

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο υποδοχέας TLR2 ( toll like receptor-2) σαν προδιαθεσικός  
παράγοντας για την εμφάνιση λοιμώξεων μυοσκελετικού»**

Κατσούλα Σοφία

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Γενετικής Παν. Θεσσαλίας **(Επιβλέπουσα)**

Δήμας Κων/νος, Επίκ. Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν. Θεσσαλίας **(Μέλος)**

Τραχανά Βαρβάρα, Επίκ. Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν. Θεσσαλίας. **(Μέλος)**

ΛΑΡΙΣΑ, 2015

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, «Γενετική του Ανθρώπου», του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Τσέζου Ασπασίας. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Τσέζου Ασπασία για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο που ανταποκρίνεται στα επιστημονικά μου ενδιαφέροντα καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Δήμα Κων/νο, Επίκ. Καθηγητής Φαρμακολογίας και την κυρία Τραχανά Βαρβάρα, Επίκ. Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στους γονείς μου Σταυρούλα και Κων/νο Κατσούλα και στον αδερφό μου Ιωάννη για την συμπαράστασή τους αλλά και την υλική και ηθική στήριξη των επιλογών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη.....  | 5  |
| Abstract .....   | 7  |
| 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....   | 10 |
| 1.1 Εισαγωγή .....   | 10 |
| 1.2 Παράγοντες που έχουν σχέση με λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος ..... | 10 |
| 1.3 Οστεομυελίτιδα .....   | 11 |
| 1.3.1 Αιτιολογικοί Παράγοντες Οστεομυελίτιδας.....                             | 12 |
| 1.4 Σηπτική Αρθρίτιδα .....  | 12 |
| 1.4.1 Αιτιολογικοί Παράγοντες Σηπτικής Αρθρίτιδας .....                        | 13 |
| 1.5 Οι υποδοχείς Toll Like Receptors .....                                     | 13 |
| 1.5.1 TLR-2 υποδοχέας .....  | 15 |
| 1.6 Έκφραση των TLR υποδοχέων .....  | 16 |
| 1.6.1 Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στους TLR υποδοχείς .....        | 16 |
| 1.6.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι TLR υποδοχέων .....                                | 18 |
| 1.6.3 Αρνητική ρύθμιση έκφρασης και λειτουργίας των TLR .....                  | 20 |
| 1.7 ΣΚΟΠΟΣ .....   | 21 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....  | 21 |
| 2.1 Απομόνωση DNA.....   | 21 |
| 2.1.1 Εισαγωγή.....  | 21 |
| 2.1.2 Πειραματικό Μέρος.....   | 22 |
| Απομόνωση DNA .....  | 22 |
| 2.2 Ηλεκτροφόρηση .....  | 23 |
| 2.2.1 Εισαγωγή.....  | 23 |
| 2.2.2 Πειραματικό Μέρος.....   | 24 |
| 2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού.....                                      | 24 |
| 2.3.1.Εισαγωγή.....  | 24 |
| 2.3.2 Πειραματικό Μέρος .....  | 27 |
| 2.4.1 Εισαγωγή.....  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.2 Πειραματικό Μέρος .....            | 28 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... | 29 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....         | 31 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                       | 33 |

## Περίληψη

Βασικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έχουν ειδικοί υποδοχείς (Pattern Recognition Receptors, PRRs) που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν ειδικά μόρια των βακτηριακών κυττάρων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) και επάγουν την ανοσολογική απάντηση. Οι Toll Like υποδοχείς (Toll Like Receptors, TLRs) ανήκουν σε αυτούς τους υποδοχείς. Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν και αναγνωρίζουν συστατικά των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των λιποπρωτεϊνών, και των νουκλεϊκών οξέων καθώς και των ενδογενών μακρομορίων που απελευθερώνονται από κάποιο τραυματισμένο ιστό. Οι TLRs κατέχουν την πρώτη γραμμή της φλεγμονώδους αντίδρασης, καθώς απ'αυτούς ξεκινά η σηματοδότηση για τη ρύθμιση της έμφυτης ανοσίας.

Οι TLRs αποτελούνται από ένα N-τερματικό εξωκυττάριο τμήμα πλούσιο σε λευκίνη το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του συνδέτη, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο, το οποίο έχει δομικές αναλογίες με το αντίστοιχο του υποδοχέα της IL-1(ιντερλευκίνης-1).

Οι TLRs εκφράζονται στα κύτταρα πολλών ιστών και οργάνων. Κάποια από αυτά είναι τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα οστικά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα αιμοπετάλια καθώς επίσης και τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη φλεγμονώδη απόκριση, φαγοκυττάρωση και την ανοσία. Εκτός όμως από την έκφρασή τους σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οι TLRs εκφράζονται επίσης σε κύτταρα της γαστρεντερικής οδού, του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, στα κυψελιδικά και βρογχικά κύτταρα του πνεύμονα, στα κερατινοκύτταρα του δέρματος καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος. Η έκφραση των TLRs μειώνεται με την ηλικία, γεγονός που μπορεί να είναι μία πιθανή εξήγηση την μεγαλύτερης ευαισθησίας των ηλικιωμένων στις λοιμώξεις.

Μεταβολές των TLR σηματοδοτικών μονοπατιών έχουν συσχετιστεί με σοβαρές λοιμώξεις των οργάνων συμπεριλαμβανομένων και των λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος. Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στον υποδοχέα TLR-7έχουν συσχετιστεί με σοβαρή ηπατίτιδα C, ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια των TLR-2 και TLR-8 έχουν συνδεθεί με αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακές μολύνσεις.

Ο TLR-2 αναγνωρίζει λιποπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια βακτηριακής προέλευσης. Οι λιποπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες που περιέχουν λιπίδια που συνδέονται ομοιοπολικά με κυστεΐνες του αμινοτελικού άκρου. Βρίσκονται σε όλα τα Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Ο TLR-2 διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εξαφάνιση των εστιών μόλυνσης του ιστού και στην επαναφορά του στη σωστή λειτουργία καθώς σχηματίζει ετεροδιμερή με τους TLR-1 και TLR-6 ανιχνεύοντας βακτηριδιακά πρωτεϊνικά μόρια (PAMPs), και μέσω πρωτεϊνών όπως της MyD88 ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο TLR-2 έχει αναφερθεί σε παλαιότερες μελέτες ότι εκφράζεται σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα, πολυμορφοπύρηνα και σε δενδριτικά κύτταρα. Ακόμη έχει αναφερθεί ότι μαζί με τους TLR-3 και TLR-4 ενέχονται στη ρύθμιση φλεγμονωδών διαδικασιών μετά από τραυματισμό.

Οι λοιμώξεις εμφανίζονται όταν αναπτύσσονται μικρόβια σε ένα σημείο του οργανισμού όπου φυσιολογικά δεν υπάρχουν. Ανάλογα με τον τύπο της μόλυνσης και τον προσβεβλημένο ιστό προκαλούν διαφορετική κλινική εικόνα. Η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσής τους είναι σημαντική για τη μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας που προκαλούνται από αυτές. Λοιμώξεις μπορεί να προκληθούν από οποιονδήποτε μικροοργανισμό (βακτήρια, μύκητες, ιούς, παράσιτα), όμως ο *S.aureus* είναι το πιο συχνό παθογόνο βακτήριο που εμπλέκεται στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος και ιδιαίτερα στις μεταχειρουργικές λοιμώξεις. Η συσχέτισή του με την οστεομυελίτιδα και τη σηπτική αρθρίτιδα έχει αναγνωριστεί εδώ και δεκαετίες και σε περιπτώσεις που δεν έχει χορηγηθεί θεραπεία μπορεί να υπάρξουν σοβαρά προβλήματα ή και ακόμη μόνιμες βλάβες.

Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της ανάπτυξης λοιμώξεων του μυοσκελετικού όπως οστεομυελίτιδας και σηπτικής αρθρίτιδας με την παρουσία του πολυμορφισμού R753Q του υποδοχέα TLR-2. Στη μελέτη συμμετείχαν 215 άτομα, από τα οποία οι 105 ανέπτυξαν σηπτική αρθρίτιδα ή οστεομυελίτιδα αφού υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ενώ οι υπόλοιποι 110 δεν ανέπτυξαν τη νόσο και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου της μελέτης.

Από όλα τα άτομα έγινε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού R753Q του υποδοχέα TLR-2 έγινε με RFLP ανάλυση. Με την τεχνική αυτή γίνεται πρώτα ενίσχυση του τμήματος DNA που περιέχει τον

πολυμορφισμό με την τεχνική της αλυδιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια ακολουθεί πέψη του προϊόντος με ειδικό ένζυμο περιορισμού. Η ανάλυση των προϊόντων PCR-RFLP έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% βαμμένη με βρωμιούχο αιθίδιο.

Τέλος, μετά την ηλεκτροφόρηση, με βάση τις ζώνες ταυτοποιούνται οι 3 γονότυποι: όταν ο πολυμορφισμός απουσιάζει ανιχνεύεται μόνο μια ζώνη προϊόντος PCR μεγέθους 430 bp. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται τρεις ζώνες προϊόντος, μια 430 bp, μια 307 bp και μια 123 bp ενώ στους ομοζυγώτες ανιχνεύονται δυο ζώνες προϊόντος, η μια 307 bp και η άλλη 123 bp. Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι στο 98% των ασθενών που ανέπτυξαν τη λοίμωξη, ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν ο *S. aureus*, και ότι ο πολυμορφισμός R753Q στον TLR-2 υποδοχέα είναι στατιστικώς σημαντικός παράγοντας για την εμφάνιση λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος.

Μελέτες σε ασθενείς που έχουν γίνει μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί N199N, S450S, R753Q, R677W, Arg677T, του TLR-2 αυξάνουν τον κίνδυνο για σοβαρές λοιμώξεις, φυματίωση καθώς και λέπρα. Ο πολυμορφισμός R753Q μπορεί να είναι ένας χρήσιμος δείκτης για τον εντοπισμό ασθενών με υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν λοιμώξεις αλλά θα πρέπει να εντοπισθεί και σε άλλες μελέτες. Η γνώση του ρόλου των TLR-2 υποδοχέων παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των λοιμώξεων και θα μπορούσε να συμβάλει στον έγκαιρο εντοπισμό ατόμων με μεγαλύτερη προδιάθεση για εμφάνιση λοιμώξεων καθώς και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

## **Abstract**

Specific receptors (Pattern Recognition Receptors, PRRs) located on the cell surface hold a key role in the human immune system. These receptors recognize specific bacterial protein molecules (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) and induce the immune response. The Toll Like receptors (hence TLRs) belong to these receptors. TLRs are transmembrane proteins, which can recognize these bacterial protein molecules, including lipoproteins, nucleic acids and endogenous

macromolecules that are released from an injured tissue. TLRs are activated by various ligands that hold the first line of the inflammatory response. Those ligands activate the beginning of regulation of innate immunity.

TLRs are comprised of an N-terminal extracellular leucine-rich fraction, which is responsible for identifying the ligand, a transmembrane portion and an intracellular, which has structural similarities to the corresponding receptor of IL-1 (interleukin-1).

TLRs are expressed in various tissues and organ cells. Some of these are the monocytes, macrophages, bone cells, smooth muscle cells, platelets, as well as the cells responsible for the inflammatory response, phagocytosis and adaptive immunity. Apart from their expression in immune cells, TLRs are also expressed in cells of the gastrointestinal tract, the female reproductive system, the alveolar and bronchial cells of the lung, in the skin keratinocytes and in epithelial cells of the cardiovascular system. Expression of TLRs decreases with age, which may be a possible explanation for the greater susceptibility of the elderly to infections.

With the recent progress in the analysis of DNA, the complex genes of TLR receptors are more comprehensible. Changes in TLR signaling pathways have been linked to severe clinical manifestations of bacterial, fungal and viral infections as well as infections of the musculoskeletal system. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TLR-7 receptor have been associated with severe hepatitis C, while mutations in the TLR-2 and TLR-8 genes have been linked to an increased susceptibility to bacterial infections.

The TLR-2 recognizes lipoproteins and glycolipids of bacterial origin. Lipoproteins are proteins containing lipids, which are covalently linked to the amino terminal cysteines. They are found in all Gram positive and Gram negative bacteria. The TLR-2 plays a key role in the disappearance of tissue infection outbreaks and in the restoration of the proper function as it forms heterodimers with TLR-1 and TLR-6 by detecting bacterial protein molecules (PAMPs), and through proteins such as MyD88 they activate the macrophages and dendritic cells. More specifically, the TLR-2 has been reported in earlier studies that it is expressed in macrophages, neutrophils, granulocytes and dendritic cells. Furthermore, it has been reported that along with the TLR-3 and TLR-4, they are involved in the regulation of inflammatory processes following injury.



Infections occur when bacteria enter the body, attach to cells and multiply where they would not normally exist. They cause a different clinical picture depending on the type of infection and the affected tissue. Their early detection is important in order to reduce the morbidity and mortality caused by these. Infections can occur from any microorganism (bacteria, fungi, viruses, parasites), but the *S.aureus* is the most common pathogen bacteria involved in Musculoskeletal infections and particularly postsurgical infections. Its correlation with osteomyelitis and septic arthritis has been recognized since decades. In cases where there have been no treatment serious problems or even permanent damage can occur.

This study sought to investigate the relationship between the development of musculoskeletal infections such as osteomyelitis and septic arthritis, and the R753Q polymorphism presence of the TLR-2 receptor. The study involved 200 people, of which 100 developed septic arthritis or osteomyelitis after undergoing surgery, while the remaining 100 did not develop the disease and constituted the control group of the study.

DNA was isolated from peripheral blood cells of all the subjects. RFLP analysis was used to detect polymorphism R753Q of TLR-2 receptor. First, the DNA fragment that contains the polymorphism was amplified using the technique of polymerase chain reaction (PCR). Then, a specific restriction enzyme was used to digest the product. The analysis of PCR-RFLP products was electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Finally, following the electrophoresis, the three genotypes are identified based on the zones. When the polymorphism is not present, only one PCR product band size 430 bp is detected. In heterozygous carriers of polymorphism three product areas are detected: a 430 bp, a 307 bp and a 123 bp, while in homozygotes two product areas are detected, one 307 bp and the other 123 bp.

Studies have shown that polymorphisms N199N, S450S, R753Q, R677W, Arg677T of the TLR-2, increase the risk of serious infections, tuberculosis and leprosy. The R753Q polymorphism may be a useful marker to identify patients with high risk to develop infections; however, more studies are needed to confirm that finding. Knowledge of the role of TLR-2 receptor is crucial in the pathogenesis of infections. To be more specific, it could help in the early identification of genetically

predisposed individuals who are more susceptible to developing infections. Finally, it could lead to the design of new therapeutic strategies.

## **1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1.1 Εισαγωγή**

Η πιο συχνή αιτία έντονου πόνου εκατομμυρίων ανθρώπων ανά την υφήλιο οφείλεται στις παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος. Οι μυοσκελετικές λοιμώξεις είναι οι πιο κοινές ασθένειες στο τμήμα των επειγόντων περιστατικών, και παρουσιάζουν ανάλογα με τον τύπο της μόλυνσης και τον ιστό που προσβάλλουν διαφορετική κλινική εικόνα. Η εμφάνισή τους γενικά, αλλά ιδιαίτερα μετά από επεμβάσεις δημιουργεί θεραπευτικές δυσκολίες, παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών, παράταση της διάρκειας παραμονής στο νοσοκομείο ίσως και επανεπέμβαση σε αρκετές περιπτώσεις [1-3]. Η λοίμωξη όπου εμφανίζεται μετά από επέμβαση θα εμφανιστεί εντός 30 ημερών από το χειρουργείο αλλά σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά υλικά (εμφυτεύματα) η εμφάνισή της μπορεί να γίνει ακόμη και μέσα σε 1 χρόνο [4]. Η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσής τους είναι σημαντική για τη μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας που προκαλούνται από αυτές. Οι λοιμώξεις του μυοσκελετικού εμφανίζονται κυρίως σε άτομα με μειωμένη άμυνα όπως οι ηλικιωμένοι, άτομα με χρόνιες παθήσεις, άτομα που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και καπνιστές [5,6]. Σε ασθενείς άνω των 80 ετών επηρεάζονται κυρίως οι αρθρώσεις του γονάτου, του ώμου και του ισχίου, ενώ παράλληλα πολύ συχνή είναι η οξεία αιματογενής οστεομυελίτιδα που προσβάλλει κυρίως τη σπονδυλική στήλη [7]. Ο κύριος λόγος των λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος, είναι η επικοινωνία της περιοχής του τραύματος με τον εξωτερικό χώρο, η μετατραυματική κατάσταση των μαλακών μορίων, οι επεμβάσεις για την αντιμετώπιση των τραυμάτων και η βακτηριαιμία που παρατηρείται στις διάφορες φάσεις της εξέλιξης της κατάστασης των πολυτραυματιών [8,9].

### **1.2 Παράγοντες που έχουν σχέση με λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος**

Ο *Staphylococcus Aureus* είναι το πιο συχνό παθογόνο βακτήριο που εμπλέκεται στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος και ιδιαίτερα στις μεταχειρουργικές

λοιμώξεις. Ο *S.aureus* είναι ένα Gram-θετικό βακτήριο που αποικίζει ασυμπτωματικά στο ανθρώπινο δέρμα, τα ρουθούνια και στη γαστρεντερική οδό. Οι μολύνσεις από το *S.aureus* μπορεί να κυμαίνονται από ήπιες λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, έως πιο σοβαρές ασθένειες, όπως ενδοκαρδίτιδα, βακτηριαιμία, σήψη, οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα. Ειδικότερα, ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη χρυσίζων σταφυλόκοκκος [*Methicillin-Resistant S.aureus* (MRSA)] αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων [10,11,12], καθώς έχει την ικανότητα να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε μια ποικιλία αντιμικροβιακών ουσιών, αλλάζοντας το πρότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά από ασθενή σε ασθενή. Εκτός όμως από αυτόν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για αυτές τις λοιμώξεις. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι συνήθως αερόβιοι Gram θετικοί κόκκοι, αλλά και Gram αρνητικά αερόβια ή αναερόβια βακτήρια (*Proteus*, *Enterococcus*, *b-streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* και *klebsiella*) [13]. Πιο σπάνιο φαινόμενο είναι η λοίμωξη από μυκοβακτηρίδια, η θεραπεία της οποίας απαιτεί κυρίως χειρουργική επέμβαση. Η κατανόηση για το πως τα μικρόβια εισέρχονται στους ιστούς και στα οστά και δημιουργούν μια χρόνια μολυσματική κατάσταση είναι επιτακτική ανάγκη για την επιτυχή θεραπεία των λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος.

### 1.3 Οστεομυελίτιδα

Η οστεομυελίτιδα είναι μια λοίμωξη της μυελικής κοιλότητας του οστού και χαρακτηρίζεται από προοδευτική φλεγμονώδη καταστροφή του. Είναι η δεύτερη πιο σημαντική λοίμωξη των μαλακών ιστών και μορίων του μυοσκελετικού συστήματος. Μπορεί να εμφανιστεί είτε σαν οξεία είτε σαν χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση των οστών. Σε ασθενείς που εμφανίζουν οστεομυελίτιδα, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε ότι οι οξείες και οι χρόνιες συνθήκες δεν βασίζονται αποκλειστικά στην διάρκεια της νόσου, αλλά και στα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Σε νεαρούς ενήλικες, είναι συνδεδεμένη με τραύματα, κατάγματα ή επιπλοκές σε ανοιχτές πληγές που εμπλέκονται τα οστά μετά από χειρουργική επέμβαση, ενώ σε παιδιά και σε ηλικιωμένους ασθενείς, η αιτία της οστεομυελίτιδας είναι η βακτηριαιμία. Συνοδεύεται από οίδημα, αγγειακή συμφόρηση, θρόμβωση παρακείμενων μικρών αγγείων, που οδηγεί τελικά στην καταστροφή του οστού. Άτομα που πάσχουν από δρεπανοκυτταρική αναιμία, σακχαρώδη διαβήτη,

σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, καθώς και σε ναρκομανείς, η εμφάνιση της νόσου είναι πιο συχνή, όπως επίσης και σε άτομα που είναι χρόνιοι χρήστες στεροειδών και άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Η έγκαιρη διάγνωση και η θεραπεία έχει αναφερθεί ότι είναι η πιο σημαντική πορεία δράσης για την επίτευξη ενός ευνοϊκού αποτελέσματος σε περιπτώσεις οστεομυελίτιδας [14,15,16].

### **1.3.1 Αιτιολογικοί Παράγοντες Οστεομυελίτιδας**

Η οστεομυελίτιδα μπορεί να προκληθεί είτε αιματογενώς, είτε κατά συνέχεια ιστών ή μετά από τραύμα, χειρουργική επέμβαση ή τοποθέτηση προσθετικής άρθρωσης. Η οξεία οστεομυελίτιδα συνήθως αποκτάται αιματογενώς και το πιο κοινό παθογόνο μικρόβιο είναι ο *S.aureus*. Η χρόνια οστεομυελίτιδα μπορεί να προκληθεί από *S.aureus*, αλλά συχνά οφείλεται και σε Gram αρνητικά βακτήρια. Στην οξεία αιματογενή οστεομυελίτιδα, τα βακτήρια φτάνουν στα αιμοφόρα αγγεία και έτσι ξεκινά η λοιμώδης διαδικασία. Παθογόνα βακτήρια στα αρτηρίδια πολλαπλασιάζονται και δημιουργούνται μικροαποστήματα. Ο σχηματισμός αυτός των μικροαποστημάτων μέσα στην μυελική κοιλότητα του οστού οδηγεί σε περαιτέρω οστική νέκρωση, λόγω αυξημένης πίεσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η οξεία οστεομυελίτιδα μπορεί να θεραπευτεί με αντιμικροβιακή θεραπεία. Στην χρόνια οστεομυελίτιδα η εκτεταμένη καταστροφή του οστού μπορεί να συνοδεύεται από το σχηματισμό συριγγίου και η μοναδική θεραπεία να είναι η χειρουργική επέμβαση. Αυτή η μόλυνση των οστών είναι πολυπαραγοντική και επηρεάζεται κυρίως από τοπικούς παράγοντες που σχετίζονται με βλάβη του οστού και των μικροοργανισμών που εμβολιάστηκαν στο οστό. Ωστόσο, κληρονομικοί παράγοντες μπορούν επίσης να συμβάλουν στην ανάπτυξή της.

## **1.4 Σηπτική Αρθρίτιδα**

Η σηπτική αρθρίτιδα είναι φλεγμονή της άρθρωσης που οφείλεται κυρίως σε λοίμωξη από βακτήρια. Είναι μια ιδιαίτερα σοβαρή κατάσταση δεδομένου του γεγονότος ότι

προκαλεί χρόνια νοσηρότητα αν δεν αναγνωριστεί και αντιμετωπιστεί νωρίς. Η σηπτική αρθρίτιδα επηρεάζει συνήθως το ισχίο, το γόνατο τον ώμο και τέλος τον αγκώνα. Η σηπτική αρθρίτιδα του ισχίου μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές μυοσκελετικές συνέπειες, οι οποίες περιλαμβάνουν πρόωρη σύγκλειση του χόνδρου, εξάρθρωση, νέκρωση του χόνδρου, ισχαιμική νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού, ψευδάρθρωση του αυχένα του μηριαίου οστού και την ολοσχερή καταστροφή της μηριαίας κεφαλής [17,18,19]. Συνήθως η ηλικία του ασθενούς αναγνωρίζεται ως σημαντικός παράγοντας κακής πρόγνωσης. Η σηπτική αρθρίτιδα στην παιδική ηλικία παρουσιάζεται συχνά με άτυπα συμπτώματα, και μάλιστα σε νεογνά, τα κλινικά ευρήματα μπορεί να είναι ελάχιστα ή ακόμη και ανύπαρκτα [14,15]. Στους ενήλικες, η κλινική εικόνα της σηπτικής αρθρίτιδας περιλαμβάνει μυοσκελετικά χαρακτηριστικά όπως μυαλγίες, πρησμένα άκρα, μυοσίτιδα και περιτονίτιδα. Σήψη εκδηλώνεται κυρίως σε ασθενείς με προυπάρχων ασθένειες, αλλά ακόμη και σε υγιή άτομα.

#### **1.4.1 Αιτιολογικοί Παράγοντες Σηπτικής Αρθρίτιδας**

Όπως στην οστεομυελίτιδα έτσι και στη σηπτική αρθρίτιδα η νόσος μπορεί να αναπτυχθεί είτε ως αποτέλεσμα εξάπλωσης αιματογενώς, είτε από μια γειτονική θέση μόλυνσης από όπου κάποιο βακτήριο έχει μεταναστεύσει ή απευθείας από κάποιο τραύμα. Τα συχνότερα βακτήρια που προκαλούν σηπτική αρθρίτιδα είναι ο *S. aureus*, ο *S. pyogenes*, αλλά και μύκητες. Η πορεία της σηπτικής αρθρίτιδας, είναι διαφορετική από εκείνη της οστεομυελίτιδας διότι τα συμπτώματα του ασθενούς δεν υποχωρούν μετά από αντιβιοτική θεραπεία ή με αρθροσκοπικό χειρουργικό καθαρισμό [20,21].

### **1.5 Οι υποδοχείς Toll Like Receptors**

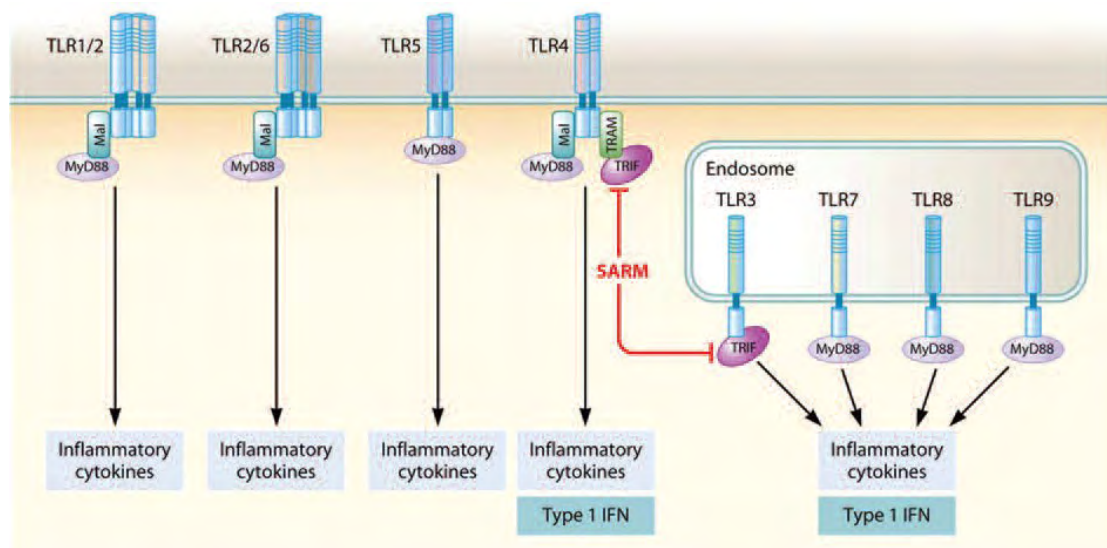
Οι Toll Like Receptors (TLRs) είναι μόρια που αναγνωρίζουν συστατικά πολλών παθογόνων μικροοργανισμών όπως Gram αρνητικά και Gram θετικά βακτήρια, ιούς, μύκητες, παράσιτα καθώς επίσης και ενδογενή μακρομόρια που απελευθερώνονται

από κάποιο τραυματισμένο ιστό καθώς και ενδογενείς συνδέτες που απελευθερώνονται από κύτταρα που υφίστανται απόπτωση.

| TLR                                 | ΜΟΡΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ                                     |
|-------------------------------------|---|
| TLR1                                | ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΤΡΙΑΚΥΛΟΛΙΠΟΠΕΠΤΙΔΙΑ & ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ |
| TLR2                                | ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΔΙΑΚΥΛΟΛΙΠΟΠΕΠΤΙΔΙΑ GRAM+, ΖΥΜΟΖΑΝΗ        |
| TLR3                                | ΔΙΠΛΗΣ ΕΛΙΚΑΣ RNA ΑΠΟ ΙΟΥΣ                            |
| TLR4                                | ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΕΣ ΑΠΟ GRAM+                                 |
| TLR5                                | ΦΛΑΓΕΛΙΝΗ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ                                |
| TLR7                                | ΜΟΝΗΣ ΕΛΙΚΑΣ RNA ΑΠΟ ΙΟΥΣ                             |
| TLR8 (ΑΝΕΝΕΡΓΟΣ ΣΤΟ ΜΥ)             | ΜΟΝΗΣ ΕΛΙΚΑΣ RNA ΑΠΟ ΙΟΥΣ                             |
| TLR9                                | CpG DNA ΑΠΟ ΙΟΥΣ                                      |
| TLR10 (ΒΡΕΘΗΚΕ ΜΟΝΟ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ)   | ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΜΟΡΙΑ  |
| TLR11                               | ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΠΡΩΤΟΖΩΑ                                    |
| TLR12 & TLR13 (ΒΡΕΘΗΚΕ ΜΟΝΟ ΣΤΟ ΜΥ) | ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΠΡΩΤΟΖΩΑ                                    |

**Πίνακας 1.** Μόρια αναγνώρισης από τους TLR υποδοχείς

Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα περιέχει υποδοχείς αναγνώρισης (Pattern Recognition Receptors, PRRs) οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και ανιχνεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) και ενεργοποιούν την έγκαιρη επέμβαση εναντίον τους. Έτσι ξεκινάει η ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή για την πρόληψη και καταπολέμηση των μολύνσεων και ενισχύεται η προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση [22,23]. Το 1990 ανακαλύφθηκαν οι TLR υποδοχείς, οι οποίοι είναι διαμεμβρανικές πρωτείνες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη και εκφράζονται από σε πολλά είδη ζώων αλλά και στον άνθρωπο [24]. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 12 TLR υποδοχείς από τους οποίους οι TLR1-10 βρίσκονται στον άνθρωπο και οι TLR1-9, TLR-11, TLR-12 στα ποντίκια [25].



**Εικόνα 1.** Οι TLRs είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς και πυροδοτούν οδούς μεταγωγής μηνυμάτων, οι οποίες οδηγούν σε παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών ή ιντερφερονών. Οι TLRs εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη ή στα ενδοσώματα.

### 1.5.1 TLR-2 υποδοχέας

Ο TLR-2 αναγνωρίζει διάφορα συστατικά από ποικίλα παθογόνα μικρόβια όπως λιποπρωτείνες πεπτιδογλυκάνες, μύκητες, παράσιτα και λιποθειϊκό οξύ από Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτηρίδια. Γι' αυτό το λόγο υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της δράσης του υποδοχέα με διάφορες λοιμώξεις στον άνθρωπο [26]. Ο TLR-2 υποδοχέας ετεροδιμερίζεται με τους TLR-1 και TLR-6 υποδοχείς, το οποίο είναι και το πρώτο βήμα για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού όταν προσβληθεί από αυτούς τους παθογόνους μικροοργανισμούς και προκληθεί μόλυνση. Αυτό μπορεί μερικώς να εξηγήσει τη δυνατότητα του TLR-2 να αποκριθεί στο ευρύ φάσμα των μικροβιακών συστατικών. Τα Gram θετικά βακτηρίδια έχουν ένα παχύ στρώμα από πεπτιδογλυκάνες. Τα οξέα και οι λιποπρωτείνες ενσωματώνονται σε αυτό το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηριδίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία λιποσακχαρίτη (LPS). Τα μυκοβακτηρίδια έχουν ένα παχύ υδροφοβικό στρώμα που περιέχει ένα στρώμα πεπτιδογλυκανών και γλυκολιπίδια. Μελέτες σε ποντίκια που υπέστησαν απαλοιφή του γονιδίου TLR-2 υποδεικνύουν αυξημένη ευαισθησία των ποντικών σε μολύνσεις από *S. aureus* και *S. pneumoniae* σε σύγκριση με τα άγριου

τύπου ποντίκια [27]. Προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος του TLR-2 στην ανοσολογική προστασία ή παθογένεση των λοιμώξεων, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών. Η συντριπτική πλειονότητα των ερευνητών έχει χρησιμοποιήσει ποντικούς ως μοντέλο *in vivo*, περιορίζοντας τη μεταβλητότητα των γονιδίων και επιτρέποντας την εξέταση των *knock out* ή διαγονιδιακών ποντικών. Επιπλέον, ένα σημαντικό ζήτημα είναι η φαινοτυπική διαφορά μεταξύ ποντικών και ανθρώπων, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου έκφρασης του TLR-2 υποδοχέα στα κύτταρα. Σύγκριση ποντικών και ανθρώπινων αλληλουχιών TLR-2 αποκάλυψε υψηλότερη συσχέτιση μεταξύ ενδοκυτταρικών περιοχών από ότι μεταξύ εξωκυτταρικών [28,29] με την τελευταία να εμπλέκεται στην αναγνώριση του συνδέτη. Παράγοντες που συσχετίζονται με πολυμορφισμούς στους TLR-2 υποδοχείς και την πορεία της νόσου και την ευαισθησία είναι η εθνικότητα, η έκθεση σε μολυσματικούς παράγοντες καθώς επίσης και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

## **1.6 Έκφραση των TLR υποδοχέων**

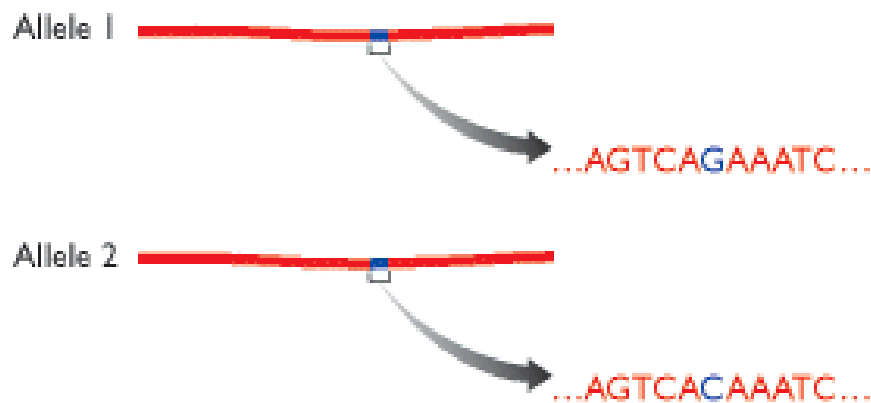
Εκτός από την έκφρασή τους σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οι TLRs εκφράζονται επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού, σε κυψελιδικά και βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, σε κερατινοκύτταρα του δέρματος, σε ενδοθηλιακά κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος και σε κύτταρα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Ορισμένοι TLR υποδοχείς εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια ( TLR-1,2,4,5,6 και 10), ενώ οι υπόλοιποι (TLR-3,7,8 και 9) εκφράζονται ενδοκυττάρια. Υπάρχουν όμως και αυτοί που εκφράζονται και στην κυτταρική επιφάνεια και ενδοκυττάρια (TLR-3 και TLR-7). Ο TLR-7μαζί με τον TLR-9 έχει βρεθεί ότι εκφράζονται σε β-κύτταρα, σε δενδριτικά και σε πλασματοκύτταρα, ενώ από την άλλη ο TLR-8 εκφράζεται σε μυελοειδή δενδριτικά, μακροφάγα και μονοκύτταρα. Ο TLR-2 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα που αναγνωρίζουν αντιγόνα, δηλαδή σε μακροφάγα, μονοκύτταρα, δενδριτικά και πλασματοκύτταρα.

### **1.6.1 Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στους TLR υποδοχείς**

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) αποτελούν τους συχνότερους τύπους διαφοροποιήσεων και προκύπτουν όταν ένα



νουκλεοτίδιο σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδιώματος αντικαθίσταται από κάποιο άλλο. SNPs είναι υπεύθυνα για την γενετική ποικιλότητα και αποτελούν χρήσιμους γενετικούς δείκτες για τη διάγνωση και μελέτη πολυγονιδιακών νοσημάτων. Ορισμένα SNPs έχουν αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι σχετίζονται με την εκδήλωση ασθενειών καθώς μπορούν να αλλάζουν την αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης [30]. Οι SNPs που εντοπίζονται στην κωδική περιοχή ενός γονιδίου, μπορούν να επιφέρουν αλλαγή στην αλληλουχία των αμινοξέων η οποία είτε να επηρεάζει τη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης είτε τη λειτουργικότητά της. Ακόμη, μπορεί να εντοπίζονται και στον υποκινητή ή σε άλλες ρυθμιστικές περιοχές επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου και να τροποποιούν το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών [31]. Οι διάφοροι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) εντός των γονιδίων TLR έχουν συσχετιστεί με ευαισθησία σε λοιμώξεις, φλεγμονές και αλλεργικές ασθένειες. Ακόμη έχει βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στην ογκογένεση αλλά και σε λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος. Το φύλο, η εθνικότητα αλλά και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες περιπλέκουν περαιτέρω το πώς οι SNPs πολυμορφισμοί επηρεάζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις των TLR υποδοχέων. Για πολλούς TLRs, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι SNPs πολυμορφισμοί επιδρούν σε αυτούς και οι επιπτώσεις τους παραμένουν άγνωστοι. Αρκετοί πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs), έχουν ταυτοποιηθεί στον υποκινητή και στην κωδική περιοχή του TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 και TLR-9 [26]. Οι μεταβολές σηματοδότησης των TLR έχουν συνδεθεί με ιογενείς λοιμώξεις. Για παράδειγμα, πολυμορφισμοί ενός μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) στον TLR-7 έχουν συσχετιστεί με ηπατίτιδα C, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο του TLR-8 υποδοχέα έχουν συνδεθεί με αυξημένη επιδεκτικότητα σε βακτηριακές μολύνσεις. Το ανθρώπινο γονίδιο TLR-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4q32 και περιέχει τουλάχιστον 89 SNPs, συμπεριλαμβανομένων 17 που τροποποιούν τις βάσεις στην αλληλουχία κωδικοποίησης του εξονίου 3 [32].



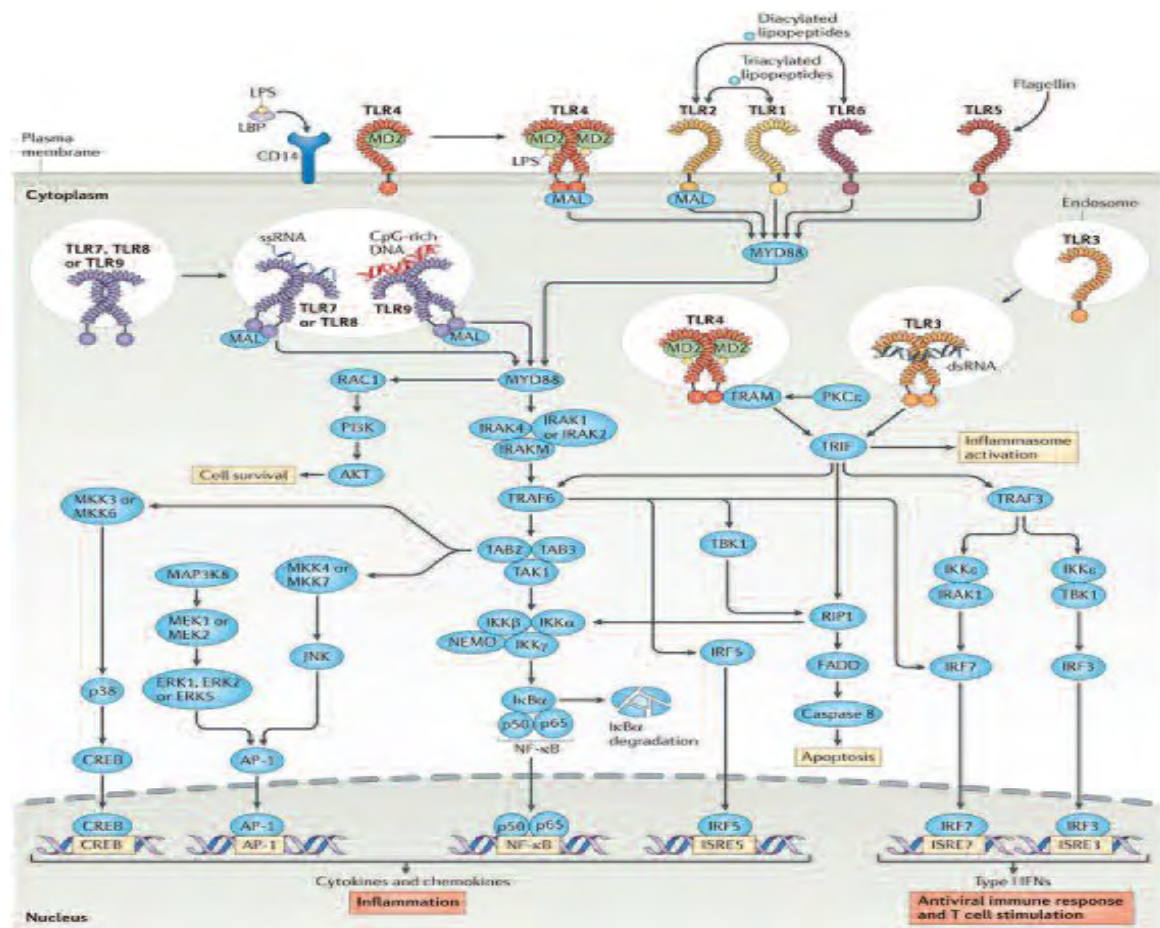
**Εικόνα 2.** Πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNP). Παρατηρείται η αλλαγή μιας βάσης. Στο πρώτο αλληλόμορφο υπάρχει γουανίνη ενώ στο δεύτερο έχει αντικατασταθεί από κυτοσίνη.

#### 1.6.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι TLR υποδοχέων

Η αλληλεπίδραση των PAMPs και των TLRs πυροδοτεί μια ποικιλία ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν στην παραγωγή διαφόρων κυτοκινών, χημειοκινών και ιντερφερονών τύπου I [33]. Οι TLRs ενεργοποιούνται από διάφορους συνδέτες οι οποίοι κατέχουν την πρώτη γραμμή της φλεγμονώδους αντίδρασης, καθώς απ' αυτούς ξεκινά η σηματοδότηση για τη ρύθμιση της έμφυτης ανοσίας. Οι υποδοχείς αυτοί περιέχουν πλούσια σε λευκίνη επαναλαμβανόμενα μοτίβα στην εξωτερική και κυτταροπλασματική μεμβράνη (TIR). Το προφλεγμονώδη μονοπάτι σηματοδότησης TLR οδηγεί στη σύνθεση των φλεγμονοδών κυτοκινών και χημειοκινών, όπως IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, και TNF- $\alpha$ . Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών προσαρμοστών (όπως αυτή της μυελοειδούς πρωτεΐνης-88 (MyD-88) και η μείωση των σημάτων τους ξεκινάει από την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B και από το μονοπάτι της ιντερφερόνης [34,35].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR μεταδίδεται μέσω σύνδεσής τους με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που περιέχουν την περιοχή TIR. Με τη δέσμευση αυτή των TLR και TIR η κυτταροπλασματική περιοχή TIR αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς των πρωτεϊνών. Μετά τη σύνδεσή τους οι TLR υποβάλλονται σε διαμορφωτικές αλλαγές που απαιτούνται για την ενεργοποίησή τους από την περιοριστική περιοχή TIR των προσαρμοστικών μορίων του TLR. Υπάρχουν τέσσερα μόρια προσαρμοστών α) το μόριο MyD88, β) το TIRAP μόριο, γ) το TRIF μόριο και δ) το μόριο TRAM. Τα

MyD88 και TRIF είναι αρμόδια για την ενεργοποίηση των σημάτων που οδηγούν στην παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών [36]. Η MyD88 έχει μια δομή Toll-IL-1 (TIR). Η μεταβίβαση σήματος ξεκινά από τη στρατολόγηση του MyD88 στους TLRs μέσω TIR-TIR αντιδράσεων. Το μοντέλο περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας πλατφόρμας TIR-TIR από το διμερισμό δυο TLRs. Αυτή η πλατφόρμα στη συνέχεια επιστρατεύει την MyD88. Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί κινάσες θρεονίνης/σερίνης τις IRAK1 και IRAK4. Η IRAK1 φωσφορυλιώνεται από την IRAK4 αφού φωσφορυλιωθεί αυτή. Η φωσφορυλιωμένη IRAK1 φωσφορυλιώνει με τη σειρά της την TRAF-6. Η φωσφορυλίωση της TRAF-6 οδηγεί στην ουμπικινοποίηση της κινάσης TAK-1. Η TAK-1 ενεργοποιεί το σύμπλεγμα της NF-κΒ και έχουμε σαν τελικό αποτέλεσμα τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που ρυθμίζουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Το TIRAP μόριο (TIR domain-containing adaptor protein) εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω TLR-2 και TLR-4. Η μόνη λειτουργία του TIRAP μορίου είναι η στρατολόγηση του MyD88 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το TRIF μόριο (TIR –relates adaptor protein including interferon) στρατολογείται από τους TLR-3 και TLR-4 υποδοχείς. Τέλος, το TRAM μόριο (Trif-related adaptor protein molecule) δρα μόνο με τον TLR-4 [37,38,39]. Είναι στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με τον TRIF. Οι TLRs και ο IL-IR υποδοχέας έχουν κοινό μονοπάτι διαβίβασης των σημάτων τους. Η υποκίνησή τους προέρχεται από τους συνδέσμους τους στην TIR περιοχή που περιέχει τους προσαρμοστές MyD88 και TIRAP στον υποδοχέα.



Εικόνα 3..Σηματοδοτικό μονοπάτι TLRs υποδοχέων

### 1.6.3 Αρνητική ρύθμιση έκφρασης και λειτουργίας των TLR

Η ρύθμιση της σηματοδότησης των TLRs ασκείται σε διάφορα επίπεδα. Έχουν αναγνωριστεί αρκετοί αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού των TLR, μεταξύ των οποίων ανταγωνιστές των υποδοχέων, προϊόντα που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των προσαρμογέων ή και άλλων πρωτεϊνών, λιγάσες ουμπικουιλίνης, microRNAs και ρυθμιστές της μεταγραφής [40]. Οι μηχανισμοί αρνητικής ρύθμισης συμβάλλουν στη διατήρηση συνεχούς ισορροπίας μεταξύ της ενεργοποίησης και της καταστολής των ανοσολογικών αποκρίσεων διότι αν παραμείνουν ανεξέλεγκτες, ο ξενιστής θα καταπονηθεί από την ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Η αρνητική ρύθμιση επιτυγχάνεται από τους TLR-2 και TLR-4 οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά εμποδίζοντας την άμεση αλληλεπίδραση των TLRs με τους βακτηριακής προέλευσης συνδέτες τους [41]. Αφού γίνει η αλληλεπίδραση του TLR με τον συνδέτη του, η μεταγωγή μηνυμάτων ελέγχεται από ενδοκυττάριους και διαμεμβρανικούς αναστολείς των μορίων-προσαρμογέων, που

υπερεκφράζονται κατά τη λοίμωξη και εξασθενούν τη TLR απόκριση μέσω αρνητικών σημάτων. Η ελάττωση του αριθμού των TLRs, που γίνεται με μείωση της μεταγραφής ή της μετάφρασης των TLR γονιδίων και η αποικοδόμηση των TLR πρωτεϊνών, μπορεί επίσης να ρυθμίσει αρνητικά την έκφρασή τους [42].

## **1.7 ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ ανάπτυξης λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος όπως οστεομυελίτιδας και σηπτικής αρθρίτιδας με την παρουσία του πολυμορφισμού R753Q στον υποδοχέα TLR2.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Απομόνωση DNA.**

#### **2.1.1 Εισαγωγή**

Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της ανάπτυξης λοιμώξεων του μυοσκελετικού όπως οστεομυελίτιδας και σηπτικής αρθρίτιδας με την παρουσία του πολυμορφισμού R753Q του υποδοχέα TLR-2.

Στη μελέτη συμμετείχαν 215 άτομα, από τα οποία οι 105 ανέπτυξαν σηπτική αρθρίτιδα ή οστεομυελίτιδα αφού υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ενώ οι υπόλοιποι 110 δεν ανέπτυξαν λοίμωξη και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου της μελέτης. Από όλα τα άτομα έγινε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής για την απομόνωση του DNA γίνεται με βάση κάποιων παραμέτρων οι οποίοι είναι, η ποσότητα του DNA, το μοριακό βάρος και το μέγεθος του DNA, η καθαρότητά του, ο διαθέσιμος χρόνος, η ευκολία της τεχνικής ή της μεθόδου απομόνωσης του DNA και το κόστος της απομόνωσης. Κάθε μέθοδος ξεκινά με κυτταρική λύση, ελευθέρωση του DNA μετά από σπάσιμο των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και διαχωρισμός του από άλλα μακρομόρια. Ακολουθεί αποπρωτεϊνοποίηση του DNA με αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η πρωτεΐναση K. Στη συνέχεια γίνεται είτε

κατακρήμνιση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών με κεκορεσμένα διαλύματα αλάτων και παραλαβή του διαλύματος νουκλεϊκού οξέος από το υπερκείμενο, είτε απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα διαλύματα νουκλεϊκών οξέων με διαδοχικές εκχυλίσσεις με οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και η φαινόλη.

### **2.1.2 Πειραματικό Μέρος**

#### **Απομόνωση DNA**

1. Σε καθένα από τα eppendorfs του 1,5 ml τοποθετείται 200 μl περιφερικό αίμα.
2. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200 μl Binding buffer το οποίο σπάει τις μεμβράνες των κυττάρων.
3. Τοποθέτηση 40 μl πρωτεϊνάση K σε κάθε eppendorf και ανακίνηση.
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 70°C για 10 min.
5. Spin στα δείγματα.
6. Προσθήκη σε καθένα 100 μl ισοπροπανόλη, η οποία βοηθάει στη συγκέντρωση του DNA.
7. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά του μείγματος σε High Pure filter tube και φυγοκέντρωση για 1 min στις 8.000 στροφές, στους 24°C . Τοποθέτηση του φίλτρου σε καθαρό tube.
8. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 500 μl inhibitor removal buffer και φυγοκέντρωση για 1 min στις 8.000 στροφές, στους 24°C . Τοποθέτηση του φίλτρου σε καθαρό tube.
9. Προσθήκη 500 μl wash buffer και φυγοκέντρωση για 1 min στις 8.000 στροφές στους 24°C
10. Επανάληψη του βήματος 9, ξανά πλύση και φυγοκέντρωση.
11. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό eppendorf. Προσθήκη 200 μl elution buffer και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 1 min στις 8.000 στροφές στους 24°C . Έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης του DNA.

## **2.2 Ηλεκτροφόρηση**

### **2.2.1 Εισαγωγή**

Η ηλεκτροφόρηση είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση, το διαχωρισμό και τον καθαρισμό των τμημάτων DNA. Μπορεί να γίνει μέσω δυο πηκτωμάτων, πολυακρυλαμίδης και αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει τμήματα DNA τα οποία δεν μπορούν να διαχωρισθούν καλά με άλλες τεχνικές, όπως π.χ. με φυγοκέντρηση σε κλίσεις πυκνότητας. Η θέση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα μετά από χρώση με μικρές συγκεντρώσεις βρωμιούχου αιθιδίου. Τα πηκτώματα αυτά μπορούν να φτιαχτούν σε διαφορετικά σχήματα, μεγέθη και συγκεντρώσεις και μπορούν επίσης να ηλεκτροφορηθούν σε διαφορετικές διαμορφώσεις. Η επιλογή ανάμεσα στις παραμέτρους εξαρτάται αρχικά από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορούνται κάθετα σε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Η διαχωριστική ικανότητά τους είναι εξαιρετικά υψηλή και μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA που διαφέρουν σε μέγεθος κατά 1 βάση. Το μειονέκτημά τους είναι ότι η παρασκευή τους είναι πιο δύσκολη σε σχέση με αυτή της αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα από αυτή της πολυακρυλαμίδης αλλά μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού. Τα πηκτώματα αγαρόζης ηλεκτροφορούνται οριζόντια σε σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης ηλεκτρικό πεδίο.

Τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται διαλύοντας την αγαρόζη στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρις ότου το διάλυμα γίνει εντελώς διαυγές. Το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή όπου και πήζει. Όταν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του πηκτώματος, το DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κατευθύνεται προς την άνοδο. Ο ρυθμός κινητικότητας το DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από 4 παραμέτρους οι οποίοι είναι: η συγκέντρωση της αγαρόζης, το μέγεθος του DNA, η ένταση του ρεύματος και η στερεοδιάταξη του DNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα αγαρόζης.

### **2.2.2 Πειραματικό Μέρος**

#### **Παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης**

Σε κωνική φιάλη γίνεται προσθήκη 1,5 gr αγαρόζης και 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος (1\* TBE ). Θέρμανση του διαλύματος μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη.

1. Προσθήκη 8 ml βρωμιούχο αιθίδιο.
2. Τοποθέτηση κάθετα στην κατάλληλη θέση τη “χτένα” που θα δημιουργήσει θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη στη συσκευή αγαρόζης.
3. Αφού πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται προσεκτικά η “χτένα” και το πηκτώμα είναι έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση.
4. Βύθιση του πηκτώματος αγαρόζης μέσα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (1\* TBE).
5. Προσθήκη σε κάθε δείγμα 5 μl χρωστική.
6. Ρύθμιση της έντασης του ρεύματος στα 150 volts και ηλεκτροφόρηση για περίπου 20 min.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός, γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος.

### **2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού**

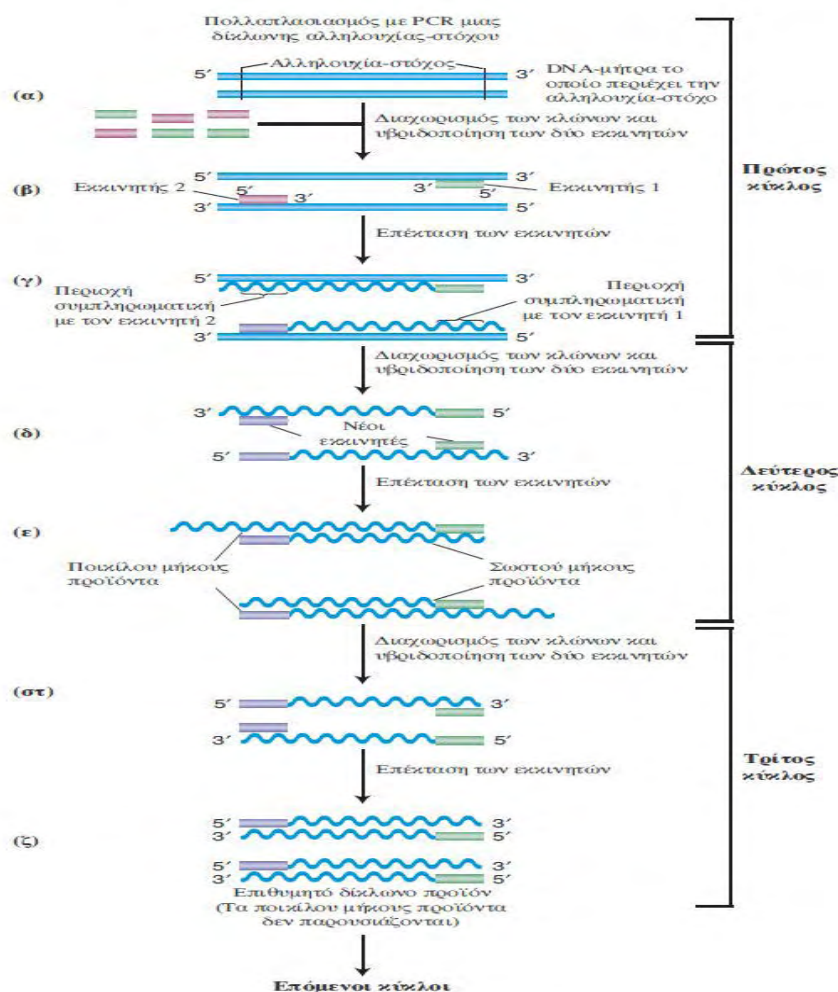
#### **2.3.1.Εισαγωγή**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) μας επιτρέπει να πολλαπλασιάσουμε εκθετικά αλληλουχίες DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: 1. Αποδιάταξη της μήτρας DNA 2. Πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. 3. Επιμήκυνση των εκκινητών – σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3'. Η αρχή της μεθόδου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1971 από τον Ghobind Khorana και τους συνεργάτες του [ 43]. Δεκαπέντε χρόνια αργότερα στα μέσα της δεκαετίας του 1980, ανακαλύφθηκε εκ νέου, από τον Kary Mullis [44]. Η PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και



αριστερά από δύο εκκινητές. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του εκμαγείου DNA, που λαμβάνει χώρα στους 94-96°C για 20 έως 60 sec.
2. Σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες, στους 37-65°C για 20 έως 60 sec.
3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3', όπου λαμβάνει χώρα στους 72°C για 0,5 έως 2 min.



**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση των πρώτων κύκλων της αντίδρασης PCR. Τυπικά η αποδιάταξη (ο διαχωρισμός κλώνων) του DNA-στόχου γίνεται στους 94°C ενώ η επέκταση των εκκινητών από την DNA-πολυμεράση στους 72°C. Τα σωστά δίκλωνα προϊόντα προκύπτουν για πρώτη φορά κατά τον τρίτο κύκλο της αντίδρασης και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με εκθετικό ρυθμό. Ο πολλαπλασιασμός των προϊόντων είναι εκθετικός, επειδή τα προϊόντα που συντίθενται σε κάθε κύκλο, χρησιμοποιούνται ως αντιδρώντα στους επόμενους κύκλους. Σε μια αντίδραση PCR τυπικά πραγματοποιούνται 30-35 κύκλοι.

Η αντίδραση πολυμερισμού περιλαμβάνει:

- Εκμαγείο DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα
- $MgCl_2$ , το οποίο κάνει ειδική τη σύνδεση των εκκινητών
- Εκκινητές
- Δεοξυνουκλεοτίδια
- DNA πολυμεράση

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμούς κυκλοποιητές που ανταλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Παράμετροι που παίζουν ρόλο για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού είναι: η εκλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου βοηθά στην ειδικότητα της αντίδρασης, η συγκέντρωση των εκκινητών να είναι αρκετά υψηλή ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται γρήγορα και να είναι και γρηγορότερη από την επανασύνδεση εκμαγείου –εκμαγείου. Ακόμη, θα πρέπει η συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του ενζύμου ώστε να εμποδίζεται η λάθος πρόσδεση των νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Τέλος, η ειδικότητα και η απόδοση της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, αφού χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης. Τα πλεονεκτήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι ότι α) η αντίδραση μπορεί να γίνει με

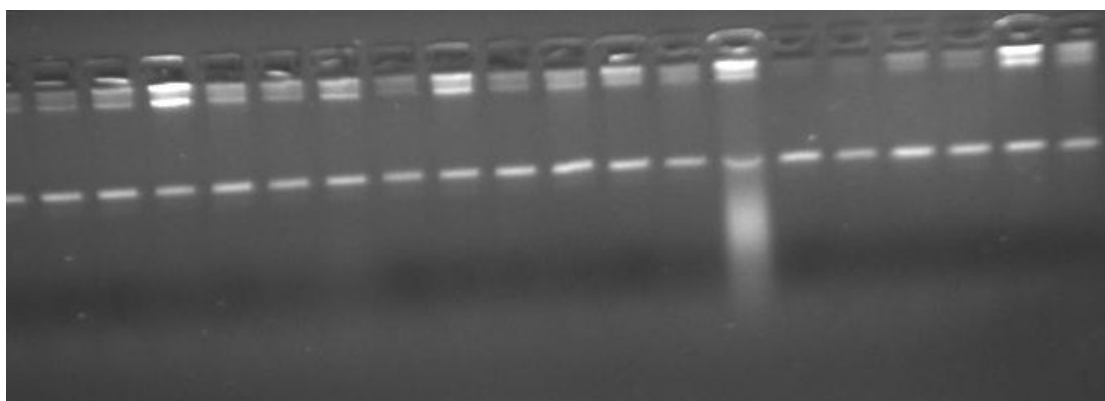
ελάχιστη, ακόμη και κακής ποιότητας DNA και β) παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA.

### 2.3.2 Πειραματικό Μέρος

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού R753Q του TLR-2 υποδοχέα δημιουργήσαμε σε ένα erppendorf το παρακάτω mix PCR.

1. Τοποθέτηση 2.5μl 10\*Std Reaction Buffer
2. Προσθήκη 0,5 μl dNTPs
3. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,5 μl LonM primer F
4. Προσθήκη 0,5 μl LonM primer R
5. Τοποθέτηση 0,125 μl Taq πολυμεράση
6. Τέλος, γίνεται προσθήκη 15,875 μl H<sub>2</sub>O και 5μl DNA.

Στη συνέχεια τοποθετούνται τα δείγματα στο μηχάνημα PCR για 1h, στους 60 °C όπου και συντίθεται ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός τμήματος DNA. Μετά τη 1h και αφού έγινε η αντιγραφή του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και η προσθήκη των δειγμάτων γίνεται η παρατήρηση στο υπεριώδες φως για να διαπιστωθεί η ύπαρξη PCR προϊόντος.



**Εικόνα 4.** Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός παρατηρήθηκε η παραπάνω εικόνα, η οποία αποδεικνύει ότι έγινε απομόνωση DNA και ότι υπάρχει PCR προϊόν καθώς παρατηρείται μια ζώνη στα 430 bp.

## **2.4. Κατάτμηση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.**

### **2.4.1 Εισαγωγή**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία παράγονται από βακτήρια, με φυσιολογικό ρόλο την προστασία του βακτηρίου από ξένο DNA. Κόβουν το ξένο DNA, και όχι το δικό τους προστατεύοντας το βακτήριο από μόλυνση. Η απομόνωση των συγκεκριμένων ενζύμων, τα οποία καλούνται και "μοριακά ψαλίδια", έδωσε τη δυνατότητα να κόβουμε το γενετικό υλικό οποιουδήποτε οργανισμού *in vitro*. Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε είναι προεξέχοντα είτε όχι. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες επιτρέπουν α) τη χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης ενός ή πολλών ενζύμων και β) τη δυνατότητα σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα. Κάθε ένζυμο έχει διαφορετικές συνθήκες όπου δρα. Έχουν διαφορετική θερμοκρασία επώασης, διαφορετικό χρόνο επώασης και διαφορετική σύσταση του διαλύματος επώασης. Τα ένζυμα αυτά φυλάσσονται στους -20 μέσα σε διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη.

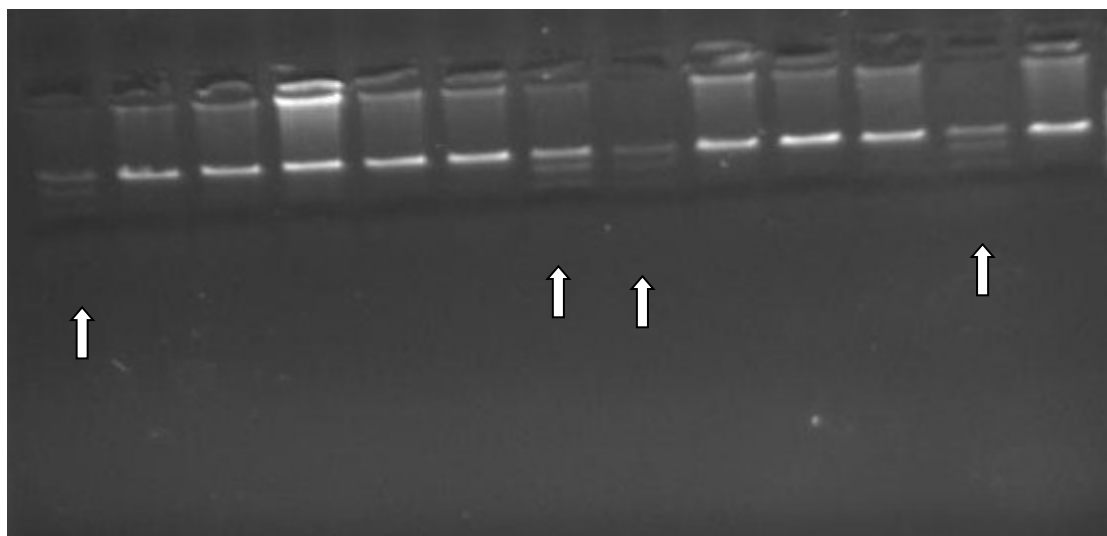
### **2.4.2 Πειραματικό Μέρος**

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο SfcI. Αρχικά φτιάξαμε το mix για την πέψη χρησιμοποιώντας τα παρακάτω υλικά:

1. 7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
2. 2  $\mu$ l Tango Buffer
3. 0,5 SfcI ένζυμο.

Τέλος, γίνεται προσθήκη 15  $\mu$ l PCR προϊόν και επώαση στους 37°C για 12h. Αφού τελειώσει αυτή η διαδικασία γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% βαμμένη με βρωμιούχο αιθίδιο και προσθέτοντας 5  $\mu$ l χρωστική σε κάθε eppendorf και ladder έτσι ώστε να μπορέσουν να ταυτοποιηθούν οι ζώνες που θα παρατηρηθούν. Μετά την ηλεκτροφόρηση, με βάση τις ζώνες ταυτοποιούνται οι 3 γονότυποι: όταν ο πολυμορφισμός απουσιάζει ανιχνεύεται μόνο μια ζώνη προϊόντος PCR μεγέθους 430 bp. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται τρεις ζώνες προϊόντος,

μια 430 bp, μια 307 bp και μια 123 bp ενώ στους ομοζυγώτες ανιχνεύονται δυο ζώνες προϊόντος, η μια 307 bp και η άλλη 123 bp.



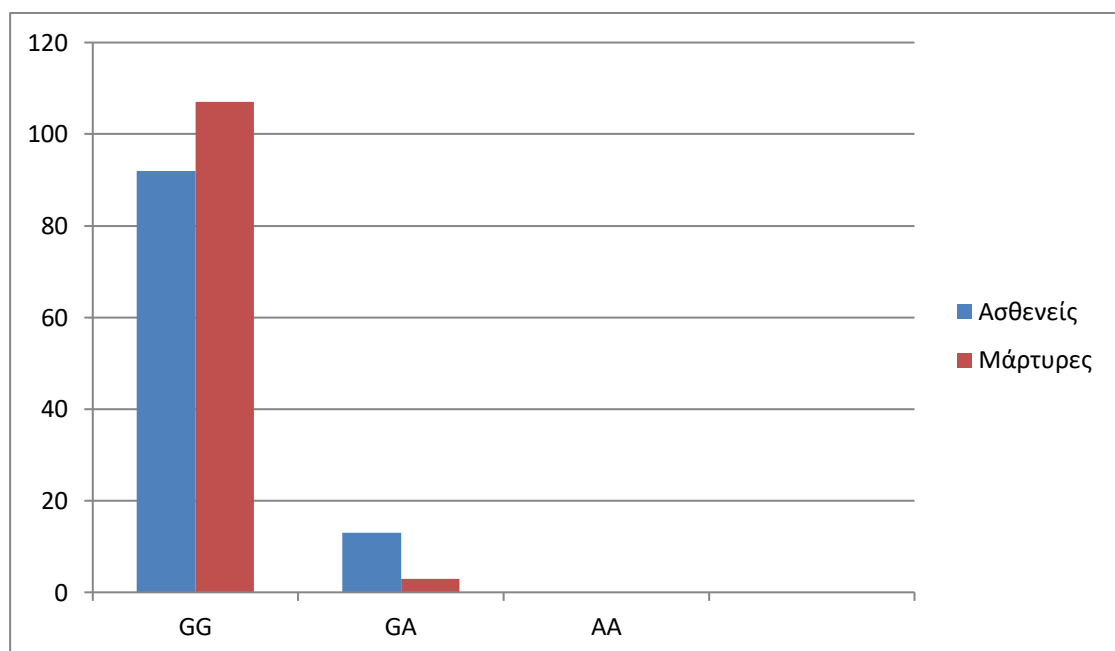
**Εικόνα 5.** Με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων έχει μια ζώνη στα 430 bp, άρα σε αυτούς τους ασθενείς απουσιάζει ο πολυμορφισμός, έχουν το “wild type” αλληλόμορφο και είναι φυσιολογικοί. Ενώ σε έξι από αυτούς παρατηρήθηκαν 3 ζώνες, μια στα 430 bp, μια στα 307 bp και μια στα 123 bp που σημαίνει ότι οι εμφανίζεται ο πολυμορφισμός στους παραπάνω ασθενείς, άρα είναι ετεροζυγώτες.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το τεστ  $\chi^2$  του προγράμματος SPSS. Οι τιμές του παράγοντα P οι οποίες ήταν μικρότερες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Τα δεδομένα προήλθαν από 105 ασθενείς και από 110 μάρτυρες οι οποίοι δεν ανέπτυξαν τη νόσο και ήταν η ομάδα ελέγχου της μελέτης. Το P value ισούται με 0,007 είναι μικρότερο του 0,05 άρα είναι στατιστικώς σημαντικό και το διάστημα εμπιστοσύνης ισούται με 5,040. Ασθενείς με γονότυπο GG ήταν 92, ενώ με γονότυπο GA ήταν 13. Από τους μάρτυρες είχαν γονότυπο GG 107 άτομα ενώ GA μόνο 3. Καμία από τις 2 ομάδες δεν παρουσίασε γονότυπο AA.

| SNP    | Γονότυποι | Ασθενείς<br>(n=105) | Μάρτυρες<br>(n=110) | P value | OR (95% CI)          |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|---------|----------------------|
| rs753q | GG        | 92                  | 107                 | 0,007   | 5,040 (1,393-18,235) |
|        | GA        | 13                  | 3                   |         |                      |
|        | AA        | 0                   | 0                   |         |                      |

**Πίνακας 1.** Κατανομή γονοτύπων σε σχέση με τους ασθενείς και τους μάρτυρες.

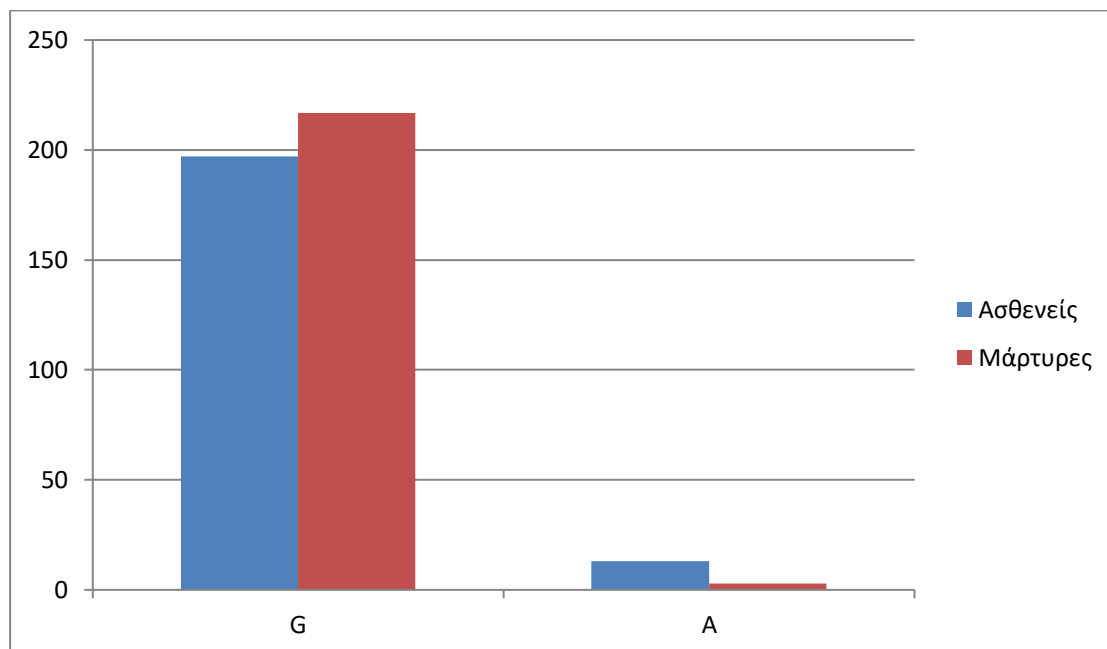


**Γράφημα 1.** Κατανομή γονοτύπων σε σχέση με τους ασθενείς και τους μάρτυρες.

Το σύνολο των αλληλομόρφων στους ασθενείς είναι 210 ενώ στους μάρτυρες το σύνολο των αλληλομόρφων είναι 220. Το Pvalue ισούται με 0,008, είναι μικρότερο του 0, 05 άρα είναι στατιστικώς σημαντικό και το διάστημα εμπιστοσύνης ισούται με 4,751. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο G (γουανίνη) εμφανίζεται 197 φορές ενώ το A (αδενίνη) 13 φορές. Ενώ στους μάρτυρες το ελληνόμορφο G (γουανίνη) εμφανίζεται 217 φορές ενώ το αλληλόμορφο A (αδενίνη) μόνο 3 φορές.

| SNP    | Αλληλόμορφα | Ασθενείς<br>(n=210) | Μάρτυρες<br>(n=220) | P value | OR(95% CI)           |
|--------|-------------|---------------------|---------------------|---------|----------------------|
| rs753q | G           | 197                 | 217                 | 0,008   | 4,751 (1,334-16,921) |
|        | A           | 13                  | 3                   |         |                      |

**Πίνακας 2.** Κατανομή αλληλομόρφων σε σχέση με τους ασθενείς και τους μάρτυρες.



**Γράφημα 2.** Κατανομή αλληλομόρφων σε σχέση με τους ασθενείς και τους μάρτυρες.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο TLR-2 αποτελεί μέλος μιας οικογένειας υποδοχέων αναγνώρισης κυτταρικών συστατικών παθογόνων παραγόντων [45] που εκφράζονται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων και αναγνωρίζει πεπτιδογλυκάνες, λιποπεπτίδια από Gram- θετικά βακτήρια και γλυκοπρωτεΐνες [46,47]. Η αναγνώριση των γλυκοπρωτεϊνών μέσω του

TLR-2 ξεκινά με μια σειρά ενδοκυτταρικών γεγονότων σηματοδότησης που προκαλούνται από την MyD88 πρωτεΐνη προσαρμογέα και του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής NF-Κβ, με αποκορύφωμα την απελευθέρωση των αντικών πεπτιδίων, τις χημειοκίνες και τις κυτοκίνες οι οποίες διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση [48,49,50]. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται σε αυτή την κλινική μελέτη υποδεικνύουν τη σημασία του μονοπατιού σηματοδότησης TLR-2 στην παθογένεια και τον έλεγχο στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος στον άνθρωπο.

Ο TLR-2 υποδοχέας κωδικοποιείται από το γονίδιο TLR-2 το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4q32 [51,52]. Στο γονίδιο TLR-2 έχει αναφερθεί ότι περιέχονται πλέον 89 SNPs και ο πολυμορφισμός R753Q έχει διερευνηθεί περισσότερο λόγω του επιπολασμού του στον πληθυσμό [48,53,54]. Ανάλογα με τη μελέτη, η συχνότητα του αλληλόμορφου R753Q έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 2,7% έως 12% [48,53-59]. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός R753Q μειώνει την ικανότητα του TLR-2 να ανιχνεύει στις συνδέσεις της πεπτιδογλυκάνης με λιποπεπτίδια [57,58,59]. Μια λειτουργική παραλλαγή στο γονίδιο TLR2 είναι η αντικατάσταση του κωδικονίου έναρξης στο νουκλεοτίδιο 2257 όπου η γλουταμίνη αντικαθιστά την αργινίνη στην θέση 753. Αυτός ο πολυμορφισμός βρέθηκε στο 3% των υγιών ατόμων, της ομάδας ελέγχου λευκής φυλής στο C-τερματικό άκρο του TLR2 γονιδίου [60]. Η συγκεκριμένη παραλλαγή είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη κυτταρική ενεργοποίηση απόκρισης λιποπρωτεϊνών, και αυτός ο πολυμορφισμός ήταν παρόν σε ασθενείς με θετικά Gram βακτήρια [60]. Σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι η συχνότητα του TLR2 R753Q πολυμορφισμού ήταν 4,7 % σε έναν Τούρκικο πληθυσμό (1,7% ομόζυγοι φορείς και 6% ετερόζυγοι φορείς), γεγονός που υποδηλώνει τις διαφορές των εθνοτήτων στη συχνότητα των αλληλομόρφων καθώς και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης φυματίωσης. Οι πολυμορφισμοί του TLR2 γονιδίου μπορεί να μας βοηθήσουν στην κατανόηση φυσιολογικού και μη φυσιολογικού έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος ελέγχοντας ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών.

Διάφοροι πολυμορφισμοί των γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και των TLR SNPs μελετώνται εκτενώς για την σχέση τους με μολυσματικές ασθένειες, δεδομένου ότι στα γονίδια που κωδικοποιούνται από πρωτεΐνες που έρχονται σε επαφή με τον ξενιστή και το περιβάλλον, ακόμη και μια μικρή μεταβολή αν υποστούν, θα



μπορούσε να έχει σημαντικές επιπτώσεις ζωτικής σημασίας για την άμυνα του ξενιστή ή την παθογένεια των νόσων [61].

Η μελέτη περιελάμβανε 215 άτομα, από τα οποία οι 105 ανέπτυξαν σηπτική αρθρίτιδα ή οστεομυελίτιδα αφού υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ενώ οι υπόλοιποι 110 δεν ανέπτυξαν τη νόσο και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου της μελέτης. Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι στο 98% των ασθενών που ανέπτυξαν τη λοίμωξη, ο αιτιολογικός παράγοντας των βακτηρίων που απομονώθηκε ήταν ο *S. aureus*, και ότι ο πολυμορφισμός R753Q στον TLR-2 υποδοχέα είναι στατιστικώς σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων (πασχόντων και φυσιολογικών) για να επιβεβαιώσουν τη σύνδεση του TLR2 (R753Q) πολυμορφισμού με την οστεομυελίτιδα και τη σηπτική αρθρίτιδα και να καθοριστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει την παθογένεια των μολύνσεων των οστών.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Herwaldt LA, Cullen JJ, Scholz, French P, Zimmerman MB, Pfaller MA, et al. A prospective study of outcomes, healthcare resource utilization, and costs associated with postoperative nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:1291-8. [\[PubMed\]](#)
2. Whitehouse JD, Friedman ND, Kirkland KB, Richardson WJ, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital : adverse quality of life, excess length of stay and extra cost. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23:183-189. [\[PubMed\]](#)

3. Coello R, Charlett A, Wilson J, Ward V, Pearson A, Borriello P. Adverse impact of surgical site infections in English hospitals. *J Hosp Infect* 2005; 60:93-103. [\[PubMed\]](#)
4. Olsen MA, Chu-Onsakul S, Brandt KE, Dietz JR, Mayfield J, Fraser VJ. Hospital-associated costs due to surgical site infection after breast surgery. *Archives of Surgery*. 2008;143(1):53–60. [\[PubMed\]](#)
5. Cheong HW, Peh WC, Guglielmi G. Imaging of diseases of the axial and peripheral skeleton. *Radiol Clin North Am*. 2008;46:703–33. vi. [\[PubMed\]](#)
6. Turecki MB, Taljanovic MS, Stubbs AY, Graham AR, Holden DA, Hunter TB, et al. Imaging of musculoskeletal soft tissue infections. *Skeletal Radiol*. 2010;39:957–71. [\[PubMed\]](#)
7. Turpin S, Lambert R. Role of scintigraphy in musculoskeletal and spinal infections. *Radiol Clin North Am*. 2001;39:169–89. [\[PubMed\]](#)
8. Rojczyk, M. Results of the Treatment of Open Fractures, Aspects of Antibiotic Therapy. In: H. Tscherne and L. Gotzen, *Fractures with Soft Tissue Injuries*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1984, pp.33-38. [\[PubMed\]](#)
9. Gristina, A., G., Naylor, P. T. and Myrcik, Q., N. Mechanics Of Musculoskeletal Sepsis. *Orthop. Cl. North Am*. 22(3): 363-371, 1991. [\[PubMed\]](#)
10. Horan TC, White JW, Jarvis WR, et al: Nosocomial infection surveillance, 1984 MMWR 1986; 35 :17SS-29SS. [\[PubMed\]](#)
11. Preheim LC, Rimbland D, Bittner MJ: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Veterans Administration Medical Centers. *Infect control* 1987 May; 8(5): 191-4. [\[PubMed\]](#)
12. Wakefield DS, Pfaller M, Assanari RM, et al: Variation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* occurrence by geographic location and hospital characteristics. *Infect control* 1987 Apr; 8(4): 151-7. [\[PubMed\]](#)
13. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR and the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20:247-278. [\[PubMed\]](#)
14. Kabak S, Halici M, Akcakus M, Cetin N, Narin N. Septic arthritis in patients followed-up in neonatal intensive care unit. *Pediatr Int*. 2002;44(6):652–657. [\[PubMed\]](#)
15. Oblatz BE. Acute suppurative arthritis of the hip in the neonatal period. *J Bone Joint Surg Am*. 1960;42(1):23–30. [\[PubMed\]](#)
16. Al Saadi MM, Al Zamil FA, Bokhary NA, Al Shamsan LA, Al Alola SA, Al Eissa YS. Acute septic arthritis in children. *Pediatr Int*. 2009;51(3):377–380. [\[PubMed\]](#)

17. Choi IH, Pizzutillo PD, Bowen JR, Dragann R, Malhis T. Sequelae and reconstruction after septic arthritis of the hip in infants. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72(8):1150–1165. [\[PubMed\]](#)
18. Howard JB, Highgenboten CL, Nelson JD. Residual effects of septic arthritis in infancy and childhood. *JAMA.* 1976;236(8):932–935. [\[PubMed\]](#)
19. Morrey BF, Bianco AJ, Rhodes KH. Suppurative arthritis of the hip in children. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58(3):388–392. [\[PubMed\]](#)
20. Burke WV, Zych GA. Fungal infection following replacement of the anterior cruciate ligament: a case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):449–53. [\[PubMed\]](#)
21. Frank M, Schmucker U, David S, Matthes G, Ekkernkamp A, Seifert J. Devastating femoral osteomyelitis after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008;16(1):71–4 [\[PubMed\]](#)
22. Sun L, Zhang L, Wang K, Wang W, Tian M. Fungal osteomyelitis after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a case report with review of the literature. *Knee.* 2012;19(5):728–31. [\[PubMed\]](#)
23. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:330–9. [\[PubMed\]](#)
24. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801. [\[PubMed\]](#)
25. Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, Joosten LA, van Riel PL, van den Berg WB. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum.* 2004;50:999–1001. [\[PubMed\]](#)
26. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 7):403-7. [FREE Full Text](#)
27. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68:6398-401. [\[PubMed\]](#)
28. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 2002; 186:798-806. [\[PubMed\]](#)
29. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000; 165:5392-5396. [\[PubMed\]](#)

30. Krawczak M., Ball E. V., Fenton I., Stenson P. D., Abeyasinghe S., Thomas N., Cooper D. N. (2000) Human gene mutation database: a biomedical information and research resource. *Hum. Mutat.* 15, 45–51 [[PubMed](#)]
31. Kawagoe T., Sato S., Matsushita K., Kato H., Matsui K., Kumagai Y., Saitoh T., Kawai T., Takeuchi O., Akira S. (2008) Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691 [[PubMed](#)]
32. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 7):408-15. [[PubMed](#)]
33. Hayden M. S., Ghosh S. (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132, 344–362 [[PubMed](#)]
34. Karin M., Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663 [[PubMed](#)]
35. Hayden M. S., Ghosh S. (2004) Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* 18, 2195–2224 [[PubMed](#)]
36. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S. (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324–329 [[PubMed](#)]
37. Kawagoe T., Sato S., Matsushita K., Kato H., Matsui K., Kumagai Y., Saitoh T., Kawai T., Takeuchi O., Akira S. (2008) Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691 [[PubMed](#)]
38. Lin S. C., Lo Y. C., Wu H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–890 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
39. Pauls E., Nanda S. K., Smith H., Toth R., Arthur J. S., Cohen P. (2013) Two phases of inflammatory mediator production defined by the study of IRAK2 and IRAK1 knock-in mice. *J. Immunol.* 191, 2717–2730 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
40. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5:975-979 [[PubMed](#)]
41. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:446-458 [[PubMed](#)]
42. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2004; 5:495-502. [[PubMed](#)]
43. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of shortsynthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*,1971, 56:341–361 [[PubMed](#)]

44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230:1350–1354 [[PubMed](#)]
45. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA., Jr A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–7. [[PubMed](#)]
46. El-Helou O, Berbari EF, Brown RA, Gralewski JH, Osmon DR, Razonable RR. Functional assessment of Toll-like receptor 2 and its relevance in patients with *Staphylococcus aureus* infection of joint prosthesis. *Hum Immunol*. 2011;72:47–53. [[PubMed](#)]
47. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*. 2000;68:6398–401. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
48. Brown RA, Gralewski JH, Razonable RR. The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. *Clin Infect Dis*. 2009;49:e96–9. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
49. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*. 2006;177:7094–102. [[PubMed](#)]
50. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. 2003;77:4588–96. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
51. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*. 2000;68:6398–401. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
52. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Suppl 7):S403–7. [[PubMed](#)]
53. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1315–20. [[PubMed](#)]
54. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation*. 2007;84:511–6. [[PubMed](#)]
55. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*. 2000;68:6398–401. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

56. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis.* 2005;41(Suppl 7):S403–7. [[PubMed](#)]
57. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41(Suppl 7):S408–15. [[PubMed](#)]
58. Brown RA, Gralewski JH, Eid AJ, Knoll BM, Finberg RW, Razonable RR. R753Q single-nucleotide polymorphism impairs toll-like receptor 2 recognition of hepatitis C virus core and nonstructural 3 proteins. *Transplantation.* 2010;89:811–5. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
59. Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med.* 2003;81:368–72. [[PubMed](#)]
60. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68:6398-401 [[PubMed](#)]
61. Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev.* 2002;190:9–25. [[PubMed](#)]