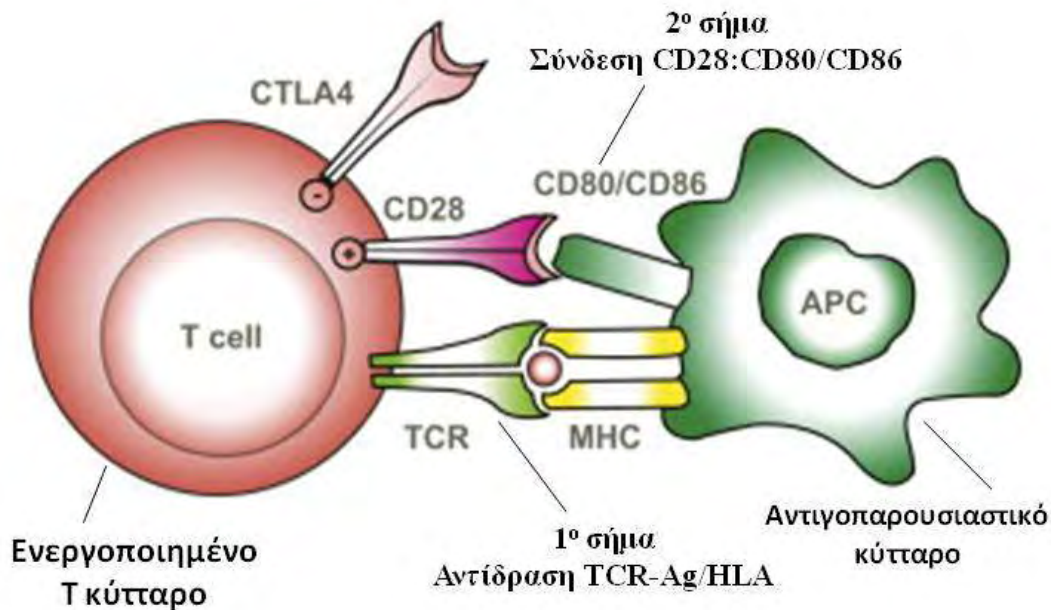


Εικόνα 1: Σύγκριση υγιούς άρθρωσης και προσβεβλημένης άρθρωσης. Πάνω δεξιά και αριστερά: φαίνεται η υγιής άρθρωση, με τον αρθρικό υμένα και τον χόνδρο που καλύπτει το οστό. Κάτω αριστερά: πρώιμη κατάσταση ρευματοειδούς αρθρίτιδας, πύκνωση του αρθρικού υμένα λόγω υπερπλασίας και υπερτροφίας αρθρικών κυττάρων. Κάτω δεξιά: εγκατεστημένη ρευματοειδής αρθρίτιδας, μετατροπή του αρθρικού υμένα σε φλεγμονώδη ιστό (πάννος) (τροποποιημένο από R. Soto - Velez, 2011).

2.3 Το ανοσολογικό σύστημα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα

Παρόλο που η αιτία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας παραμένει ακόμη άγνωστη, έχει ταυτοποιηθεί ένας καταρράκτης φλεγμονωδών αντιδράσεων ο οποίος οδηγεί σε επίμονη υμενίτιδα, βλάβη του αρθρικού χόνδρου και καταστροφή του οστού (D. L. Scott et al, 2010). Μια πληθώρα κυττάρων εισέρχεται στο αρθρικό υγρό μέσω υποδοχέων. Διάφοροι τύποι κυττάρων, κυρίως τα δενδριτικά, εκφράζουν μόρια τα οποία λειτουργούν ως υποδοχείς μηνυμάτων, όπως υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν δυο ειδών συνδέτες, τους εξωγενείς και τους ενδογενείς με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς διεργασιών, όπως η ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος, η παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων και η έκφραση συνδιεγερτικών μορίων στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων που λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cells, APCs) με αποτέλεσμα την επαγωγή της φλεγμονής και τη διαφοροποίηση της προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης (T. R. D. J. Radstake et al, 2004).

Η ικανότητα της διάκρισης εαυτού και μη εαυτού αποτελεί ίσως έναν από τους πιο κρίσιμους παράγοντες ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αυτοάνοσες νόσους. Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν τους βασικούς μεσολαβητές για την έναρξη και την ρύθμιση της προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης. Η ανοσιακή απάντηση του T λεμφοκυττάρου αρχίζει με την αναγνώριση, στον υποδοχέα του αντιγόνου του T λεμφοκυττάρου (T Cell antigen Receptor, TCR), του αντιγόνου που είναι συνδεδεμένο με μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα συμμετέχουν τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II, ενώ το 80% των ασθενών φέρουν τον επίτοπο του *HLA-DRB1 04*. Για την ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου απαιτούνται δυο σήματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.

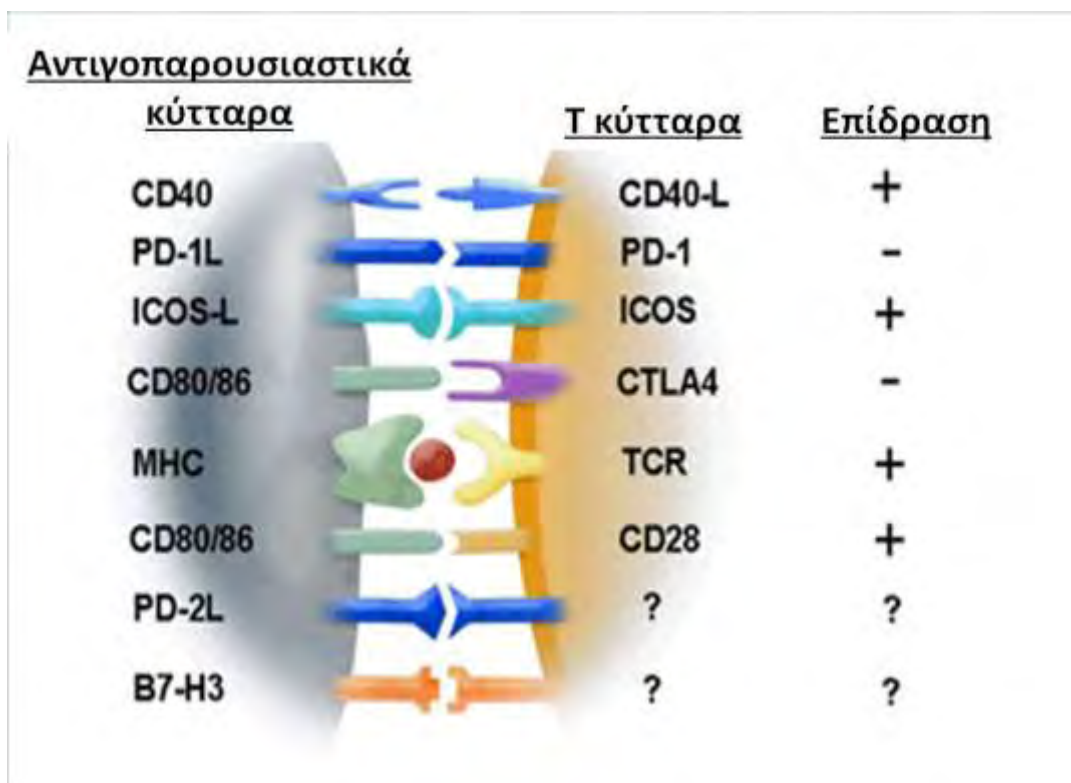


Εικόνα 2: Ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου, μέσω της διπλής σηματοδότησης. Το 1^ο σήμα προέρχεται από την αντίδραση TCR-Ag/HLA και το 2^ο από την σύνδεση CD28 με CD80/CD86 (F. Vincenti et al, 2008).

Η αναγνώριση του συμπλέγματος αντιγόνου/HLA από τον TCR του λεμφοκυττάρου παρέχει το 1^ο σήμα για την ενεργοποίησή του. Το 2^ο σήμα παρέχεται από τα συνδιεργετικά μόρια, τα οποία είναι το CD28 στο T λεμφοκύτταρο και τα CD80/CD86 στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο. Από την σύνδεση αυτών των συνδιεργετικών μορίων προκαλείται η ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου. Απώλεια του 2^{ου} σήματος οδηγεί στην απόπτωση ή στην ανεργία του T λεμφοκυττάρου με αποτέλεσμα την λειτουργική του αδρανοποίηση (S. Trikudanathan and Sayegh MH, 2007, J. S. Smolen et al, 2007).

Εκτός από τα παραπάνω συνδιεργετικά μόρια παρατηρούνται και άλλα όπως φαίνονται στην Εικόνα 3. Ο υποδοχέας ICOS ή CD278 εκφράζεται στα T λεμφοκύτταρα και συνδέεται με το ICOS-L το οποίο εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η σύνδεση ICOS - ICOS-L οδηγεί στη διέγερση των T λεμφοκυττάρων, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν και να επιβιώσουν. Επίσης, το ICOS βοηθάει στην ανάπτυξη των T βοηθητικών κυττάρων, Th1, Th2 και Th17 αλλά και στη διατήρηση των T λεμφοκυττάρων μνήμης. Το PD-1 εκφράζεται στα T και B λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα, στα δενδριτικά και σε χαμηλά επίπεδα στα φυσικά φονικά κύτταρα. Το PD-1 έχει δυο γνωστούς συνδέτες τον PD-L1 (B7-H1)

και *PD-L2* (*B7-DC*). Το *PD-L1* εκφράζεται σε περιφερικούς ιστούς όπως η καρδιά, ο πλακούντας, οι μύες, το εμβρυϊκό ήπαρ, η σπλήνα και οι λεμφαδένες. Έχει βρεθεί στα T και B λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα, στα δενδριτικά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, η έκφραση του *PD-L2* περιορίζεται στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση του *PD-1* με τους συνδέτες του *PD-L1* και *PD-L2*, λειτουργεί ως ανασταλτικός υποδοχέας που μειώνει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Τέλος, ο υποδοχέας *CD40* και ο συνδέτης του *CD40-L* είναι από τα πρώτα μέλη της οικογένειας *TNF*, τα οποία εντοπίστηκαν. Το *CD40* εκφράζεται στα B λεμφοκύτταρα, στα δενδριτικά, στα μονοκύτταρα, στα μακροφάγα, καθώς και στους ινοβλάστες, στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Το *CD40-L* εκφράζεται στα T και B λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση του *CD40* με τον συνδέτη *CD40-L* έχει πολλαπλό λειτουργικό ρόλο. Ενισχύει την αντιγονοειδική απόκριση του T λεμφοκυττάρου, επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και μεταλλοπρωτεϊνών, οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και στη δημιουργία B λεμφοκυττάρων μνήμης (D. Carpece et al, 2012).

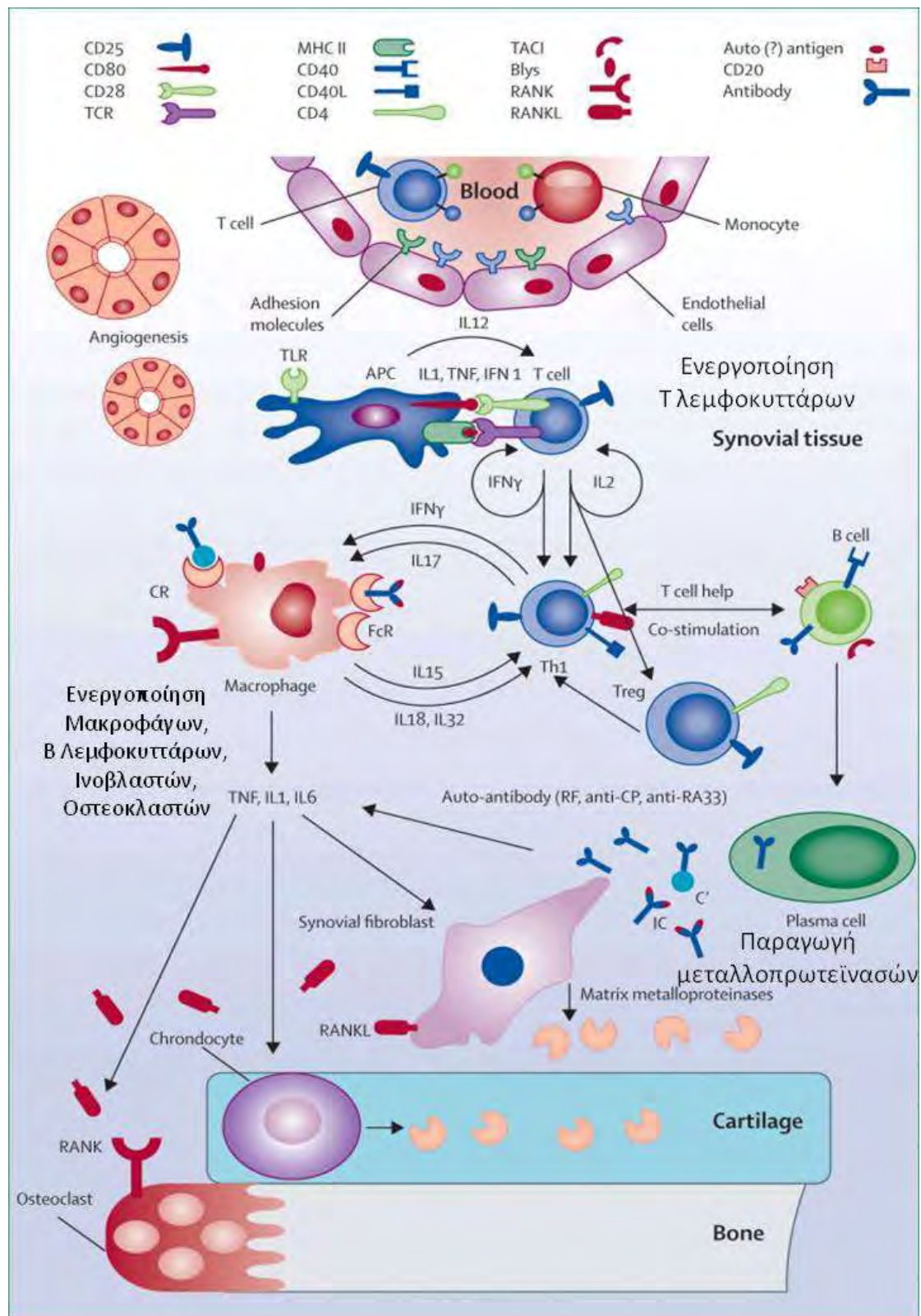


Εικόνα 3: Συνδιεργετικά μόρια που εκφράζονται στα T λεμφοκύτταρα και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους και οδηγούν στη διέγερση(+) ή στη καταστολή(-) της ανοσολογικής αντίδρασης (Carreno BM and Collins M, 2002).

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό υποομάδων των λεμφοκυττάρων που ονομάζονται Th1, Th2 και Th17. Η υποομάδα κυττάρων Th1 παράγει INF- γ και την κυτταροκίνη IL-2. Επάγει την κυτταροτοξικότητα, τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τις αντιδράσεις τύπου επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας τύπου III και ενεργοποιεί τα μακροφάγα. Η υποομάδα κυττάρων Th2 παράγει κυτταροκίνες IL- 4, IL- 5 και IL- 13, οι οποίες ενεργοποιούν ηωσινόφιλα και μαστοκύτταρα και επάγουν την ίνωση, δηλαδή την καταστροφή των ιστών των οργάνων. Τέλος, η υποομάδα κυττάρων Th17 παράγει IL-21 και κυτταροκίνες της οικογένειας IL-17 όπως η IL-17A, η IL-17B, η IL-17C, η IL-17D, η IL-17E (IL-25) και η IL-17F, οι οποίες είναι ισχυροί επαγωγείς της φλεγμονής. Επίσης, δημιουργούνται ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (T-regulatory, Treg) που παράγουν τον TGF β (transforming growth factor β). Τα Tregs καταστέλλουν τους άλλους τύπους εκτελεστικών βοηθητικών T λεμφοκυττάρων και έτσι εμποδίζουν την αυτοανοσία (E. Bettelli et al, 2007).

Τα διεγερμένα T λεμφοκύτταρα επάγουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων, των B λεμφοκυττάρων, των ινοβλαστών και των οστεοκλαστών. Τα B λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και έχουν ως αποτέλεσμα την έκκριση αυτοαντισωμάτων έναντι της ανοσοσφαιρίνης γ (IgG) (ρευματοειδής παράγοντας), των κιτρουλινοποιημένων πεπτιδίων (anti-CCP), όπως του ιωδογόνου, της βιμεντίνης ή του αντιγόνου της ρευματοειδούς αρθρίτιδας 33kDa (RA33). Τα αυτοαντισώματα αυτά μετά την αναγνώριση και πρόσδεση του ειδικού αντιγόνου σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα, τα οποία με τη σειρά τους ενισχύουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο *TNF*, μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και των υποδοχέων της ανοσοσφαιρίνης Fc (Fc γ R). Τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα έχουν την δυνατότητα να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενεργοποιώντας έτσι και άλλα T λεμφοκύτταρα που εισέρχονται στον αρθρικό υμένα. Με αυτόν το μηχανισμό δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος ενίσχυσης της αυτοάνοσης αντίδρασης στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (J. S. Smolen et al, 2007). Παράλληλα, και με την ενεργοποίηση των μακροφάγων παρατηρείται η έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως TNF- α , IL-1 (Interleukin-1) και IL-6 (Interleukin-6). Η IL-6 είναι αυξητικός παράγοντας των T και κυρίως των B λεμφοκυττάρων.

Στον αρθρικό υμένα των ασθενών, εκτός από τα κύτταρα της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, ενεργοποιούνται και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως ινοβλάστες του αρθρικού υμένα, χονδροκύτταρα και οστεοκλάστες. Οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα ενεργοποιούνται μέσω των φλεγμονωδών κυτταροκινών και παράγουν μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs). Η έκκριση των μεταλλοπρωτεϊνών εντός του αρθρικού υγρού έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του χόνδρου και την εισβολή του νεοσχηματιζόμενου φλεγμονώδους ιστού στο υποκείμενο οστό. Οι διαβρώσεις που σχηματίζονται στο υποκείμενο οστό οφείλονται στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών μέσω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών RANK-RANKL (Receptor for Activated Nuclear factor κ - Ligand of Receptor for Activated Nuclear factor κ). Η παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας φαίνεται στην Εικόνα 4 (J. S. Smolen et al, 2007, I. B. McInnes and G. Schett, 2011).



Εικόνα 4: Παθογένεια ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που συμβαίνουν στην αρθρική μεμβράνη, στον χόνδρο και στο οστό σε άτομα προσβεβλημένα με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στο πάνω μέρος φαίνεται η ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου μέσω της διπλής σηματοδότησης που οδηγεί στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό υποομάδων των λεμφοκυττάρων, που με

την σειρά τους οδηγούν στην παραγωγή κυτταροκινών. Στο κέντρο φαίνεται η ενεργοποίηση των μακροφάγων, των Β λεμφοκυττάρων, των ινοβλαστών και των οστεοκλαστών. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρατηρείται η παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες οδηγούν στην καταστροφή του χόνδρου και την εισβολή του νεοσχηματιζόμενου φλεγμονώδους ιστού στο υποκείμενο οστό (J. S. Smolen et al, 2007).

2.4 Κλινικά χαρακτηριστικά – Δείκτες ενεργότητας

Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα το κύριο συστατικό είναι η φλεγμονώδης νόσος. Η νόσος εκδηλώνεται με πόνο, ερυθρότητα, οίδημα, περιορισμό της κινητικότητας της άρθρωσης, επώδυνη ευαισθησία, συλλογή υγρού και έκπτωση της μυϊκής ισχύος. Αρχικά, οφείλεται σε χρόνια φλεγμονή του αρθρικού υμένα, η οποία με τον καιρό επεκτείνεται ενδοαρθρικά (διαβρώσεις χόνδρου και υποχονδρίου οστού) και περιαρθρικά (σύνδεσμοι, τένοντες). Πρόκειται για μη αναστρέψιμες διαβρώσεις που συνήθως δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία. Η έναρξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή σταδιακή. Σε μεγάλο ποσοστό, περίπου στο 50%, εμφανίζεται η σταδιακή έναρξη, κατά την οποία προσβάλλονται οι μικρές αρθρώσεις άκρων χειρών-ποδών, όπως οι μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις, εγγύς μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις, οι πηχεοκαρπικές, οι καρποί, οι αγκώνες, οι μεταταρσιοφαλαγγικές και οι ποδοκνημικές. Η κατανομή της φλεγμονής είναι συμμετρική και παρατηρείται πρωινή δυσκαμψία και απώλεια ή μείωση της συσφικτικής ικανότητας των άκρων χεριών. Η εξέλιξη της νόσου είναι μακροχρόνια με εξάρσεις και υφέσεις και τελικά αν δεν δοθεί θεραπεία καταλήγει σε καταστροφή και ινώδη αγκύλωση των αρθρώσεων (R. C. Jeffery, 2014).

Στην κλινική πράξη και στα πρώιμα στάδια δεν είναι δυνατή η διάγνωση όλων των περιπτώσεων και κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός των κριτηρίων και όλων των πληροφοριών που αφορούν τον ασθενή. Σε πιο προχωρημένες μορφές, η διάγνωση γίνεται μέσω της κλινικής εικόνας. Ο ασθενής πάσχει από ρευματοειδή αρθρίτιδα εφόσον καλύπτει 4 από τα 7 παρακάτω κριτήρια, ενώ τα συμπτώματα θα πρέπει να παρατηρούνται για 6 εβδομάδες.

1. Πρωινή δυσκαμψία διάρκειας τουλάχιστον 1 ώρας
2. Αρθρίτιδα με διόγκωση ταυτόχρονα σε 3 ή περισσότερες αρθρώσεις
3. Αρθρίτιδα με διόγκωση στις άκρες χείρες
4. Συμμετρική αρθρίτιδα

5. Ρευματικά οζίδια
6. Ρευματοειδής παράγοντας
7. Ακτινολογικές αλλοιώσεις με διαβρώσεις στις αρθρώσεις καρπού και άκρων χειρών.

Σπανιότερα, μπορεί να παρουσιαστούν σοβαρά συμπτώματα όπως πυρετός, απώλεια βάρους, λεμφαδενοπάθεια, κατάθλιψη, προσβολή και άλλων οργάνων όπως η καρδιά και οι πνεύμονες (V. Majithia et al, 2007).

Σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (American College of Rheumatology, ACR) ο ορισμός της ύφεσης, η οποία αποτελεί τον κύριο στόχο της θεραπείας, που στην κλινική πράξη παρατηρείται σπάνια και είναι είτε προσωρινή είτε απαιτεί συνεχή θεραπεία με φάρμακα τα οποία τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARDs) ή άλλους βιολογικούς παράγοντες, διατυπώθηκε το 1981, από τους Pinal *et al* ως εξής «Η πλήρης ύφεση υποδηλώνει την απουσία όλων των αρθρικών και εξωαρθρικών φλεγμονών και όλων των ανοσολογικών δραστηριοτήτων που σχετίζονται με την ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA)». Ωστόσο, οι ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια αυτά ήταν ελάχιστοι με αποτέλεσμα την τροποποίηση των κριτηρίων (D. T. Felson and J. S. Smolen, 2011, J. Fransen et al, 2004).

Οι δείκτες ενεργότητας της νόσου στη ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι σύνθετοι και περιλαμβάνουν σφαιρική εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου από τον ασθενή (patient global assessment of disease activity, ptGA), από τον ιατρό (physician global assessment of disease activity, phGA), την TKE (0-100) ή την CRP, τον αριθμό των διογκωμένων αρθρώσεων από 28 αρθρώσεις (28swollen joint count, 28SJC), τον αριθμό των ευαίσθητων στην πίεση αρθρώσεων από 28 αρθρώσεις (28 tender joint count, 28TJC), ένα ερωτηματολόγιο εκτίμησης της υγείας (health assessment questionnaire, HAQ) και εκτίμηση της έντασης του πόνου σε αναλογική κλίμακα (visual analogue scale, VAS). Οι 28 αρθρώσεις προέρχονται από τους καρπούς, τις μετακαρπιοφαλαγγικές αρθρώσεις, τους αγκώνες, τους ώμους, τα γόνατα και τις εγγύς μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις. Ειδικότερα, οι δείκτες ενεργότητας που προτείνει το ACR είναι (J. Anderson et al, 2012):

1. Βαθμός ενεργότητας νόσου με 28 αρθρώσεις (Disease activity score with 28 joints, DAS28)
2. Απλοποιημένος δείκτης ενεργότητας νόσου (Simplified disease activity index, SDAI) - (28SJC + 28TJC + ptGA + phGA + CRP)

3. Κλινικός δείκτης ενεργότητας νόσου (Clinical disease activity index, CDAI)
(28SJC + 28TJC + ptGA + phGA)
4. Κλίμακα ενεργότητας ασθενούς (Patient activity scale, PAS)
(HAQ x 3.33 + pain VAS + ptGA VAS)/3
5. Κλίμακα ενεργότητας ασθενούς II (Patient activity scale II, PAS II)
(HAQ-II x 3.33 + pain VAS + ptGA VAS)/3
6. Εκτίμηση των δεικτών του ασθενούς με 3 μετρήσεις
(Routine assessment of patient index data with 3 measures, RAPID3)
(multidimensional HAQ x 3.33 + pain VAS + ptGA VAS)/3.

Σε κλινικές μελέτες ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, στις ευρωπαϊκές χώρες, χρησιμοποιούν το βαθμό της ενεργότητας της νόσου (DAS), το οποίο δημοσιεύθηκε το 1993 από τον van der Heijde και αποτελεί ένα μέτρο για την εκτίμηση της κατάστασης της νόσου. Περιλαμβάνει τα 4 ακόλουθα στοιχεία: 44 πρησμένες αρθρώσεις, τον αρθρικό δείκτη Ritchie (δείκτης μέτρησης της αρθρικής ευαισθησίας σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα), την ταχύτητα καθίζησης των ερυθροκυττάρων (ESR) και την συνολική υγεία του ασθενούς. Αργότερα, για λόγους ευκολίας προτάθηκε από τον Prevo *et al* 1995 το βαθμό της ενεργότητας της νόσου με 28 αρθρώσεις (DAS28) (R. Landewe *et al*, 2006). Ο δείκτης DAS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ταξινομηθούν οι ασθενείς σε εκείνους που παρουσιάζουν καλή, μέτρια ή κακή ανταπόκριση στη θεραπεία. Για το σκοπό αυτό ο δείκτης DAS χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα κριτήρια EULAR (European League Against Rheumatism). Στον Πίνακα 2 φαίνεται ότι το επίπεδο ενεργότητας της ασθένειας μπορεί να ερμηνευτεί με βάση αυτόν τον δείκτη ως ήπιο $DAS28 < 3,2$, μέτριο 3,2 έως 5,1 και υψηλό $DAS28 > 5,1$. Στην καθημερινή κλινική πράξη για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου παρατηρείται περισσότερο η χρήση του DAS28 (O. R. Madsen, 2011).

Πίνακας 2: Δείκτες ενεργότητας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (J. Anderson *et al*, 2012).

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΗΠΙΑ	ΜΕΤΡΙΑ	ΥΨΗΛΗ
DAS28	2,6 έως <3,2	3,2 έως 5,1	>5,1
SDAI	>3,3 έως 11	>11 έως 26	>26
CDAI	>2,8 έως 10	>10 έως 22	>22

Τα κριτήρια του Αμερικάνικου Κολλεγίου Ρευματολογίας (American College of Rheumatology, ACR), χρησιμοποιούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Τα κριτήρια ACR αναφέρονται ως ACR 20, 50, 70, τα οποία υποδηλώνουν την βελτίωση όσον αφορά στον αριθμό των διογκωμένων αρθρώσεων, στον αριθμό των ευαίσθητων στην πίεση αρθρώσεων και βελτίωση σε τουλάχιστον τρία από τα επτά παραπάνω κριτήρια, τα οποία υποδηλώνουν την ύπαρξη της νόσου. Ένα άτομο το οποίο εμφανίζει ACR20 σημαίνει ότι παρουσιάζει βελτίωση κατά 20%, ACR50 ότι παρουσιάζει βελτίωση κατά 50% και ACR70 βελτίωση κατά 70%. Πιο συγκεκριμένα, ένα άτομο με ACR20 παρουσιάζει 20% βελτίωση στις προσβεβλημένες ή στις πρησμένες αρθρώσεις, αλλά και 20% βελτίωση τουλάχιστον σε τρία από τα επτά παραπάνω κριτήρια (K. E. Donahue et al, 2007).

2.5 Βιοχημικοί δείκτες – Ακτινολογικά ευρήματα

Οι εργαστηριακές εξετάσεις για την διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας πρέπει να περιλαμβάνουν μια πλήρη γενική αίματος, τον προσδιορισμό της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, το ρευματοειδή παράγοντα (RF), την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, τα αντιπυρηνικά αντισώματα, τα αντισώματα έναντι κιτρογλινωμένων πεπτιδίων (αντι-CCP) και τα αντιουδετεροφιλικά κυτταροπλασματικά αντισώματα (ANCA). Υπάρχουν και άλλα αυτοαντισώματα που είναι ειδικά για την ρευματοειδή αρθρίτιδα όπως ο περιπυρηνικός παράγοντας και τα αντικερατινικά αντισώματα. Δεν χρησιμοποιούνται όμως λόγω τεχνικών δυσκολιών στην ανίχνευση (M. AM. Van Boekel et al, 2002).

Ένας σημαντικός παράγοντας που ανιχνεύεται στον ορό των ασθενών είναι ο ρευματοειδής παράγων (RF). Πρόκειται για αυτοαντίσωμα έναντι του τμήματος Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG του ανθρώπου. Συνήθως είναι αντίσωμα IgM, αλλά μπορεί να είναι και IgG, IgA ή IgE. Ανιχνεύεται στο 75% των ασθενών. Οι υψηλοί τίτλοι ρευματοειδούς παράγοντα συσχετίζονται με ρευματικά οζίδια, νεκρωτική αγγειΐτιδα και κακή μακροχρόνια πρόγνωση. Τα επίπεδα του ρευματοειδούς παράγοντα στα αρχικά στάδια της νόσου συνήθως είναι εντός των φυσιολογικών ορίων στον ορό, ενώ είναι αυξημένα στο υγρό των αρθρώσεων (M. AM. Van Boekel et al, 2002).

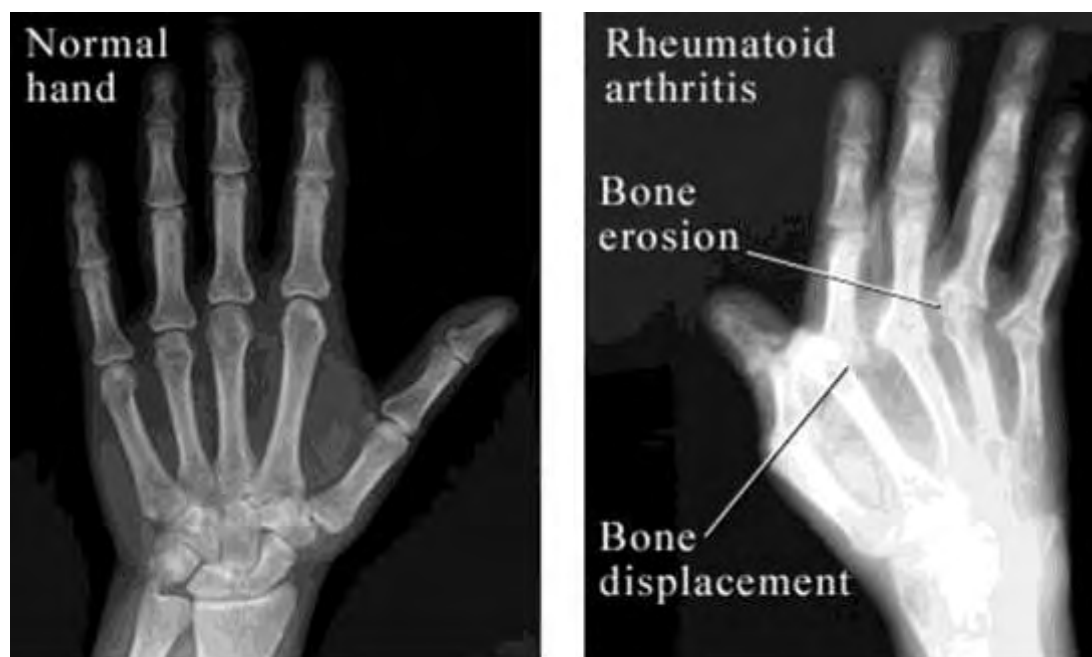
Ο ρευματοειδής παράγοντας δεν είναι ειδικός για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς υψηλά επίπεδα παρατηρούνται και σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren ή

αυτοάνοση επιθηλίτιδα, το οποίο αποτελεί χρόνιο αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού και προσβάλλει τους εξωκρινείς αδένες (Y. Huang et al, 2013), καθώς και στην ιδιοπαθή μικτή κρυσφαιριναιμία, στην οποία μη φυσιολογικές πρωτεΐνες μέσα στο αίμα καθιζάνουν και παραμένουν αδιάλυτες σχηματίζοντας παθολογικά συμπλέγματα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της φυσιολογικής του ανθρώπινου σώματος (M. Pietrogrande et al, 2011). Ο ρευματοειδής παράγοντας ανιχνεύεται σε χαμηλούς τίτλους και σε άλλες νόσους του συνδετικού ιστού καθώς και σε χρόνιες λοιμώξεις. Συνεπώς, χωρίς κλινικές εκδηλώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας, τα θετικά αποτελέσματα ρευματοειδούς παράγοντα δεν αξιολογούνται. Αντίθετα ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη διάγνωση ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε ασθενή που εμφανίζει κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (M. AM. Van Boekel et al, 2002).

Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία, ειδικότητα και καλύτερη θετική και αρνητική προγνωστική αξία σε σύγκριση με τον ρευματοειδή παράγοντα είναι η ανίχνευση των αντι-κιτρουλλινικών ACPA (anti-citrullinated protein antibodies) και των αντι-CCP (anti-cyclic citrullinated peptides antibodies) αντισωμάτων. Ο όρος κιτρουλλινοποίηση μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου αναφέρεται στην μετατροπή των καταλοίπων αργινίνης σε κατάλοιπα κιτρουλλίνης, γεγονός που παρατηρείται σε περιπτώσεις φλεγμονής. Τα αντισώματα αυτά είναι ειδικά για την ρευματοειδή αρθρίτιδα, καθώς μετά την εγκατάσταση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας παράγονται στον αρθρικό υμένα και διαχέονται στον ορό. Τα αντισώματα αντι-CCP προσδιορίζονται στον ορό των ασθενών και οι τιμές μεγαλύτερες από 15 IU/L θεωρούνται παθολογικές. Σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα οι τιμές των αντι-CCP υπερβαίνουν τις 100 IU/L (P. B. Halverson, 2005).

Τέλος, για την πλήρη διάγνωση, απαραίτητες είναι οι ακτινολογικές εξετάσεις, καθώς οι διαβρώσεις των χεριών και των ποδιών είναι εμφανείς στα αρχικά στάδια (Εικόνα 5). Ακόμη πιο αποτελεσματική θεωρείται η μαγνητική τομογραφία με την οποία μπορεί να ανιχνευτεί μεγάλο ποσοστό των διαβρώσεων των οστών πολύ πιο νωρίς από ότι με τις συμβατικές ακτίνες X (N. F. Schwenzer et al, 2010). Με την μαγνητική τομογραφία είναι δυνατή η απεικόνιση του αρθρικού θυλάκου, η απεικόνιση και η ποσοτική εκτίμηση του χόνδρου, η αποκάλυψη οιδήματος του μυελού των οστών, και η ρήξη των τενόντων. Επιπλέον, επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της νόσου από τον θεράποντα ιατρό και του παρέχει την δυνατότητα προγραμματισμού της έγκαιρης έναρξης της θεραπευτικής

αντιμετώπισης. Ωστόσο, μειονέκτημα της μαγνητικής τομογραφίας αποτελεί το υψηλό κόστος (F. M. McQueen & E. Chan, 2013).



Εικόνα 5: Ακτινολογική εξέταση άνω άκρων χεριών. Αριστερά φαίνεται το φυσιολογικό άκρο, ενώ δεξιά φαίνεται η διάβρωση του οστού και η αλλαγή της θέσης του οστού, τα οποία οδηγούν στην αλλαγή του σχήματος του άνω άκρου και επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ρευματοειδούς αρθρίτιδας (A. C. Poinier and N. A. Shadick, 2012).

2.6 Θεραπεία ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η πορεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας είναι χρόνια και κυμαινόμενη και μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη των αρθρώσεων, παραμορφώσεις και αναπηρία. Πρωταρχικοί στόχοι της θεραπείας είναι η ύφεση του πόνου, της φλεγμονής και η παρεμπόδιση της καταστροφής των αρθρώσεων και των ιστών (J. Siegel, 2008). Έχει αναφερθεί η ύπαρξη ενός «παραθύρου» κατά την έναρξη της νόσου, στην διάρκεια του οποίου η ρευματοειδής αρθρίτιδα μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά. Παρ' όλα αυτά δεν έχει ακόμη βρεθεί η μόνιμη ίαση (J. Dale et al, 2007). Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία με φάρμακα που τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARDs) οδηγούν στην βελτίωση των συμπτωμάτων και καθυστερούν την εξέλιξη των βλαβών στις αρθρώσεις. Επί του παρόντος τα DMARDs τα οποία διατίθενται είναι η σουλφασαλαζίνη, η αζαθειοπρίνη, η μεθοτρεξάτη, η λεφλουνομίδη, η κυκλοσπορίνη A και οι βιολογικές θεραπείες, οι

οποίες είναι η εταναρσέπτη, η ινφλιξιμάμπη, η ανταλιμουμάμπη, το ανακίπρα, η ριτουξιμάμπη, η τοσιλιζουμάμπη και η αβατασέπτη (I. Rego-Pérez et al, 2009). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της θεραπείας ποικίλουν από φάρμακο σε φάρμακο και από ασθενή σε ασθενή.

2.6.1 Συστημικές θεραπείες (DMARDs)

Η **σουλφασαλαζίνη (sulfasalazine)** χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αλλά η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω των ανεπιθύμητων παρενεργειών. Με την κατάποση διασπάται η σουλφασαλαζίνη από εντερικά βακτήρια σε 5-αμινοσαλικυλικό οξύ και σουλφαφυριδίνη, η οποία μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω ακετυλίωσης. Το γονίδιο *NAT2* κωδικοποιεί το ένζυμο που συμμετέχει στην ακετυλίωση της σουλφαφυριδίνης. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *NAT2* επηρεάζουν την ακετυλίωση, η οποία μπορεί σε ορισμένα άτομα να είναι ταχεία ενώ σε άλλους αργή με αποτέλεσμα το φάρμακο να παραμένει στον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα και να αυξάνεται η τοξικότητα (I. Rego-Pérez et al, 2009).

Η **αζαθειοπρίνη (azathioprine)** χρησιμοποιείται στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, σε ρευματικές παθήσεις και στην πρόληψη της απόρριψης οργάνων μετά από μεταμοσχεύσεις. Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της αποτελεσματικότητάς της, ωστόσο ορισμένες φορές παρατηρούνται ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως γαστρεντερικές διαταραχές και αυξημένη τοξικότητα του μυελού των οστών (H. Corominas et al, 2013).

Η **μεθοτρεξάτη (methotrexate)** είναι ένα αμινο-μεθυλ-ανάλογο της αμινοπτερίνης, η οποία είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος. Παρεμβαίνει στη σύνθεση του DNA μειώνοντας την διαθεσιμότητα πουρίνης και πυριμιδίνης στα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Μεγάλες δόσεις χρησιμοποιούνται για την θεραπεία των κακοηθών όγκων, ενώ σε χαμηλές δόσεις η μεθοτρεξάτη έχει ανοσοτροποποιητικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Χρησιμοποιείται είτε σε συνδυασμό με κάποιο άλλο φάρμακο είτε μόνο του. Αποτελεί πρώτης επιλογής φάρμακο και η βελτίωση της νόσου παρατηρείται εντός 3 μηνών στους ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίνονται στην θεραπεία. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ανορεξία, γαστρικό έλκος, ναυτία, στοματίτιδα, καθώς και πιο σοβαρές λοιμώξεις που παρατηρούνται στον πνεύμονα και στο συκώτι (A T. Borchers et al, 2004).

Η λεφλουνομίδη (**leflunomide**) έχει παρόμοια δράση με την μεθοτρεξάτη, καθώς έχει ανοσορρυθμιστικά/ανοσοκατασταλτικά χαρακτηριστικά, δρα ως ανασταλτικός παράγοντας του πολλαπλασιασμού και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. *In vivo* μεταβολίζεται ταχέως και σχεδόν πλήρως στο A771726, το οποίο είναι ο ενεργός μεταβολίτης της λεφλουνομίδης. Η πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ήπια αύξηση της αρτηριακής πίεσης, η λευκοπενία, η παραισθησία, η κεφαλαλγία, η διάρροια και η ναυτία (A.T. Borchers et al, 2004).

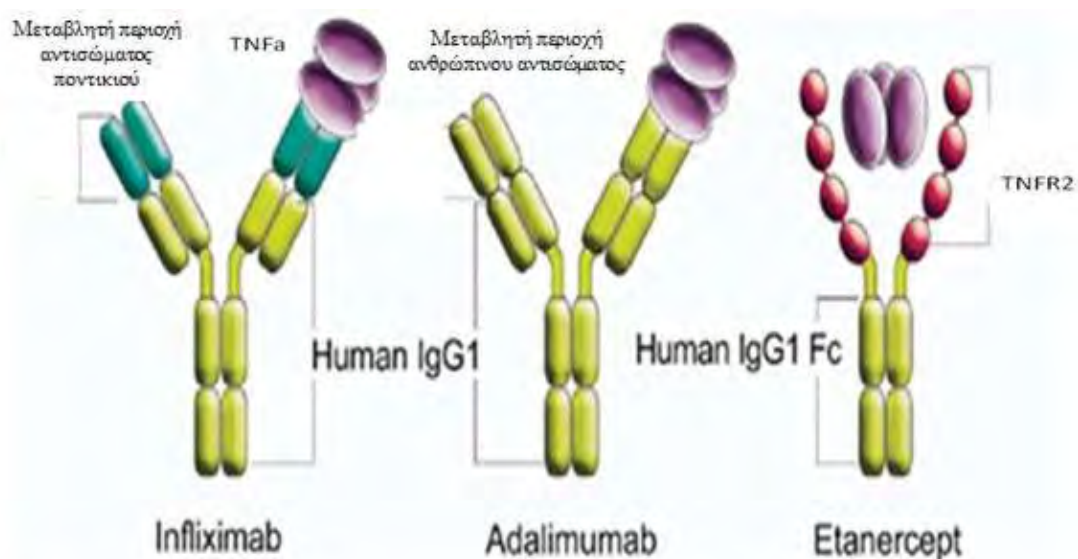
Η **κυκλοσπορίνη Α (cyclosporine A)** επηρεάζει τη λεμφοκυτταρική δραστηριότητα. Αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων παρεμβαίνοντας στην ασβέστιο-εξαρτώμενη-σηματοδότηση. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την μεθοτρεξάτη και σπάνια μόνη της. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες είναι ναυτία, διάρροια, κεφαλαλγία και σοβαρότερες λοιμώξεις όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα και λοιμώξεις, διότι με την κυκλοσπορίνη το ανοσοποιητικό σύστημα καταστέλλεται και είναι ευάλωτο σε ευκαιριακές λοιμώξεις. (E. Gremese and G.F. Ferraccioli, 2004).

2.6.2 Βιολογικές Θεραπείες

Η ανάπτυξη στοχευμένων βιολογικών θεραπειών έναντι των μορίων που παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας αποτέλεσε το επόμενο βήμα για την αντιμετώπισή της. Βάση για την χρήση αυτών αποτέλεσε η γνώση και η κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Οι βιολογικοί παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση των συμπτωμάτων αλλά και την καθυστέρηση των ακτινολογικών αλλοιώσεων. Το κόστος είναι αρκετά υψηλότερο από τις κλασικές θεραπείες, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών που δεν ανταποκρίνονται πλήρως.

Τα τελευταία χρόνια έρευνες έχουν δείξει ότι κυτταροκίνες, όπως ο TNF και η IL-1, είναι αυξημένες σε περιοχές που παρατηρείται φλεγμονή και για αυτό το λόγο δημιουργήθηκαν φάρμακα που στοχεύουν στα μόρια αυτά. Τρεις παράγοντες αντι-TNFα έχουν εγκριθεί για χρήση σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα: η ετανερσέπτη (etanercept, Enbrel®) που είναι ένας ανθρώπινος διαλυτός υποδοχέας-τύπου II του TNFα, η ινφλιξιμάμπη (infliximab, Remicade®) ένα χημιαϊκό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNFα και η ανταλιμουμάμπη (adalimumab, Humira®) ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNFα (Εικόνα 6). Ο μηχανισμός δράσης αυτών των μορίων βασίζεται στην ίδια αρχή, η

οποία συνίσταται στην παρεμπόδιση της πρόσδεσης του TNF α με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια των κυττάρων, με αποτέλεσμα την αναστολή της βιολογικής τους δράσης (I. Rego- Pérez et al, 2009).



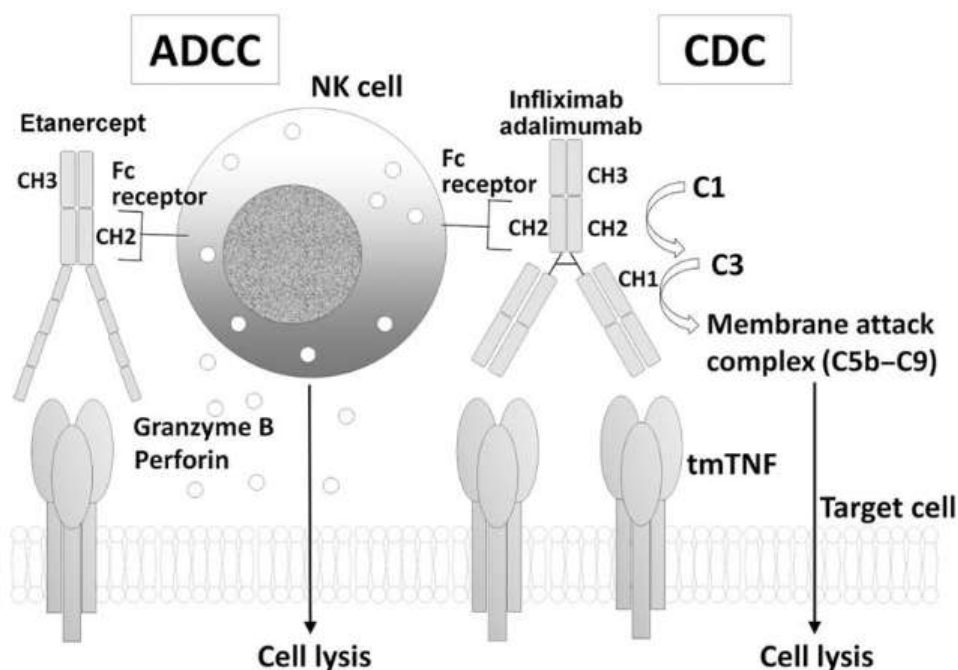
Εικόνα 6: Υποδοχείς παραγόντων αντι-TNF α . Η ινφλιξιμάμπη είναι χιμαϊρικό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου και προκύπτει από την σύνδεση της μεταβλητής περιοχής ενός αντισώματος ποντικού με την σταθερή περιοχή του ανθρώπινου IgG1, ενώ η ανταλιμουμάμπη προκύπτει από την ένωση ανθρώπινου αντισώματος. Η ετανερσέπτη είναι διμερής πρωτεΐνη που προκύπτει από την σύνδεση του p75 του υποδοχέα του TNF στην περιοχή Fc της ανθρώπινης IgG1 (Anderson Pj, 2005).

Η **ετανερσέπτη (etanercept, Enbrel®)** είναι ένα διμερές μιας χιμαϊρικής πρωτεΐνης που προέρχεται από την σύντηξη του τμήματος p75 του υποδοχέα του TNF α με την περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1 (Εικόνα 7). Η θεραπεία με ετανερσέπτη είναι αποτελεσματική τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, κυρίως με την μεθοτρεξάτη. Η χορήγηση του φαρμάκου για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 24 μηνών περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τις αρθρικές βλάβες. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί ορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ευκαιριακές λοιμώξεις, φυματίωση, καρδιακή ανεπάρκεια και λέμφωμα. Ο κίνδυνος αυξάνεται σε περιπτώσεις που το άτομο λαμβάνει ταυτόχρονα στεροειδή ή άλλα ανοσοκατασταλτικά (I. Rego- Pérez et al, 2009, B. Haraoui and V. Bykerk, 2007).

Η **ινφλιξιμάμπη (infliximab, Remicade®)** είναι ένα χιμαϊρικό μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον TNF α και παρεμποδίζει τη δράση του. Οι μεταβλητές περιοχές του αποτελούνται από αντίσωμα ποντικού και δεσμεύονται με την σταθερή

περιοχή της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1 (Εικόνα 7). Η ινφλιξιμάμπη είναι από τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με την μεθοτρεξάτη και για την θεραπεία άλλων αυτοάνοσων ασθενειών όπως η νόσος Crohn, η αγκυλωτική ή αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και η ψωριασική αρθρίτιδα. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που έχουν παρατηρηθεί είναι ίδιες με εκείνες που παρατηρούνται με την χρήση της ετανερσέπτης (I. Rego- Pérez et al, 2009).

Η ανταλιμουμάμπη (**adalimumab, Humira®**) είναι ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNFα (Εικόνα 7). Ο μοριακός του μηχανισμός είναι παρόμοιος με την ινφλιξιμάμπη. Έχει την ικανότητα να τροποποιεί τις βιολογικές απαντήσεις που προάγονται από τον TNF και μειώνει τα επίπεδα της IL-6 και των μεταλλοπρωτεϊνών. Όπως και οι προηγούμενοι βιολογικοί παράγοντες έτσι και η ανταλιμουμάμπη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την μεθοτρεξάτη αλλά και μόνο του. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του φαρμάκου είναι η αναστολή της καταστροφής της άρθρωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονταν στην θεραπεία με άλλα DMARDs. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι παρόμοιες με των δυο προηγούμενων φαρμάκων (I. Rego- Pérez et al, 2009).

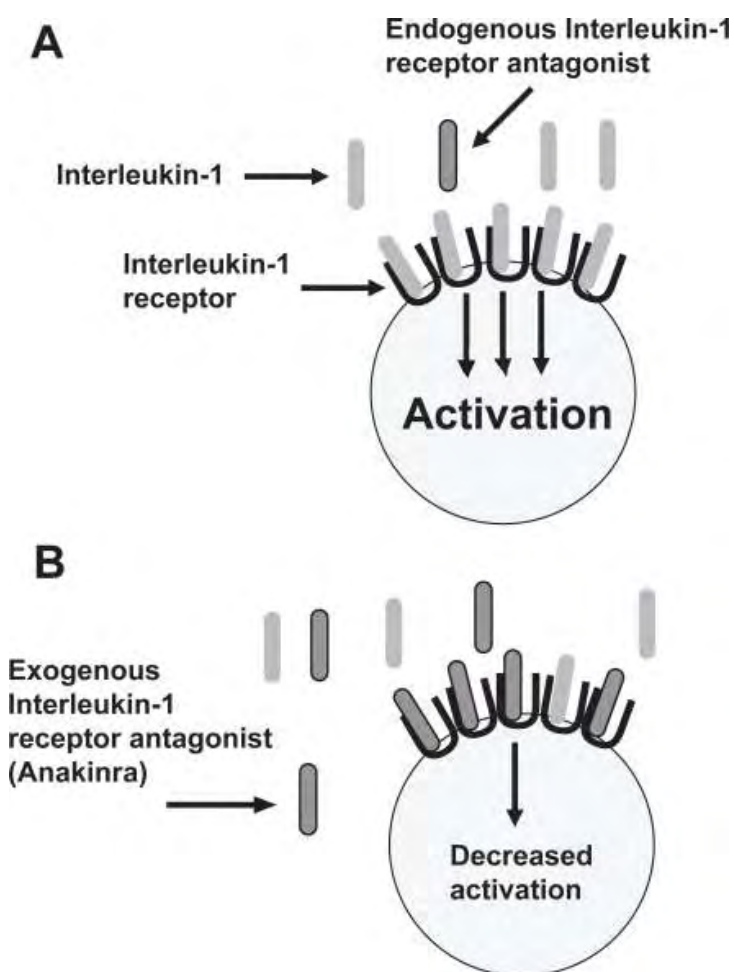


Εικόνα 7: Τρόπος δράσης των παραγόντων αντι-TNFα. Η ινφλιξιμάμπη, η ανταλιμουμάμπη και η ετανερσέπτη περιέχουν την περιοχή Fc της ανθρώπινης IgG1,

της οποίας το τμήμα CH₂ ενεργοποιεί το συμπλήρωμα C₁. Ενεργοποίηση του C₁ οδηγεί σε ενεργοποίηση του C₂ και σχηματισμό του συμπλόκου που επιτίθεται στο μεμβρανικό σύμπλεγμα MAC (Membrane Attack Complex) C5b-C9 και λύει το κύτταρο (cell lysis). Η ετανερσέπτη δεν περιέχει το τμήμα CH₁ της IgG1 που είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση του C₃. Και οι τρεις παράγοντες περιέχουν τα τμήματα CH₂ και CH₃, τα οποία μεσολαβούν στην σύνδεση με τον υποδοχέα Fc και οδηγούν στην απελευθέρωση κυτταρολυτικών πρωτεϊνών (γρανένζυμα, περφορίνη) από τα κύτταρα NK και λύση του κυττάρου στόχου (T. Horiuchi et al, 2010).

Παρόλο που η χρήση των παραγόντων αντι-TNFα έχει δείξει σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία. Έρευνες έχουν δείξει ότι το αποτέλεσμα της θεραπείας στο 40-60% είναι ανεπαρκές (Y. Vasilopoulos et al, 2011, V. Strand et al, 2007). Οι βιολογικοί αυτοί παράγοντες αναφέρονται στη συνέχεια.

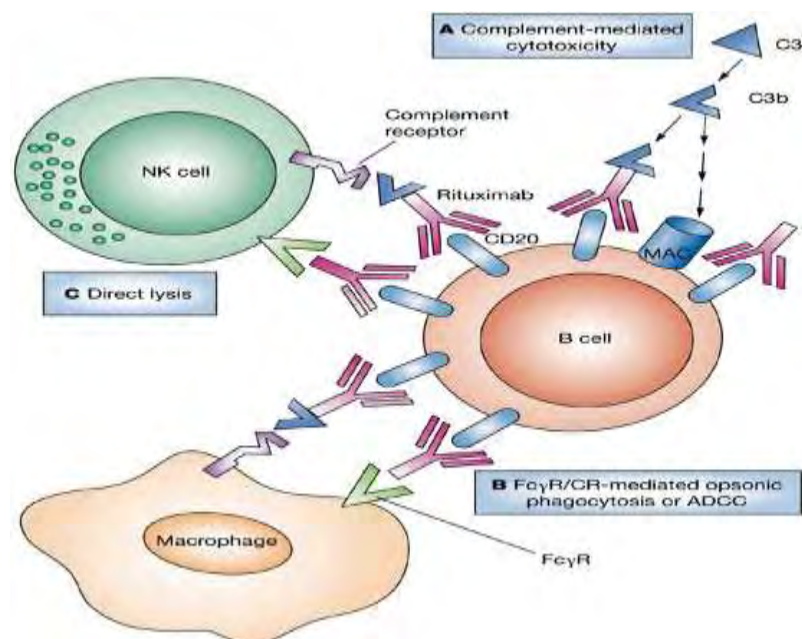
Το **ανακίπρα (anakinra, kineret®)** είναι ένας ανασυνδυασμένος ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1Ra) και συνδέεται ισχυρά με τους υποδοχείς της στα T-λεμφοκύτταρα, στα κύτταρα του αρθρικού υμένα και στα χονδροκύτταρα (Εικόνα 8). Τα ποσοστά των ασθενών που παρουσιάζουν βελτίωση με αυτήν την αγωγή είναι χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα που ακολουθούν αγωγή με παράγοντες αντι-TNFα. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι το anakinra επιβραδύνει την εξέλιξη των ακτινολογικών βλαβών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με ανθεκτική νόσο καθώς και σε εκείνους στους οποίους παρατηρούνται ανεπιθύμητες παρενέργειες από την χρήση των παραγόντων αντι-TNFα. Σε μακροχρόνια χορήγηση έχουν παρατηρηθεί σοβαρές λοιμώξεις κυρίως σε ασθενείς που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή, ενώ δεν έχει συνδεθεί με την αναζωπύρωση λανθάνουσας φυματίωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε περίπτωση μη ανταπόκρισης των ασθενών στη χορήγηση παραγόντων αντι-TNFα το anakinra παρουσιάζει επίσης χαμηλή ανταπόκριση (I. Rego- Pérez et al, 2009).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης του anakinra. Πρόκειται για μια ανασυνδυασμένη μορφή του ανθρώπινου IL-1RA που λειτουργεί ως ανταγωνιστής στην φυσιολογική λειτουργία της IL-1, εμποδίζοντας την σύνδεση της IL-1 στον υποδοχέα της. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η φυσιολογική σύνδεση της IL-1 στον υποδοχέα και η ενεργοποίηση του κυττάρου. Στο κάτω μέρος φαίνεται η απενεργοποίηση του κυττάρου λόγω της πρόσδεσης του ανταγωνιστή ανακίνρα στον υποδοχέα (ML. Stoll & AC. Gotte, 2008)

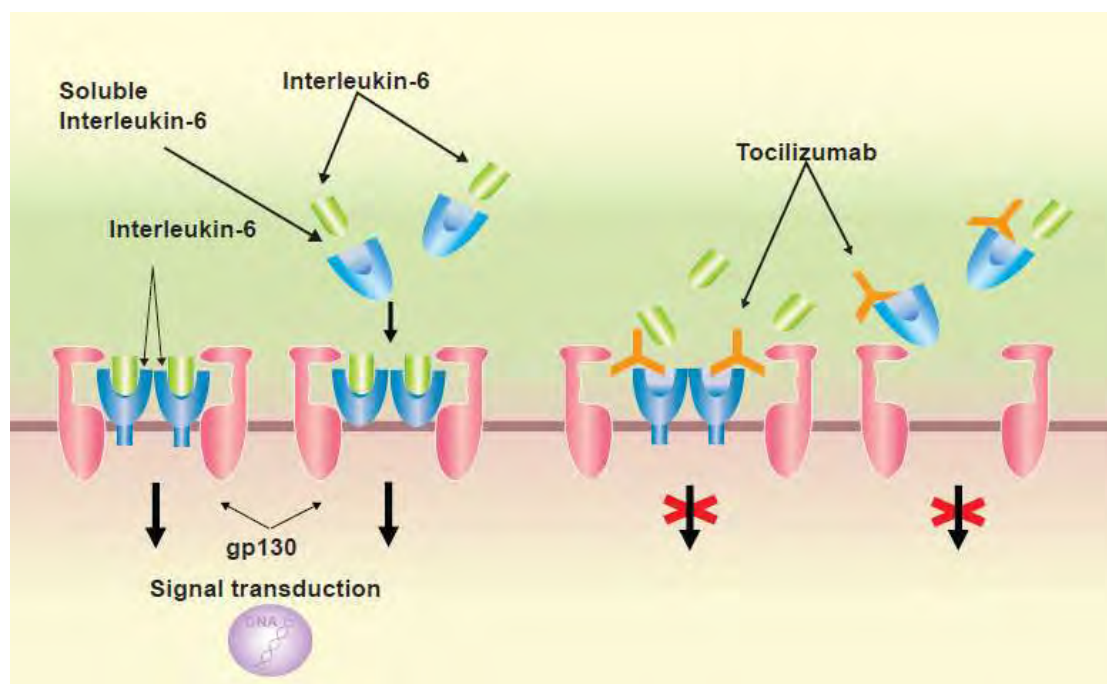
Η **ριτουξιμάμπη (rituximab, Mabthera®)** είναι ένα χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα, έναντι του μορίου *CD20* της επιφάνειας των Β λεμφοκυττάρων. Το *CD20* βρίσκεται στα πρόδρομα και στα ώριμα Β λεμφοκύτταρα. Αντιπροσωπεύει μία γλυκοζυλιωμένη ανοσοσφαιρίνη με σταθερές περιοχές ανθρώπινης IgG1 και αλληλουχίες μεταβλητής περιοχής ελαφρών και βαρέων αλυσίδων. Το φάρμακο αυτό έχει την ιδιότητα να εξαλείφει τα Β λεμφοκύτταρα από το περιφερικό αίμα, τους λεμφαδένες και το μυελό των οστών με εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC) ή με εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα ή με απόπτωση (ADCC) (Εικόνα 9). Χορηγείται σε ασθενείς με σοβαρή ρευματοειδή

αρθρίτιδα, οι οποίοι είχαν ανεπαρκή ανταπόκριση στην χορήγηση των παραγόντων αντι-TNFα (E. Jonathan et al, 2004)



Εικόνα 9: Υποδοχέας και τρόπος δράσης του rituximab. Τα Β κύτταρα υπόκεινται σε απόπτωση με τρεις τρόπους. (Α) Η δέσμευση του rituximab προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη συμπληρώματος, παράγεται το σύμπλοκο προσβολής της μεμβράνης (MAC) και λύνονται τα κύτταρα Β. (Β) Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγεί στην αποθήκευση θραυσμάτων C3b/iC3b, τα οποία προκύπτουν από την διάσπαση του C3, πρωτεΐνη του συστήματος του συμπληρώματος. Η περιοχή Fc και τα παραπάνω θραύσματα επιτρέπουν την αναγνώρισή τους από τα μακροφάγα και οδηγούν στην εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα. (C) Η δέσμευση της ριτουξιμάμπης επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα NK μέσω του υποδοχέα FcγR και του υποδοχέα του συμπληρώματος, το οποίο οδηγεί σε εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα (R. P. Taylor and M. A. Lindorfer, 2007).

Η **τοσιλιζουμάμπη (tocilizumab, anti-IL-6R)** είναι ένα εξανθρωποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ισότυπου IgG1 έναντι του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-6 (IL-6). Η δράση του φαρμάκου εξασκεύεται μέσω της σύνδεσης του στον υποδοχέα IL-6R, όπου φυσιολογικά προσδένεται η IL-6 και οδηγεί στην μεταγωγή του σήματος (Εικόνα 10). Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται κατόπιν με την γλυκοπρωτεΐνη gp130 της κυτταρικής επιφάνειας και λαμβάνει χώρα η ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που υπάρχει πιθανότητα να παρατηρηθούν είναι αλλεργικές αντιδράσεις μέχρι και αναφυλακτικό σοκ, σηψαιμία, ουδετεροπενία και αύξηση ηπατικών ενζύμων (Y. Okuda, 2008).



Εικόνα 10: Υποδοχείς και τρόπος δράσης του tocilizumab. Η ενδοκυτταρική σηματοδότηση (signal transduction) αναστέλλεται από την δράση του tocilizumab, το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα IL-6R εμποδίζοντας τη λειτουργία του (Υ. Okuda, 2008).

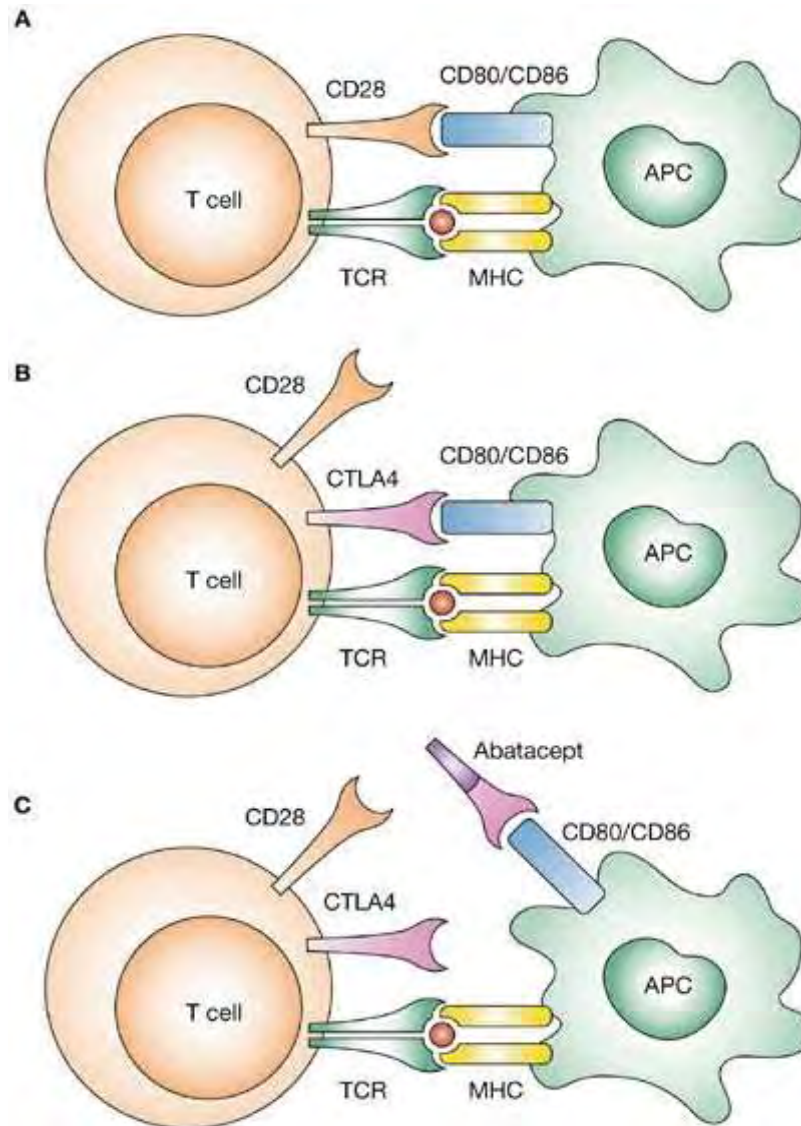
2.6.3 Αβατασέπτη (abatacept, Orencia®)

Κλινικές έρευνες έχουν δείξει σημαντική πρόοδο στην θεραπεία των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα με την χρήση των παραγόντων αντι-TNFα και της ιντερλευκίνης-1. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η μη ανταπόκριση των ασθενών στις παραπάνω θεραπείες οδήγησε στην αναζήτηση μορίων, οι οποίοι αποτελούν νέους θεραπευτικούς στόχους. Συνεπώς, οι έρευνες στράφηκαν πλέον προς την καταστολή της δραστηριότητας των Τ λεμφοκυττάρων, καθώς έχει παρατηρηθεί σημαντική ανταπόκριση των ασθενών. Ειδικότερα, η επιδείνωση της αρθρικής βλάβης έχει μειωθεί και έχει βελτιωθεί η σωματική λειτουργία (E. M. Ruderman and R. M. Pope, 2005).

Για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων απαιτούνται δυο σήματα. Το πρώτο προέρχεται από την σύνδεση του υποδοχέα αντιγόνου του Τ-λεμφοκυττάρου με το σύμπλοκο αντιγονικό πεπτίδιο/αντιγόνο ιστοσυμβατότητας (HLA) στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, ενώ το δεύτερο από τη σύνδεση συνδिएγερτικών μορίων με το συνδέτη τους. Τέτοια μόρια είναι το *CD28* που

συνδέεται με τα *CD80* και *CD86*. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης είναι η αλληλεπίδραση των κυττάρων (μακροφάγα, ινοβλάστες, λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα) και των προϊόντων τους (π.χ. ένζυμα και κυτταροκίνες) που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη διεργασία και στην ιστική καταστροφή του αρθρικού υμένα. Επίσης, με την ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου στην επιφάνεια εκφράζεται το μόριο *CTLA-4 (CD152)*, το οποίο έχει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τα *CD80* και *CD86*. Η σύνδεση αυτή επάγει αρνητικό σήμα στο T-λεμφοκύτταρο και αναστέλλει την ενεργοποίησή του (E. M. Ruderman and R. M. Pope, 2005).

Η **αβατασέπτη (abatacept, Orencia®)** είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αποτελούμενη από το εξωκυτταρικό τμήμα του ανθρώπινου κυτταροτοξικού T λεμφοκυτταρικού αντιγόνου 4 (*CTLA-4*), συνδεδεμένου με το τμήμα Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1 (*CTLA4-FcIgG1, Orencia*). Η αβατασέπτη έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το *CD80/86*, παρεμποδίζοντας την σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων με το *CD28* (Εικόνα 11)(U. Fiocco et al, 2008). Επίσης, η αβατασέπτη επάγει την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC) και την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (CDC), διότι υπό κανονικές συνθήκες η περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG συνδέεται σε υποδοχείς (*CD16, CD32* και *CD64*), οι οποίοι ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένων των CDC, ADCC, τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων, την παραγωγή κυτταροκινών και την φαγοκυττάρωση (J. Sibilina and R. Westhovens, 2007).



Εικόνα 11: Ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μέσω της διπλής σηματοδότησης και ο μηχανισμός δράσης της αβατασέπτης. Α) Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα TCR και του αντιγόνου που είναι συνδεδεμένο με μεμβρανικές πρωτεΐνες MHC, αλλά και την αλληλεπίδραση μεταξύ των CD28 και CD80/86. Β) Μετά την ενεργοποίηση εκφράζεται ο υποδοχέας CTLA-4, ο οποίος προσδένεται στον υποδοχέα CD80/CD86 και καταστέλλει την συνεχή ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Γ) Το abatacept (*CTLA-4Ig*) παρεμβάλλεται μεταξύ της αλληλεπίδρασης των CD80/86 και CD28 ή CTLA-4 και αποτρέπει την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (E. M. Ruderman and R. M. Pope, 2006).

Η αβατασέπτη εγκρίθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων το 2007 και χρησιμοποιείται πλέον σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση. Το φάρμακο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την μεθοτρεξάτη για την θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ενεργής ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε ενήλικες και για την θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ενεργής πολυαρθρικής νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας, σε

ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν επαρκώς στην θεραπεία με τη χρήση άλλων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων αντι-TNFα. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που παρατηρήθηκαν από την χρήση του φαρμάκου ήταν κεφαλαλγία, ναυτία, υπέρταση, διάρροια αλλά και σοβαρές λοιμώξεις όπως πνευμονία, βρογχίτιδα, φυματίωση, ηπατίτιδα Β (T. Pham et al, 2009).

Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν ανταποκρίνεται στην χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 638 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα σε χρονικό διάστημα 12 μηνών έδειξε ότι σύμφωνα με τα κριτήρια ACR70, ACR50 και ACR20 οι ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση 29%, 48% και 73% αντίστοιχα (L. Moreland et al, 2006). Με σκοπό την μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και την μείωση του κόστους, κρίνεται αναγκαία η εύρεση βιο-δεικτών με απώτερο στόχο την εξατομικευμένη θεραπεία προσαρμοσμένη στο γενετικό προφίλ του κάθε ασθενή. Αξίζει να τονιστεί ότι είναι ελάχιστες οι φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το ρόλο των πολυμορφισμών που επηρεάζουν την ανταπόκριση των ασθενών με ΡΑ στο abatacept (G. S. Ginsburg, 2009).

3.1 Φαρμακογενετική

Το 1959 ο Γερμανός γενετιστής Vogel ανέφερε για πρώτη φορά τον όρο φαρμακογενετική για να περιγράψει την ύπαρξη γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με την δράση των φαρμάκων. Μελέτη έδειξε ότι η κληρονομική ανεπάρκεια του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) προκαλεί σοβαρή αιμόλυση σε ορισμένους ασθενείς μετά από χορήγηση ανθελονοσιακού φαρμάκου. Αυτή η ανακάλυψη εξηγεί το λόγο που η αιμόλυση εμφανίζεται κυρίως σε Αφροαμερικάνους, οι οποίοι παρουσιάζουν έλλειψη του ενζύμου, και σπανιότερα στους Καυκάσιους και Ευρωπαίους. Η φαρμακογενετική, αναφέρεται στην αξιολόγηση της κλινικής δραστηριότητας και/ή του προφίλ ασφαλείας και ανεκτικότητας, στον φαινότυπο ανταπόκρισης ενός φαρμάκου, σε ομάδες ατόμων που διαφέρουν ως προς ορισμένα χαρακτηριστικά που βρίσκονται κωδικοποιημένα στο DNA. Επίσης παρέχει την δυνατότητα της επιλογής της κατάλληλης θεραπείας έτσι ώστε οι ασθενείς να ανταποκρίνονται θετικά και να αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες ενέργειες καθώς και η αλόγιστη χρήση φαρμάκων (L. Bridges, 2007).

Μεγάλος αριθμός ασθενών παρουσιάζει διαφορετική ανταπόκριση στην χορήγηση ενός φαρμάκου καθώς και διαφορετική τοξικότητα. Οι ασθενείς διαφοροποιούνται σε εκείνους οι οποίοι ανταποκρίνονται εξαιρετικά, μέτρια ή σε εκείνους που εκδηλώνουν τις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου. Αυτές οι διαφορές στην ανταπόκριση των ασθενών οφείλονται σε γενετικούς, παθοφυσιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (L. Bridges, 2007). Υπάρχουν μεταλλάξεις που είναι προσθήκες ή ελλείψεις μερικών βάσεων στο γενετικό υλικό, ωστόσο δεν είναι τόσο συχνές όσο ορισμένοι πολυμορφισμοί, οι οποίοι ονομάζονται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και οφείλονται στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Υπολογίζεται ότι στις 3,5 δισεκατομμύρια βάσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος υπάρχουν τουλάχιστον 3 εκατομμύρια SNPs σύμφωνα με την φάση II του προγράμματος HarMap (T. J. Pemberton, 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυμορφισμοί είναι υπεύθυνοι για την διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών στην χορήγηση φαρμάκων, μεταβάλλοντας είτε την φαρμακοκινητική, είτε τη φαρμακοδυναμική τους. Η φαρμακοκινητική αναφέρεται στις διαφορές μεταξύ των ατόμων ως προς την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την απέκκριση του φαρμάκου ενώ, η φαρμακοδυναμική αφορά την μελέτη της σχέσης ανάμεσα στη

δόση ενός φαρμάκου και τη φαρμακολογική, τοξικολογική ή κλινική απάντηση του οργανισμού (S. B. Liggett, 2001).

Σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αποτελούν το ατομικό ιστορικό της ασθένειας, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η ηλικία και το φύλο. Ωστόσο, πέραν των ειδικών αυτών χαρακτηριστικών, η ανάπτυξη νέων μοριακών και διαγνωστικών τεχνολογιών παρέχει την δυνατότητα της χρήσης του γενετικού προφίλ των ασθενών. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι η προσέγγιση ενός νέου τομέα που ονομάζεται εξατομικευμένη θεραπεία, με την οποία οι γιατροί θα μπορέσουν να χορηγούν στους ασθενείς την κατάλληλη θεραπεία χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες και αποφεύγοντας την ταλαιπωρία των ασθενών λόγω των ακατάλληλων φαρμάκων (L. Bridges, 2007). Οι μεγαλύτερες εξελίξεις σε ότι αφορά στην εξατομικευμένη θεραπεία έχουν συντελεστεί έως τώρα στα αντικαρκινικά φάρμακα, για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα καθώς και στις αιματολογικές νεοπλασίες. Ο όρος της εξατομικευμένης θεραπείας δεν σημαίνει ότι κάθε ασθενής θα λαμβάνει το δικό του φάρμακο, αντίθετα μία συγκεκριμένη ομάδα ασθενών, οι οποίοι εμφανίζουν έναν ή περισσότερους κοινούς γενετικούς δείκτες. Τέλος, με το πέρασμα του χρόνου και την μείωση του κόστους ολοένα και περισσότερες εξατομικευμένες θεραπείες θα είναι διαθέσιμες για την εφαρμογή στην κλινική πράξη (A. Abernethy et al, 2014).

3.2 Φαρμακογενετικές μελέτες στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα-Βιολογικές θεραπείες

Για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας υπάρχει αυξημένος αριθμός διαθέσιμων θεραπευτικών παραγόντων. Κατά την έναρξη των συμπτωμάτων στους ασθενείς χορηγούνται συνήθως φάρμακα που τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARDs) όπως για παράδειγμα η μεθοτρεξάτη. Στην συνέχεια, αν ο ασθενής δεν ανταποκριθεί στην θεραπεία ή εμφανιστούν ανεπιθύμητες παρενέργειες η θεραπεία στρέφεται προς την χορήγηση βιολογικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα οι αναστολείς αντι-TNFα οι οποίοι χρησιμοποιούνται είτε σε συνδυασμό με DMARDs είτε μόνοι τους (Z. Szekanecz et al, 2013).

Παρόλο που η χρήση των παραγόντων αντι-TNFα έχει δείξει σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία. Έρευνες έχουν δείξει ότι

το αποτέλεσμα της θεραπείας στο 40-60% είναι ανεπαρκές. Η φαρμακογενετική δύναται όχι μόνο να εξηγήσει την διαφορετική απόκριση των ασθενών στην χορήγηση φαρμάκων, αλλά και να προβλέψει την αποτελεσματικότητα και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων σε διαφορετικούς ασθενείς. Μελέτες έχουν συγκεντρώσει σημαντικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των φαρμάκων με την κυτταροκίνη TNFα. Το γεγονός αυτό, καθιστά τον TNFα ως υποψήφιο γονίδιο για φαρμακογενετικές μελέτες. Τα τελευταία χρόνια, αρκετοί πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον TNFα έχουν ταυτοποιηθεί και πιθανόν να σχετίζονται με τα θεραπευτικά αποτελέσματα. Μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας έδειξε ότι σύμφωνα με τα κριτήρια DAS28 οι 31/100 ασθενείς δεν ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με παράγοντες αντι-TNFα. Επίσης, το 79% και το 66% των ασθενών ήταν θετικοί ως προς τον παράγοντα RF και τα anti-CCP. Στον Πίνακα 3 φαίνεται η συσχέτιση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στην θεραπεία. Τα αποτελέσματα, μέσω της μελέτης γενετικών και ορολογικών δεικτών, έδειξαν ότι άτομα με το αλληλόμορφο TNFR2 c.676G και θετικοί για τα anti-CCP δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία (Y. Vasilopoulos et al, 2011).

Πίνακας 3: Φαίνεται η συσχέτιση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στην θεραπεία. Τα αποτελέσματα, μέσω της μελέτης γενετικών και ορολογικών δεικτών, έδειξαν ότι άτομα με το αλληλόμορφο TNFR2 c.676G που ήταν θετικοί για τα anti-CCP δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία (Y. Vasilopoulos et al, 2011).

Gene, polymorphism	Genotype	Responders n. (%)	Non-responders n. (%)	<i>p-value</i>
TNF-α g.-308G>A	GG	59 (85.5)	27 (87.1)	1
	GA	10 (14.5)	4 (12.9)	
	AA	0 (0)	0 (0)	
TNF-α g.-857C>T	CC	44 (63.8)	19 (61.3)	0.323
	CT	21 (30.4)	12 (38.7)	
	TT	4 (5.8)	0 (0)	
TNFR2 c.676T>G	TT	34 (49.3)	12 (38.7)	0.459
	TG	31 (44.9)	18 (58.1)	
	GG	4 (5.8)	1 (3.2)	

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες φαρμακογενετικής που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής είναι ανεπαρκής λόγω του μεγέθους των δειγμάτων. Απαιτούνται μεγαλύτερες ομάδες ασθενών για να εξαχθούν οριστικά συμπεράσματα. Έρευνες οι οποίες έχουν δημοσιευθεί δεν οδηγούν σε συμπέρασμα σχετικά με την χρησιμότητα του γονοτύπου του TNFα 308 A/G ή του HLA-DRB1 έτσι ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η έκβαση της θεραπείας με infliximab σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από στην θεραπεία με etanercept. Υπάρχουν αρκετές δυσκολίες στην ερμηνεία και στην σύγκριση των αποτελεσμάτων σε μελέτες φαρμακογενετικής. Συνεχείς μεγάλης κλίμακας μελέτες είναι απαραίτητες έτσι ώστε η φαρμακογενετική να εφαρμόζεται στην καθημερινή κλινική πράξη (Y. Vasilopoulos et al, 2011, Z. Szekanecz et al, 2013).

Τέλος, αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την θεραπεία των ασθενών με την χρήση του abatacept. Ωστόσο οι περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς μετά από την θεραπεία 6 μηνών δεν παρουσιάζουν βελτίωση. Η μοναδική δημοσιευμένη έρευνα αναφέρει ότι ασθενείς οι οποίοι λάμβαναν θεραπεία με abatacept για 6 μήνες παρουσίασαν μείωση από το 5.06 ± 1.4 στο 3.98 ± 1.35 , σύμφωνα με τα κριτήρια DAS28. Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν σχετικά μικρός αλλά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *CTLA4* δεν συσχετίζονται με την έκβαση της θεραπείας (R. Talotta et al, 2013).

3.3 CD80/86 ως θεραπευτικοί στόχοι

Όπως έχει αναφερθεί η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων απαιτεί δύο σήματα, το δεύτερο προέρχεται από την σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων *CD28-CD80/86*. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cells, APCs), όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα συνδιεγερτικά μόρια *CD80/86*. Η έκφραση του *CD80* είναι σχετικά χαμηλή, ενώ η έκφραση του *CD86* υψηλότερη. Έχει παρατηρηθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις *CD80/86* επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των T βοηθητικών κυττάρων Th1 και Th2 (T. Aarvak and J. B. Natvig, 2001). Συνεπώς, τα APCs στο αρθρικό υγρό οδηγούν στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων με το μονοπάτι των Th1 μέσω της έκφρασης του *CD86* και της έκκρισης της IL-12. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα συνδιεγερτικά μόρια *CD80/86* αποτελούν στόχους για την αποτροπή ή την θεραπεία των αυτοάνοσων νοσημάτων (T. Aarvak and J. B. Natvig, 2001).

Αρχικά, το 1991, μετά την ανακάλυψη ότι το *CD80 (B7-1)* συντελεί στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά αντισώματα αντι-B7-1 για την παρεμπόδιση της σύνδεσής τους. Ωστόσο, η χρήση των αντισωμάτων ήταν αναποτελεσματική, λόγω της ύπαρξης του δεύτερου συνδεδεμένου μορίου *CD86 (B7-2)*. Αργότερα, το 1994, χρησιμοποιήθηκε μια διαλυτή πρωτεΐνη, η *CD28Ig*, με την προσδοκία της αναστολής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των *CD28-CD80/86*, η οποία επίσης ήταν αναποτελεσματική. Το 1987, επιστήμονες ανακαλύπτουν την κυτταροτοξική Τ λεμφοκυτταρική πρωτεΐνη 4 (*CTLA-4*), η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τα *CD80/86* από ότι με το *CD28*. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *CTLA-4Ig*, η οποία συνδέεται αποτελεσματικά τόσο με το *CD86* όσο και με το *CD80*. Στις έρευνες που ακολούθησαν βρέθηκε ότι μπορούσε να ανασταλεί η θεραπεία με *CTLA-4Ig* μετά από ένα μικρό χρονικό διάστημα και ο ασθενής να υφίστανται τα αποτελέσματα της για το υπόλοιπο της ζωής του. Κατά τα τελευταία 15 χρόνια, ο μηχανισμός δράσης του *CTLA-4Ig in vivo* έχει γίνει κατανοητός και μελέτες σε ποντίκια οδήγησαν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τέλος, αποτέλεσμα όλων αυτών ήταν η δημιουργία του εγκεκριμένου πλέον φαρμάκου για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, την αβατασέπτη (Orencia, Bristol-Myers Squibb) (J. A. Bluestone, 2006).

3.4 Οικογένεια B7

Η οικογένεια *B7* είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από 7 μέλη τα *B7-1*, *B7-2*, *ICOS-L*, *PD-L1*, *PD-L2*, *B7-H3* και *B7-H4* (M. Collins, 2005). Ανήκουν στην γονιδιακή υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin gene superfamily, IgSF), που αποτελείται από μόρια της κυτταρικής επιφάνειας και διαθέτει μια δομική περιοχή γνωστή ως ανοσοσφαιρίνη Ig. Δυο περιοχές των ανοσοσφαιρινών που παίζουν κυρίαρχο ρόλο είναι οι περιοχές V- και C-. Η περιοχή *IgV* αποτελεί την μεταβλητή περιοχή που σχετίζεται με τις ιδιότητες της σύνδεσης του αντιγόνου, ενώ η περιοχή *IgC* αποτελεί την σταθερή περιοχή και μεσολαβεί στις λειτουργίες του τελεστή. Περιοχές που παρουσιάζουν ομοιότητες με την περιοχή *IgV* αναφέρονται ως *IgV-like*, και αντίστοιχα για την *IgC* περιοχή (A. N. Barclay, 2003). Οι δομές των εξωκυτταρικών περιοχών *B7-1* και *B7-2* είναι *IgV-like* και *IgC-like*. Τα γονίδια *B7-1* και *B7-2* είναι στενά συνδεδεμένα, όπως και τα *PD-L1* και *PD-L2*, ενώ

τα γονίδια *ICOS-L*, *B7-H3* και *B7-H4* δεν είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους (M. Collins, 2005).

Οι πρωτεΐνες *B7* γενικά εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και Β κύτταρα. Η έκφραση των *B7-1*, *B7-2* και *PD-L2* περιορίζεται στα λεμφοειδή κύτταρα, ενώ τα *ICOS-L*, *PD-L1*, *B7-H3* και *B7-H4* εκφράζονται σε μη λεμφοειδή κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν διαφορετικούς ρόλους στη λειτουργία του ανοσοποιητικού (M. Collins, 2005). Τα παραπάνω μόρια εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα αρχικά και παρατηρείται αύξηση της έκφρασής τους σε περιπτώσεις φλεγμονής. Χαμηλά επίπεδα του *B7-2* παρατηρούνται στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα Β κύτταρα και η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην έκφραση του *B7-1*. Το *ICOS-L* εκφράζεται στα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα και η έκφραση του ρυθμίζεται από την ιντερφερόνη- γ . Η έκφρασή του *PD-L2* περιορίζεται σε δενδριτικά και μακροφάγα, ενώ το *PD-L1* εκφράζεται κυρίως σε Β και Τ κύτταρα και σε μη λεμφοειδή κύτταρα. Τέλος, τα *B7-H3* και *B7-H4* δεν εκφράζονται σε ανθρώπινα κύτταρα αλλά σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ποντικού (M. Collins, 2005).

Οι συνδέτες *B7* συμμετέχουν σε ανοσοαποκρίσεις παρέχοντας σήματα διέγερσης ή αναστολής κατά την σύνδεσή τους με τους υποδοχείς τους. Τα σήματα διέγερσης οδηγούν στην ενεργοποίηση του κυττάρου, στην παραγωγή του αυξητικού παράγοντα και στην επιβίωση του κυττάρου. Σε αντίθεση, τα σήματα αναστολής εξασθενούν τα σήματα του αντιγονικού υποδοχέα, με αποτέλεσμα την μειωμένη ενεργοποίηση των κυττάρων, αναστέλλουν την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Τα *B7-1* και *B7-2* παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσορύθμιση, λόγω των αλληλεπιδράσεών τους με τα *CD28* και *CTLA-4*. Το *B7-1* παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με το *CTLA-4*, ενώ το *B7-2* δεσμεύεται πιο αποτελεσματικά με το *CD28* και οδηγεί στον καταρράκτη των εξελίξεων όπως αναφέρθηκε παραπάνω (S. Bhatia, 2006).

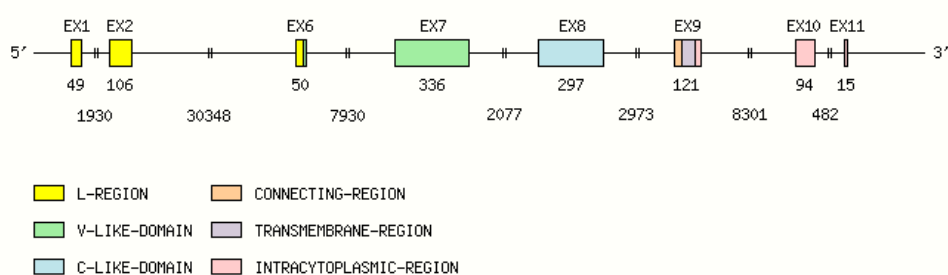
3.5 Γονίδια *CD80* και *CD86*

Τα *CD80* και *CD86*, γνωστά και ως *B7-1* και *B7-2*, εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και δεσμεύονται στα συνδιεργετικά μόρια *CD28* και *CTLA-4* (*CD152*). Τα μόρια αυτά έχουν κοινές δομικές ομοιότητες και

δεσμεύονται στα ίδια συνδιεγερτικά μόρια, αλλά παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Οι βιολογικές ιδιότητες αναφέρονται στα πρότυπα έκφρασης, στα μονοπάτια σηματοδότησης, καθώς και στην μοριακή οργάνωση.

3.5.1 Γενωμική οργάνωση των γονιδίων *CD80* και *CD86*

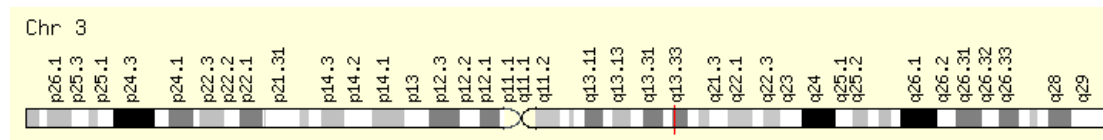
Το γονίδιο *CD80* (Εικόνα 13A) του ανθρώπου κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Freeman et al. το 1989. Περιλαμβάνει 6 εξόνια και εκτείνεται σε 32kb γενωμικού DNA. Το εξόνιο 2 περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG και τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν τις περιοχές IgV και IgC. Τα εξόνια 5 και 6, αντίστοιχα, κωδικοποιούν το διαμεμβρανικό τμήμα και την κυτταροπλασματική ουρά (Selvakumar et al, 1992). Το γονίδιο *CD86* (Εικόνα 13B) κλωνοποιήθηκε από τους Freeman et al. και Azuma et al. το 1993. Περιλαμβάνει 8 εξόνια και καλύπτει 22kb γενωμικού DNA (Εικόνα 12). Τα εξόνια 1 και 2 περιλαμβάνουν τις 5' αμετάφραστες περιοχές. Το εξόνιο 3 κωδικοποιεί το πεπτιδικό σήμα, το εξόνιο 4 τον τομέα IgV-like, το εξόνιο 5 τον τομέα IgC-like και το εξόνιο 6 το διαμεμβρανικό τμήμα και σε ένα μέρος της κυτταροπλασματικής ουράς. Τα εξόνια 7 και 8 κωδικοποιούν το υπόλοιπο της ουράς (Εικόνα 12). Η αντιστοιχία που υπάρχει μεταξύ των εξονίων και των λειτουργικών περιοχών αποτελεί χαρακτηριστικό των γονιδίων της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin gene superfamily, IgSF) (Jellis et al., 1995).



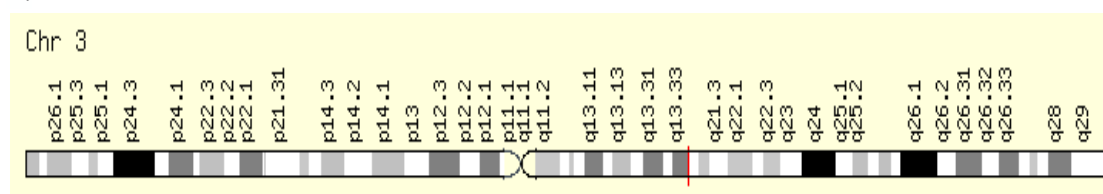
Εικόνα 12: Οργάνωση εξονίων–ιντρονίων του ανθρώπινου γονιδίου *CD86*. Το γονίδιο *CD86* περιέχει 8 εξόνια (χρωματιστά κουτάκια). Το εξόνιο 1 και 2 αντιστοιχούν στις αμετάφραστες περιοχές (κίτρινο χρώμα), το εξόνιο 3 στο πεπτιδικό σήμα (κίτρινο-μαύρο χρώμα), το εξόνιο 4 στον τομέα IgV-like (πράσινο χρώμα), το εξόνιο 5 στον τομέα IgC-like (μπλε χρώμα), το εξόνιο 6 στο διαμεμβρανικό τμήμα

(πορτοκαλί-μοβ χρώμα) και τα εξόνια 7 και 8 κωδικοποιούν το υπόλοιπο μέρος της ουράς (ροζ χρώμα) (F. Borriello et al, 1995).

A.



B.



Εικόνα 13: A. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου CD80, B. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου CD86 στην περιοχή (3q21) (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD86>).

3.5.2 Πολυμορφισμοί των γονιδίων *CD80* και *CD86*

Έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί πολυμορφισμοί των γονιδίων *CD80* και *CD86*, καθώς και των υποδοχέων τους *CTLA-4* και *CD28*, οι οποίοι αφορούν SNPs. Τα γονίδια *CTLA-4* και *CD28* είναι ομόλογα μεταξύ τους και συνδέονται στενά στην χρωμοσωμική περιοχή 2q33. Το *CD28* εκφράζεται στα ανθρώπινα $CD4^+$ T κύτταρα και στο 50-80% των $CD8^+$ T κυττάρων. Αντίθετα, το *CTLA-4* εκφράζεται μόνο μετά την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Τα γονίδια *CD80* και *CD86* είναι επίσης ομόλογα και βρίσκονται στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή 3q21 (Bier, 2007).

Σε μελέτη προσδιορίστηκαν αρκετοί νέοι πολυμορφισμοί στο 5' άκρο αλλά και στις κωδικές περιοχές των γονιδίων *CD80* και *CD86*. Δυο από τους πολυμορφισμούς κωδικοποιούν τις υποκαταστάσεις αμινοξέων, *CD80 N186D* και *CD86 A304T*. Η *CD80 N186D* εισάγει μια αλλαγή φορτίου και διαταράσσει μια από τις πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης στην IgC-like εξωκυτταρική περιοχή. Και οι δυο εξωκυτταρικές περιοχές της *CD80* είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση μεταξύ του *CD28* και του *CTLA-4*. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι παρά την έλλειψη της περιοχής IgC-like, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο παραπάνω πραγματοποιείται

κανονικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η περιοχή IgC-like δεν είναι απαραίτητη για την σύνδεση. Η *CD86 A304T* εισάγει μια θέση φωσφορυλίωσης στην κυτταροπλασματική περιοχή, παρόλα αυτά δεν υπάρχουν περαιτέρω πληροφορίες εάν η υποκατάσταση αυτή επηρεάζει τη μεταγωγή σήματος (M. Matsushita et al, 2000).

Παρά το γεγονός ότι τα γονίδια *CD80* και *CD86* έχουν χαρτογραφηθεί και τα δύο στην περιοχή 3q21 δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ της θέσης 452 *CD80* και της θέσης 1052 του *CD86*.

Παρά τον κρίσιμο ρόλο του *CD28* για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων η έλλειψη του σε μελέτες ποντίκια έδειξε φυσιολογική ανάπτυξη του T-λεμφοκυττάρου και φυσιολογική κυτταρική ανοσία. Η ομοιότητα των αμινοξέων μεταξύ ανθρώπου και ποντικίου για το γονίδιο *CD28* είναι 68%, η οποία δεν διαφέρει αρκετά από εκείνη του γονιδίου *CD80* (60%) και του *CD86* (50%). Είναι εκπληκτικό το ότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί παραλλαγές στο ανθρώπινο γονίδιο *CD28*, αυτό ίσως δείχνει πόσο απαραίτητος είναι ο ρόλος του στους ανθρώπους. Επίσης, η απουσία συνώνυμων αλλά και μη συνώνυμων αντικαταστάσεων υποδηλώνει το χαμηλό ποσοστό μετάλλαξης σε αυτή την περιοχή. Σχετικά πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε στον άνθρωπο ένα νέο συνδιεγερτικό μόριο που σχετίζεται με το *CD28* και ονομάζεται επαγωγίμο συνδιεγερτικό γονίδιο (*ICOS*). Αναφέρθηκε ότι το *ICOS* συνδέεται με τον υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων και παρέχει τη σηματοδότηση στα T λεμφοκύτταρα στη φάση της συνεργασίας με τα B λεμφοκύτταρα στο λεμφικό σύστημα. Στα ποντίκια σε περίπτωση έλλειψης του *CD28*, τα ομόλογα του *ICOS* και οι υποδοχείς του μπορούν να αντικαταστήσουν μερικώς τον ρόλο του *CD28*. Οι παραλλαγές εντός του γονιδίου *ICOS* όπως και του προτύπου έκφρασης σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα πιθανώς να είναι σημαντικά για μελλοντική έρευνα (M. Matsushita et al, 2000).

Ένα ακόμη εύρημα της παραπάνω μελέτης είναι η παρουσία 4 αλληλομόρφων που αφορούν στο 5' άκρο του *CD80*. Ο απλότυπος A-454-T-387-A-232-C-79-C-7-A5 φέρει τουλάχιστον τέσσερις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αλληλόμορφα τα οποία φέρουν 5 τουλάχιστον νουκλεοτιδικές προσθήκες και εμφανίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού της Ιαπωνίας (M. Matsushita et al, 2000).

Ο πολυμορφισμός που έχει μελετηθεί αρκετά όσον αναφορά τον υποδοχέα *CTLA-4* είναι ο G/A(+49) στο εξόνιο 1, ο οποίος προκαλεί την αντικατάσταση

θρεονίνης/αλανίνης και επηρεάζει την λειτουργία του υποδοχέα. (Liu et al., 2010). Άλλοι πολυμορφισμοί του υποδοχέα *CTLA-4* αποτελούν ο C/T(-318) στην περιοχή του υποκινητή, ο A/G(+6230) στην 3'αμετάφραστη περιοχή και άλλοι οι οποίοι εμφανίζονται σπανιότερα (Kusztal et al., 2010). Στο γονίδιο *CD28* έχει εντοπιστεί ο πολυμορφισμός T/C(+17) στην θέση του ιντρονίου 3, ωστόσο ο λειτουργικός του ρόλος δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί (Marín et al., 2005). Στο γονίδιο *CD80* έχουν εντοπιστεί οι πολυμορφισμοί G/A(+452) στο εξόνιο 3, C/G(614) στο εξόνιο 3, A/G(864) στο εξόνιο 4 και T/G(1018-12) στο ιντρόνιο 4 (M. Matsushita et al, 2000)

Στο γονίδιο *CD86*, εντοπίζεται ο πολυμορφισμός G/A(+1057) στο εξόνιο 8 (rs1129055), με αποτέλεσμα την αντικατάσταση αλανίνης/θρεονίνης στο κωδικόνιο 304 το οποίο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική ουρά του *CD86* και την φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται με την ρευματοειδή αρθρίτιδα και έχει εντοπισθεί σε ασθενείς. Τέλος, στον Πίνακα 4 αναφέρονται περιληπτικά εκτός από τους πολυμορφισμούς των παραπάνω γονιδίων και μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα (Pawlak et al., 2010).

Πίνακας 4: SNPs και τα αντίστοιχα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (C. Perricone et al, 2011).

SNP	Locus	candidate gene	OR	Allele frequency
rs10488631	7	IRF5	1.16 (0.72–1.87)	0.156
rs10499194	6	TNFAIP3	1.16–1.22 (0.94–1.42)	0.148–0.22
rs10865035	2	AFF3	1.14	0.46
rs10919563	1	PTPRC	0.9–1.08 (0.92–1.26)	0.132–0.362
rs11586238	1	CD2	1.12	0.227
rs11586238	1	CD58 G/C	0.87 (0.67–1.13)	0.164
rs1188934	2	STAT4 T/C	1.22 (0.98–1.53)	0.231
rs12746613	1	FCGR2A	1.1	0.124
rs13031237	2	REL	1.207	0.34
rs13315591	3	PXK C/T	0.98 (0.83–1.15)	0.326
rs1678542	12	KIF5A	0.89	0.351
rs1980422	2	CD28	1.1	0.238
rs2104286	10	IL2RA	0.92	0.28
rs2240340a	1	PADI4	1.4	0.373
rs2395175	6	MHC	1	0.021
rs2476601	1	PTPN22	1.23–1.75 (0.66–2.29)	0.1–0.665
rs2736340	8	BLK	1.122	0.243
rs2812378	9	CCL21	1.1	0.355
rs3087243	2	CTLA4	0.75–1.136 (0.62–0.91)	0.340–0.56
rs3093023	6	CCR6	0.79 (0.64–0.98)	0.47
rs3218253	22	IL2RB	1.07–1.11 (0.85–1.33)	0.121–0.73
rs3761847	9	TRAF1	1.1 (0.97–1.32)	0.326–0.44
rs3766379a	1	CD244	1.31	0.53
rs3890745	1	TNFSF14	0.92 (0.79–1.07)	0.32
rs394581	6	TNFAIP3	0.93	0.286
rs4750316	10	PRKCCQ	0.91–1.02 (0.87–1.19)	0.183–0.417
rs4810485	20	CD40	0.91–1.02 (0.75–1.38)	0.196–0.231
rs5029937	6	TNFAIP3	1.34	0.04
rs540386	11	TRAF6	0.92–0.97 (0.81–1.16)	0.144–0.307
rs548234	6	PRDM	1.1–1.12 (0.84–1.49)	0.100–0.322
rs6822844	4	IL2/IL21	0.7–1.389 (0.63–1.77)	0.71
rs6859219	5	ANKRD55 T/C	0.73 (0.48–1.12)	0.139
rs6920220	6	TNFAIP3	1.333	0.61
rs706778	10	IL2RA C/T	1.04 (0.89–1.21)	0.268
rs7528684a	1	FCLR3	1.2	0.35
rs7574865	2	STAT4	1.32	0.18
rs763361	18	CD226	0.875	0.005
rs874040	4	RBPJ C/G	1.02 (0.87–1.21)	0.530
rs934734	2	SPRED2 G/A	1.10 (0.94–1.28)	0.346

Σκοπός

Με βάση το ρόλο του CD86 στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και τη δράση του φαρμάκου Abatacept, σκοπός της μελέτης είναι η ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1129055 στο γονίδιο *CD86* με την ανταπόκριση των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα στην θεραπεία με το φάρμακο Abatacept, στον ελληνικό πληθυσμό.

Υλικά και Μέθοδοι

2

Υλικά και Μέθοδοι



1.1 Συλλογή δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 29 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι λάμβαναν θεραπεία με abatacept για τουλάχιστον 12 μήνες. Τα 19 δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από το Αιματολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και τα 10 δείγματα από το Αιματολογικό Τμήμα Άγιος Παύλος Θεσσαλονίκης. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με EDTA για την αποφυγή πήξης και διατηρήθηκαν στους -80°C .

Τα παραπάνω Τμήματα μάς παραχώρησαν τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, όπως η ηλικία και το φύλο, και τα κλινικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την έναρξη της νόσου και την πορεία της με την φαρμακευτική αγωγή μετά από 6 και 12 μήνες.

1.2 Απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος

1.2.1 Αρχή της μεθόδου

Σκοπός της απομόνωσης είναι η απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος από το κύτταρο και η χρήση του σε μεταγενέστερες διαδικασίες. Το DNA απομονώνεται από λευκοκύτταρα ολικού ανθρώπινου αίματος. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Αρχικά, χρησιμοποιείται διάλυμα SSC, και ακολούθως απορρυπαντικό SDS, το οποίο προκαλεί την διάσπαση των μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση του διαλύματος με διάλυμα πρωτεΐνάσης για την πέψη των πρωτεϊνών και διάλυμα οξικού νατρίου. Μετά την επώαση, τα θραύσματα των μεμβρανών, τα υπολείμματα κυττάρων και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με την χρήση οργανικών διαλυμάτων, όπως φαινόλη και χλωροφόρμιο. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης παρατηρούνται δύο φάσεις. Το DNA

κατανέμεται στην ανώτερη υδατική φάση. Στην μεσόφαση κατανέμονται κυτταρικά υπολείμματα. Συλλέγουμε την ανώτερη υδατική φάση και τέλος το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη, ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70% και επαναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα ή ddH₂O.

1.2.2 Πρωτόκολλο

Τα δείγματα αίματος (~10ml) κατά την λήψη τους τοποθετούνται σε falcon με 0,5ml EDTA 0,5M και φυλάσσονται στον καταψύκτη στους -20 °C. Αρχικά, μεταφέρουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε ελαφρά και όταν ξεπαγώσουν μεταφέρουμε 0,5ml αίματος σε σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 1ml SSC 1X. Στην συνέχεια, αναδεύουμε τα erpendorfs στη συσκευή vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 3 min. Έπειτα, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml SSC 1X. Αναδεύουμε ξανά στη συσκευή vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 3 min. Απομακρύνουμε όλο το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0,5ml οξικού νατρίου 0,2M, 50μl SDS 5% και 5μl πρωτεΐνωση K (10mg/ml). Αναδεύουμε και επωάζουμε στους 55 °C για 1 ώρα με ανέδευση. Μετά την επώαση, προσθέτουμε 0,5ml φαινόλης και 0,5ml χλωροφόρμιο, αναδεύουμε στη συσκευή vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 10 min. Συλλέγουμε την ανώτερη στοιβάδα που περιέχει το DNA χωρίς να διαταράζουμε την ενδιάμεση και σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 1ml χλωροφόρμιο, αναδεύουμε στη συσκευή του vortex και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 5 min. Μετά την 2^η φυγοκέντρωση μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης. Αναδεύουμε και επωάζουμε τα δείγματα στους -20 °C για 20 min ή ολονύκτια. Στην συνέχεια, φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 20 min. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml διαλύματος αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm, στους 4 °C για 5 min. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα και στην συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37 °C για 1 ώρα για ξήρανση. Τέλος, αφού εξατμιστεί η αιθανόλη προσθέτουμε 100μl dd H₂O για επαναδιάλυση του DNA (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος (L. Buckingham et al, 2007).

Τα πυκνά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι:

EDTA 0,5 M: Διαλύονται 93,1 gr Na_2EDTA σε 400 ml H_2O . Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 8 με σταγόνες NaOH 10N. Συμπληρώθηκε ddH_2O ως τα 500ml. Ακολουθεί αποστείρωση.

20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, pH7.0): Προσθήκη 175,4 gr NaCl και 88,2 gr Sodium citrate dehydrate σε 500 ml ddH_2O . Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.0 με σταγόνες HCl . Τελικός όγκος διαλύματος 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση. Το διάλυμα SSC 1x που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση DNA προκύπτει από την αραιώση του παραπάνω διαλύματος.

3M οξικό νάτριο Sodium Acetate: Διαλύονται 40,81 gr sodium acetate σε 80 ml ddH_2O . Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 5,2 με σταγόνες glacial acetic acid (CH_3COOH). Συμπληρώνουμε με ddH_2O ως τα 100 ml. Ακολουθεί αποστείρωση. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε Sodium Acetate 0,2M, το οποίο προκύπτει από την αραιώση του πυκνού διαλύματος.

10% SDS: Αναμειγνύονται 10 gr SDS σε 90 ml ddH_2O . Επώαση στους 68°C υπό ανάδευση για επιτάχυνση της διάλυσης. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7,2 χρησιμοποιώντας πυκνό HCl . Προσθήκη ddH_2O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 ml. Μετά την αραιώση του διαλύματος 10% SDS προκύπτει το διάλυμα 5% SDS που χρησιμοποιήθηκε.

Chloroform (24:1 v/v chloroform-isoamyl alcohol): Για την παρασκευή του διαλύματος αναμειγνύονταν 24 ml χλωροφόρμιου και 1 ml ισοαμυλικής αλκόολης.

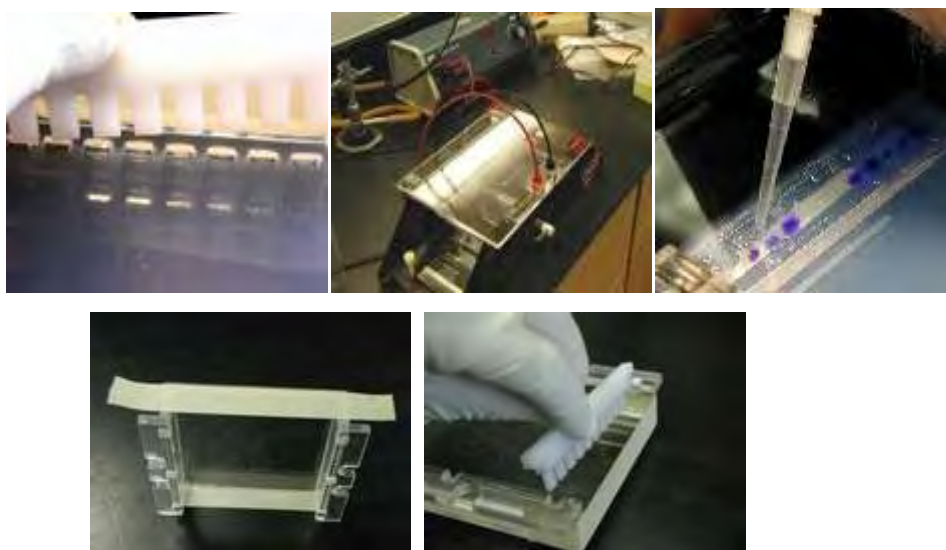
1.3 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

1.3.1 Αρχή της μεθόδου

Ο ποιοτικός προσδιορισμός του DNA γίνεται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι μόρια νουκλεϊκού οξέος, τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος και δομή, κινούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έχουν την ικανότητα του διαχωρισμού. Χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση που διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA και η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα μόρια εξαρτάται από το μήκος τους, το φορτίο τους και τη δομή τους. Τέλος, χρησιμοποιούνται χρωστικές που προσδένονται στο DNA, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, και επιτυγχάνεται η χρώση των μορίων που βρίσκονται στο πήκτωμα, ενώ στην συνέχεια το πήκτωμα εκτίθεται σε ακτινοβολία UV και τα τμήματα DNA εμφανίζονται σαν μια σειρά από φωτεινές ζώνες που αντικατοπτρίζουν το μέγεθός τους (L. Buckingham et al, 2007).

1.3.2 Πρωτόκολλο

Με την παραπάνω τεχνική μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη DNA, καθώς και αν είναι ακέραιο ή σε θραύσματα. Αρχικά, ετοιμάζουμε το καλούπι στο οποίο θα τοποθετήσουμε το μίγμα και εφαρμόζουμε χτενάκια έτσι ώστε να σχηματιστούν εγκοπές όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Στην συνέχεια, παρασκευάζουμε το πήκτωμα αγαρόζης με την διάλυση αγαρόζης σε διάλυμα TAE 1x. Βράζουμε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και κατόπιν αφήνουμε να κρυώσει μέχρι τη θερμοκρασία των $\sim 50^{\circ}\text{C}$. Οι αναλογίες της αγαρόζης και του TAE 1x βασίζονται στο μέγεθος των τμημάτων DNA (χρησιμοποιούμε συγκέντρωση 1% για ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA ή 2% για προϊόντα PCR). Έπειτα, προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο 0,4 μl , αναδεύουμε και το ρίχνουμε σε καλούπι για να στερεοποιηθεί. Τοποθετούμε το πήκτωμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προηγουμένως έχουμε τοποθετήσει TAE 1x και φορτώνουμε τα δείγματα χρησιμοποιώντας το δείγμα DNA αναμειγμένο με χρωστική. Ο όγκος του δείγματος εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του. Γενικά απαιτούνται δεκάδες ng DNA ώστε να ανιχνεύσουμε ευδιάκριτες ζώνες μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Τέλος, εφαρμόζουμε τάση $\sim 100\text{ V}$ και μεταφέρουμε το πήκτωμα σε συσκευή UV όπου μπορούμε να δούμε τις ζώνες του DNA (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (D. B. Fankhauser et al, 1994).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη είναι:

TAE 50x: Παρασκευάζεται διαλύοντας 121 gr Tris base, 28,5 ml acetic acid και 50 ml EDTA 0,5M σε τελικό όγκο 500ml. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Για να χρησιμοποιήσουμε TAE 1x αραιώνουμε τον επιθυμητό όγκο από το πυκνό διάλυμα TAE 50x.

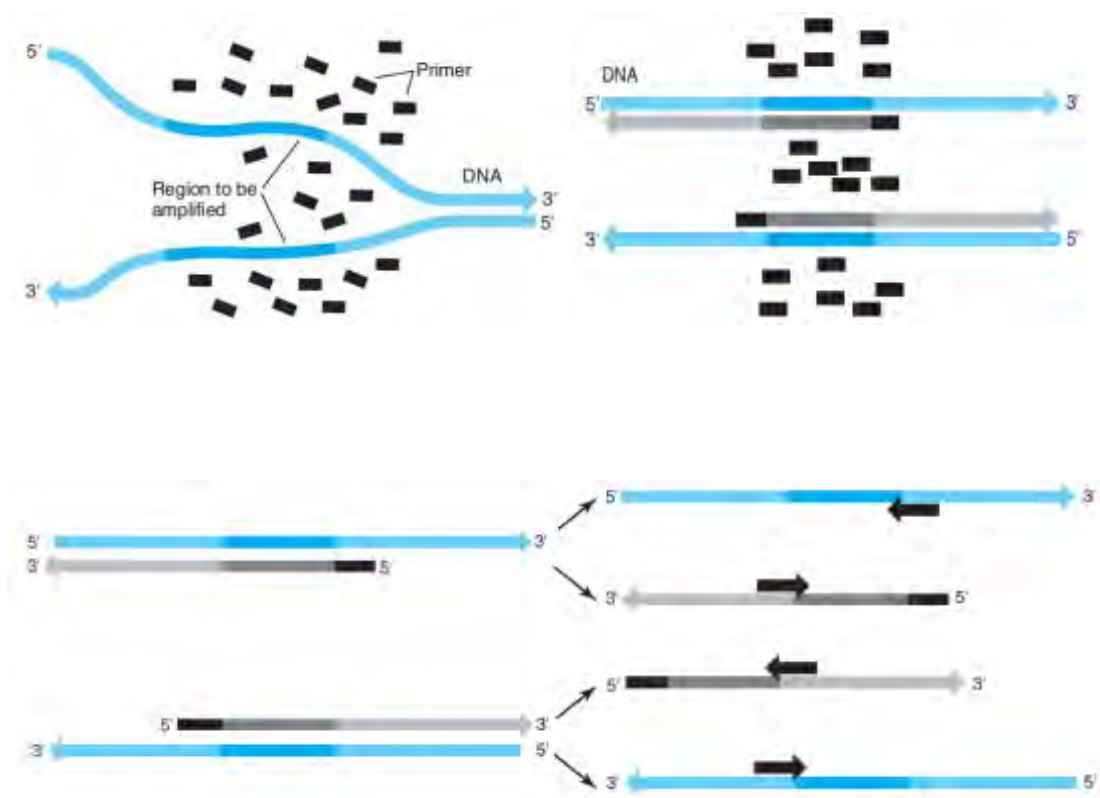
Loading buffer 6x: Αναμειγνύουμε 1 ml bromophenol blue 1% w/v με 1 ml TBE 10x και 5ml γλυκερόλη 100%. Συμπληρώνουμε με ddH₂O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10ml.

1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

1.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επινοήθηκε από τον Kary Mullis το 1983 και έφερε την επανάσταση στην μοριακή γενετική. Πρόκειται για μια *in vitro* ενζυμική μέθοδο με την οποία μπορούμε να ενισχύσουμε οποιοδήποτε τμήμα DNA σε μεγάλες ποσότητες με την χρήση κατάλληλων εκκινητών. Αποτελείται από 3 στάδια την αποδιάταξη, την υβριδοποίηση των εκκινητών και την επιμήκυνση. Στην PCR χρησιμοποιείται μια πολυμεράση DNA, η οποία μετά την θέρμανση του δίκλωνου DNA και την

αποδιάταξη του χρησιμοποιεί το μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου. Καθώς η πολυμεράση DNA δεν μπορεί να ξεκινήσει μόνη της την σύνθεση χρησιμοποιούνται ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, μήκους 18-22 βάσεων. Με την χρήση αυτών μπορούμε να καθορίσουμε τα σημεία έναρξης της σύνθεσης, καθώς οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς την περιοχή που μας ενδιαφέρει. Έτσι στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται το στάδιο της επιμήκυνσης κατά το οποίο η πολυμεράση DNA συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο χρησιμοποιώντας ως μήτρα το μονόκλωνο DNA. Τα τρία αυτά στάδια επαναλαμβάνονται αρκετές φορές, έτσι ώστε μετά από n κύκλους το μείγμα να περιέχει έως 2^n δίκλιωνα μόρια DNA (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR (L. Buckingham et al, 2007).

Τα συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση της PCR είναι το υπόστρωμα-δείγμα DNA που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες τις οποίες θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Αυτό θα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και ακέραιο. Οι εκκινητές έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς είναι ολιγονουκλεοτίδια μικρού μεγέθους 18-22 βάσεων και είναι συμπληρωματικοί ως προς τα άκρα της

περιοχής που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Επίσης, χρησιμοποιούνται dNTPs (dATP, dTTP, dCTP και dGTP) απαραίτητα για την σύνθεση της αλυσίδας. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση, που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και για αυτό ονομάζεται Taq, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται και έχει την δυνατότητα να παραμένει ενεργή ακόμη και στους 95°C όπου και πραγματοποιείται η αποδιάταξη. Επίσης, προσθέτουμε χλωριούχο μαγνήσιο, το οποίο επηρεάζει την ειδικότητα των εκκινητών και την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης. Όταν η συγκέντρωση Mg^{2+} είναι υψηλή αυξάνεται η ποσότητα μη ειδικού προϊόντος, ενώ όταν η συγκέντρωση Mg^{2+} είναι χαμηλή μειώνεται η απόδοση της PCR και τελικά η ποσότητα του προϊόντος. Τέλος, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για την δραστηριότητα της Taq DNA πολυμεράσης (L. Buckingham et al, 2007).

1.4.2 Πρωτόκολλο

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής, υπολογίζουμε τις ποσότητες ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων μας προσθέτοντας ένα επιπλέον δείγμα το οποίο δεν περιέχει DNA και αποτελεί τον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης για την ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων. Στην συνέχεια, παρασκευάζουμε το μίγμα της αντίδρασης το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA, μοιράζουμε στα σωληνάκια την ανάλογη ποσότητα, προσθέτουμε το δείγμα DNA και αναδεύουμε ώστε τα δείγματα να γίνουν ομοιογενή. Τέλος, τοποθετούμε τα σωληνάκια στον θερμοκυκλοποιητή και προγραμματίζουμε τις κατάλληλες συνθήκες. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR, καθώς και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στους Πίνακες 5 και 6.

Πίνακας 5: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της PCR

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min
Αποδιάταξη	95°C	40sec
Υβριδοποίηση	52°C	45sec
Επέκταση	72°C	45sec
Τελική επέκταση	72°C	10min

Πίνακας 6: Ποσότητες αντιδραστηρίων

Συστατικά PCR	Ποσότητες (μl)
DNA μήτρα	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
MgCl ₂	0,5μl
dNTPs	1μl
Εκκινητής Forward	1μl
Εκκινητής Reverse	1μl
Taq DNA πολυμεράση	0,25μl
ddH ₂ O	41μl
Τελικός όγκος	50μl

Πίνακας 7: Αλληλουχία ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

Ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
RV	5'-CCTTATTACTCATGGTAATG- 3'
FW	5'-TCATTGCTGTTCCAATGGC- 3'

1.5 Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

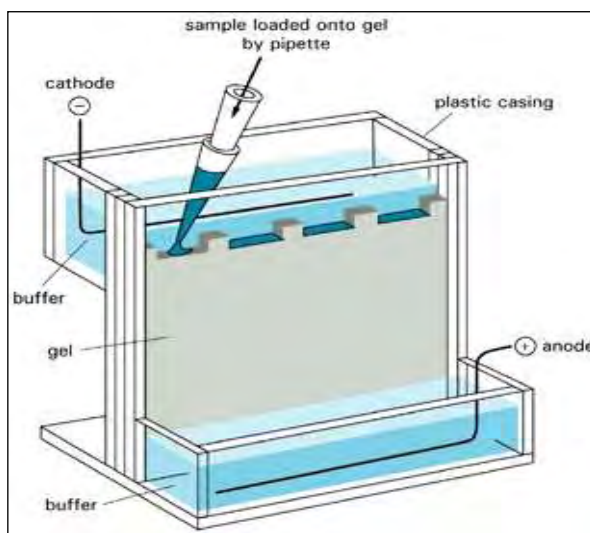
1.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στο γεγονός ότι η δομή μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική της συγκεκριμένης αλληλουχίας του μορίου DNA. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο εντοπισμός σημειακών μεταλλάξεων, καθώς μόρια DNA τα οποία διαφέρουν έστω

και κατά μια βάση μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (L. Buckingham et al, 2007).

1.5.2 Πρωτόκολλο

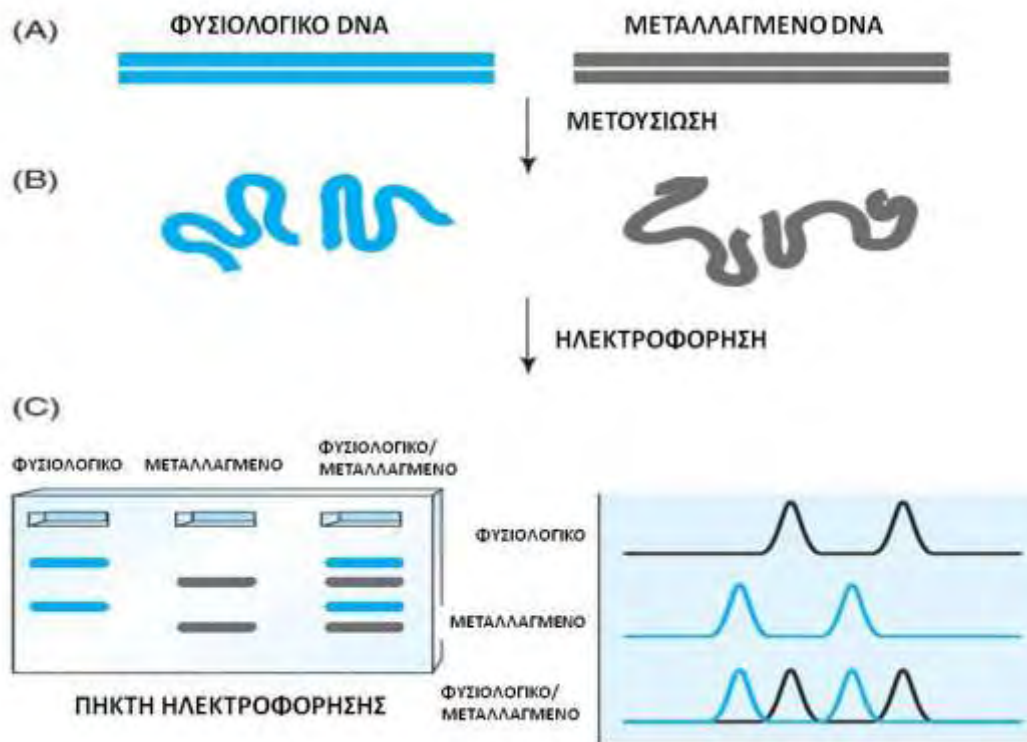
Για την πραγματοποίηση της μεθόδου αρχικά προετοιμάζουμε για τη συσκευή για την παρασκευή της πηκτής. Στα δυο άκρα των τζαμιών τοποθετούμε διαχωριστές (spacer) ώστε να δημιουργήσουμε το κατάλληλο πάχος, τα spacer που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος πηκτώματος 2mm. Ελέγχουμε για τυχόν διαρροές και προχωράμε στην παρασκευή του διαλύματος. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 6,1875gr ακρυλαμίδα, 0,165gr δισ-ακρυλαμίδα, 6,25ml γλυκερόλη 50% και 5ml TBE 10X και μαγνήτη ανάδευσης. Το μείγμα αφήνεται να ομογενοποιηθεί σε αναδευτήρα. Στην συνέχεια, διηθούμε το διάλυμα με διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 62,5ml. Έπειτα, μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη και προσθέτουμε 62,5μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 400μl APS 20% (Ammonium Persulfate) το ανακινούμε γρήγορα, πριν πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και πήξει, περιχύνουμε το διάλυμα στη συσκευή. Τέλος, τοποθετούμε τα χτενάκια για την δημιουργία των πηγαδιών και αφήνουμε το πήκτωμα να πολυμεριστεί (~45min).



Εικόνα 17: Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (L. Buckingham et al, 2007).

Στην συνέχεια, αφού πήξει το πήκτωμα αφαιρούμε τα τζάμια από τη συσκευή και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια. Ετοιμάζουμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην

οποία τοποθετούμε TBE 1x και τα τζάμια που περιέχουν την πηκτή ακρυλαμίδης. Έπειτα, 5 μl δείγματος αναμιγνύεται με 10 μl χρωστικής (SSCP loading buffer) και τα θερμαίνουμε στους 97°C ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη. Τοποθετούμε τα δείγματα σε πάγο. Τέλος, «φορτώνουμε» το δείγμα στα πηγαδάκια και ρυθμίζουμε την τάση (Εικόνα 17). Στην παρούσα μελέτη η τάση ορίστηκε στα 250 V και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στους 4°C για ~20 ώρες.



Εικόνα 18: Ανάλυση SSCP. Τα δίκλινα τμήματα των προϊόντων PCR μιας φυσιολογικής και μιας μεταλλαγμένης αλληλουχίας μετουσιώνονται και στη συνέχεια αποκτούν μία συγκεκριμένη δομή η οποία εξαρτάται από την αλληλουχία τους. Μόρια με διαφορετική δομή έχουν και διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα (L. Buckingham et al, 2007).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι:

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%: Παρασκευάζεται με διάλυση 29 gr ακρυλαμίδης με 1 gr δις ακρυλαμίδης σε 100 ml ddH₂O.

TBE 10x: Διαλύονται 60,5 gr Tris Base με 30,85 gr Boric Acid και 25 ml EDTA 0,5M σε 80 ml ddH₂O. Αφότου διαλυθούν συμπληρώνουμε με ddH₂O ώστε να

έχουμε τελικό όγκο 1 lt. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Το TBE 1x παρασκευάζεται με την αραιώση του πυκνού διαλύματος 10x.

APS 20%: Διαλύουμε 2 gr Ammonium Persulfate σε 10 ml ddH₂O. Αναδεύουμε ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.

1.5.3 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης εφαρμόζουμε την χρώση με νιτρικό άργυρο. Τα ιόντα αργύρου έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA και να αντιδρούν με την φορμαλδεΐδη σε αλκαλικές συνθήκες. Η χρώση με νιτρικό άργυρο αποτελείται από τρία στάδια, σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιείται διαφορετικό διάλυμα (S.O. Byun, 2008).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

1^ο Διάλυμα

Σε ddH₂O προσθέτουμε 10ml αιθυλική αλκοόλη 100% και 0,5ml οξικό οξύ. Συμπληρώνουμε με ddH₂O έτσι ώστε να έχουμε τελικό όγκο 400ml. Εκτελούμε δύο πλύσεις με 200ml κάθε φορά για 3 min.

2^ο Διάλυμα

Σε 200ml ddH₂O προσθέτουμε 0,2gr AgNO₃, εκτελούμε μια πλύση με 200ml για 10min. Στην συνέχεια, ξεπλένουμε 2 φορές με ddH₂O, για 2 min κάθε φορά.

3^ο Διάλυμα

Σε 200ml ddH₂O προσθέτουμε 3gr NaOH, 0,01gr NaBH₄ (Natriumborhydrid) και 1ml HCHO (φορμαλδεΐδη). Αναμιγνύουμε και επωάζουμε το πήκτωμα μέχρι να είναι ευδιάκριτες οι ζώνες DNA.

1.6 Αλληλούχηση (Sequencing)

Για την αλληλούχηση των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε καθαρισμός για την απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων. Ο καθαρισμός έγινε με το “κιτ” NucleoSpin Gel της εταιρείας Macherey-Nagel. Στην συνέχεια απεστάλησαν στην εταιρεία Cemía, η οποία πραγματοποίησε και την αλληλούχηση των δειγμάτων.

1.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού rs1129055 του γονιδίου *CD86* έγινε διαχωρισμός των ανταποκριθέντων και των μη ανταποκριθέντων ασθενών στη θεραπεία. Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν ανάλογα με τον γονότυπό τους για τον πολυμορφισμό Ala304Thr (G>A) και χρησιμοποιήθηκαν πίνακες 2x2 για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Για την δοκιμή της ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε το τεστ χ^2 , ενώ η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία έγινε με το τεστ Cochran-Armitage. Επίσης, εκτελέστηκαν και άλλα τεστ για τα οποία βασίζονται στην υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του κοινού αλληλομόρφου. Για τη στατιστική ανάλυση το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $P \leq 0,05$.

3

Αποτελέσματα



1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 29 δείγματα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι λάμβαναν θεραπεία με αβατασέπτη. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8 από τα άτομα τα οποία συμμετείχαν, οι 28 ήταν γυναίκες και ένας άνδρας. Η παραπάνω διαφορά δεν συνάδει με τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και αναφέρουν ότι η συχνότητα εμφάνισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μεταξύ γυναικών και ανδρών είναι 3:1 (D. Jawaheer et al, 2006). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 51,25 και η μέση διάρκεια της ασθένειας 14,8 έτη. Πριν από την λήψη της θεραπείας με το φάρμακο Abatacept το αρχικό DAS των ασθενών υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στο 5,95, ενώ μετά από θεραπεία 6 μηνών στο 4,53 και μετά από 12 μήνες στο 2,45. Από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο Abatacept καλή ανταπόκριση είχαν οι 18 (62%) (Πίνακας 8).

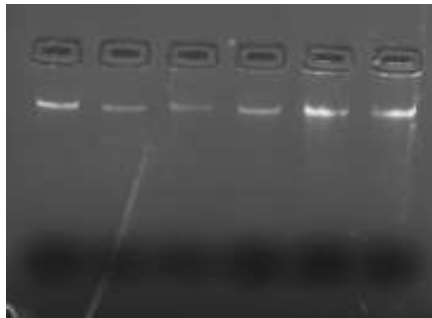
Πίνακας 8: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα που έλαβαν μέρος στη μελέτη ((i)Ανταποκριθέντες: $\Delta\text{DAS}28 \geq 1.2$ and $\text{DAS}28 \leq 3.2$ (ii) Μη ανταποκριθέντες: $\Delta\text{DAS}28 \leq 0.6$ και/ή $\Delta\text{DAS}28 > 0.6$ αλλά ≤ 1.2 και $\text{DAS}28 > 5.1$ (iii) Μετρίως ανταποκριθέντες: όλοι οι υπόλοιποι ανταποκριθέντες)

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος±ΤΑ*	51.25±17.85
Φύλο Α/Θ	1/28
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος±ΤΑ*	14.8±11.3
Αρχικό DAS28, μέσος±ΤΑ*	5.95±2.8
DAS28 στους 6 μήνες, μέσος±ΤΑ*	4.53±2.4
DAS28 στους 12 μήνες, μέσος±ΤΑ*	2.45±2.3
Ανταποκριθέντες, ποσοστό	18 (62%)
Μερικώς ανταποκριθέντες, ποσοστό	11 (38%)

*ΤΑ = Τυπική απόκλιση

1.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

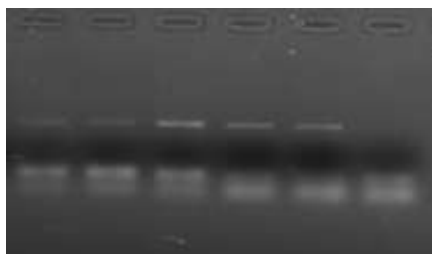
Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού DNA από τα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η ποσότητα και η ποιότητα του γενωμικού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8% w/v. Στην Εικόνα 19, μετά από έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία φαίνεται ότι το γενωμικό DNA το οποίο εξήχθη είναι ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω διαδικασίες.



Εικόνα 19: Ενδεικτικό αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

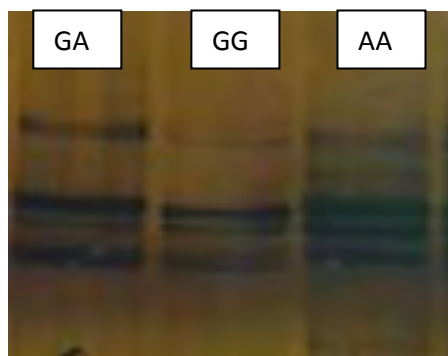
Το τμήμα του γονιδίου *CD86*, το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό rs1129055 ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR. Τα δείγματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5% w/v για να πιστοποιηθεί η παρουσία και η ποσότητα του προϊόντος. Στην Εικόνα 20 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR.



Εικόνα 20: Ενδεικτικό αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων της PCR (μεγέθους 320bp) σε πήκτωμα αγαρόζης.

1.4 Ανάλυση SSCP

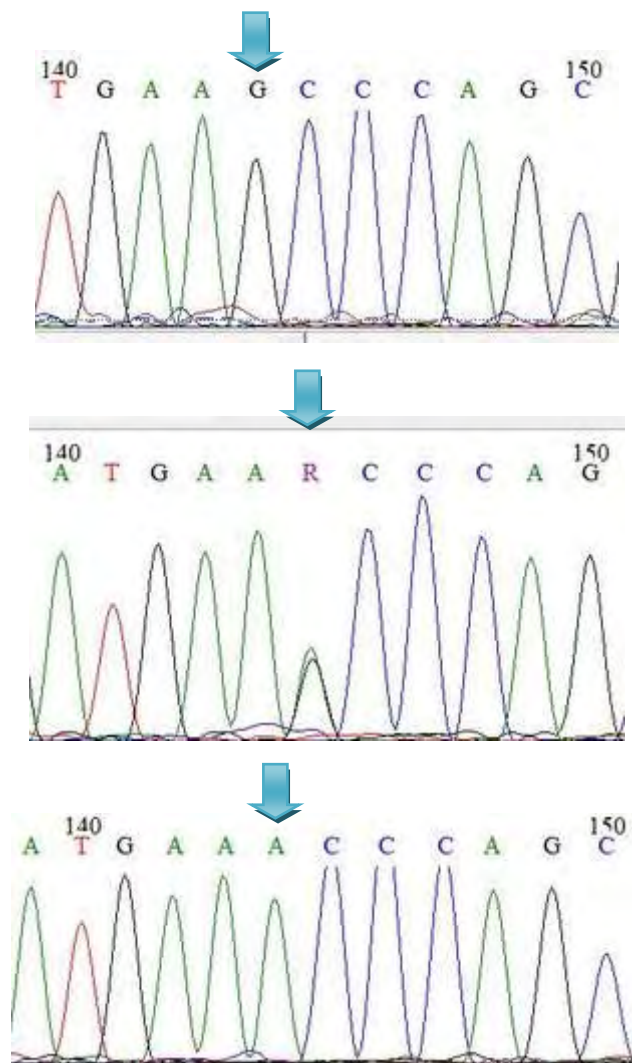
Η ανάλυση SSCP πραγματοποιήθηκε για να ομαδοποιηθούν τα δείγματα-προϊόντα PCR βάσει προτύπου και να επιλεγούν συγκεκριμένα-αντιπροσωπευτικά δείγματα για αλληλούχηση. Στην Εικόνα 21 παρατηρούμε, ενδεικτικά, τις διαφορές μεταξύ τριών δειγμάτων, τα οποία επιλέχθηκαν προς αλληλούχηση. Όπως φάνηκε στη συνέχεια (βλ. επόμενη παράγραφο) το πρώτο αντιστοιχεί σε ετεροζυγωτία (GA), το δεύτερο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G (GG) και το τρίτο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (AA).



Εικόνα 21: Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάλυσης SSCP σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τριών δειγμάτων.

1.5 Αλληλούχηση

Τα προϊόντα PCR 9 δειγμάτων, που είχαν αντιπροσωπευτικά πρότυπα στην ανάλυση SSCP, εστάλησαν για αλληλούχηση. Κατόπιν τα PCR προϊόντα 9 δειγμάτων εστάλησαν για αλληλούχηση. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην Εικόνα 22 με τη μορφή χρωματογραφήματος. Παρουσιάζονται τρία διαφορετικά χρωματογραφήματα, στα οποία εμφανίζεται ο πολυμορφισμός rs1129055 (Εικόνα 22, βέλος). Μέσω των κορυφών του χρωματογραφήματος μπορούμε να αναγνωρίσουμε την ύπαρξη ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας στον υπό μελέτη πολυμορφισμό. Από την εικόνα προκύπτει ότι το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G (GG), το τρίτο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (AA) και το δεύτερο σε ετεροζυγωτία (GA).



Εικόνα 22: Απεικόνιση τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR με τη μορφή χρωματογράφηματος. Το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G (GG), το δεύτερο σε ετεροζυγωτία (GA) και το τρίτο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (AA).

1.6 Γονοτύπηση

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων έγινε μέσω των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση, καθώς και από την σύγκριση αυτών με τα υπόλοιπα δείγματα μέσω της SSCP. Στον Πίνακα 9 φαίνεται η κωδική ονομασία του κάθε ασθενούς, ο αντίστοιχος γονότυπος, καθώς και η ανταπόκριση τους μετά από την θεραπεία με το Abatacept στους 6 και 12 μήνες (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Γονότυποι ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και η ανταπόκριση τους στη θεραπεία μετά από 6 και 12 μήνες

ΔΕΙΓΜΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	6 ΜΗΝΕΣ	12 ΜΗΝΕΣ
OR001	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR003	GG	Ανταποκρινόμενος	Μετρίως Ανταποκρινόμενος
OR006	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR007	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR008	GG	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
ΔΕΙΓΜΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	6 ΜΗΝΕΣ	12 ΜΗΝΕΣ
OR010	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR011	GG	Μη Ανταποκρινόμενος	Μη Ανταποκρινόμενος
OR012	GG	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Μετρίως Ανταποκρινόμενος
OR013	GG	Ανταποκρινόμενος	Μη Ανταποκρινόμενος
OR014	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR017	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR019	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR020	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR021	GG	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR022	GG	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR023	GG	Μη Ανταποκρινόμενος	Μη Ανταποκρινόμενος
OR024	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR025	GA	Μη Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
OR026	GA	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος

ΔΕΙΓΜΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	6 ΜΗΝΕΣ	12 ΜΗΝΕΣ
1Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
2Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
3Θ	AA	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
4Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
5Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
6Θ	GG	Μη Ανταποκρινόμενος	Μη Ανταποκρινόμενος
7Θ	AA	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Μετρίως Ανταποκρινόμενος
8Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
9Θ	GG	Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος
10Θ	GG	Μετρίως Ανταποκρινόμενος	Ανταποκρινόμενος

1.7 Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1129055 του γονιδίου *CD86* με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης και της μεταβολής του δείκτη DAS προκύπτουν τα αποτελέσματα του (Πίνακας 10). Το σύνολο των ασθενών που μελετήθηκε χωρίστηκε σε ανταποκριθέντες και μη – ανταποκριθέντες σε θεραπεία με το φάρμακο abatacept μετά από 6 μήνες. Όσον αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς, η γονοτύπηση έδειξε ότι 16 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, 1 ομόζυγος για το αλληλόμορφο A και 1 ετερόζυγος. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs1129055 στους ανταποκριθέντες είναι 0,92 (Πίνακας 10). Όσον αναφορά τους μη-ανταποκριθέντες, η γονοτύπηση έδειξε ότι 9 από αυτούς είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, 1 ομόζυγος για το αλληλόμορφο A και 1 ετερόζυγος. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs1129055 στους μη-ανταποκριθέντες είναι 0,86 (Πίνακας 10). Το αλληλόμορφο G εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στους ανταποκριθέντες ασθενείς. Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($n=0,66$) (Πίνακας 10), ως προς την συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου G, το οποίο επίσης δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (n=1) (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου *CD86* Ala304Thr (G>A) και ανταπόκριση στη θεραπεία με Abatacept μετά από 6 μήνες (n=29)

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	Μη-ανταποκριθέντες (Μερικώς ανταποκριθέντες + Μη ανταποκριθέντες)	P
<i>CD86</i> Ala304Thr (G>A) rs1129055	Genotypic [GG/GA/AA]	16/1/1	9/1/1	0.059
	Cochran- Armitage [G/A]	33/3 (0.92)	19/3 (0.86)	0.66
	Επικρατών [(GG+GA)/AA]	17/1	10/1	1.00
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	16/2	9/2	0.62

Στον Πίνακα 11 παρατηρούνται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης μετά από 12 μήνες θεραπείας με το φάρμακο Abatacept. Όσον αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς παρατηρούμε ότι 18 είναι πλέον ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, 1 ομόζυγος για το αλληλόμορφο A και 2 ετερόζυγοι. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs1129055 στους ανταποκριθέντες είναι 0,9 (Πίνακας 11). Όσον αφορά τους μη ανταποκριθέντες, 7 είναι πλέον οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, 1 ομόζυγος για το αλληλόμορφο A και κανένας ετερόζυγο. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs1129055 στους μη ανταποκριθέντες είναι 0,87 (Πίνακας 11). Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (n=1) (Πίνακας 11), ως προς την συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου G, το οποίο επίσης δεν

έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (n=0,483) (Πίνακας 11). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μετά από θεραπεία 12 μηνών 2 επιπλέον εκ των ασθενών ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία. Ωστόσο, τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Πίνακας 11: Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου *CD86* Ala304Thr (G>A) και ανταπόκριση στη θεραπεία με Abatacept μετά από 12 μήνες (n=29)

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	Μη-ανταποκριθέντες (Μερικώς ανταποκριθέντες + Μη ανταποκριθέντες)	P
<i>CD86</i> Ala304Thr (G>A) rs1129055	Genotypic [GG/GA/AA]	18/2/1	7/0/1	0.559
	Cochran- Armitage [G/A]	19/2 (0.9)	7/1 (0.87)	1.000
	Επικρατών [(GG+GA)/AA]	20/1	7/1	0.483
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	18/3	7/1	1.000

4

Συζήτηση



1.1 Συζήτηση

Ο σκοπός της μελέτης είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1129055 στο γονίδιο *CD86* με την ανταπόκριση των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα στην θεραπεία με το φάρμακο Abatacept, στον ελληνικό πληθυσμό. Για την πραγματοποίηση της μελέτης αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 29 ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με το Abatacept για 12 μήνες. Στην συνέχεια, με την μέθοδο της PCR ενισχύθηκαν τα τμήματα τα οποία περιείχαν τον υπό μελέτη πολυμορφισμό. Από τα 29 δείγματα τα 9 εστάλησαν για αλληλούχηση και οι γνωστές πλέον αλληλουχίες συγκρίθηκαν με τα υπόλοιπα δείγματα μέσω της μεθόδου της SSCP.

Το ερέθισμα για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης ήταν το γεγονός ότι για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων απαιτούνται δυο σήματα. Το πρώτο, το οποίο προέρχεται από την σύνδεση του υποδοχέα αντιγόνου του T-λεμφοκυττάρου με το σύμπλοκο αντιγονικό πεπτίδιο/αντιγόνο ιστοσυμβατότητας (HLA) στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και το δεύτερο από τη σύνδεση συνδιεγερτικών μορίων με το συνδέτη τους. Τέτοια μόρια είναι το *CD28* που συνδέεται με τα *CD80* και *CD86*. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης είναι η αλληλεπίδραση των κυττάρων (μακροφάγα, ινοβλάστες, λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα) και των προϊόντων τους (π.χ. ένζυμα και κυτταροκίνες) που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη διεργασία και στην ιστική καταστροφή του αρθρικού υμένα. Επίσης, με την ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου στην επιφάνεια εκφράζεται το μόριο *CTLA-4 (CD152)*, το οποίο έχει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τα *CD80* και *CD86*. Το φάρμακο το οποίο χρησιμοποιήθηκε έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το *CD80/86*, παρεμποδίζοντας την σύνδεση των συνδιεγερτικών μορίων με το *CD28* και κατ' επέκταση τον καταρράκτη των αντιδράσεων που ακολουθεί και οδηγεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Στη παρούσα μελέτη μετά από την στατιστική ανάλυση των γονοτύπων των δειγμάτων και την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ως προς την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1129055 με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Abatacept σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο, σημαντικό είναι το γεγονός της αναλογίας του φύλου. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες η αναλογία μεταξύ γυναικών και ανδρών είναι 3:1, το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη καθώς η αναλογία στα δείγματα ήταν 28:1.

Στη παρούσα φαρμακογενετική μελέτη ελέγχου συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1129055 με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Abatacept, το εξαιρετικά μικρό δείγμα των ασθενών αποτέλεσε μειονέκτημα στη στατιστική ανάλυση. Επομένως, μελλοντικό στόχο αποτελεί ο έλεγχος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Παράλληλα, μελλοντικοί στόχοι αποτελούν και η αναζήτηση βιο-δεικτών που σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Abatacept. Πιο συγκεκριμένα, είτε στοχεύοντας ειδικά γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στους μηχανισμούς δράσης των φαρμάκων είτε στοχεύοντας ένα δίκτυο αλληλοεξαρτώμενων και συνδιεγερτικών μορίων. Ένα επόμενο βήμα αποτελεί και η αναζήτηση βιο-δεικτών που θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με Abatacept αλλά ανταποκρίνονται στη θεραπεία με anti-TNF και/η το αντίθετο. Τέλος, απότερος σκοπός είναι η εύρεση μιας μοριακής ταυτότητας για την διάκριση μεταξύ της πρώιμης ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων και της εγκατεστημένης φλεγμονής.

Βιβλιογραφία

Aarvak Tanja and Natvig Jacob B., Review: Cell–cell interactions in synovitis Antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res* 2001, 3:13–17

Abernethy Amy, Edward Abrahams, Anna Barker, Ken Buetow, Randy Burkholder, William S. Dalton, Margaret Foti, Felix Frueh, Richard B. Gaynor, Marcia Kean, Zeba Khan¹, Tracy Lessor, J. Leonard Lichtenfeld, John Mendelsohn, and Laura van't Veer, Turning the Tide Against Cancer Through Sustained Medical Innovation: The Pathway to Progress, Published Online First February 12, 2014; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3430

Anderson Jaclyn, Liron Caplan, Jinoos Yazdany, Mark Robbins, Tuhina Neogi, Kaleb Michaud, Kenneth G. Saag, James R. O'dell and Salahuddin Kazi, Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures: American College of Rheumatology Recommendations for Use in Clinical Practice, *Arthritis Care & Research*, Vol. 64, No. 5, May 2012, pp 640 – 647, DOI 10.1002/acr.21649

Anderson Pj, Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles, Pp. 19-22, Copyright 2005

Barclay A. Neil, Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules, *Seminars in Immunology* 15 (2003) 215–223

Beier K.C., Kallinich T. & Hamelmann E. (2007). Master switches of T-cell activation and differentiation. *European Respiratory Journal*, Vol. 29, pp. 804–812

Bettelli Estelle, Thomas Korn and Vijay K Kuchroo, Th17: the third member of the effector T cell trilogy, 2007, 19:652–657

Bluestone Jeffrey A., E. William St. Clair and Laurence A. Turka, CTLA4Ig: Bridging the Basic Immunology with Clinical Application, *Immunity* 24, 233–238, March 2006, Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.immuni.2006.03.001

Borchers Andrea T., Carl L. Keen, Gurtej S. Cheema, and M. Eric Gershwin, The Use of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol 34, No 1 (August), 2004: pp 465-483

Borriello Frank, Jennifer Oliveros, Gordon J. Lee M. Nadler and Arlene H. Sharpe, Differential Expression of Alternate mB7-2 Transcripts, 1995 by The American Association of Immunologists

Bridges Louis, Jr., M.D., Ph.D. Personalized Medicine in Rheumatoid Arthritis Hopes and Challenges, *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;65 (3):174-7

Buckingham Lela, Maribeth L. Flaws, *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications*, 2007 by F. A. Davis Company

Campbell – Reece, Urry, Cain, Wasserman, Minorsky, Jackson. Βιολογία – Η χημεία της ζωής - το κύτταρο – γενετική, Τόμος I, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2008

Capece Daria, Daniela Verzella, Mariafausta Fischietti, Francesca Zazzeroni, and Edoardo Alesse, Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity, Hindawi Publishing Corporation, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2012, Article ID 926321, 17 pages, doi:10.1155/2012/926321

Carreno BM, Collins M., The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29-53. Epub 2001 Oct 4

Collins Mary, Vincent Ling† and Beatriz M Carreno, Protein family review: The B7 family of immune-regulatory ligands, *Genome Biology* 2005, 6:223 (doi:10.1186/gb-2005-6-6-223)

Corominas H., M. Dome`nech1, A. Lai`z, I. Gich2, C. Geli, C. Dí`az, F. de Cuevillas1, M. Moreno, G. Va`zquez and M. Baiget, Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology* 2003;42:40–45 doi:10.1093/rheumatology/keg028

Dale James, Nicola Alcorn, Hilary Capell and Rajan Madhok, Combination therapy for rheumatoid arthritis: methotrexate and sulfasalazine together or with other DMARDs, August 2007 vol 3 no 8, www.nature.com/clinicalpractice, doi:10.1038/ncprheum0562

Damini Jawaheer, Raymond F. Lum, Peter K. Gregersen and Lindsey A. Criswell, Influence of Male Sex on Disease Phenotype in Familial Rheumatoid Arthritis, Vol. 54, No. 10, October 2006, pp 3087–3094, DOI 10.1002/art.22120

David T., Josef S. Smolen, American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Provisional Definition of Remission in Rheumatoid Arthritis for Clinical Trials. Vol. 63, No. 3, March 2011, pp 573–586, DOI 10.1002/art.30129

Donahue Katrina E., Gerald Gartlehner, Daniel E. Jonas, Linda J. Lux, Patricia Thieda, Beth Jonas, Richard A. Hansen, Laura C. Morgan, Stacey C. Williams, Kathleen N. Lohr, Appendix I: Clinical and Self-Reported Scales and Instruments Commonly Used in Studies of Drug Therapy for Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis, AHRQ Publication No. 08-EHC004-EF November 2007

Edwards Jonathan C.W., Leszek Szczepański, Jacek Szechiński, Anna Filipowicz-Sosnowska, Paul Emery, David R. Close, Randall M. Stevens and Tim Shaw, Efficacy of B-Cell–Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis, June 17, 2004, DOI: 10.1056/NEJMoa032534

Fankhauser David B., Electrophoretic separation of DNA fragments, 16 March 1994

Felson David T., Josef S. Smolen, American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Provisional Definition of Remission in Rheumatoid

Arthritis for Clinical Trials. Vol. 63, No. 3, March 2011, pp 573–586, DOI 10.1002/art.30129

Fiocco Ugo, Paolo Sfriso, Francesca Oliviero, Elisa Pagnin, Elena Scagliori, Carla Campana, Serena Dainese, Luisella Cozzi, Leonardo Punzi, Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: The role of (CTLA4-Ig) abatacept, *Autoimmunity Reviews* 8 (2008) 76–82

Flavio Vincenti, Joshua A. Boyce, Fred Finkelman, William T. Shearer and Donata Vercelli, Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation, 2008 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, doi:10.1016/j.jaci.2008.01.002.

Fransen J., M. C. W. Creemers and P. L. C. Van Riel, Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria, 2004; 43:1252-1255

Ginsburg Geoffreys S., and Huntington F. Willard Durham, Nc, Genomic and personalized medicine: foundations and applications, 2009 Mosby, Inc. All rights reserved, doi:10.1016/j.trsl.2009.09.005

Gremese E., G.F. Ferraccioli, Benefit/risk of cyclosporine in rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22 (Suppl. 35):S101-S10.

Halverson Paul B., M.D. Anti-cyclic citrullinated peptide (CCP): a new test for rheumatoid arthritis, 2005

Haraoui Boulos, Vivian Bykerk , Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis, *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2007:3(1) 99–105

Huang Yi-fan, Qian Cheng, Chun-miao Jiang, Shu An, Lan Xiao, Yong-chao Gou, Wen-jing Yu, Lei Lei, Qian-ming Chen, Yating Wang, and Jun Wang, *Review Article*,

Jeffery Rachel C., Clinical features of rheumatoid arthritis, 2014 Elsevier Ltd

Jellis, C. L., Wang, S. S., Rennert, P., Borriello, F., Sharpe, A. H., Green, N. R., Gray, G. S. Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86). *Immunogenetics* 42: 85-89, 1995

Klareskog Lars, Vivianne Malmström, Karin Lundberg, Leonid Padyukov, Lars Alfredsson, Review Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, Volume 23, Issue 2, April 2011

Kooloos Wouter M., Dirk J. de Jong, Tom W.J. Huizing and Henk-Jan Guchelaar, Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease, *Drug Discovery Today* _ Volume 12, Numbers 3/4 _ February 2007

Kusztal M., Kościelska-Kasprzak K., Drulis-Fajdasz D. et al. (2010). The influence of CTLA-4 gene polymorphism on long-term kidney allograft function in Caucasian recipients. *Transplant Immunology*, Vol. 23, pp. 121–124.

Landewe R, van der Heijde D, van der Linden S, Boers M. Twenty-eight-joint counts invalidate the DAS28 remission definition owing to the omission of the lower extremity joints: a comparison with the original DAS remission. *Ann Rheum Dis* 2006;65:637–41

Liu Y., Liang W.B., Gao L.B. et al. (2010). CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology*, Vol. 71, pp. 1141–1146

Macgregor Alexander J., Harold Snieder, Alan S. Rigby, Markku Koskenvuo, Jaakko Kaprio, Kimmo Aho, and Alan J. Silman, Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins, *Arthritis & Rheumatism* Vol. 43, No. 1, January 2000, pp 30–37

Madsen Ole Rintek, Is DAS28-CRP with three and four variables interchangeable in individual patients selected for biological treatment in daily clinical practice? *Clin Rheumatol* (2011) 30:1577–1582 , DOI 10.1007/s10067-011-1847-6

Majithia Vikas, MD, Stephen A. Geraci, MD, *Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management*, *The American Journal of Medicine* (2007) 120, 936-939

Marvn L.A., Moya-Quiles M.R., Miras M. et al. (2005). Evaluation of CD86 gene polymorphism at (+1057) position in liver transplant. *Transplant Immunology*, Vol. 15, pp. 69-74

Matsuno Hiroaki, Chapter 5, *Treatment of Rheumatoid Arthritis with Biological Agents*, ISBN 978-953-51-0916-7, Published: January 2, 2013 under CC BY 3.0 license

Matsushita M., N Tsuchiya, T Oka, A Yamane and K Tokunaga, New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Genes and Immunity* (2000) 1, 428–4347

McInnes Iain B., F.R.C.P., Ph.D., and Georg Schett, M.D. Review article - Mechanisms of Disease, *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*, *n engl j med* 365;23 nejm.org december 8, 2011

McQueen Fiona M. & Chan Estee, *Insights into Rheumatoid Arthritis from Use of MRI*, Springer Science+Business Media New York 2013

Moreland Larry, Guy Bate and Peter Kirkpatrick, *Abatacept*, volume 5, 2006 Nature Publishing Group

Pawlak E., Karabon L., Wlodarska-Polinska I. et al. (2010). Influence of CTLA-4/CD28/ICOS gene polymorphisms on the susceptibility to cervical squamous cell carcinoma and stage of differentiation in the Polish population. *Human Immunology*, Vol. 71, pp. 195-200

Pemberton Trevor J., Chaolong Wang, Jun Z. Li and Noah A. Rosenberg, Inference of Unexpected Genetic Relatedness among Individuals in HapMap Phase III, *The American Journal of Human Genetics* 87, 457–464, October 8, 2010

Perricone Carlo, Fulvia Ceccarelli, Guido Valesini, Review: An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story, 2011 Elsevier B.V. doi:10.1016/j.autrev.2011.04.021

Pham Thao, Pascal Claudepierre, Arnaud Constantin, Bruno Fautrel, Laure Gossec, Jacques-Éric Gottenberg, Philippe Goupille, Éric Hachulla, Charles Masson, Jacques Morel, Alain Saraux, Thierry Schaeferbeke, Daniel Wendling, Xavier Mariette, Jean Sibilia, Abatacept therapy and safety management, DOI: 10.1016/S1297-319X(09)74520-8, Volume 76, Supplement 1, May 2009, Pages S3–S55

Pietrogrande Maurizio, Salvatore De Vita, Anna Linda Zignego, Pietro Pioltelli, Domenico Sansonno, Salvatore Sollima, Fabiola Atzeni, Francesco Saccardo, Luca Quartuccio, Savino Bruno, Raffaele Bruno et al, Review, Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients, 2011 Published by Elsevier B.V. doi:10.1016/j.autrev.2011.01.008

Poinier Anne C., Nancy Ann Shadick, X-Ray of Rheumatoid Arthritis in the Hands, *Healthwise Staff*, June 05, 2012

Radstake Timothy R. D. J., Mieke F. Roelofs, Yvonne M. Jenniskens, Birgitte Oppers-Walgreen, Piet L. C. M. van Riel, Pilar Barrera, Leo A. B. Joosten, and Wim B. van den Berg, Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Rheumatoid Synovial Tissue and Regulation by Proinflammatory Cytokines Interleukin-12 and Interleukin-18 Via Interferon- γ . Vol. 50, No. 12, December 2004, pp 3856–386

Rego-Pérez Ignacio, Mercedes Fernandez-Moreno, Vanessa Carreira-Garcva, and Francisco J. Blanco, Review article: Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis, *Reumatol Clin.* 2009;5(6):268–279

Ruderman Eric M and Pope Richard M, Drug Insight: abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis, *Nature Clinical Practice Rheumatology* (2006) 2, 654-660 doi:10.1038/ncprheum0345

Ruderman Eric M and Pope Richard M, Review: The evolving clinical profile of abatacept (CTLA4–Ig): a novel co-stimulatory modulator for the treatment of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther* 2005, 7 (Suppl 2):S21-S25 (DOI 10.1186/ar1688)

S.O. Byun, Q. Fang, H. Zhou, J.G.H. Hickford, An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels, *Article history: Received 31 August 2008, Available online 25 October 2008*

Schwenzer Nina F., Ina Kotter, Jorg C. Henes, Christina Schraml, Jan Fritz, Claus D. Claussen, Marius Horger, The Role of Dynamic Contrast-Enhanced MRI in the

Differential Diagnosis of Psoriatic and Rheumatoid Arthritis, American Roentgen Ray Society, 2010

Scott David L., Frederick Wolfe, Tom W J Huizinga , Rheumatoid arthritis, *Lancet* 2010; 376: 1094–1108

Selvakumar, A., Mohanraj, B. K., Eddy, R. L., Shows, T. B., White, P. C., Dupont, B. Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics* 36: 175-181, 1992

Sibilia J., R. Westhovens, Safety of T-cell co-stimulation modulation with abatacept in patients with rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25 (Suppl. 46):S46-S56.

Siegel Jeffrey, Comparative Effectiveness of Treatments for Rheumatoid Arthritis, *Ann Intern Med.* 2008;148:162-163.

Smolen Josef S., Daniel Aletaha, Marcus Koeller, Michael H Weisman, Paul Emery, New therapies for treatment of rheumatoid arthritis, *Lancet* 2007; 370: 1861–74

Soto-Velez Raul BSME, Rheumatoid Arthritis: Overview, Molecular Mechanisms and Biologics Treatments, August 17, 2011

Stephen B. Liggett, Pharmacogenetic applications of the Human Genome project, 2001 Nature Publishing Group

Strand V, Kimberly R, Isaacs JD: Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 75-92.

Stoll ML, Gotte AC, Biological therapies for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Lessons from the adult and pediatric experience, *Biologics* (2008)

Sumeena Bhatia, Michael Edidin, Steven C. Almob, Stanley G. Nathenson, B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties, *Immunology Letters* 104 (2006) 70–75

Szekanecz Zolta'n, Bertalan Mesko, Szilard Poliska, Andrea Va'ncsa, Szilvia Szamosi, Edit Ve'gh, Eniko Simkovics, Judit Laki, Ju' lia Kurko, Timea Besenyey, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant, La'szlo' Nagy, Pharmacogenetics and pharmacogenomics in Rheumatology, Published online: 6 April 2013_ Springer Science+Business Media New York 2013

Takahiko Horiuchi, Hiroki Mitoma, Shin-ichi Harashima, Hiroshi Tsukamoto and Terufumi Shimoda, Transmembrane TNF-a: structure, function and interaction with anti-TNF agents, *Rheumatology* 2010;49:1215–122

Talotta R, Bagnato GL, Atzeni F, Ditto MC, Bitto A, Squadrito F, Lo Gullo A, Sarzi-Puttini P, Bagnato GF, Polymorphic alleles in exon 1 of the CTLA4 gene do not predict the response to abatacept, *Clin Exp Rheumatol.* 2013 Sep-Oct;31 (5):813. Epub 2013 May 28.

Taylor Ronald P. and Lindorfer Margaret A., Drug Insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis, *Nature Clinical Practice Rheumatology* (2007) 3, 86-95 doi:10.1038/ncprheum0424

Tobon Gabriel J., Pierre Youinou, Alain Saraux, The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis, 2010 Elsevier

Trikudanathan S, Sayegh MH. The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways:clinical implications. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25 (suppl46):S12-21

Van Boekel Martinus AM, Erik R Vossenaar, Frank HJ van den Hoogen and Walther J van Venrooij, Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value, *Arthritis Res* 2002, 4:87-93

Vasilopoulos Y., V. Bagiatis, D. Stamatopoulou, D. Zisopoulos, I. Alexiou, T. Sarafidou, L. Settas, L. Sakkas, Z. Mamuris, Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFR2 susceptibility variant with anti-TNF- α response in rheumatoid arthritis, *Copyright clinical and experimental rheumatology* 2011

Visser Henk, Early diagnosis of rheumatoid arthritis, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* Vol. 19, No. 1, pp. 55–72, 2005

Watson James D., Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkiwski, Ανασυνδυσμένο DNA – Γονίδια και γονιδιώματα – συνοπτική παρουσίαση, *Ακαδημαϊκές Εκδόσεις* 2007

Zhang Xuewu, Jean-Claude D. Schwartz, Steven C. Almo, and Stanley G. Nathenson, Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: Insights into organization and signaling, Contributed by Stanley G. Nathenson, December 18, 2002

Πατρινός Γεώργιος Π., Wilhelm Ansorge, Μοριακή Διαγνωστική, *Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου* 2008

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD86>