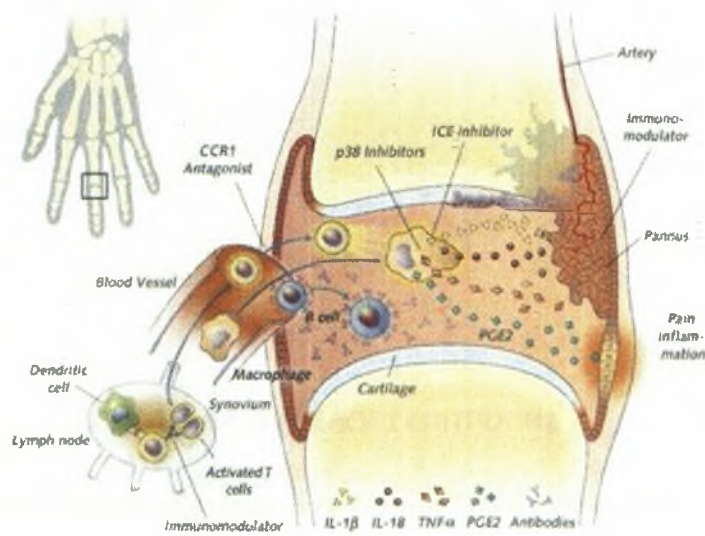


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Σταματοπούλου Δήμητρα

Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών του  
γονιδίου TNFα και των υποδοχέων του και ανταπόκρισης στη  
θεραπεία αντί – TNFα παραγόντων σε ασθενείς με  
ρευματοειδή αρθρίτιδα



ΛΑΡΙΣΑ 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8126/1

Ημερ. Εισ.: 13-04-2010

Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

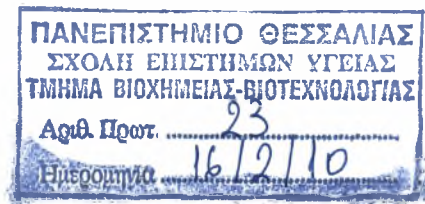
616.722 7

ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087111



**Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου  
TNFα και των υποδοχέων του και ανταπόκρισης στη θεραπεία αντί –  
TNFα παραγόντων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα**

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευρολογίας, Τμήμα Βιοχημείας  
& Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>7</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
1.1 Γενική Εισαγωγή	9
<b>1.2 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα</b>	<b>12</b>
1.2.1 Γενικά	12
1.2.2 Επιπολασμός της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	14
1.2.3 Παθολογική ανατομία της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	15
1.2.4 Διάγνωση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	16
1.2.5 Αξιολόγηση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	17
1.2.6 Αιτιολογία της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	19
1.2.7 Παθογένεια της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας	22
<b>1.3 Θεραπεία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας</b>	<b>27</b>
1.3.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ)	27
1.3.2 Κορτικοστεροειδή	28
1.3.3 Φάρμακα που τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARD)	28
1.3.4 Βιολογικοί παράγοντες	30
<b>1.4 Γονίδια που εμπλέκονται με την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα</b>	<b>36</b>
1.4.1 TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor – alpha)	36
1.4.2 Υποδοχείς του TNF $\alpha$ – TNFR1, TNFR2	37
1.4.3 Ο ρόλος του TNF $\alpha$	41
1.4.4 Πολυμορφισμοί του TNF $\alpha$ και των υποδοχέων του στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα	42
<b>1.5 Φαρμακογενετική</b>	<b>45</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>49</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>50</b>
2.1 Συλλογή δειγμάτων	50
2.2 Απομόνωση DNA	50

2.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA	54
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	56
2.5 Καθαρισμός PCR προϊόντος	62
2.6 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)	62
2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	67
2.8 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)	70
2.9 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	71
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>73</b>
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	73
3.2 RFLP – PAGE γονοτύπηση πολυμορφισμών	76
3.3 Μελέτη συσχέτισης πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στη θεραπεία	83
3.4 Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα	91
3.5 Ισχύς της μελέτης	92
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>94</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>100</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>116</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 3/3/2009 έως 2/12/2009. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης μεταπτυχιακής διατριβής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και πρόεδρο του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Μαμούρη Ζήση για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάσκοντα Π.Δ. 407/80 κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για την συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής, τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπαγιάτη Βασίλειο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την βοήθεια που προσέφερε στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, τους υποψήφιους διδάκτορες Σταμάτη Κωνσταντίνο και Γιαννούλη Θεμιστοκλή και την συμφοιτήριά μου Σκριάπα Λαμπρινή για την προθυμία, τις συμβουλές και την ηθική συμπαράσταση που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους κ. Σακκά Λάζαρο, Καθηγητή Παθολογίας – Ρευματολογίας και κ. Αλεξίου Ιωάννη, ιατρούς της Ρευματολογικής Κλινικής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, καθώς επίσης και στους κ. Σέττα Λουκά, Καθηγητή Παθολογίας – Ρευματολογίας και κ. Ζησόπουλο Δημήτρη, ιατρούς του Ρευματολογικού Τμήματος της Α' Παθολογικής

Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης για την συλλογή και παραχώρηση των δειγμάτων αίματος των ασθενών.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευρολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Ζίφα Αιμιλία, για την τιμή που μου κάνουν συμμετέχοντας στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου και την αδερφή μου για την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν, τις συμβουλές και την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μια χρόνια, αυτοάνοση, πολυπαραγοντική νόσος και εμφανίζεται περίπου στο 1% του πληθυσμού παγκοσμίως με σοβαρές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις. Την τελευταία δεκαετία η εισαγωγή των βιολογικών αναστολέων του TNFα (Infliximab, Etanercept, Adalimumab) έχουν επιφέρει επανάσταση στην θεραπεία ασθενών με ΡΑ όσον αφορά την αποτελεσματικότητα αλλά και ραγδαία αύξηση στο κόστος. Ωστόσο τα κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι μόνο το 50–60% των ασθενών ανταποκρίνονται στην θεραπεία, ενώ πολλοί ασθενείς έχουν μερική ύφεση των συμπτωμάτων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση γνωστών πολυμορφισμών στον υποκινητή του γονιδίου TNFα (G-238A, G-308A, C-857T) και στους υποδοχείς του, TNFR1 (A36G) και TNFR2 (T676G), με την κλινική ανταπόκριση (DAS28) των ασθενών με ΡΑ στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες, στον ελληνικό πληθυσμό, με απώτερο στόχο την ανάδειξη ενός προγνωστικού απλοτύπου για την ανταπόκριση στη δεδομένη θεραπεία

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς (n=100) από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα που έχουν λάβει αντί – TNFα (Infliximab, Etanercept, Adalimumab), για τουλάχιστον 6 μήνες. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα, οριζόμενη με την βαθμολογία DAS28  $\geq$  3.2, κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και τα κριτήρια EULAR. Η γονοτύπηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών με τη μέθοδο PCR-RFLP.

Η ανάλυση συσχέτισης των πολυμορφισμών του TNFα και των υποδοχέων του με την ανταπόκριση στην δεδομένη θεραπεία στους 3 και 6 μήνες δεν οδήγησε σε κάποιο στατιστικά θετικό αποτέλεσμα, πρόβλεψης θετικής ή/και αρνητικής ανταπόκρισης στην θεραπεία. Συγκεκριμένα, αν και η μελέτη αυτή είναι η μεγαλύτερη που πραγματοποιήθηκε στον ελληνικό χώρο, ο μικρός σχετικά πληθυσμός ασθενών (n=100) δεν αφήνει πολλά περιθώρια για χρήσιμα



συμπεράσματα, όπως αυτό αντανακλάται από τον υπολογισμό της στατιστικής δύναμης της μελέτης (53%).

Παρά την εκτεταμένη μελέτη των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία αντί-TNFα, μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στοιχεία που να συνδέουν πειστικά τη θεραπευτική έκβαση (θετική ή αρνητική) με τα γενετικά χαρακτηριστικά του ασθενούς υπό θεραπευτική αγωγή. Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού απλοτύπου για την ανταπόκριση στην αντί – TNFα θεραπεία των ασθενών με RA στον ελληνικό πληθυσμό.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενική Εισαγωγή

Η ανακάλυψη του DNA ως φορέα των γενετικών πληροφοριών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση και αναπαραγωγή των οργανισμών εστίασε το ενδιαφέρον των ερευνητών στον τρόπο με τον οποίο μεταβιβάζονται τα γονίδια στους απογόνους. Την αρχή την έκανε ο Mendel ο οποίος μελέτησε τον τρόπο κληρονομής διακριτών χαρακτηριστικών του φυτού *Pisum sativum* και έθεσε τις βάσεις της μενδελικής κληρονομικότητας, όπως είναι γνωστή. Με βάση τα συμπεράσματα του Mendel οι επιστήμονες στράφηκαν στην μελέτη γενετικών ασθενειών και στον τρόπο με τον οποίο κληρονομούνται, έτσι ώστε να μπορούν να βρουν το αίτιο της ασθένειας ή να υπολογίσουν την πιθανότητα εμφάνισής της στους απογόνους. Αρχικά, μελετήθηκαν στο έπακρο οι μονογονιδιακές ασθένειες επειδή, κυρίως ακολουθούσαν τους νόμους του Mendel, ήταν σχετικά εύκολο να παρακολουθείται ο τρόπος κληρονομής του αιτίου (γονιδίου) της ασθένειας στις γενιές, καθώς επίσης να υπολογιστούν οι πιθανότητες επανεμφάνισης της ασθένειας. Το ίδιο ισχύει και για τις χρωμοσωμικές ασθένειες.

Ωστόσο, δεν ακολουθούν όλες οι ασθένειες τον μενδελικό τρόπο κληρονομής. Υπάρχουν ασθένειες των οποίων η εμφάνιση εξαρτάται από το συνολικό συνδυασμό των γονιδίων του ατόμου ή/και από το περιβάλλον ή η ένταση και η σοβαρότητα της ασθένειας είναι διαφορετική μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Τέτοιου είδους ασθένειες είναι οι πολυγονιδιακές ή πολυπαραγοντικές, στις οποίες έχει εστιαστεί το ενδιαφέρον των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. Τα νοσήματα αυτά οφείλονται στην αλληλεπίδραση πολλών γονιδίων, τα οποία μπορεί να έχουν μεγάλη ή μικρή συνεισφορά στην ασθένεια. Αυτού του είδους τα νοσήματα είναι τα συχνότερα και λιγότερο κατανοητά από τις ανθρώπινες γενετικές ασθένειες. Ονομάζονται πολυγονιδιακά τα χαρακτηριστικά ή οι ασθένειες που προκαλούνται από την επίδραση πολλών διαφορετικών γονιδίων, καθένα από τα οποία έχει μία περιορισμένη μόνο επίδραση στο φαινότυπο, ενώ πολυπαραγοντικά τα χαρακτηριστικά που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση πολλαπλών

περιβαλλοντικών παραγόντων, με πολλαπλά γονίδια. Οι περισσότερες από τις ασθένειες της ενήλικης ζωής (πχ. σακχαρώδης διαβήτης, υπέρταση, σχιζοφρένεια) και οι περισσότερες συνήθεις συγγενείς δυσπλασίες (πχ. χειλεοσχιστία, υπερωιοσχιστία, βλάβες του νευρικού σωλήνα) είναι τέτοιου είδους ασθένειες<sup>1</sup>. Είναι ποικίλα τα αίτια που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση μιας πολυπαραγοντικής ασθένειας, όπως ο τρόπος ζωής του ατόμου, η διατροφή, η έκθεση σε χημικά, το γενετικό του υλικό ή η δράση πολλών γενικότερα παραγόντων<sup>2</sup>. Σε μια πολυγονιδιακή ασθένεια το αίτιο μπορεί να οφείλεται στη συνεισφορά μερικών έως πολλών γονιδίων.

Έχουν γίνει πολλές μελέτες μεγάλης κλίμακας σε διαφορετικούς πληθυσμούς προσπαθώντας να βρεθεί και να απομονωθεί το υπεύθυνο γονίδιο μιας ασθένειας. Πολύ συχνά στις πολυπαραγοντικές ασθένειες λόγω της δράσης πολλών γονιδίων το ενδιαφέρον εδράζεται σε μεταλλάξεις που υπάρχουν στο υποψήφιο γονίδιο και οι οποίες είναι διαφορετικές μεταξύ φυσιολογικού πληθυσμού και ασθενών. Τα πιθανά αλληλόμορφα που μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστεί στατιστικά η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας. Γίνεται δηλαδή συσχέτιση των αλληλομόρφων του γονιδίου, που είναι γνωστό ότι σχετίζονται και εμφανίζονται μαζί με την ασθένεια, με την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας.

Κάθε άτομο φέρει πολλές διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις, **SNPs (single nucleotide polymorphisms)**, στο γονιδίωμά του. Τα SNPs αυτά μπορεί να είναι ωφέλιμα, ουδέτερα ή επιβλαβή για το άτομο. Μερικά από αυτά σε συνδυασμό με το περιβάλλον μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και εκδήλωση μιας ασθένειας<sup>3</sup>. Πολλές επιβλαβείς μεταλλάξεις συσσωρεύονται και σε συνδυασμό με επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορούν να συμβάλλουν προς την εμφάνιση της ασθένειας.

**SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)** είναι οι παραλλαγές σε μία αλληλουχία βάσεων του DNA η οποία διαφέρει κατά μία μόνο βάση σε σχέση με την αντίστοιχη αλληλουχία μεταξύ διαφορετικών ατόμων ή μεταξύ των ζευγών χρωμοσωμάτων του ίδιου ατόμου. Οι παραλλαγές αυτές λέγονται αλληλόμορφα και

ως επί το πλείστον κάθε SNP έχει δύο αλληλόμορφα<sup>4</sup>. Η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι πάνω από 1%. Υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις των SNPs μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, δηλαδή SNPs που είναι κοινά για κάποιο πληθυσμό, το πιο πιθανό είναι να είναι σπάνια σε κάποιον άλλον πληθυσμό διαφορετικής γεωγραφικής τοποθεσίας ή εθνότητας. Στο γονιδίωμα του ανθρώπου υπάρχει κατά μέσο όρο ένα SNP ανά 1000 ζεύγη βάσεων και αποτελούν το 0,1% του γονιδιώματος<sup>5</sup>.

Τα SNPs απαντώνται σχεδόν σε όλο το γονιδίωμα, μπορεί να βρίσκονται στα εξώνια, στα ιντρόνια, στις ρυθμιστικές περιοχές, ή σε περιοχές ετεροχρωματίνης. Μπορεί να προκαλέσουν την αλλαγή κάποιου αμινοξέος και κατά συνέπεια να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης ή να επηρεάσουν το μάτισμα ή την πρόσδεση διάφορων παραγόντων<sup>6,7</sup>. Ωστόσο, κατά συντριπτική πλειοψηφία τα SNP βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος χωρίς λειτουργική σημασία και έτσι είναι πιθανότερο να είναι ουδέτερα (δηλαδή να μην επηρεάζουν το φαινότυπο)<sup>5</sup>. Τα SNPs μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό το πώς αντιδρούν τα άτομα σε διάφορα παθογόνα, σε εμβόλια, σε φάρμακα και άλλους παράγοντες. Επίσης, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη κάποιας ασθένειας<sup>6</sup>.

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μία φλεγμονώδης ασθένεια που οφείλεται σε διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και κατατάσσεται στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση της ασθένειας, ωστόσο διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει την άμεση εμπλοκή του μορίου TNFα στην παθογένεια και εξέλιξη της ασθένειας<sup>8</sup>. Γι' αυτό τα εργαστήρια βιοτεχνολογίας και τα τμήματα έρευνας και ανάπτυξης μεγάλων πολυεθνικών εταιριών κατευθύνθηκαν προς τη δημιουργία φαρμάκων που να στοχεύουν σ' αυτό το μόριο. Την τελευταία δεκαετία, η χρήση αυτών των βιολογικών παραγόντων έφερε επανάσταση στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ΡΑ, ωστόσο τα κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι μόνο 50-60% των ασθενών ανταποκρίνονται θετικά στην θεραπεία, ενώ πολλοί ασθενείς έχουν μερική ύφεση των συμπτωμάτων<sup>9</sup>. Παράλληλα η γεωμετρικά αυξανόμενη χρήση των φαρμάκων αυτών οδήγησε σε ραγδαία αύξηση του κόστους της θεραπευτικής προσέγγισης για την ΡΑ, κάτι που έχει άμεσο αντίκτυπο στα ασφαλιστικά ταμεία και

το σύστημα υγείας των κρατών. Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο στην Ελλάδα η χρήση των βιολογικών παραγόντων αντί – TNFα κόστισε περίπου 300 εκατομμύρια ευρώ για ένα χρόνο συνταγογράφησης για όλες τις ενδείξεις (Πηγή: Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων). Εντούτοις σταδιακά αναπτύσσεται η θεωρία ότι η γενετική ποικιλομορφία των ασθενών δύναται να είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την ανταπόκρισή τους στην θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες. Στα πλαίσια της εξατομικευμένης ιατρικής, οι γενετικές μελέτες και η ανακάλυψη πολυμορφισμών που σχετίζονται άμεσα με την ασθένεια και την ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στην καθημερινή κλινική πράξη παρέχοντας την δυνατότητα πρόβλεψης εκ των προτέρων της ανταπόκρισης των ασθενών στη δεδομένη θεραπευτική προσέγγιση.

## 1.2 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

### 1.2.1 Γενικά

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μία χρόνια, συστηματική, φλεγμονώδης, συμμετρική συνήθως πολυαρθρίτιδα (υμενίτιδα), άγνωστης αιτιολογίας, που μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση των αρθρώσεων και προοδευτική αναπηρία. Η νόσος είναι δυνατόν να συνοδεύεται και από εξωαρθρικές εκδηλώσεις (ρευματοειδή οζίδια, αγγειίτιδα), με αποτέλεσμα την προσβολή διάφορων ιστών και οργάνων<sup>10</sup>. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι η πιο συχνή φλεγμονώδης αρθροπάθεια. Η νόσος έχει παγκόσμια κατανομή, προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες απ' τους άντρες (αναλογία φύλου 3:1) και η συχνότητά της κυμαίνεται από 0,3-1,5%. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, με μεγαλύτερη συχνότητα όμως μεταξύ της 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> δεκαετίας. Η επίπτωσή της σε διαφορετικούς πληθυσμούς ποικίλλει από 0,2-0,4/1000 άτομα κατ' έτος<sup>10,11</sup>. Η αιτιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας παραμένει ακόμη άγνωστη αλλά θεωρείται γενικά πολυπαραγοντικό νόσημα. Υποστηρίζεται ότι οι γενετικοί και

περιβαλλοντικοί παράγοντες (λοιμώδεις, ανοσολογικοί, ενδοκρινικοί, διαιτητικοί, ψυχοκοινωνικοί) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και πυροδοτούν ένα νόσημα αυτοάνοσου μηχανισμού, σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο, που εκφράζεται τελικά με φλεγμονώδεις και καταστρεπτικές εκδηλώσεις<sup>10</sup>.

Οι μελέτες των διάφορων πληθυσμών έδειξαν ότι υπάρχει ελαφρά αύξηση στη συχνότητα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας στους συγγενείς πρώτου βαθμού που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα, ειδικά όταν αυτοί είναι οροθετικοί στον ρευματοειδή παράγοντα. Το 5-10% των ασθενών αυτών έχουν οικογενειακό ιστορικό ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους δείχνουν επίσης μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου απ' ότι στους διζυγωτικούς. Επιπλέον, στους καυκάσιους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα το HLA-DR4 αντιγόνο ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη συχνότητα (60-70%) σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (20-25%) και ιδιαίτερα σε αυτούς με θετικό το ρευματοειδή παράγοντα. Η παρουσία αυτού του αντιγόνου αυξάνει το σχετικό κίνδυνο σε 4,7 για τους οροθετικούς και σε 2,4 για τους οροαρνητικούς ασθενείς. Ισχυρή επίσης συσχέτιση με την εμφάνιση και βαρύτητα της νόσου υπάρχει και με την έκφραση του HLA-DRI<sup>10</sup>.

Ωστόσο, η ύπαρξη του αυτοαντισώματος (IgM: ρευματοειδής παράγοντας) στον ορό των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα μαρτυρά ότι η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι κατά βάση αυτοάνοσο νόσημα. Στο 80% περίπου των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ανιχνεύονται αντισώματα (ρευματοειδείς παράγοντες) έναντι του Fc τμήματος της ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης. Άλλα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται ενίοτε στη ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι τα αντιπυρηνικά αντισώματα (40%), τα αντισώματα έναντι αρκετών τύπων κολλαγόνου και τα αντισώματα έναντι κερατίνης. Οι ιστολογικοί χαρακτήρες των αλλοιώσεων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, όπως είναι η ύπαρξη λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων και μακροφάγων ενισχύουν την άποψη ότι οι ανοσολογικές μεταβολές μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην αιτιολογία της νόσου. Οι διαταραχές της χυμικής ανοσίας φαίνονται από την αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων των ανοσοσφαιρινών. Οι περισσότεροι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν στο αίμα τους ρευματοειδή παράγοντα σε κάποια στάδια της



νόσου. Η νόσος μπορεί να μειώσει τη ζωή των ασθενών κατά 5-10 έτη. Παρόλο που οι άνδρες έχουν γενικά καλύτερη πρόγνωση απ' ό,τι οι γυναίκες, στους άνδρες η νόσος είναι συνήθως πιο βαριάς μορφής. Η εγκυμοσύνη προκαλεί ύφεση των συμπτωμάτων, ενδεχομένως λόγω της κατασταλτικής κυτταροκίνης IL-10, που παράγεται από τον πλακούντα. Η ύπαρξη του HLA-DR4 αντιγόνου σχετίζεται με την επιρρέπεια των ατόμων για την εμφάνιση της νόσου<sup>10</sup>.

### **1.2.2 Επιπολασμός της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας**

Ο επιπολασμός μιας ασθένειας δείχνει το σύνολο των ατόμων του πληθυσμού που έχουν την ασθένεια σε κάποια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συχνότητας μιας κατάστασης (πχ. ασθένειας) σε ένα πληθυσμό κάποια συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

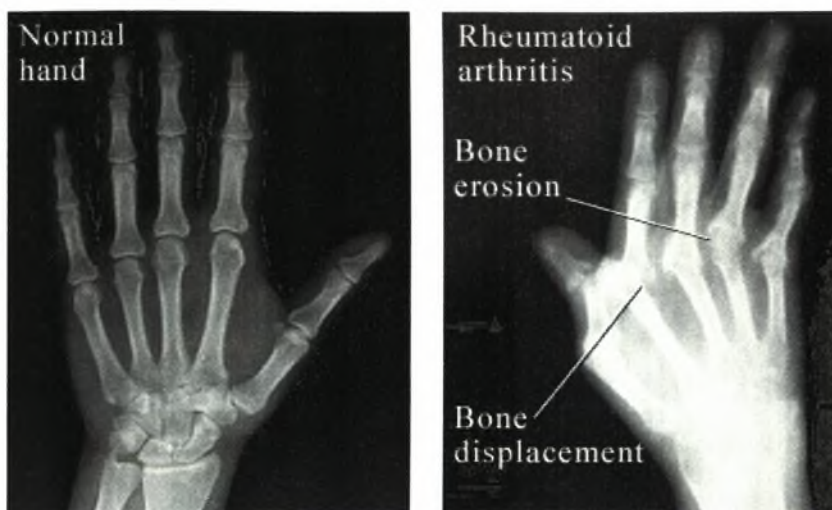
Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός της RA ποικίλει από 0,2 έως 1,0% σε ευρωπαϊκούς, νοτιοαμερικανικούς, ασιατικούς και αυστραλιανούς πληθυσμούς. Οι περισσότερες μελέτες στις ευρωπαϊκές χώρες κάνουν λόγο για επιπολασμό της RA που κυμαίνεται από το 0,5-1.0%. Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες στις νότιες ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας, ο επιπολασμός έχει υπολογιστεί χαμηλότερα, 0,18- 0,34%. Αυτό οδήγησε τους επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι πιθανώς εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, περιβαλλοντικοί και/ή γενετικοί για την αιτιολογία της RA<sup>12</sup>. Ο επιπολασμός της RA στους Καυκάσιους των αναπτυγμένων χωρών (ΗΠΑ, Ευρώπη) κυμαίνεται στο 0,5-1%<sup>13</sup>. Σε έρευνα με ερωτηματολόγια (3928 άτομα) και αναδρομή σε ιατρικά αρχεία στο Halmstad της Σουηδίας, ο επιπολασμός της RA ήταν 0,51%<sup>14</sup>. Στην Ουγγαρία, σε αντιπροσωπευτικό δείγμα 10000 ατόμων ηλικίας 14-65 ετών, υπολογίστηκε στο 0,37% (0,23% στους άνδρες και 0,48% στις γυναίκες)<sup>15</sup>, ενώ σε χώρες της νότιας Ευρώπης είναι 0,5-1%. Στην Ισπανία, ο επιπολασμός υπολογίστηκε σε 0,3-0,5% του αστικού και αγροτικού πληθυσμού και αναλογία γυναικών : ανδρών 4:1<sup>16</sup>. Στην Ιταλία, σε έρευνα πληθυσμού 4456 ατόμων με ερωτηματολόγια και ιατρικούς φακέλους, ο επιπολασμός της RA ήταν 0,33% (0,13 % στους άνδρες και 0,51% στις γυναίκες) το 1991-92<sup>17</sup>. Σε μία μελέτη στο νομό Μαγνησίας, ο επιπολασμός της RA

υπολογίστηκε σε 0,58%<sup>18</sup> και είναι μεταξύ του ποσοστού (0,35%) που βρέθηκε σε αναδρομική μελέτη<sup>19</sup> και του ποσοστού (0,67%) μιας ανεξάρτητης διεξοδικής μελέτης στην Ελλάδα<sup>12</sup>.

### **1.2.3 Παθολογική ανατομία της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας**

Τα παθολογοανατομικά ευρήματα της νόσου παρατηρούνται κυρίως στις προσβαλλόμενες αρθρώσεις (Εικόνα 1) και σε εξωαρθρικές εκδηλώσεις της νόσου, όπως πχ. στα ρευματοειδή οζίδια. Η προσβολή των υμενικών αρθρώσεων (διαρθρώσεων) αφορά το αρθρικό υγρό και τον αρθρικό υμένα. Παρατηρείται αύξηση της ποσότητας και της συγκέντρωσης των κυττάρων (κυτταροβρίθειας) του αρθρικού υγρού. Τα κύτταρα που επικρατούν στο αρθρικό υγρό είναι κυρίως τα πολυμορφοπύρρηνα και μονοκύτταρα, ενώ σε μικρότερη αναλογία τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τον αρθρικό υμένα, αλλά ο μηχανισμός μεταφοράς τους από τον υμένα στο υγρό δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως<sup>10</sup>. Εκτός από τις αρθρώσεις, η ΡΑ μπορεί να προσβάλει και άλλα όργανα, να παρουσιάσει δηλαδή διάφορες εξωαρθρικές εκδηλώσεις. Οι συνηθέστερες κατά σειρά συχνότητας είναι: αναιμία, υποδόρια ρευματοειδή οζίδια, σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, σύνδρομο Sjögren, σκληρίτιδα, διάμεση πνευμονική ίνωση, πλευρίτιδα, και αγγειίτιδα<sup>20</sup>. Τα ρευματοειδή οζίδια είναι κυρίως υποδόρια, δεν συμφύονται με το δέρμα ή με τα υποκείμενα μόρια και εντοπίζονται σε θέσεις που ασκείται πίεση<sup>10,20</sup>. Ωστόσο, μπορεί να εντοπιστούν και σε άλλους ιστούς όπως στην καρδιά, στους πνεύμονες, στη γαστρεντερική οδό, στη σκληρή μήνιγγα ή στις φωνητικές χορδές. Τα ρευματοειδή οζίδια εμφανίζονται συνήθως σε ασθενείς με οροθετική ΡΑ<sup>10</sup>.





Εικόνα 1: Συγκριτικές φωτογραφίες ακτίνων Χ στο άνω άκρο ενός φυσιολογικού και ασθενούς ατόμου<sup>21</sup>

#### 1.2.4 Διάγνωση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η διάγνωση της PA στις τυπικές και προχωρημένες μορφές της είναι εύκολη και βασίζεται κυρίως στην κλινική εικόνα. Στα πρώιμα όμως στάδια, η επιβεβαίωση της νόσου μπορεί να είναι δύσκολη, επειδή η εξέλιξη της ασθένειας διαφέρει μεταξύ των ασθενών. Για την ταξινόμηση και διάγνωση της PA χρησιμοποιούνται τα αναθεωρημένα το 1987 διαγνωστικά κριτήρια της Αμερικάνικης Ρευματολογικής Εταιρείας (American College of Rheumatology). Η ανάλυση του αρθρικού υγρού ή/και η βιοψία του αρθρικού υμένα ενισχύει τα αποτελέσματα, ώστε να είναι πιο αξιόπιστα<sup>10</sup>.

Αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια ταξινόμησης της PA (1987):

1. Πρωινή δυσκαμψία διάρκειας τουλάχιστον μιας ώρας
2. Αρθρίτιδα με διόγκωση ταυτόχρονα σε τρεις 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

Για την ταξινόμηση και διάγνωση της PA απαιτείται η ύπαρξη τουλάχιστον 4 από τα 7 κριτήρια<sup>22</sup>.

### 1.2.5 Αξιολόγηση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Τα συμπτώματα της PA ποικίλουν μεταξύ των διαφορετικών περιστατικών. Κάποιοι ασθενείς αναφέρουν απλώς ενοχλήσεις στις αρθρώσεις, πόνους ή πρήξιμο, ενώ άλλοι αναφέρουν κόπωση σε μεγάλο βαθμό και απώλεια της γενικής υγείας. Λόγω αυτής της ποικιλίας των συμπτωμάτων κατά την έκφραση της ασθένειας έχουν επιλεγθεί κάποιες συγκεκριμένες μεταβλητές για να εκτιμάται η κατάσταση του κάθε ασθενή με PA, όσων αφορά την έκταση και την ενεργότητα της ασθένειας. Αναπτύχθηκε, λοιπόν, ο δείκτης **DAS (Disease Activity Score)** ώστε να είναι πιο έγκυρη η διάγνωση της PA<sup>23</sup>. Ο δείκτης DAS βασίζεται σε ένα πρότυπο της ενεργότητας της PA και συνδυάζει πληροφορίες, από τις πρησμένες και προσβεβλημένες αρθρώσεις, την οξεία φάση απάντησης, τον ρυθμό καθίζησης των ερυθροκυττάρων και την συνολική υγεία του ατόμου, σε ένα συνεχή δείκτη της ρευματοειδούς φλεγμονής για να διαχωριστούν οι ασθενείς σε αυτούς με χαμηλή, μέτρια ή υψηλή ενεργότητα της ασθένειας<sup>23</sup>.

Ο δείκτης DAS μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τα κριτήρια EULAR. Τα EULAR κριτήρια ανταπόκρισης χρησιμοποιούν την έκταση μεταβολή στον δείκτη DAS που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα έτσι ώστε το επίπεδο του δείκτη να ταξινομεί τους ασθενείς σε αυτούς με καλή (good), μέτρια (moderate) ή μη καλή ανταπόκριση στη θεραπεία (non- responders).

Ο δείκτης DAS28 μοιάζει αρκετά με τον δείκτη DAS. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι ο δείκτης DAS28 αναφέρεται μόνο σε 28 αρθρώσεις και γίνεται αποτίμηση της κατάστασης αυτών των 28 αρθρώσεων σε μία κλίμακα από το 0-28. Επιπλέον, μετράται ο ρυθμός καθίζησης των ερυθροκυττάρων (ESR), και εκτιμάται η συνολική υγεία του ασθενή σε μία κλίμακα από το 0-100<sup>23,24</sup>. Η χρήση του DAS28 είναι πιο εύκολη από τον δείκτη DAS διότι αναφέρεται σε μία συνεχή κλίμακα που

κυμαίνεται από 0 έως το 9.4 και συνήθως ανταποκρίνεται σε μία κατανομή κατά Gauss στους πληθυσμούς με RA. Το επίπεδο ενεργότητας της ασθένειας μπορεί να ερμηνευθεί με βάση αυτόν τον δείκτη ως χαμηλό ( $DAS28 \leq 3.2$ ), μέτριο ( $3.2 < DAS28 \leq 5.1$ ) ή υψηλό ( $DAS28 > 5.1$ ). Εάν ο δείκτης DAS28 είναι μικρότερος του 2.6 τότε πιθανώς η RA στον συγκεκριμένο ασθενή να βρίσκεται σε ύφεση. Ωστόσο, δεν βρίσκονται σε ύφεση όλοι οι ασθενείς που έχουν δείκτη μικρότερο του 2.6, ενώ μία μεταβολή της τάξης του 1.2 στον δείκτη σε έναν ασθενή θεωρείται αρκετά σημαντική αλλαγή<sup>23</sup>. Ο δείκτης DAS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η υποχώρηση της ασθένειας ή να γίνει εκτίμηση της ενεργότητας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μετά τη χορήγηση DMARDs φαρμάκων ή βιολογικών φαρμάκων. Σε κάθε ασθενή ελέγχεται το DAS score πριν τη χορήγηση κάποιου φαρμάκου και στη συνέχεια ο έλεγχος επαναλαμβάνεται στους 3 μήνες, στους 6 μήνες κ.ο.κ. μετά τη χορήγηση κάποιου φαρμάκου. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί εάν η θεραπεία βελτιώνει την κατάσταση του ασθενή ή όχι. Αν και ο δείκτης DAS είναι αρκετά χρήσιμος για την επιλογή ή την τροποποίηση της θεραπείας δε θα πρέπει να αγνοείται η προσεκτική εξέταση του ασθενή<sup>23</sup>.

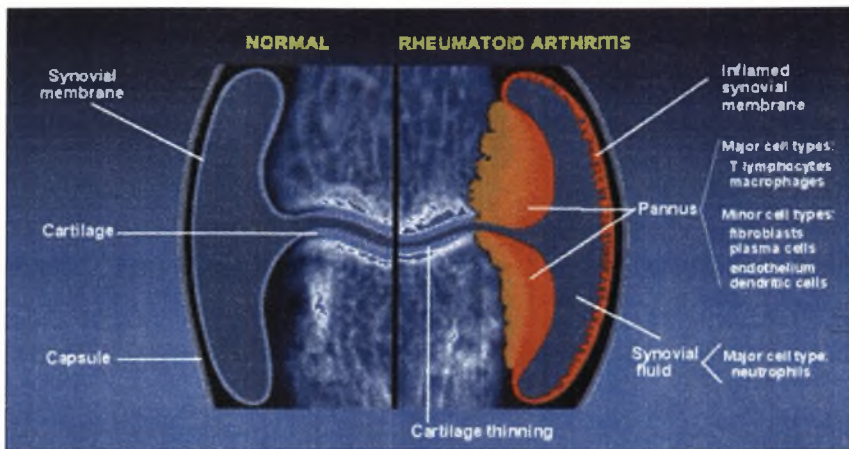
Σ' αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάποιες κλινικές δοκιμές ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο τα κριτήρια του American College of Rheumatology, γνωστά ως ACR κριτήρια, για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα των διάφορων θεραπειών ή για να συγκριθούν οι κλινικές δοκιμές μεταξύ τους. Τα ACR κριτήρια αναφέρονται ως ACR 20, ACR 50 και ACR 70 και μετρούν την βελτίωση στις προσβεβλημένες ή πρησμένες αρθρώσεις καθώς επίσης και τη βελτίωση σε τουλάχιστον τρεις από τις παρακάτω πέντε παραμέτρους:

- οξεία φάση αντίδρασης (πχ. ρυθμός καθίζησης)
- συνολική αξιολόγηση του ασθενή
- φυσιολογική εκτίμηση του ασθενή
- επίπεδο πόνου των αρθρώσεων
- Health Assessment Questionnaire (HAQ)<sup>25</sup>

Το HAQ δημοσιεύτηκε πρώτη φορά το 1980 και είναι από τα πρώτα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ασθενών. Το HAQ βασίζεται σε πέντε παραμέτρους: ανικανότητα, πόνο, συνέπειες της φαρμακευτικής θεραπείας, κόστος και θνησιμότητα<sup>25</sup>. Έτσι, μετά από κλινικές δοκιμές αναφέρεται το ποσοστό των συμμετεχόντων που πέτυχαν ACR 20, ACR 50, και ACR 70. Για παράδειγμα, εάν σε μία μελέτη αναφέρεται ότι 55% των ασθενών πέτυχαν ACR 20, σημαίνει ότι 55% των ασθενών πέτυχαν 20% βελτίωση στις προσβεβλημένες ή στις πρησμένες αρθρώσεις, καθώς επίσης και 20% βελτίωση σε τρία από πέντε κριτήρια<sup>26</sup>. Παρά την εκτεταμένη χρήση των δεικτών αυτών στις κλινικές μελέτες, η καθημερινή κλινική πράξη στηρίζεται στην χρήση του DAS28, η συστηματική καταγραφή του οποίου εξασφαλίζει την απρόσκοπτη παρακολούθηση του ασθενούς.

### **1.2.6 Αιτιολογία της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας**

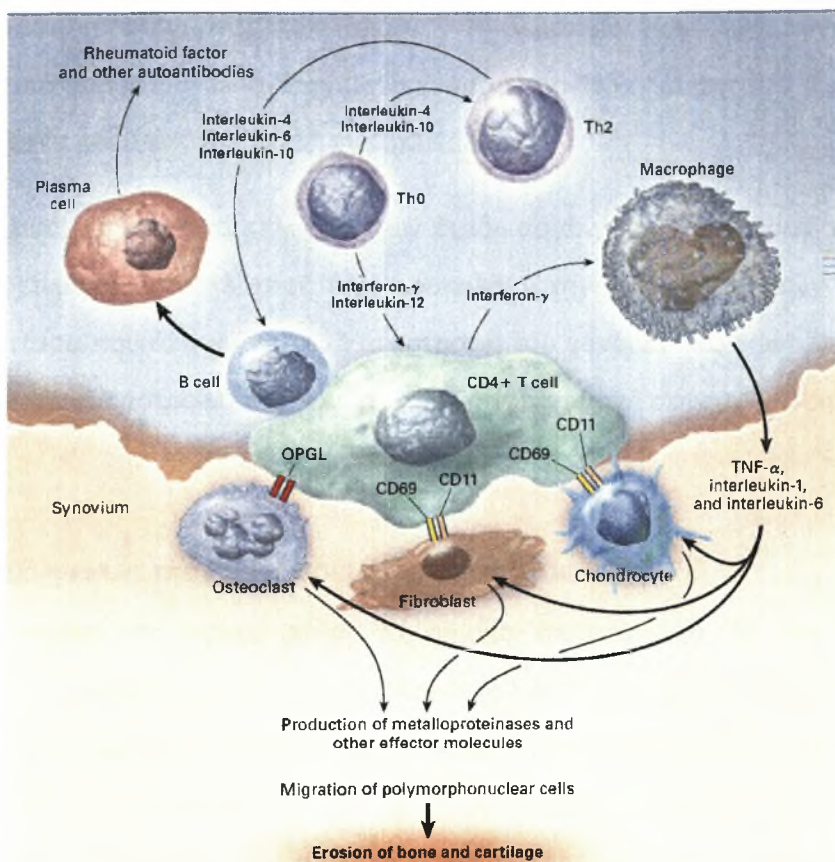
Η RA είναι μία φλεγμονώδης ασθένεια που οφείλεται σε διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η φλεγμονή είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό της ασθένειας διότι οδηγεί στη δημιουργία χόνδρων και στην καταστροφή του οστού<sup>8</sup>. Η φλεγμονή είναι αποτέλεσμα της δράσης κυτταροκινών και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών στα αιμοφόρα αγγεία. Η συσσώρευση των λευκοκυττάρων στο σημείο της λοίμωξης με τη συνακόλουθη αγγειοδιαστολή και αυξημένη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων οδηγεί στην αυξημένη ροή αίματος στα σημεία αυτά και προκαλεί την ερυθρότητα και το πρήξιμο που παρατηρείται τοπικά<sup>27,28</sup> (Εικόνα 2). Έχουν γίνει πολλές έρευνες για την αιτιολογία της παθογένειας της RA καθώς επίσης και για τη ρόλο των κυτταροκινών, διότι παρατηρήθηκε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) στα σημεία της φλεγμονής ήταν χαρακτηριστικό της ασθένειας. Επιπλέον, η απομάκρυνση της περίσσειας του TNFα από αυτά τα σημεία βελτίωνε σημαντικά την κατάσταση του ασθενή<sup>8</sup>. Ακόμη, διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν μεγάλες συγκεντρώσεις TNFα ανέπτυξαν αρθρίτιδα που ήταν ιστολογικά και κλινικά ίδια με τη RA<sup>29</sup>. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ο TNFα να γίνει ο θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της RA<sup>30,31</sup>.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση μιας φυσιολογικής και μιας ασθενούς άρθρωσης<sup>32</sup>

Οι κυτταροκίνες όπως είναι ο TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) και η IL-1 έχει αποδειχτεί ότι είναι σημαντικοί μεσολαβητές της φλεγμονής και της καταστροφής των αρθρώσεων στη ΡΑ<sup>33</sup>. Ο TNF $\alpha$  παράγεται πρωταρχικά από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα, και εμπλέκεται στην φλεγμονή και στην αποικοδόμηση κυτταρικού δικτύου στην άρθρωση. Επιπλέον, ο TNF $\alpha$  προάγει την παραγωγή άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης που θα ελκύουν τα λευκοκύτταρα στις προσβεβλημένες αρθρώσεις (αυξημένη διήθηση κυττάρων) και αυξάνει το ρυθμό σύνθεσης των μεταλλοπρωτεασών από τα μακροφάγα των αρθρώσεων, τους ινοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα χονδροκύτταρα. Ακόμη παρεμποδίζει την σύνθεση πρωτεογλυκανών στον χόνδρο<sup>34</sup> και η σύνθεση των μεταλλοπρωτεασών οδηγεί στην καταστροφή του αρθρικού χόνδρου (Εικόνα 3). Η αύξηση του VEGF προκαλεί την αυξημένη αγγειογένεση που παρατηρείται στις φλεγμονές και κατά συνέπεια την συνάθροιση των λευκοκυττάρων. Τέλος, στα ηπατοκύτταρα, η διέγερση της οξείας φάσης ανταπόκρισης οδηγεί σε αύξηση της ενεργούς πρωτεΐνης C (CRP) και άλλων μεσολαβητών.





Εικόνα 3: Μονοπάτια σηματοδότησης των κυτταροκινών που εμπλέκονται στη φλεγμονή της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας<sup>34</sup>

Ο TNFα δεν είναι συνήθως ανιχνεύσιμος σε υγιή άτομα αλλά αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό και σε ιστούς απαντώνται σε φλεγμονώδεις και μολυσματικές καταστάσεις. Τα επίπεδα του ορού σχετίζονται με τη σοβαρότητα των μολύνσεων<sup>35</sup>. Οι περισσότερες από τις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου του TNFα και της IL-1, ανιχνεύονται στο αρθρικό υγρό των ασθενών με ΡΑ<sup>34</sup>. Οι συγκεντρώσεις του sTNFR1 και του sTNFR2 είναι αυξημένες στον ορό ασθενών με ΡΑ και είναι καλοί δείκτες της ενεργότητας της ασθένειας<sup>8</sup>.

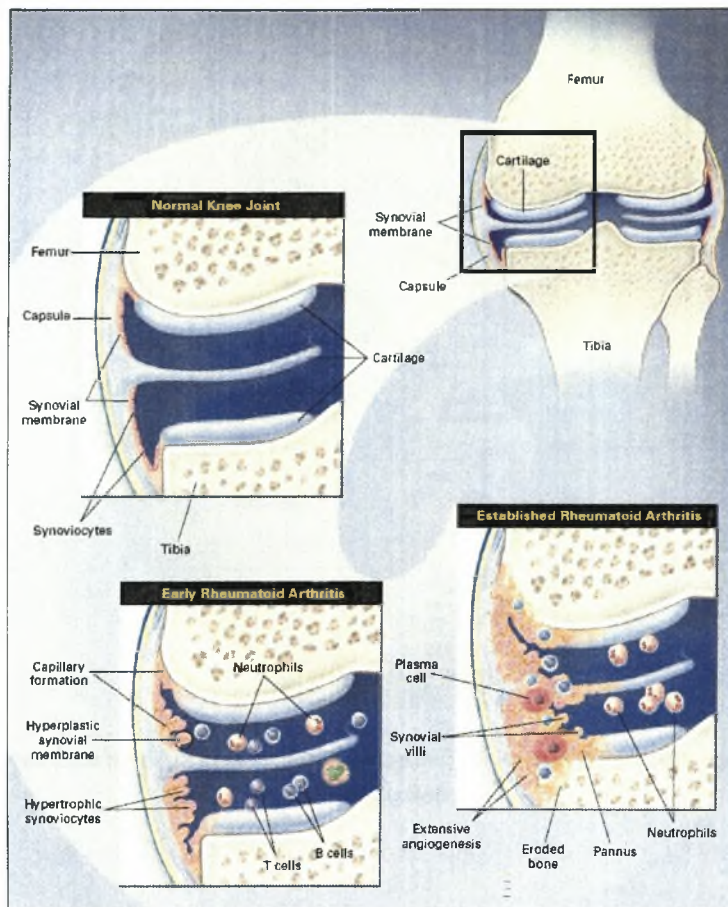
Πολλά είναι τα κύτταρα που παράγουν τον TNFα, συμπεριλαμβανομένου τα βασεόφιλα κύτταρα, τα Τ και Β λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά (NK - natural killer), τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία και καρδιακά μυϊκά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τους οστεοκλάστες<sup>36</sup>. Αποτελέσματα από διάφορες

μελέτες σε πειραματικά μοντέλα προτείνουν ότι και η IL-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση φλεγμονής των ιστών<sup>33</sup>. Η θεραπεία μοντέλων ποντικών που έπασχαν από αρθρίτιδα, με αντισώματα ενάντια του TNFα και της IL-1 ή με διαλυτό TNF υποδοχέα έδειξαν ότι η ασθένεια βελτιώθηκε<sup>37</sup>.

Τελικά, τα κύτταρα τελεστές των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στην άρθρωση είναι οι οστεοκλάστες που προκαλούν την καταστροφή των οστών, τα χονδροκύτταρα που οδηγούν στην καταστροφή του χόνδρου και οι ινοβλάστες που προωθούν την καταστροφή του χόνδρου και την φλεγμονή στην άρθρωση<sup>38</sup>.

### **1.2.7 Παθογένεια της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας**

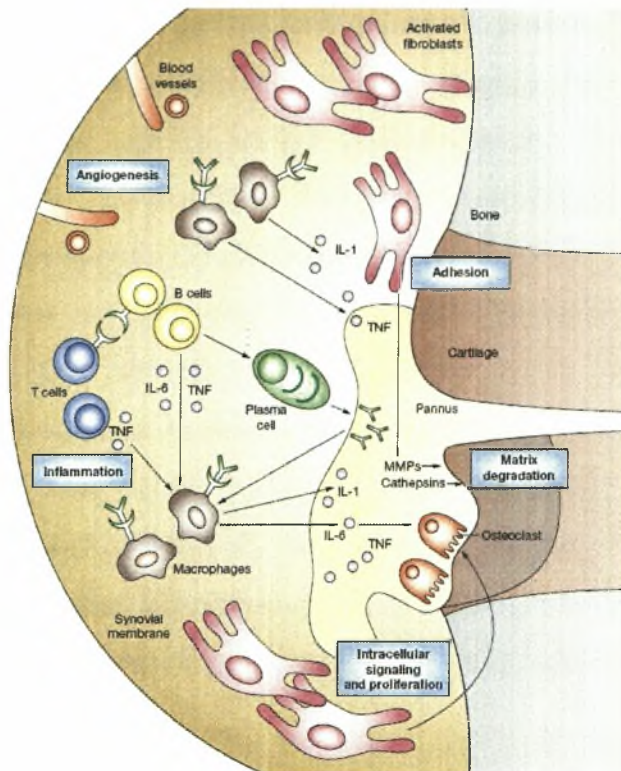
Οι αρθρώσεις γενικά είναι το σημείο όπου ενώνονται δύο οστά. Οι διαρθρώσεις αποτελούν το συνηθέστερο είδος αρθρώσεων στον άνθρωπο, συνδέουν δύο μεγάλα γειτονικά οστά μεταξύ τους κατά τέτοιο τρόπο ώστε να εξυπηρετείται η λειτουργικότητα του αντίστοιχου μέρους του σώματος, πχ. άρθρωση του γόνατου. Η σύνδεση μεταξύ των δύο οστών συγκρατείται από συνδέσμους και ένα θύλακα συνδετικού ιστού. Ο θύλακας περικλείει την αρθρική κοιλότητα που περιέχει το αρθρικό υγρό, που είναι απαραίτητο για την λίπανση (lubrication) των αρθρώσεων και την παροχή των απαραίτητων συστατικών και οξυγόνου στο χόνδρο<sup>39</sup>. Η αρθρική μεμβράνη είναι το εσωτερικό στρώμα του αρθρικού θύλακα και αποτελείται από συνήθως από μία ή δύο σειρές κυττάρων, και επίσης από χαλαρό συνδετικό ιστό. Τα κύτταρα που επικρατούν στην μεμβράνη σχηματίζουν δύο στρώματα κυττάρων. Το ένα στρώμα αποτελείται από κύτταρα τύπου A – μακροφάγα (τύπου A αρθροκύτταρα) και τύπου B – ινοβλάστες (τύπου B αρθροκύτταρα)<sup>34</sup>. Τα κύτταρα τύπου A έχουν την ικανότητα της φαγοκυττάρωσης και είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών από το αρθρικό υγρό. Τα τύπου B παράγουν ουσίες απαραίτητες για το αρθρικό υγρό, πχ. υαλουρονικό οξύ<sup>40</sup> (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας<sup>34</sup>

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι το αποτέλεσμα της διέγερσης πολλών διαφορετικών ανοσοποιητικών κυττάρων λόγω της διατάραξης της ισορροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Πέντε είναι οι παράγοντες που εμπλέκονται στην καταστροφή της άρθρωσης σε ασθενείς με ΡΑ. Η ενδοκυτταρική σηματοδότηση και πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η αποικοδόμηση του κυτταρικού δικτύου. Οι παράγοντες αυτοί μαζί με διάφορα μόρια τελεστές όπως είναι ο TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 και ένζυμα που αποδιατάσσουν το κυτταρικό δίκτυο, συμπεριλαμβανομένου MMP, και καθεψίνες, και τα προϊόντα τους βρίσκονται σε συνεχή παραγωγή συντελώντας τελικά στην καταστροφή της άρθρωσης<sup>41</sup> (Εικόνα 5).





Εικόνα 5: Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην καταστροφή της άρθρωσης στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα<sup>41</sup>

Ο TNFα παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (από τα Τ κύτταρα) στη φλεγμονώδη αρθρική μεμβράνη των ασθενών με ΡΑ. Ο TNFα έχει την ιδιότητα να προάγει την παραγωγή άλλων προφλεγμονώδων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-1, IL-6, καθώς επίσης και να προάγει την παραγωγή και απελευθέρωση των χημειοκινών που προσελκύουν τα λευκοκύτταρα από το αίμα στο φλεγμονώδη ιστό. Η διαδικασία διευκολύνεται με την υπερρύθμιση των εντεγκρινών και των μορίων προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένου της E-σελεκτίνης και του VCAM-1, στο ενδοθήλιο. Η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και του οστού ξεκινά με την δράση πρωτεολυτικών και MMP ενζύμων και τελικά, η έναρξη της απορροφητικής ικανότητας των οστεοκλαστών καταστρέφει το κόκκαλο<sup>42</sup>.

Στα αρχικά στάδια της ασθένειας, η αρθρική μεμβράνη λεπταίνει εξαιτίας υπερπλασίας και υπερτροφίας των κυττάρων της άρθρωσης. Ένα εκτεταμένο δίκτυο νέων αιμοφόρων αγγείων σχηματίζεται στην άρθρωση. Τα Τ κύτταρα (κυρίως

τα CD4+) και τα Β κύτταρα (μερικά από τα οποία γίνονται πλασματοκύτταρα) διεισδύουν στην αρθρική μεμβράνη. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται επίσης στο αρθρικό υγρό μαζί με μεγάλο αριθμό ουδετερόφιλων. Συγκεκριμένα, τα Τ ενεργοποιημένα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα διεγείρουν τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τους αρθρικούς ινοβλάστες να παράγουν τις κυτταροκίνες IL-1, IL-6 και TNFα<sup>31</sup>, οι οποίες αυξάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και την παραγωγή κυτταροκινών<sup>34,43</sup>. Σαν αποτέλεσμα, ο αρθρικός ιστός κατακλύζεται από μακροφάγα, ινοβλάστες και ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται από ένα λεπτό στρώμα σε ένα επιθετικό, φλεγμονώδη και πολλαπλασιαζόμενο ιστό, τον πάννο<sup>44</sup>. Ο ιστός αυτός εισβάλλει και καταστρέφει τον χόνδρο και το κόκκαλο που βρίσκονται κοντά σε αυτόν. Ο πάννος αποτελείται από τύπου Α αρθροκύτταρα, τύπου Β αρθροκύτταρα και πλασματοκύτταρα<sup>34</sup>.

Η υπεραϊμία στον ιστό είναι από τα πρώτα χαρακτηριστικά στάδια του καταρράκτη της φλεγμονώδους αντίδρασης<sup>40</sup>. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες, καθώς επίσης και τα προϊόντα τους μπορούν να προκαλέσουν αγγειογένεση, η οποία εξηγεί την αυξημένη αγγειίτιδα που απαντάται στις αρθρώσεις ασθενών με ΡΑ<sup>34</sup>. Έτσι δημιουργείται ένα νέο αγγειακό δίκτυο, που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των κυττάρων και των απαραίτητων συστατικών στον επιθετικό πάννο<sup>45</sup>. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην άρθρωση ενεργοποιούνται, από κυτταροκίνες, πχ. TNFα, IL-1, IL-8 και VEGF<sup>46</sup> και εκφράζουν μόρια προσκόλλησης που προωθούν την στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων στην άρθρωση, συγκεκριμένα των ουδετερόφιλων. Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ελασάση και πρωτεάσες που αποικοδομούν τις πρωτεογλυκάνες στο επιφανειακό στρώμα του χόνδρου<sup>47</sup>. Η μείωση των πρωτεογλυκάνων δίνει τη δυνατότητα στα ανοσοσυμπλέγματα να κατακρημνίζονται στο επιφανειακό στρώμα των κολλαγόνων με αποτέλεσμα να εκτίθενται τα χονδροκύτταρα<sup>48</sup>. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πρηξίματος και πόνου στην άρθρωση και αυτό εκτείνεται και καταστρέφει τον χόνδρο και το οστό σταδιακά.

Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, όταν διεγείρονται από την IL-1, τον TNFα ή από ενεργοποιημένα CD4+ Τ κύτταρα, οι ινοβλάστες των άρθρωσης και τα μακροφάγα απελευθερώνουν MMP που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση

των συστατικών του εξωκυτταρικού δικτύου. Οι μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάρου πλέγματος και συγκεκριμένα η stromelysin και οι κολλαγενάσες είναι ένζυμα που αποικοδομούν τον συνδετικό ιστό του κυτταρικού δικτύου και θεωρείται ότι είναι οι κύριοι μεσολαβητές στην καταστροφή της άρθρωσης στην PA μέσω της εκφύλισης της εξωκυττάριας ουσίας<sup>34</sup>. Υπάρχουν τουλάχιστον 19 ανθρώπινες MMP, με την MMP1 (κολλαγενάσες) και MMP3 (stromelysins) να σχετίζονται περισσότερο με τη PA<sup>49</sup>. Ο TNFα και η IL-1 είναι ενδεχόμενοι διεγέρτες των μεσενχυματικών κυττάρων (αρθρικοί ινοβλάστες, οστεοκλάστες και χονδροκύτταρα) που με τη σειρά τους απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεάσες που καταστρέφουν τον ιστό<sup>50</sup>. Έτσι, υπερρυθμίζουν την έκφραση της RANKL στους αρθρικούς ινοβλάστες και στα T κύτταρα, είτε είναι στη διαμεμβρανική είτε στη διαλυτή της μορφή. Η RANKL παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, ενεργοποιώντας την RANK στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από την οστεοπρωτεγερίνη (OPG), η οποία είναι ένας διαλυτός (decoy) ανταγωνιστικός υποδοχέας που εκκρίνεται από τα ίδια κύτταρα, συναγωνίζεται την RANKL για τον υποδοχέα RANK και εμποδίζοντας τη σύνδεση RANKL – RANK, αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών<sup>51,52</sup>. Η IL-1 και ο TNFα αναχαιτίζουν την παραγωγή των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών στους αρθρικούς ινοβλάστες. Αυτές οι δράσεις οδηγούν στην καταστροφή της άρθρωσης. Ίσως προάγοντας την παραγωγή της IL-11, ο TNFα να διεγείρει την ανάπτυξη των οστεοκλαστών που είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή του οστού<sup>53</sup>. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην καταστροφή των αρθρώσεων και του χόνδρου. Τέτοιου είδους ενεργοποιημένα T κύτταρα προκάλεσαν καταστροφή των αρθρώσεων σε ζωικά μοντέλα με PA<sup>54</sup>.

Στην εγκατεστημένη PA, η φλεγμονή είναι εκτεταμένη και ο σχηματισμός της ίνωσης και της διάβρωσης οδηγεί στην μείωση του κενού στην άρθρωση και στην σταδιακή ακινητοποίησή της<sup>55</sup>. Η ατροφία του οστού λόγω της απόφραξης των αγγείων από υπερτραφή ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια και φλεγμονώδη κύτταρα διαταράσσει την συνάρθρωση των δύο οστών, προκαλώντας μυϊκή δυστροφία και μερικές εξάρθρωσεις. Τελικά, ο ιστός ασβεστοποιείται με αποτέλεσμα να παρατηρείται αγκύλωση και ολική ακινησία<sup>40</sup>.

### 1.3 Θεραπεία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, η θεραπεία της ΡΑ παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της πληθώρας των κυττάρων και μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος που λαμβάνουν μέρος στη φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στις αρθρώσεις. Σε κάθε ασθενή με ΡΑ, παρόλο που τα χαρακτηριστικά της ασθένειας είναι παρόμοια, η παθογένεια της ασθένειας μπορεί να είναι διαφορετική λόγω ενεργοποίησης των φλεγμονωδών μονοπατιών με διαφορετικό τρόπο<sup>56</sup>. Με σωστή και έγκαιρη αγωγή η ΡΑ μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά, αλλά για την ώρα δεν υπάρχει μόνιμη ίαση<sup>20</sup>. Σκοπός της θεραπευτικής αγωγής είναι η ύφεση του πόνου και της δυσκαμψίας, η μείωση της φλεγμονής, η διατήρηση και αποκατάσταση της λειτουργικότητας των αρθρώσεων, η πρόληψη των παραμορφώσεων και η παρεμπόδιση της καταστροφής των ιστών (χόνδρων, οστών, τενόντων κλπ). Τελικός στόχος είναι η πλήρης ύφεση της νόσου<sup>10,20</sup>.

Η φαρμακευτική αγωγή είναι κατά κάποιο τρόπο εμπειρική και κατευθύνεται στη μη ειδική καταστολή της φλεγμονώδους επεξεργασίας. Τα φάρμακα δρουν είτε συμπτωματικά (αναλγητικά, ΜΣΑΦ, κορτικοστεροειδή) ή τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (πχ. ανθελονοσιακά, σουλφασαλαζίνη, άλατα χρυσού, D- πενικιλλαμίνη, αζαθειοπρίνη, μεθοτρεξάτη, λεφλουνομίδη, κυκλοσπορίνη, βιολογικοί παράγοντες)<sup>10</sup>.

#### 1.3.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ)

Τα φάρμακα αυτά, συμπεριλαμβανομένων των σαλικυλικών, δρουν αμέσως και έχουν αναλγητικές, αντιπυρετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, με αποτέλεσμα την ελάττωση του πόνου, της δυσκαμψίας, του οιδήματος και γενικά της αρθρικής φλεγμονής. Ωστόσο, δεν προλαμβάνουν την καταστροφή του ιστού ή την εξέλιξη της νόσου, ούτε και περιορίζουν πλήρως τα σημεία και τα συμπτώματα αυτής και γι' αυτό θα πρέπει να διακόπτονται στους ασυμπτωματικούς ασθενείς. Οι

κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες των ΜΣΑΦ παρουσιάζονται συνήθως στο δέρμα (αντιδράσεις υπερευαισθησίας), στο γαστρεντερικό σωλήνα, στα νεφρά με κατακράτηση νατρίου και ύδατος. Σπανιότερα εμφανίζονται προβλήματα στο ήπαρ και το αιμοποιητικό σύστημα<sup>10</sup>.

### **1.3.2 Κορτικοστεροειδή**

Χορηγούνται σε συνδυασμό με ένα άλλο τροποποιητικό της νόσου φάρμακο στους ασθενείς με ενεργό νόσο. Έχουν άμεση αντιφλεγμονώδη δράση και ενδεχομένως επιβραδύνουν την οστική καταστροφή. Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η αύξηση του σωματικού βάρους και το πανσεληνοειδές προσώπιο, ο καταρράκτης, η οστεοπόρωση, η μυοπάθεια και η οστεονέκρωση<sup>10</sup>.

### **1.3.3 Φάρμακα που τροποποιούν την εξέλιξη της νόσου (DMARD)**

Τα φάρμακα αυτά πιστεύεται ότι αναστέλλουν ή επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου ή προκαλούν ύφεση. Το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα εμφανίζεται μετά από το πρώτο μήνα της χορήγησής τους.

**Ανθελανοσιακά:** Συνιστώνται για πρώιμη, ήπια και/ή οροαρνητική νόσο και είναι εύκολα στη χρήση. Ανταπόκριση στη θεραπεία παρουσιάζει μόνο το 25-50% των ασθενών, μερικοί δε από αυτούς μετά από 3 – 6 μήνες. Ο μηχανισμός δράσης των ανθελανοσιακών φαρμάκων αποδίδεται κυρίως στη δέσμευση και μετουσίωση των πρωτεϊνών του πλάσματος, στην αναστολή της RNA/DNA πολυμεράσης και στην παρέμβασή τους στη λειτουργία των λυσοσωματίων (σταθεροποίηση μεμβρανών). Η κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η αμφιβληστροειδοπάθεια, που μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμη μείωση της όρασης. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η μυοπάθεια και η νευροπάθεια των σκελετικών μυών και του καρδιακού μυός, οι οποίες συνήθως βελτιώνονται μετά από διακοπή του φαρμάκου<sup>10</sup>.

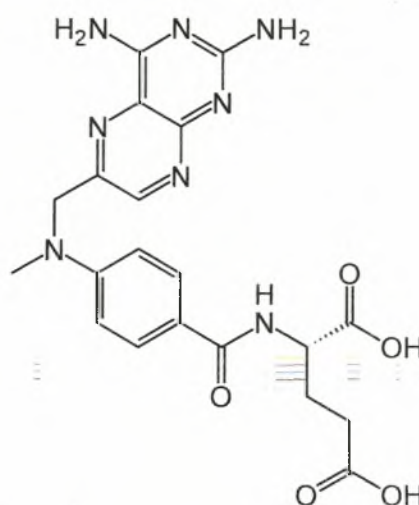
**Σουλφασαλαζίνη:** Είναι σύνθετη χημική ένωση που αποτελείται από το αντιβιοτικό σουλφαπυριδίνη και το ΜΣΑΦ 5-αμινοσαλικυλικό οξύ. Οι συχνότερες



ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ναυτία και τα δυσπεπτικά ενοχλήματα. Δερματικά εξανθήματα και ουδετεροπενία σπάνια παρατηρούνται, ενώ αιμολυτική αναιμία μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με έλλειψη του ενζύμου G-6PD. Συχνά χορηγείται σε συνδυασμό με υδροξυχλωροκίνη και μεθοτρεξάτη<sup>10</sup>.

**Αζαθειοπρίνη:** Είναι αντιμεταβολίτης ανάλογος της πουρίνης με κυτταροστατικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Η πιο συχνή παρενέργεια είναι η ναυτία και σπανιότερα η καταστολή του μυελού, η διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας και οι ευκαιριακές λοιμώξεις. Σήμερα έχει αντικατασταθεί από τη μεθοτρεξάτη<sup>10</sup>.

**Μεθοτρεξάτη:** Είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος και αναστέλλει τη σύνθεση του DNA<sup>10</sup> (Εικόνα 6). Χρησιμοποιείται είτε σε συνδυασμό με κάποιο άλλο φάρμακο είτε μόνο του. Αποτελεί από τα πρώτης επιλογής φάρμακα για την βελτίωση της κατάστασης των ασθενών<sup>58</sup>. Συνιστάται για ασθενείς με βαριάς μορφής νεοδιαγνωσθείσα νόσο. Η θεραπευτική της δράση εμφανίζεται συνήθως μετά από 4-10 εβδομάδες. Το 60-70% των ασθενών εμφανίζει βελτίωση. Συχνά συνδυάζεται και με άλλα



Εικόνα 6: Χημικός τύπος της μεθοτρεξάτης<sup>57</sup>

τροποποιητικά της νόσου φάρμακα, όπως πχ. οι ανταγωνιστές του TNFα ή τα κορτικοστεροειδή. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ναυτία, ο εμετός, η στοματίτιδα και η διάρροια<sup>20</sup>. Η μεθοτρεξάτη είναι από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται συχνότερα.

**Κυκλοσπορίνη Α:** Η κυκλοσπορίνη Α είναι δεκαπεπτίδιο (11 αμινοξέα) που παράγεται από μύκητα. Έχει ισχυρή ανοσορρυθμιστική δράση και αναστέλλει κυρίως την ενεργοποίηση των CD4 T λεμφοκυττάρων. Μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερικές διαταραχές, υπερτρίχωση, υπέρταση και νεφροτοξικότητα, ωστόσο, το φάρμακο μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη της αρθρικής βλάβης ακόμη και σε ασθενείς με βαριάς μορφής ανθεκτική νόσο<sup>10</sup>.

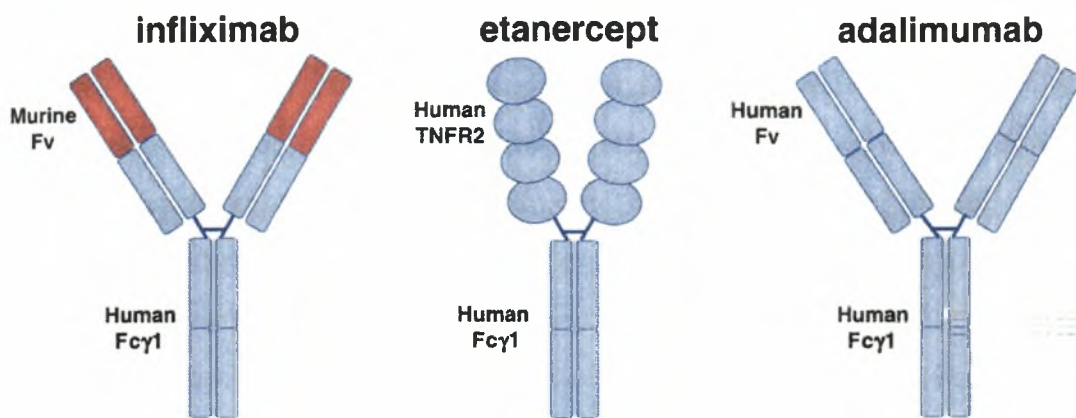
**Λεφλουνομίδη:** Αναστέλλει τη σύνθεση της πυριμιδίνης και έχει κλινική δράση παρόμοια με τη μεθοτρεξάτη. Οι πιθανές παρενέργειες περιλαμβάνουν διάρροια, εξάνθημα, αναστρέψιμη αλωπεκία και ηπατοτοξικότητα<sup>10</sup>.

**Κυκλοφωσφαμίδη:** Είναι αλκυλιώντας παράγων με ποικίλες ανεπιθύμητες δράσεις όπως ναυτία και εμετό, μυελοτοξικότητα, στείρωση, αλωπεκία, αιμορραγική κυστίτιδα και καρκινογένεση<sup>10</sup>.

#### **1.3.4 Βιολογικοί παράγοντες**

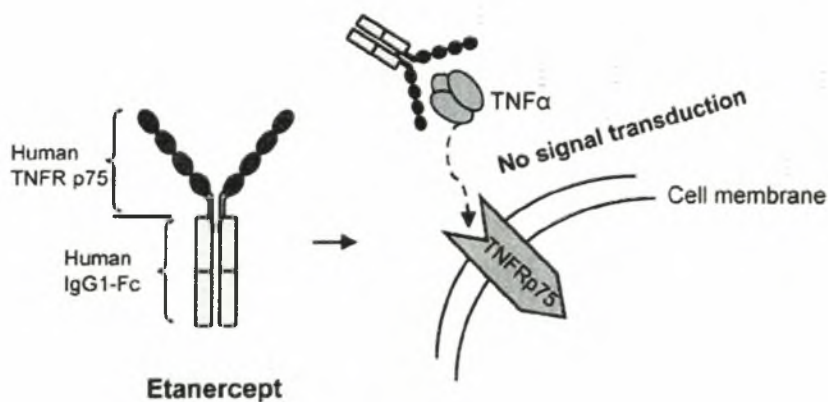
Τα τελευταία χρόνια, με την κατανόηση των φλεγμονωδών διαδικασιών και των μεσολαβητών που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΡΑ, αναπτύχθηκαν νέα φάρμακα με στόχο την τροποποίηση της εξέλιξης της ασθένειας. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι ο TNFα είναι αυξημένος στις περιοχές της φλεγμονής σε ασθενείς με ΡΑ. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η απομάκρυνση του TNFα βελτίωνε την ασθένεια<sup>30,31</sup>. Άρα έπρεπε να σχεδιαστούν φάρμακα που να στοχεύουν στο μόριο αυτό έτσι ώστε να μειωθούν τα επίπεδά του. Οι βιολογικοί παράγοντες στρέφονται κατά των μεσολαβητών της φλεγμονής και της αρθρικής βλάβης, δηλαδή των κυτταροκινών TNFα και IL-1. Στους ανταγωνιστικούς αυτούς παράγοντες ανήκουν, οι πλέον εύχρηστοι, αντί – TNFα ανταγωνιστές (Etanercept, infliximab, Adalimumab) καθώς επίσης και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (Anakinra). Οι βιολογικοί αυτοί παράγοντες φαίνεται ότι επιβραδύνουν ή αποτρέπουν την εξέλιξη της νόσου και μπορούν να συνδυαστούν με ένα ή περισσότερα DMARDs, συνήθως με μεθοτρεξάτη<sup>33,38</sup>.

Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα είναι το Etanercept (Enbrel, Wyeth), το Infliximab (Remicade, Schering – Plough) και το Adalimumab (Humira, Abbott). Και τα τρία αυτά φάρμακα προσδένουν τον TNFα με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τη σύνδεσή του στους υποδοχείς<sup>33</sup> (Εικόνα 7). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν ασθενείς που τους χορηγήθηκε κάποιο από τα τρία αυτά φάρμακα (etanercept, infliximab, adalimumab).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των τριών ανταγωνιστών του TNFα<sup>8</sup>

Το **etanercept** ήταν ο πρώτος παράγοντας που στόχευε σε κυτταροκίνη που εγκρίθηκε για τη θεραπεία της ΡΑ. Είναι η αναδυνδασμένη μορφή του p75 υποδοχέα του TNFα που συνδέεται με το Fc τμήμα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G1 (IgG1) (immunoglobulin). Το etanercept συνδέεται με τον TNFα και περιορίζει τις βιολογικές δράσεις του<sup>33</sup> (Εικόνα 8).



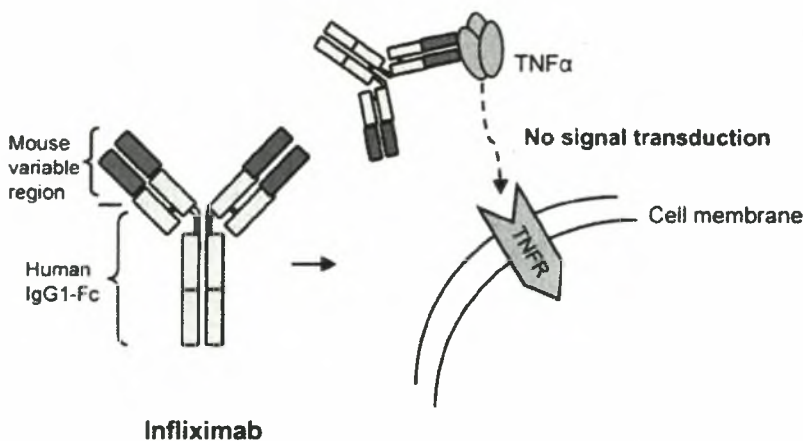
Εικόνα 8: Μοριακός μηχανισμός του etanercept<sup>9</sup>

Η αποτελεσματικότητα του etanercept έχει αποδειχθεί σε κλινικές δοκιμές. Οι μελέτες έδειξαν σημαντική μείωση στην ενεργότητα της ασθένειας παρατηρώντας την μείωση του πρηξίματος και του πόνου των αρθρώσεων και σε



φλεγμονώδεις δείκτες<sup>59</sup>. Το etanercept όταν δίνεται σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη βρέθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό σε σχέση κατά τη θεραπεία μόνο με μεθοτρεξάτη. Ωστόσο, η θεραπεία μόνο με etanercept βρέθηκε να είναι το ίδιο αποτελεσματική όπως με τη μεθοτρεξάτη όσον αφορά τη βελτίωση της αρθρίτιδας (περιορισμός της ενεργότητάς της) και στην αναχαίτιση της καταστροφής της άρθρωσης σε ασθενείς με ΡΑ<sup>60,61</sup>. Το etanercept θεωρείται ένα ασφαλές φάρμακο με καλό προφίλ ανεκτικότητας. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί κάποια προβλήματα κυρίως στην περιοχή που γίνεται η ένεση. Επιπλέον, η θεραπεία με αντί - TNFα θεραπεία μπορεί να σχετίζεται με σοβαρές μολύνσεις λόγω της εξασθενημένης άμυνας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, με φυματίωση, με λεμφώματα ή καρδιακή ανεπάρκεια<sup>9,33</sup>. Το etanercept έχει εγκριθεί για ασθενείς με ΡΑ με μέτρια προς σοβαρή αρθρίτιδα και χορηγείται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τη μεθοτρεξάτη, όπως έχει αναφερθεί. Το etanercept αντενδείκνυται σε ασθενείς που έχουν γνωστή υπερευαισθησία στο φάρμακο ή έχουν κάποια ενεργή μόλυνση. Διακοπή της θεραπείας απαιτείται αν ο ασθενής εμφανίσει σοβαρή μόλυνση κατά τη διάρκεια της θεραπείας<sup>10</sup>.

Το **infliximab** είναι ένα χιμαϊρικό μονοκλωνικό αντίσωμα με 75% ανθρώπινη και 25% πρωτεΐνη ποντικού που προσδένεται και στις διαλυτές αλλά και στις διαμεμβρανικές μορφές του TNFα (Εικόνα 9).

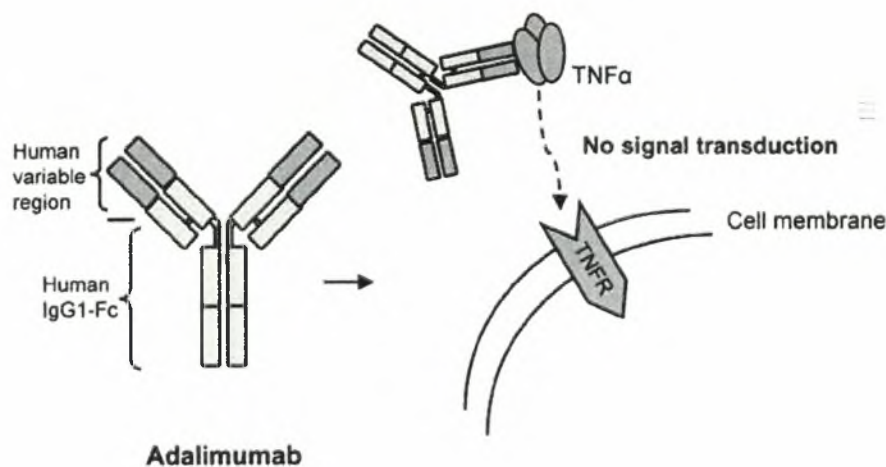


Εικόνα 9: Μοριακός μηχανισμός του infliximab<sup>9</sup>

Η αποτελεσματικότητα του infliximab στη θεραπεία της ΡΑ έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετές δοκιμές είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη<sup>59,62,63</sup>. Ομοίως, σε μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς που έπαιρναν μεθοτρεξάτη έδειξαν μεγαλύτερη βελτίωση με την ταυτόχρονη χορήγηση του infliximab (συνδυασμός των 2) απ' ό,τι αυτοί που έπαιρναν μόνο μεθοτρεξάτη<sup>64</sup>. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα συμπτώματα της αρθρίτιδας περιορίζονταν όλο και περισσότερο με την αύξηση της δόσης του infliximab<sup>33</sup>. Το infliximab ήταν το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ΡΑ και απέδειξε την σημασία του TNFα στην παθογένεια της ασθένειας<sup>9,65</sup>. Η χρήση του infliximab μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής του ασθενή, εμποδίζει την καταστροφή των αρθρώσεων και πιθανώς επιδρά στην επανόρθωση των οστών. Τα μειονεκτήματα, όμως, δε λείπουν και περιλαμβάνουν μολύνσεις, φυματίωση, καρδιακή ανεπάρκεια, αυξημένος κίνδυνος λεμφώματος κ<sup>9</sup>.

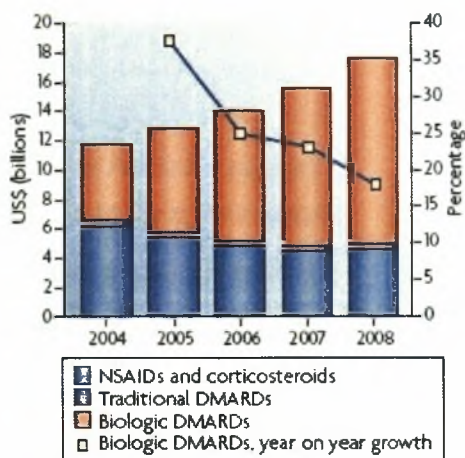
Το **adalimumab** είναι ένα πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει ενάντια στον TNFα. Εγκρίθηκε από τον FDA τον Δεκέμβριο του 2002. Το μόριο αυτό έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με το infliximab και προκαλεί μικρότερη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για αραιότερη δοσολογία<sup>33</sup>. Η αντίδραση στη θεραπεία με το adalimumab είναι γρήγορη, άμεση και κυμαίνεται από 24 ώρες μέχρι και μία βδομάδα μετά τη χορήγηση. Το adalimumab έχει παρόμοιο μοριακό μηχανισμό με αυτόν του infliximab. Συγκεκριμένα, προσδένει τον διαλυτό και διαμεμβρανικό TNFα και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, τον TNFR1 και τον TNFR2 (Εικόνα 10). Επιπλέον, το adalimumab ρυθμίζει τις βιολογικές απαντήσεις που προάγονται από τον TNF και μειώνει τα επίπεδα της IL-6 και των MMPs (MMP-1, MMP-3)<sup>9</sup>. Η θεραπεία με adalimumab δε πρέπει να εφαρμόζεται σε ασθενείς με ενεργή μόλυνση, συμπεριλαμβανομένου τις χρόνιες και τοπικές λοιμώξεις. Εάν ένας ασθενής κατά τη θεραπεία αναπτύξει κάποια μόλυνση τότε το adalimumab θα πρέπει να διακόπτεται άμεσα. Το adalimumab μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε συνδυασμό με άλλα DMARDs είτε μόνο του<sup>33</sup>. Από τα σημαντικότερα οφέλη αυτού του φαρμάκου είναι η αναχαίτιση της καταστροφής της άρθρωσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε ασθενείς που δεν

είχαν ανταπόκριση με τα DMARDs. Ωστόσο, οι τοξικές δράσεις του adalimumab είναι παρόμοιες με αυτές των etanercept και infliximab: μολύνσεις, διαταραχές στο ανοσοποιητικό σύστημα, φυματίωση και καρδιακή ανεπάρκεια<sup>9</sup>.



Εικόνα 10: Μοριακός μηχανισμός του adalimumab<sup>9</sup>

Παρόλο που αυτοί οι βιολογικοί παράγοντες δρουν γρηγορότερα έτσι ώστε να ελέγξουν έγκαιρα την ασθένεια και έχουν καλύτερο προφίλ ανεκτικότητας σε σχέση με τα συμβατικά DMARDs, δεν είναι ικανά να την θεραπεύσουν. Είναι γεγονός ότι την τελευταία δεκαετία η εισαγωγή των βιολογικών αναστολέων του TNF-α (Infliximab, Etanercept, Adalimumab) έχουν επιφέρει επανάσταση στην θεραπεία ασθενών με ΡΑ όσον αφορά την αποτελεσματικότητα αλλά ταυτόχρονα το κόστος έχει αυξηθεί πάρα πολύ<sup>58</sup> (Εικόνα 11). Ακόμη, σε πολλές περιπτώσεις ασθενών η θεραπεία με κάποιο βιολογικό παράγοντα δεν επιφέρει κάποιο θετικό αποτέλεσμα στην καταστολή της ασθένειας, με αποτέλεσμα να του χορηγούνται κατά διαστήματα διαφορετικά φάρμακα, που πιθανώς να επιβαρύνουν την υγεία του περισσότερο. Η επίδραση της χρήσης των παραγόντων αυτών δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως<sup>66</sup>.



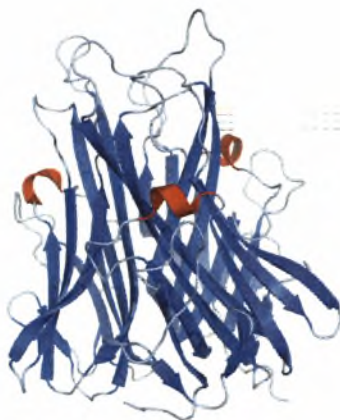
Εικόνα 11: Αυξανόμενο κόστος των βιολογικών παραγόντων για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας<sup>58</sup>

Ωστόσο, πολλές έρευνες επιβεβαιώνουν ότι σε κάποιους ασθενείς οι προαναφερθέντες βιολογικοί παράγοντες δεν είναι αρκετά αποτελεσματικοί ώστε να περιοριστούν τα συμπτώματα της ασθένειας. Γι' αυτό το λόγο, αναπτύχθηκαν σταδιακά νέοι βιολογικοί παράγοντες με εναλλακτικούς μηχανισμούς δράσης, πχ. anakinra, rituximab, abatacept, tocilizumab. Το anakinra είναι ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 και χρησιμοποιείται είτε μόνο του είτε με άλλα DMARDs. Το rituximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που προσδένεται στη CD20 περιοχή στα Β λεμφοκύτταρα και έχει εγκριθεί για ασθενείς που δεν έχουν ανταπόκριση στους TNF αναστολείς. Το abatacept είναι μία πρωτεΐνη σύντηξης (fusion) που προσδένεται στη CD28 περιοχή των Τ κυττάρων και συνίσταται σε ασθενείς που δεν έχουν ανταποκριθεί ικανοποιητικά σε DMARDs, τα οποία λαμβάνονται από το στόμα ή σε TNF αναστολείς. Τέλος, το tocilizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που προσδένεται στον υποδοχέα της IL-6 και χρησιμοποιείται σε ασθενείς που δεν έχουν ανταποκριθεί ικανοποιητικά ή ήταν δυσανεκτικοί σε προηγούμενες θεραπείες (DMARDs και TNF αναστολείς)<sup>58</sup>.

## 1.4 Γονίδια που εμπλέκονται με την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα

### 1.4.1 TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor – alpha)

Το γονίδιο του TNF $\alpha$  βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 του ανθρώπου, και συγκεκριμένα στη θέση 6p21.3. Υπάρχει ένα αντίγραφο του γονιδίου σε κάθε χρωμόσωμα. Το γονίδιο εδράζεται στην περιοχή όπου βρίσκονται τα γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC), συγκεκριμένα στην περιοχή της τάξης III, γεγονός που υποδηλώνει ότι εμπλέκεται με αυτό, και ανήκει στην υπεροικογένεια TNF. Το γονίδιο έχει τέσσερα εξώνια, που διακόπτονται από τρία ιντρόνια και αποτελείται από 2762 ζεύγη βάσεων<sup>67</sup>. Το τελευταίο εξώνιο κωδικοποιεί παραπάνω από το 80% της ώριμης πρωτεΐνης ενώ τα εξώνια I και II περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά τις πεπτιδικές αλληλουχίες του εκκινητή<sup>67</sup>. Η 3' αμετάφραστη περιοχή του TNF $\alpha$  είναι πλούσια σε στοιχεία AU (ARE). Το mRNA μεταφράζεται σε μία πρωτεΐνη 157 αμινοξέων. Η τελική μορφή της πρωτεΐνης του TNF $\alpha$  είναι τριμερής και αποτελείται από τρεις όμοιες υπομονάδες (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNF $\alpha$ <sup>68</sup>

Ο TNF αναγνωρίστηκε το 1975 ως μία γλυκοπρωτεΐνη επαγόμενη από ενδοτοξίνη, που προκαλούσε αιμορραγική νέκρωση των σαρκομάτων που μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια. Ο ανθρώπινος TNF κλωνοποιήθηκε το 1982. Ο TNF φαίνεται ότι εμπλέκεται σε μία μεγάλη ποικιλία φλεγμονωδών, μολυσματικών και κακοηθών καταστάσεων. Η εμπλοκή του TNF $\alpha$  στη φλεγμονή έχει αποδειχτεί από την αποτελεσματικότητα των αντί – TNF αντισωμάτων ή των διαλυτών TNF υποδοχέων στον έλεγχο της ασθένειας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις<sup>36</sup>. Το γονίδιο κωδικοποιεί μία προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα. Αυτή η κυτταροκίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός μεγάλου φάσματος βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, του



μεταβολισμού των λιπιδίων και της πήξης. Επιπλέον, είναι υπεύθυνη για μία μεγάλη ποικιλία ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου διάφορων αυτοάνοσων ασθενειών, αντίσταση στην ινσουλίνη και καρκίνο<sup>69</sup>.

Σε γενετικές μελέτες, η ρευματοειδής αρθρίτιδα σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το MHC σύμπλεγμα της τάξης II και τα αντιγόνα HLADRB1\*0404 και DRB1\*0401. Η κυριότερη λειτουργία των HLA τάξης II μορίων είναι να παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτίδια στα CD4+ T κύτταρα, γεγονός που μαρτυρά ότι η PA προκαλείται από κάποιο μη αναγνωρισμένο αρθριτογενές αντιγόνο. Το αντιγόνο αυτό μπορεί να είναι κάποιο εξωγενές αντιγόνο, πχ. μία ιική πρωτεΐνη, ή ένα ενδογενές αντιγόνο, πχ. citrullinated protein, human cartilage glycoprotein 39, και heavy-chain-binding protein<sup>34</sup>.

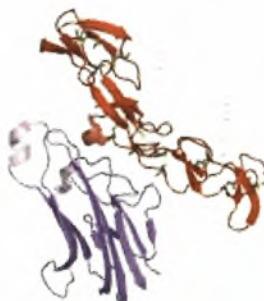
Ο TNFα δρα και λειτουργεί μέσω της πρόσδεσής του με έναν από τους δύο υποδοχείς του, τον TNFR1 ή p55 ή τύπος 1 και TNFR2 ή p75 ή τύπος 2. Και οι δύο μορφές είναι λειτουργικές στη διαλυτή τους μορφή στο αρθρικό υγρό των ασθενών με PA. Αυτοί οι διαλυτοί υποδοχείς συναγωνίζονται με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων για τη σύνδεσή τους με τον TNFα και κατ'επέκταση για την αναχαίτιση της δραστηριότητάς του. Και οι δύο υποδοχείς συνδέονται στον TNFα με παρεμφερείς συγγένειες<sup>33</sup>. Ο TNFα προάγει τη δημιουργία φλεγμονής. Είναι ένας αυτοκρινής διεγέρτης αλλά και παρακρινής προαγωγέας άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-1, IL-6, IL-8 και του παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων – μακροφάγων (GM-CSF). Επιπλέον, ο TNFα, κατά το σχηματισμό της φλεγμονής, προκαλεί τους ινοβλάστες να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης. Αυτά τα μόρια προσκόλλησης αλληλεπιδρούν με τους προσδέτες τους στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα να καταλύεται αυξημένη μεταφορά λευκοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής, όπως είναι οι αρθρώσεις στους ασθενείς με PA<sup>34</sup>.

#### **1.4.2 Υποδοχείς του TNFα – TNFR1, TNFR2**

Όλες οι γνωστές διαδικασίες που συμμετέχει ο TNFα προκαλούνται με την πρόσδεσή του σε έναν εκ των δύο υποδοχέων, TNFR1 ή TNFR2. Οι δύο αυτοί

υποδοχείς είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και ρυθμίζονται διαφορετικά σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, σε ιστούς φυσιολογικών και ασθενών ατόμων<sup>70</sup>. Οι εξωκυτταρικές επικράτειες, που είναι οι θέσεις πρόσδεσης του TNF, αποτελούνται από υπομονάδες πλούσιες σε κυστεΐνη, κάτι που είναι χαρακτηριστικό των μελών αυτής της οικογένειας γονιδίων<sup>36</sup>. Αντίθετα, οι ενδοκυτταρικές επικράτειες των δύο υποδοχέων δεν έχουν ομολογία<sup>67</sup> στην αλληλουχία τους, στερούνται την ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα και ενεργοποιούν διακριτά μονοπάτια σηματοδότησης με τη στρατολόγηση κυτοσολικών πρωτεϊνών διαμέσου συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων επικρατειών πρωτεϊνών – πρωτεϊνών<sup>36,67,71</sup>. Η ικανότητα των TNFR1 και του TNFR2 να αλληλεπιδρούν με παρόμοια και με διαφορετικά μόρια μπορεί, κατά κάποιο τρόπο, να εξηγήσει τις λειτουργίες τους. Μελέτες βασισμένες σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς, στους οποίους δεν εκφράζονται τα γονίδια των υποδοχέων έδειξαν ότι τα προφλεγμονώδη μονοπάτια, όπως και αυτά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιούνται από τον TNFα και σχετίζονται με την καταστροφή ιστών, διαμεσολαβούνται κυρίως από τον TNFR1. Οι επιπτώσεις από τη σηματοδότηση του TNFR2 είναι λιγότερο καλά χαρακτηρισμένες, αλλά ο TNFR2 έχει αποδειχτεί ότι μεσολαβεί σε μονοπάτια που προωθούν την επανόρθωση των ιστών και την αγγειογένεση<sup>36</sup>.

Το γονίδιο του TNFR1 (TNF receptor type 1, CD120a, p55/60) βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 και συγκεκριμένα στη θέση 12p13.2. Αποτελείται από 13340 ζεύγη βάσεων, έχει 10 εξώνια<sup>68</sup> και το προϊόν του γονιδίου έχει μήκος 434 αμινοξέα<sup>67</sup>. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην υπερικογένεια των TNF υποδοχέων (Εικόνα 13). Αυτή η πρωτεΐνη είναι από τους σημαντικότερους υποδοχείς για τον TNFα. Ο υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει τον NF – kappaB, να μεσολαβήσει στην απόπτωση και να λειτουργήσει σαν ρυθμιστής της φλεγμονής.



Εικόνα 13: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR1<sup>72</sup>

Το γονίδιο του TNFR2 (TNF receptor type 2, CD120b, p75/80) βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 του ανθρώπου, και συγκεκριμένα στη θέση 1p36.3-p36.2. Αποτελείται από 42220 ζεύγη βάσεων, έχει 10 εξώνια<sup>69</sup> και η πρωτεΐνη που προκύπτει έχει 439 αμινοξέα<sup>67</sup> (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR2<sup>73</sup>

Και οι δύο αυτοί υποδοχείς μπορούν να δεσμεύσουν τον TNFα. Οι περισσότερες κυτταρικές σειρές και ιστοί εκφράζουν και τους δύο TNF υποδοχείς, παρόλο που ο TNFR2 προτιμάται να εκφράζεται στα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς<sup>36</sup>. Συγκεκριμένα, ο TNFR1 εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους<sup>24</sup> πχ. ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα<sup>67</sup>, εκτός από τα ερυθροκύτταρα ενώ ο TNFR2 εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα<sup>8</sup>. Ο TNFR1 μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως και από τη διαμεμβρανική και από τη διαλυτή τριμερή μορφή του TNFα, ενώ ο TNFR2 εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T cells) και σχετίζεται με τη διαμεμβρανική μορφή του TNFα. Μία σειρά ερεθισμάτων που περιλαμβάνουν τον TNF, την IL-1, την IL-10 και τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου ιστών (tissue plasminogen activator), έχουν την δυνατότητα να αυξάνουν την έκφραση του TNFR2 μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής του. Αντίθετα, ο TNFR1 υπορυθμίζεται παρουσία αυτών των ερεθισμάτων<sup>74,75,76</sup>.

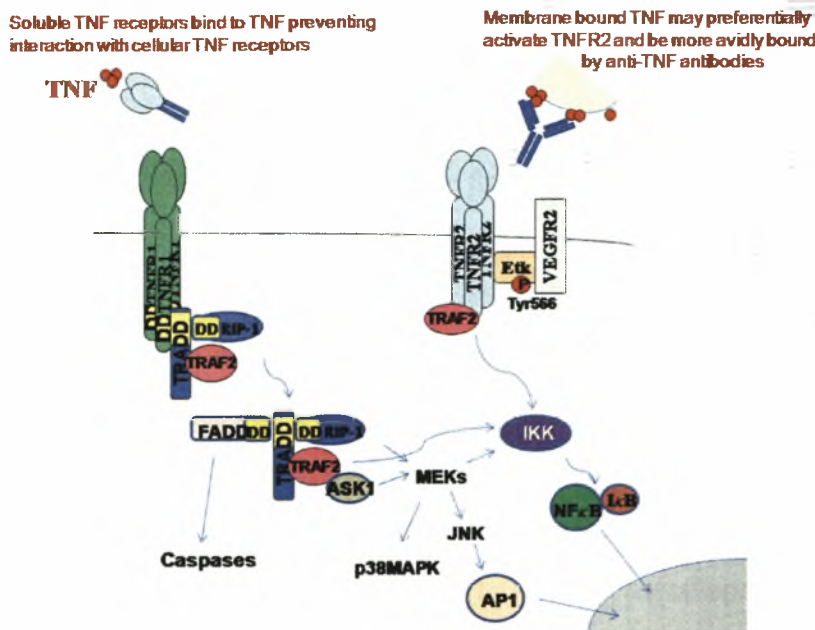
Οι υποδοχείς του TNFα σχηματίζουν επίσης τριμερή<sup>28</sup>. Η πρόσδεση του υποδοχέα με τον TNFα προκαλεί δομικές αλλαγές στον υποδοχέα, προκαλώντας την απόσπαση της ανασταλτικής πρωτεΐνης SODD από την ενδοκυτταρική επικράτεια. Αυτή η απόσπαση δίνει τη δυνατότητα στην πρωτεΐνη TRADD να προσδεθεί στην επικράτεια και να οδηγήσει, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15, στα εξής μονοπάτια σηματοδότησης<sup>77,78</sup>:

- **Ενεργοποίηση του NF – κB:** η TRADD στρατολογεί την TRAF2 και την RIP. Η TRAF2 με τη σειρά της στρατολογεί την κινάση IKK, όπου με την δράση της serine-threonine κινάσης RIP την ενεργοποιεί. Μία πρωτεΐνη αναστολέας, IκBα, που φυσιολογικά προσδέεται στον NF-κB και αναστέλλει την



μετανάστευσή του, φωσφορυλιώνεται από την IKK και στην συνέχεια αποικοδομείται, απελευθερώνοντας τον NF-κΒ. Ο NF-κΒ είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που μεταναστεύει στον πυρήνα και μεσολαβεί στη μεταγραφή μιας μεγάλης ποικιλίας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό, στην φλεγμονώδη ανταπόκριση και σε αντί – αποπτωτικούς παράγοντες.

- **Ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPK:** Από τα τρία βασικά μονοπάτια των MAPK, ο TNF $\alpha$  προάγει την ενεργοποίηση της JNK ομάδας που σχετίζεται με το στρες. Το JNK μονοπάτι εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και είναι γενικά προ – αποπτωτικό.
- **Προαγωγή του κυτταρικού θανάτου:** ο TNFR1 εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο, όπως όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TNF. Ωστόσο, ο ρόλος του TNF στα μονοπάτια της απόπτωσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με την εμπλοκή του στη φλεγμονή<sup>79</sup>.



Εικόνα 15: Τα μονοπάτια σηματοδότησης που προκαλούνται από τις ενδοκυτταρικές δράσεις του TNF $\alpha$ <sup>36</sup>

### 1.4.3 Ο ρόλος του TNFα

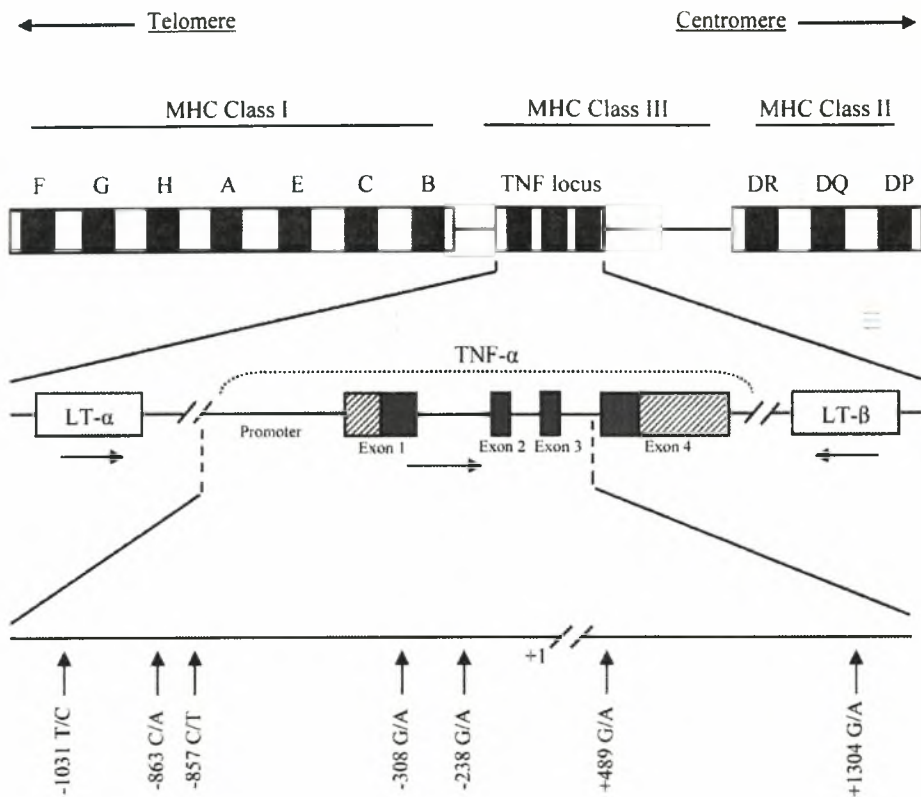
Ένας από τους βασικότερους βιολογικούς ρόλους του TNFα είναι η άμυνα του ξενιστή ενάντια σε βακτηριακές, ιικές και παρασιτικές μολύνσεις<sup>8,36</sup>. Φυσιολογικά ο TNFα είναι σημαντικός για την φυσιολογική ανταπόκριση σε μολύνσεις αλλά η υπερβολική παραγωγή μπορεί να είναι επιβλαβής<sup>36</sup>. Ο TNFα μεσολαβεί σε μία ποικιλία μηχανισμών στα κύτταρα και επιπλέον προάγει την παραγωγή άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως είναι η IL-1, ιντερφερόνη-γ, IL-2, και της καταστροφής ιστών τοποθετώντας τον έτσι στην κορυφή του φλεγμονώδους καταρράκτη. Μερικές από τις δράσεις του TNFα είναι συχνές σε αρκετές ασθένειες όπως είναι πχ. η στρατολόγηση κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός κυττάρων, ο κυτταρικός θάνατος και η ρύθμιση ανοσοποιητικού<sup>34</sup>. Ωστόσο, άλλες βιολογικές δραστηριότητες του TNFα μπορεί να περιορίζονται σε συγκεκριμένες ασθένειες, πχ. η αποδιάταξη κυτταρικού δικτύου (osteoclastogenesis) στη ΡΑ ή στο σχηματισμό κοκκιωμάτων στη νόσο του Crohn. Η ενεργοποίηση του NF – κB από τον TNFα έδειξε ότι προκαλείται η έκφραση γονιδίων που αναχαιτίζουν την απόπτωση, ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συμμετέχουν στην μετανάστευση καρκινικών κυττάρων όγκων και στη μετάσταση<sup>80</sup>. Αυτό προτείνει ότι πιθανώς οι ανταγωνιστές του TNFα να είναι αποτελεσματικοί σε κάποια είδη καρκίνου. Ο TNFα μπορεί να παραχθεί από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένου των μακροφάγων, των Τ λεμφοκυττάρων, των βασεόφιλων, των ινοβλαστών, των νευρικών κυττάρων, των κερατινοκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων, των κυτταροτοξικών (NK) και των λείων μυϊκών κυττάρων<sup>8</sup>.

Ο TNFα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από ενεργοποιημένα μακροφάγα και Τ λεμφοκύτταρα ως μία ομοτριμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μονομερή των 26 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ο πρόδρομος TNFα (tmTNF) και εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Εκεί αποκόπτεται η εξωκυτταρική περιοχή από μεταλλοπρωτεάσες στρώματος (MMP: matrix metalloproteinases) και συγκεκριμένα από το TNF alpha-converting enzyme (TACE), που τελικά οδηγούν στην απελευθέρωση της διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης (sTNF)<sup>81</sup>. Η διαλυτή μορφή του TNFα είναι επίσης μία τριμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μονομερή των 17 kDa<sup>8,36</sup>. Και ο sTNF και ο tmTNF είναι βιολογικά ενεργοί και οι σχετικές συγκεντρώσεις καθενός εξαρτάται από τα ερεθίσματα στο περιβάλλον τους, τα

κύτταρα που εμπλέκονται, τα ποσοστά ενεργού TACE όπως και τα ποσά των φυσικών αναστολέων του TACE (πχ. αναστολείς ιστών των μεταλλοπρωτεασών-3)<sup>82</sup>. Και οι δύο μορφές του TNFα αλληλεπιδρούν και προσδένονται με τους δύο διακριτούς υποδοχείς, τον TNFR1 και τον TNFR2, ώστε να ολοκληρώσουν τη δράση τους. Συνηθέστερα, ο sTNF προσδένεται με τον TNFR1 και ο tmTNF με τον TNFR2<sup>8</sup>.

#### **1.4.4 Πολυμορφισμοί του TNFα και των υποδοχέων του στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα**

Στην περιοχή γύρω από το γονίδιο του TNFα και εντός του γονιδίου έχουν αναγνωριστεί πολλοί πολυμορφισμοί οι περισσότεροι από τους οποίους αφορούν SNPs, δηλαδή αντικατάσταση ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Μάλιστα στην περιοχή που βρίσκεται το γονίδιο του TNF υπάρχει ο μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφισμών για το χρωμόσωμα 6<sup>83</sup>. Τα περισσότερα SNPs στο συγκεκριμένο γονίδιο έχουν εντοπιστεί ανοδικά του γονιδίου και βρίσκονται ως επί των πλείστον στον υποκινητή του. Από τους πιο γνωστούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο του TNFα είναι οι: TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T, TNF C-1031T, TNF C-863A, TNF G+489A, TNF G+1304A (Εικόνα 16). Υπάρχουν και άλλοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό αλλά είναι σχετικά σπάνιοι. Ακόμα και μία αλλαγή στην αλληλουχία ενός γονιδίου μπορεί να επηρεάσει την παραγόμενη πρωτεΐνη σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται και το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει. Αυτό μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στο άτομο που φέρει το SNP ειδικά εάν το SNP εμπλέκεται άμεσα με κάποια ασθένεια.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNF $\alpha$ <sup>9</sup>

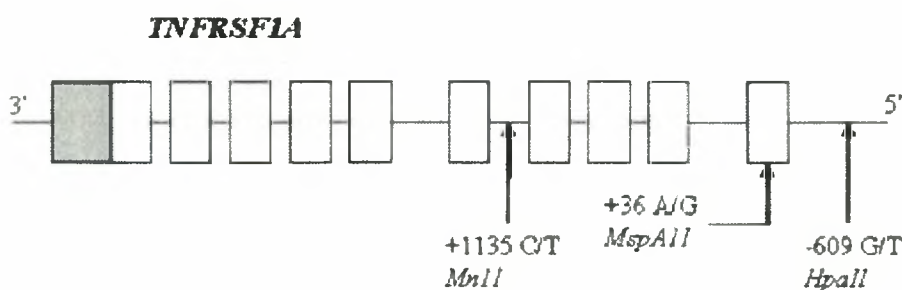
Σε ασθενείς με ΡΑ, τα επίπεδα του TNF στο αίμα είναι αυξημένα και πιο συγκεκριμένα στις αρθρώσεις<sup>84</sup>. Αν και αρχικά τα αποτελέσματα των ερευνών ήταν αμφιλεγόμενα<sup>85,86</sup>, από τους πρώτους πολυμορφισμούς που επιβεβαιώθηκαν ότι εμπλέκεται στην ΡΑ είναι ο TNF G-308A, που αφορά την αντικατάσταση του φυσιολογικού G από A. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με την ΡΑ αλλά όχι σε όλους τους πληθυσμούς. Βέβαια αυτό το ενδεχόμενο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση ώστε να προκύψει κάποιο σίγουρο συμπέρασμα<sup>87</sup>. Η θέση του πολυμορφισμού αυτού είναι στον υποκινητή του γονιδίου και το φυσιολογικό αλληλόμορφο G αντικαθίσταται από A. Η ύπαρξη του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου έχει συσχετιστεί με τον απλότυπο HLA-A1-B8-DR3-DQ2<sup>88,89</sup> καθώς επίσης με αυτοάνοσες ασθένειες και την υπερπαραγωγή του TNF $\alpha$ <sup>89,90</sup>. Πιθανώς αυτό το A αλληλόμορφο να μεσολαβεί στην απορρύθμιση της λειτουργίας των κυτταροκινών και να επηρεάζει την παθογένεια

στην PA<sup>91</sup>, προκαλώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου οδηγώντας έτσι τα επίπεδα του TNFα σε υψηλότερα από τα φυσιολογικά<sup>89</sup>.

Ένας αρκετά συχνός πολυμορφισμός είναι ο TNF G-238A. Ο πολυμορφισμός αυτός αφορά την αντικατάσταση του αλληλομόρφου G από το A και βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου. Το A αλληλόμορφο είναι αρκετά σπάνιο και έτσι συνήθως τα άτομα έχουν το GG ή το GA γενότυπο<sup>9</sup>. Ο γονότυπος G/G σχετίζεται με αρκετά σοβαρές διαβρώσεις στις αρθρώσεις, ενώ σε άτομα με γονότυπο G/A ο χόνδρος στην άρθρωση καταστρεφόταν με πιο αργούς ρυθμούς<sup>92</sup>.

Επίσης, αρκετά συχνός είναι ο πολυμορφισμός TNF C-857T, που αφορά την αντικατάσταση του C αλληλομόρφου από T. Θεωρείται ότι ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με την ευπάθεια των ατόμων στην PA, προκαλώντας την αύξηση της μεταγραφής και κατ' επέκταση της παραγωγής του TNFα<sup>93,94</sup>.

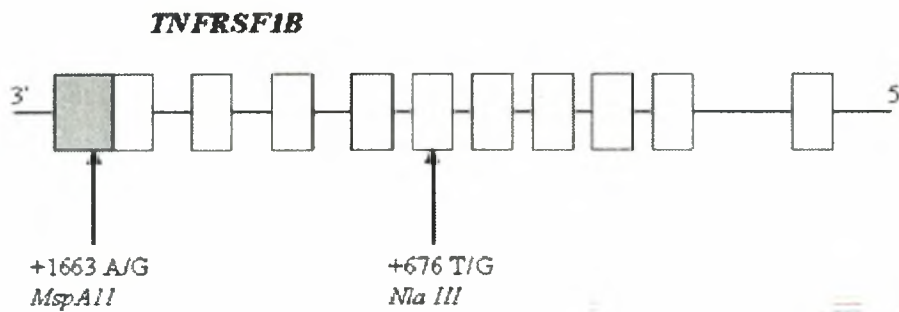
Ο πολυμορφισμός A36G του TNFR1 εντοπίζεται στο εξώνιο 1 του γονιδίου και αφορά την αντικατάσταση του A από G στο δωδέκατο κωδικόνιο (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα, το κωδικόνιο CCA αντικαθίσταται από το CCG (Pro12Pro). Ωστόσο, τα κωδικόνια αυτά είναι συνώνυμα και το αμινοξύ προλίνη παραμένει στην πεπτιδική αλυσίδα<sup>96</sup>. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με αυτοάνοσες ασθένειες<sup>97</sup>. Μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή του πολυμορφισμού αυτού στην PA, που είναι μεγαλύτερη στην οικογενή PA<sup>98</sup>. Επίσης, ο γονότυπος GG φαίνεται να είναι πιο συχνός σε ασθενείς με προχωρημένη PA<sup>99</sup>.



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFR1<sup>95</sup>



Τέλος, ο πολυμορφισμός T676G του TNFR2 εντοπίζεται στο εξώνιο 6 του γονιδίου και αφορά την αντικατάσταση μιας βάσης στο κωδικόνιο 196, με αποτέλεσμα από ATG να προκύπτει AGG (Εικόνα 18). Αυτή η μη συντηρητική αλλαγή στην πεπτιδική αλυσίδα οδηγεί στην αντικατάσταση της μεθειονίνης από την αργινίνη<sup>9</sup>. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με τη PA, συγκεκριμένα με τα επίπεδα των TNFRs που απελευθερώνονται από τα T κύτταρα σε ασθενείς με PA<sup>99</sup>. Η ύπαρξη του G αλληλόμορφου μπορεί να αυξήσει την παραγωγή της IL-6 περισσότερο σε σχέση με το T αλληλόμορφο. Επιπλέον, το αλληλόμορφο G μπορεί να επηρεάσει την αποδιάταξη των υποδοχέων των μεμβρανών και/ή την πρόσδεση του αντίστοιχου προσδέτη<sup>100</sup>.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFR2<sup>95</sup>

## 1.5 Φαρμακογενετική

Οι ολοένα και αυξανόμενες ανακαλύψεις στη βιολογία, που έχουν οδηγήσει στην κατανόηση των μηχανισμών των κυττάρων και της λειτουργίας τους, επέτρεψε τη μετάβαση από το χημικό στο βιολογικό μοντέλο ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι επιστήμονες πλέον βασίζονται στον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων, φυσιολογικά και μεταβολικά, ώστε να επιτυγχάνεται προβλέψιμη επίδραση στη φυσιολογική λειτουργία λόγω της δράσης του φαρμάκου, και κατ' επέκταση διόρθωση της παθολογικής κατάστασης.

Ο όρος φαρμακογενετική αναφέρεται στη μελέτη ή κλινική μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των ατόμων που προκαλεί διαφορετική ανταπόκριση στα φάρμακα. Ο απώτερος στόχος της φαρμακογενετικής είναι η γνώση της αλληλουχίας του DNA του ασθενή να χρησιμοποιείται έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας και τα φάρμακα να χρησιμοποιούνται μόνο σε αυτούς τους ασθενείς που αναμένεται να ανταποκριθούν θετικά, ώστε να αποφεύγονται τυχόν παρενέργειες<sup>101</sup> και η αλόγιστη χρήση των φαρμάκων με σημαντικά οικονομικοκοινωνικά οφέλη.

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας ασθενών παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ανταπόκρισή τους σε μεγάλες δόσεις του φαρμάκου. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι πιθανώς η γενετική ποικιλομορφία των ατόμων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση των φαρμάκων. Προσπάθειες για να κατανοηθεί αυτό οδήγησε σε μελέτες διδύμων που έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις πλάσματος ή άλλων φαρμακοκινητικών παραμέτρων σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την κληρονομικότητα για κάποια φάρμακα<sup>101</sup>. Επιπλέον, είναι γεγονός ότι πολλοί ασθενείς ανταποκρίνονται στην αγωγή που λαμβάνουν είτε μερικώς είτε καθόλου, ενώ άλλοι εκδηλώνουν ανεπιθύμητα συμβάντα που ποικίλλουν από απλώς δυσάρεστα μέχρι σοβαρά και δυνητικώς μοιραία<sup>102</sup>. Η παρουσία ή η απουσία ορισμένων πολυμορφισμών (SNPs) στο γονιδίωμα ενός ατόμου, καθώς επίσης και μεταλλάξεις όπως προσθήκες, αναστροφές, ελλείμματα, διπλασιασμοί ή αναδιατάξεις του γενετικού υλικού, μπορεί να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο αντίδρασης του οργανισμού σε κάποιο συγκεκριμένο φάρμακο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι παραλλαγές αυτές μπορεί να βρίσκονται μέσα σε γονίδια, ή στους υποκινητές, στους ενισχυτές, σε θέσεις κοπής των ιντρονίων, ή σε άλλες αλληλουχίες που επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου ή τη σταθερότητα του mRNA<sup>6</sup>.

Η φαρμακογενετική σαν κλάδος αποσκοπεί στην εξατομίκευση της περίθαλψης και κατ' επέκταση της θεραπείας, κατά ασθενή και κατά νόσο, μελετώντας το γενετικό προφίλ των ασθενών. Συνήθως εξετάζονται πολυμορφισμοί που σχετίζονται κατά κάποιο τρόπο με τη συγκεκριμένη ασθένεια, πχ. πολυμορφισμοί στον υποκινητή ενός γονιδίου που παράγεται μία πρωτεΐνη.

Ωστόσο, πολλές φορές δεν αρκεί η ανακάλυψη της άμεσης σχέσης των πολυμορφισμών/ παραλλαγών των αλληλομόρφων των αλληλουχιών με την ασθένεια ή την ανταπόκριση στο φάρμακο, διότι η αποτελεσματικότητα ή μη του φαρμάκου μπορεί να επηρεάζεται από κάποια έμμεση εκδήλωση που πιθανώς να καθορίζεται από μία μεταλλαγή σε κάποια θέση του γονιδιώματος που δε σχετίζεται με την ασθένεια ή από μία που μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστή. Επιπλέον, η συγχορήγηση άλλων φαρμάκων ή ακόμα και η κατανάλωση ορισμένων τροφών μπορεί να επηρεάσει και να περιπλέξει περαιτέρω την εικόνα οποιασδήποτε χορηγούμενης θεραπείας<sup>102</sup>.

Υπάρχουν τρεις τύποι γενετικών ποικιλομορφιών που μπορούν να επηρεάσουν τη θεραπεία. Η ποικιλομορφία σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του φαρμάκου ή στη μεταφορά του (φαρμακοκινητική ποικιλομορφία), η ποικιλομορφία στους στόχους του φαρμάκου ή σε μονοπάτια που έπονται και σχετίζονται με αυτούς τους στόχους (φαρμακοδυναμική ποικιλομορφία) και η γενετική ποικιλομορφία που σχετίζεται, επίσης, με δράσεις του φαρμάκου<sup>6</sup>. Κατά τον μεταβολισμό ενός φαρμάκου επηρεάζεται η συγκέντρωση της ουσίας που φτάνει τελικά στον στόχο του. Κάθε άτομο έχει το δικό του γενετικό προφίλ λόγω των διαφορετικών μεταλλάξεων που μπορεί να υπάρχουν στο γονιδίωμά του, με αποτέλεσμα να χρειάζεται και διαφορετική μεταχείριση. Συμπερασματικά, μέχρι σήμερα, η φαρμακογενετική έχει πολύ λίγα δεδομένα για να μπορεί να ικανοποιήσει τον στόχο της, να προβλέπει την ανταπόκριση των ασθενών σε κάποιο φάρμακο εκ των προτέρων. Η εντατικοποίηση των ερευνών δύναται να οδηγήσει στην κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας και του ρόλου που διαδραματίζει στις αντιδράσεις των φαρμάκων<sup>103</sup>.

Παρόλο που χρησιμοποιούνται πλέον οι νέοι βιολογικοί παράγοντες ως θεραπευτική αντιμετώπιση για τον περιορισμό των συμπτωμάτων της ΡΑ, πολλοί ασθενείς δεν ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στη θεραπεία<sup>9</sup>. Η γενετική ποικιλομορφία είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την ανταπόκριση ενός ασθενή με ΡΑ στην αντί – TNF θεραπεία. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποιος συγκεκριμένος βιοδείκτης που να μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση, γι' αυτό μελετώνται διάφοροι κλινικοί παράγοντες που μπορούν να

καθορίσουν εάν ένας ασθενής ανταποκρίνεται ή όχι στη θεραπεία<sup>104,105</sup>. Έρευνες από διάφορες ομάδες προτείνουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον 10 διαφορετικές γενετικές περιοχές που σχετίζονται με τη ΡΑ<sup>106</sup>. Η συνεισφορά της κάθε γενετικής περιοχής στην ασθένεια δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως αλλά συνηγορεί στο γεγονός ότι οι ασθενείς διαθέτουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς που καθορίζονται γενετικά, και συγκεκριμένα οφείλεται σε πολυμορφισμούς. Πολλοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές ή σε ρυθμιστικές περιοχές που εμπλέκονται με το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς επίσης και με τον μεταβολισμό ενζύμων. Ακόμη, το ποσοστό της συνεισφοράς των πολλαπλών γενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ΡΑ μπορεί να καθορίζει και τη σοβαρότητα της ασθένειας κλινικά<sup>9</sup>.

Η εξατομικευμένη θεραπεία σε συνδυασμό με τη χρήση των βιολογικών παραγόντων υπόσχεται να δώσει τη δυνατότητα στους ρευματολόγους να επιλέγουν την καταλληλότερη βιολογική θεραπεία για τον κάθε ασθενή ατομικά ώστε να μειώνονται οι παρενέργειες και να επιτυγχάνεται η αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της ασθένειας<sup>107</sup>.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση γνωστών πολυμορφισμών στο γονίδιο του TNFα και στους υποδοχείς του, TNFR1 και TNFR2, με την κλινική ανταπόκριση των ασθενών με ΡΑ στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες, στον ελληνικό πληθυσμό, με απώτερο στόχο την ανάδειξη ενός προγνωστικού απλοτύπου για την ανταπόκριση στη δεδομένη θεραπεία.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συλλογή δειγμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 78 ασθενείς από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα, με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αντί – TNF παράγοντα για τουλάχιστον 6 μήνες. Οι αντί – TNF παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το **infliximab (Remicade, Schering – Plough)**, το **etanercept (Enbrel, Wyeth)** και το **adalimumab (Humira, Abbott)**. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα, οριζόμενη με την βαθμολογία DAS28 $\geq$ 3.2, κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και τα κριτήρια EULAR.

Υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε το περιφερικό αίμα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα. Τα δείγματα, τα οποία προσφέρθηκαν έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς, προέρχονται από την Ρευματολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και από το Ρευματολογικό Τμήμα της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης.

### 2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από το αίμα είναι καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι είναι επιθυμητή η σωστή απομόνωση και ποσοτικά και ποιοτικά. Είναι απαραίτητο να διαθέτουμε αρκετή ποσότητα DNA σε κάθε δείγμα και σε καλή κατάσταση, να μην είναι δηλαδή διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι και πρωτόκολλα για την απομόνωση του DNA και εξαρτάται από το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό DNA, μιτοχονδριακό DNA, πλασμιδιακό DNA) καθώς επίσης και από το είδος και την ποσότητα των κυττάρων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε βάσει του κλασικού πρωτοκόλλου επώασης με πρωτεΐνάση K<sup>110</sup>.

Τα δείγματα αίματος κατά τη λήψη τοποθετούνταν σε σωλήνες falcon των 15 ml, που περιείχε 0,5 ml **EDTA 0,5M**. Το EDTA 0,5M είναι αντιπηκτικός παράγοντας και είναι δυνατό να αποφεύγεται η πήξη του αίματος και η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Τα δείγματα διατηρούνταν σε καταψύκτη στους -20° C. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,5 ml αίματος και η διαδικασία που ακολουθεί είναι η εξής:

Αρχικά, αφήνουμε τα δείγματα να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου ενώ βρίσκονται μέσα σε πάγο. Ανακινούμε ελαφρά κάθε δείγμα ώστε να μην πήξει το αίμα. Όταν ξεπαγώσουν εντελώς, μεταφέρουμε 0,5 ml αίματος σε σωλήνα erpendorf (2 ml) και προστίθεται 1 ml **SSC 1x**. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4° C για 3 min. Στη συνέχεια, απομακρύνεται 1 ml του υπερκείμενου και προστίθεται 1 ml **SSC 1x**. Πραγματοποιείται ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4° C για 1 min. Έπειτα, αφού απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο, προστίθεται 0,5 ml **NaOAc 0,2M**. Πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex και στη συνέχεια προστίθενται 50 μl SDS 5% και 5 μl **proteinase K (20 ng/μl)**. Αναδεύουμε τους σωλήνες και ακολουθεί επώαση για 1 h στους 55° C, με συχνή ανακίνηση των σωλήνων, κάθε ένα τέταρτο. Μετά την επώαση, προστίθενται 0,5 ml **φαινόλης** και 0,5 ml **chloroform [24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol]**, ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στους 4° C στις 13000 rpm. Με τη φυγοκέντρηση, δημιουργούνται τρεις στρώσεις, που είναι: μία ανώτερη υδατική φάση, μία κατώτερη οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα μεταξύ των δύο προηγούμενων φάσεων. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός της διαλυτής φάσης που περιέχει το DNA από την οργανική. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 1ml **chloroform [24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol]**, αναδεύουμε στο vortex και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 min στους 4° C στις 13000 rpm. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 1 ml **isopropanol**. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή

στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 15 min ή overnight. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml διαλύματος αιθανόλης 70%. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  στις 13000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο πολύ προσεκτικά ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα και στη συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο για ξήρανση για 1 ώρα στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Στόχος είναι να εξατμιστεί η αιθανόλη εντελώς και να μείνει μόνο το DNA, το οποίο θα είναι κολλημένο στα eppendorfs λόγω της προηγούμενης φυγοκέντρησης. Αφού στεγνώσει το DNA, προσθέτουμε 100 μl dd H<sub>2</sub>O για επαναδιάλυση του DNA. Αφήνουμε τα δείγματα στους  $4^{\circ}\text{C}$  για να επαναδιαλυθούν overnight. Για την αποθήκευση των δειγμάτων τα τοποθετούμε σε καταψύκτη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

**EDTA 0,5M:** Διαλύονται 93,1 gr Na<sub>2</sub>EDTA σε 400 ml H<sub>2</sub>O. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 8 με σταγόνες NaOH 10N. Συμπληρώθηκε ddH<sub>2</sub>O ως τα 500 ml. Ακολουθεί αποστείρωση.

**20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, pH 7.0):** Προσθήκη 175,4 gr NaCl και 88,2 gr Sodium citrate dehydrate σε 500 ml ddH<sub>2</sub>O. 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 προέκυψε από την αραιώση του παραπάνω διαλύματος.

**3M Sodium Acetate (NaOAc):** Διαλύονται 40,81 gr sodium citrate σε 80 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 5.2 με σταγόνες glacial acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH). Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O ως τα 100 ml. Ακολουθεί αποστείρωση. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε **Sodium Acetate (NaOAc) 0,2M**, το οποίο προέκυψε από την αραιώση του πυκνού διαλύματος.

**10% SDS:** Αναμειγνύονται 10 gr Electrophoresis grade SDS σε 90 ml ddH<sub>2</sub>O. Ανάδευση στους  $68^{\circ}\text{C}$  για επιτάχυνση της διάλυσης. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7,2 χρησιμοποιώντας σταγόνες HCl. Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100 ml. Μετά την αραιώση του διαλύματος 10% SDS προέκυψε το διάλυμα **5% SDS** που χρησιμοποιήθηκε.

**Chloroform [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol]:** Για την παρασκευή του διαλύματος αναμειγνύονταν 24 ml χλωροφορμίου και 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης.

Το διάλυμα **SSC** είναι ένα ήπιο διάλυμα που έχει το ρόλο ενός λυτικού διαλύματος. Έχει την ιδιότητα να λύει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να μπορέσουν τα επόμενα διαλύματα να επιδράσουν στις πυρηνικές μεμβράνες, ενώ το **NaOAc** χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.

Το **SDS** είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό το οποίο προκαλεί τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και γαλακτωματοποιεί τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Παρεμβαίνει στις πολικές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές των λιπιδίων και των πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.

Η **πρωτεΐνάση K** προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών, όπως οι νουκλεάσες που μπορούν να αποικοδομήσουν το DNA. Το ένζυμο παραμένει ενεργό κατά την παρουσία διάφορων χημικών ουσιών που αποδιατάσσουν πρωτεΐνες όπως είναι το SDS.

Η **φαινόλη** έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να διαχωρίζει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλειικά οξέα. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH >7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του **χλωροφορμίου** στην συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Προκαλεί επίσης τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η **ισοαμυλική αλκοόλη** μειώνει τον αφρό και σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ της υδατικής και της οργανικής, όπου συλλέγονται οι πρωτεΐνες.

Το DNA κατακρημνίζεται με **ισοπροπανόλη** και στη συνέχεια ακολουθεί πλήση με **αιθανόλη 70%**. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

### 2.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

Μετά την επαναδιάλυση του DNA ελέγχουμε την ύπαρξή του ποσοτικά και ποιοτικά. Ο ποσοτικός έλεγχος γίνεται με φωτομέτρηση ενώ ο ποιοτικός με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%.

Η μέθοδος της φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA απορροφά το υπεριώδες φως με μέγιστο στα 260 nm, λόγω της ύπαρξης των αρωματικών βάσεων, δηλαδή της αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Με τη φωτομέτρηση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του κάθε δείγματος DNA. Κατά τη διαδικασία της φωτομέτρησης, το δείγμα εκτίθεται στο υπεριώδες φως, σε μήκος κύματος 260 nm, και ένας φωτοανιχνευτής μετρά το φως που περνά διαμέσου του δείγματος. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του DNA.

Για τη διαδικασία αυτή, αραιώθηκε 1 μl δείγματος DNA σε 49 μl ddH<sub>2</sub>O. Η τιμή της απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του DNA του δείγματος. Η τιμή της απορρόφησης στα 280 nm μετράει τις προσμίξεις του δείγματος σε πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/280 αποτελεί δείκτη του περιεχομένου νουκλεϊκών οξέων/πρωτεϊνών στο δείγμα, δηλαδή της καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να έχει τιμές μεταξύ 1,80 – 2,00. Στην περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλη και η μέτρησή του δεν είναι ακριβής. Επίσης, η απορρόφηση στα 230 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οργανικών υπολειμμάτων ή αλάτων και ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5. Η σύγκριση γίνεται αυτόματα από το φωτόμετρο UV-Vis Erpendorf, το οποίο χρησιμοποιήθηκε.

Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του DNA, καθώς επίσης να ελέγξουμε εάν είναι συμπαγές ή σε θραύσματα. Η πηκτική αγαρόζης παρασκευάζεται με την διάλυση της αγαρόζης σε TAE 1x και το επακόλουθο βράσιμο ώστε να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Στην συνέχεια, προστίθεται βρωμιούχο αιθύδιο και αφότου αναδευτεί καλά το διάλυμα, ρίχνεται στο καλούπι όπου θα στερεοποιηθεί. Στο πάνω μέρος εφαρμόζεται μία «χτένα» όπου θα σχηματίσει εγκοπές (πηγάδια) για να «φορτωθούν» τα δείγματα.

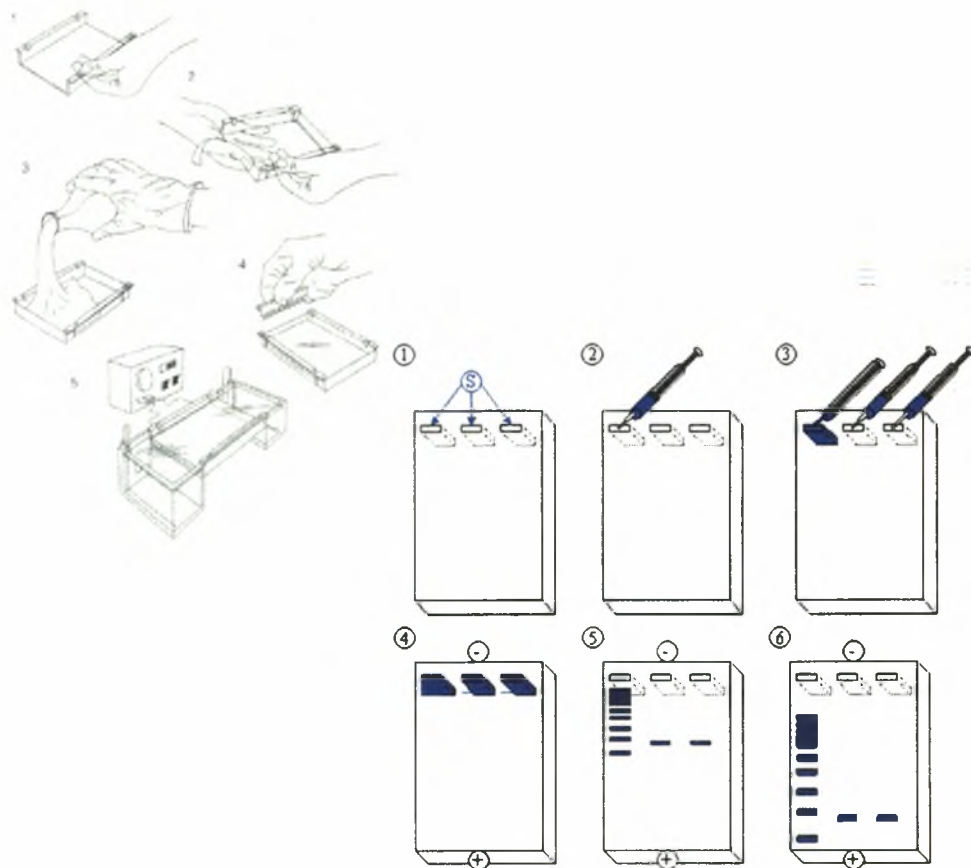


Το βρωμιούχο αιθύδιο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται (δεσμεύεται) ανάμεσα από τις βάσεις του DNA με αποτέλεσμα να το κάνει ορατό όταν διεγείρεται από υπεριώδες φώς(UV)<sup>5</sup>. «Φορτώνουμε» τα δείγματά μας χρησιμοποιώντας 3 μl DNA αναμειγμένο με 3 μl χρωστικής (loading buffer) (Εικόνα 19). Το buffer που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση είναι το TAE 1x, το οποίο πρέπει να καλύπτει τις θέσεις που φορτώνουμε το DNA (πηγάδια). Γενικά το DNA «τρέχει» 10% πιο γρήγορα όταν το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι το TAE σε σχέση με το TBE, αλλά το TAE έχει μικρότερη απομονωτική ικανότητα και γι' αυτό πρέπει να αντικαθίσταται συχνά<sup>109</sup>. Στη συνέχεια, κλείνουμε τη συσκευή και ορίζουμε την τάση γύρω στα 80-100 V. Έπειτα, μεταφέρουμε το gel σε συσκευή UV όπου μπορούμε να δούμε το DNA λόγω της ύπαρξης του βρωμιούχου αιθιδίου. Τέλος, μπορούμε να φωτογραφίσουμε το gel.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη είναι:

**TAE 50x:** Το TAE 50x παρασκευάζεται διαλύοντας 121 gr Tris base, 28,5 ml acetic acid και 50 ml EDTA 0,5M σε τελικό όγκο 500 ml. 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 5 ml γλυκερόλη 100%. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10 ml.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Προετοιμασία της πηκτής και "φόρτωση" των δειγμάτων<sup>109,110</sup>

## 2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοτεχνολογία με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Η PCR εφευρέθηκε από τον Kary Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με Νόμπελ Χημείας το 1993<sup>111</sup>.

Για να μελετήσουμε τους πολυμορφισμούς χρειάζεται να μελετήσουμε ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων TNFα, TNFR1 και TNFR2. Αυτό επιτυγχάνεται με την Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), όπου με την χρήση κατάλληλων εκκινητών μπορούμε να ενισχύσουμε ένα συγκεκριμένο τμήμα που μας ενδιαφέρει σε μεγάλες ποσότητες, χωρίς να χρειαστεί να καταφύγουμε σε κλωνοποίηση. Στην PCR χρησιμοποιείται μία DNA πολυμεράση για τη σύνθεση (τον πολλαπλασιασμό)

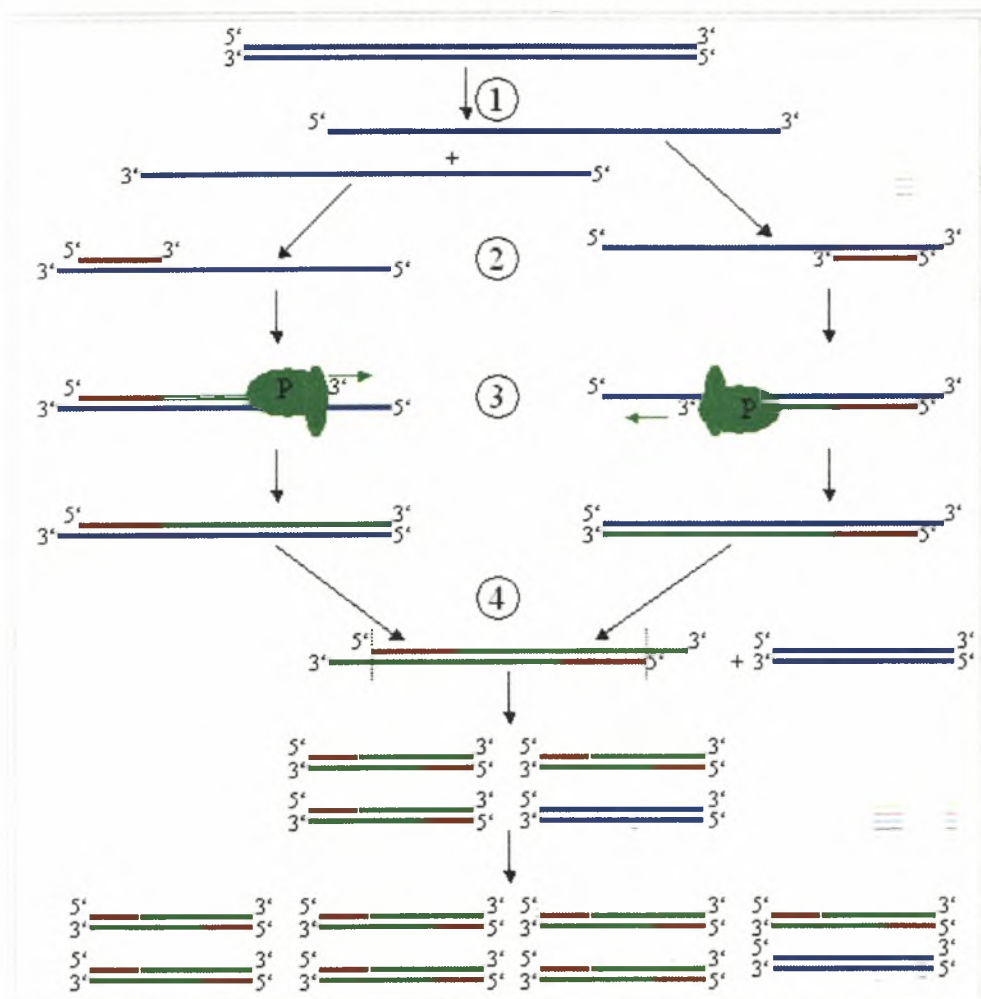
μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές, οι οποίοι χρειάζονται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA<sup>5</sup>.

Η PCR αποτελείται από 3 στάδια: αποδιάταξη, υβριδοποίηση/πρόσδεση των εκκινητών και επιμήκυνση. Κατά την αποδιάταξη λαμβάνει χώρα η θέρμανση του DNA έτσι ώστε να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA και να προκύψει μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία αυτή πλησιάζει συνήθως το σημείο βρασμού. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων.

Η DNA πολυμεράση δε μπορεί να συνθέσει από μόνη της τον συμπληρωματικό κλώνο διότι χρειάζεται πάντα ένα ελεύθερο 3' άκρο. Συνεπώς χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-22 βάσεων, που είναι συμπληρωματικοί σε αλληλουχίες εκατέρωθεν του τμήματος που θέλουμε να ενισχυθεί. Κατά το στάδιο, λοιπόν, της υβριδοποίησης γίνεται η πρόσδεση των εκκινητών στο DNA. Η θερμοκρασία πρόσδεσης δεν είναι συγκεκριμένη διότι εξαρτάται καθαρά από το μήκος του εκκινητή και από την περιεκτικότητά του σε GC και AT. Συνήθως οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε το περιεχόμενο σε GC να κυμαίνεται μεταξύ του 45% – 55%<sup>4</sup>. Ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός στο 5' άκρο του μονόκλωνου DNA με αποτέλεσμα να υπάρχει πάντα ελεύθερο 3' άκρο για να δράσει η DNA πολυμεράση. Λόγω της αντιπαράλληλης δομής του DNA, κατά τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων περιλαμβάνονται οι θέσεις που προσδένονται οι εκκινητές της αντίθετης φοράς. Κάθε φορά, δηλαδή, δημιουργούνται νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών.

Τέλος, μετά την υβριδοποίηση λαμβάνει χώρα το στάδιο της επιμήκυνσης, κατά το οποίο η DNA πολυμεράση δημιουργεί τον συμπληρωματικό κλώνο έχοντας ως μήτρα το μονόκλωνο DNA και αφετηρία το 3' άκρο του εκκινητή. Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα κύκλο της PCR και επαναλαμβάνονται πολλές φορές (συνήθως 30-40 κύκλοι) σε ειδικούς θερμοκυκλοποιητές που εναλλάσσουν τις θερμοκρασίες (Εικόνα 20). Σήμερα οι εφαρμογές και οι παραλλαγές της PCR είναι πολλές και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κληρονομικών ασθενειών, τη

διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, την κλωνοποίηση γονιδίων και τα τεστ πατρότητας.



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR<sup>112</sup>

Η παραγωγή του PCR προϊόντος είναι εκθετική διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την εφαρμογή της μεθόδου οι DNA πολυμεράσες οργανισμών όπως του ανθρώπου καταστρέφονται. Γι' αυτό, χρησιμοποιείται μία θερμοάντοχη Taq DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργή και σταθερή ακόμη και στους +95° C, θερμοκρασία κατά την οποία γίνεται η αποδιάταξη του DNA στόχου, αλλά και σε όλη τη διάρκεια των κύκλων πολλαπλασιασμού. Εκτός από την Taq DNA πολυμεράση και τους εκκινητές, στις

αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιούνται ιόντα  $Mg^{2+}$ , διότι η Taq DNA πολυμεράση τα χρησιμοποιεί ως μεταλλικό συμπράγοντα. Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Γενικά, περίσσεια  $Mg^{2+}$  θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη  $Mg^{2+}$  θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος. Τέλος, τον ακρογωνιαίο λίθο της αντίδρασης PCR αποτελούν τα dNTPs (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), όντας απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA.

Για τη μελέτη του κάθε πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (πίνακας 1), βάσει προηγούμενων μελετών στους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, που ενισχύουν ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων μόνο<sup>113-117</sup>.

**Πίνακας 1: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό**

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος
<b>TNF G-238A<sup>113</sup></b>	5' AACACAGACCACAGACCTGGTC 3' (Forward) 5' CTCACACTCCCCATCTCCCGGATC 3' (Reverse)	155 bp
<b>TNF G-308A<sup>114</sup></b>	5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3' (Forward) 5' TCATCTGGAGGAAGCGGTAG 3' (Reverse)	228 bp
<b>TNF C-857T<sup>115</sup></b>	5' GGCTCTGAGGAATGGGTAC 3' (Forward) 5' CCTCTACATGGCCCTGTCTAC 3' (Reverse)	128 bp
<b>TNFR1 A36G<sup>116</sup></b>	5' GAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGG 3' (Forward) 5' ACCAGGCCCGGCAGGAGAG 3' (Reverse)	183 bp
<b>TNFR2 T676G<sup>117</sup></b>	5' ACTCTCCTATCCTGCCTGCT 3' (Forward) 5' TTCTGGAGTTGGCTGCGTGT 3' (Reverse)	242 bp

Ο reverse εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμορφισμό TNF G-238A περιλαμβάνει στην αλληλουχία του μία θέση αναγνώρισης για ένζυμο περιορισμού, η οποία δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Ο forward εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμορφισμό TNF G-308A περιλαμβάνει, επίσης, μία θέση ενζύμου περιορισμού, που δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Στον πίνακα 1 σημειώθηκαν τα νουκλεοτίδια των εκκινητών που διαφέρουν από την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου.

Όλες οι αντιδράσεις της PCR είχαν τελικό όγκο 25 μl. Αρχικά παρασκευαζόταν το μίγμα της αντίδρασης (master mix) που περιείχε όλα τα



απαραίτητα αντιδραστήρια εκτός από το DNA. Συνήθως, υπολογίζαμε τις ποσότητες για n+1 αντιδράσεις έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι θα υπάρχει αρκετό μίγμα για τις αντιδράσεις που θέλαμε. Στη συνέχεια το μοιράζαμε στα σωληνάκια με το ίδιο αποστειρωμένο tip, έτσι ώστε να περιορίσουμε τις απώλειες. Έπειτα, προσθέταμε το DNA κάθε δείγματος σε διαφορετικό σωληνάκι και αφού ανακατεύαμε καλά το περιεχόμενο καθενός σωληνάκι εκτελούσαμε ένα spin 4 δευτερολέπτων. Τέλος, τοποθετούσαμε τα σωληνάκια στο μηχάνημα της PCR και ενεργοποιούσαμε το πρόγραμμα με τις επιθυμητές συνθήκες.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούσαμε για κάθε αντίδραση των πολυμορφισμών φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2: Αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR**

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR1 A36G, TNFR2 T676G		TNF G-238A	
	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dH <sub>2</sub> O		17,5 μl		17 μl
PCR Buffer (10x) + Mg (1,5mM)	1x	2,5 μl	1x	2,5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 mM	-	2 mM	0,5 μl
dNTPs (40mM)	0,8 mM	0,5 μl	0,8 mM	0,5 μl
Primer forward (50 pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl	1 pmol/μl	0,5 μl
Primer reverse (50 pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl	1 pmol/μl	0,5 μl
Taq polymerase (5U/ml)	1 U/ml	0,5 μl	1 U/ml	0,5 μl
DNA		~2 μl		~2 μl
Τελικός όγκος		25 μl		25 μl

Οι συνθήκες της PCR για τον κάθε πολυμορφισμό φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3: Οι συνθήκες PCR για κάθε πολυμορφισμό**

Πολυμορφισμός	Συνθήκες PCR	Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub> (mM)
<b>TNF G-238A</b>	95° C → 5 min 95° C → 45 sec 58° C → 45 sec 72° C → 45 sec 72° C → 10 min Hold 4° C } x 34	2,0 mM
<b>TNF G-308A</b>	95° C → 5 min 95° C → 45 sec 57° C → 45 sec 72° C → 45 sec 72° C → 10 min Hold 4° C } x 34	1,5 mM
<b>TNF C-857T</b>	95° C → 5 min 95° C → 45 sec 58° C → 45 sec 72° C → 45 sec 72° C → 10 min Hold 4° C } x 34	1,5 mM
<b>TNFR1 A36G</b>	95° C → 5 min 95° C → 45 sec 58° C → 45 sec 72° C → 45 sec 72° C → 10 min Hold 4° C } x 34	1,5 mM
<b>TNFR2 T676G</b>	95° C → 5 min 95° C → 45 sec 58° C → 45 sec 72° C → 45 sec 72° C → 10 min Hold 4° C } x 34	1,5 mM

Μετά την PCR ελέγχεται το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Γι' αυτό παρασκευάζεται μία πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Αφού κρυώσει η πηκτή, ηλεκτροφορούμε 5 μl από το κάθε δείγμα μας, αναμειγμένο με 3 μl χρωστικής (loading buffer). Αφότου εφαρμόσουμε τάση και τα δείγματα να «τρέξουν» λίγη ώρα, παρατηρούμε την πηκτή σε συσκευή UV.

Όταν διαπιστώθηκε ότι η αντίδραση δούλεψε σωστά, δηλαδή κάθε δείγμα είχε την επιθυμητή μπάντα χωρίς παραπροϊόντα, και ότι το αρνητικό control ήταν καθαρό, τότε ακολουθήσαμε τη διαδικασία του καθαρισμού του PCR προϊόντος. Στόχος αυτής της τεχνικής είναι να έχουμε όσο το δυνατόν καθαρότερο PCR προϊόν, απαλλαγμένο από τα αντιδραστήρια της PCR. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.

## **2.5 Καθαρισμός PCR προϊόντος**

Χρησιμοποιούμε τα 20 μl PCR προϊόντος, τα οποία τα μεταφέρουμε σε σωλήνες erpendorf των 1,5 ml και προσθέτουμε 30 μl dH<sub>2</sub>O, έχοντας τελικό όγκο 50 μl. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 25 μl phenol και 25 μl chloroform [24:1 (v/v) chloroform- isoamyl alcohol]. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min με στόχο τον χωρισμό της διαλυτής φάσης που περιέχει το DNA από την οργανική. Έπειτα, μεταφέρουμε το υπερκείμενο (διαλυτή φάση) σε ένα καθαρό erpendorf αφού προσθέσουμε 50 μl chloroform [24:1 (v /v) chloroform- isoamyl alcohol] ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min. Πραγματοποιείται μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα καθαρό erpendorf και προσθήκη 5 μl NaOAc 3M και 125μl EtOH 100%. Αφού αναδεύσουμε τα δείγματα ώστε να γίνει ομοιογενές το διάλυμα, τα μεταφέρουμε στους -20° C, όπου μπορούν να παραμείνουν για 20 min ή overnight. Ακολουθεί καθίζηση του DNA με φυγοκέντρηση στις 13000, στους 4° C για 15 min. Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο, που είναι η αιθανόλη, και αφήνουμε το ίζημα να ξηραθεί στους 37° C για 1 – 1½ ώρα. Τέλος, επαναδιαλύουμε το DNA σε 20 μl dH<sub>2</sub>O.

## **2.6 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)**

Μετά το στάδιο του καθαρισμού τα δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού εφαρμόζοντας τη μέθοδο RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Στόχος της μεθόδου είναι να εντοπίσουμε τυχόν πολυμορφισμούς που επηρεάζουν τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού, με αποτέλεσμα την παραγωγή τμημάτων DNA διαφορετικού

μήκους. Συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί μπορεί να δημιουργούν ή να καταργούν θέσεις κοπής του DNA από ένζυμα περιορισμού, γι' αυτό και είναι από τις πιο ευρείες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για γονοτύπηση<sup>4</sup>.

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώθηκαν από βακτήρια. Τα βακτήρια διαθέτουν αυτά ένζυμα ως ένα μηχανισμό άμυνας κατά του εξωγενούς DNA που μπορεί να εισέλθει μέσω ιών ή φάγων και το κόβουν επιλεκτικά σε πολλά κομμάτια, καθιστώντας το έτσι ανενεργό. Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται διότι είναι μεθυλιωμένο. Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA μήκους 4-8 bp συνήθως<sup>5</sup>. Η αναγνώριση αυτή οδηγεί στην κοπή του τμήματος παράγοντας ένα, δύο ή περισσότερα τμήματα, ανάλογα αν το αρχικό τμήμα είναι γραμμικό ή κυκλικό και πόσες θέσεις κοπής απαντώνται. Συγκρίνοντας το μέγεθος και τον αριθμό των τμημάτων που έχουν παραχθεί από μία συγκεκριμένη περιοχή μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, μπορούμε να συνθέσουμε τον χάρτη περιορισμού της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία καθενός σημείου περιορισμού. Το πρότυπο που προκύπτει μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση του συγκεκριμένου τμήματος DNA και για τον έλεγχο ορισμένων αλλαγών στο μέγεθος, στη δομή ή στην αλληλουχία του DNA. Η τοποθεσία και η σειρά των θέσεων περιορισμού πάνω στο τμήμα DNA είναι μοριακό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου τμήματος<sup>118</sup>.

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο ή περισσότερων ομόλογων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους, ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLPs-Restriction Fragment Length Polymorphism). Η διαφορά ανιχνεύεται λόγω των διαφορετικών τμημάτων που προκύπτουν μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού. Τα RFLPs αποτελούν τη βάση των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης και χαρτογράφησης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για κλινικές αναλύσεις δομικών αλλαγών στα χρωμοσώματα που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες (όπως μετατοπίσεις, ελλείμματα, προσθήκες, αντικαταστάσεις



βάσεων κλπ). Επίσης, το RFLP βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης κάποιας ασθένειας ή στον προσδιορισμό πατρότητας<sup>118</sup>.

Οι θέσεις όπου κόβουν τα ένζυμα περιορισμού είναι συνήθως πολυμορφικές και κληρονομήσιμες ούτως ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Ανάμεσα στα γονιδιώματα δύο τυχαίων (μη συγγενικών) ατόμων συναντώνται διαφορές με συχνότητα περίπου 1:1000 ζεύγη βάσεων. Ορισμένες από αυτές αφορούν κάποια θέση περιορισμού, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην κόβει πλέον το DNA στη θέση αυτή και να παράγεται ένα τμήμα DNA μεγαλύτερου μήκους. Τμήματα διαφορετικού μήκους παράγονται επίσης στις περιπτώσεις κατά τις οποίες παραμένουν ανέπαφες οι θέσεις περιορισμού και των δύο χρωμοσωμάτων, αλλά υπάρχει προσθήκη ή έλλειμμα ενός τμήματος DNA ανάμεσα σε δύο διαδοχικές θέσεις-στόχους του ενζύμου, με αποτέλεσμα να αλλάζει η σχετική απόστασή τους στα δύο χρωμοσώματα. Έτσι, είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων ενός ατόμου ή τα χρωμοσώματα διαφορετικών ατόμων. Ένα άτομο με δύο διαφορετικές παραλλαγές ενός γενετικού τόπου είναι ετερόζυγο ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό RFLP. Επειδή το χαρακτηριστικό πρότυπο πολυμορφισμών RFLP κληρονομείται όπως ακριβώς ένα γονίδιο, η παρακολούθηση των πολυμορφικών τμημάτων – δεικτών RFLP μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την πορεία των αντίστοιχων χρωμοσωμάτων, καθώς αυτά περνάνε από γενιά σε γενιά. Τις περισσότερες φορές ο πολυμορφισμός RFLP δεν είναι η αιτία μιας ασθένειας αλλά ένα παρατηρήσιμο χαρακτηριστικό που υποδεικνύει τους φορείς της ή την προδιάθεση<sup>5</sup>.

Συνήθως τα προϊόντα της PCR επιλέγονται έτσι ώστε να περιλαμβάνουν μία πολυμορφική αλληλουχία αναγνώρισης από κάποιο ένζυμο περιορισμού. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει κάποια αλληλουχία αναγνώρισης, τότε δημιουργείται τεχνητά, συμπεριλαμβάνοντας την επιθυμητή αλληλουχία στους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR<sup>4,119</sup>. Για κάθε πολυμορφισμό που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκε και ένα διαφορετικό ένζυμο περιορισμού. Κάθε ένζυμο κόβει το PCR προϊόν αναγνωρίζοντας μία μόνο συγκεκριμένη αλληλουχία με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο νέα τμήματα DNA.

Συγκεκριμένα για τον **TNF G-238A** χρησιμοποιήθηκε το **BamHI**, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία **gGATCC** και δημιουργεί κολλώδη άκρα. Το πρώτο G σε αυτή την αλληλουχία είναι η θέση του πολυμορφισμού. Έτσι όταν η βάση που υπάρχει είναι G τότε το ένζυμο κόβει και προκύπτουν δύο τμήματα μήκους 130 bp και 25 bp. Εάν η βάση είναι A τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει και έχουμε ένα τμήμα μόνο, μήκους 155 bp.

Για τον **TNF G-308A** χρησιμοποιήσαμε το **NcoI**, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία **CCATGg** και δημιουργεί κολλώδη άκρα. Το δεύτερο G είναι η θέση του πολυμορφισμού και ανάλογα με την βάση που βρίσκεται σ' αυτή τη θέση, το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να κόβει ή όχι το τμήμα DNA. Εάν στη θέση αυτή υπάρχει G τότε το ένζυμο κόβει και προκύπτουν δύο τμήματα DNA, ένα 20 bp και ένα 208 bp. Εάν το G αντικαθίσταται από A τότε το ένζυμο δεν βρίσκει την αλληλουχία αναγνώρισης με αποτέλεσμα το προϊόν της PCR να παραμένει άκοπο, μήκους 228 bp.

Όσον αφορά τον **TNF C-857T** χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο **HpyCH4IV**. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι **AcGT**, και η δεύτερη βάση στην αλληλουχία αναγνώρισης, το C, είναι η θέση του πολυμορφισμού. Έτσι, όταν το ένζυμο βρίσκει αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα DNA σε δύο τμήματα μήκους 106 bp και 22 bp. Στην περίπτωση που στη θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει και το προϊόν παραμένει άκοπο, μήκους 128 bp. Και αυτό το ένζυμο δημιουργεί κολλώδη άκρα.

Για τον πολυμορφισμό του **TNFR1 A36G** χρησιμοποιήθηκε το **MspA1I**, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία **CCgCTG**, το οποίο δημιουργεί τυφλά άκρα στα προκύπτοντα τμήματα. Ο πολυμορφισμός είναι στην τρίτη βάση της αλληλουχίας αναγνώρισης. Όταν υπάρχει A το ένζυμο δε μπορεί να κόψει επομένως το PCR προϊόν παραμένει άκοπο μεγέθους 183 bp. Όταν στη θέση του A υπάρχει G τότε το ένζυμο αναγνωρίζει τη θέση κοπής και προκύπτουν δύο τμήματα DNA μήκους 75 bp και 108 bp.

Τέλος, για τον πολυμορφισμό του **TNFR2 T676G** χρησιμοποιήθηκε το **NlaIII**. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι **CAtG**, όπου T είναι η θέση του πολυμορφισμού. Το ένζυμο αναγνωρίζοντας αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα



DNA και προκύπτουν δύο νέα τμήματα μήκους 134 bp και 108 bp. Όταν το T αντικαθίσταται από G τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει το τμήμα DNA, το οποίο είναι μήκους 242 bp. Τα προκύπτοντα τμήματα έχουν κολλώδη άκρα.

**Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση των ενζύμων και των προϊόντων πέψης**

SNP	Ένζυμο περιορισμού	Προϊόντα πέψης	Άκοπο προϊόν	Αλληλουχία αναγνώρισης
<b>TNF G-238A</b>	BamHI	130 bp, 25 bp	155 bp	5' g/GATCC 3' 3' cCTAG/G 5'
<b>TNF G-308A</b>	NcoI	208 bp, 20 bp	228 bp	5' C/CATGg 3' 3' GGTAC/c 5'
<b>TNF C-857T</b>	HpyCH4IV	106 bp, 22 bp	128 bp	5' A/cGT 3' 3' TgC/A 5'
<b>TNFR1 A36G</b>	MspA1I	108 bp, 75 bp	183 bp	5' CMg/CKG 3' 3' GKc/GMC 5'
<b>TNFR2 T676G</b>	NlaIII	134 bp, 108 bp	242 bp	5' CATg/ 3' 3' /GTaC 5'

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας *New England Biolabs*. Κάθε ένζυμο περιορισμού χρειάζεται ένα συγκεκριμένο buffer το οποίο βελτιστοποιεί τις αποδόσεις του ενζύμου. Συγκεκριμένα, το NcoI χρησιμοποιήθηκε με το buffer 3, το BamHI με το buffer 3, το HpyCH4IV με το buffer 1, το MspA1I με το buffer 4 και το NlaIII με το buffer 4. Η αρχική συγκέντρωση του buffer είναι 10x και σε κάθε αντίδραση ήταν επιθυμητή η αραιώσή του σε 1x. Επιπλέον, με τα ένζυμα BamHI, MspA1I και NlaIII χρειαζόταν να χρησιμοποιήσουμε BSA (10 mg/ml). Η BSA (Bovine Serum Albumin) είναι μία πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται κατά κόρον στις πέψεις λόγω της ιδιότητάς της να σταθεροποιεί τα ένζυμα κατά τη διάρκεια της πέψης του DNA. Η ύπαρξη της BSA στην πέψη εμποδίζει την προσκόλληση του ενζύμου στους σωλήνες της αντίδρασης. Η πρωτεΐνη αυτή δεν επηρεάζει τα ένζυμα που δε τη χρειάζονται για σταθεροποίηση. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό άλλων πρωτεϊνών, συγκρίνοντας πρωτεΐνη

άγνωστης ποσότητας με γνωστή ποσότητα BSA. Για κάθε αντίδραση η επιθυμητή ποσότητα BSA που χρησιμοποιήθηκε είναι 100 µg/ml. Η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου είναι 10000 U/ml.

Αρχικά, φτιάχναμε ένα μίγμα που περιείχε dH<sub>2</sub>O, το Buffer που ήταν κατάλληλο για το κάθε ένζυμο και το ένζυμο περιορισμού. Επιπλέον προστίθεται το BSA, μόνο για τα μίγματα που χρειαζόταν. Από το μίγμα μοιραζόταν 5 µl σε κάθε σωλήνα που θα χρησιμοποιούσαμε για την πέψη. Συνήθως, οι αναλογίες υπολογίζονταν για ένα επιπλέον για να αποφύγουμε τυχόν απώλειες λόγω χειρισμού των πιπετών. Έπειτα, σε κάθε σωλήνα προσθέταμε 5 µl από το καθαρισμένο PCR προϊόν, με αποτέλεσμα να έχουμε τελικό όγκο 10 µl. Αφού ανακατεύαμε καλά και εκτελούσαμε ένα spin 4 δευτερολέπτων, τοποθετούσαμε τα δείγματα στον κλίβανο, στους 37° C, overnight. Τα ένζυμα για να δράσουν και να μπορέσουν να κόψουν το DNA, πρέπει να βρίσκονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία που να τα ευνοεί. Αυτή συνήθως είναι οι 37° C διότι για τα περισσότερα βακτήρια αυτή είναι η μέγιστη θερμοκρασία που παραμένουν ενεργά.

Αναλυτικά, οι αναλογίες του μίγματος της πέψης είναι οι εξής:

**Πίνακας 5: Αναλογίες των αντιδραστηρίων για τις πέψεις με ένζυμο περιορισμού**

Αντιδραστήρια	BamHI	NcoI	HpyCH4IV	MspA1I	NlaIII
Buffer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Ένζυμο περιορισμού	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
BSA	0,1 µl	-	-	0,1 µl	0,1 µl
dH <sub>2</sub> O	3,7 µl	3,8 µl	3,8 µl	3,7 µl	3,7 µl
Τελικός όγκος	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Μετά την πέψη, ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να διαπιστώσουμε πως έδρασε το ένζυμο. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι είτε αγαρόζης είτε πολυακρυλαμίδης. Συνήθως, η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη γίνεται όταν μελετάμε τμήματα μεγαλύτερα των 200 bp. Ωστόσο, προτιμάται η

ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη λόγω της καλύτερης διακριτικής ικανότητας. Ο διαχωρισμός των επιθυμητών τμημάτων γίνεται καλύτερα και είναι δυνατή η διάκριση τμημάτων που διαφέρουν ακόμα και 20 bp. Στους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκε μόνο η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη διότι τα τμήματα των υπό μελέτη τμημάτων DNA είναι σχετικά μικρά.

Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης, αρχικά ετοιμάζουμε τα τζάμια που θα χρησιμοποιήσουμε, τα οποία τα στήνουμε σε ένα ειδικό στατώ. Τα τζάμια που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά και σχηματίζουν ένα ειδικό άνοιγμα ώστε να μπορούμε να ρίξουμε το μίγμα πριν κρυσταλλώσει και πήξει. Στα δύο άκρα των τζαμιών και κατακόρυφα τοποθετούμε spacers έτσι ώστε να δημιουργήσουμε το επιθυμητό πάχος στο gel. Τα spacers που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος 2 εκατοστά και παρασκευάζουμε ανάλογη ποσότητα πηκτής. Αφού σταθεροποιήσουμε τα τζάμια στο στατώ και σιγουρευτούμε ότι δε θα έχουμε διαρροές, αρχίζουμε την παρασκευή του διαλύματος.

#### **Παρασκευή 62,5 ml πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%**

Για την παρασκευή ενός gel πολυακρυλαμίδης, πάχους 2 εκατοστών, αναμειγνύουμε 8 gr ουρία, 16,625 ml μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%, 8,25 ml TBE 10x, τα οποία τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με λίγο νερό και ένα μαγνήτη ανάδευσης. Το μείγμα αφήνεται να ομογενοποιηθεί σε ένα αναδευτήρα. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται και μεταφέρεται σε ένα ογκομετρικό σωλήνα. Αφού διηθηθεί το μίγμα συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O έως τα 62,5 ml. Έπειτα, μεταφέρουμε το διάλυμα σε μία κωνική φιάλη και προστίθενται 83,75 ml TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 500 μl APS 20% (Ammonium Persulfate). Αφού αναδεύσουμε λίγο το περιεχόμενο της κωνικής, ρίχνουμε γρήγορα το διάλυμα στα τζάμια πριν πήξει και τοποθετούμε τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα «πηγαδάκια». Συμπληρώνουμε στις άκρες με το διάλυμα που περίσσεψε έτσι ώστε να αντικαταστήσουμε τυχόν ποσότητα του διαλύματος που μπορεί να χύθηκε επειδή τοποθετήσαμε τα χτενάκια. Το αφήνουμε να πήξει καλά γύρω στη μισή ώρα.

Αφότου πήξει το gel βγάζουμε τα τζάμια από το στατώ και τα χτενάκια. Καθαρίζουμε λίγο τα «πηγαδάκια» διότι η αφαίρεση της χτένας μπορεί να αφήσει

υπολείμματα ακρυλαμίδης. Έπειτα τοποθετούμε τα τζάμια στη συσκευή, γεμίζουμε με TBE 1x την συσκευή και ανάμεσα από τα τζάμια έτσι ώστε να δημιουργηθεί κύκλωμα. Στην συνέχεια, «φορτώνουμε» τα δείγματα βάζοντας πρώτα ένα μάρτυρα μοριακών βαρών, συνήθως 100 bp, 5 μl ενός από τα καθαρισμένα δείγματα που θα χρησιμεύει ως άκοπο και τέλος φορτώνουμε και τα 10 μl των δειγμάτων μετά από πέψη. Κάθε δείγμα που θα «φορτώσουμε» αναμειγνύεται με 5 μl χρωστικής (loading buffer), έτσι ώστε το δείγμα να επικαθίσει στη βάση των πηγαδιών. Κλείνουμε τη συσκευή και ορίζουμε την τάση γύρω στα 210-230 V, σε θερμοκρασία δωματίου. Συνήθως, χρειάζονται 2-2,5 ώρες για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 21).

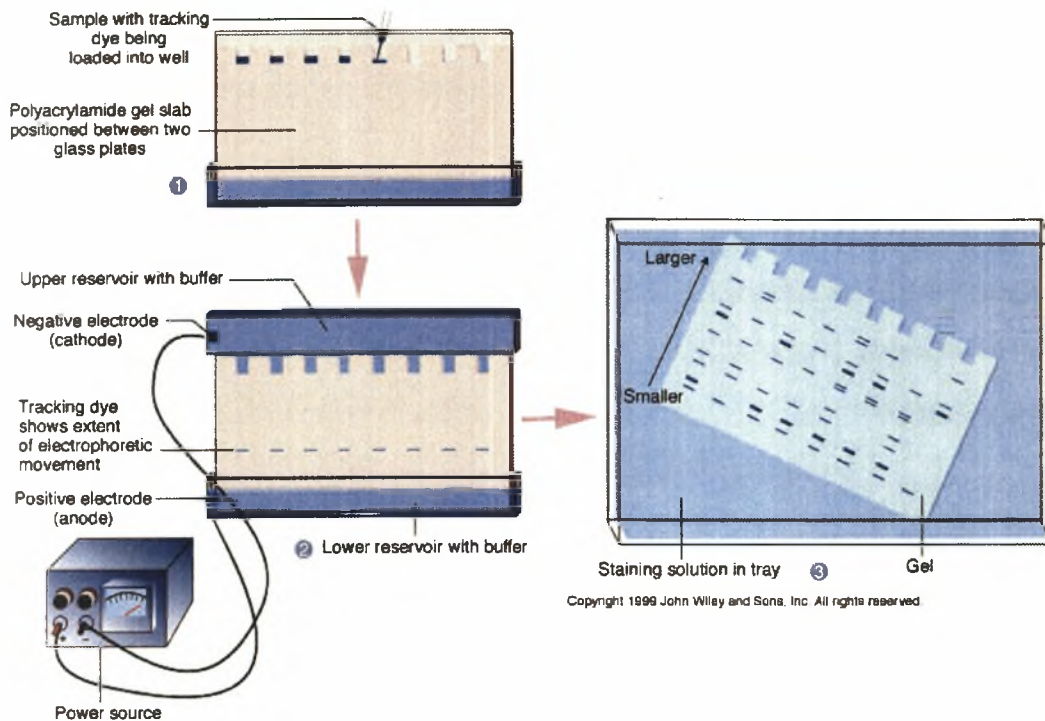
Συνήθως, χρησιμοποιήθηκαν τα spacers 2 εκατοστών και φτιάχναμε 2 πηκτές πολυακρυλαμίδης, άρα οι αναλογίες ήταν 16 gr ουρία, 33,25 ml μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30% και 16,5 ml TBE 10x.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι τα ακόλουθα:

**Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:** Το μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30% παρασκευάζεται με τη διάλυση 29 gr acrylamide 99% με 1 gr bis acrylamide σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.

**TBE 10x:** Το TBE 10x αποτελείται από Tris base, Boric Acid, EDTA 0,5M. Διαλύονται 60,5 gr Tris Base μαζί με 30,85 gr Boric Acid και 25 ml EDTA 0,5M σε 80 ml ddH<sub>2</sub>O. Αφότου διαλυθούν συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O. Αναδεύουμε ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (RFLP) και ακόλουθη χρώση<sup>120</sup>

## 2.8 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, πρέπει να βάψουμε την πηκτή ώστε να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα. Αυτό γίνεται με την χρώση **silver staining** (χρώση με νιτρικό άργυρο). Ο νιτρικός άργυρος έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA και στη συνέχεια να αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης, με αποτέλεσμα η πηκτή να βάφεται σε φόντο κίτρινο και οι ζώνες με τα επιθυμητά τμήματα να βάφονται σκούρο καφέ<sup>109,121</sup>.

Η διαδικασία που ακολουθείται στην χρώση αποτελείται από τρία στάδια και σε κάθε στάδιο χρησιμοποιείται και ένα διαφορετικό διάλυμα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για αυτήν την χρώση είναι τα ακόλουθα:

**Διάλυμα 1:** Αρχικά σε 380 ml dd H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 8 ml **αιθανόλη 100%** και 0,5 ml **οξικό οξύ**. Στη συνέχεια συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O έτσι ώστε να έχουμε τελικό όγκο 400 ml. Κατόπιν εκτελούμε 2 πλύσεις με 200 ml κάθε φορά για 5 min. Έπειτα ξεπλένουμε μία φορά με ddH<sub>2</sub>O για 2 min.



**Διάλυμα 2:** Σε 200 ml dd H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 0,2 gr AgNO<sub>3</sub>, εκτελούμε μία πλύση με 200 ml για 15 min. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O, για 2 min κάθε φορά.

**Διάλυμα 3:** Σε 180 ml ddH<sub>2</sub>O προσθέτουμε 3 gr NaOH, 0.01 gr NaBH<sub>4</sub> (Natriumborhydrid) και 1 ml HCHO (φορμαλδεΐδη). Προσθέτουμε ddH<sub>2</sub>O μέχρι να συμπληρωθούν τα 200 ml. Αναδεύουμε καλά με τη βοήθεια ενός μαγνήτη πάνω σε έναν αναδευτήρα. Αφήνουμε το διάλυμα στο gel μέχρι να είναι ευδιάκριτα ορατές οι μπάντες που μας ενδιαφέρουν. Ξεπλένουμε μία φορά με ddH<sub>2</sub>O.

Μετά την χρώση και με τη βοήθεια του μάρτυρα και του άκοπου δείγματος μπορούμε να διαπιστώσουμε αν στα δείγματα υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού που χρησιμοποιήσαμε ή όχι. Υπάρχουν τρία ενδεχόμενα, το ένζυμο να κόβει στην θέση αναγνώρισης και το δείγμα να είναι ομόζυγο, το ένζυμο να μην έκοψε, διότι δεν υπάρχει η αλληλουχία αναγνώρισης και το δείγμα να είναι επίσης ομόζυγο και τρίτον το δείγμα να είναι ετερόζυγο, δηλαδή στο ένα ομόλογο χρωμόσωμα να υπάρχει η θέση αναγνώρισης για το ένζυμο και στο άλλο ομόλογο χρωμόσωμα να μην υπάρχει. Κάθε πολυμορφισμός είναι διαφορετικός και απαντάται με διαφορετική συχνότητα στον εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμό.

## **2.9 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για κάθε πολυμορφισμό ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών.

Η μεταβολή στον δείκτη DAS28 των ασθενών  $\geq 0,6$  θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες (etanercept, infliximab, adalimumab). Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη DAS28  $< 0,6$  υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες. Άτομα που έχουν λάβει περισσότερους από ένα αντί – TNF παράγοντα μελετήθηκαν ανεξάρτητα, αποτελώντας ξεχωριστό δείγμα για κάθε φάρμακο.



Οι συχνότητες των αλληλόμορφων εκτιμήθηκαν με την μέθοδο καταμέτρησης των γονιδίων. Διεξήχθησαν δοκιμές  $\chi^2$  για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για όλους τους πολυμορφισμούς οι πληθυσμοί των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 3 και 6 μήνες θεραπείας για κάθε φάρμακο ξεχωριστά, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας  $2 \times 2$  πίνακες συνάφειας και ομαδοποιώντας τους ετερόζυγους και τους ομόζυγους για το σπάνιο αλληλόμορφο σε κάθε περίπτωση και συγκρίνοντάς το με το ρίσκο της ομάδας του κοινού αλληλόμορφου. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p \leq 0.0001$ <sup>104</sup>. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση των στατιστικών προγραμμάτων SPSS 14 και SISA<sup>122</sup>.

Ο υπολογισμός της ισχύς της μελέτης για την ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ γονότυπου και μεταβολή της ανταπόκρισης της αντί – TNF $\alpha$  θεραπείας (DAS28) κατά 0,6 μονάδες πραγματοποιήθηκε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος *Quanto*, όπως σε προηγούμενες μελέτες<sup>123</sup>. Ειδικότερα, ο υπολογισμός της ισχύς του κάθε πληθυσμιακού δείγματος έγινε με τις ίδιες τιμές σε μέση μεταβολή και τυπική απόκλιση της ανταπόκρισης στην θεραπεία, που ήταν 2,5 και 1,5 αντίστοιχα.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία έλαβαν μέρος συνολικά 78 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, που λάμβαναν θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες για τουλάχιστον 6 μήνες. Κάποιοι από τους ασθενείς έχουν λάβει περισσότερους από έναν αντί – TNF παράγοντα. Αυτές οι περιπτώσεις μελετήθηκαν ανεξάρτητα ανεβάζοντας τον αριθμό των ασθενών, υπό μελέτη, στους 100. Οι αντί – TNF παράγοντες που χορηγήθηκαν στους ασθενείς της παρούσας μελέτης είναι το infliximab, το etanercept και το adalimumab. Έγινε γονοτύπηση των ασθενών για πέντε πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τον TNFα και τους υποδοχείς του. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι οι εξής: TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR1 A36G, TNFR2 T676G.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση των γονοτύπων των ασθενών και η συσχέτισή τους με την μεταβολή της ανταπόκρισής τους στην αντί – TNF θεραπεία, ώστε να βρεθεί κάποιος απλότυπος που να μπορεί να προβλέψει πειστικά την ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία πριν τη χορήγησή της.

#### 3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη θεραπεία φαίνονται στον πίνακα 6. Επιπλέον, φαίνεται ποιο φάρμακο χορηγήθηκε στον κάθε ασθενή, καθώς επίσης και ποιοι ασθενείς έλαβαν περισσότερους από ένα αντί – TNF παράγοντα.

Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Διάρκεια Ασθένειας	ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ	Φάρμακο	DAS28		
						DAY0	WEEK12	WEEK24
1	F	1966	12	Όχι	REMICADE	7,56	6,22	4,38
2	F	1932	5	Όχι	HUMIRA	5,38	3,65	2,96
3	F	1953	15	Όχι	ENBREL	3,00	2,02	1,32
				Όχι	HUMIRA	4,57	3,81	3,56

4	F	1949	28	Όχι	ENBREL	4,06	4,57	5,08
5	F	1964	16	Όχι	HUMIRA	3,62	2,67	2,51
6	F	1956	29	Όχι	HUMIRA	6,60	4,00	3,20
7	F	1954	6	Όχι	HUMIRA	5,62	5,22	2,47
8	F	1948	9	Remicade: αλλεργική αντίδραση	REMICADE	5,41	4,22	4,24
					HUMIRA	4,97	4,07	5,54
9	F	1946	19	Όχι	REMICADE	4,91	2,30	2,94
10	F	1943	8	Όχι	HUMIRA	6,57	4,58	3,15
11	F	1956	25	MabThera: αλλεργική αντίδραση	REMICADE	5,57	4,74	2,95
				Όχι	ENBREL	6,72	4,17	6,42
12	F	1953	15	Όχι	REMICADE	6,88	6,11	6,11
					ENBREL	4,79	5,20	5,24
					HUMIRA	5,83	6,38	5,80
13	F	1952	7	Όχι	HUMIRA	5,43	5,32	5,49
14	F	1975	11	Remicade: εξάνθημα	REMICADE	6,03	3,69	3,69
					ENBREL	3,67	3,36	3,50
15	F	1954	22	Όχι	HUMIRA	6,61	3,41	1,50
16	F	1977	5	Όχι	HUMIRA	6,46	4,84	7,31
17	F	1962	12	Όχι	REMICADE	6,09	3,73	4,69
					ENBREL	4,34	5,29	3,34
18	F	1948	6	Όχι	REMICADE	5,79	3,36	5,71
19	F	1938	24	Όχι	REMICADE	7,12	5,57	6,41
20	F	1973	20	Όχι	ENBREL	4,10	3,87	3,89
21	F	1960	13	Όχι	HUMIRA	5,68	5,47	3,93
22	F	1954	18	Όχι	HUMIRA	6,65	3,69	3,33
23	F	1948	10	Όχι	ENBREL	4,77	4,29	5,13
				Όχι	HUMIRA	5,23	5,34	4,77
24	F	1985	6	Όχι	ENBREL	5,91	3,66	2,40
25	F	1945	11	Όχι	HUMIRA	6,67	6,67	6,67
26	M	1944	7	Όχι	HUMIRA	4,80	2,50	2,80
27	F	1956	12	Όχι	ENBREL	5,92	6,56	5,56
					HUMIRA	5,97	5,97	5,42
29	F	1943	22	Όχι	ENBREL	6,97	5,78	5,32
30	F	1945	17	Humira: πνευμονία αρκετές φορές	HUMIRA	6,40	3,20	3,30
31	F	1942	13	Όχι	REMICADE	6,95	5,42	4,30
					ENBREL	7,01	5,35	7,88
					HUMIRA	7,05	6,85	7,01



32	F	1939	7	Όχι	ENBREL	5,91	2,42	2,17
33	F	1944	16	Όχι	REMICADE	7,93	6,01	5,94
					ENBREL	4,29	4,35	4,63
					HUMIRA	5,34	7,30	7,48
34	F	1943	4	Όχι	HUMIRA	8,91	7,24	7,24
35	F	1934	21	Όχι	HUMIRA	7,26	5,64	4,41
36	F	1939	5	Όχι	HUMIRA	5,91	3,91	4,55
37	F	1953	9	Όχι	REMICADE	4,27	3,70	4,19
					ENBREL	5,44	5,44	5,44
					HUMIRA	4,10	3,92	3,92
38	F	1961	23	Όχι	REMICADE	5,85	3,46	2,44
41	M	1946	10	Όχι	ENBREL	6,41	4,55	3,10
42	F	1948	31	Όχι	ENBREL	4,44	5,78	4,76
43	F	1953	6	Όχι	HUMIRA	6,13	6,13	6,13
44	F	1941	6	Όχι	ENBREL	6,52	3,01	4,38
45	F	1952	39	Όχι	REMICADE	6,63	6,09	5,82
46	F	1955	22	Όχι	REMICADE	5,62	5,31	4,54
					ENBREL	6,89	5,61	4,41
1-Θ	F	1966	10	Όχι	REMICADE	6,36	6,05	6,35
2-Θ	F	1957	15	Όχι	HUMIRA	5,07	4,28	3,63
3-Θ	M	1952	20	Ανεπιθύμητη	REMICADE	5,46	4,28	2,41
				Αρχική ανταπόκριση και στους 36 μήνες όχι DAS:5.6	HUMIRA	4,32	3,80	3,20
				Όχι	ENBREL	5,60	5,20	5,20
4-Θ	F	1969	16	Όχι	HUMIRA	5,40	2,80	2,40
5-Θ	M	1949	18	Όχι	ENBREL	5,60	4,20	3,70
				Όχι	HUMIRA	5,80	5,75	5,80
6-Θ	M	1955	13	Όχι	ENBREL	4,97	3,61	2,31
7-Θ	F	1947	22	Όχι	HUMIRA	5,20	3,10	2,20
8-Θ	F	1960	7	Όχι	HUMIRA	5,08	3,40	2,40
9-Θ	F	1959	10	Όχι	HUMIRA	4,81	3,62	3,40
10-Θ	F	1948	16	Όχι	ENBREL	5,70	4,14	3,67
11-Θ	F	1957	21	Αρχική ανταπόκριση και στους 36 μήνες όχι DAS:5.1	ENBREL	5,40	3,80	2,70
				Όχι	HUMIRA	4,90	3,20	2,16
12-Θ	F	1952	19	Όχι	HUMIRA	5,10	2,90	2,20
13-Θ	F	1965	8	Όχι	REMICADE	5,80	4,20	3,10
				Όχι	HUMIRA	5,90	5,10	4,78
14-Θ	F	1962	14	Όχι	ENBREL	4,80	4,10	3,30
15-Θ	F	1953	18	Όχι	HUMIRA	5,17	3,25	2,90

16-Θ	F	1961	12	Όχι	REMICADE	5,32	4,10	3,10
17-Θ	F	1968	7	Ανεπιθύμητη	REMICADE	5,70	3,90	2,80
				Ανεπιθύμητη	HUMIRA	5,40	3,10	2,60
18-Θ	F	1948	21	Όχι	HUMIRA	5,80	2,60	2,40
19-Θ	F	1956	15	Όχι	HUMIRA	4,90	2,60	2,20
20-Θ	F	1964	8	Ανεπιθύμητη	REMICADE	5,42	3,10	2,50
21-Θ	F	1967	10	Όχι	HUMIRA	5,48	4,32	4,06
22-Θ	F	1946	25	Όχι	REMICADE	5,80	4,20	3,30
				Όχι	HUMIRA	5,10	4,10	2,90
23-Θ	F	1950	14	Όχι	REMICADE	5,80	5,20	5,60
24-Θ	F	1957	7	Όχι	HUMIRA	4,87	3,10	2,30
25-Θ	F	1962	17	Όχι	HUMIRA	5,37	2,60	2,10
26-Θ	F	1949	23	Όχι	HUMIRA	5,60	4,10	2,80
27-Θ	F	1952	9	Όχι	HUMIRA	6,10	4,20	3,30
28-Θ	F	1963	12	Όχι	HUMIRA	5,90	4,10	3,10
29-Θ	F	1948	28	Όχι	HUMIRA	5,30	3,10	2,39
30-Θ	F	1959	20	Όχι	HUMIRA	5,10	3,20	2,45
31-Θ	F	1966	17	Όχι	HUMIRA	5,40	3,10	2,20
32-Θ	F	1962	16	Όχι	REMICADE	5,60	4,10	2,80
				Όχι	ENBREL	5,40	5,20	5,60
				Όχι	HUMIRA	4,40	3,20	3,00

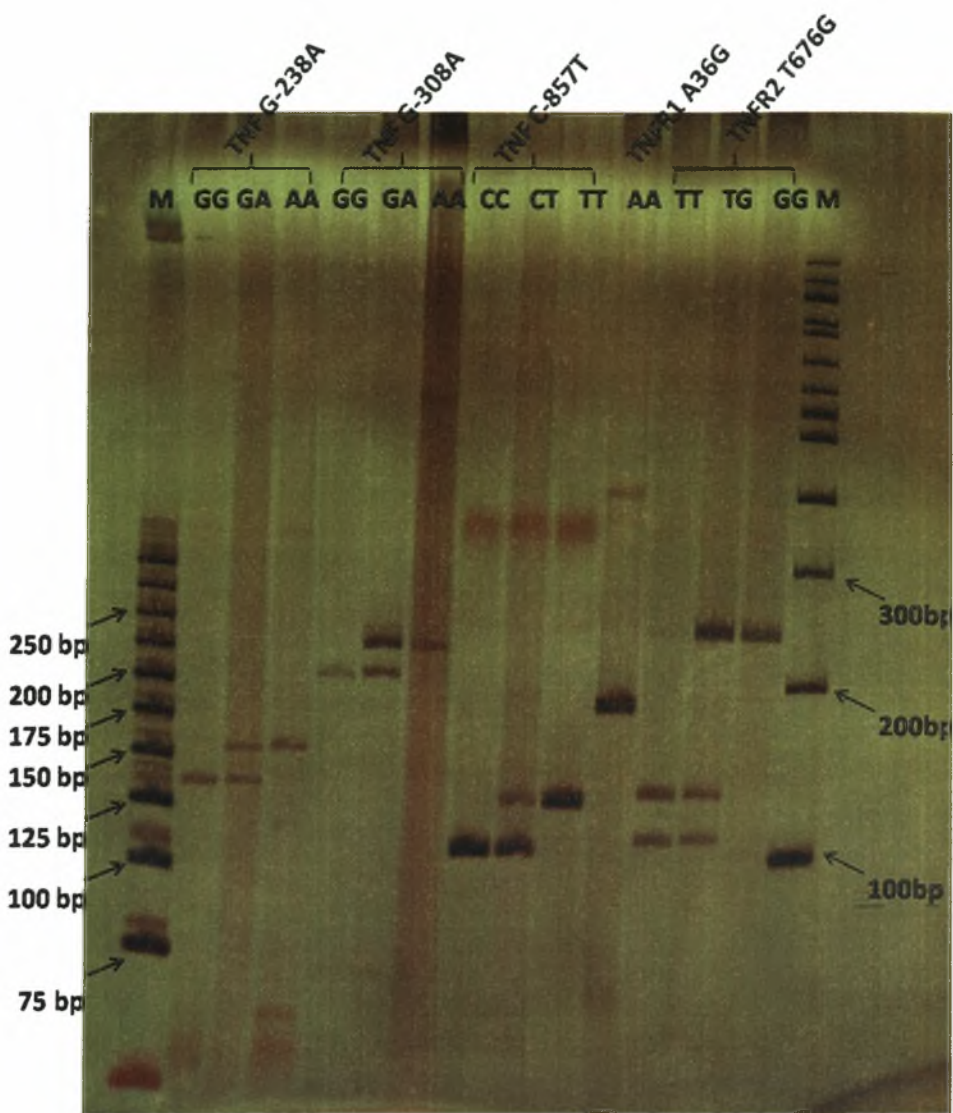
Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι σε 24 ασθενείς χορηγήθηκε το infliximab, σε 26 το etanercept και σε 50 το adalimumab.

### 3.2 RFLP – PAGE γονοτύπηση πολυμορφισμών

Η διαδικασία προσδιορισμού των γονότυπων των ασθενών περιγράφηκε παραπάνω αναλυτικά. Η εικόνα 22 παρουσιάζει τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν μετά από τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο. Για τους τέσσερις πολυμορφισμούς (TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR2 T676G) προσδιορίστηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι, ενώ για τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G όλοι οι ασθενείς είχαν το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Αναλυτικά, ο απλότυπος που προέκυψε για τον κάθε ασθενή φαίνεται στον πίνακα 7.





Εικόνα 22: RFLP – PAGE γονοτύπηση των υπό μελέτη πολυμορφισμών

Πίνακας 7: Απλότυπος ασθενών για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς

Δείγμα	TNF $\alpha$			TNFR	
	TNF G-238A	TNF G-308A	TNF C-857T	TNFR1 A36G	TNFR2 T676G
1	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
2	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
3	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
4	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
5	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T



6	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
7	G/G	G/A	C/C	A/A	T/G
8	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
9	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
10	G/G	G/A	C/C	A/A	T/G
11	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
12	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
13	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
14	G/G	G/A	C/C	A/A	T/G
15	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G
16	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T
17	G/A	G/G	C/C	A/A	T/G
18	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T
19	G/G	G/G	C/T	A/A	G/G
20	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
21	G/A	G/G	C/T	A/A	T/T
22	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
23	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
24	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
25	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
26	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
27	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
29	G/G	G/A	C/C	A/A	T/G
30	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
31	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
32	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
33	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
34	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T
35	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
36	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
37	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
38	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
41	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
42	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T
43	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
44	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
45	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
46	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
1-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
2-Θ	G/G	G/G	T/T	A/A	T/T
3-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T

4-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
5-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
6-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
7-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
8-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	G/G
9-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
10-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
11-Θ	G/G	G/A	C/C	A/A	T/T
12-Θ	G/A	G/G	C/T	A/A	G/G
13-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
14-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	G/G
15-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
16-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
17-Θ	G/G	G/G	T/T	A/A	T/G
18-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
19-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
20-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
21-Θ	G/G	G/A	C/T	A/A	T/G
22-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
23-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/G
24-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
25-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/T
26-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
27-Θ	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T
28-Θ	G/G	G/A	C/C	A/A	T/G
29-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G
30-Θ	G/G	G/G	T/T	A/A	T/G
31-Θ	G/A	G/G	C/C	A/A	T/T
32-Θ	G/G	G/G	C/T	A/A	T/G

Όλοι οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, εκτός από τον TNFR1 A36G, γι' αυτό και αποκλείστηκε από την περαιτέρω ανάλυση.

Για τον πολυμορφισμό TNF G-238A το φυσιολογικό αλληλόμορφο είναι το G και το σπάνιο το A. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, η συχνότητα του TNF G-238A σε φυσιολογικό πληθυσμό ποικίλλει. Συγκεκριμένα, σε ένα πληθυσμό 354 υγιών ατόμων η συχνότητα του γονότυπου G/G υπολογίστηκε σε 90,7%, του G/A σε 9,3%

και του A/A 0<sup>95</sup>. Σε μία άλλη μελέτη, σε πληθυσμό 108 αμερικανών υγιών ατόμων η συχνότητα του γονότυπου G/G βρέθηκε να είναι 88,8%, του G/A 11,2% και του A/A 0<sup>124</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε ένα πληθυσμό 204 υγιών καυκάσιων, όπου η συχνότητα του γονότυπου G/G ήταν 92,6%, του G/A 7,4 και του A/A 0<sup>125</sup>, ενώ σε 271 υγιή άτομα από την Κίνα οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν: G/G 94,8%, G/A 4,8% και A/A 0,4%<sup>126</sup>.

Στον πολυμορφισμό TNF G-308A, το συχνό αλληλόμορφο είναι το G και το σπάνιο το A. Και σ' αυτήν την περίπτωση, η συχνότητα των γονοτύπων του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ποικίλλει στον υγιή πληθυσμό. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε κάποιες μελέτες όπου σε 354 υγιή άτομα καυκάσιων η συχνότητα των γονοτύπων ήταν: G/G 65,8%, G/A 31,1% και A/A 3,1%<sup>95</sup> ενώ σε 108 υγιείς αμερικανούς βρέθηκαν οι εξής συχνότητες: G/G 68.2%, G/A 28.0% και A/A 3.8%<sup>124</sup>. Σε 271 άτομα από την ανατολική Κίνα οι συχνότητες ήταν: G/G 85.6%, G/A 13.3%, A/A 1.1%<sup>126</sup> ενώ σε δείγμα 204 υγιών καυκάσιων ήταν: G/G 74%, G/A 25%, A/A 1%<sup>125</sup>. Σε μία μελέτη σε 237 υγιή άτομα στον ελληνικό πληθυσμό οι συχνότητες του πολυμορφισμού υπολογίστηκαν ως ακολούθως: G/G 96%, G/A 4%, A/A 0<sup>127</sup>.

Για τον πολυμορφισμό TNF C-857T το φυσιολογικό αλληλόμορφο είναι το C, το οποίο αντικαθίσταται από το σπάνιο T. Σε μία μελέτη με 271 υγιή άτομα από την Κίνα η συχνότητα των γονοτύπων βρέθηκε: C/C 72,7%, C/T 23,6%, T/T 3,7%<sup>126</sup>. Η συχνότητα του πολυμορφισμού σε ένα μεικτό πληθυσμό γερμανών και βρετανών (576 σύνολο) υγιών ατόμων βρέθηκε να είναι: C/C 85,9%, C/T 13,5%, T/T 0,5%<sup>128</sup>, ενώ σε ένα πληθυσμό 354 καυκάσιων υγιών ατόμων ήταν: C/C 85,6%, C/T 14,1%, T/T 0,3%<sup>94</sup>.

Το φυσιολογικό αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G είναι το A. Σε ένα δείγμα 119 υγιών καυκάσιων η συχνότητα των γονοτύπων βρέθηκε A/A 37,8%, A/G 42,9% G/G 19,3%<sup>95</sup>. Σε άλλη μελέτη με 90 υγιή άτομα βρέθηκαν οι συχνότητες: A/A 24%, A/G 53%, G/G 13%<sup>129</sup>.

Για τον TNFR2 T676G το φυσιολογικό αλληλόμορφο είναι το T το οποίο αντικαθίσταται από το σπάνιο G. Η συχνότητα αυτού του πολυμορφισμού σε υγιή



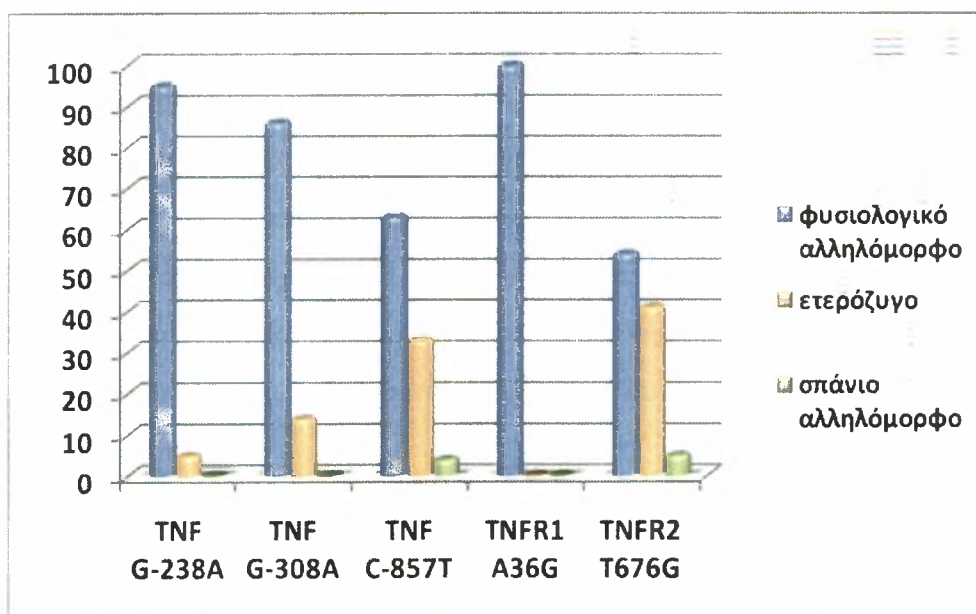
πληθυσμό καυκάσιων βρέθηκε: σε 192 άτομα T/T 60,9%, T/G 32,8%, G/G 6,3%<sup>95</sup>, ενώ σε πληθυσμό 90 υγιών ατόμων ήταν: T/T 59%, T/G 26% και G/G 5%<sup>129</sup>.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η συχνότητα των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών στους ασθενείς με ΡΑ συνοπτικά διαμορφώθηκαν ως εξής:

**Πίνακας 8: Συχνότητα των γονοτύπων στους πολυμορφισμούς υπό μελέτη**

Πολυμορφισμοί	Φυσιολογικό αλληλόμορφο (%)	Ετερόζυγο (%)	Σπάνιο αλληλόμορφο (%)
TNF G-238A	95	5	0
TNF G-308A	86	14	0
TNF C-857T	63	33	4
TNFR1 A36G	100	0	0
TNFR2 T676G	54	41	5

Στο παρακάτω διάγραμμα, φαίνεται η συχνότητα των αλληλομόρφων των υπό μελέτη πολυμορφισμών.



**Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των συχνοτήτων των γονοτύπων στους πολυμορφισμούς υπό μελέτη**

Οι συχνότητες που προέκυψαν για τους ασθενείς με ΡΑ δε συμφωνούν απόλυτα με τις συχνότητες από άλλες μελέτες για φυσιολογικό πληθυσμό.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα είναι παρόμοια για τους εξής πολυμορφισμούς: τον TNF G-238A και τον TNFR2 T676G. Συγκρίσιμα είναι τα αποτελέσματα και για τον TNF C-857T. Αντίθετα, οι πολυμορφισμοί TNF G-308A και TNFR1 A36G δείχνουν αρκετά διαφορετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να συμπεράνουμε εκ του ασφαλούς για τις συχνότητες των γονοτύπων. Φαίνεται ότι κάθε πληθυσμός φυσιολογικών ατόμων διαφέρει όσον αφορά τη συχνότητα των γονοτύπων. Επιπλέον, επειδή είναι μικρός ο πληθυσμός της μελέτης μας, ίσως να μην είναι πλήρως αντιπροσωπευτικές οι συχνότητες των γονοτύπων. Αντιδιαστέλλοντας, η διαφοροποίηση αυτή των γονοτύπων μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών της μελέτης μας, ίσως μαρτυρά την πιθανή εμπλοκή του γενετικού υλικού στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας.

Παρακάτω ακολουθούν οι πίνακες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επεξεργασία των δεδομένων. Για λόγους απλοποίησης συμβολίσαμε κάθε αλληλόμορφο των πολυμορφισμών με έναν αριθμό. Συγκεκριμένα, θεωρήσαμε ότι το κοινό αλληλόμορφο των πολυμορφισμών είναι το 1 και το σπάνιο το 2. Επομένως, ένα άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο θα συμβολίζεται ως 11 αντί πχ. για G/G. Ομοίως, το ετερόζυγο άτομο συμβολίζεται ως 12 και το ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο ως 22.

Στον επόμενο πίνακα (πίνακας 9), αντιπαραβάλλεται ο γονότυπος κάθε ασθενή (και για τους 5 πολυμορφισμούς) με την ανταπόκρισή τους στα φάρμακα, ενώ στον πίνακα 10 αντιπαραβάλλεται ο γονότυπος κάθε ασθενή σε σχέση με την μη ανταπόκρισή τους στα φάρμακα που τους χορηγήθηκαν. Η συσχέτιση έγινε και για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά αλλά και συνολικά και για τους πέντε πολυμορφισμούς.

### 3.3 Μελέτη συσχέτισης πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στη θεραπεία

Πίνακας 9: Συσχέτιση του γονότυπου των ασθενών με την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία

Δείγματα	Ανταπόκριση													
	Γονότυπος						infliximab			etanercept			adalimumab	
	TNFα G-238A	TNFα G-308A	TNFα C-857T	TNFR1 A36G	TNFR2 T676G		0 - 3	0 - 6		0 - 3	0 - 6		0 - 3	0 - 6
1	11	11	11	11	12		*							
2	11	11	12	11	11								*	*
3	11	11	11	11	11					*	*		*	*
4	11	11	12	11	11									
5	11	12	11	11	11								*	*
6	11	11	11	11	11								*	*
7	11	12	11	11	12									*
8	11	11	11	11	12		*	*					*	
9	11	11	12	11	11		*	*						
10	11	12	11	11	12								*	*
11	11	11	11	11	12		*	*		*	*			
12	11	11	11	11	11		*	*						
13	11	11	12	11	12									
14	11	12	11	11	12		*	*						
15	11	11	11	11	22								*	*
16	11	12	11	11	11								*	*



17	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*
18	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*			
19	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	22	*	*	*	*
20	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	11				
21	12	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	11			*	*
22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12		*	*	*
23	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11				
24	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*
25	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	11			*	*
26	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			*	*
27	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	12				
29	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*
30	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	12		*	*	*
31	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*
32	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	12	*	*	*	*
33	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	11	*	*	*	*
34	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11		*	*	*
35	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12		*	*	*
36	11	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11	11		*	*	*
37	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11				
38	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*
41	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*
42	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11				
43	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11				
44	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*

45	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*				
46	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*			
1-0	11	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11					
2-0	11	11	11	11	22	22	11	11	11	11	11		*	*		*
3-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*				*
4-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12			*	*	*
5-0	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	12		*	*		
6-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		*	*		
7-0	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	12			*	*	*
8-0	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	22			*	*	*
9-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12			*	*	*
10-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		*	*		
11-0	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11		*	*		*
12-0	12	11	11	11	12	12	11	11	11	11	22			*	*	*
13-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*		*	*	*
14-0	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	22		*	*		
15-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12			*	*	*
16-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*	*
17-0	11	11	11	11	22	22	11	11	11	11	12	*	*	*	*	*
18-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			*	*	*
19-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11			*	*	*
20-0	11	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*
21-0	11	11	12	11	12	12	11	11	11	11	12			*	*	*
22-0	11	11	11	11	12	12	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*
23-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	*	*	*	*	*



24-Θ	11	11	11	12	11	11	11	11	11	*	*
25-Θ	11	11	11	12	11	11	11	11	11	*	*
26-Θ	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*
27-Θ	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*
28-Θ	11	12	12	11	11	11	11	12	12	*	*
29-Θ	11	11	11	12	12	11	11	12	12	*	*
30-Θ	11	11	11	22	12	11	11	12	12	*	*
31-Θ	12	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*
32-Θ	11	11	11	12	12	11	11	12	12	*	*

Πίνακας 10: Συσχέτιση του γονοτύπου των ασθενών με την μη ανταπόκρισή τους στη θεραπεία

Δείγματα	Μη ανταπόκριση													
	Γονότυπος						infliximab			etanercept			adalimumab	
	TNFα G-238A	TNFα G-308A	TNFα C-857T	TNFR1 A36G	TNFR2 T676G	...	0 - 3	0 - 6	0 - 6	0 - 3	0 - 6	0 - 6	0 - 3	0 - 6
1	11	11	11	11	12	...								
2	11	11	12	11	11	...								
3	11	11	11	11	11	...								
4	11	11	12	11	11	...			*	*				
5	11	12	11	11	11	...								
6	11	11	11	11	11	...								
7	11	12	11	11	12	...							*	





<b>34</b>	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>35</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>36</b>	11	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>37</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*	*
<b>38</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>41</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>42</b>	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*
<b>43</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*
<b>44</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>45</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*
<b>46</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*
<b>1-0</b>	11	11	11	12	11	11	11	11	11	*	*	*	*	*	*
<b>2-0</b>	11	11	11	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>3-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>4-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>5-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>6-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>7-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>8-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	11
<b>9-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11
<b>10-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>11-0</b>	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>12-0</b>	12	11	11	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	11
<b>13-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<b>14-0</b>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	11



15-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12							
16-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12							
17-0	11	11	11	11	22	11	11	11	11	11	12							
18-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11							
19-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11							
20-0	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11	11							
21-0	11	11	12	12	12	12	12	12	11	11	12							
22-0	11	11	11	11	12	12	12	12	11	11	11							
23-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12		*					
24-0	11	11	11	11	12	12	12	12	11	11	11							
25-0	11	11	11	11	12	12	12	12	11	11	11							
26-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11							
27-0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11							
28-0	11	11	12	12	11	11	11	11	11	11	12							
29-0	11	11	11	11	12	12	12	12	11	11	12							
30-0	11	11	11	11	22	11	11	11	11	11	12							
31-0	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11							
32-0	11	11	11	11	12	12	12	12	11	11	12		*		*			

**Πίνακας 11: Συνοπτική απεικόνιση των γονότυπων και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με RA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη – 3 μήνες αντί – TNF θεραπείας**

SNP	Γονότυπος	n (συχνότητα)	Μέσος όρος του DAS28 (SD) στους 0 μήνες	Μέση μεταβολή στο DAS28 (SD) στους 3 μήνες
TNFα G-238A	GG	95(0.95)	5.739(0.999)	1.433(0.916)
	GA	5(0.05)	5.672(0.433)	1.886(0.939)
	AA			
TNFα G-308A	GG	86(0.86)	5.709(0.939)	1.463(0.914)
	GA	14(0.14)	5.901(1.212)	1.411(0.975)
	AA			
TNFα C-857T	CC	63(0.63)	5.75(1.03)	1.468(0.872)
	CT	33(0.33)	5.751(0.934)	1.419(1.050)
	TT	4(0.04)	5.393(0.355)	1.573(0.524)
TNFR1 A36G	AA	100(1.00)	5.736(0.977)	1.456(0.918)
	AG			
	GG			
TNFR2 T676G	TT	54(0.54)	5.67(1.204)	1.353(0.918)
	TG	41(0.41)	5.822(0.566)	1.541(0.916)
	GG	5(0.05)	5.742(1.048)	1.867(0.920)

**Πίνακας 12: Συνοπτική απεικόνιση των γονότυπων και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με RA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη – 6 μήνες αντί – TNF θεραπείας**

SNP	Γονότυπος	n (συχνότητα)	Μέσος όρος του DAS28 (SD) στους 0 μήνες	Μέση μεταβολή στο DAS28 (SD) στους 6 μήνες
TNFα G-238A	GG	95(0.95)	5.739(0.999)	1.95(1.230)
	GA	5(0.05)	5.672(0.433)	2.13(0.859)
	AA			
TNFα G-308A	GG	86(0.86)	5.709(0.939)	1.996(1.196)
	GA	14(0.14)	5.901(1.212)	1.729(1.322)
	AA			
TNFα C-857T	CC	63(0.63)	5.75(1.03)	1.98(1.255)
	CT	33(0.33)	5.751(0.934)	1.856(1.182)
	TT	4(0.04)	5.393(0.355)	2.473(0.698)
TNFR1 A36G	AA	100(1.00)	5.736(0.977)	1.959(1.211)
	AG			
	GG			
TNFR2 T676G	TT	54(0.54)	5.67(1.204)	1.678(1.256)
	TG	41(0.41)	5.822(0.566)	2.254(1.01)
	GG	5(0.05)	5.742(1.048)	2.58(1.672)

Στους πίνακες 11 και 12 απεικονίζονται συνοπτικά οι γονότυποι και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΡΑ που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για τον δείκτη DAS28 χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τιμών που είχαν οι ασθενείς της μελέτης στους 0, 3 και 6 μήνες θεραπείας με αντί – TNF παράγοντα.

### 3.4 Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα

Οι επόμενοι δύο πίνακες δείχνουν την ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1 και TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα. Ο πίνακας 13 αναφέρεται στη μελέτη συσχέτισης που πραγματοποιήθηκε κατά τη θεραπεία 3 μηνών και ο πίνακας 14 κατά τη θεραπεία 6 μηνών. Αναφέρουμε ότι στατιστικά σημαντικό, για την διεξαγωγή συμπεράσματος, καθορίστηκε το όριο  $p \leq 0.001^{104}$ . Επιπλέον, σημειώνεται ότι τα p-values υπολογίστηκαν με Fisher's exact test.

**Πίνακας 13: Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα στους 3 μήνες**

SNP	Ανταπόκριση	Κοινό αλληλόμορφο (συχνότ)	Ετερόζυγο/σπάνιο (συχνότ)	Σύνολο	Odds ratio (CI95%)	p-value
TNFα G-238A	Θετική	68(0.958)	3/0(0.042)	71	1.655(0.269-10.171)	0.629
	Αρνητική	27(0.931)	2/0(0.069)	29		
TNFα G-308A	Θετική	60(0.845)	11/0(0.155)	71	0.65(0.174-2.419)	0.761
	Αρνητική	26(0.897))	3/0(0.103)	29		
TNFα C-857T	Θετική	46(0.648)	21/4(0.352)	71	1.016(0.478-2.163)	1.00
	Αρνητική	17(0.586)	12/0(0.414)	29		
TNFR1 A36G	Θετική	71(1)	0/0	71	n/a	n/a
	Αρνητική	29(1)	0/0	29		
TNFR2 T676G	Θετική	34(0.479)	32/5(0.521)	71	0.437(0.197-0.97)	0.049
	Αρνητική	20(0.69)	9(0.31)	29		



**Πίνακας 14: Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα στους 6 μήνες**

SNP	Ανταπόκριση	Κοινό αλληλόμορφο (συχνότ)	Ετερόζυγο/σπάνιο (συχνότ)	Σύνολο	Odds ratio (CI95%)	p-value
TNFα G-238A	Θετική	66(0.93)	5/0(0.07)	71	0.774(0.079-7.595)	1.00
	Αρνητική	29(1)	0/0(0)	29		
TNFα G-308A	Θετική	61(0.859)	10/0(0.141)	71	0.978(0.294-3.253)	1.00
	Αρνητική	25(0.862)	4/0(0.138)	29		
TNFα C-857T	Θετική	45(0.634)	22/4(0.366)	71	0.874(0.404-1.888)	0.848
	Αρνητική	18(0.621)	11/0(0.379)	29		
TNFR1 A36G	Θετική	71(1)	0/0(0)	71	n/a	n/a
	Αρνητική	29(1)	0/0(0)	29		
TNFR2 T676G	Θετική	34(0.479)	32/5(0.521)	71	0.437(0.197-0.97)	0.049
	Αρνητική	20(0.69)	9(0.31)	29		

Όπως φαίνεται στους πίνακες 13 και 14, η ανάλυση συσχέτισης των πολυμορφισμών του TNFα και των υποδοχέων του με την ανταπόκριση στην δεδομένη θεραπεία στους 3 και 6 μήνες δεν οδήγησε σε κάποιο στατιστικά θετικό αποτέλεσμα, πρόβλεψης θετικής ή/και αρνητικής ανταπόκρισης στην θεραπεία.

### 3.5 Ισχύς της μελέτης

Με βάση τα δεδομένα του πληθυσμού μας υπολογίστηκε η ισχύς της παρούσας μελέτης (πίνακας 15) για την ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ γονότυπου και μεταβολή της ανταπόκρισης της αντί – TNFα θεραπείας (DAS28). Ο υπολογισμός της ισχύς του κάθε πληθυσμιακού δείγματος έγινε με τις ίδιες τιμές σε μέση μεταβολή και τυπική απόκλιση της ανταπόκρισης στην θεραπεία, 2.5 και 1.5 αντίστοιχα<sup>123</sup>. (Η πραγματική ισχύς δείγματος θα διαφέρει ανάλογα με τη διαφορά Μ.Ο. και την τυπική απόκλιση που προκύπτει σε κάθε δείγμα). Επί του παρόντος ο μικρός σχετικά πληθυσμός ασθενών (n=100) δεν αφήνει πολλά περιθώρια για χρήσιμα συμπεράσματα, όπως αυτό αντανακλάται από τον υπολογισμό της στατιστικής δύναμης της μελέτης (53%), σε σύγκριση με αυτόν της αγγλικής μελέτης, ενώ δικαιολογεί εν μέρει την απουσία συσχέτισης σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό.

**Πίνακας 15: Υπολογισμός της ισχύς της φαρμακογενετικής μελέτης**

<b>Ερευνητική ομάδα</b>	<b>N</b>	<b>Στατιστική ισχύς μελέτης</b>
<b>Maxwell et al, Sheffield, UK<sup>123</sup></b>	1050	99.9%
<b>Chatzikyriakidou et al, Ιωάννινα<sup>130</sup></b>	58	34%
<b>Stamatoroulou et al, Λάρισα</b>	100	53%



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντιμετώπιση της ΡΑ συνεχώς εξελίσσεται λόγω της παρασκευής νέων φαρμάκων πιο ειδικών για την ασθένεια. Ο αρχικός τρόπος αντιμετώπισης είναι συνήθως η χορήγηση DMARDs και συγκεκριμένα μεθοτρεξάτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μεθοτρεξάτη είναι το πρώτο φάρμακο που χορηγείται στον ασθενή. Παρόλο που έχει αποδειχτεί αρκετά αποτελεσματική, όταν χορηγείται μόνη της, σε αρκετούς ασθενείς αποτυγχάνει να ελέγξει την ασθένεια και να περιορίσει τις καταστροφές στις αρθρώσεις<sup>131</sup>. Έχει βρεθεί ότι μόνο 40-60% των ασθενών έχουν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή με άλλα DMARDs<sup>132,133</sup>. Γι' αυτό το λόγο, σχεδιάστηκαν νέα φάρμακα που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια, πχ. κυτταροκίνες ή πρωτεΐνες του κυττάρου οι οποίες μεσολαβούν στην παθογένεια της ΡΑ. Τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν κυρίως την δράση του TNFα, διατηρώντας τα φυσιολογικά του επίπεδα<sup>131</sup>. Οι θεραπείες με τους βιολογικούς παράγοντες έχουν βελτιώσει σε μεγάλο βαθμό τα συμπτώματα της ΡΑ στην πλειονότητα των ασθενών και προσφέρουν μια καλή επιλογή για τους ασθενείς όπου δεν επαρκεί η μεθοτρεξάτη<sup>63,134</sup>. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι παράγοντες χορηγούνται σε συνδυασμό με τη μεθοτρεξάτη, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι ο συνδυασμός των δύο είναι αποτελεσματικότερος και προκαλεί λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς<sup>131,135</sup>.

Παρόλο που οι αντί – TNF παράγοντες έχουν αλλάξει τον τρόπο αντιμετώπισης της ΡΑ, μόνο στο 50-60% των ασθενών παρατηρείται βελτίωση της εξέλιξης της ασθένειας και των συμπτωμάτων της<sup>123</sup>. Αυτό πιθανώς να είναι κρίσιμο – επιβλαβές για έναν ασθενή διότι κατ' αυτόν τον τρόπο χάνεται αρκετός χρόνος με αποτέλεσμα να προχωρήσει η αρθρική βλάβη και να μειωθεί η δυνατότητα αντιστρεψιμότητας της ασθένειας<sup>136,137</sup>. Η κλινική αποτελεσματικότητα των αντί – TNF παραγόντων είναι καλά εδραιωμένη εδώ και περίπου 10 χρόνια. Οι αντί – TNF παράγοντες χορηγούνται πλέον σε βάση ρουτίνας στους ασθενείς με ΡΑ<sup>131</sup>. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά είναι αρκετά ακριβά και έχει επιβεβαιωθεί ότι συνοδεύονται από αρκετές παρενέργειες. Η εκ των προτέρων γνώση της ανταπόκρισης των ασθενών,

με την χρήση κατάλληλων βιοδεικτών, θα ήταν λοιπόν εξαιρετικά χρήσιμη κατά την επιλογή του κατάλληλου τύπου αντί – TNF και θα συντελούσε στην πιο στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπεία για τον ασθενή με παράλληλη μείωση του κόστους.

Τα μέχρι στιγμής δημοσιευμένα αποτελέσματα φαρμακογενετικών μελετών σε ασθενείς που τους χορηγήθηκε μόνο μεθοτρεξάτη ή μεθοτρεξάτη σε συνδυασμό με κάποιο βιολογικό παράγοντα δείχνουν ότι είναι δυνατόν να βρεθούν βιοδείκτες που να μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση των ασθενών σε ατομικό επίπεδο. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν εκτεταμένα. Πιστεύεται ότι θα είναι πιο αντιπροσωπευτικός ένας συνδυασμός βιοδεικτών σε σχέση με έναν ανεξάρτητο βιοδείκτη, γι' αυτό και οι έρευνες προσανατολίζονται σε αυτή την κατεύθυνση<sup>131</sup>. Στην πραγματικότητα, κανένας πολυμορφισμός δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί ανεξάρτητα ώστε να προβλέψει την ιδανική θεραπεία σε ασθενείς με πολύπλοκες ασθένειες όπως είναι οι χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές<sup>130</sup>.

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια αξιόλογη συσχέτιση μεταξύ κάποιου πολυμορφισμού συγκεκριμένα και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες<sup>131</sup>. Αν και παλιότερα ήταν αρκετά αμφιλεγόμενη η εμπλοκή των πολυμορφισμών του TNFα στην παθογένεια της ΡΑ και κατ' επέκταση στην ανταπόκριση της θεραπείας<sup>9</sup>, τώρα πλέον είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτών, κατευθύνοντας τους ερευνητές στην ανακάλυψη κάποιου απλού τύπου πρόβλεψης<sup>131</sup>.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, ο πολυμορφισμός TNF G-238A φαίνεται να σχετίζεται με την ανταπόκριση στους αντί – TNFα παράγοντες και συγκεκριμένα με την ανταπόκριση στο infliximab, όχι όμως στο etanercept<sup>123,138</sup>. Συγκεκριμένα, οι ετεροζυγώτες TNF -238 GA που τους χορηγήθηκε το infliximab είχαν μικρότερη ανταπόκριση σ' αυτό σε σχέση με τους ομοζυγώτες TNF -238 GG. Επίσης, σε ασθενείς που τους χορηγήθηκε το etanercept δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της θεραπείας με τον συγκεκριμένο παράγοντα (etanercept)<sup>123</sup>.

Ο πολυμορφισμός TNF G-308A είναι από τους πρώτους πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν με την παθογένεια της ΡΑ. Στη μελέτη του Wilson το 2008, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός βρέθηκε ότι σχετίζεται με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με το etanercept αλλά όχι με το infliximab. Αναλυτικά, οι ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού δεν είχαν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με το etanercept. Αντίθετα, άτομα με γονότυπο TNF-308AG και TNF-308GG σημείωσαν σημαντική βελτίωση. Επιπλέον, δε βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου A του πολυμορφισμού και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με infliximab<sup>123</sup>. Σε μία άλλη μελέτη, ο γονότυπος των ετερόζυγων ατόμων για τον πολυμορφισμό αυτό (TNF -308GA) αποδείχτηκε ότι επηρεάζει την ανταπόκριση στο infliximab και μάλιστα άτομα που ήταν ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο GG (TNF -308GG) είχαν καλύτερη ανταπόκριση<sup>139,140</sup>. Συνεπώς, η παρουσία του A αλληλομόρφου, που προκαλεί υψηλή παραγωγή TNFα, θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη μικρότερη ανταπόκριση στο infliximab<sup>9</sup>. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι ο TNF G-308A επηρεάζει την ανταπόκριση του ατόμου στο infliximab επειδή εμπλέκεται άμεσα με τα κυκλοφορούντα επίπεδα του TNFα<sup>141</sup>.

Ο πολυμορφισμός TNF C-857T πιθανώς σχετίζεται με την ανταπόκριση στο etanercept<sup>142</sup>. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος TNF -857CC φαίνεται ότι σχετίζεται με την καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με το etanercept<sup>130</sup>. Ωστόσο, άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι το T αλληλόμορφο είναι αυτό που εμπλέκεται στη θεραπεία με το etanercept και έχει όντως βρεθεί ότι είναι πιο συχνό στους ασθενείς που είχαν καλή ανταπόκριση στο φάρμακο αυτό<sup>142,143</sup>. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αμφιλεγόμενα αφού φαίνεται και τα δύο αλληλόμορφα να σχετίζονται με την καλή ανταπόκριση στους αντί – TNFα παράγοντες<sup>144</sup>.

Υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα για την συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFR1 A36G με την ανταπόκριση της θεραπείας με κάποιον από τους αντί – TNFα παράγοντες. Σε μία έρευνα σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου βρέθηκε ότι οι ασθενείς που ήταν ετερόζυγοι ή ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (TNFR1 36AG ή TNFR1 36GG), δεν είχαν καλή ανταπόκριση στη

θεραπεία με infliximab σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (TNFR1 36AA)<sup>145</sup>.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G, έχει βρεθεί ότι ο γονότυπος TNFR2 676TT έχει μεγαλύτερη ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες στη PA σε σχέση με τους γονότυπους TNFR2 676TG και TNFR2 676GG. Η παρουσία του αλληλόμορφου G φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντες<sup>130,146,147</sup>.

Η μελέτη του Δρόσου το 2007 υποστηρίζει ξεκάθαρα την χρήση ενός συνδυασμού πολυμορφισμών για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην αντί – TNFα θεραπεία. Συγκεκριμένα, προτείνεται ο συνδυασμός των εξής πολυμορφισμών: TNF C-857T και TNFR2 T676G<sup>130</sup>. Ωστόσο, οι συσχετίσεις των παραπάνω πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στο adalimumab δεν έχουν οδηγήσει σε κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα, άρα το παραπάνω αποτέλεσμα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Σε συνέχεια πρόσφατων ερευνητικών δεδομένων<sup>123</sup> η παρούσα μελέτη καλείται να επαληθεύσει αλλά και να ανιχνεύσει εκ νέου έναν προγνωστικό γενετικό απλότυπο χρήσιμο στην επιλογή του τύπου αντί-TNFα φαρμάκου για την PA στον ελληνικό πληθυσμό. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν στην μελέτη αυτή είναι οι: TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR1 A36G και TNFR2 T676G. Η ανάλυση συσχέτισης των πολυμορφισμών του TNFα και των υποδοχέων του με την ανταπόκριση στην δεδομένη θεραπεία στους 3 και 6 μήνες δεν οδήγησε σε κάποιο στατιστικά θετικό αποτέλεσμα, πρόβλεψης θετικής ή/και αρνητικής ανταπόκρισης στην θεραπεία.

Αναλυτικότερα, δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T και TNFR2 T676G και του συνδυασμού αυτών με κάποιον από τους αντί – TNF παράγοντες (infliximab, etanercept, adalimumab) που χορηγήθηκε στους ασθενείς. Φυσικά δε μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντί –TNF παράγοντες, αλλά αυτό απαιτεί την επέκταση της μελέτης σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με PA. Πιθανώς τα



αποτελέσματα που προέκυψαν από τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G να τείνουν να επιβεβαιώσουν την αρχική μας υπόθεση, ωστόσο πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών ώστε να βγει κάποιο αξιόπιστο συμπέρασμα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στη μελέτη του Wilson, το 2008, απαιτήθηκε δείγμα 1000 περίπου ασθενών με RA από 20 ρευματολογικές κλινικές της Αγγλίας, για να συμπεράνουν αξιόπιστα ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες<sup>123</sup>.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G στην συγκεκριμένη μελέτη είναι μη πληροφοριακός καθώς σε όλα τα άτομα υπάρχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο A. Επομένως, έχει αποκλειστεί από τη μελέτη αφού δεν είναι δυνατό να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την πιθανή εμπλοκή του στην RA των ασθενών ή στην ανταπόκριση της θεραπείας τους με αντί – TNFα παράγοντες. Πιθανώς, σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό να βρεθούν ασθενείς με τους εναλλακτικούς γονότυπους του πολυμορφισμού. Μία άλλη πιθανότητα είναι στον ελληνικό πληθυσμό να κυριαρχεί μόνο το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης αποδείχθηκε σχετικά μικρός με αποτέλεσμα να μην αφήνει πολλά περιθώρια για χρήσιμα συμπεράσματα. Αυτό αντανάκλαται κατά κύριο λόγο και από τον υπολογισμό της στατιστικής δύναμης της μελέτης, για την ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ γονότυπου και μεταβολή της ανταπόκρισης της αντί – TNFα θεραπείας (DAS28). Με βάση την ισχύ της μελέτης υπάρχει 53% στατιστική δύναμη να ανιχνευθεί μια γενετική συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, στον πληθυσμό των 100 ασθενών με RA. Στη μελέτη του Wilson, το 2008, η στατιστική ισχύς της μελέτης του είναι 99% σε πληθυσμό 1000 περίπου ασθενών<sup>123</sup>, ενώ στη μελέτη του Δρόσου, το 2007, η στατιστική ισχύς είναι 34% σε πληθυσμό 58 ασθενών. Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, δικαιολογείται η απουσία συσχέτισης στην μελέτη του Δρόσου, το 2007, λόγω του πολύ μικρότερου δείγματος ασθενών<sup>130</sup>, καθιστώντας ίσως την παρούσα μελέτη την μεγαλύτερη φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ γονοτύπου και ανταπόκρισης στην αντί-TNFα θεραπεία σε ασθενείς με RA στην Ελλάδα.

Παρά την εκτεταμένη μελέτη των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία αντί – TNFα, ως σήμερα δεν έχουν βρεθεί στοιχεία που να συνδέουν πειστικά τη θεραπευτική έκβαση (θετική ή αρνητική) με τα γενετικά χαρακτηριστικά του ασθενούς υπό θεραπευτική αγωγή. Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού απλοτύπου για την ανταπόκριση σε αντί-TNFα θεραπεία στον ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο, είναι αναγκαία η συνέχιση και επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με RA από όλη την Ελλάδα, καθώς οι ασθενείς της παρούσας μελέτης προέρχονται από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα, και με ισότιμη κατανομή των βιολογικών παραγόντων ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτική η μελέτη και να μην είναι προκατειλημμένη ή περιορισμένη σε ένα μόνο φάρμακο. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός των γονοτύπων συγκεκριμένων πολυμορφισμών, δηλαδή η χρήση ενός αντιπροσωπευτικού απλοτύπου για την RA, πιθανόν να παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία πρόβλεψης σε σχέση με τη χρήση ενός ή δύο μόνο πολυμορφισμών, παρέχοντας έτσι ένα αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή της αποτελεσματικότερης θεραπείας εξατομικευμένα για κάθε ασθενή με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg, Αρχές Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2003
2. The Human Genome, Richard Twyman, Polygenic and multifactorial diseases - The risk of many common diseases is thought to be influenced by multiple genes as well as environmental factors, 2003, [http://genome.wellcome.ac.uk/doc\\_WTD020852.html](http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020852.html)
3. Hirschhorn, J. N., Lohmueller K., Byrne E., Hirschhorn K., A comprehensive review of genetic association studies, Genetics in Medicine, 2002; 4 (2): 45-61
4. Elles Rob, Mountford Roger, Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Humana Press, 2003
5. James D. Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkowski, Ανασυνδυασμένο DNA (γονίδια και γονιδιώματα – μία συνοπτική παρουσίαση), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2007
6. Golan David E., Tashjian Armen H., Jr, Armstrong Ehrin J., Armstrong April W., Principles of Pharmacology, The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008
7. Michael Olivier, From SNPs to function: the effect of sequence variation on gene expression. Focus on “A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression”, Physiol Genomics, 2004; 16: 182-183
8. Tracey D., Klareskog L., Sasso E. H., Salfeld J. G., Tak P. P., Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review, Pharmacology & Therapeutics, 2008; 117:244-279
9. Ignacio Rego-Pérez, Mercedes Fernández-Moreno and Francisco J. Blanco, Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis, Current Genomics, 2008;9:381-393

10. Ράπτης Σ.Α., Εσωτερική Παθολογία, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2008
11. Alamanos Y., Drosos Alexandros A., Epidemiology of Rheumatoid arthritis, Autoimmunity Reviews 2005; 4:130-136
12. Andrianakos A, Trontzas P, Christoyiannis F, Kaskani E, Nikolia Z, Tavaniotou E, et al: Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece-the ESORDIG study. Rheumatology 2006; 45:1549-54.
13. Mac Gregor AJ, Silman AJ., Rheumatoid arthritis and other synovial disorders: classification and epidemiology. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Editors. Rheumatology 3rd ed. Mosby 2003; pp757-63
14. Simonsson M, Bergman S, Jacobsson LTH, Petersson IF, Svensson B. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden, Scand J Rheumatol 1999; 28:340-3.
15. Kiss CG, Lovei C, Suto G, Varju C, Nagy Z, Fuzesi Z, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in the south Transdanubian region of Hungary based on a representative survey of 10,000 inhabitants, J Rheumatol 2005; 32:1688-90.
16. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain, Rheumatology 2002; 4:88-95.
17. Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S., Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari study. Ann Rheum Dis 1998; 57:315-8.
18. Αναγνωστόπουλος Ι., Ζιντζάρας Η., Αλεξίου Ι., Παπαθανασίου Α., Νταβας Ε., Κουτρούμπας Α., Μπαρούτα Γ., Σακκάς Λ.Ι., Ο επιπολασμός της χρόνιας αρθρίτιδας στο γενικό πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας, Ελληνική Ρευματολογία, 2008; 19(4): 318-328



19. Drosos AA, Alamanos I, Voulgari PV, Psychos DN, Katsaraki A, Papadopoulos I, et al, Epidemiology of adult rheumatoid arthritis in northwest Greece, *J Rheumatol* 1997; 24:2129-33.
20. Γιαβασόπουλος Ε., Μανίκου Ο., Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, Ολιστική θεώρηση – Θεραπευτική αντιμετώπιση, Το Βήμα του Ασκληπιού, 2007, Τόμος 6<sup>ος</sup>, τεύχος 3<sup>ο</sup>, 1-20
21. CentraCare Health System, <http://64.143.176.9/library/healthguide/en-us/images/media/medical/hw/h9991226.jpg>
22. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24
23. Fransen J., van Riel P.L.C.M., The Disease Activity Score and the EULAR response criteria, *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23 (Suppl. 39): 93-99.
24. Mäkinen H., Kautiainen H., Hannonen P., et al, Disease activity score 28 as an instrument to measure disease activity in patients with early rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*. 2007 Oct 34(10):1987-91. Epub 2007 Jul 1.
25. Bruce B., Fries J.F., The Health Assessment Questionnaire (HAQ), *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23 (Suppl. 39): S14-S18.
26. [http://arthritis.about.com/od/trials/f/ACR\\_criteria.htm](http://arthritis.about.com/od/trials/f/ACR_criteria.htm)
27. Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Βασική Ανοσολογία "Λειτουργίες και Δυσλειτουργίες του Ανοσοποιητικού Συστήματος", Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2004
28. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik, Immunobiology, the immune system in health and disease, Garland Science Publishing, 2005
29. Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., et al, Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, *EMBO J* 1991;10: 4025–4031.

30. Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;2:244–247.
31. Knight, D., Trinh, H., Le, J., Siegel, S., Shealy, D., McDonough, M., et al, Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody, *Mol Immunol* 1993; 30: 1443–1453.
32. Feldman et al, *Ann Rev Immun* 1996; 14:337-440, <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/Spring2003/Super/jointandcells.gif>
33. Sharma P. K., Hota D., Pandhi P., *Biologics in Rheumatoid Arthritis*, *J Assoc Physicians India*, 2004 Mar;52:231-6.
34. Choy EH., Panayi GS., *Cytokines pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*, *New England J Med* 2001; 344:907-16
35. Robak T., Gladalska A., Stepien H., *The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis*. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9(2): 145-154
36. Bradley JR, *TNF-mediated inflammatory disease*, *J Pathol* 2008; 214: 149-160
37. Joosten LA., Helsen MM., van de Loo FA., van de Berg WB., *Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/I mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti -IL-1 alpha/beta, and IL-1 Ra*. *Arthritis Rheum* 1996; 39:797-09
38. Scheinecker C., Redlich K., and Smolen JS., *Cytokines as Therapeutic Targets: Advances and Limitations*, *Immunity* April 2008; 28:440-444
39. Junqueira L. C., Carneiro J. *Basic Histology*, 11<sup>th</sup> Edition, The McGraw – Hill Companies, Inc., 2005
40. Sommer O. J., Kladossek A., Weiler V., Czembirek H., Boeck M., Stiskal M., *Rheumatoid Arthritis: A practical guide to state – of – the – art imaging*, image

interpretation, and clinical implications, *RadioGraphics*, 2005; Vol. 25, pp. 381 – 398.

41. Müller-Ladner U., Pap T., Gay R.E., Neidhart Michel and Gay Steffen, Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis, *Nat Clin Pract Rheum*, 2005; 1:102-10
42. Brennan F.M. and McInnes I.B., Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis, *J. Clin. Invest*, 2008; 118:3537–3545
43. McInnes I.B., Schett G., Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Nature Reviews Immunology*, 2007; Vol. 7: 429 – 442
44. Vaccaro A. R., *Orthopaedic Knowledge Update: Home Study Syllabus*, 8 (Orthopaedics Knowledge Update Series), 1<sup>st</sup> Edition, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2005
45. Colville – Nash P., Scott D. L., Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1992; 51:919 – 925.
46. Feldmann M., Brennan F. M., Maini R. N., Role of cytokines in rheumatoid arthritis., *Annual Review of Immunology*, 1996; 14: 397 – 440.
47. Moore AR, Iwamura H, Larbre JP, Scott DL, Willoughby DA., Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms, *Ann Rheum Dis*, 1993; 52:27-31.
48. Jasin HE, Taurog JD., Mechanisms of disruption of the articular cartilage surface in inflammation: neutrophil elastase increases availability of collagen type II epitopes for binding with antibody on the surface of articular cartilage, *J Clin Invest*, 1991; 87:1531-6.
49. Vincenti M. P., Binckerhoff C. E., Transcriptional regulation of collagenase (MMP - 1, MMP - 13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the

recruitment of gene-specific transcription factors, *Arthritis Research & Therapy*, 2002;4:157 – 164.

50. Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y., The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells, *Clin Exp Immunol*, 1993;94:145-9
51. Schett G., Hayer S., Zwerina J., Redlich K., Smolen J. S., Mechanisms of: the link between RANKL and arthritic bone disease, *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2005;1:47 – 54.
52. Gary S. Firestein, Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature*, 2003;423: 356-361
53. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC., Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development., *J Clin Invest*, 1994;93:1516-24
54. Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand., *Nature*, 1999;402:304-9
55. Lehtinen J. T., Lehto M. U. K., Kaarela K., Kautiainen H. J., Belt E. A., Kauppi M. J., Radiographic joint space in rheumatoid glenohumeral joints: a 15 – year prospective follow – up study in 74 patients, *Rheumatology*. 2000; 39:288 – 292.
56. Mulherin D., Fitzgerald O. and Bresnihan B., Clinical improvement and radiological deterioration in Rheumatoid arthritis: Evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ, *British Journal of Rheumatology* 1996;35:1263-1268
57. Wikipedia, the free encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Methotrexate>
58. Stoll JG & Yasothan U, Rheumatoid arthritis market, *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 693-4

59. Moreland LW., Margolies G, Heck LW Jr, et al., Recombinant soluble tumour necrosis factor receptor (p80) fusion protein: toxicity and dose finding trial in refractory rheumatoid arthritis, *J Rheumatology*, 1996; 23:1849-55
60. Weinblatt ME., Kremer JM., Bankhurst AD., et al, A trial of etanercept, a recombinant tumour necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate, *N Engl J Med*, 1999;340:253-9
61. Bathon JM., Martin RW., Fleischmann RM, et al, A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis, *N Engl J Med*, 2000;343:1586-93
62. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, et al., Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial., *Ann Intern Med* 1999; 130:478-86
63. Elliott MJ., Maini RN., Feldmann M., et al., Randomized double blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis, *Lancet* 1994;344:1105-10
64. Kavanaugh A, St Clair EW, McCune WJ, Braakman T, Lipsky P, Chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy, *J Rheumatol* 2000;27:841-50
65. Maini R.N. and Feldmann M., How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 2002; 4 (suppl 2):S22-S28
66. Weaver A. L., The impact of new biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 2004;43(Suppl. 3):iii17–iii23
67. Haitham T.I., Naismith J.H., TNFa and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s), *Microscopy research and technique*, 2000; 50:184–195
68. Wikipedia, the free encyclopedia,  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor\\_necrosis\\_factor-alpha](http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha)



69. National center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
70. Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR., Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants, *Lab Invest* 2001;81(11):1503–1515.
71. Ledgerwood EC, Pober JS, Bradley JR., Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction, *Lab Invest* 1999; 79(9):1041–1050.
72. EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1tnr>, [http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do\\_annotation.pl?ACC=SM00207](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?ACC=SM00207)
73. ModBase, Database of Comparative Protein Structure Models, [http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model\\_details.cgi?queryfile=1264121497\\_2269&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&](http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi?queryfile=1264121497_2269&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&)
74. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W., Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993;268(4):2762–2766.
75. Winzen R, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Brakebusch C, Kemper O, et al., Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells, *J Immunol* 1992;148(11):3454–3460.
76. Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H., Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *J Immunol* 1993; 150(10):4346–4353.
77. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P., Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ*, 2003; 10 (1): 45–65.
78. Chen G, Goeddel DV., TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, *Science*, 2002; 296 (5573): 1634–5.

79. Gaur U, Aggarwal BB, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily, *Biochem. Pharmacol*, 2003; 66 (8): 1403–8.
80. Mayo, M. W., & Baldwin, A. S., The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance, *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1470: M55–M62.
81. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al., A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* 1997;385(6618):729–733
82. Smookler, D. S., Mohammed, F. F., Kassiri, Z., Duncan, G. S., Mak, T. W. & Khokha, R., Cutting edge: tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation, *J Immunol* 2006; 176:721–725
83. Mungall A. J., Palmer S. A., Sims S. K., Edwards C. A., et al, The DNA sequence and analysis of human chromosome 6, *Nature*, 2003;425:805-811
84. Brennan F.M., Maini, R.N., Feldmann, M., TNF alpha -a pivotal role in rheumatoid arthritis?, *Br. J. Rheumatol.*, 1992; 31: 293-298
85. Rezaieyazdi Zahra, Afshari J.T., Sandooghi M., Mohajer F., Tumour necrosis factor a -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatol Int*, 2007;28:189–191
86. Cuenca J., Cuchacovich M., Perez C., Ferreira L., et al., The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 2003;42:308–313
87. Young Ho Lee, Jong Dae Ji, Gwan Gyu Song, Tumor Necrosis Factor-a Promoter -308 A/G Polymorphism and Rheumatoid Arthritis Susceptibility: A Metaanalysis, *J Rheumatol* 2007;34:43-9
88. Wilson, A.G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F.S., van der Putte, L.B., Duff, G.W., An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha

promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles, *J. Exp. Med.*, 1993;177: 557-560.

89. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., McDevitt H.O., AND Duff G.W., Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation, *Immunology*, 1997; 94:3195–3199
90. Jacob C.O., Fronck Z., Lewis G.D., Koo M., Hansen J.A., McDevitt H.O., Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor  $\alpha$ : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 1233-1237.
91. Verweij, C.L., Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, 1999; 58: 120-126
92. Brinkman, B.M., Huizinga, T.W., Kurban, S.S., van der Velde, E.A., Schreuder, G.M., Hazes, J.M., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., Tumour necrosis factor  $\alpha$  gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of disease?, *Br. J. Rheumatol.*, 1997; 36: 516-521
93. van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP et al., Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF( $\kappa$ )B transcription factors, *Hum Mol Genet*, 2002;11:1281–9.
94. Kuo, N.W., Lympny, P.A., Menezo, V., Lagan, A.L., John, S., Yeo, T.K., Liyanage, S., du Bois, R.M., Welsh, K.I., Lightman, S., TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005; 46: 1565-1571
95. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, et al., TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study, *Genes and Immunity* 2004; 5:631–640
96. Xue-Wen Yu a, Xu Li b, Yong-Hui Ren a, Xue-Cheng Li, Tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 polymorphisms and serum soluble TNFR1 in early spontaneous miscarriage, *Cell Biology International*, 2007;31: 1396-1399

97. Glossop JR, Dawes PT, Hassell AB, Matthey DL., Anemia in rheumatoid arthritis: association with polymorphism in the tumour necrosis factor receptor I and II genes, *J Rheumatol* 2005;32:1673-8
98. Dieude P., Osorio J., Petit-Teixeira E., Moreno S., et al , A TNFR1 Genotype With a Protective Role in Familial Rheumatoid Arthritis, *Arthritis & Rheumatism*, 2004; 50 (2):413–419
99. Glossop J.R., Dawes P.T., Nixon N.B. and Matthey D.L., Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 2005; 7:R1227-R1234
100. Santee, S.M., Owen-Schaub, L.B., Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization, *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 21151-21159.
101. Weinshilboum R., Wang Liewei, *Pharmacogenomics: Bench to bedside*, *Nature Reviews*, 2004; 3:739-748
102. Patrinos P. George, Ansorge Wilhelm, *Μοριακή Διαγνωστική, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.*, 2008
103. Wang Liewei and Weinshilboum R.M., *Pharmacogenomics: candidate gene identification, functional validation and mechanisms, human molecular genetics*, 2008;17 (review issue 2):174-179
104. Plenge R.M. and Criswell L.A., Genetic variants that predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis: current challenges and future directions, *Current Opinion in Rheumatology*, 2008; 20: 145-152
105. Kooloos W.M., de Jong D.J., et al, Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease, *Drug Discovery Today*, 2007;12 (Issues 3-4):125-131

106. Cornelis, F., Fauré, S., Martinez, M., Rheumatoid arthritis genome scan and pretative autoimmunity locus, *Arthritis Rheum.*, 1997; 40: S329.
107. Are new agents needed to treat RA? *Nature reviews Rheumatology* 2009;5:521-522
108. Budowle, B., Allen, R. C, Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments, *molecular biology in medicine*, 1990; 7
109. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989
110. Wikipedia, the free encyclopedia, <http://wikidoc.org/images/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png>
111. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erich H.A., Primer detected amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 1988;239:487-491
112. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/5/56/20060729145920!Pcr.png>
113. Fontaine-Bisson B, Wolever TM, Chiasson JL, Rabasa-Lhoret R, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NW, Ryan EA, El-Sohemy A., Tumor necrosis factor alpha -238G>A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus, *Metabolism*. 2007 May; 56(5):649-55.
114. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM., Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis., *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1259-64.
115. Lee GH, Choi YM, Kim SH, Hong MA, Oh ST, Lim YT, Moon SY., Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms with advanced stage endometriosis *Hum Reprod.*, 2008 Apr;23(4):977-81. Epub 2008 Feb 12.



116. Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL., An MspA1 I polymorphism in exon 1 of the human TNF receptor type I (p55) gene, *Eur J Immunogenet.* 1998 Apr-Jun; 25(2-3):269-70.
117. Teramoto M, Kitawaki J, Koshiba H, Kitaoka Y, Obayashi H, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Matsushita M, Maruya E, Saji H, Ohta M, Honjo H., Genetic contribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene promoter (-1031, -863 and -857) and TNF receptor 2 gene polymorphisms in endometriosis susceptibility, *Am J Reprod Immunol.* 2004 May; 51(5):352-7.
118. Lela Buckingham, Maribeth L. Flaws, *Molecular Diagnostics (Fundamentals, Methods, Clinical Applications)*, F. A. Davis Company, 2007
119. Ruifang Zhang, Zanhua Zhu, Hongming Zhu, Tu Nguyen, Fengxia Yao, Kun Xia, Desheng Liang and Chunyu Liu, SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design, *Nucleic Acids Research*, 2005;33: 489-492
120. <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/protein/page.jpg>
121. Ainsworth P. J., Surh L.C., Coulter-Mackiel M.B, Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non- radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs Bi variant, *Nucleic Acids Research* 1991;19: 405-406
122. <http://home.clara.net/sisa/twoby2.htm>
123. Maxwell J.R., Potter C., Hyrich K.L., Wilson A.G. et al, Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis, *Human Molecular Genetics*, 2008; 17 (No. 22): 3532-3538
124. Calhoun E.S., McGover R.M., Janney C.A., et al., Host Genetic Polymorphism Analysis in Cervical Cancer, *Clinical Chemistry* 2002;48:8 1218-1224
125. Mossböck G., Renner W., El-Shabrawi Y., et al., TNF- $\alpha$  -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian patients with exfoliation glaucoma, *Molecular Vision* 2009; 15:518-522

126. Chen R., Fang M., Cai Q., et al., Tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Han population of Eastern China *Rheumatol Int* 2007;28:121–126
127. Dedoussis G.V. Panagiotakos D.B., Vidra N.V. et al., Association between TNF-[alpha] -308G>A polymorphism and the development of acute coronary syndromes in Greek subjects: The CARDIO2000-GENE Study *Genetics in Medicine: July/August 2005 ;7 (Issue 6):411-416*
128. Grutters J.C., Sato H., Pantelidis P., et al., Increased Frequency of the Uncommon Tumor Necrosis Factor -857T Allele in British and Dutch Patients with Sarcoidosis, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2002;165:1119–1124
129. Nguyen-Khac E., Houchi H. et al., Lack of association between tumour necrosis factor receptor types 1 and 2 gene polymorphism and severe acute alcoholic hepatitis *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2009; 28 July 2009
130. Chatzikyriakidou A., Georgiou I., Voulgari P.V., Venetsanopoulou A. I., Drosos A.A., Combined tumour necrosis factor- $\alpha$  and tumour necrosis factor receptor genotypes could predict rheumatoid arthritis patients' response to anti-TNF- $\alpha$  therapy and explain controversies of studies based on a single polymorphism, *Rheumatology* 2007;46:1034–1035
131. Bansard C., Lequerre T., et al., Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?, *Rheumatology* 2009;48:1021–1028
132. Emery P., Breedveld, F.C., Lemmel, E.M., Kaltwasser, J.P., Dawes, P.T., Gomer, B., Van Den Bosch, F., Nordstrom, D., Bjerneboe, O., Dahl, R. et al., A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2000;39: 655–665
133. Smolen, J.S., Kalden, J.R., Scott, D.L., Rozman, B., Kvien, T.K., Larsen, A., Loew-Friedrich, I., Oed, C. and Rosenburg, R., Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a

double-blind, randomised, multicentre trial. European Leflunomide Study Group., *Lancet* 1999; 353: 259–266.

134. Maini R, St Clair EW, Breedveld F et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999; 354:1932–9.
135. Andreakos E.T., Foxwell B.M., Brennan F.M., Maini R.N., Feldmann M., Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002;13: 299–313
136. Zink A, Strangfeld A, Schneider M et al., Effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis in an observational cohort study: comparison of patients according to their eligibility for major randomized clinical trials. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3399–407.
137. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group., *N Engl J Med* 2000; 343:1594–602.
138. Criswell, L.A., Lum, R.F., Turner, K.N., Woehl, B., Zhu, Y., Wang, J., Tiwari, H.K., Edberg, J.C., Kimberly, R.P., Moreland, L.W., Seldin, M.F., Bridges, S.L., The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2750-2756.
139. Mugnier, B., Balandraud, N., Darque, A., Roudier, C., Roudier, J., Reviron, D., Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 1849-1852.
140. Cuchacovich, M., Ferreira, L., Aliste, M., Soto, L., Cuenca, J., Cruzat, A., Gatica, H., Schiattino, I., Pérez, C., Aguirre, A., Salazar- Onfray, F., Aguillón, J.C., Tumour

necrosis factor-alpha (TNFalpha) levels and influence of -308 TNF-alpha promoter polymorphism on the responsiveness to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2004; 33: 228-232.

141. Schotte, H., Schluter, B., Drynda, S., Willeke, P., Tidow, N., Assmann, G., Domschke, W., Kekow, J., Gaubitz, M., Interleukin 10 promoter microsatellite polymorphisms are associated with response to long term treatment with etanercept in patients with rheumatoid arthritis., *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64: 575-581.
142. Kang, C.P., Lee, K.W., Yoo, D.H., Kang, C., Bae, S.C., The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor alpha gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis., *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 547-552
143. Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese., *J Clin Periodontol* 2003;30:524-31.
144. de Vries N. and Tak P. P., The response to anti-TNF- $\alpha$  treatment: gene regulation at the bedside *Rheumatology* 2005;44:705-707
145. Pierik M., Vermeire S., Steen K.V., et al., Tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab, *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 303-310
146. Fabris, M., Tolusso, B., Di Pol, E., Assaloni, R., Sinigaglia, L., Ferraccioli, G., Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2002; 29: 1847-1850.
147. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H et al., Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis., *Arthritis Rheum* 2001;44:2819-27.

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΕΙΚΟΝΩΝ

**Πίνακας 1:** Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό (Σελ. 59)

**Πίνακας 2:** Αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR (Σελ. 60)

**Πίνακας 3:** Οι συνθήκες PCR για κάθε πολυμορφισμό (Σελ. 61)

**Πίνακας 4:** Συνοπτική παρουσίαση των ενζύμων και των προϊόντων πέψης (Σελ. 66)

**Πίνακας 5:** Αναλογίες των αντιδραστηρίων για τις πέψεις με ένζυμα περιορισμού (Σελ. 67)

**Πίνακας 6:** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη (Σελ. 73 – 76)

**Πίνακας 7:** Απλότυπος ασθενών για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς (Σελ. 77 – 79)

**Πίνακας 8:** Συχνότητα των γονοτύπων στους πολυμορφισμούς υπό μελέτη (Σελ. 81)

**Πίνακας 9:** Συσχέτιση του γονοτύπου των ασθενών με την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία (Σελ. 83 – 86)

**Πίνακας 10:** Συσχέτιση του γονοτύπου των ασθενών με την μη ανταπόκρισή τους στη θεραπεία (Σελ. 86 – 89)

**Πίνακας 11:** Συνοπτική απεικόνιση των γονότυπων και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με RA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη – 3 μήνες αντί – TNF θεραπείας (Σελ. 90)

**Πίνακας 12:** Συνοπτική απεικόνιση των γονότυπων και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με RA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη – 6 μήνες αντί – TNF θεραπείας (Σελ. 90)

**Πίνακας 13:** Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα στους 3 μήνες (Σελ. 91)



**Πίνακας 14:** Ανάλυση συσχέτισης των TNFα, TNFR1, TNFR2 πολυμορφισμών και ανταπόκρισης στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντα στους 6 μήνες **(Σελ. 92)**

**Πίνακας 15:** Υπολογισμός της ισχύς της φαρμακογενετικής μελέτης **(Σελ. 93)**

**Εικόνα 1:** Συγκριτικές φωτογραφίες ακτίνων Χ στο άνω άκρο ενός φυσιολογικού και ασθενούς ατόμου **(Σελ. 16)**

**Εικόνα 2:** Σχηματική αναπαράσταση μιας φυσιολογικής και μιας ασθενούς άρθρωσης **(Σελ. 20)**

**Εικόνα 3:** Μονοπάτια σηματοδότησης των κυτταροκινών που εμπλέκονται στη φλεγμονή της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας **(Σελ. 21)**

**Εικόνα 4:** Παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας **(Σελ. 23)**

**Εικόνα 5:** Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στην καταστροφή της άρθρωσης στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα **(Σελ. 24)**

**Εικόνα 6:** Χημικός τύπος της μεθοτρεξάτης **(Σελ. 29)**

**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση των τριών ανταγωνιστών του TNFα **(Σελ. 31)**

**Εικόνα 8:** Μοριακός μηχανισμός του etanercept **(Σελ. 31)**

**Εικόνα 9:** Μοριακός μηχανισμός του infliximab **(Σελ. 32)**

**Εικόνα 10:** Μοριακός μηχανισμός του adalimumab **(Σελ. 34)**

**Εικόνα 11:** Αυξανόμενο κόστος των βιολογικών παραγόντων για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας **(Σελ. 35)**

**Εικόνα 12:** Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFα **(Σελ. 36)**

**Εικόνα 13:** Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR1 **(Σελ. 38)**

**Εικόνα 14:** Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR2 **(Σελ. 39)**

**Εικόνα 15:** Τα μονοπάτια σηματοδότησης που προκαλούνται από τις ενδοκυτταρικές δράσεις του TNFα (Σελ. 40)

**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFα (Σελ. 43)

**Εικόνα 17:** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFR1 (Σελ. 44)

**Εικόνα 18:** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFR2 (Σελ. 45)

**Εικόνα 19:** Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Προετοιμασία της πηκτής και "φόρτωση" των δειγμάτων (Σελ. 56)

**Εικόνα 20:** Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR (Σελ. 58)

**Εικόνα 21:** Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (RFLP) και ακόλουθη χρώση (Σελ. 70)

**Εικόνα 22:** RFLP – PAGE γονοτύπηση των υπό μελέτη πολυμορφισμών (Σελ. 77)

**Διάγραμμα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση των συχνοτήτων των γονοτύπων στους πολυμορφισμούς υπό μελέτη (Σελ. 81)