



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

## **Φαρμακογενετική της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας**

**Πανταζή Ιωάννα**



**Λάρισα 2014**

**Φαρμακογενετική της αγκυλοποιητικής  
σπονδυλίτιδας**

**Pharmacogenetics of ankylosing spondylitis**

## **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

- **Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Μαμούρης Ζήσης:** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Σαραφίδου Θεολογία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT .....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα .....	9
1.1.1 Γενικά .....	9
1.1.2 Επιδημιολογία.....	9
1.1.3 Κλινικές εκδηλώσεις και διάγνωση.....	10
1.1.4 Δείκτες αξιολόγησης της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας .....	13
1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	14
1.1.6 Παθογένεση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας.....	17
1.2 Θεραπεία της αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδας.....	19
1.2.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα .....	20
1.2.2 Νοσοτροποιητικά φάρμακα .....	21
1.2.3 Βιολογικοί παράγοντες αντι-TNFα .....	22
1.3 Φαρμακογενετική.....	27
1.3.1 Φαρμακογενετική της ρευματοειδούς αρθρίτιδας .....	28
1.3.2 Φαρμακογενετική της ψωριασικής αρθρίτιδας .....	34
1.3.3 Φαρμακογενετική της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας .....	35
1.4. Σκοπός .....	36
2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ .....	37
2.1 Δείγματα ασθενών.....	37
2.2 Απομόνωση DNA .....	37
2.2.1 Αντιδραστήρια.....	37
2.2.2 Μέθοδος .....	39
2.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	40
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	42
2.4.1 Στάδια της PCR .....	43
2.4.2 Αντιδραστήρια και συνθήκες της PCR.....	44

2.4.3 Ανάλυση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης .....	48
2.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP).....	48
2.5.1 Αρχή της ανάλυσης RFLP .....	48
2.5.2 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.....	50
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	51
2.6.1 Ανάλυση τμημάτων DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου .....	52
2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών .....	56
3.2 Αποτελέσματα της PCR .....	57
3.3 Γονοτύπιση πολυμορφισμών.....	57
3.4 Μελέτες συσχέτισης και ανάλυση αποτελεσμάτων .....	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 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 τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, την επίκουρο καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, κ. Λιαδάκη Καλλιόπη για την όλη καθοδήγηση και επίβλεψη κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρο καθηγήτρια στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για τη συμβολή της στην επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και στον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, Διδάσκοντα Π.Δ 407/80 στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για τις συμβουλές και τη βοήθεια του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σαρρή Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την παρουσίαση μου στο εργαστήριο, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες για τη βοήθεια και συνεργασία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο της σπονδυλικής στήλης, των αρθρώσεων και άλλων οργάνων, με τη συμμετοχή τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια, η εισαγωγή των βιολογικών αναστολέων του TNFα έχουν επιφέρει επανάσταση στην θεραπεία ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συσχέτιση του πολυμορφισμού A36G του γονιδίου TNFR1 και του πολυμορφισμού T676G του γονιδίου TNFR2 με την ανταπόκριση των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες, στον ελληνικό πληθυσμό. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος 24 ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα που έλαβαν θεραπεία με αντί-TNF παράγοντες για τουλάχιστον 12 μήνες. Οι αντί-TNF παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Infliximab, το Etanercept και το Adalimumab. Η γονοτύπηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR-RFLP και η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε με μεταβολή του δείκτη BASDAI (>50% ανταποκριθέντες).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μόνο για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G, καθώς ο πολυμορφισμός TNFR1 A36G δεν βρισκόταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg και αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση. Στη μελέτη αυτή, ανταπόκριση στη θεραπεία σημείωσε το 50% των ασθενών με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών (79,16%) να έχουν λάβει το φάρμακο Remicade. Η ανάλυση συσχέτισης δεν μπόρεσε να προσδιορίσει κάποια σαφή συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και της ανταπόκρισης ή μη στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού του δείγματος των ασθενών που μελετήθηκε.

## ABSTRACT

---

Ankylosing spondylitis is a chronic inflammatory disease of axial skeleton, joints and other organs with the contribution of both genetic and environmental factors. Lately, the introduction of biological TNF inhibitors has revolutionized the therapy of patients with ankylosing spondylitis. However, a significant percentage of patients with ankylosing spondylitis do not respond to treatment with anti-TNF agents.

The aim of this study is to investigate the possible influence of TNFR1 A36G and TNFR2 T676G gene polymorphisms on anti-TNF treatment responsiveness in patients with ankylosing spondylitis, in the greek population. In this study, peripheral blood samples of 24 patients with ankylosing spondylitis, treated with anti-TNF agents for at least 12 months, were used. The TNF agents used in this treatment were Infliximab, Etanercept and Adalimumab. Single nucleotide polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP assays and the treatment responsiveness was defined as a reduction in the BASDAI index by >50% (responders) or <50% (non responders).

The analysis was performed only for the TNFR2 T676G gene polymorphism, since the TNFR1 A36G gene polymorphism wasn't in Hardy-Weinberg equilibrium and was excluded from further analysis. The majority of the patients of this study (79,16%) was treated with the medicine Remicade, and half of them was recorded as responders to the treatment. However, association analysis failed to identify a clear association between the genotype and positive or negative response to treatment with anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis, possibly due to the small number of patients examined.



# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα

### 1.1.1 Γενικά

Η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι η συχνότερη μιας μεγάλης ομάδας χρόνιων αυτοάνοσων φλεγμονωδών νόσων με κοινά κλινικά, ανοσολογικά και γενετικά γνωρίσματα, τις σπονδυλοαρθρίτιδες. Οι σπονδυλοαρθρίτιδες περιλαμβάνουν την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, την αντιδραστική αρθρίτιδα, την ψωριασική αρθρίτιδα και τη νόσο του Crohn. Συγκεκριμένα, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα ταξινομείται στις οροαρνητικές σπονδυλοαρθρίτιδες, καθώς οι ασθενείς είναι αρνητικοί για ένα αυτοαντίσωμα, τον ρευματοειδή παράγοντα. Η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο της σπονδυλικής στήλης, των αρθρώσεων και άλλων οργάνων και χαρακτηρίζεται από την τεράστια διείσδυση ανοσοποιητικών κυττάρων στον αρθρικό χόνδρο. Η ονομασία της ασθένειας προέρχεται από τη λέξη αγκύλωση, που συμβαίνει σε προχωρημένες περιπτώσεις και αποτελεί την πλήρη οστεώδη σύντηξη της σπονδυλικής στήλης, και τη λέξη σπονδυλίτιδα που αναφέρεται στη φλεγμονή των σπονδύλων και των αρθρώσεων.

### 1.1.2 Επιδημιολογία

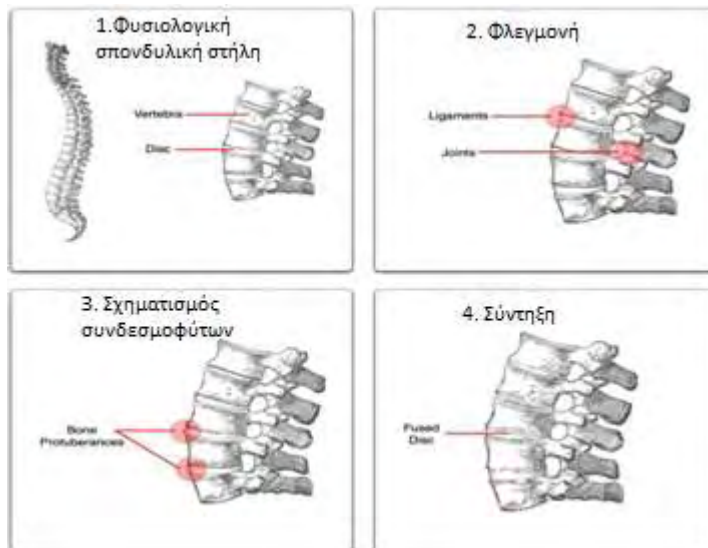
Η συχνότητα εμφάνισης της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας στον γενικό πληθυσμό εκτιμάται περίπου στο 0,5%, ενώ για την ομάδα των σπονδυλοαρθρίτιδων η συχνότητα εμφάνισης εκτιμάται ότι είναι πάνω από το 1% (Slobodin *et al.* 2012). Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης της διαφέρει μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών και πληθυσμιακών ομάδων. Χαμηλή συχνότητα έχει αναφερθεί στην Ιαπωνία, στην Κίνα, στην Αφρική, στις χώρες της Μέσης Ανατολής, στη Λατινική Αμερική και στους Αφροαμερικάνους, ενώ υψηλή συχνότητα παρουσιάζουν γενικά οι χώρες της Ευρώπης όπως η Βόρεια Νορβηγία, η

Γερμανία και η Τσεχοσλοβακία, με χαμηλότερες συχνότητες στην Ελλάδα, την Φινλανδία, την Ουγγαρία και την Ολλανδία (Stolwijk *et al.* 2012). Στην Ελλάδα, η συχνότητα της κυμαίνεται από το 0,03% έως και το 0,21% του πληθυσμού. Η επίπτωση (incidence) της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας έχει βρεθεί 0,5-14 ανά 100000 ανθρώπους το χρόνο (Braun & Sieper, 2007).

Η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα ξεκινά συνήθως στη δεύτερη ή τρίτη δεκαετία ζωής, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 28,3 χρόνια. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου θεωρείται μεγαλύτερη στους άντρες από τις γυναίκες με αναλογία 2-3:1, ωστόσο πρόσφατες έρευνες δεν αναφέρουν διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα δυο φύλα, πράγμα το οποίο υποδηλώνει την πιθανότητα ότι οι γυναίκες ασθενείς παρουσιάζουν άτυπες εκδηλώσεις της νόσου, στις οποίες τα συμπτώματα αργούν να διαγνωστούν ή είναι λιγότερο συχνά και επώδυνα (Rudwaleit *et al.* 2009, Slobodin *et al.* 2011).

### **1.1.3 Κλινικές εκδηλώσεις και διάγνωση**

Τα πρώτα συμπτώματα της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας συνήθως εμφανίζονται στο τέλος της εφηβείας έως τις αρχές της ενηλικίωσης. Το κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η οσφυαλγία φλεγμονώδους τύπου, στην οποία ο πόνος εντοπίζεται στους γλουτούς και/ή στις κατώτερες περιοχές της οσφυϊκής μοίρας σε εναλλακτικές πλευρές και συνοδεύεται από πρωινή ακαμψία που κρατάει μερικές ώρες και βελτιώνεται με την δραστηριότητα. Στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η φλεγμονή των συνδέσμων στο κατώτερο μέρος της σπονδυλικής στήλης διεγείρει οστεογενετικά κύτταρα που προκαλούν το σχηματισμό οστού μέσα στους συνδέσμους που με την πάροδο του χρόνου μεγαλώνει και σχηματίζονται οστικές γέφυρες, τα λεγόμενα συνδεσμοφύτα, μεταξύ γειτονικών σπονδύλων. Σε τελική φάση, μερικοί σπόνδυλοι μπορεί να συντηχθούν και να δημιουργήσουν μια πλήρη οστεώδη σύντηξη της σπονδυλικής στήλης (αγκύλωση) με τη μορφή καλάμου μπαμπού (Εικόνα 1). Οι ασθενείς αυτοί έχουν απώλεια κινητικότητας της σπονδυλικής τους στήλης με περιορισμούς στην κάμψη, την προέκταση της οσφυϊκής μοίρας και τη διαστολή του θώρακα (Sieper *et al.* 2002).



Εικόνα 1. Τα κλινικά στάδια της αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδας από 1. τη φυσιολογική σπονδυλική στήλη, 2. στη φλεγμονή, 3. τον σχηματισμό των συνδεσμοφύτων μεταξύ των σπονδύλων και 4. τη σύντηξη της σπονδυλικής στήλης ([wikipedia.org/wiki/Ankylosing\\_spondylitis](http://wikipedia.org/wiki/Ankylosing_spondylitis)).

Άτομα με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα μπορούν επίσης να εμφανίζουν αρθρίτιδα και σε περιφερικές αρθρώσεις όπως στις αρθρώσεις των ισχύων, των γονάτων, των αστραγάλων, των αγκώνων και των ώμων. Ακόμη, πολλοί ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα (επηρεάζονται λίγες αρθρώσεις όχι αναγκαστικά και στις δυο πλευρές του σώματος) και ενθεσίτιδα (φλεγμονή στη θέση που ένας σύνδεσμος ή τένοντας συνδέεται με το οστό). Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου δεν περιορίζονται μόνο στις αρθρώσεις αλλά περιλαμβάνουν και άλλα όργανα. Τέτοιες εκδηλώσεις είναι η πρόσθια ραγοειδίτιδα (οξεία επώδυνη ερυθρότητα του οφθαλμού με θολή όραση και φωτοφοβία), φλεγμονή στο βλεννογόνο και φλεγμονή στο έντερο. Σε επίμονη μακροχρόνια ενεργή νόσο παρουσιάζεται οστεοπενία, οστεοπόρωση και υψηλός κίνδυνος καταγμάτων. Τέλος, οι ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα έχουν τον κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονικής ίνωσης, καθώς και καρδιακής και νεφρικής ανεπάρκειας (Golder & Schachna, 2013).

Η ιερολαγονίτιδα (φλεγμονή των ιερολαγονίων αρθρώσεων) είναι το σήμα κατατεθέν της νόσου και ο εντοπισμός της με τη ραδιογραφία πιστοποιεί τη διάγνωση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας με βάση ένα βαθμολογικό σύστημα των αλλαγών που υπόκεινται οι ιερολαγονίες αρθρώσεις (Sieper *et al.* 2002). Το

ραδιογράφημα εντοπίζει οριακές διαβρώσεις των σπονδυλικών σωμάτων, τετραγωνισμό των σπονδυλικών σωμάτων, σχηματισμό συνδεσμοφύτων και την πλήρη αγκύλωση της σπονδυλικής στήλης (McVeigh & Cairns, 2006). Ωστόσο, οι ραδιογραφίες μπορεί να φαίνονται φυσιολογικές στα αρχικά στάδια της νόσου και η διάγνωση να καθυστερεί μέχρι και 10 χρόνια, γι' αυτό άλλες μέθοδοι απεικόνισης όπως η μαγνητική και η αξονική τομογραφία παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρώιμη διάγνωση της νόσου.

Η μαγνητική τομογραφία επιτρέπει τον προσδιορισμό φλεγμονής στις ιερολαγόνιες αρθρώσεις νωρίς στην πορεία της νόσου και μπορεί να προσδιορίσει οίδημα του μυελού των οστών στις ιερολαγόνιες αρθρώσεις και/ή στις γωνίες των σπονδύλων, το οποίο σχετίζεται με μεταγενέστερη σύντηξη είτε των ιερολαγόνιων αρθρώσεων είτε της σπονδυλικής στήλης (Golder & Schachna, 2013). Η μαγνητική τομογραφία, ακόμη, προσδιορίζει την ενθεσίτιδα και την περιφερειακή αρθρίτιδα. Παρ' όλη τη συμβολή της όμως, η μαγνητική τομογραφία δεν είναι ο χρυσός κανόνας στη διάγνωση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας, εφόσον η ευαισθησία της μεθόδου παραμένει επίμονα κάτω από το 70-75% και τα ευρήματα της είναι σχετικά δυναμικά (επιδείνωση ή βελτίωση σε διάστημα εβδομάδων) (Braun & Sieper, 2007).

Η διάγνωση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας μπορεί να γίνει με κατάλληλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, σε συνδυασμό με τις μεθόδους απεικόνισης. Τα κλινικά ευρήματα περιλαμβάνουν την παρουσία οσφυαλγίας φλεγμονώδους τύπου, όπως αυτή προσδιορίζεται με βάση κάποια συγκεκριμένα κριτήρια (οσφυαλγία φλεγμονώδους τύπου αν ισχύουν >2 κριτήρια) και άλλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου που προσδιορίζονται με τη χρήση εξειδικευμένων δοκιμών, όπως την μέτρηση της εμπρόσθιας και πλευρικής κάμψης και την μέτρηση της διαστολής του θώρακα. Τα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν την παρουσία του HLA-B27, καθώς και δεικτών φλεγμονής, όπως η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και ο ρυθμός καθίζησης ερυθροκυττάρων (ESR) (Sieper *et al.* 2002). Η παρουσία του HLA-B27 αποδεικνύει την συσχέτιση της νόσου με το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο B27 (HLA-B27) του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (90-95% των ασθενών λευκής φυλής έχουν το αντιγόνο) (Koutroumpas & Sakkas, 2008).

#### 1.1.4 Δείκτες αξιολόγησης της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας

Υπάρχει μια ποικιλία δεικτών για την αξιολόγηση ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, οι οποίοι μετρούν τρία ξεχωριστά στοιχεία της εξέλιξης της νόσου: την ενεργότητα της νόσου, τη φυσική λειτουργία και τη δομική βλάβη (Zochling & Brown, 2005). Το πιο κοινό εργαλείο για τη μέτρηση της ενεργότητας της νόσου είναι ο δείκτης BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), ένας έγκυρος και σύνθετος δείκτης που αξιολογεί τα πέντε κύρια συμπτώματα της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας: κόπωση, αξονικός και περιφερειακός πόνος, δυσκαμψία και ενθεσοπάθεια (Garrett *et al.* 1994). Ο BASDAI συμπληρώνεται από τον ίδιο τον ασθενή και είναι ευαίσθητος στις διάφορες κλινικές αλλαγές μπορεί να συμβούν σε διάστημα 3 μηνών. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης για την αξιολόγηση της φυσικής λειτουργίας στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι ο BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index), ένας έγκυρος και σύνθετος δείκτης που απαρτίζεται από 10 ερωτήσεις, οι οποίες απευθύνονται στη λειτουργία και την ικανότητα του ασθενή να ανταπεξέλθει με τη νόσο (Van der Heijde *et al.* 2002). Ένας ακόμη δείκτης για την αξιολόγηση της φυσικής λειτουργίας είναι ο DFI (Dougados Functional Index). Η εκτίμηση των δομικών βλαβών κατά την εξέλιξη της νόσου βασίζεται κατά κύριο λόγο στη ραδιογραφία, ωστόσο δυο ακόμη δείκτες αξιολόγησης δομικών βλαβών είναι ο BASRI (Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index) και ο mSASSS (modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score).

Η ανταπόκριση στη θεραπεία μετράται συνήθως με 2 τρόπους: όταν υπάρχει ελάττωση του BASDAI κατά 50% (BASDAI 50) ή κατά 2 μονάδες (Braun *et al.* 2003). Άλλος δείκτης ανταπόκρισης είναι ο δείκτης ASAS, ένας σύνθετος δείκτης αποτελούμενος από οπτική αναλογική κλίμακα (VAS) για α) το άλγος, β) τη φλεγμονή, γ) τη γενική κατάσταση και δ) τη λειτουργικότητα. Βελτίωση κατά 20, 50 ή 70% σε τρεις από τις παραπάνω παραμέτρους χωρίς επιδείνωση στην τέταρτη παράμετρο αντιστοιχεί σε ανταπόκριση ASAS 20, 50 ή 70 (Braun & Sieper, 2002). Αυτές οι αξιολογήσεις διεξάγονται 6 με 12 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας και επανεξετάζονται κάθε τρίμηνο.

### 1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Μέχρι σήμερα, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα αποτελεί μια νόσο αγνώστου αιτιολογίας, όμως θεωρείται μια αυτοάνοση νόσος που προκαλείται από ένα συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Μελέτες διδύμων έχουν αποκαλύψει ένα μεγάλο βαθμό κληρονομησιμότητας καθώς >90% του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου είναι γενετικώς καθορισμένο, πράγμα το οποίο παράλληλα αναδεικνύει την πιθανότητα παρουσίας περιβαλλοντικών παραγόντων εφόσον δεν βρέθηκε κληρονομησιμότητα 100% (Brown, 2008). Από έρευνες σε ζωικά μοντέλα, κυρίως σε αρουραίους, έχειδειχθεί ότι η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα μπορεί να προκληθεί από έκθεση σε ένα κοινό παθογόνο, όπως βακτήρια της εντερικής χλωρίδας, κάτι το οποίο έχει βρεθεί και στους ανθρώπους στην περίπτωση της αντιδραστικής αρθρίτιδας αλλά όχι στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Εκτός από τα παθογόνα, άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να πυροδοτήσουν την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα είναι το κάπνισμα και διατροφικά προϊόντα που περιέχουν φλαβονοειδή (Zhao *et al.* 2011).

Η συσχέτιση της νόσου με τα αλληλόμορφα του μορίου HLA-B27 του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC τάξης I (χρωμόσωμα 6p21.3), είναι γνωστή από το 1973 και παραμένει ένα από τα καλύτερα παραδείγματα συσχέτισης μιας ασθένειας με ένα συγκεκριμένο κληρονομικό δείκτη (Brewerton *et al.* 1973). Περισσότερο από το 90% των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα φέρουν αλληλόμορφα του μορίου HLA-B27, ωστόσο τα περισσότερα θετικά άτομα για το HLA-B27 παραμένουν υγιή, γεγονός το οποίο συνηγορεί στη συμβολή και άλλων γονιδίων τόσο εντός όσο και εκτός του MHC (van der Linden *et al.* 1984). Έτσι, η συνεισφορά του HLA-B27 στο συνολικό γενετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου υπολογίζεται ότι είναι μόλις 20-30%, ενώ ολόκληρο το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας MHC συνεισφέρει περίπου το 40-50% (Brown *et al.* 1997). Η μεγάλη σημασία των γενετικών παραγόντων στη νόσο αυτή επισημαίνεται από μελέτες διδύμων, όπου το ποσοστό συμπτωματικότητας για τα μονοζυγωτικά δίδυμα που είναι θετικά για το HLA-B27 είναι 63%, ενώ για τα διζυγωτικά είναι 23% (Brown *et al.* 1997). Επίσης, είναι γνωστό ότι άτομα με αλληλόμορφο του μορίου

HLA-B27 που έχουν συγγενή πρώτου βαθμού με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα έχουν 6 με 16 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με άτομα που επίσης φέρουν αυτό το αλληλόμορφο αλλά δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό (Calin *et al.* 1983).

Το αλληλόμορφο, αποκαλούμενα και υπότυποι, του μορίου HLA-B27 που βρέθηκαν ότι συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι τα ακόλουθα: *B\*2702*, *B\*2703*, *B\*2704*, *B\*2705*, *B\*2707*, *B\*2708*, *B\*2710*, *B\*2714*, *B\*2715* και *B\*2719*. Ο υπότυπος *B\*2705* έχει βρεθεί σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες και φαίνεται ότι είναι το πρωτότυπο μόριο HLA-B27, από το οποίο προέκυψαν οι άλλοι υπότυποι με μεταλλάξεις. Οι υπότυποι *B\*2706* και *B\*2709* δεν συνδέονται με την νόσο, ωστόσο ταυτοποιήθηκαν ασθενείς που έφεραν αυτά τα αλληλόμορφα (Philip *et al.* 2014).

Εκτός από το *HLA-B27* και άλλα αλληλόμορφα γονιδίων του MHC φαίνεται ότι συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, όπως τα *HLA-B60*, *HLA-DRB1\*01*, *DRB1\*08*, *HLA-A\*0201*, *HLA\*B1403*, καθώς και τα γονίδια *TNF-α*, *TAP*, *LMP2* και *LMP7*. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν αυτά τα γονίδια μπορούν να συνεισφέρουν στη νόσο ή βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με το *HLA-B27* και έτσι συνεισφέρουν στη νόσο. Ο TNF είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και ο σημαντικός του ρόλος στην νόσο αυτή έχει αποδειχθεί από την επιτυχή θεραπεία των ασθενών με φάρμακα αντι-TNF, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια. Μερικοί καλά μελετημένοι πολυμορφισμοί του TNF που συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι οι -308 A/G (rs1800629), -238 A/G (rs361525), -1031 (rs1799964), -863 (rs1800630), -857 (rs1799724) και -238 (rs361525) στην περιοχή του υποκινητή (Zambrano-Zaragoza *et al.* 2013).

Η ανακάλυψη των γονιδίων εκτός του MHC που συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα έγινε με διάφορες μελέτες σύνδεσης, μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων και μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος. Ένα γονίδιο, που βρέθηκε με μεγάλη συσχέτιση με τη νόσο (26%), είναι το *ERAP1* ή αλλιώς *ARTS1* στη χρωμοσωματική περιοχή 5p15 (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Πολυμορφισμοί του *ERAP1* που συσχετίζονται με τη νόσο είναι οι rs27044, rs30187, rs17482078, rs10050860 και rs2287987 (Wellcome Trust Case

Control Consortium 2007). Η συσχέτιση αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις 3 λειτουργίες της πρωτεΐνης ERAP1: 1) περικόπτει αντιγονικά πεπτιδία στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε κατάλληλο μέγεθος για την παρουσίαση τους στο MHC τάξης I, 2) αποκόπτει τους επιφανειακούς υποδοχείς των προφλεγμονώδων κυτταροκινών IL-1 (IL-1R2) , IL-6 (IL-6Rα) και TNF (TNFR1), 3) ενεργοποιεί τα μακροφάγα (Zambrano-Zaragoza *et al.* 2013). Τα αποτελέσματα ερευνών, οδηγούν στο συμπέρασμα πως ο μηχανισμός που εξηγεί καλύτερα τη συσχέτιση αυτή είναι η περικοπή των αντιγονικών πεπτιδίων σε κατάλληλο μέγεθος για την παρουσίασή τους στο MHC. Το γονίδιο ERAP2 συσχετίζεται και αυτό με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα σε άτομα αρνητικά για το HLA-B27 και δεν είναι γνωστό αν συσχετίζεται και σε άτομα θετικά για το HLA-B27, όπως συμβαίνει με το ERAP1.

Ένα ακόμη γονίδιο με μεγάλη συνεισφορά στη νόσο (9%) που βρίσκεται εκτός του MHC, είναι το IL-23R που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1. Η IL-23 είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που προωθεί την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-6, IL-17, IL-22, καθώς και των κυττάρων Th17, τα οποία έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στο περιφερικό αίμα και στον ορό ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (Lim'ón-Camacho *et al.* 2012). Ισχυρή συσχέτιση με τη νόσο παρουσιάζουν οι πολυμορφισμοί rs11209032, rs11209026 και rs10489629 (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το μονοπάτι του υποδοχέα του IL-23 παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθολογία της νόσου και μπορεί να ελέγχει διάφορες εκδηλώσεις της (Sherlock *et al.* 2012).

Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος αποκάλυψαν πολλά ακόμη γονίδια που συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, όπως τα KIRS, CYP2D6, UBE2E3, UBE2L3, IL6R, τα γονίδια του συμπλέγματος IL-1 (IL1R1, IL1R2, IL-1RN, IL-1A, IL-1B), αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην λεμφοκυτταρική ανάπτυξη και ενεργοποίηση (EOMES, RUNX3, TBX21, ZMIZ1, IL7, IL7R) και τρεις GPRCs (GPR35, GPR37, GPR65) (Philip *et al.* 2014). Τέλος, μελέτες σύνδεσης ταυτοποίησαν περιοχές με πιθανή σύνδεση, όπως οι περιοχές των χρωμοσωμάτων 10 και 16q, καθώς και μικρή σύνδεση στις περιοχές των χρωμοσωμάτων 3, 10, 11, 17 και 19q (Végnári *et al.* 2009).



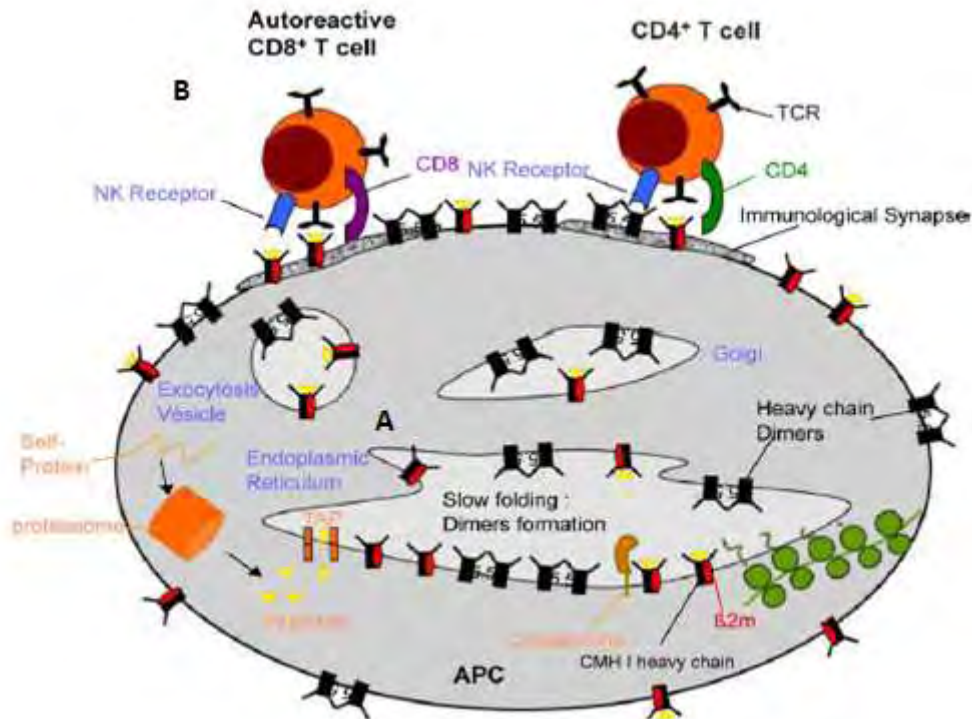
### 1.1.6 Παθογένεση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας

Λόγω της ισχυρής συσχέτισης του HLA-B27 με τις σπονδυλοαρθρίτιδες, το HLA-B27 είναι το πιο καλά μελετημένο αλληλόμορφο HLA-B. Ο τρόπος με τον οποίο το HLA-B27 επηρεάζει την ασθένεια δεν είναι ξεκάθαρος, ωστόσο από μελέτες ποικίλων ζωικών μοντέλων έχουν διατυπωθεί ορισμένες θεωρίες για το μηχανισμό. Οι θεωρίες μπορούν να χωριστούν σε αντιγονο-εξαρτώμενες και αντιγονο-ανεξάρτητες (Εικόνα 2) (Hacquard-Bouder *et al.* 2005).

Οι αντιγονο-εξαρτώμενες θεωρίες βασίζονται στην αντιγονική παρουσίαση και περιλαμβάνουν τη θεωρία του αρθριτογόνου πεπτιδίου και τη θεωρία της μοριακής μίμησης. Στη θεωρία του αρθριτογόνου πεπτιδίου, το HLA-B27 συνδέεται με ειδικά πεπτίδια των αρθρώσεων, μικροβιακής ή εαυτής προέλευσης, και τα παρουσιάζει σε αυτοδραστικά CD8+ ή CD4+ T λεμφοκύτταρα (στοχεύουν σε εαυτά μόρια), υπεύθυνα για τη φλεγμονώδη νόσο (Ramos & Lopez de Castro, 2002). Στη θεωρία της μοριακής μίμησης, αν ένα εξωγενές πεπτίδιο παρουσιάζει μοριακή μίμηση με ένα ενδογενές πεπτίδιο, το οποίο αναγνωρίζεται από το ανοσολογικό σύστημα μέσω του HLA-B27, είναι δυνατό η αρχική ανοσολογική απόκριση στο εξωγενές πεπτίδιο να καταλύσει την αυτο-ανοχή (κατάσταση στην οποία τα ανώριμα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα καταστρέφονται) και να έχουμε απόκριση και ως προς το ενδογενές πεπτίδιο που συμπεριφέρεται πλέον ως αυτο-αντιγόνο. (Davenport, 1995).

Οι αντιγονο-ανεξάρτητες θεωρίες βασίζονται στη δομή του μορίου HLA-B27 και περιλαμβάνουν τη θεωρία της λανθασμένης αναδίπλωσης και τη θεωρία σχηματισμού ομοδιμερών των βαρέων αλυσίδων του HLA-B27. Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες με τη βοήθεια σαπερονίων (πρωτεΐνες του κυττάρου που φροντίζουν να γίνεται αποτελεσματικά η αναδίπλωση των μακρομοριακών δομών στο χώρο), οι βαριές αλυσίδες του HLA-B27 συνδέονται μη-ομοιοπολικά με το μόριο της β2-μικροσφαιρίνης (η ελαφρά ή β-αλυσίδα του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου) και τέλος προστίθεται το αντιγονικό πεπτίδιο. Το σύμπλεγμα αυτό εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ωστόσο η αναδίπλωση των βαρέων αλυσίδων του HLA-B27 γίνεται με πολύ χαμηλότερο ρυθμό σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μόρια HLA, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη αναδίπλωση του HLA-B27

(Mear *et al.* 1999). Οι λανθασμένα αναδιπλωμένες βαριές αλυσίδες συνήθως αποβάλλονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά σε περίπτωση ανεπαρκών ή ακατάλληλων σαπερονίων, πεπτιδίων ή β2 μικροσφαιρίνης είναι δυνατόν να συσσωρευτούν, με αποτέλεσμα την πυροδότηση ενός σήματος συναγερμού από το κύτταρο, το οποίο ονομάζεται UPR (Unfolded Protein Response, απόκριση μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης). Η UPR ενεργοποιείται από την παρατεταμένη αλληλεπίδραση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο με το σαπερόνιο BiP και μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) (Pahl *et al.* 1996). Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας οδηγεί στην αύξηση της κυτταρικής έκφρασης των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IL-1 και IL-6. Η χρόνια ενεργή UPR έχει ως αποτέλεσμα μια προφλεγμονώδη κατάσταση και αυξημένη απόκριση της ιντερλευκίνης 23 (IL-23), οι πολυμορφισμοί της οποίας συσχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, συνδέοντας έτσι την UPR με την ανάπτυξη των κυττάρων Th17, ένα υποπληθυσμό T λεμφοκυττάρων που σχετίζεται με διαφορετικές φλεγμονώδεις νόσους (DeLay *et al.* 2009). Η θεωρία του σχηματισμού ομοδιμερών των βαρέων αλυσίδων του HLA-B27 προτείνει ότι τα ομοδιμερή σχηματίζονται πιθανότατα λόγω της αποσύνδεσης του συμπλόκου HLA-B27/πεπτιδίου μέσω ενδοσωματικής ανακύκλωσης και μπορεί να εντοπίζονται είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου διεγείρουν την UPR, είτε τοπικά στην κυτταρική επιφάνεια (Bird *et al.* 2003). Τα ομοδιμερή μπορεί να συνδέονται με ρυθμιστικούς υποδοχείς του ανοσοποιητικού όπως με τους υποδοχείς KIR των κυττάρων NK, προωθώντας την επιβίωση και διαφοροποίηση προφλεγμονώδων λευκοκυττάρων στη νόσο.



Εικόνα 2. Σύνοψη των διαφορετικών θεωριών του παθογενετικού ρόλου του HLA-B27 στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Α. Η λανθασμένη αναδίπλωση του HLA-B27 έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ομοδιμερών και τη συσσώρευσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, γεγονός που οδηγεί σε ένα μηχανισμό ανταπόκρισης σε στρες και ενεργοποίηση του NF-κΒ. Β. Διάφορες μορφές των μορίων HLA-B27 εκφράζονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) μέσω κυστιδίων εξωκυττάρωσης. Αυτά τα μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτοδραστικά CD8+ T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν ένα “αρθριτογόνο πεπτίδιο” ή με CD4+ T λεμφοκύτταρα ή με υποδοχείς κυττάρων NK από ομοδιμερή HLA-B27 (Hacquard-Bouder et al. 2006)

## 1.2 Θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας

Η κοινή θεραπεία για όλες τις σπονδυλοαρθρίτιδες περιλαμβάνει φάρμακα, ασκήσεις και φυσιοθεραπεία, άλλες θεραπευτικές επιλογές όπως η χρήση ζέστης/κρύου για τη χαλάρωση των μυών και τη μείωση του πόνου στις αρθρώσεις, ενώ σε προχωρημένες καταστάσεις μπορεί να χρειάζεται ακόμα και χειρουργική επέμβαση. Η φαρμακευτική θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας περιλαμβάνει τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs-nonsteroidal anti-inflammatory drugs), τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα (DMARDs-disease-modifying antirheumatic drugs) και τους αναστολείς του TNF-α.

### 1.2.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) προτείνονται ως πρώτη γραμμή θεραπείας στους ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα με άλγος και δυσκαμψία. Τα κλασικά ΜΣΑΦ μπορεί να βελτιώσουν το άλγος της σπονδυλικής στήλης, την περιφερική αρθρίτιδα και τη λειτουργικότητα σε διάστημα 6 εβδομάδων (Zochling *et al.* 2006). Τα ΜΣΑΦ ταξινομούνται στα κλασικά ή μη εκλεκτικά (π.χ. ναπροξένη, ιβοπροφένη, δικλοφενάκη), που δρουν αναστέλλοντας και τις δυο κυκλο-οξυγενάσες (COX-1, COX-2), και στα νεότερα εκλεκτικά (κοξίμπες, COXIB) (σελεκοξίμπη, ροφεκοξίμπη, βαλντεκοξίμπη), που αναστέλλουν μόνο την COX-2, η οποία ενεργοποιείται κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Οι επιλεκτικοί αναστολείς της κυκλο-οξυγενάσης-2 (κοξίμπες) έχουν επάξια αποτελεσματικότητα στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Μία δίχρονη μελέτη με ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε σελεκοξίμπη συνεχόμενα για 2 χρόνια και σε ασθενείς που λάμβαναν σελεκοξίμπη κατά διαστήματα, έδειξε ότι η συνεχής θεραπεία με σελεκοξίμπη επιβράδυνε την ακτινολογική εξέλιξη στα 2 χρόνια σε σχέση με την χρήση της κατά διαστήματα (Wanders *et al.* 2005). Η αποτελεσματικότητα κάποιου ΜΣΑΦ κρίνεται από τη χορήγηση του σε μέγιστη συνιστώμενη δόση για 2-4 εβδομάδες. Όταν υπάρχει καλή ανταπόκριση, το ΜΣΑΦ συνεχίζεται στην ελάχιστη δραστική δόση.

Η χρήση ΜΣΑΦ προκαλεί συνήθως σημαντικές παρενέργειες που αφορούν κυρίως το πεπτικό σύστημα και οι ασθενείς με υψηλό κίνδυνο γαστρεντερικών επιπλοκών πρέπει να λαμβάνουν γαστροπροστασία (Zochling *et al.* 2006). Οι κοξίμπες, αν και έχουν παρόμοια αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες από τα κλασικά ΜΣΑΦ, καθώς αναστέλλουν μόνο την COX-2, η οποία δεν επηρεάζει την παραγωγή θρομβοξανής A<sub>2</sub> και προσταγλαδινών υπεύθυνων για την προστασία του γαστρικού βλεννογόνου. Σε ασθενείς στους οποίους τα ΜΣΑΦ έχουν μικρή αποτελεσματικότητα μπορεί να χορηγηθούν αναλγητικά, όπως η παρακεταμόλη, ή ακόμα και οπιοειδή αναλγητικά για τον έλεγχο του άλγους (Zochling *et al.* 2006).

### 1.2.2 Νοσοτροποποιητικά φάρμακα

Όταν η χρήση των ΜΣΑΦ δεν επαρκεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα που αποτελούν τη δεύτερη γραμμή φαρμάκων. Τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα είναι φάρμακα που τροποποιούν τη φυσική πορεία ορισμένων ρευματικών παθήσεων αναστέλλοντας την εξέλιξή τους και επιτυγχάνοντας ύφεση. Μερικά από τα πιο σημαντικά φάρμακα αυτής της ομάδας είναι η σουλφασαλαζίνη, η μεθοτρεξάτη και τα κορτικοστεροειδή.

**Σουλφασαλαζίνη:** Το καλύτερα μελετημένο νοσοτροποποιητικό φάρμακο στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι η σουλφασαλαζίνη. Η σουλφασαλαζίνη είναι γνωστό ότι ελέγχει αποτελεσματικά όχι μόνο τον πόνο και το οίδημα των αρθρώσεων από την αρθρίτιδα αλλά και τις εντερικές βλάβες. Σε μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο (placebo), βρέθηκε ότι η σουλφασαλαζίνη (3 gr/ημέρα) είχε μεγαλύτερη θετική επίδραση στους ασθενείς με περιφερική αρθρίτιδα παρά σε εκείνους με αξονική νόσο. Σε ασθενείς με αξονική νόσο τα ποσοστά ανταπόκρισης στη σουλφασαλαζίνη και το placebo ήταν ίδια, ενώ σε ασθενείς με περιφερική αρθρίτιδα τα ποσοστά ήταν 59% στην σουλφασαλαζίνη και 42,7% στο placebo (Clegg DO *et al.* 1999).

**Μεθοτρεξάτη:** Η μεθοτρεξάτη είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος και αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και πρωτεϊνών. Αναπτύχθηκε αρχικά για την καταπολέμηση του καρκίνου, ωστόσο χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικό και για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Όταν συνταγογραφείται για την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, χορηγείται σε πολύ μικρότερες δόσεις σε σχέση με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Μια μελέτη διάρκειας ενός έτους έδειξε ότι η μεθοτρεξάτη (12,5 mg ενδομυϊκά εβδομαδιαίως) δεν είχε καμία επίδραση στον αξονικό σκελετό, αλλά είχε σημαντική βελτίωση στους 16 από τους 26 ασθενείς με περιφερική αρθρίτιδα (Sampaio-Barros *et al.* 2000).

**Κορτικοστεροειδή:** Η συνεχής θεραπεία με κορτικοστεροειδή στην αξονική νόσο της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας δεν συνιστάται από τους ειδικούς, αν και για το

θέμα αυτό δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες (Lavie *et al.* 2007). Η τοπική ένεση κορτικοειδούς στις ιερολαγόνιες αρθρώσεις ανακουφίζει από το άλγος και είναι μία εναλλακτική προσέγγιση σε ασθενείς με ανθεκτικότητα ή υποτροπή του τοπικού άλγους παρά τη χορήγηση ΜΣΑΦ (Maugars *et al.* 1996).

### 1.2.3 Βιολογικοί παράγοντες αντι-TNFα

Ο TNFα είναι μια κυτταροκίνη που συμμετέχει σε μια σειρά φλεγμονωδών, μολυσματικών και κακοηθών καταστάσεων. Απελευθερώνεται από διαφορετικά ανοσοποιητικά και μη κύτταρα ως ένα διαλυτό μόριο μετά από αποκοπή από την κυτταρική επιφάνεια, με τη βοήθεια ενός ενζύμου (TACE). Τόσο ο διαλυτός (sTNF) όσο και ο διαμεμβρανικός (mTNF) TNF είναι βιολογικά ενεργοί όταν αλληλεπιδρούν με οποιονδήποτε από τους δυο υποδοχείς TNFR1 ή p55 και TNFR2 ή p75 (Chan *et al.* 2000). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει το ρόλο του TNF στην παθογένεση χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η νόσος Crohn (Marra *et al.* 2011).

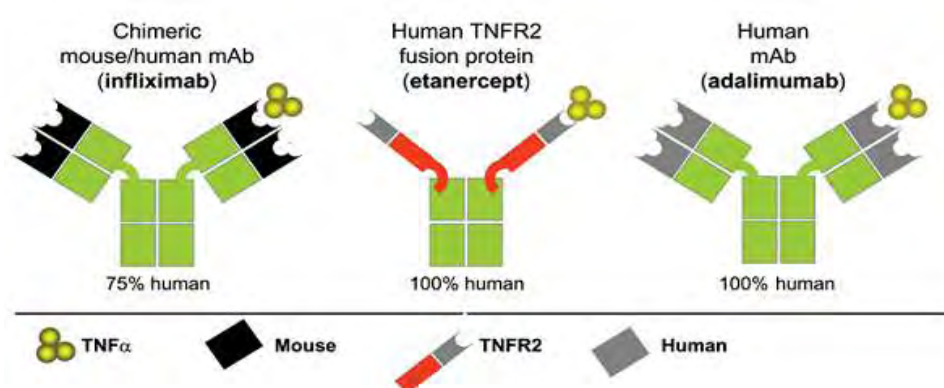
Από το τέλος της δεκαετίας του '90, αναπτύχθηκαν διαφορετικά φάρμακα που στοχεύουν τον TNFα, βελτιώνοντας δραματικά την κατάσταση των ασθενών. Οι αναστολείς του TNFα έχουν λάβει έγκριση (etanercept-2003, infliximab-2004, adalimumab-2006) για τη θεραπεία της σοβαρής, ενεργού νόσου (BASDAI>4) και η αποτελεσματικότητά τους έχει αποδειχθεί σε τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες με placebo μελέτες, στις οποίες δείχθηκε ότι τα φάρμακα αυτά βελτιώνουν τα συμπτώματα της νόσου, τις μετρήσιμες παραμέτρους (BASMI), το δείκτη BASDAI, εργαστηριακούς δείκτες φλεγμονής, τη λειτουργικότητα των ασθενών (BASFI) και την ποιότητα ζωής (van der Heijde *et al.* 2006). Η βελτίωση των συμπτωμάτων της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας μετά από τη θεραπεία με κάποιον αναστολέα του TNF είναι ταχεία και εμφανίζεται εντός δυο εβδομάδων (Brandt *et al.* 2000).

Ένα από τα πλεονεκτήματα της χορήγησης των παραγόντων αντι-TNF στη ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι η αναστολή της ακτινολογικής εξέλιξης, κάτι το οποίο δεν έχει εξακριβωθεί και για την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Φαίνεται ότι υπάρχει κάποια επιβράδυνση της ακτινολογικής εξέλιξης, ωστόσο δεν υπάρχουν μακροχρόνιες μελέτες με πολλούς ασθενείς για οριστικά συμπεράσματα (Baraliakos

*et al.* 2007). Μελέτες με μαγνητική τομογραφία (MRI) έδειξαν ότι οι αναστολείς του TNFα καταστέλλουν τη φλεγμονή στις ιερολαγόνιες αρθρώσεις και τη σπονδυλική στήλη, όμως σε αρκετούς ασθενείς η φλεγμονή στις θέσεις αυτές επιμένει (Marzo-Ortega *et al.* 2009). Η καταστολή της φλεγμονής δεν είναι γνωστό ακόμη αν σχετίζεται με την αναστολή της αγκύλωσης (Jois *et al.* 2007).

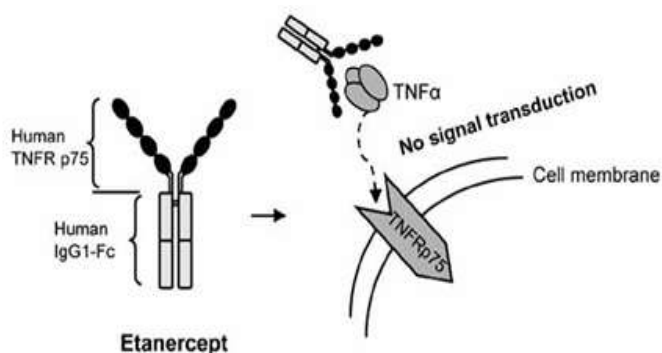
Σύμφωνα με τη οδηγίες της ASAS (Assessment in Ankylosing Spondylitis working group), κατάλληλοι για θεραπεία με αναστολείς TNF-α είναι οι ασθενείς με ΑΣ που πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις: 1) έχουν διαγνωστεί με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, 2) έχουν ενεργή νόσο, που ορίζεται ως BASDAI  $\geq 4$  για διάστημα τουλάχιστον 4 εβδομάδων, 3) έχουν αποτύχει τουλάχιστον 2 ΜΣΑΦ για τουλάχιστον 3 μήνες στην ενδεδειγμένη δόση και 4) δεν έχουν αντένδειξη για θεραπεία με αναστολέα του TNF (Braun *et al.* 2006).

Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα είναι το etanercept (enbrel), το infliximab (remicade) και το adalimumab (humira) (Εικόνα 3). Και τα τρία αυτά φάρμακα προσδένουν ισχυρά και έχουν παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ τους για τον διαλυτό TNFα, αλλά και για τον διαμεμβρανικό TNFα (η πρόσδεση του διαμεμβρανικού TNFα είναι λιγότερη ισχυρή από αυτή του διαλυτού TNFα κατά μια τάξη μεγέθους). Το αποτέλεσμα είναι ότι εμποδίζουν τη σύνδεση του TNFα στους υποδοχείς του και ως επακόλουθο τις βιολογικές του δράσεις.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση τριών παραγόντων αντι-TNF. Το infliximab είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-TNFα από άνθρωπο και ποντικό, το etanercept είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη σύντηξης δύο p75 TNFRs με το Fc τμήμα του ανθρώπινου IgG1 και το adalimumab είναι ένα πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-TNFα (Russo & Polosa, 2005).

**Etanercept (Enbrel):** Είναι η ανασυνδυασμένη μορφή του υποδοχέα p75 του TNFα που συνδέεται με το τμήμα Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G1 (IgG1). Το etanercept συνδέεται με τον TNFα, εμποδίζει την πρόσδεσή του στον υποδοχέα p75 και έτσι περιορίζει αποτελεσματικά τις βιολογικές του δράσεις (Εικόνα 4) (Sharma *et al.* 2004). Τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές φάσης II και III του etanercept για την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, ανέδειξαν ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας και σημείωσαν κλινική αποτελεσματικότητα, ειδικά στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν επαρκώς στις συνηθισμένες θεραπείες (Maini & Taylor, 2000). Σε τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με placebo μελέτη, βρέθηκε ότι τα ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα κατά ASAS 20,50,70 ήταν 60%, 45% και 29%, αντίστοιχα (U.S. Food and Drug Administration). Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου είναι 102 +/- 30 ώρες και η προτεινόμενη δοσολογία είναι 25 mg, 2 φορές την εβδομάδα με υποδόρια ένεση, ωστόσο στην πράξη χορηγούνται 50 mg εβδομαδιαίως, λόγω δυσκολίας στην παρασκευή του ενέσιμου διαλύματος.

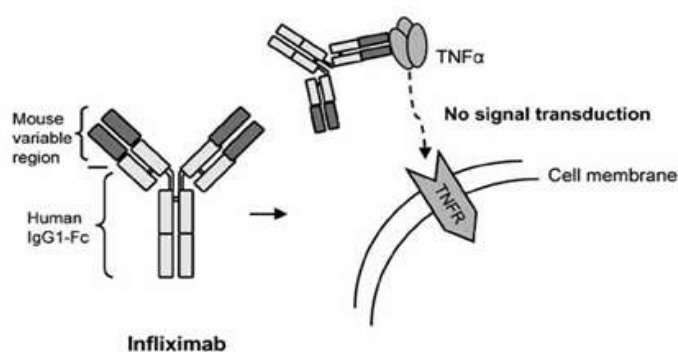


Εικόνα 4. Μοριακός μηχανισμός του etanercept. Το etanercept συνδέεται με τον TNFα και τον αποτρέπει να συνδεθεί στον υποδοχέα του TNFR2 (p75) και να ασκήσει τις βιολογικές του δράσεις (Rego-Pérez *et al.* 2008).

**Infliximab (Remicade):** Το infliximab είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα με 75% ανθρώπινη (περιλαμβάνει τις σταθερές περιοχές του αντισώματος IgG1) και 25% πρωτεΐνη ποντικού (περιλαμβάνει τις μεταβλητές περιοχές του αντισώματος) που προσδένεται στις διαλυτές και στις διαμεμβρανικές μορφές του TNFα. Το infliximab συνδέεται με τον TNFα, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς του και έτσι περιορίζει αποτελεσματικά τις βιολογικές του δράσεις



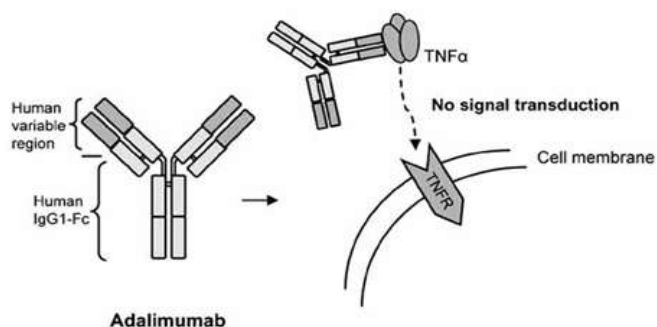
(Εικόνα 5). Το infliximab προτείνεται για την θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας με σοβαρά σκελετικά συμπτώματα που δεν έχουν ανταποκριθεί επαρκώς στη συνηθισμένη θεραπεία. Σε τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με placebo μελέτη, βρέθηκε πως τα ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα κατά ASAS 20,50,70 ήταν 60%, 44% και 28%, αντίστοιχα (U.S. Food and Drug Administration). Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου είναι 8-12 ημέρες και η προτεινόμενη δοσολογία είναι 5 mg/kg με υποδόρια ένεση στην πρώτη, δεύτερη και έκτη εβδομάδα, ενώ ακολουθεί δόση διατήρησης των 5 mg/kg κάθε 6-8 εβδομάδες.



Εικόνα 5. Μοριακός μηχανισμός του infliximab. Το infliximab συνδέεται με τον TNFα και τον αποτρέπει να συνδεθεί στους υποδοχείς του και να ασκήσει τις βιολογικές του δράσεις (Rego-Pérez et al. 2008).

**Adalimumab (Humira):** Είναι ένα πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον TNFα. Το adalimumab, όπως και τα προηγούμενα φάρμακα, συνδέεται με τον TNFα, εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς του και έτσι περιορίζει αποτελεσματικά τη βιολογική δράση τόσο του διαλυτού, όσο και του διαμεμβρανικού TNFα (Εικόνα 6). Επιπλέον, το adalimumab μειώνει τα επίπεδα της IL-6 και των MMPs (matrix metalloproteinases-MMP-1, MMP-3) (Rego-Pérez et al. 2008). Σε τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με placebo μελέτη, βρέθηκε ότι τα ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα κατά ASAS 20,50,70 ήταν 58%, 38% και 23%, αντίστοιχα (U.S. Food and Drug Administration). Το μόριο αυτό έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής (2 εβδομάδες) και η δοσολογία του είναι 40 mg κάθε 2 εβδομάδες με υποδόρια ένεση. Το adalimumab μπορεί να

χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα νοσοτροποποιητικά φάρμακα (Sharma *et al.* 2004).



Εικόνα 6. Μοριακός μηχανισμός του *adalimumab*. Το *adalimumab* συνδέεται με τον *TNFα* και τον αποτρέπει να συνδεθεί στους υποδοχείς του και να ασκήσει τις βιολογικές του δράσεις (Rego-Pérez *et al.* 2008).

Τα φάρμακα *etanercept*, *infliximab* και *adalimumab* έχουν συσχετιστεί με σοβαρές παρενέργειες, κυρίως σοβαρές λοιμώξεις που συμπεριλαμβάνουν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, ενεργοποίηση λανθάνουσας φυματίωσης και σηψαιμία, καθώς υπάρχει η πιθανότητα για τους παράγοντες αντι-TNF να επηρεάσουν την άμυνα του ασθενούς κατά των λοιμώξεων και των κακοηθειών δεδομένου ότι ο TNF μεσολαβεί στη φλεγμονή και ρυθμίζει τις κυτταρικές αποκρίσεις του ανοσοποιητικού. Για το λόγο αυτό αν τα άτομα εμφανίσουν μια λοίμωξη κατά τη διάρκεια χρήσης ενός παράγοντα αντι-TNF, πρέπει να σταματήσουν τη θεραπεία με αυτόν. Μία σπάνια πιθανή επιπλοκή που έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι η ανάπτυξη καρκίνου, ειδικά του αίματος (λευχαιμία) ή του λεμφικού συστήματος (λέμφωμα). Το κόστος των θεραπειών με αντι-TNF παράγοντες αποτελεί σημαντικό περιοριστικό παράγοντα της ευρύτερης χρήσης τους. Μια οικονομική ανάλυση έδειξε ότι οι τρεις βιολογικοί παράγοντες δεν μπορούν να θεωρηθούν οικονομικά συμφέρουσες θεραπείες, αν ωστόσο ληφθούν υπόψη οι οικονομικές συνέπειες της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας για τον ασθενή, την κοινωνία και την αναμενόμενη αναστολή της εξέλιξης της νόσου, η χρήση των αναστολέων του TNF-α ίσως να είναι οικονομικά συμφέρουσα (Botteman *et al.* 2007, Ara *et al.* 2007, Kobelt *et al.* 2007).

Σε περίπτωση ικανοποιητικής ανταπόκρισης, η θεραπεία συντήρησης παραμένει εμπειρική. Με την επίτευξη πλήρους ή μερικής ύφεσης, θα μπορούσε να

διακοπεί η χρήση του αναστολέα του TNF, όμως η παρακολούθηση των ασθενών που συμμετείχαν σε τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξε ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών υποτροπίασαν μετά τη διακοπή του παράγοντα αντι-TNF-α, συνήθως σε 12-24 εβδομάδες (Baraliakos *et al.* 2005). Η επαναχορήγηση infliximab ή etanercept ήταν ασφαλής και αποτελεσματική. Έτσι, το θέμα της συντηρητικής θεραπείας με παράγοντα αντι-TNF-α στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα παραμένει ανοιχτό.

### 1.3 Φαρμακογενετική

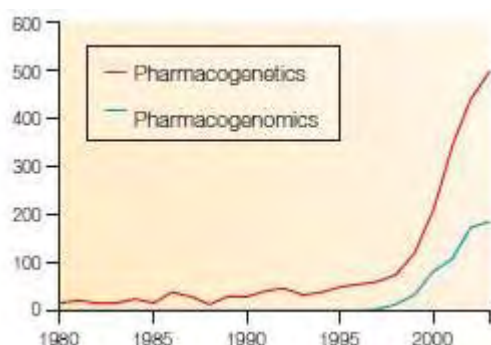
Ο όρος φαρμακογενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1959 από τον γερμανό γενετιστή F. Vogel, για να περιγράψει την ύπαρξη γενετικών διαφορών ανάμεσα στα άτομα που σχετίζονται με την ανταπόκριση τους στα φάρμακα (Meyer, 2004). Ενώ υπάρχουν αρκετοί λόγοι που μπορεί να εξηγήσουν την ποικιλία αποκρίσεων στα φάρμακα, όπως η ηλικία, το φύλο, η βαρύτητα της νόσου και η παράλληλη χρήση άλλων φαρμάκων, οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων που επηρεάζουν το μεταβολισμό, μεταφορά και απέκκριση των φαρμάκων και/ή τους μοριακούς στόχους τους, φαίνεται ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ποικιλότητα αυτή (Siva *et al.* 2002).

Σήμερα είναι γνωστοί αρκετοί πολυμορφισμοί οι οποίοι επηρεάζουν την ανταπόκριση των ασθενών σε συγκεκριμένα φάρμακα, μεταβάλλοντας είτε τη φαρμακοκινητική είτε τη φαρμακοδυναμική τους. Η κλινική σημασία αυτού του φαινομένου, που είναι και ο απώτερος στόχος του τομέα της φαρμακογενετικής, είναι ότι με τον προσδιορισμό των γονοτύπων γίνεται δυνατή η επιλογή/παραγωγή του κατάλληλου φαρμάκου και ο καλύτερος σχεδιασμός δοσολογίας για κάθε ασθενή (εξατομίκευση δόσης), με αποτέλεσμα την βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών (Meyer, 2004).

Το πιο συχνό είδος πολυμορφισμού στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs, single nucleotide polymorphism). Τα SNPs μπορεί να εμφανιστούν εντός της κωδικής ή της μη κωδικής περιοχής του γονιδίου. Τα SNPs μέσα στην κωδική περιοχή μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στο αμινοξύ που κωδικοποιείται. Τα SNPs στην μη κωδική περιοχή μπορεί να

επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων ή τη σταθερότητα του mRNA. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα διαφορετικό πρότυπο SNPs. Στη φαρμακογενετική έρευνα των ρευματοειδών νοσημάτων, έχουν βρεθεί πολλά SNPs που σχετίζονται με την καλή/κακή ανταπόκριση των ασθενών στα φάρμακα.

Η φαρμακογενετική έρευνα έχει δει μια έκρηξη ενδιαφέροντος από φυσιολόγους, γενετιστές και τη φαρμακευτική βιομηχανία όπως φαίνεται από τη γρήγορη αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων που περιλαμβάνουν αυτό τον όρο (Εικόνα 7). Η αυξανόμενη χρήση του όρου φαρμακογενωμική αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της φαρμακογενετικής στην έρευνα όλου του φάσματος των γονιδίων που καθορίζουν τη δράση των φαρμάκων (Meyer, 2004). Για την ακρίβεια η φαρμακογενωμική αποτελεί την επιστήμη που κάνει χρήση της γονιδιωματικής για την εύρεση νέων θεραπειών.



Εικόνα 7. Παρουσία του όρου φαρμακογενετική και φαρμακογενωμική σε άρθρα στη βάση δεδομένων Pubmed (Meyer, 2004)

Επί του παρόντος, οι φαρμακογενετικές έρευνες στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι ελλειπείς. Επομένως, μια αναφορά στην καλύτερα μελετημένη φαρμακογενετική άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων είναι απαραίτητη, καθώς ορισμένοι πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με τα αυτοάνοσα νοσήματα αφορούν και την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα.

### 1.3.1 Φαρμακογενετική της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια υψηλά ετερογενής νόσος που επηρεάζει το 0.5-1% του πληθυσμού παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από χρόνια

φλεγμονή των αρθρώσεων, η οποία οδηγεί στην καταστροφή των οστών και του χόνδρου καθώς και σε άλλες εκδηλώσεις που δεν περιλαμβάνουν τις αρθρώσεις (Silman & Pearson, 2002). Μελέτες διδύμων έχουν δείξει πως γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα της νόσου και η γενετική αυτή συνεισφορά κυμαίνεται στο 50-60% (MacGregor *et al.* 2000). Ο πιο σημαντικός γενετικός τόπος που συμβάλει στην ανάπτυξη της νόσου εντοπίζεται στο HLA και περιλαμβάνει το αλληλόμορφο HLA-DRB1.

Στην κλινική ιατρική οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα αντιμετωπίζονται με τα παραδοσιακά νοσοτροποποιητικά αντιρευματικά φάρμακα, όπως η μεθοτρεξάτη, ενώ σε περιπτώσεις χαμηλής ανταπόκρισης στα νοσοτροποποιητικά φάρμακα ή εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών χορηγείται ένας συνδυασμός μεθοτρεξάτης και βιολογικών παραγόντων. Παρόλα αυτά, ένα 40-60% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν παρουσιάζει ικανοποιητική ανταπόκριση και ένα 15-30% εμφανίζει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες από τα φάρμακα αυτά (Klareskog *et al.* 2004), πράγμα που επιδεικνύει ένα σημαντικό αριθμό μη εντοπισμένων πολυμορφισμών γονιδίων που επηρεάζουν την απόκριση σε θεραπεία με νοσοτροποποιητικά φάρμακα και βιολογικούς παράγοντες.

### **Φαρμακογενετική της μεθοτρεξάτης στην ρευματοειδή αρθρίτιδα**

Η μεθοτρεξάτη αποτελεί δομικό ανάλογο του φυλλικού οξέος και δρα ως ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος. Μετά την είσοδό της στο κύτταρο, η μεθοτρεξάτη υφίσταται πολυγλουταμινοποίηση και μετατρέπεται σε πολυγλουταμάτες της μεθοτρεξάτης από το ένζυμο FPGS (folypolyglutamate synthetase). Αυτή η κατάσταση μπορεί να αντιστραφεί από το ένζυμο GGH (gamma-glutamyl hydrolase). Η πολυγλουταμινοποιημένη μεθοτρεξάτη αναστέλλει άμεσα πολλά ένζυμα του μονοπατιού του φυλλικού οξέος, όπως η διυδροφυλλική αναγωγή (DHFR-dihydrofolate reductase), που είναι και ο κύριος στόχος της μεθοτρεξάτης, η συνθάση της θυμιδυλάτης (TYMS-thymidylate synthetase) και τη μετατροπή του AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) σε φορμυλ-AICAR, μία ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την τρανσφορμυλάση του AICAR. Η συσσώρευση του AICAR εμποδίζει άλλα ένζυμα, όπως το AMPD1 (adenosine monophosphate deaminase), οδηγώντας στην απελευθέρωση της

αδενοσίνης, έναν πιθανό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Cronstein, 2005). Ακόμη, η πολυγλουταμινοποιημένη μεθοτρεξάτη αναστέλλει έμμεσα την μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή (MTHFR-methylenetetrahydrofolate reductase), ένα ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι του φυλλικού οξέος που καταλύει τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη (Chan & Cronstein, 2002).

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί αρκετά SNPs γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού και ένζυμα μεταφοράς της μεθοτρεξάτης, ωστόσο η σχέση τους με την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα έχει επιφέρει αντιφατικά αποτελέσματα. Οι πιο καλά μελετημένοι πολυμορφισμοί περιλαμβάνουν τα SNPs στις θέσεις 677C>T και 1298A>C του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή MTHFR. Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη με 105 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λάμβαναν μεθοτρεξάτη, βρέθηκε ότι και οι δυο πολυμορφισμοί συσχετίζονται με μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα και γαστρεντερική τοξικότητα (Haagsma *et al.* 1999). Ωστόσο, έχουν παρουσιαστεί κατά καιρούς και αντιφατικά αποτελέσματα, όπως έρευνες που δεν έδειξαν καμία συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα της μεθοτρεξάτης ή άλλες που έδειξαν ότι οι ασθενείς με γονότυπο MTHFR 677TT ήταν λιγότερο πιθανό να ανταποκρίνονται στη μεθοτρεξάτη (Dervieux *et al.* 2006), ενώ ασθενείς με γονότυπο MTHFR 677CC συσχετίζονταν με καλύτερη ανταπόκριση (Wessels *et al.* 2006). Αντικρουόμενες έρευνες υπήρξαν και για τον πολυμορφισμό 1298A>C, στις οποίες ασθενείς με γονότυπο MTHFR 1298CC επέδειξαν μεγάλη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη (Urano *et al.* 2002) αλλά αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας, ενώ μια έρευνα βρήκε χαμηλό δείκτη DAS (Disease Activity Scor) σε ασθενείς με γονότυπο MTHFR 1298AA (Wessels *et al.* 2006).

Επιπλέον ένζυμα που επηρεάζονται από τις πολυγλουταμάτες της μεθοτρεξάτης είναι τα MTHFD1 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1) και SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1). Το γονίδιο MTHFD1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που έχει τρεις ξεχωριστές ενζυμικές δραστηριότητες, οι οποίες καταλύουν μια από τις τρεις διαδοχικές αντιδράσεις κατά τη μετατροπή των παραγώγων του τετραϋδροφυλλικού με ένα άνθρακα. Ο πολυμορφισμός 1958G>A στο γονίδιο MTHFD1 έχει συσχετιστεί με αποτελεσματικότητα στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη

(Wessels *et al.* 2007). Το γονίδιο SHMT1 κωδικοποιεί το ένζυμο SHMT1, το οποίο καταλύει τη μετατροπή της σερίνης σε γλυκίνη και του τετραϋδροφυλλικού σε 5,10 μεθυλενοτετραυδροφυλλικό. Σε μια πολυετή μελέτη με 48 ασθενείς που έλαβαν μεθοτρεξάτη, βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός 1420C>T του γονιδίου SHMT1 επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα και ότι στους ασθενείς με γονότυπο 1420CC η μεθοτρεξάτη είχε μεγάλη αποτελεσματικότητα (Dervieux *et al.* 2006). Μερικές έρευνες δεν αναφέρουν συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με τοξικότητα, ενώ άλλες αναφέρουν συσχέτιση του γονότυπου 1420CC με παρενέργειες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Weisman *et al.* 2006).

Τα ένζυμα TYMS, DHFR και ATIC (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase) είναι άμεσοι στόχοι της μεθοτρεξάτης. Το γονίδιο TYMS κωδικοποιεί το ένζυμο συνθάση της θυμιδιλάτης, το οποίο μετατρέπει τη μονοφωσφορική δεοξουριδίνη (dUMP) σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTMP). Μια μελέτη ανέδειξε τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού του TYMS, ένα έλλειμα 6bp στο νουκλεοτίδιο 1494 στην περιοχή 3'UTR, με αυξημένη αποτελεσματικότητα θεραπείας με μεθοτρεξάτη (Kumagai *et al.* 2003). Το γονίδιο DHFR κωδικοποιεί το ένζυμο διυδροφυλλική αναγωγή, η οποία καταλύει την αναγωγή του διυδροφυλλικού οξέος (DHF) σε τετραϋδροφυλλικό οξύ (THF). Για το DHFR έχουν περιγραφεί δύο πολυμορφισμοί, ο -473G>A και ο 3589G>A, για τους οποίους όμως δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα της μεθοτρεξάτης (Wessels *et al.* 2006). Το γονίδιο ATIC κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που καταλύει τα δυο τελευταία βήματα του de novo βιοσυνθετικού μονοπατιού των πουρινών. Για το ATIC έχει αναφερθεί ο πολυμορφισμός 347C>G, ο οποίος σχετίζεται με βελτίωση του δείκτη DAS, αλλά και με τοξικότητα σε ασθενείς με το γονότυπο 347GG (Wessels *et al.* 2006).

Τα ένζυμα FPGS και GGH, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, συμμετέχουν στη πολυγλουταμινοποίηση της μεθοτρεξάτης. Έχουν περιγραφεί 2 πολυμορφισμοί στο γονίδιο FPGS, ο 114G>A και ο 1994A>G, για τους οποίους όμως δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα της μεθοτρεξάτης (van der Straaten *et al.* 2007). Για το γονίδιο GGH, βρέθηκε ότι οι γονότυποι εκτός του TT του πολυμορφισμού 16C>T συσχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ηπατικής δυσλειτουργίας σε Ιάπωνες ασθενείς (Yanagimachi *et al.* 2011).

Επίσης, έχουν μελετηθεί και πολυμορφισμοί στα γονίδια ενζύμων-μεταφορέων που εισάγουν/εξάγουν μεθοτρεξάτη στα κύτταρα, όπως τα RFC1 (Replication factor C subunit 1), ABCB1 (ATP-Binding Cassette, Sub-Family B, Member 1) και ABCC2 (ATP-Binding Cassette, Sub-Family C, Member 2). Έρευνες έδειξαν ότι άτομα με γονότυπο RFC1 80AA έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη μεθοτρεξάτη, συγκριτικά με ασθενείς με γονότυπο 80GG (Dervieux *et al.* 2004). Ακόμη, έρευνες του πολυμορφισμού ABCB1 3435C>T έδειξαν ότι ο γονότυπος 3435TT συσχετιζόταν με αποτελεσματικότητα στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη αλλά και τοξικότητα (Takatori *et al.* 2006). Τέλος, όσον αφορά το γονίδιο ABCC2, ο πολυμορφισμός 1249 G>A έχει συσχετιστεί με γαστρεντερική τοξικότητα και ο πολυμορφισμός 1058G>A με ηπατοτοξικότητα στους Αφροαμερικάνους (Ranganathan *et al.* 2008).

### **Φαρμακογενετική των βιολογικών παραγόντων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα**

Η χρήση βιολογικών παραγόντων έχει βελτιώσει σημαντικά τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Οι τρεις παράγοντες αντι-TNF etanercept, infliximab και adalimumab, έχει βρεθεί ότι μειώνουν τα συμπτώματα της νόσου, ακόμα και την ακτινολογική εξέλιξη. Παρόλα αυτά, ένα 25-30% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν ανταποκρίνεται σε αυτές τις θεραπείες (Furst *et al.* 2005). Οι περισσότερες έρευνες για τον προσδιορισμό γενετικών προγνωστικών δεικτών της ανταπόκρισης στη θεραπεία αντι-TNF, έχουν επικεντρωθεί σε υποψήφια γονίδια που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ρευματοειδούς αρθρίτιδας, όπως ο επίτοπος HLA-DRB1, ο TNF και το σηματοδοτικό του μονοπάτι και άλλες κυτταροκίνες.

Καθώς το σύστημα HLA έχει συσχετιστεί με την προδιάθεση ανάπτυξης ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να προσδιοριστεί η επίδραση του επιτόπου HLA-DRB1 στην ανταπόκριση με θεραπεία αντι-TNF. Μια μελέτη έδειξε ότι ασθενείς που είχαν δυο αντίγραφα του HLA-DRB1, είχαν μια καλή ανταπόκριση στο etanercept (Criswell *et al.* 2004), ενώ άλλες μελέτες δεν βρήκαν καμία συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Ο πολυμορφισμός -308G>A στην περιοχή του υποκινητή του TNF είναι ο πιο καλά μελετημένος, όσον αφορά στην απόκριση ασθενών σε βιολογικούς παράγοντες. Μια μετα-ανάλυση που περιλάμβανε 692 ασθενείς, έδειξε ότι το



σπάνιο αλληλόμορφο -308A σχετίζεται με φτωχή ανταπόκριση σε οποιονδήποτε αναστολέα του TNF (O’Rielly *et al.* 2009). Επιπλέον πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν σ’ αυτό το γονίδιο ήταν οι -238G>A και -857C>T. Οι πολυμορφισμοί -238G, -308G και -857C συσχετίστηκαν με μη ανταπόκριση στη θεραπεία με adalimumab (Miceli-Richard *et al.* 2008), ενώ το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού 857C>T φαίνεται ότι συσχετίζεται με καλή ανταπόκριση στο etanercept (Kang *et al.* 2005).

Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τους δυο υποδοχείς του TNF-α (TNFRSF1A, TNFRSF1B), έχουν συσχετιστεί με την κλινική ανταπόκριση σε αρκετές μελέτες. Ο γονότυπος 196TT του πολυμορφισμού 196T>G του γονιδίου TNFRSF1B έχει συσχετιστεί με ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF (Fabris *et al.* 2002) και το αλληλόμορφο G του πολυμορφισμού 676T>G έχει συσχετιστεί με μη ανταπόκριση στο etanercept και στο infliximab (Ongaro *et al.* 2008). Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο γονότυπος AA του πολυμορφισμού G36A στο γονίδιο TNFRSF1A συσχετίζεται με φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF (Morales-Lara *et al.* 2012). Κανένας από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου TNFRSF1A στις θέσεις -609, -580 και -383, δεν εμφάνισε συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα του etanercept (Criswell *et al.* 2004).

Συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF βρέθηκε και σε μερικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου IL-10, όπως είναι οι -1082G>A, -819T>C, -592A>C. Μια μελέτη έδειξε ότι ο γονότυπος -1082GG του πολυμορφισμού -1082G>A σε συνδυασμό με τον γονότυπο TNF -308GG, συσχετίζεται με καλή ανταπόκριση στο etanercept, ενώ μια καλή ανταπόκριση στο etanercept συσχετίστηκε με τους πολυμορφισμούς -819T>C και -592A>C (Padyukov *et al.* 2003). Τέλος, ο πολυμορφισμός 3954C>T του γονιδίου IL-1β δεν έδειξε κάποια συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία (Marotte *et al.* 2006).

Μια πρόσφατη μελέτη σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) σε 566 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που έλαβαν θεραπεία με αντι-TNF, ταυτοποίησε τη συσχέτιση επτά γενετικών τόπων με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με αντι-TNF (Plant *et al.* 2011). Ανάμεσα σ’ αυτούς, το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs17301249 του γονιδίου EYA4 (Eyes Absent Homolog 4) συσχετίστηκε με ικανοποιητική ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF. Αντίθετα,

το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs1532269 του γονιδίου PDZD2 (PDZ Domain Containing 2) συσχετίστηκε με φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία.

### 1.3.2 Φαρμακογενετική της ψωριασικής αρθρίτιδας

Η ψωριασική αρθρίτιδα θεωρείται ένας υπότυπος της ρευματοειδούς αρθρίτιδας που συμβαίνει σε συνδυασμό με την ψωρίαση του δέρματος (περισσότερο από το 30% των ασθενών με ψωρίαση αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα) (Schett *et al.* 2011).

Η θεραπεία με αντι-TNF έχει αποδειχτεί πολύ αποτελεσματική στην ψωριασική αρθρίτιδα και μάλιστα πιο αποτελεσματική απ' ό,τι σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Έτσι, οι αναστολείς του TNF θεωρούνται πρώτης γραμμής ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες στους ασθενείς που τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα δεν ήταν επιτυχή. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση, υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα στην αποτελεσματικότητα και στην τοξικότητα των φαρμάκων μεταξύ των ατόμων.

Όσον αφορά τη θεραπεία της ψωριασικής αρθρίτιδας με παράγοντες αντι-TNF, μια ενδιαφέρουσα ανασκόπηση περιέγραψε τη συσχέτιση αρκετών πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF (Rahman & O' Rielly, 2008). Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς ήταν ίδιοι με αυτούς των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα που λάμβαναν την ίδια θεραπεία, όπως είναι αυτοί των γονιδίων IL-1, IL-10, TNF- $\alpha$  και αυτοί στην περιοχή του υποκινητή του TNF- $\alpha$ , οι οποίοι είχαν και τη ισχυρότερη συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF. Μια πρόσφατη έρευνα, ακόμη, έδειξε ότι ο γονότυπος AA του πολυμορφισμού G36A στο γονίδιο TNFRSF1A συσχετίζεται με καλή ανταπόκριση των ασθενών με ψωριασική αρθρίτιδα στη θεραπεία με αντι-TNF, σε αντίθεση με την φτωχή ανταπόκριση των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Morales-Lara *et al.* 2012). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί μια έρευνα σε ασθενείς με ψωρίαση, η οποία έδειξε ότι ο γονότυπος 676TT του πολυμορφισμού 676T>G στο γονίδιο TNFRSF1B συσχετίζεται με ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF (Vasilopoulos *et al.* 2012).

### 1.3.3 Φαρμακογενωμική της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας

Όπως προαναφέρθηκε, η φαρμακογενετική έρευνα στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι ακόμα αρκετά ελλιπής, ωστόσο έχουν υπάρξει ορισμένες φαρμακογενετικές μελέτες που πρέπει να αναφερθούν.

Για την εκτίμηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών -857, -1031, -308 και -238 του γονιδίου TNF-α με την ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF, μελετήθηκαν 106 Κινέζοι ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (Qiang *et al.* 2012). Συνολικά, 32 από αυτούς έλαβαν θεραπεία με infliximab και 74 έλαβαν θεραπεία με etanercept. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αλληλόμορφα στις θέσεις -308 και -238 δεν συσχετίζονται με τη θεραπευτική ανταπόκριση, ενώ οι γονότυποι -857 CC και -1031 TT συσχετίζονται με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία.

Μια φαρμακογενετική μελέτη έγινε για την εκτίμηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών 36A>G του γονιδίου TNFR1 και 626G>C του γονιδίου TNFSF10A (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 10A) σε 86 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και 52 ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα που έλαβαν θεραπεία με infliximab (Morales-Lara *et al.* 2010). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αλληλόμορφο G του TNFSF10A συσχετιζόταν με φτωχή ανταπόκριση μετά από 3 μήνες στη θεραπεία στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, εφόσον η συχνότητα των μη ανταποκριθέντων ήταν πολύ μικρή στους φορείς του αλληλομόρφου C στους 3-6 μήνες της θεραπείας με infliximab. Για τον πολυμορφισμό του TNFR1, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση στο πλαίσιο της ανταπόκρισης στο infliximab.

Τέλος, άλλη μια φαρμακογενετική μελέτη έγινε για την εκτίμηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού 315C>T του γονιδίου IL1B σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα που έλαβαν θεραπεία με infliximab (Morales-Lara *et al.* 2010). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αλληλόμορφο T, όπως επίσης και οι γονότυποι TT και TC, συσχετίζονται με πολύ καλή ανταπόκριση στη θεραπεία ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα μετά από 3 μήνες θεραπείας. Στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν βρέθηκε καμία

σημαντική συσχέτιση μεταξύ γονοτύπων στο IL1B και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

#### **1.4 Σκοπός**

Εν ελλείψει φαρμακογενετικών μελετών στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη σε έλληνες ασθενείς αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας που έλαβαν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF (Infliximab, Etanercept, Adalimumab), με σκοπό τη συσχέτιση των πολυμορφισμών A36G του γονιδίου TNFR1 και T676G του γονιδίου TNFR2 (πολυμορφισμοί που έχουν μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες ρευματοειδών νοσημάτων), με την ανταπόκριση στη θεραπεία.

## 2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Δείγματα ασθενών

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 24 ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με αντί-TNF παράγοντες για τουλάχιστον 12 μήνες. Οι αντί-TNF παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το infliximab (Remicade), το etanercept (Enbrel) και το adalimumab (Humira). Τα δείγματα που μελετήθηκαν αποτελούνταν από περιφερικό αίμα ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και προήλθαν από τη Ρευματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και το Ρευματολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Άγιος Παύλος Θεσσαλονίκης. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα με βάση το δείκτη αξιολόγησης BASDAI κατά την εισαγωγή τους στη θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με την μεταβολή του δείκτη BASDAI.

### 2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA είναι το πρώτο βήμα σε πολλές μοριακές εφαρμογές που χρησιμοποιούνται στην έρευνα και στη διάγνωση. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από την απαιτούμενη ποσότητα του DNA, το είδος του δείγματος, την καθαρότητα του DNA, τον διαθέσιμο χρόνο, την ευκολία της μεθόδου απομόνωσης και το κόστος.

#### 2.2.1 Αντιδραστήρια

**Διάλυμα Standard Sodium Citrate (SSC):** Λυτικό διάλυμα που έχει την ικανότητα να καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες. Για την παρασκευή διαλύματος SSC(20x), διαλύονται 175,4 gr NaCl (3M) και 88,2 gr κιτρικού νατρίου (0,3M) σε 800 ml ddH<sub>2</sub>O και το pH ρυθμίζεται στο 7,0 με σταγόνες HCl. Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσαρμόζεται στο 1L με την προσθήκη ddH<sub>2</sub>O και ακολουθεί αποστείρωση του

διαλύματος. Για την απομόνωση του DNA, έγινε αραίωση του παραπάνω διαλύματος σε ddH<sub>2</sub>O σε τελική συγκέντρωση 1x SSC.

**Διάλυμα οξικού νατρίου:** Χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση DNA και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Για την παρασκευή 3M οξικού νατρίου, διαλύονται 40,8 gr οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa 3H<sub>2</sub>O) σε 80 ml ddH<sub>2</sub>O και το pH ρυθμίζεται στο 5,2 με σταγόνες παγωμένου οξικού οξέος (CH<sub>3</sub>COOH). Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσαρμόζεται στα 100 ml με την προσθήκη ddH<sub>2</sub>O και ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 0,2M που προέκυψε από την αραίωση του παραπάνω διαλύματος.

**SDS (Sodium-Dodecyl-Sulphate):** Είναι ένα ισχυρό ανιονικό αποδιατακτικό που αφαιρεί από τις πρωτεΐνες ορισμένα ιόντα, καταστρέφοντας τη διαμόρφωση και συνεπώς τη δομή τους. Με την καταστροφή των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, το κύτταρο σπάει. Ακόμη, το SDS διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών με αποτέλεσμα να βοηθά τη λύση των πυρηνικών μεμβρανών και την έκθεση των χρωμοσωμάτων, ενώ επίσης βοηθά στην απελευθέρωση του DNA από τις ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες τις οποίες μετουσιώνει. Για την παρασκευή διαλύματος 10% SDS, διαλύονται 10 gr SDS (electrophoresis-grade) σε 80 ml ddH<sub>2</sub>O και το pH ρυθμίζεται στο 7,2 με σταγόνες HCl. Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσαρμόζεται στα 100 ml με την προσθήκη ddH<sub>2</sub>O. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε 5% SDS που προέκυψε από την αραίωση του διαλύματος 10% SDS σε ddH<sub>2</sub>O.

**Φαινόλη:** Είναι υπεύθυνη για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στην οργανική (φαινολική) φάση και των νουκλεϊκών οξέων στην υδατική φάση.

**Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη(24:1):** Το χλωροφόρμιο προκαλεί την μετουσίωση των πρωτεϊνών και την απομάκρυνση της φαινόλης από την υδατική φάση, βοηθώντας έτσι τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Η ισοαμυλική αλκοόλη παρεμποδίζει το σχηματισμό αφρού και βοηθά στον διαχωρισμό της οργανικής και υδατικής φάσης. Για την παρασκευή του

διαλύματος χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), αναμειγνύονται 24 ml χλωροφορμίου και 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης.

**Πρωτεΐνάση K (10 mg/ml):** Πρωτεάση σερίνης που χρησιμοποιείται για την πέψη των πρωτεϊνών, καθώς και νουκλεασών ώστε να απελευθερωθεί το DNA.

**Ισοπροπανόλη:** Βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA.

**Διάλυμα αιθανόλης 70% σε H<sub>2</sub>O:** Χρησιμοποιείται ως διάλυμα πλύσης για την απομάκρυνση προηγούμενων διαλυμάτων που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος π.χ. πέψη με ένζυμα περιορισμού.

### 2.2.2 Μέθοδος

Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε από τα δείγματα αίματος ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα βάση ενός πρωτοκόλλου που περιλαμβάνει τη χρήση φαινόλης-χλωροφορμίου.

Αρχικά, τα δείγματα μεταφέρονται από τους -20°C σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για να μην πήξει το αίμα. Στη συνέχεια, 0,5 ml αίματος από το κάθε δείγμα μεταφέρονται σε σωληνάκια erpendorf (2 ml) και προστίθεται 1 ml διαλύματος 1X SSC. Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 3 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστίθεται 1 ml διαλύματος 1X SSC. Πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex για να ξεκολλήσει και να επαναδιαλυθεί το ίζημα και έπειτα φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 3 λεπτά. Αφού απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο, προστίθεται 0,5 ml διαλύματος οξικού νατρίου (0,2M) και πραγματοποιείται σύντομη ανάδευση στο vortex. Έπειτα, προστίθενται 50 μl διαλύματος SDS (5%) και 5 μl πρωτεΐνάση K (10 mg/ml) και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση σε vortex. Σε αυτό το στάδιο, γίνεται επώαση μιας ή και παραπάνω ωρών στους 55° C σε περιστρεφόμενη συσκευή για να διαλυθεί το ίζημα.

Ακολουθως, προστίθενται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου, πραγματοποιείται ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό στους 4<sup>0</sup> C. Στο στάδιο αυτό σχηματίζονται 2 φάσεις, μια υδατική που περιλαμβάνει το DNA και μια οργανική που διαχωρίζονται με μια ενδιάμεση στοιβάδα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια errendorf, προστίθεται 1 ml διαλύματος χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό στους 4<sup>0</sup> C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται και πάλι σε νέα σωληνάρια errendorf και προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης. Τα δείγματα, έπειτα, αναδεύονται και επωάζονται στους -20<sup>0</sup> C για 20 λεπτά, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό στους 4<sup>0</sup> C, μετά την οποία αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml διαλύματος παγωμένης αιθανόλης 70%. Μετά από φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13.000 στροφές ανά λεπτό στους 4<sup>0</sup> C, το υπερκείμενο αφαιρείται πολύ προσεκτικά και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον κλίβανο για ξήρανση στους 37<sup>0</sup> C, η οποία διαρκεί μια ή και περισσότερες ώρες. Τέλος, το DNA επαναδιαλύεται σε 100 μl ddH<sub>2</sub>O, ενώ πραγματοποιείται περιοδικά ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4<sup>0</sup> C για 12 ώρες για να επαναδιαλυθούν ή στους -20<sup>0</sup> C για μελλοντική χρήση.

### **2.3 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

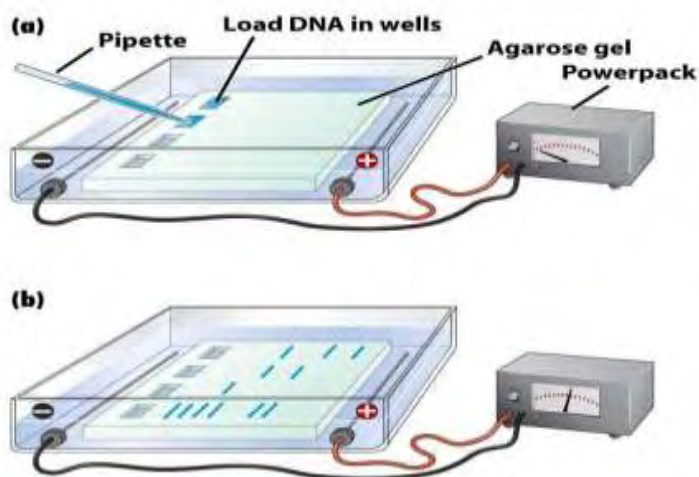
Ο έλεγχος του DNA που απομονώθηκε από το αίμα έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η τεχνική αυτή, επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Έτσι, το DNA που φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων, τοποθετείται στην κάθοδο(-) και



κινείται προς την άνοδο(+). Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μετανάστευσης του DNA. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος (δηλαδή η συγκέντρωση της αγαρόζης) και το σημαντικότερο, το μέγεθος των μορίων του DNA. Τα μικρότερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο από τους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα και ως εκ τούτου κινούνται ταχύτερα. Σχηματίζονται συνεπώς στο πήκτωμα ζώνες από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση υπεριώδους φωτός.

Υπάρχουν δύο τύποι πηκτώματος, το πήκτωμα αγαρόζης και το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR, καθώς και τον ποιοτικό έλεγχο του DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα με πόρους διαμέτρου από 100 έως 300 nm. Η ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο απομόνωσης του DNA έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ενώ για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1%, σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 30 ml διαλύματος TAE 1x και 0,3 gr αγαρόζης και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Αφού κρυώσει λίγο προστίθενται 3 ml βρωμιούχου αιθιδίου από διάλυμα με συγκέντρωση 10 mg/mL (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και έτσι προκαλεί τον φθορισμό του DNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία). Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σημείο αυτό, στο πήκτωμα βυθίζεται μια ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα απομακρύνεται η «χτένα» και η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x.

Σε κάθε θέση του πηκτώματος τοποθετούνται 3 μl DNA και 3 μl χρωστικής (loading buffer 1x) και η συσκευή ηλεκτροφόρησης ορίζεται σε τάση γύρω στα 100 V. Τέλος, το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή UV με σκοπό την παρατήρηση του DNA λόγω της ύπαρξης του βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ανάλυση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (Watson et al. 2007).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι τα εξής:

**TAE (Tris-acetate-EDTA):** Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων όπως DNA και RNA. Για την παρασκευή διαλύματος TAE 50x, διαλύονται 121 gr Tris base, 28,5 ml οξικό οξύ και 50 ml EDTA (0,5M) σε 500ml ddH<sub>2</sub>O. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται TAE 1x, επομένως γίνεται αραιώση του διαλύματος TAE 50x σε ddH<sub>2</sub>O.

**Loading buffer 6x:** Χρησιμοποιείται για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος, ενώ περιέχει και χρωστική για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Για την παρασκευή του αναμειγνύεται 1 ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v με 1 ml διαλύματος TBE 10x και 5 ml γλυκερόλη 100% και συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 10 ml. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση loading buffer 1x.

## 2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιείται προκειμένου να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων TNFR<sub>1</sub> και

TNFR<sub>2</sub>. Με τη PCR μπορεί να ενισχυθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα που μας ενδιαφέρει σε μεγάλες ποσότητες με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA. Οι υβριδοποιημένοι εκκινητές λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για τη δράση της DNA πολυμεράσης και έτσι για κάθε αλυσίδα δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).

### 2.4.1 Στάδια της PCR

Η τεχνική της PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών σταδίων που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

1. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95° C για 30 δευτερόλεπτα περίπου.
2. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με την αλληλουχία στόχο. Ο υβριδισμός επιτυγχάνεται ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-65° C επί 20 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.
3. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη συμπληρωματικών βάσεων δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή από την Taq DNA πολυμεράση και συνεπώς την επέκταση της αλυσίδας του DNA. Η επέκταση των εκκινητών επιτυγχάνεται στους 72-74° C επί 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος PCR και της ποιότητας της Taq DNA πολυμεράσης.

Πριν από τον πρώτο κύκλο, το DNA συχνά αποδιατάσσεται για 5-10 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί ότι θα είναι μονόκλωνο και να μπορεί να υβριδιστεί με τους μονόκλωνους εκκινητές. Επίσης, μετά το τέλος των κύκλων εφαρμόζεται ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης (5-10 λεπτών) για να διασφαλιστεί ότι οποιοδήποτε DNA έχει αντιγραφεί επιτυχώς.

Μια εκτέλεση των τριών αυτών σταδίων, αποτελεί 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους, οπότε το τμήμα του DNA στόχου πολλαπλασιάζεται  $2^n$  φορές (όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων).

#### 2.4.2 Αντιδραστήρια και συνθήκες της PCR

Η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH  $\approx$  8.2 που περιέχει ιόντα  $Mg^{++}$  απαραίτητα για την ενζυμική δράση.

##### Δείγμα DNA

Το DNA στόχος είναι δυνατόν να προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και αν δεν είναι πλήρης καθαρότητας. Συνήθως 100 ng ολικού DNA είναι αρκετά για να επιτευχθεί ο γονιδιακός πολλαπλασιασμός του DNA στόχου. Προϋπόθεση για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου είναι η ακεραιότητά του.

##### Εκκινητές (primers)

Η επιλογή των εκκινητικών μορίων είναι μεγάλης σημασίας. Τα εκκινητικά μόρια, θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C και A/T, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων. Τα εκκινητικά μόρια θα πρέπει επίσης να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ). Ένα επιθυμητό  $T_m$  θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-65° C. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_a$ ) των εκκινητικών μορίων. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού  $T_a$ , επιλέγεται να είναι κατά 5°C μικρότερη του  $T_m$  των εκκινητών.

### Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)

Στην αντίδραση PCR οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200  $\mu\text{M}$ . Υψηλότερες συγκεντρώσεις dNTPs μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει ν' αποφεύγονται. Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  και συνεπώς το ποσό των dNTPs προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου  $\text{Mg}^{2+}$ .

### DNA πολυμεράση

Το ένζυμο *Taq DNA* είναι μια ανθεκτική στη θερμοκρασία DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus (Taq)*. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της *Taq* πολυμεράσης είναι οι  $72^{\circ}\text{C}$ , αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους  $94^{\circ}\text{C}$ . Η *Taq* πολυμεράση προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των θερμικών κυκλοποιητών.

### Ρυθμιστικό διάλυμα PCR που περιέχει $\text{MgCl}_2$

Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-Cl τυπικά σε συγκέντρωση  $\sim 10\text{ mM}$ , προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στη θερμοκρασία των  $72^{\circ}\text{C}$  στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μια περίπου μονάδα φθάνοντας στο  $\sim 7,2$  που είναι η κατάλληλη τιμή για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει και  $1,5\text{ mM}$  ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$ . Η συγκέντρωση ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Οι συγκεντρώσεις των  $1,5\text{ mM}$  είναι συνήθως βέλτιστες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\text{Mg}^{2+}$  μπορεί να αποδειχθούν απαραίτητες. Γενικά, η περίσσεια  $\text{Mg}^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ η έλλειψη  $\text{Mg}^{2+}$  μειώνει την ποσότητα του προϊόντος.

Για την εκτέλεση της PCR, το DNA κάθε δείγματος προστίθεται σε ειδικό σωλήνα (tube) για την PCR και έπειτα παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης (master mix) που περιέχει όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα αντιδραστήρια. Αφού προηγηθεί σύντομη φυγοκέντρηση, το μίγμα μοιράζεται ισόποσα στους σωλήνες

PCR που περιέχουν το DNA και ακολουθεί περιστροφή (spin) στη φυγόκεντρο για 4 δευτερόλεπτα περίπου. Τέλος, τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή και ενεργοποιείται το κατάλληλο πρόγραμμα.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε αντίδραση PCR φαίνονται στον πίνακα 1.

Αντιδραστήρια	TNFR1 A36G		TNFR2 T676G	
	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
DNA		1 $\mu$ l		2 $\mu$ l
PCR Buffer (10x) + MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	Buffer (1x) MgCl <sub>2</sub> (1,5mM)	5 $\mu$ l	1x	5 $\mu$ l
dNTPs (10mM από το καθένα)	0,2mM	1 $\mu$ l	0,2mM	1 $\mu$ l
Πρόσθιος εκκινητής (50 pmol/ $\mu$ l)	1 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Ανάστροφος εκκινητής (50 pmol/ $\mu$ l)	1 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
KAPA Taq πολυμεράση (5U/ $\mu$ l)	1U	0,25 $\mu$ l	1U	0,25 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O		40 $\mu$ l		39 $\mu$ l
Τελικός όγκος		50 $\mu$ l		50 $\mu$ l

Πίνακας 1. Οι αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR.

Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ενίσχυση του DNA στόχου πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών, οι οποίες περιλαμβάνουν αλλαγές στη συγκέντρωση του MgCl<sub>2</sub> και του DNA στο μίγμα της αντίδρασης, καθώς και αλλαγές στη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών στο DNA εκμαγείο. Οι συνθήκες

που προσδιορίστηκαν για την εκτέλεση των αντιδράσεων PCR παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πολυμορφισμός	Συνθήκες PCR
<b>TNFR1 A36G</b>	95 <sup>0</sup> C → 1 λεπτό
	95 <sup>0</sup> C → 40 δευτερόλεπτα
	67 <sup>0</sup> C → 45 δευτερόλεπτα
	72 <sup>0</sup> C → 40 δευτερόλεπτα
	72 <sup>0</sup> C → 10 λεπτά
	Παραμονή στους 4 <sup>0</sup> C
<b>TNFR2 T676G</b>	95 <sup>0</sup> C → 1 λεπτό
	95 <sup>0</sup> C → 40 δευτερόλεπτα
	58 <sup>0</sup> C → 45 δευτερόλεπτα
	72 <sup>0</sup> C → 40 δευτερόλεπτα
	72 <sup>0</sup> C → 10 λεπτά
	Παραμονή στους 4 <sup>0</sup> C

Πίνακας 2. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του κάθε πολυμορφισμού.

Για τη μελέτη του κάθε πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (πίνακας 3), βάσει προηγούμενων μελετών στους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, που ενισχύουν μόνο ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων.

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	T <sub>m</sub>	Μέγεθος προϊόντος
<b>TNFR1 A36G</b>	5' GAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGG 3' (Πρόσθιος)	70 <sup>0</sup> C	183 bp
	5' ACCAGGCCCGGGCAGGAGAG 3' (Ανάστροφος)	69 <sup>0</sup> C	
<b>TNFR2 T676G</b>	5' ACTCTCCTATCCTGCCTGCT 3' (Πρόσθιος)	60 <sup>0</sup> C	242 bp
	5' TTCTGGAGTTGGCTGCGTGT 3' (Ανάστροφος)	60 <sup>0</sup> C	

Πίνακας 3. Οι ακολουθίες των εκκινητών για κάθε πολυμορφισμό που μελετήθηκε, το T<sub>m</sub> του κάθε εκκινητή και το μέγεθος προϊόντος που αναμένεται.

### **2.4.3 Ανάλυση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης**

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ένα πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Για την παρασκευή του ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3 (ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης). Η διαφορά είναι ότι στην ηλεκτροφορόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μl του προϊόντος PCR από το κάθε δείγμα, μετά από ανάμειξη με χρωστική (loading buffer).

## **2.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)**

### **2.5.1 Αρχή της ανάλυσης RFLP**

Η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP) είναι μια από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR. Σε όλες τις αναλύσεις RFLP πραγματοποιείται το κόψιμο (περιορισμό-restriction) του DNA με μια ή περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ο διαχωρισμός των θραυσμάτων που δημιουργούνται βάσει του μοριακού τους βάρους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα και η οπτικοποίηση των θραυσμάτων διαφόρων μεγεθών.

Τα ένζυμα περιορισμού (ενδονουκλεάσες περιορισμού) είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια αποικοδομώντας το «ξένο» προς αυτά DNA, αναστέλλοντας έτσι την ικανότητα του να μολύνει το βακτηριακό κύτταρο. Κάθε ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει μία συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων με οκτώ νουκλεοτιδίων. Αυτές οι αλληλουχίες, όπου υπάρχουν στο γενετικό υλικό του ίδιου του βακτηρίου, προστατεύονται χάρη στη μεθυλίωση μιας τριφωσφορικής αδενοσίνης ή τριφωσφορικής κυτοσίνης. Όταν οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού βρίσκονται σε «ξένο» ως προς το βακτήριο DNA, δεν είναι γενικώς μεθυλιωμένες και συνεπώς, αποκόπτονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού (Watson *et al.* 2007).



Μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού θα κόψει σε μία σειρά συγκεκριμένων τμημάτων οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA που έχει απομονωθεί από ένα κύτταρο. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται τμήματα περιορισμού. Συγκρίνοντας το μέγεθος των τμημάτων περιορισμού που έχουν παραχθεί από μία συγκεκριμένη γενετική περιοχή μετά την επεξεργασία της με έναν συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, μπορεί να δημιουργηθεί ένας χάρτης περιορισμού της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία καθενός σημείου περιορισμού (Watson *et al.* 2007).

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο, ή περισσότερων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών τους νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP). 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). Επίσης, οι RFLP βρίσκουν εφαρμογή στον προσδιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης κάποιας ασθένειας ή στον προσδιορισμό πατρότητας (Buckingham & Flaws, 2007).

Οι RFLPs που έχουν εξεταστεί έως τώρα είναι απλές αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου, που δημιουργούν ή καταστρέφουν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων. Γενικά, η αλλαγή μια βάσης που αναγνωρίζεται από ένα περιοριστικό ένζυμο, οδηγώντας σε έναν πολυμορφισμό δεν είναι η αιτία μιας ασθένειας αλλά ένα παρατηρήσιμο χαρακτηριστικό που υποδεικνύει τους φορείς της ή την προδιάθεση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όμως ως δείκτης ενός συγκεκριμένου χρωμοσώματος ώστε να μελετηθεί η κληρονομηση του. Η κληρονομηση των αλληλομόρφων RFLP ακολουθεί πιστά τους νόμους του Mendel. Όταν παρακολουθούμε τη κληρονομηση ενός χρωμοσώματος, χρησιμοποιώντας RFLPs, οι πιο χρήσιμοι πολυμορφισμοί είναι εκείνοι για τους οποίους τα περισσότερα άτομα είναι ετερόζυγα (Watson *et al.* 2007).

## 2.5.2 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Η μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων TNFR1 και TNFR2 έγινε μετά από πέψη των προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού.

Συγκεκριμένα, για τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο MspA1I. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι η CMgCKG, όπου g είναι η θέση του πολυμορφισμού. Στην αλληλουχία αυτή, όπου M είναι τα νουκλεοτίδια A ή C και όπου K τα νουκλεοτίδια G ή T, σύμφωνα με την ονοματολογία νουκλεοτιδίων κατά IUPAC. Το ένζυμο αναγνωρίζοντας αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα DNA ανάμεσα στις βάσεις G και C, στη θέση 75 του PCR προϊόντος, και προκύπτουν δύο νέα τμήματα μήκους 108 bp και 75 bp. Το ένζυμο αυτό κόβει όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός και συνεπώς το A που βρίσκεται στη θέση 75 έχει αντικατασταθεί από το G, ενώ όταν δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει το τμήμα DNA, το οποίο είναι μήκους 183 bp. Τα προκύπτοντα τμήματα έχουν τυφλά άκρα.

Παρομοίως, για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο NlaIII. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι η CA<sub>t</sub>G, όπου t είναι η θέση του πολυμορφισμού. Το ένζυμο αναγνωρίζοντας αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα DNA αμέσως μετά από αυτή την αλληλουχία, στη θέση 134 του PCR προϊόντος, 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.

Στη διαδικασία των πέψεων με ένζυμα περιορισμού, αρχικά παρασκευάζεται ένα μίγμα που περιέχει ddH<sub>2</sub>O, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για κάθε ένζυμο (buffer) και το ένζυμο περιορισμού (σύμφωνα με τον πίνακα 4). Σε κάθε σωλήνα μοιράζονται 8 μl από το μίγμα και προστίθενται 2 μl από το προϊόν PCR. Έπειτα, εκτελείται περιστροφή (spin) στη φυγόκεντρο για 4 δευτερόλεπτα περίπου και τα δείγματα επωάζονται σε κλίβανο 37° C, για περίπου 12 ώρες (overnight).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας *New England Biolabs*. Κάθε ένζυμο περιορισμού χρειάζεται ένα συγκεκριμένο buffer το οποίο

βελτιστοποιεί την απόδοση του ενζύμου. Τα ένζυμα περιορισμού MspA1I και NlaIII χρησιμοποιήθηκαν με το CutSmart buffer. Η αρχική συγκέντρωση του buffer είναι 10x και σε κάθε αντίδραση ήταν επιθυμητή η αραίωσή του σε 1x. Επιπλέον, το buffer αυτό περιέχει 100 µg/ml BSA. Η BSA (Bovine Serum Albumin) είναι μία πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται 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.

Αναλυτικά οι αναλογίες του μίγματος της πέψης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Αντιδραστήρια	MspA1I	NlaIII
DNA	2 µl	2 µl
Buffer	1 µl	1 µl
Ένζυμο περιορισμού	0,3 µl	0,3 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl	7 µl
Τελικός όγκος	10 µl	10 µl

Πίνακας 4. Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων για τις πέψεις με ένζυμο περιορισμού.

## 2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Για την οπτικοποίηση των θραυσμάτων DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ή σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έχει μικρότερου μεγέθους πόρους από το πήκτωμα αγαρόζης και έτσι επιτρέπει τον ακριβή διαχωρισμό μορίων μεγέθους 10 έως 1500 bp. Για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη διότι τα τμήματα των υπό μελέτη τμημάτων DNA είναι σχετικά μικρά.

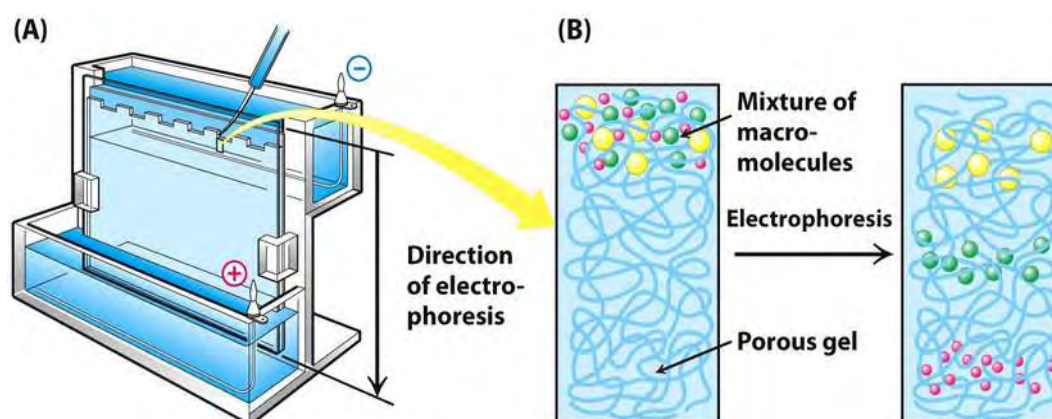
### 2.6.1 Ανάλυση τμημάτων DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Για την παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, αρχικά ετοιμάζονται τα τζάμια που θα χρησιμοποιηθούν, τα οποία στήνονται σε ένα ειδικό στατώ. Τα τζάμια που χρησιμοποιούνται σχηματίζουν ένα ειδικό άνοιγμα, στο οποίο μπορεί να εκχυθεί το μίγμα πριν κρυώσει και πήξει. Στα δύο άκρα των τζαμιών και κατακόρυφα τοποθετούνται διαχωριστικά (spacers) έτσι ώστε να δημιουργείται το επιθυμητό πάχος στο πήκτωμα. Τα spacers που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος 1,5 εκατοστά. Αφού σταθεροποιηθούν τα τζάμια στο στατώ και διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχουν διαρροές, αρχίζει η παρασκευή του διαλύματος.

Για τη παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου πάχους 1,5 mm παρασκευάζονται 62,5 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 8%. Συγκεκριμένα, σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100 ml προσθέτονται 8 gr ουρίας, 16,7 ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30% και 6,5 ml διαλύματος TBE 10x. Το μείγμα αυτό αφήνεται να ομογενοποιηθεί σε ένα αναδευτήρα με τη βοήθεια ενός μαγνήτη ανάδευσης. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και κατόπιν συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 62,5 ml. Έπειτα, μεταφέρεται σε μια κωνική φιάλη και προσθέτονται 400 μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 62 μl APS 20% (Ammonium Persulfate), ώστε να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου. Τέλος, το διάλυμα εκχύνεται γρήγορα στα τζάμια, τοποθετείται η ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων και αφήνεται να πήξει περίπου μισή ώρα.

Όταν το πήκτωμα πήξει, απομακρύνονται η «χτένα» και τα τζάμια από το στατώ. Οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων καθαρίζονται προσεκτικά, διότι έχουν υπολείμματα ακρυλαμίδης. Έπειτα, τα τζάμια με το πήκτωμα τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με διάλυμα TBE 1x και τα δείγματα «φορτώνονται» στις θέσεις υποδοχής. Στα δείγματα περιλαμβάνονται 2 μl από ένα μάρτυρα μοριακών βαρών, 2 μl από το κάθε προϊόν της PCR που θα χρησιμεύσει ως άκοπο δείγμα ελέγχου και 10 μl από το κάθε δείγμα που έχει υποστεί πέψη. Πριν τη φόρτωση κάθε δείγμα αναμειγνύεται με 5 μl χρωστικής

(loading buffer). Τέλος, η συσκευή ρυθμίζεται σε τάση γύρω στα 210-230 V και η ηλεκτροφόρηση αφήνεται να εξελιχθεί για περίπου 2-2,5 ώρες (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος (Berg et al. 2012).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι τα εξής:

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

**TBE:** Για τη παρασκευή του διαλύματος TBE 10x διαλύονται 121 gr Tris Base μαζί με 61,7 gr βορικό οξύ και 80 ml EDTA 0,5 M. Ο όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 2 L. Το TBE 1x παρασκευάζεται με την αραίωση του διαλύματος TBE 10x.

**APS:** Για τη παρασκευή του διαλύματος APS 20%, 2 gr Ammonium Persulfate διαλύονται σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O και το μίγμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί πλήρως.

### 2.6.2 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι αρχικά διαφανές. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA πρέπει το πήκτωμα να υποβληθεί σε χρώση νιτρικού αργύρου. Ο νιτρικός άργυρος έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA και να σχηματίζει

αδιάλυτα σύμπλοκα φωσφορικού αργύρου με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Όταν αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη (HCHO), παρουσία βάσης, το πήκτωμα βάφεται σε φόντο κίτρινο και οι ζώνες με τα επιθυμητά τμήματα βάφονται σκούρο καφέ. Η χρώση με νιτρικό άργυρο έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA (<100 pg DNA) σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο (Ainsworth *et al.* 1991).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αποκολλάται προσεκτικά από τα τζάμια και τοποθετείται σε νάυλον μεμβράνη μέσα σε ένα ειδικό μεταλλικό σκεύος στον αναδευτήρα. Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη τριών διαφορετικών διαλυμάτων με περιόδους επώασης σε αυτά και ενδιάμεσες πλύσεις. Τα διαλύματα αυτά είναι τα εξής:

### **1° Διάλυμα**

Για την παρασκευή του πρώτου διαλύματος προστίθενται 10 ml αιθανόλης 100%, 0,5 ml οξικό οξύ 10% και ddH<sub>2</sub>O τελικού όγκου 390 ml. Από αυτό το διάλυμα προστίθενται 195 ml στο πήκτωμα για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα υπόλοιπα 195 ml για ακόμη 5 λεπτά. Ακολουθεί πλύση με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό.

### **2° Διάλυμα**

Για την παρασκευή του δεύτερου διαλύματος προστίθενται 0,2 gr νιτρικού αργύρου σε 200 ml ddH<sub>2</sub>O. Το πήκτωμα επωάζεται με αυτό το διάλυμα για 15 λεπτά και ακολουθεί πλύση 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό κάθε φορά.

### **3° Διάλυμα**

Για την παρασκευή του τρίτου διαλύματος προστίθενται 3 gr NaOH, 0,01 gr NaBH<sub>4</sub> (Natriumborhydrid), 1ml φορμαλδεΐδη και 200 ml ddH<sub>2</sub>O σε ένα ποτήρι ζέσεως. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνήτη πάνω σε έναν αναδευτήρα. Όταν το διάλυμα είναι έτοιμο προστίθεται στο πήκτωμα μέχρι να είναι ευδιάκριτα ορατές οι ζώνες του. Τέλος, πραγματοποιείται πλύση με ddH<sub>2</sub>O για ένα λεπτό.

Μετά την χρώση του πηκτώματος και με τη βοήθεια του μάρτυρα και του άκοπου δείγματος μπορεί να διαπιστωθεί αν στα δείγματα υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε ή όχι. Υπάρχουν 3

ενδεχόμενα: το ένζυμο να κόβει στην θέση αναγνώρισης και το δείγμα να είναι ομόζυγο (παρουσία 2 ζωνών), το ένζυμο να μην έκοψε διότι δεν υπάρχει η αλληλουχία αναγνώρισης και το δείγμα να είναι επίσης ομόζυγο (παρουσία μιας ζώνης), 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 (παρουσία 3 ζωνών).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη θεραπεία φαίνονται στον πίνακα 5. Επιπλέον, φαίνεται το ποσοστό των ανταποκριθέντων και μη ασθενών στη θεραπεία με τους αντι-TNF παράγοντες Remicade, Enbrel, Humira. Τα περιεχόμενα του πίνακα 5 αφορούν τους 19 ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα από το Ρευματολογικό Τμήμα του νοσοκομείου Άγιος Παύλος στη Θεσσαλονίκη, που λάμβαναν θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες για τουλάχιστον 12 μήνες. Κάποιοι από τους ασθενείς είχαν λάβει περισσότερους από έναν αντι-TNF παράγοντες, επομένως μελετήθηκαν ανεξάρτητα ανεβάζοντας τον αριθμό των ασθενών υπό μελέτη στους 24.

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος±ΤΑ*	46±11,73
Φύλο Α/Θ	22/2
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος±ΤΑ*	17,54±9,48
Αρχικό BASDAI, μέσος±ΤΑ*	5±0,94
BASDAI στους 12 μήνες, μέσος±ΤΑ*	2,41±2,17
Ανταποκριθέντες, ποσοστό	12 (50%)
Μη-ανταποκριθέντες, ποσοστό	12 (50%)

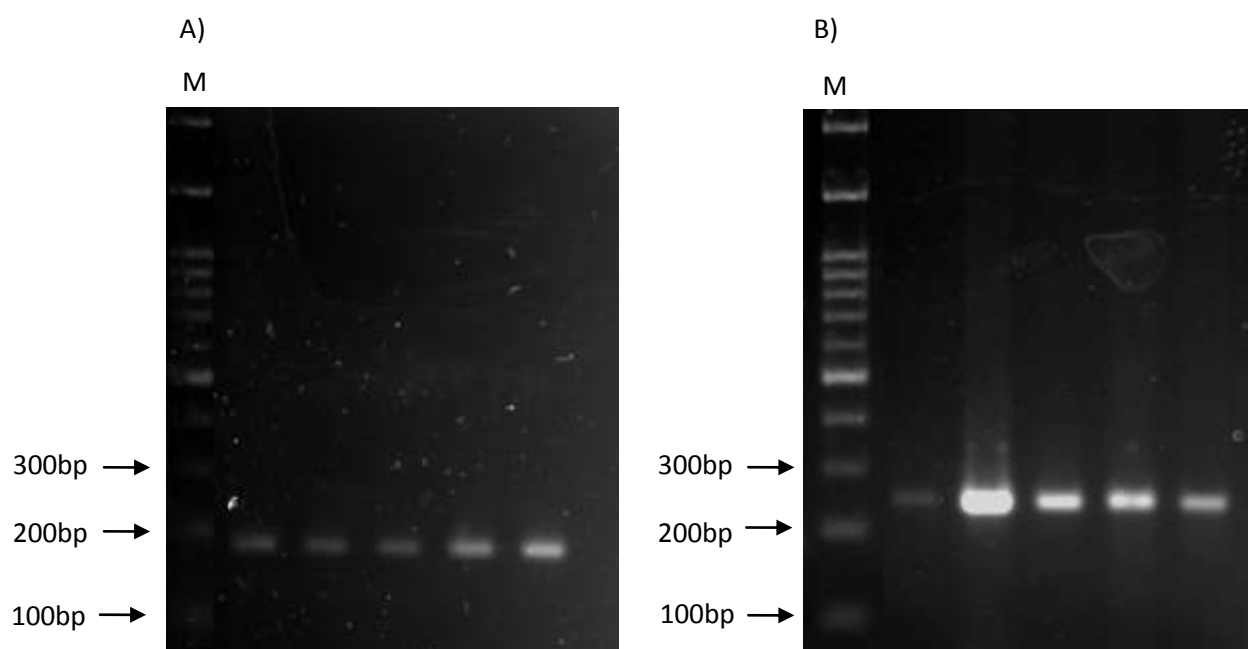
Πίνακας 5. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα που έλαβαν μέρος στη μελέτη (n=24), όπου \*ΤΑ = Τυπική απόκλιση

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5, ένα ποσοστό 50% ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με αντι-TNF. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι 19 από τους 24 ασθενείς της μελέτης έλαβαν το φάρμακο Remicade (79,16%), από τους οποίους ανταποκριθέντες ήταν 12 (63,15%). Τα παραπάνω ποσοστά συμφωνούν με τα ποσοστά των ασθενών που παρατηρούνται στην καθημερινή κλινική πράξη και στις κλινικές μελέτες. Αντίθετα, στους παράγοντες Enbrel και Humira η ανταπόκριση κυμαίνεται σε μηδενικά επίπεδα, όμως αποτελούν ελάχιστο μέρος του συνόλου των δειγμάτων (16,67% και 4,17% αντίστοιχα), επομένως δεν μπορούν να θεωρηθούν το ίδιο αξιόπιστα όσο το ποσοστό ανταπόκρισης στο Remicade.



### 3.2 Αποτελέσματα της PCR

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που έγινε για τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR, παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Στην εικόνα αυτή φαίνεται ότι το προϊόν της PCR για τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G εμφανίζει την αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 183 bp, ενώ το προϊόν της PCR για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G εμφανίζει την αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 242 bp, κατόπιν σύγκρισης με δείκτη γνωστών μεγεθών (pirron fastgene μοριακός δείκτης DNA 100bp).



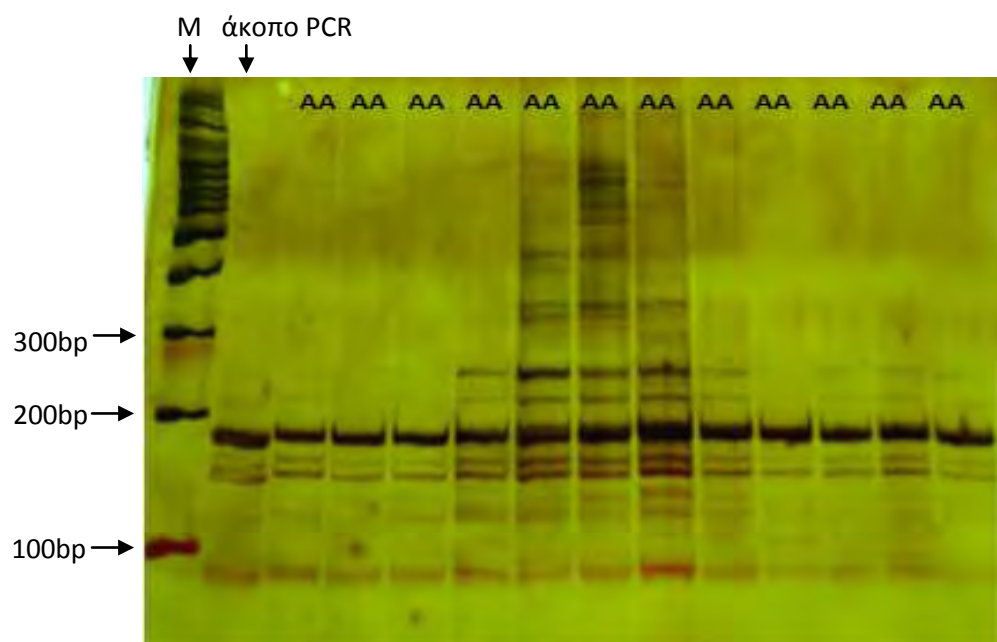
Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τους πολυμορφισμούς A) TNFR1 A36G και B) TNFR2 T676G.

### 3.3 Γονοτύπηση πολυμορφισμών

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP, μετά από χρώση του πήκτωματος πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο, για τους πολυμορφισμούς TNFR1 A36G και TNFR2 T676G παρουσιάζονται στις εικόνες 11 και 12 αντίστοιχα, καθώς και στον πίνακα 6.

Στην εικόνα 11, όλες οι ζώνες έχουν το ίδιο μέγεθος με αυτό του άκοπου προϊόντος PCR (183 bp), επομένως το ένζυμο MspA1I δεν μπόρεσε να κόψει την

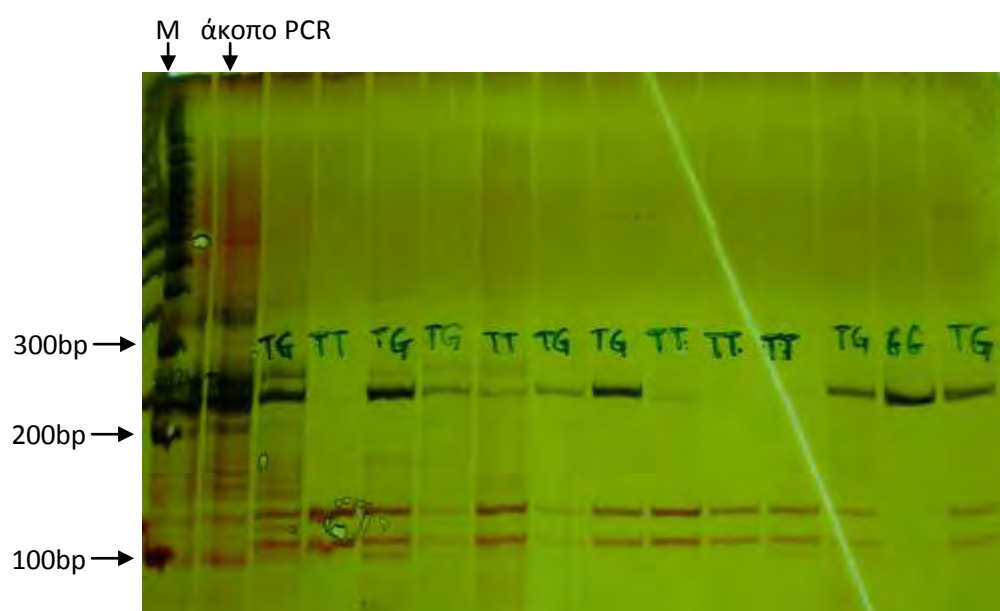
αλληλουχία CMgCKG που αναγνωρίζει και κόβει μόνο όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός, δηλαδή όταν το A στη θέση 75 του προϊόντος της PCR έχει αντικατασταθεί από το G. Έτσι φαίνεται ότι οι ασθενείς που μελετήθηκαν δεν περιείχαν τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G, ο οποίος δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg και για το λόγο αυτό ο πολυμορφισμός αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 11. RFLP γονοτύπηση του πολυμορφισμού TNFR1 A36G.

Στην εικόνα 12, φαίνεται ότι για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G προσδιορίστηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι. Το ένζυμο NlaIII αναγνωρίζει την αλληλουχία CA<sub>n</sub>TG και κόβει αμέσως μετά από αυτή, στη θέση 134 του προϊόντος της PCR, και προκύπτουν δύο νέα τμήματα DNA μήκους 134 bp και 108 bp. Όταν το T αντικαθίσταται από G τότε το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει το τμήμα DNA, το οποίο είναι μήκους 242 bp. Στην RFLP γονοτύπηση του πολυμορφισμού TNFR2 T676G εμφανίστηκαν οι γονότυποι TT, GG, TG. Ο γονότυπος TT χαρακτηρίζει ένα άτομο ομόζυγο που δεν διαθέτει τον πολυμορφισμό, εφόσον παρατηρούνται 2 ζώνες μεγέθους 134 bp και 108 bp και συνεπώς το ένζυμο έκοψε κανονικά μετά την αλληλουχία CA<sub>n</sub>TG. Ο γονότυπος GG χαρακτηρίζει ένα άτομο ομόζυγο που διαθέτει

τον πολυμορφισμό, εφόσον παρατηρείται η ύπαρξη μιας ζώνης μεγέθους 242 bp που σημαίνει ότι το T αντικαταστάθηκε από το G και το ένζυμο δεν μπόρεσε να κόψει μετά την αλληλουχία αναγνώρισης. Τέλος, ο γονότυπος TG χαρακτηρίζει ένα άτομο ετερόζυγο, στο οποίο το ένα ομόλογο χρωμόσωμα διαθέτει την αλληλουχία CAAtG την οποία αναγνωρίζει και κόβει το ένζυμο, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται 2 ζώνες μεγέθους 134 bp και 108 bp, ενώ το άλλο ομόλογο χρωμόσωμα διαθέτει τον πολυμορφισμό, όπου το T έχει αντικατασταθεί από το G και το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει το DNA, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ακόμη ζώνης μεγέθους 242 bp.



Εικόνα 12. RFLP γονοτύπηση του πολυμορφισμού *TNFR2* T676G.

Πίνακας 6. Οι γονότυποι των δειγμάτων για τους πολυμορφισμούς TNFR1 A36G και TNFR2 T676G.

Δείγματα	Γονότυποι	
	TNFR1	TNFR2
2Θ	AA	TG
3Θ	AA	TT
4Θ	AA	TG
5Θ	AA	TG
6Θ	AA	TT
7Θ	AA	TG
8Θ	AA	TG
9Θ	AA	TT
10Θ	AA	TT
11Θ	AA	TT
12Θ	AA	TG
13Θ	AA	GG
15Θ	AA	TG
16Θ	AA	TG
17Θ	AA	GG
18Θ	AA	TG
19Θ	AA	TG
20Θ	AA	TT
21Θ	AA	TG

Στην παρούσα εργασία η RLFP γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε και για 16 ακόμη ασθενείς, για τους οποίους όμως δεν ήταν δυνατή η πραγματοποίηση περαιτέρω μελέτης συσχέτισης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων, καθώς δεν ήταν γνωστά τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα της γονοτύπησης παρατίθενται στον πίνακα 7, και θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε μελέτες συσχέτισης.

*Πίνακας 7. Οι γονότυποι ασθενών για τους πολυμορφισμούς TNFR1 A36G και TNFR2 T676G.*

Δείγματα	Γονότυποι	
	TNFR1	TNFR2
1Λ	AA	TG
2Λ	AA	TG
3Λ	AA	TG
4Λ	AA	ΤΤ
5Λ	AA	ΤΤ
6Λ	AA	ΤΤ
7Λ	AA	ΤΤ
8Λ	AA	TG
9Λ	AA	TG
10Λ	AA	TG
11Λ	AA	TG
12Λ	AA	ΤΤ
13Λ	AA	TG
14Λ	AA	TG
15Λ	AA	TG

16Λ	AA	TG
-----	----	----

### 3.4 Μελέτες συσχέτισης και ανάλυση αποτελεσμάτων

Η μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού με την ασθένεια έγινε με το Cochran-Armitage test, καθώς και με γενοτυπικά και αλληλομορφικά τεστ και τεστ για την εξακρίβωση επικράτειας - υποτέλειας. Το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση ομάδων γονοτύπων και το chi-square test χρησιμοποιήθηκε για την εξακρίβωση της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05, επομένως μια τιμή  $p \leq 0.05$  θα ορίζει ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 8. Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου TNFR2 T676G και συνολικών αποτελεσμάτων

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (BASDAI >50%)	Μη-ανταποκριθέντες (BASDAI <50%)	P
TNFR2 T676G	Genotypic [GG/GT/TT]	1/6/5	2/6/4	0,80
	Cochran- Armitage [G/T]	8/16	10/14	0,76
	Επικρατών [(GG+GT)/TT]	7/5	8/4	1,00
	Υπολειπόμενο [GG/(GT+TT)]	1/11	2/10	1,00

θεραπείας αντί-TNF για 12 μήνες (n=24)

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης του γονοτύπου στους ασθενείς για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν μη σημαντική διαφορά στις αλληλομορφικές ή γενοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες ασθενείς και δεν μπορεί να προκύψει καμία σαφής συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και της ανταπόκρισης ή μη στους

ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες ( $p > 0,05$  – μη στατιστική σημαντικότητα).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο της σπονδυλικής στήλης, των αρθρώσεων και άλλων οργάνων, με τη συμμετοχή τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η φαρμακευτική θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας περιλαμβάνει τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs-nonsteroidal anti-inflammatory drugs), τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα (DMARDs-disease-modifying antirheumatic drugs) και τους βιολογικούς παράγοντες. Οι παραδοσιακές θεραπείες που περιλαμβάνουν τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα και τα νοσοτροποποιητικά φάρμακα, στοχεύουν στη βελτίωση της κλινικής εικόνας της νόσου χωρίς να στοχεύουν σε παράγοντες που την προκαλούν. Αντίθετα, οι βιολογικοί παράγοντες είναι αναστολείς του TNFα, ο οποίος παίζει ρόλο στην παθογένεια φλεγμονωδών νοσημάτων όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Η θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες έχει βελτιώσει σε μεγάλο βαθμό τα συμπτώματα της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας στην πλειονότητα των ασθενών και αποτελεί μια καλή επιλογή για τους ασθενείς με σοβαρή ενεργή νόσο, καθώς επίσης και σε αυτούς που δεν επαρκούν οι συνηθισμένες θεραπείες.

Παρόλη την συνεισφορά των βιολογικών παραγόντων στη θεραπεία της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία (McLeod *et al.* 2007). Επιπλέον, τα φάρμακα αυτά είναι αρκετά ακριβά και έχει επιβεβαιωθεί ότι συνοδεύονται από αρκετές παρενέργειες. Για τους λόγους αυτούς, υπάρχει μεγάλη ανάγκη εύρεσης αξιόπιστων βιοδεικτών για τη αποτελεσματική πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες και συνεπώς την εξατομίκευση της θεραπείας που είναι και ο απώτερος στόχος της φαρμακογενετικής. Ελάχιστες φαρμακογενετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, ωστόσο η καλύτερα μελετημένη φαρμακογενετική της ρευματοειδούς αρθρίτιδας προσφέρει αρκετούς προτεινόμενους πολυμορφισμούς προς μελέτη για την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα.



Στη παρούσα, λοιπόν, μελέτη διερευνήθηκε η πιθανότητα συσχέτισης των πολυμορφισμών TNFR1 A36G και TNFR2 T676G, που μελετήθηκαν σε προηγούμενες έρευνες, με την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό TNFR1 A36G, βρέθηκε ότι δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, εφόσον όλοι οι ασθενείς έχουν γονότυπο AA, και αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση. Για τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G, προσδιορίστηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι GG, TG, TT. Η ανάλυση συσχέτισης έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις αλληλομορφικές ή γενοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες ασθενείς και δεν μπορεί να προκύψει καμία σαφής συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και της ανταπόκρισης ή μη στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες. Πρέπει να αναφερθεί ότι το μικρό μέγεθος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αντανάκλα και την μικρή δύναμη της μελέτης και δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και για το λόγο αυτό η έρευνα αυτή πρέπει μελλοντικά να επεκταθεί και σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackiel MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non- radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs Bi variant. *Nucleic Acids Research* 1991, 19(2): 405-406
- Ara RM, Reynolds AV, Conway P. The cost-effectiveness of etanercept in patients with severe ankylosing spondylitis in the UK. *Rheumatology* 2007, 46(8):1338-44
- Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007, 369(9570): 1379–90
- Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 years of treatment with the anti-TNF- $\alpha$  antibody infliximab. *Rheumatology* 2007, 46(9): 1450-3
- Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Zink A, Alten R, Burmester G, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Schneider M, Sørensen H, Zeidler H, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Clinical response to discontinuation of anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis after 3 years of continuous treatment with infliximab. *Arthritis Research & Therapy* 2005, 7(3):R439-R444
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. *W.H Freeman & Company* 2012
- Bird LA, Peh CA, Kollnberger S, Elliott T, McMichael AJ, Bowness P. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *European Journal of Immunology* 2003, 33(3):748–59
- Botteman MF, Hay JW, Luo MP, Curry AS, Wong RL, van Hout BA. Cost effectiveness of adalimumab for the treatment of ankylosing spondylitis in the United Kingdom. *Rheumatology* 2007, 46(8):1320-8
- Brandt J, Haibel H, Cornely D, Golder W, Gonzalez J, Reddig J, Thriene W, Sieper J, Braun J. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis & Rheumatism* 2000, 43(6):1346–2
- Braun J, Davis J, Dougados M, Sieper J, van der Linden S, van der Heijde D, for the ASAS working group. First update of the international ASAS consensus statement for

the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006, 65(3):316-20

Braun J, Pham T, Sieper J, van der Linden S, Dougados M, van der Heidje D. International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003, 62(9):817-24

Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007, 369(9570): 1379–90

Braun J, Sieper J. Building consensus on nomenclature and disease classification for ankylosing spondylitis: results and discussion of a questionnaire prepared for the International Workshop on new treatment strategies in ankylosing spondylitis. *Annals of Rheumatic Diseases* 2002, 61(suppl. 3):iii61-7

Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973, 301(7809):904–907

Brown MA. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2008, 47(2): 132–137

Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, Calin A, Wordsworth P. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis & Rheumatism* 1997, 40(10): 1823–28

Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2000, 59(11): 883–886

Buckingham L, Flaws ML. Molecular Diagnostics (Fundamentals, Methods, Clinical Applications), *F. A. Davis Company* 2007

Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy L, O’Hea J, Mallorie P, Jenkinson TA. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *The Journal of Rheumatology* 1994, 21(12):2281–5

Calin A, Marder A, Becks E, Burns T. Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls. *Arthritis and Rheumatism* 1983, 26(12):1460–1464

Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *Journal of Clinical Investigation* 1985, 76(3): 907-912

Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research* 2002, 4(4): 266-73

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000, 288(54745):2351-4

Clegg DO, Reda DJ, Abdellatif M. Comparison of sulfasalazine and placebo for the treatment of axial and peripheral articular manifestations of the seronegative spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism* 1999, 42(11):2325-9

Criswell LA, Lum RF, Turner KN, Woehl B, Zhu Y, Wang J, Tiwari HK, Edberg JC, Kimberly RP, Moreland LW, Seldin MF, Bridges SL, Jr. 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 & Rheumatism* 2004, 50(9): 2750-6

Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reviews* 2005, 57(2): 163-72

Davenport MP. The promiscuous B27 hypothesis. *Lancet* 1995, 346(8973):500–1

DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis & Rheumatism* 2009, 60(9):2633–43

Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004, 50(9): 2766-74

Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2006, 54(10): 3095-103

Devauchelle-Pensec V, D'Agostino MA, Marion J, Lapierre M, Jousse-Joulin S, Colin D, Chary-Valckenaere I, Marcelli C, Loeuille D, Aegerter P, Guis S, Gaudin P, Breban M, Saraux A. Computerized tomography scan facilitates the diagnosis of sacroiliitis in patients with suspected spondyloarthritis: Results of the ECHOSPA cohort. *Arthritis & Rheumatism* 2012, 64(5): 1412-19

Fabris M, Toluoso B, Di Poi 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. *The Journal of Rheumatology* 2002, 29(9): 1847-50

Feldtkeller E. Age at disease onset and delayed diagnosis of spondyloarthropathies. *Zeitschrift für Rheumatologie* 1999, 58(1):21–30

Finzel S, Englbrecht M, Engelke K, Stach C, Schett G. A comparative study of periarticular bone lesions in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011, 70(1): 122-7

Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Bijlsma JW, Dougados M, Emery P, Keystone EC, Klareskog L, Mease PJ. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005, 64(suppl. 4): iv2-iv14

Garrett S, Jenkinson T, Kennedy L, Whitlelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *The Journal of Rheumatology* 1994, 21(12):2286–91

Golder V, Schachna L. Ankylosing spondylitis: an update. *Australian Family Physician*. 2013, 42(11):780-4

Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1999, 58(2): 79-84

Hacquard-Bouder C, Ittah M, Breban M. Animal models of HLA-B27 associated diseases: new outcomes. *Joint Bone Spine* 2005, 73(2): 132-138

[http://en.wikipedia.org/wiki/Ankylosing\\_spondylitis](http://en.wikipedia.org/wiki/Ankylosing_spondylitis)

Jois RN, Gaffney K, Keat A. Anti-tumour necrosis factor therapy for ankylosing spondylitis- unresolved issues. *Rheumatology* 2007, 46(6):899-901

Kang CP, Lee KW, Yoo DH, Kang C, Bae SC. 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* 2005, 44(4): 547-52

Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, Martín Mola E, Pavelka K, Sany J, Settas L, Wajdula J, Pedersen R, Fatenejad S, Sanda M. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomized controlled trial. *Lancet* 2004, 363(9410): 675-81

Kobelt G, Sobocki P, Sieper J, Braun J. Comparison of the cost-effectiveness of infliximab in the treatment of ankylosing spondylitis in the United Kingdom based on two different clinical trials. *International Journal of Technology Assessment in Health Care* 2007, 23(3):368-375

Koutroumpas A, Sakkas L.I. Ankylosing spondylitis: from diagnosis to treatment. *Hellenic Rheumatology* 2008, 19(1):41-53

Kumagai K, Hiyam, K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Medicine* 2003, 11(5): 593-600

Lavie F, Pavy S, Dernis E, Goupille P, Cantagrel A, Tebib J, Claudepierre P, Flipo RM, Le Loët X, Maillefert JF, Mariette X, Saraux A, Schaeffer T, Wendling D, Combe B. Pharmacotherapy (excluding biotherapies) for ankylosing spondylitis: development of recommendations for clinical practice based on published evidence and expert opinion. *Joint Bone Spine* 2007, 74(4): 346-52

Limón-Camacho L, Vargas-Rojas MI, Vázquez-Mellado J, Casasola-Vargas J, Moctezuma JF, Burgos-Vargas R, Llorente L. In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *Journal of Rheumatology* 2012, 39(4): 830–835

MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis & Rheumatism* 2000, 43(1): 30-7

Maini RN & Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annual Review of Medicine* 2000, 51:207–29

Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Tebib J, Gaudin P, Alexandre C, Blond J.L, Cazalis M. A, Mouglin B, Miossec P. The shared epitope is a marker of severity associated with selection for, but not with response to, infliximab in a large rheumatoid arthritis population. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006, 65(3): 342-7

Marra CA, Bansback N, Anis AH, Shojania K. Introduction to economic modeling for clinical rheumatologists: application to biologic agents in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 2011, 30(suppl. 1):9-18

Marzo-Ortega H, McGonagle D, O'Connor P, Hensor EM, Bennett AN, Green MJ, Emery P. Baseline and 1-year magnetic resonance imaging of the sacroiliac joint and lumbar spine in very early inflammatory back pain. Relationship between symptoms, HLAB27 and disease extent and persistence. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009, 68(11): 1721-7

Maugars Y, Mathis C, Berthelot JM, Charlier C, Prost A. Assessment of the efficacy of sacroiliac corticosteroid injections in spondylarthropathies: a double-blind study. *British Journal of Rheumatology* 1996, 35(8): 767-70

McVeigh CM, Cairns AP. Diagnosis and management of ankylosing spondylitis. *The BMJ* 2006, 333(7568):581–5

McLeod C, Bagust A, Boland A, Dagenais P, Dickson R, Dundar Y, Hill RA, Jones A, Mujica Mota R, Walley T. Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 2007, 11(28): 1-158

Mear JP, Schreiber KL, Munz C, Zhu X, Stevanović S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *The Journal of Immunology* 1999, 163(12):6665—6670

Meyer UA. Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 2004, 5:669-676

Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C, Tamouza R, Loiseau P, Ravaud P, Kupper H, Becquemont L, Charron D, Mariette X. A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008, 67(4): 478-84

Morales-Lara MJ, Cañete JD, Torres-Moreno D, Hernández MV, Pedrero F, Celis R, García-Simón MS, Conesa-Zamora P. Effects of polymorphisms in TRAILR1 and TNFR1A on the response to anti-TNF therapies in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. *Joint Bone Spine* 2012, 79(6): 591-6

Morales-Lara MJ, Conesa-Zamora P, Santaclara V, Torres-Moreno D, Pedrero F, Corral J, Perez-Guillermo M, Rodríguez-Martínez FJ, Soriano-Navarro E. Role of TRAILR1 and TNFR1A polymorphisms in the susceptibility and pharmacogenetics of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients treated with infliximab. *Journal of Translational Medicine* 2010, 8(suppl.1): P50

Morales-Lara MJ, Conesa-Zamora P, Santaclara V, Torres-Moreno D, Pedrero F, Moreno-Morales J, Cogolludo V. Influence of a polymorphism IL1B gene in the response of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients treated with infliximab. *Journal of Translational Medicine* 2010, 8(suppl.1): P51

Ongaro A, De Mattei M, Pellati A, Caruso A, Ferretti S, Masieri FF, Fotinidi M, Farina I, Trotta F, Padovan M. Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T>G polymorphism predict the response grading to anti-TNFalpha therapy in rheumatoid arthritis? *Rheumatology International* 2008, 28(9): 901-8

O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics Journal* 2009, 9(3): 161-7

Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, Ernestam S, Cederholm T, Lundkvist I, Andersson P, Hermansson Y, Harju A, Klareskog L, Bratt J. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003, 62(6): 526-9



- Pahl HL, Sester M, Burgert HG, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NFkappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *The Journal of Cell Biology* 1996, 132(4):511—522
- Peters ND, Ejstrup L. Intravenous methylprednisolone pulse therapy in ankylosing spondylitis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1992, 21(3):134-8
- Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Barton A. Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci. *Arthritis & Rheumatism* 2011, 63(3): 645-53
- Qiang Tong, Dong-Bao Zhao, Punam Bajracharya, Xia Xu, Rui-Na Kong, Ju Zhang, Sheng-Ming Dai, Qing Cai TNF- $\alpha$  -857 and -1031 polymorphisms predict good therapeutic response to TNF- $\alpha$  blockers in Chinese Han patients with ankylosing spondylitis. *Pharmacogenomics* 2012, 13(13): 1459-1467
- Rahman P & O'Rielly DD. Psoriatic arthritis: genetic susceptibility and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 2008, 9(2): 195-205
- Ramos M, Lopez de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002, 60(3):191—205
- Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, Joseph A, Reddy V, Eisen S, McLeod HL. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2008, 35(4): 572-9
- Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Blanco FJ. Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. *Current Genomics* 2008, 9(6):381-393
- Reveille JD. The genetic basis of spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011, 70(suppl.1): i44-50
- Robinson PC, Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis. *Molecular Immunology* 2014, 57(1): 2– 11
- Rudwaleit M, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Märker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis & Rheumatism* 2009, 60(3): 717-27

Russo C & Polosa R. TNF- $\alpha$  as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical Science* 2005, 109(2): 135–142

Sampaio-Barros PD, Costallat LT, Bertolo MB, Neto JF, Samara AM. Methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2000, 29(3):160-2

Schett G, Coates LC, Ash ZR, Finzel S, Conaghan PG. Structural damage in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: traditional views, novel insights gained from TNF blockade, and concepts for the future. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13(suppl. 1): S4

Sharma PK, Hota D, Pandhi P. Biologics in Rheumatoid Arthritis. *Journal of the Association of Physicians of India* 2004, 52:231-6

Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gor-man DM, Bowman EP, McClanahan TK, Yearley JH, Eberl G, Buckley CD, Kastelein RA, Pierce RH, Laface DM, Cua DJ. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gammat+ CD3+ CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nature Medicine* 2012, 18(7): 1069–1076

Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of Rheumatic Diseases* 2002, 61 (suppl 3):iii8-18

Silman AJ & Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 2002, 4(suppl. 3): 265-72

Siva C, Yokoyama WM, McLeod HL. Pharmacogenetics in rheumatology: the prospects and limitations of an emerging field. *Rheumatology* 2002, 41(11):1273–1279

Slobodin G, Reyhan I, Avshovich N, Balbir-Gurman A, Boulman N, Elias M, Feld J, Mader R, Markovitz D, Rimar D, Rosner I, Rozenbaum M, Zisman D, Odeh M. Recently diagnosed axial spondyloarthritis: gender differences and factors related to delay in diagnosis. *Clinical Rheumatology* 2011, 30 (8): 1075-80

Slobodin G, Rosner I, Rimar D, Boulman N, Rozenbaum M, Odeh M. Ankylosing Spondylitis: Field in Progress. *Israel Medical Association Journal* 2012, 14(12): 763-7

Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD. Epidemiology of Spondyloarthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 2012, 38(3): 441-476

Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, Hirata T, Kawahito Y, Satomi Y, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2006, 24(5): 546-54

Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002, 12(3): 183-90

U.S. Food and Drug Administration, [www.fda.gov](http://www.fda.gov)

van der Heijde D, Braun J, McGonagle D, Siegel J. Treatment trials in ankylosing spondylitis: current and future considerations. *Annals of Rheumatic Diseases* 2002, 61(suppl. 3):iii24–32

van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, Dougados M, Reveille JD, Wong RL, Kupper H, Davis JC Jr. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism* 2006, 54(7):2136-46

van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis and Rheumatism* 1984, 27(3):241–249

van der Straaten RJ, Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Bogaartz J, Tiller M, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics* 2007, 8(2): 141-50

Vasilopoulos Y, Manolika M, Zafiriou E, Sarafidou T, Bagiatis V, Krüger-Krasagaki S, Tosca A, Patsatsi A, Sotiriadis D, Mamuris Z, Roussaki-Schulze A. Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of

response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Molecular diagnosis & Therapy* 2012, 16(1): 29-34

Végvári A, Szabó Z, Szántó S, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. The genetic background of ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2009, 76(6): 623–628

Wanders A, van der Heijde D, Landewe R, Behier J-M, Calin A, Olivieri I, Zeidler H, Dougados M. Non steroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism* 2005, 52(6):1756-65

Watson JD, Caudy A, Myers R, Witkowski JA. Ανασυνδυασμένο DNA (γονίδια και γονιδιώματα – μία συνοπτική παρουσίαση), *Ακαδημαϊκές Εκδόσεις* 2007

Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, Caldwell JR, Dervieux T. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2006, 54(2): 607-12

Wellcome Trust Case Control Consortium, The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium. A genome-wide scan of 14,000 non-synonymous coding SNP in 5,500 individuals. *Nature Genetics* 2007, 39:1329–36

Wellcome Trust Case Control Consortium, The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetics* 2007, 39(11): 1329–1337

Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman Y P, Allaart CF, Kerstens PJ, van Zeben D, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis & Rheumatism* 2006, 54(4): 1087-95

Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, Huizinga T W, Guchelaar HJ. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2007, 56(6): 1765-75

Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Morita S, Goto H, Yokota S. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients

with juvenile idiopathic arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011, 71(2): 237-43

Zambrano-Zaragoza JF, Agraz-Cibrian JM, González-Reyes C, Durán-Avelar Mde J, Vibanco-Pérez N. Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes. *International Journal of Inflammation* 2013, 2013:501653

Zhao L, Liu CH, Yu D. High-throughput screening of chemical libraries for modulators of gene promoter activity of HLA-B2705: environmental pathogenesis and therapeutics of ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology* 2011, 38(6):1061-5

Zochling J, Brown J. Assessment of ankylosing spondylitis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2005, 23(suppl. 39):133–41

Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, Collantes E, Davis JC, Dijkmans B, Dougados M, Géher P, Inman RD, Khan MA, Kvien TK, Leirisalo-Repo M, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stucki G, Sturrock RD, van der Linden S, Wendling D, Böhm H, van Royen BJ, Braun J. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Annals of Rheumatic Diseases* 2006, 65(4):423–32