

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-1 ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΑΚΙΝΡΑ
ΒΕΛΤΙΩΝΕΙ ΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ ΚΑΙ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ
ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS
ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΟ ΠΜΣ ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΚΑΤΣΕΛΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΑΜ: 1002-1

ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΔΡΕΑΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΒΑΛΣΑΜΗ ΓΕΩΡΓΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΑΡΚΑΝΤΩΝΗ- ΚΥΡΟΥΔΗ ΣΟΦΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κυρία Μαρκαντώνη- Κυρούδη Σοφία, υπεύθυνη του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Κλινική Φαρμακευτική» και μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας εργασίας, που με επέλεξε να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και για την παρακολούθηση της παρούσας εργασίας και την Επίκουρη Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας κυρία Βαλσαμή Γεωργία, για την παρακολούθηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια της Φαρμακευτικής Σχολής κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με τον ερευνητικό τομέα, ο οποίος πριν από την εκπόνηση της παρούσας εργασίας ήταν για εμένα ακόμα άγνωστος. Οι γνώσεις, ο ενθουσιασμός και το ήθος της κυρίας Ανδρεάδου υπήρξαν αρωγοί στην εκπόνηση της εργασίας αυτής, αφού η συνεχής παρακολούθηση και οι πολύτιμες συμβουλές της, τόσο στο γενικό όσο και στο ειδικό μέρος, υπήρξαν καταλυτικός παράγοντας στην υλοποίηση της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου, η οποία πάντα στήριζε και συνεχίζει να στηρίζει τις επιλογές μου, σε όλους τους τομείς της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) επάγει την αθηρογένεση. Το anakinra, ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων της IL-1, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (PA) και έχει ευνοϊκά αποτελέσματα στη μείωση του νιτροξειδωτικού stress, της CRP, της IL-6, της ενδοθηλίνης-1, και βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ακόμα η χορήγηση του anakinra σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα μειώνει τους δείκτες απόπτωσης (Fas, Fas Ligand, TNF- α , IL-1 β και κασπάση-9) και βελτιώνει τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Μελετάμε τις επιδράσεις του anakinra στην ενδοθηλιακή, στη στεφανιαία και στην αορτική λειτουργία σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και PA.

Σαράντα ασθενείς με χρόνια καρδιαγγειακή νόσο και ρευματοειδή αρθρίτιδα τυχαιοποιήθηκαν ώστε να λάβουν μία δόση anakinra (100mg s.c.) ή placebo και μετά από 48 ώρες να λάβουν την εναλλακτική θεραπεία σε μία διπλή τυφλή μελέτη. Ως ομάδα ελέγχου ορίστηκαν άλλοι 23 εθελοντές με παρόμοιους παράγοντες κινδύνου. Κατά την έναρξη της θεραπείας και 3 ώρες μετά εκτιμήσαμε τη στεφανιαία εφεδρεία ροής (CFR), την εκτασιμότητα της αορτής (AS), την αγγειοδιαστολή βραχιόνιου αρτηρίας (FMD), τους δείκτες απόπτωσης Fas, Fas ligand, IL-1 β , TNF- α , και τους δείκτες νιτροξειδωτικού stress νιτροτυροσίνη και πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Οι ασθενείς είχαν μειωμένα FMD, CFR και AS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Κατά την γραμμή βάσης υπήρξε συσχέτιση της νιτροτυροσίνης με την AS και την FMD και του Fas και του FasL με τον CFR. Μετά από θεραπεία 3 ωρών με το anakinra υπήρξε βελτίωση των FMD, CFR και AS σε σχέση με το placebo, προσεγγίζοντας τιμές όμοιες με αυτές της ομάδας ελέγχου (FMD: $5,1 \pm 2,3\%$, έναντι $13,9 \pm 3,5\%$ έναντι $8,1 \pm 3,6\%$, $p=0,006$, CFR: $2,1 \pm 0,7$ έναντι $3,0 \pm 1,1$ έναντι $3,4 \pm 0,7$, $p<0,001$, AS: $4,4 \pm 2,3\%$ έναντι $9,6 \pm 3,6\%$ έναντι $8,0 \pm 2,8\%$, $p=0,003$). Επιπλέον υπήρξε σημαντική μείωση των επιπέδων της νιτροτυροσίνης (median $6,66$ έναντι $6,15$ nM/L), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($0,131$ έναντι $0,091$ nmol/mg protein), του Fas ($51,8$ έναντι $49,3$ pg/ml) και FasL ($47,6$ έναντι $40,95$ pg/ml), ενώ υπήρξε μη στατιστικά σημαντική αύξηση του TNF- α ($1,06$ έναντι $1,24$ pg/ml) και της IL-1 β ($3,19$ έναντι $3,83$ pg/ml), 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra.

Η αναστολή της IL-1 βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία και επακόλουθα τη στεφανιαία και αορτική λειτουργία, πιθανώς μέσω της μείωσης του νιτροξειδωτικού stress και της απόπτωσης.

Background: Interleukin-1 mediates atherogenesis and coronary vasoreactivity. Anakinra, a human recombinant interleukin-1a receptor antagonist, is used for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) and shows favourable effects on endothelial and arterial function in RA patients. We investigated the effects of anakinra on coronary endothelial and arterial function in CAD patients with coexistent RA.

Methods: Forty patients with chronic CAD and RA (ejection fraction: $56,3 \pm 16,4\%$) were randomized to receive a single injection of anakinra (100mg s.c.) or placebo and after 48 hours the alternative treatment in a double-blind trial. 23 age and sex matched subjects with similar risk factors served as controls. At baseline and 3 hours after treatment we assessed a) coronary flow reserve (CFR) of the LAD using Doppler echocardiography, b) aortic strain (AS), c) flow mediated endothelial-dependent dilation of the brachial artery (FMD) by ultrasonography and d) Fas, Fas ligand, TNF- α , IL-1 β , nitrotyrosine (NT) and protein carbonyls (PC) serum levels. All controls had no clinical history for CAD and a negative for ischemia treadmill exercise test.

Results: Patients had impaired FMD, CFR and AS compared to controls ($p < 0,001$). At baseline, NT was related with AS and FMD ($r = -0,401$ and $r = -0,386$), while Fas and FasL with CFR ($r = -0,450$ and $r = -0,362$) ($p < 0,05$). After 3 hours of anakinra treatment, there was an improvement in FMD, CFR and AS compared to placebo, reaching values similar to those in controls (FMD: $5,1 \pm 2,3\%$, vs. $13,9 \pm 3,5\%$ vs. $8,1 \pm 3,6\%$, $p = 0,006$, CFR: $2,1 \pm 0,7$ vs. $3,0 \pm 1,1$ vs. $3,4 \pm 0,7$, $p < 0,001$, AS: $4,4 \pm 2,3\%$ vs. $9,6 \pm 3,6\%$ vs. $8,0 \pm 2,8\%$, $p = 0,003$). Furthermore, there was a decrease in NT (median 6,66 vs. 6,15 nM/L), PC (0,131 vs. 0,091 nmol/mg protein), Fas (51,8 vs. 49,3 pg/ml) and FasL levels (47,6 vs. 40,95 pg/ml) after anakinra ($p < 0,05$). There was a non significant increase in TNF- α (1,06 vs. 1,24 pg/ml) and IL-1 β (3,19 vs. 3,83 pg/ml) levels. No significant changes were observed after placebo.

Conclusion: IL-1 inhibition improves endothelial function and consequently, coronary and aortic wall function, probably through reduction of nitro-oxidative stress and apoptosis.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	RIP: (receptor interacting protein) πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα
INF-γ: ιντερφερόνη-γ	
IL-1: ιντερλευκίνη-1	ROS: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
IL-6: ιντερλευκίνη-6	$\cdot\text{O}_2^-$: ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου
IL-10: ιντερλευκίνη-10	OH $^-$: ρίζα υδροξυλίου
IL-12: ιντερλευκίνη-12	RNS: ενεργά ενδιάμεσα αζώτου
IL-15: ιντερλευκίνη-15	NO: μονοξείδιο του αζώτου
IL-18: ιντερλευκίνη-18	ONOO $^-$: υπεροξυνιτρώδες ανιόν
IL-1Ra: ανταγωνιστής υποδοχέα ιντερλευκίνης-1	NO $_2\cdot$: διοξείδιο του αζώτου
IL-1RAcP: interleukin-1 receptor accessory protein	HNO: νιτροσυλο υδρίδιο
IL-1R1: υποδοχέας ιντερλευκίνης-1	SOD: υπεροξειδική δεσμουτάση
TNF-α: παράγοντας όγκου νέκρωσης	NOS: συνθάση του NO
TNF-R1: υποδοχέας παράγοντα όγκου νέκρωσης	nNOS: νευρωνική NOS
Fas: υποδοχέας θανάτου	iNOS: επαγόμενη NOS
FasL: δεσμεύτης του Fas	eNOS: ενδοθηλιακή NOS
TRAIL-R1: TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1	NT: νιτροτυροσίνη
DD: (Death Domain) περιοχές θανάτου	MDA: μηλονική διαλδεϋδη
DED: death effector domain	PC: πρωτεϊνικά καρβονύλια
TRADD: TNF-R1 associated DD	AS (aortic strain): Εκτασιμότητα της αορτής
FADD: Fas associated DD	CFR (coronary flow reserve): Στεφανιαία εφεδρεία ροής
DISC: (Fas Death Signaling Complex) σύμπλεγμα σηματοδοτικού θανάτου του Fas	FMD (flow mediated dilation): αγγειοδιαστολή βραχιόνιου αρτηρίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	2
ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	2
1 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΑΡΘΡΩΣΕΩΝ	3
2 ΕΞΩΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ.....	6
3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	8
4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	9
5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ	13
6 ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ.....	19
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	40
ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΣΥΝΥΠΑΡΧΟΥΣΕΣ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ	50
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS (OXIDATIVE STRESS).....	52
RNS (REACTIVE NITROGEN SPECIES).....	65
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	69
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	70
2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	71
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	87
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι η πιο κοινή συστηματική φλεγμονώδης νόσος, που χαρακτηρίζεται από συμμετρική προσβολή των αρθρώσεων. Οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις, όπως οι ρευματικοί όζοι, η αγγειίτιδα, η φλεγμονή των οφθαλμών, η νευρολογική δυσλειτουργία, η καρδιοπνευμονική νόσος, η λεμφαδενοπάθεια και η σπληνομεγαλία μπορεί να είναι επίσης εκδηλώσεις της νόσου. Παρόλο που η συνήθης πορεία της νόσου είναι χρόνια, κάποιοι ασθενείς μπαίνουν σε αυτόματη ύφεση.¹

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα εκτιμάται πως έχει επιπολασμό 1-2% και δεν έχει φυλετική διάκριση. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, με αυξανόμενο επιπολασμό έως την εβδομηκοστή δεκαετία. Η νόσος είναι 3 φορές πιο συχνή στις γυναίκες και στις ηλικίες 15-45 ετών, και γενικά οι γυναίκες υπερτερούν σε αναλογία 6:1. Η αναλογία φύλου είναι περίπου ίδια σε ασθενείς έως 10 ετών και σε μεγαλύτερους των 60 ετών.²

Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν πως μία γενετική προδιάθεση και έκθεση σε άγνωστους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να είναι απαραίτητα για την εκδήλωση της ασθένειας. Το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex molecules), που βρίσκεται στα T λεμφοκύτταρα, φαίνεται να έχει ένα σημαντικό ρόλο στους περισσότερους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί χρησιμοποιώντας το ανθρώπινο αντιγόνο λεμφοκυττάρων (HLA). Η πλειοψηφία των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν HLA-DR4, HLA-DR1 ή και τα δύο αντιγόνα στην κύρια περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας. Ασθενείς με το αντιγόνο HLA-DR4 έχουν τριάντισι φορές περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σχέση με τους ασθενείς που εκφράζουν άλλα αντιγόνα HLA-DR.⁴ Παρόλο που η κύρια περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας είναι σημαντική, δεν είναι αποκλειστικά καθοριστική, επειδή οι ασθενείς μπορεί να πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα χωρίς τους διάφορους τύπους HLA.^{5,6}

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι έξι φορές πιο συχνή σε διζυγωτικά δίδυμα και μη δίδυμα παιδιά γονέων με θετικό ρευματοειδή παράγοντα και με διαβρωτική ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε σχέση με τα παιδιά γονέων που δεν πάσχουν από την ασθένεια. Αν ένα παιδί από τα μονοζυγωτικά δίδυμα προσβληθεί, το άλλο παιδί έχει τριάντα φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξει την ασθένεια.^{5,6}

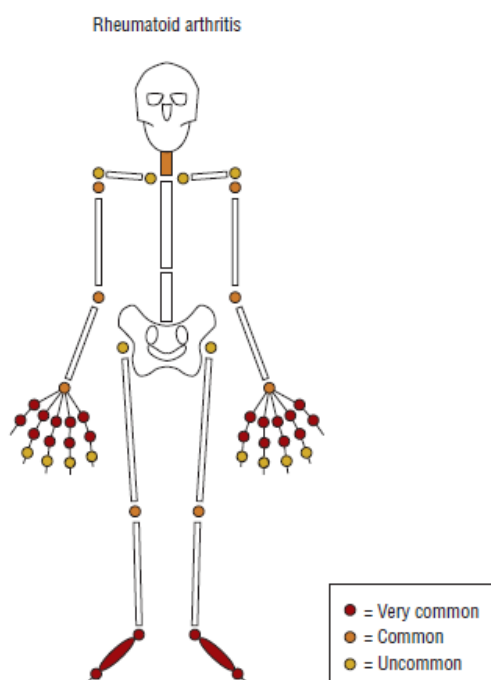
Τα συμπτώματα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας συνήθως αναπτύσσονται «αθόρυβα» κατά τη διάρκεια μερικών εβδομάδων έως μερικών μηνών. Στα πρόδρομα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται η κούραση, η αδυναμία, ο χαμηλός πυρετός (δέκατα), η απώλεια της όρεξης και πόνος στις αρθρώσεις. Η ακαμψία και οι μυαλγίες μπορεί να προηγηθούν της ανάπτυξης του οιδήματος στις αρθρώσεις και εμφανίζονται τις πρωινές ώρες και μετά υποχωρούν. Συνήθως η προσβολή των αρθρώσεων τείνει να είναι συμμετρική, παρόλα αυτά στην αρχή της νόσου κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν ένα ασύμμετρο μοτίβο, εμπλέκοντας μία ή μερικές αρθρώσεις, που στο τέλος μετατρέπεται σε μία πιο κλασσική παρουσίαση. Περίπου το 20% των ασθενών αναπτύσσει μία αιφνίδια έναρξη της νόσου με πυρετό, πολυαρθρίτιδα, και άλλα συμπτώματα όπως κατάθλιψη, άγχος, κούραση, ανορεξία και απώλεια βάρους.^{5,6}

Δεν υπάρχει κάποια μεμονωμένη εξέταση ή φυσικό εύρημα για τη διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Στην αρχή της νόσου η διάγνωση μπορεί να είναι ιδιαίτερα αμφισβητήσιμη καθώς δεν υπάρχουν ακτινολογικά ευρήματα και η εξέταση για το ρευματοειδή παράγοντα μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμη. Η διάρκεια του αρθρικού πόνου όπως και η πρωινή ακαμψία για >1 ώρα και συμμετοχή περισσότερων από 3 αρθρώσεων είναι σημαντικός δείκτης για την ανάπτυξη εμμένουσας διαβρωτικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας.⁷

1 ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΑΡΘΡΩΣΕΩΝ

Οι αρθρώσεις που προσβάλλονται πιο συχνά από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι οι μικρές αρθρώσεις των χεριών, των καρπών και των πόδων (εικόνα 1). Επιπλέον οι αρθρώσεις των αγκώνων, των ώμων, των γοφών, των γονάτων και των αστραγάλων μπορεί να εμπλέκονται. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζουν τοπική ακαμψία της άρθρωσης που είναι χειρότερη το πρωί. Η διάρκεια της δυσκαμψίας τείνει να σχετίζεται άμεσα με την δραστηριότητα της νόσου, συνήθως ξεπερνά τα 30 λεπτά και

μπορεί να εμμένει όλη την ημέρα. Η χρόνια φλεγμονή με έλλειψη ενός επαρκούς προγράμματος άθλησης οδηγεί σε απώλεια του εύρους των κινήσεων, μυϊκή ατροφία, αδυναμία και παραμόρφωση.^{1,3}



Εικόνα 1: Οι αρθρώσεις που προσβάλλονται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹

Στην εξέταση, το οίδημα στις αρθρώσεις μπορεί να είναι ορατό ή μπορεί να φαίνεται μόνο με ψηλάφηση. Το οίδημα είναι μαλακό και σπογγώδες επειδή προκαλείται από πολλαπλασιασμό των μαλακών ιστών ή από συσσώρευση υγρού μέσα στην κάψα της άρθρωσης. Η οιδηματώδης άρθρωση μπορεί να φαίνεται ερυθματώδης και να είναι πιο θερμή από τις γειτονικές επιφάνειες του δέρματος, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της νόσου.^{3,6}

Η εμπλοκή των αρθρώσεων των χεριών και των καρπών είναι συνήθης στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στην οξεία φάση, στα χέρια εκδηλώνεται με πόνο, οίδημα, ευαισθησία και αδυναμία λαβής, ενώ στη χρόνια φάση με εξάρθρωση, αστάθεια, παραμόρφωση και μυϊκή ατροφία. Παραμόρφωση του χεριού μπορεί να εμφανιστεί στη χρόνια φλεγμονή. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να αλλάξουν τη μηχανική της λειτουργίας του χεριού, μειώνοντας την δύναμη της λαβής, δυσκολεύοντας την εκτέλεση των συνηθισμένων καθημερινών δραστηριοτήτων.⁶

Ο πόνος στον αγκώνα και στον ώμο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της εμπλοκής των αρθρώσεων ή της φλεγμονής της δομής των μαλακών ιστών όπως των τενόντων (τενοντίτιδα) ή των θυλάκων (θυλακίτιδα). Το γόνατο μπορεί επίσης να εμπλέκεται

με απώλεια του χόνδρου, με αστάθεια, και με πόνο στην άρθρωση. Η συνοβίτιδα του γονάτου μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό μίας κύστης πίσω από το γόνατο που ονομάζεται κύστη του Baker. Αυτές οι κύστεις μπορεί να είναι επώδυνες καθώς γίνονται εντονότερες ή μπορεί να υποστούν ρήξη, παράγοντας μία κλινική εικόνα όμοια με θρομβοφλεβίτιδα. Ο χρόνιος πόνος στις αρθρώσεις οδηγεί σε μυϊκή ατροφία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε χαλάρωση των συνδετικών δομών που υποστηρίζουν το γόνατο προκαλώντας αστάθεια. Η διατήρηση ενός επαρκούς εύρους κινήσεων του γονάτου είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική βάδιση.³

Συχνά στη ρευματοειδή αρθρίτιδα προσβάλλονται τα πόδια και οι αστράγαλοι. Η προσβολή των μεταταρσοφαλαγγικών αρθρώσεων δυσκολεύει τη βάδιση, ενώ η εξάρθρωση των μετατάρσιων αρθρώσεων έχει ως αποτέλεσμα την παραμόρφωση. Η εξάρθρωση μπορεί επίσης να προκαλέσει μία παραμόρφωση κάμψης στην εγγύς μεσοφαλαγγική άρθρωση του δακτύλου του ποδιού, προκαλώντας νέκρωση οφειλόμενη στην πίεση του δέρματος που βρίσκεται πάνω από την άρθρωση, και δευτερογενώς ενόχληση οφειλόμενη στα υποδήματα. Επίσης μπορεί να εμφανιστεί βλαισός μέγα δάκτυλος (Hallux Valgus), δηλαδή πλευρική-πλάγια απόκλιση του δακτύλου) και σχηματισμός κάλου στο μεγάλο δάκτυλο του ποδιού και συχνά παρατηρείται μία διεύρυνση του ποδιού στη μακροχρόνια νόσο.⁶

Η σπονδυλική στήλη συνήθως προσβάλλεται στους αυχενικούς σπονδύλους, ενώ στους οσφυϊκούς σπόνδυλους η ανάπτυξη είναι σπάνια. Η προσβολή του πρώτου και του δεύτερου αυχενικού σπονδύλου (A1-A2) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αστάθεια αυτής της άρθρωσης. Οι ασθενείς με αυτό το πρόβλημα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο συμπίεσης της σπονδυλικής στήλης παρόλο που αυτή η επιπλοκή είναι σπάνια.

Η κροταφογναθική άρθρωση (σιαγώνα) μπορεί επίσης να προσβληθεί, οδηγώντας σε ανώμαλη σύγκλειση και δυσκολία στην μάσηση. Η φλεγμονή του θωρακικού χόνδρου μπορεί να οδηγήσει σε πόνο του θωρακικού τοιχώματος, ενώ ο πόνος στον γοφό μπορεί να είναι αποτέλεσμα των καταστρεπτικών αλλαγών στην άρθρωση, της φλεγμονής του μαλακού ιστού ή να είναι αναφερόμενος πόνος λόγω παγίδευσης των νευρών στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης.¹

2 ΕΞΩΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

• ΡΕΥΜΑΤΙΚΟΙ ΟΖΟΙ

Αυτοί εμφανίζονται στο 20% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και εντοπίζονται κυρίως στις εκτείνουσες επιφάνειες των αγκώνων, των βραχιόνων και των χεριών, αλλά μπορεί να σχηματιστούν και στα πόδια και σε άλλα σημεία πίεσης. Μπορεί επίσης να αναπτυχθούν στον πνεύμονα ή στον υπεζωκότα και σπάνια στις μήνιγγες. Οι ρευματικοί όζοι συνήθως είναι ασυμπτωματικοί και δεν απαιτούν κάποια ειδική παρέμβαση. Οι όζοι παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με διαβρωτική νόσο.⁸

• ΑΓΓΕΙΤΙΣ

Συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με μακροχρόνια ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η αγγειίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε μία ευρεία ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων. Η προσβολή των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων από φλεγμονώδη κύτταρα, οδηγεί σε καταστροφή του αγγείου προκαλώντας απόφραξη του ιστού, περιφερικά της εμπλεκόμενης περιοχής. Η αγγειίτιδα των μικρών αγγείων συνήθως δημιουργεί έμφρακτα κοντά στα δάκτυλα του χεριού ή του ποδιού, ιδιαίτερα γύρω από τα νύχια. Αυτά τα έμφρακτα συνήθως είναι μικρής σημασίας. Η αγγειίτιδα μπορεί επίσης να προκαλέσει βλάβη στο δέρμα, ειδικότερα στα κάτω άκρα, δημιουργώντας έλκη τα οποία ίσως να μοιάζουν με τα έλκη κατάκλισης. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα έλκη δεν θεραπεύονται με τις συνηθισμένες θεραπείες για έλκη κατάκλισης. Η προσβολή των μεγαλύτερων αγγείων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απόφραξη των αγγείων που παροχετεύουν με αίμα τα νεύρα, προκαλώντας μη αναστρέψιμα κινητικά προβλήματα, ενώ η προσβολή αγγείων που παροχετεύουν άλλα όργανα μπορεί να οδηγήσει σε πολυαρτηριδιακή νόσο. Έτσι λοιπόν επιθετική θεραπεία είναι απαραίτητη σε αυτούς τους ασθενείς.⁶

• ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Μπορεί να αναπτυχθεί πνευμονική ίνωση λόγω της ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε συνδυασμό με το κάπνισμα. Οι ρευματικοί όζοι μπορεί να αναπτυχθούν στο πνευμονικό παρέγχυμα μοιάζοντας με νεοπλάσματα στις ακτινογραφίες θώρακος. Η διάμεση πνευμονίτιδα και η αρτηρίτιδα είναι σπάνιες δυνητικώς επικίνδυνες για την ζωή επιπλοκές της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.^{3,6}

- **ΟΦΘΑΛΜΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ**

Οι οφθαλμικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβάνουν τη ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα και την φλεγμονή του σκληρού χιτώνα και του κερατοειδούς χιτώνα. Η ατροφία του δακρυϊκού πόρου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού των δακρύων, προκαλώντας ξηρότητα και κνησμό στους οφθαλμούς (ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα). Όταν αυτή παρατηρηθεί σε συνδυασμό με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, αναφέρεται ως σύνδρομο Sjögren. Τα τεχνητά δάκρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Η φλεγμονή των επιφανειακών στρωμάτων του σκληρού χιτώνα (επισκληρίτιδα) είναι γενικώς αυτοπεριοριζόμενη. Οι ρευματικοί όζοι μπορούν να αναπτυχθούν και στον σκληρό χιτώνα.³

- **ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ**

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θνητότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα. Αυτός ο κίνδυνος φαίνεται να είναι υψηλότερος στους ασθενείς με την πιο ενεργή φλεγμονή και μειώνεται μετά από θεραπεία με μεθοτρεξάτη. Μπορεί επίσης να εμφανιστεί περικαρδίτιδα, οδηγώντας σε συσσώρευση υγρών, όπως και ανωμαλίες στην καρδιακή αγωγιμότητα, ενώ η μυοκαρδίτιδα είναι μια σπάνια επιπλοκή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.^{9,10}

- **ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ FELTY**

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα σε συνδυασμό με την σπληνομεγαλία και την ουδετεροπενία είναι γνωστή ως σύνδρομο του Felty. Η θρομβοκυττάρωση μπορεί επίσης να είναι μία εκδήλωση του συνδρόμου. Οι ασθενείς με σύνδρομο του Felty και λευκοπενία είναι πιο επιρρεπείς σε λοιμώξεις.⁸

- **ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**

Η λεμφαδενοπάθεια μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ιδιαίτερα στους λεμφαδένες που εντοπίζονται κοντά στις πιο ενεργά εμπλεκόμενες αρθρώσεις. Η συμμετοχή των νεφρών είναι σπάνια αλλά μπορεί να σχετίζεται με την θεραπεία με Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα, με άλατα χρυσού και πενικιλλαμίνη. Η αμυλοείδωση είναι μία σπάνια επιπλοκή της μακροχρόνιας ρευματοειδούς αρθρίτιδας.¹

3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Οι αιματολογικές εξετάσεις συχνά αποκαλύπτουν ήπια προς μέτρια αναιμία. Ο αιματοκρίτης μπορεί να μειωθεί ακόμα και 30%. Η αναιμία είναι συνήθως ανάλογη με την φλεγμονή και ονομάζεται αναιμία χρόνιας νόσου. Αυτό το είδος αναιμίας δεν ανταποκρίνεται σε θεραπεία με σίδηρο και μπορεί να προκαλέσει διαγνωστικό πρόβλημα, διότι τα ΜΣΑΦ μπορούν να προκαλέσουν γαστρίτιδα και χρόνια απώλεια αίματος, οδηγώντας σε σιδηροπενική αναιμία.^{7,19}

Η θρομβοκυττάρωση είναι ένα ακόμη αιματολογικό εύρημα στην ενεργή νόσο. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων αυξάνεται και μειώνεται και συσχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα της νόσου. Η θρομβοκυτταροπενία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της τοξικότητας από την χορήγηση αλάτων χρυσού, πενικιλλαμίνης ή ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Η θρομβοκυτταροπενία είναι πιο συχνή στο σύνδρομο Felty και στην αγγειίτιδα.^{6,8}

Η ταχύτητα καθίζησης των ερυθρών (ΤΚΕ) είναι συνήθως αυξημένη σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλες φλεγμονώδεις νόσους. Η συγκεκριμένη εξέταση είναι μη ειδική και παρόλο που η ΤΚΕ συνήθως ελαττώνεται όταν οι ασθενείς ανταποκρίνονται στη θεραπεία, υπάρχει μεγάλη διακύμανση ανάμεσα σε ασθενείς με ανταπόκριση στη θεραπεία.⁷

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι ένας άλλος μη ειδικός δείκτης για την ρευματοειδή αρθρίτιδα όταν αυτός αυξάνεται. Η CRP παράγεται στο ήπαρ προς απάντηση σε διάφορες κυτταροκίνες.

Ο ρευματοειδής παράγοντας είναι παρών στο 60-70% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η συνήθης εργαστηριακή εξέταση για το ρευματοειδή παράγοντα είναι ένα αντίσωμα ειδικό για την ανοσοσφαιρίνη IgM ρευματοειδούς παράγοντα. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και αρνητική εξέταση για ρευματοειδή παράγοντα μπορεί να έχουν IgG ή IgA ρευματοειδή παράγοντα, αλλά οι εξετάσεις για αυτούς τους ασθενείς δεν είναι διαθέσιμες για εξέταση ρουτίνας. Η εξέταση ρευματοειδούς παράγοντα μπορεί να βρεθεί θετική σε συγκεκριμένη αραιώση του ορού. Οι υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό συνήθως δείχνουν πιο σοβαρή νόσο, αλλά όπως και με την ΤΚΕ, η υψηλή διατομική διακύμανση κάνει αυτήν την εξέταση αναξιόπιστη ως τρόπο παρακολούθησης της πορείας της νόσου. Ο ρευματοειδής παράγοντας μπορεί να είναι αυξημένος και σε ασθενείς που δεν νοσούν από ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹

Το αντίσωμα έναντι του πεπτιδίου της κιτρουλλίνης (anti CCP) έχει παρόμοια ευαισθησία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, ευρισκόμενο στο 50-85% των νοσούντων ασθενών, αλλά είναι πιο ειδικό και ανιχνεύσιμο στην αρχή της νόσου.⁷

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα ανιχνεύονται στο 25% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Το συμπλήρωμα του ορού είναι συνήθως φυσιολογικό, ενώ στους ασθενείς με αγγειίτιδα οι συγκεντρώσεις του συμπληρώματος στον ορό μπορεί να είναι χαμηλές.

Το αρθρικό υγρό συνήθως είναι θολό εξαιτίας του αυξημένου αριθμού των λευκοκυττάρων στο φλεγμονώδες υγρό. Ο αριθμός των λευκών κυττάρων σε αυτές τις αρθρώσεις είναι 5000-50000/mm³. Το υγρό είναι συνήθως μικρότερου ιξώδους από ότι στις φυσιολογικές αρθρώσεις.³

Οι αρχικές ακτινολογικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν οίδημα του μαλακού ιστού και οστεοπόρωση κοντά στην άρθρωση (περιαρθρική οστεοπόρωση). Ο χώρος της άρθρωσης ελαττώνεται λόγω της σταδιακής αποδόμησης του χόνδρου. Οι διαβρώσεις τείνουν να συμβούν αργότερα κατά τη διάρκεια της νόσου και συνήθως εμφανίζονται πρώτα στις μετακαρποφαλαγγικές και εγγύς διαφαλαγγικές αρθρώσεις των χεριών, και μεταταρσοφαλαγγικές αρθρώσεις των πόδων. Περιοδικές ακτινογραφίες είναι χρήσιμες για την εκτίμηση της πορείας της νόσου.¹

4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η χρόνια φλεγμονή του αρθρικού ιστού κατά μήκος της άρθρωσης οδηγεί σε πολλαπλασιασμό αυτού του ιστού. Η φλεγμονή και ο πολλαπλασιασμός του αρθρικού υμένα ονομάζεται πάννος (pannus). Αυτός εισβάλλει στο χόνδρο και τελικά στην επιφάνεια του οστού, προκαλώντας διαβρώσεις στον χόνδρο και στο οστό και οδηγεί σε καταστροφή της άρθρωσης. Οι παράγοντες που εκκινούν την φλεγμονώδη διαδικασία είναι άγνωστοι.²⁹

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα περίπλοκο σύστημα ελέγχων και ισορροπιών σχεδιασμένο να διακρίνει τους ιστούς του οργανισμού και τους ξένους ιστούς. Βοηθάει τον οργανισμό να απαλλάγει από λοιμογόνους παράγοντες, καρκινογόνα κύτταρα και παράγωγα σχετιζόμενα με τη δυσλειτουργία των κυττάρων. Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα αυτό το σύστημα δεν μπορεί να ξεχωρίσει τα υγιή κύτταρα από τα ξένα κύτταρα και προσβάλλει τους αρθρικούς ιστούς όπως και άλλους συνδετικούς ιστούς.³

Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει και χημική και κυτταρική λειτουργία. Η χημική απάντηση είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των αντισωμάτων. Τα αντισώματα παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Οι περισσότεροι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παράγουν αντισώματα που ονομάζονται ρευματοειδείς παράγοντες. Ο ρευματοειδής παράγοντας δεν έχει ταυτοποιηθεί ως παθογόνος και ούτε η ποσότητα αυτών των κυκλοφορούντων αντισωμάτων σχετίζεται πάντα με τη δραστηριότητα της νόσου. Οι ανοσοσφαιρίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν το σύστημα του συμπληρώματος (complement system). Το σύμπλεγμα απλοποιεί την ανοσολογική απάντηση μέσω του χημειοτακτισμού, της φαγοκυττάρωσης και της απελευθέρωσης των κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα. Το επεξεργασμένο αντιγόνο (εικόνα 2) αναγνωρίζεται από τις κύριες πρωτεΐνες του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας του λεμφοκυττάρου, το οποίο και ενεργοποιείται για να διεγείρει την παραγωγή των Τ και Β κυττάρων. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α, IL-1 και IL-6 είναι ενώσεις κλειδιά στην εκκίνηση και συνέχιση της φλεγμονής.³⁰ Τα λεμφοκύτταρα μπορεί να είναι είτε Β κύτταρα (προερχόμενα από τον μυελό των οστών) είτε Τ κύτταρα (προερχόμενα από τον θύμο αδένα). Τα Τ κύτταρα μπορούν να είναι είτε CD4+ (Τ βοηθητικά, TH) είτε CD8+ (κυτταροτοξικά ή killer) Τ κύτταρα. Υπάρχουν δύο υπότυποι βοηθητικών Τ κυττάρων: τα TH1, τα οποία προάγουν τη φλεγμονή παράγοντας INF-γ, TNF-α και IL-2, και τα TH2, τα οποία παράγουν τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL4, IL5 και IL-10. Τα CD8+ Τ κύτταρα έχουν ρυθμιστική δράση στην ανοσολογική διαδικασία, καταστέλλοντας τη δραστηριότητα των CD4+ Τ κυττάρων, μέσω της απελευθέρωσης αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και προάγοντας την απόπτωση. Τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα παράγουν κυτταροτοξίνες, που είναι άμεσα τοξικές στους ιστούς και κυτταροκίνες, οι οποίες επάγουν περαιτέρω τη διαδικασία της φλεγμονής και προσελκύουν κύτταρα στις περιοχές της φλεγμονής. Τα μακροφάγα διεγείρονται και εκκρίνουν προσταγλανδίνες και κυτταροτοξίνες.¹¹

Παρόλο που έχει προταθεί πως τα Τ κύτταρα έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, τα Β κύτταρα έχουν ξεκάθαρα ένα εξίσου σημαντικό ρόλο. Τα ενεργοποιημένα Β κύτταρα παράγουν πλασματοκύτταρα, τα οποία σχηματίζουν αντισώματα. Αυτά τα αντισώματα σε συνδυασμό με το συμπλήρωμα οδηγούν στη συσσώρευση των πολυμορφοπύρηνων λεμφοκυττάρων, τα οποία απελευθερώνουν κυτταροτοξίνες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), που

προάγουν την κυτταρική καταστροφή στις αρθρώσεις και τα οστά. Τα B κύτταρα παράγουν επίσης κυτταροκίνες, οι οποίες μπορούν να αλλάξουν την λειτουργία άλλων ανοσολογικών κυττάρων, έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται τα αντιγόνα αλλά και να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αλληλεπιδρώντας με τα T κύτταρα για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης.^{12,13}

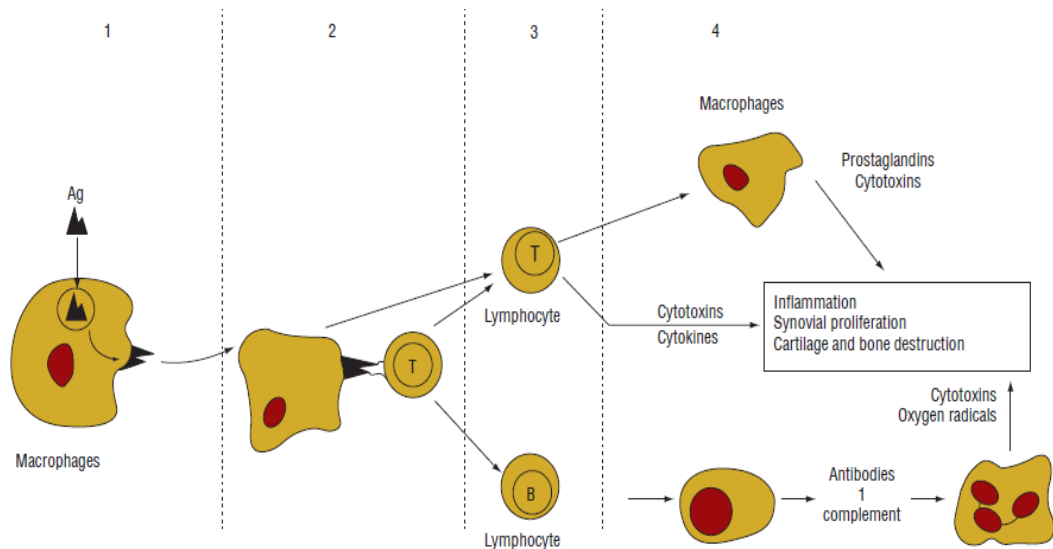
Στην αρθρική μεμβράνη, τα CD4+ T κύτταρα είναι άφθονα και επικοινωνούν με τα μακροφάγα, τους οστεοκλάστες, τους ινοβλάστες και τα χονδροκύτταρα είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, είτε μέσω των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-1 και IL-6. Αυτά τα κύτταρα παράγουν τις μεταλλοπρωτεΐνες και άλλες κυτταροτοξικές ουσίες οι οποίες οδηγούν στην διάβρωση του οστού και του χόνδρου.^{4,14,15}

Οι αγγειοδραστικές ενώσεις έχουν επίσης ένα σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία. Η ισταμίνη, οι κινίνες, και οι προσταγλανδίνες απελευθερώνονται στο σημείο της φλεγμονής. Αυτές οι ουσίες αυξάνουν και την αιματική ροή στο σημείο της φλεγμονής και την διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων. Αυτές οι ουσίες προκαλούν οίδημα, αύξηση της θερμότητας, ερύθημα και πόνο σχετιζόμενο με τη φλεγμονή των αρθρώσεων, διευκολύνοντας τη διέλευση των κοκκιοκυττάρων από τα αιμοφόρα αγγεία στο σημείο της φλεγμονής.⁴

Τα τελικά αποτελέσματα της χρόνιας φλεγμονής ποικίλουν. Η απώλεια των χόνδρων μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του ενδοαρθρικού χώρου. Ο σχηματισμός ουλώδους ιστού μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της κινητικότητας των αρθρώσεων ή σε αγκύλωση. Η χαλάρωση των δομών των τενόντων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της στήριξης της προσβεβλημένης άρθρωσης οδηγώντας σε αστάθεια ή εξάρθρωση. Επίσης μπορούν να συμβούν συσπάσεις στους τένοντες, προκαλώντας χρόνια παραμόρφωση.^{4,6,16,17}

Η καταστροφή των αρθρώσεων έχει δύο φάσεις:^{25,31,32}

Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των CD4+ T κυττάρων με την παρουσίαση ενός αντιγόνου ή αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting) (πιθανότατα από τα δενδριτικά) στο σύμπλεγμα των κύριων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (MHC).

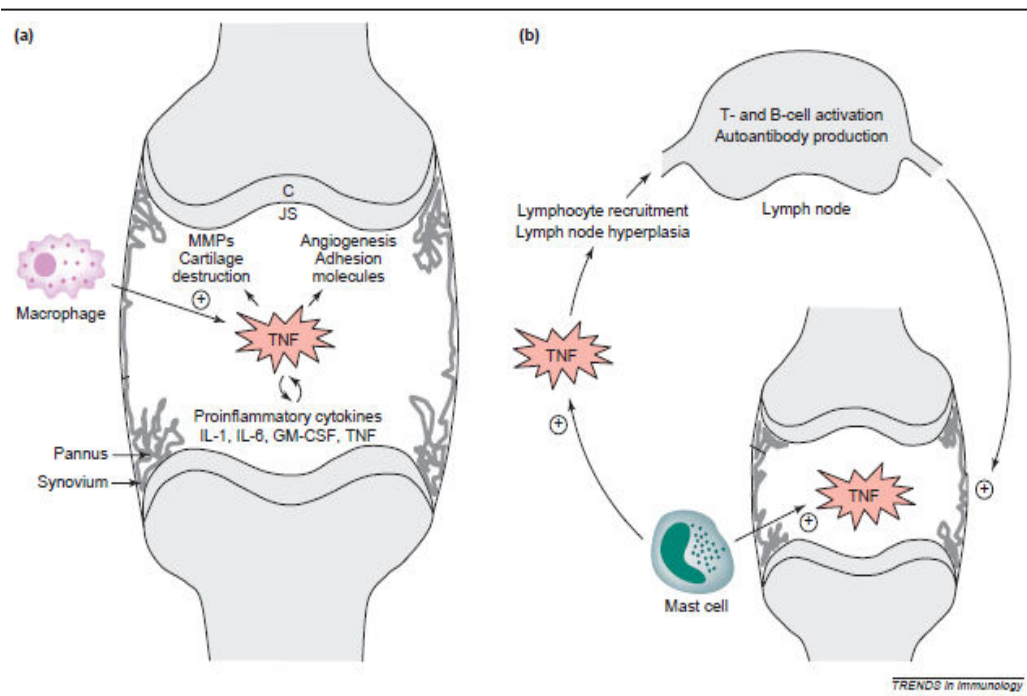


Εικόνα 2: Παθογένεση της φλεγμονώδους απάντησης. Φάση 1: αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν αντιγόνα. Φάση 2: το αντιγόνο παρουσιάζεται σε ένα T λεμφοκύτταρο. Το T λεμφοκύτταρο προσκολλάται στο αντιγόνο στο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας στο κυτταρικό τοίχωμα προκαλώντας ενεργοποίηση. Φάση 3: ένα ενεργοποιημένο T κύτταρο διεγείρει την παραγωγή T και B λεμφοκυττάρων, επάγοντας φλεγμονή. Φάση 4: τα ενεργοποιημένα T κύτταρα και τα μακροφάγα απελευθερώνουν παράγοντες που επάγουν την καταστροφή του ιστού, την αύξηση της αιματικής ροής και οδηγούν στην προσβολή του ιστού της άρθρωσης και του αρθρικού υγρού.¹

Τα T κύτταρα έχουν έναν κρίσιμο ρόλο στην μετατροπή του αρθρικού υμένα σε λεμφικό ιστό. Τα CD4⁺ T κύτταρα που βρίσκονται στον αρθρικό υμένα εκφράζουν την CD4-5RO ισομορφή, ορίζοντάς τα ως κύτταρα μνήμης όπως και τα CD69, τα οποία είναι δείκτης αρχικής ενεργοποίησης.

Οι κύριες κυτταροκίνες που συνεργάζονται με τα CD4⁺ T κύτταρα είναι οι προφλεγμονώδεις IL-2, IL-12 και η ιντερφερόνη γ (INF-γ). Αυτές οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα κύτταρα της άρθρωσης, για την παραγωγή των καταστροφικών για τις αρθρώσεις κυτταροκινών TNF-α, IL-1, IL-6 και GM-CSF και των μεταλλοπρωτεϊνών.

Η δεύτερη φάση της φλεγμονώδους διαδικασίας στις αρθρώσεις χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό της άρθρωσης και τον σχηματισμό του πάννου (pannus) (εικόνα 3). Τα κύτταρα του αρθρικού υμένα, ο χόνδρος και το οστό καταστρέφονται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Νέα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται για να παροχετεύσουν τον επεκτεινόμενο αρθρικό υμένα.³²



Εικόνα 3: (a) Η παραδοσιακή παραδοχή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, (b) Η παθολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας με τα νέα δεδομένα, με την συμμετοχή του TNF- α .³

Τα Β κύτταρα ενεργοποιούνται και παράγουν αντισώματα και αυτοαντισώματα όπως ο ρευματοειδής παράγοντας (RF) και αντισώματα κατά της κιτρουλλίνης (antiCCP).

Οι χημειοτακτικές ουσίες όπως η IL-8 και τα λευκοτριένια B4 (LTB4) παρασύρουν τα ουδετερόφιλα στο αρθρικό υγρό, όπου μπορούν να απελευθερώσουν προφλεγμονώδεις ουσίες, όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, ελαστάση, κολλαγενάση και ROS προς απάντηση σε ανοσολογικά σύμπλοκα που σχηματίζονται στην επιφάνεια του χόνδρου.³³ Τα μακροφάγα επίσης προσλαμβάνονται στον αρθρικό υμένα, αποτελώντας εκεί το 50% των κυττάρων, και οι κυτταροκίνες που απελευθερώνουν (TNF- α , IL-1) έχουν άμεσο ρόλο στην απώλεια του χόνδρου με την αύξηση της παραγωγής των μεταλλοπρωτεϊνών των χονδροκυττάρων και μείωση της παραγωγής κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης.³⁴

5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο πρωταρχικός στόχος είναι να βελτιωθεί η ποιότητα της ζωής. Η θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας είναι μία πολύπλευρη προσέγγιση και συμπεριλαμβάνει φαρμακολογικές και μη φαρμακολογικές θεραπείες. Κυρίαρχο στόχο αποτελεί η επίτευξη πλήρους ύφεσης, παρόλο που αυτός ο στόχος μπορεί να είναι δύσκολος να επιτευχθεί σε μερικούς ασθενείς. Άλλοι στόχοι είναι ο έλεγχος της δραστηριότητας της νόσου και του αρθρικού πόνου, διατηρώντας τη λειτουργική ικανότητα στις

καθημερινές δραστηριότητες ή στη δουλειά, βελτιώνοντας την ποιότητα της ζωής και επιβραδύνοντας τις καταστροφικές αλλαγές στις αρθρώσεις.

• ΜΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ξεκούραση, η φυσιοθεραπεία, η εργοθεραπεία, η χρήση υποβοηθητικών συσκευών, η μείωση του σωματικού βάρους και η χειρουργική παρέμβαση είναι οι πιο χρήσιμες μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις σε ασθενείς πάσχοντες από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η ξεκούραση είναι απαραίτητη, ανακουφίζει το stress στις αρθρώσεις προλαμβάνοντας την περαιτέρω καταστροφή των αρθρώσεων και βοηθάει επίσης στην ανακούφιση του πόνου. Η ακινησία ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο εύρος κινήσεων και τελικά σε μυϊκή ατροφία και συσπάσεις.¹⁸

Η εργοθεραπεία και η φυσιοθεραπεία παρέχουν στον ασθενή τις δεξιότητες και τις ασκήσεις για να αυξήσουν ή να διατηρήσουν την κινητικότητά του. Η απώλεια βάρους βοηθάει στην ανακούφιση των αρθρώσεων από την πίεση, και θα πρέπει να παρακολουθείται από διατροφολόγο. Η τενοντοενδοαρθρική υμενεκτομή, η αποκατάσταση των τενόντων και η υποκατάσταση των αρθρώσεων είναι χειρουργικές επιλογές για τους ασθενείς με σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα.^{18,19}

• ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέσα στους πρώτους 3 μήνες έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου θα πρέπει να χορηγηθεί ένα αντιρευματικό φάρμακο τροποποιητικό της νόσου (DMARD).¹⁸ Όσο πιο γρήγορα ξεκινάει η θεραπεία με τα DMARD τόσο καλύτερα αποτελέσματα θα έχει η θεραπεία.²⁰⁻²⁷ Τα Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα ή τα κορτικοστεροειδή ή συνδυασμός και των δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανακούφιση των συμπτωμάτων. Αυτά παρέχουν σχετικά γρήγορη βελτίωση των συμπτωμάτων σε σχέση με τα DMARD, τα οποία χρειάζονται εβδομάδες για να παρατηρηθεί βελτίωση. Παρόλα αυτά τα Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα δεν δρουν στην πορεία της νόσου και οι ανεπιθύμητες ενέργειες των κορτικοστεροειδών λόγω χρόνιας χορήγησης, τα καθιστούν λιγότερο επιθυμητά.²⁶ Η έγκαιρη θεραπεία με DMARD μπορεί να μειώσει την θνητότητα, αφού οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν αυξημένη θνητότητα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ανθρώπους. Τα DMARD συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών παραγόντων πρέπει να χρησιμοποιούνται σε όλους τους ασθενείς με εξαίρεση αυτούς με περιορισμένη νόσο. Οι βιολογικοί παράγοντες έχουν βρεθεί πως είναι αποτελεσματικοί σε ασθενείς στους οποίους η θεραπεία με τα DMARD έχει αποτύχει. Ο συνδυασμός θεραπείας με

δύο ή περισσότερα DMARD μπορεί να είναι αποτελεσματικός όταν η μονοθεραπεία είναι ανεπιτυχής. Οι συνδυασμοί μεθοτρεξάτης με κυκλοσπορίνη και μεθοτρεξάτης με σουλφασαλαζίνη και υδροξυχλωροκίνη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί.²⁸

✓ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ (ΜΣΑΦ)

Τα ΜΣΑΦ αναστέλλουν κυρίως την σύνθεση των προσταγλανδινών, η οποία είναι ένα μέρος της φλεγμονώδους πορείας. Τα ΜΣΑΦ πρέπει να χρησιμοποιούνται σπάνια ως μονοθεραπεία για την ρευματοειδή αρθρίτιδα επειδή δεν τροποποιούν την πορεία της νόσου και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικά φάρμακα στην θεραπεία με τα DMARD. Τα ΜΣΑΦ κατέχουν αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, και μειώνουν την ακαμψία που σχετίζεται με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁹

✓ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Τα κορτικοστεροειδή αναστέλλουν τη σύνθεση των προσταγλανδινών και των λευκοτριένιων και αναστέλλουν τον σχηματισμό ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα. Επηρεάζουν επίσης την μετακίνηση των κυττάρων προκαλώντας ανακατανομή των μονοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, επιβραδύνοντας με αυτόν τον τρόπο την φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση. Τα από του στόματος χορηγούμενα κορτικοστεροειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορους τρόπους. Είναι χρήσιμα στον περιορισμό των συμπτωμάτων πριν από την έναρξη της δράσης των DMARD. Μία μεγάλη δόση κορτικοστεροειδών μπορεί επίσης να χορηγηθεί στην οξεία φάση της νόσου, ενώ συνεχείς χαμηλές δόσεις μπορούν να προστεθούν όταν τα DMARD δεν παρέχουν επαρκή έλεγχο της νόσου. Η χορήγηση χαμηλής δόσης μέρα παρά μέρα δεν είναι αποτελεσματική στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, διότι συνήθως τα συμπτώματα είναι σε έξαρση όταν δεν χορηγείται θεραπεία. Τα κορτικοστεροειδή μπορούν να εγχυθούν στις αρθρώσεις και τους μαλακούς ιστούς για τον έλεγχο της τοπικής φλεγμονής. Τα κορτικοστεροειδή σπάνια χρησιμοποιούνται ως μονοθεραπεία, λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.^{21,22}

✓ DMARD (disease modifying anti-rheumatic drugs)²²

Τα DMARD που συχνά χρησιμοποιούνται είναι η μεθοτρεξάτη, η υδροξυχλωροκίνη, η σουλφασαλαζίνη, και η λεφλουνομίδη.

Λιγότερο συχνά χρησιμοποιείται η αζαθειοπρίνη, η D-πενικιλλαμίνη, οι ενώσεις χρυσού, η μινοκυκλίνη, η κυκλοσπορίνη, και η κυκλοφωσφαμίδη. Αυτό

οφείλεται είτε στη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα, είτε στην υψηλή τοξικότητα ή και στα δύο παραπάνω.

Μεθοτρεξάτη²⁴

Η μεθοτρεξάτη αναστέλλει την παραγωγή των κυτταροκινών και την βιοσύνθεση των πουρινών, με αποτέλεσμα την αναστολή της φλεγμονώδους διαδικασίας. Θεωρείται ως το φάρμακο πρώτης εκλογής για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας λόγω καλής αποτελεσματικότητας και χαμηλού κόστους σε σχέση με τους βιολογικούς παράγοντες. Αντενδείκνυται σε έγκυες και θηλάζουσες γυναίκες, όπως και σε ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο, με ανοσοανεπάρκεια, με περιτοναϊκό εξίδρωμα, με λευκοπενία, με θρομβοκυτταροπενία και με κάθαρση κρεατινίνης μικρότερη από 40ml/min.

Λεφλουνομίδη²⁸

Η λεφλουνομίδη είναι ισοξαζολικό παράγωγο που αναστέλλει τη σύνθεση πυριμιδίνης και οδηγεί σε μείωση των λεμφοκυττάρων ρυθμίζοντας τη φλεγμονή. Έχει αποτελεσματικότητα όμοια της μεθοτρεξάτης για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Το φάρμακο μπορεί να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα και αντενδείκνυται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα ηπατική νόσο, μυελοτοξικότητα και είναι τερατογόνο.

Υδροξυχλωροκίνη²³

Η υδροξυχλωροκίνη είναι ανθελonoσιακό φάρμακο. Το κύριο πλεονέκτημά της είναι η έλλειψη μυελοκαταστολής, ηπατοτοξικότητας και νεφροτοξικότητας. Βραχυπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες συμπεριλαμβάνουν ναυτία, έμετο και διάρροια, όπως και οφθαλμική τοξικότητα, δερματολογικές και νευρολογικές τοξικότητες.

Σουλφασαλαζίνη³⁵

Η σουλφασαλαζίνη είναι ένα προφάρμακο το οποίο διασπάται σε σουλφαπυριδίνη, η οποία θεωρείται πως έχει αντιρευματική δράση, και σε 5-αμινοσαλικυλικό οξύ από τα βακτήρια του εντέρου. Η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών της, όπως ναυτία, έμετος, διάρροια και ανορεξία. Αν εμφανιστούν αντιδράσεις υπερευαισθησίας κατά την θεραπεία το φάρμακο θα πρέπει να διακόπτεται και να χρησιμοποιείται άλλο DMARD. Η σουλφασαλαζίνη σχετίζεται με αλωπεκία, λευκοπενία, στοματίτιδα, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και πορτοκαλοκίτρινο χρωματισμό του δέρματος και των ούρων.

- **ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**^{26,29}

Οι βιολογικοί παράγοντες είναι γενετικά τροποποιημένα μόρια που αναστέλλουν τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α, IL-1, και καταστρέφουν τα περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα. Αυτά τα φάρμακα δεν έχουν κάποια τοξικότητα που να χρειάζεται παρακολούθηση, αλλά αυξάνουν τον κίνδυνο για λοιμώξεις και έχουν υψηλό κόστος.

Οι βιολογικοί παράγοντες που είναι τροποποιητές της νόσου είναι τα αντι-TNF φάρμακα (etanercept, infliximab, adalimumab), ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1, IL-1Ra (anakinra), ο παράγοντας που καταστρέφει τα Β κύτταρα rituximab, και τέλος ο ανασταλτικός παράγοντας των Τ κυττάρων, abatacept.

Etanercept³⁶

Το φάρμακο συνδέεται ειδικά με τον TNF-α και αναστέλλει ανταγωνιστικά την σύνδεσή του με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια των κυττάρων και με αυτό τον τρόπο αναστέλλει την βιολογική του δραστηριότητα. Εκτός από τις τοπικές αντιδράσεις από την ένεση, οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι σπάνιες. Η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια είναι αντένδειξη του φαρμάκου. Το φάρμακο είναι δραστικό στο 60-75% των πασχόντων με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Infliximab³⁷

Έχει δράση όμοια του etanercept. Δεσμεύει όλες τις μορφές του TNF-α και εξουδετερώνει τη δράση του. Επειδή είναι χιμαϊρικό αντίσωμα από πρωτεΐνες ποντικού και ανθρώπων, μπορεί να σχηματιστούν αντισώματα ενάντια σε αυτό. Για αυτόν το λόγο πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλα και μεθοτρεξάτη για όσο διάστημα χρησιμοποιείται το infliximab. Αντισώματα παράγονται στο 7-15% των ασθενών, αυξάνοντας την πιθανότητα αλλεργικών αντιδράσεων κατά την έγχυση. Το φάρμακο αντενδείκνυται σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.

Adalimumab³⁸

Είναι αναστολέας του TNF-α. Επειδή δεν έχει ξένα πρωτεϊνικά τμήματα, παράγει λιγότερα αντιγόνα από το infliximab. Έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα με τους υπόλοιπους αντι-TNF παράγοντες όπως και τις ίδιες ανεπιθύμητες ενέργειες όσον αφορά τις λοιμώξεις.

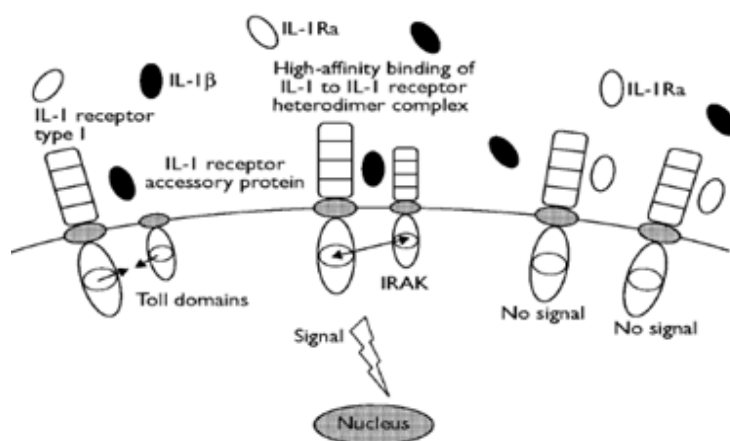
Abatacept³⁹

Το φάρμακο αναστέλλει τις δράσεις των Τ κυττάρων, γενικά είναι καλά ανεκτό με ελαφρές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως πονοκέφαλο, ρινοφαρυγγίτιδα, ζάλη, βήχα, πόνο στην πλάτη, υπέρταση, δυσπεψία, ουρολοιμώξεις, εξάνθημα και έντονο πόνο.

Rituximab⁴⁰

Το φάρμακο είναι χημειρικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD-20 και αναστέλλει τα Β κύτταρα και είναι χρήσιμο σε ασθενείς στους οποίους η θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή με αντι-TNF παράγοντες έχει αποτύχει. Πρέπει να χορηγείται μεθυλοπρεδνιζολόνη 30 λεπτά πριν από την έγχυση του παράγοντα, διότι αυτός προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις λόγω έγχυσης. Οι ασθενείς θα ξαναχρηαστούν θεραπεία στην επόμενη έξαρση της νόσου.

Anakinra (ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΣ IL-1Ra ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟ)



Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης του IL-1Ra. Το IL-1Ra προσδένεται στον υποδοχέα IL-1R1 αλλά δεν ενεργοποιεί το κύτταρο.²

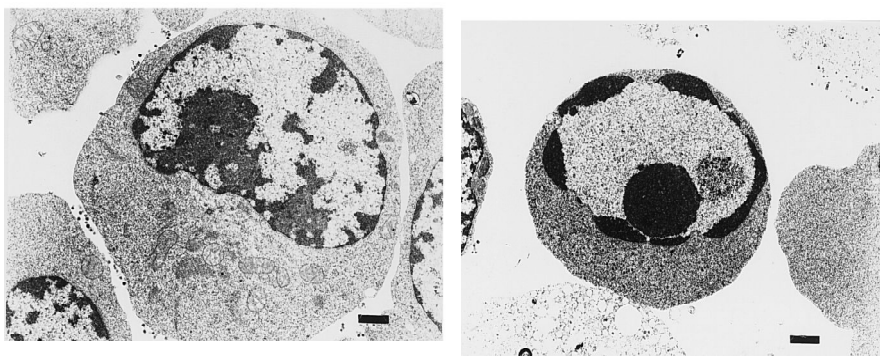
Ο ενδογενής IL-1Ra κλωνοποιήθηκε ως cDNA και εκφράστηκε στο *Escherichia coli*. Το Anakinra έχει μοριακό βάρος 17 kDa και προσδένεται στους υποδοχείς IL-1R στα T λεμφοκύτταρα, στα κύτταρα της άρθρωσης και στα κύτταρα του χόνδρου με περίπου ίση συγγένεια με την IL-1. Ο μηχανισμός δράσης του Anakinra (εικόνα 4) μπορεί να εξηγηθεί μέσω ενός δεύτερου μορίου της κυτταρικής μεμβράνης, το IL-1RAcP. Όταν η IL-1 προσδένεται στον IL-1R1, η IL-1RAcP αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο υποδοχέα-δεσμευτή και επάγει την κυτταρική διέγερση. Το Anakinra όταν προσδένεται στον IL-1R1 υποδοχέα αποτρέπει την αλληλεπίδραση του IL-1RAcP με τον υποδοχέα, οδηγώντας σε μη ανταπόκριση. Οι ανταγωνιστικές δράσεις του Anakinra στην επαγόμενη έκκριση της PGE2 από την IL-1, στην παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, και στην αποδόμηση της πρωτεογλυκάνης έχουν αποδειχθεί *in vitro*. Το Anakinra εμποδίζει τον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των T κυττάρων από την IL-1, όπως και την παραγωγή κολλαγενάσης σε καλλιέργεια αρθρικών κυττάρων χόνδρου. Η επαγόμενη διέγερση του υαλουρονικού οξέος από την IL-1 αναστάληκε

από το Anakinra με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως και ανατράπηκε η επαγόμενη σύνθεση πρωτεογλυκάνης από την IL-1.⁸⁶

6 ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η απόπτωση είναι ο όρος για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ο όρος εισάχθηκε από τους Kerr, Wyllie, και Currie το 1972, ως ένα μέσο που οριοθετεί τα μοριακά συμβάντα που ελέγχουν ένα δομικά διακριτικό τρόπο κυτταρικού θανάτου σε ζώντες ιστούς. Ο όρος αυτός προκύπτει από την Ελληνική λέξη «πτώση» (των φύλλων). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συμβαίνει όταν ένα κύτταρο ενεργοποιεί το ενδογενές κωδικοποιημένο πρόγραμμα ως απάντηση σε ενδογενή ή εξωγενή σήματα. Η απόπτωση αρχίζει από το κυτταρόπλασμα και συμβαίνει γρήγορα χωρίς να αφήσει ίχνη. Η αποτυχία της ρύθμισης της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική κατάσταση όπως καρκίνο, αυτοάνοσα νοσήματα και νευροεκφυλιστικές διαταραχές.^{41,42}



Εικόνα 5: το κύτταρο πριν ξεκινήσει την διαδικασία της απόπτωσης και μετά σε διαδικασία απόπτωσης.

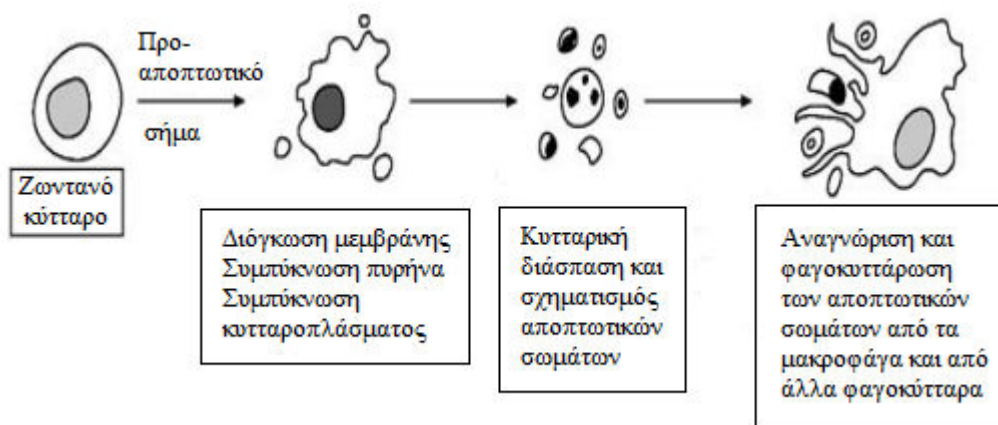
Η διαδικασία της απόπτωσης εκτελείται με οργάνωση και συνήθως απαιτεί τη συμμετοχή όλων των ενδοκυττάρων οργανιδίων. Ο χρόνος μέχρι την έναρξη της απόπτωσης μετά από ένα θανατηφόρο ερέθισμα ποικίλει (από λεπτά μέχρι ώρες) αλλά οι αλλαγές είναι ραγδαίες (εικόνα 5). Στην απόπτωση, οι συντονισμένες αλλαγές συμβαίνουν στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική επιφάνεια. Η απόπτωση συνήθως επηρεάζει ένα κύτταρο ή μια μικρή ομάδα κυττάρων με ασυγχρόνιστο τρόπο, και η διαδικασία μπορεί να χωριστεί αρχικά σε 4 στάδια (εικόνα 6):^{45,48}

i. Συρρίκνωση του κυττάρου

Οι αρχικές αλλαγές που παρατηρούνται συμπεριλαμβάνουν την απώλεια των κυτταρικών συνδέσεων και των άλλων ειδικών δομών των πλασματικών μεμβρανών, όπως τις μικρολάχνες. Συνήθως το κυτταρόπλασμα ξεκινά να συρρικνώνεται ακολουθώντας τη διάσπαση της λαμίνης και των ινών της ακτίνης, ενώ σε μερικές περιπτώσεις το κυτταρόπλασμα γίνεται υπερτροφικό

ii. Συμπύκνωση και κατακερματισμός του πυρήνα ή της χρωματίνης

Πρόκειται για το πιο διακριτό χαρακτηριστικό της απόπτωσης, το οποίο δείχνει τις κλασικές στερεοτυπικές αλλαγές. Αυτό το στάδιο περνά διάφορες πολύ περίπλοκες βιοχημικές και μοριακές αλλαγές. Σε αυτό το στάδιο η χρωματίνη συμπυκνώνεται (δημιουργία πυκνωτικού πυρήνα), υφίσταται σχάση με συστηματικό τρόπο σε μια ή περισσότερες μεγάλες ή μικρές μάζες, και μετακινείται προς την περιφέρεια της πυρηνικής μεμβράνης (πολλές φορές ο πυρήνας των αποπτωτικών κυττάρων παίρνει σχήμα «πετάλου»). Καθώς η διαδικασία συνεχίζει, ο πυρήνας διασπάται σε πολλά θραύσματα. Η συρρίκνωση του κυτταροπλασματικού όγκου προφανώς σχετίζεται με την απώλεια ενδοκυττάρων υγρών και ιόντων.



Εικόνα 6: Τα 4 στάδια της απόπτωσης.⁴

iii. Κυτταρική διάσπαση και σχηματισμός αποπτωτικών σωμάτων

Τα κύτταρα που βρίσκονται στην φάση της απόπτωσης συνεχίζουν να συρρικνώνονται, προκαλώντας σχηματισμό που τους επιτρέπει εύκολη εγκόλπωση από όλα τα είδη κυττάρων. Το κύτταρο παροδικά υιοθετεί μια

συσπειρωμένη διάρθρωση και εμφανίζει εκτενή διάτρηση της επιφάνειάς του. Για να προωθήσουν τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα, τα αποπτωτικά κύτταρα συχνά προκαλούν βιοχημικές αλλαγές στην επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης, ώστε να ανταποκριθούν τα μακροφάγα. Οι μεμβρανικές αλλαγές μπορούν συχνά να παρατηρηθούν μορφολογικά μέσω της εμφάνισης κύστεων στη μεμβράνη, οι οποίες εμφανίζονται προς το τέλος της αποπτωτικής διαδικασίας. Επομένως το κύτταρο διασπάται σε διάφορα «αποπτωτικά σώματα», που περιέχουν μία ποικιλία συμπυκνωμένων οργανιδίων και κάποιων πυρηνικών θραυσμάτων.

iv. Φαγοκυττάρωση (καθαρισμός των αποπτωτικών σωμάτων)

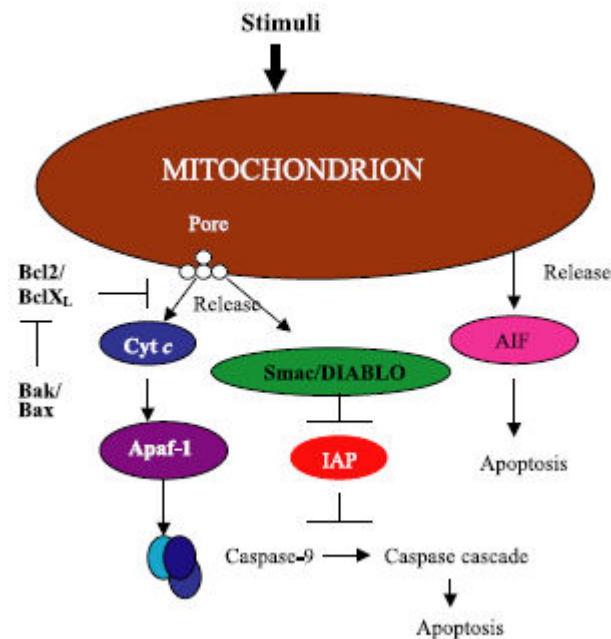
Τα αποπτωτικά σώματα εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος στο μέγεθος και στο σχήμα και δεν υπάρχει όριο στον αριθμό των αποπτωτικών σωμάτων που σχηματίζονται από ένα κύτταρο. Τα αποπτωτικά σώματα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα ή από τα γειτονικά κύτταρα που λειτουργούν μερικώς ως φαγοκύτταρα. Αυτά τα φαγοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων και για την αποφυγή προβλημάτων οφειλόμενων στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Μόλις τα αποπτωτικά κύτταρα απομακρυνθούν, τα παρακείμενα κύτταρα μετακινούνται ή πολλαπλασιάζονται για να αντικαταστήσουν το κενό που δημιουργήθηκε από την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων.

Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλούς διαφορετικούς εξωτερικούς και εσωτερικούς διεγέρτες. Ως εξωτερικοί διεγέρτες θεωρούνται η υπεριώδης ακτινοβολία, τα λιποσωμικά κυτταροτοξικά και τα αντιβιοτικά, ενώ ως εσωτερικοί διεγέρτες οι ρυθμιστές της μεταγραφής και η καταστροφή του DNA λόγω ελευθέρων ριζών οξυγόνου.⁴³⁻⁴⁶

Υπάρχουν δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια: το μιτοχονδριακό και το επαγόμενο από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου. Η σηματοδότηση και των δύο συστημάτων μπορεί να ρυθμιστεί από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (IAP), δηλαδή από πολυπεπίδια με υψηλή συμπύκνωση τα οποία αναστέλλουν εκλεκτικά τη δραστηριότητα και την ενεργοποίηση των κασπασών.^{41,48,49}

- **ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ-ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ**

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου απελευθερώνοντας αποπτωγόνους παράγοντες κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, οι οποίοι διαφορετικά είναι αποθηκευμένοι με ασφάλεια μέσα στο κύτταρο.⁴²⁻⁴⁹



Εικόνα 7: Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον κυτταρικό θάνατο.⁵

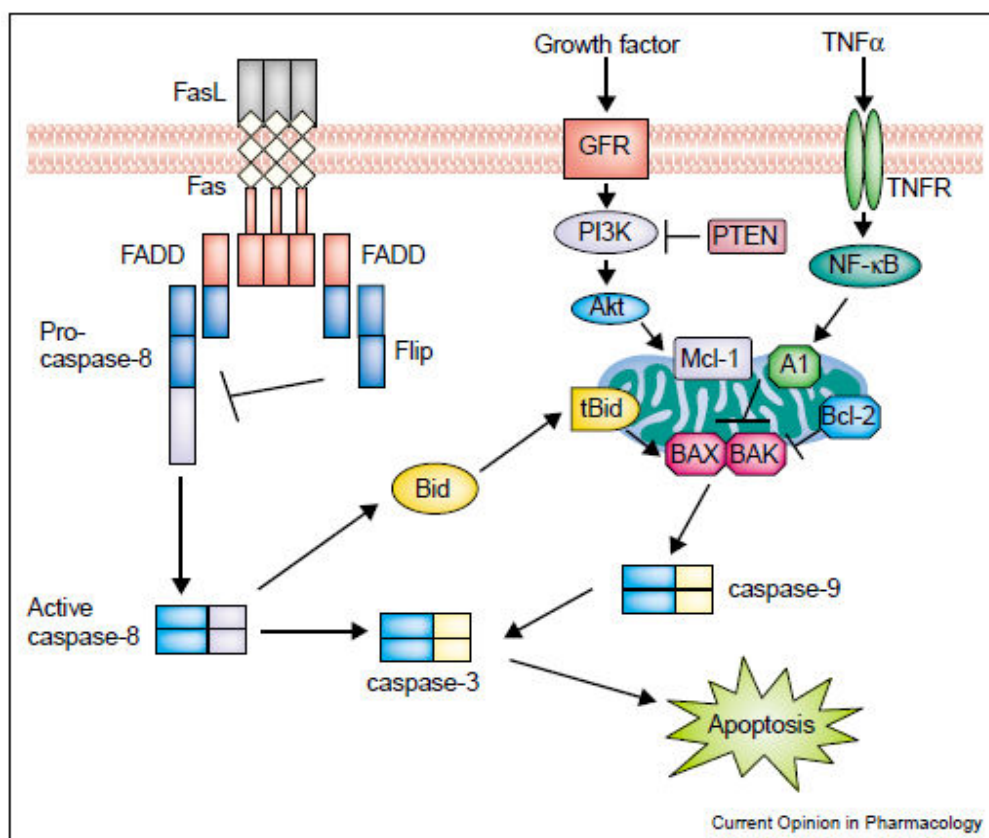
Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, η Bcl-X_L και η Bcl-2 που βρίσκονται στην εξώτερη μιτοχονδριακή μεμβράνη προωθούν την κυτταρική επιβίωση (εικόνα 7). Οι διεγέρτες προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση ή/και στη δραστηριότητα των προαποπτωτικών Bid και Bax, οι οποίες βρίσκονται στην εξώτερη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών, το κυτόχρωμα C και άλλα πολυπεπίδια απελευθερώνονται από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Το απελευθερώμενο κυτόχρωμα C προσδένεται στην Apaf1 πρωτεΐνη, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας μία APT- ή dATP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση που επιτρέπει στην Apaf1 να προσδεθεί στον προτομέα (prodomain) της προκασπάσης-9. Αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύει την πρωτεολυτική δράση της προκασπάσης-9, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των κασπασών-3 και -7 και έπειτα στην ενεργοποίηση της κασπάσης-6. Η απελευθέρωση του Smac/DIABLO αναστέλλει την αλληλεπίδραση της IAP με την κασπάση-9. Αυτή η σύνδεση φυσιολογικά καταργεί την ικανότητα της κασπάσης-9 να οδηγήσει σε

απόπτωση. Ο AIF (apoptosis inducing factor) μπορεί επίσης να επάγει την απόπτωση. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9 μπορεί μετά να διασπάσει μεταγενέστερα τις δραστικές κασπάσες. Το Bid ενεργοποιείται από την κασπάση-8 και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο για να απελευθερωθεί το κυτόχρωμα C.⁴⁵⁻⁴⁹

- **ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ- ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΘΑΝΑΤΟΥ (DEATH RECEPTORS, DR)**

Οι DR είναι υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, όπου ειδικοί δεσμευτές τους δεσμεύουν μεταδίδοντας τα σήματα της απόπτωσης,. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν έναν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και μπορούν να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες μέσα σε δευτερόλεπτα μετά από την πρόσδεση του δεσμευτή. Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω του συγκεκριμένου μηχανισμού είναι ως εκ τούτου πολύ γρήγορη. Οι πιο γνωστοί DR είναι το Fas, ο TNF-R1, ο DR-3, TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1 ή αλλιώς DR-4), TRAIL-R2 ή αλλιώς DR-5, και ο DR-6. Υπάρχουν 3 πρωτεΐνες που περιέχουν τις περιοχές θανάτου (Death Domain, DD), η TRADD (TNF-R1 associated DD), η FADD/MORT-1, και η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα RIP (receptor interacting protein). Η TRADD δρα ως προσαρμοστικό μόριο για τον TNF-R1 υποδοχέα επάγοντας την αλληλεπίδραση του TNF-R1 με την FADD, ενώ η RIP θεωρείται πως εμπλέκεται με την σηματοδότηση της NF-κB. Η ενεργοποίηση του Fas αρχίζει με την σύνδεση τουλάχιστον τεσσάρων πρωτεϊνών, οι οποίες ορίζονται ως CAP (Cytotoxicity Dependent Apo-1 Associated Proteins). Η CAP-1 και η CAP-2 έχουν ταυτοποιηθεί ως οι εναλλακτικές μορφές των φωσφορυλιωμένων στη σερίνη FADD. Οι τέσσερις συνδεδεμένες πρωτεΐνες έχουν οριστεί ως το σύμπλεγμα σηματοδοτικού θανάτου του Fas (Fas Death Signaling Complex, DISC). Μία επικρατής αρνητική εκδοχή της FADD, η οποία δεν έχει N-τελική DED (death effector domain), λειτουργεί εμποδίζοντας την πρόσδεση της CAP-3 και της CAP-4 στο DISC. Η CAP-3 και η CAP-4 δρουν μεταγενέστερα στην σηματοδοτική αλληλουχία του Fas. Το Fas και ο TNF-R2 μοιράζονται έναν DD. Ο ολιγομερισμός αυτού του τομέα οδηγεί σε πρόσληψη προσαρμοστικών πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος για την συναρμολόγηση του DISC. Ο σχηματισμός του DISC είναι απαραίτητος για την μεταγωγή σήματος του Fas. Με την ενεργοποίηση, ο DD του υποδοχέα προσδένεται στον DD της προσαρμοστικής πρωτεΐνης FADD (CAP-1 και CAP-2) και με αυτόν τον τρόπο το προσλαμβάνει για τον σχηματισμό μέρους του

DISC. Το σύμπλεγμα του DISC σχηματίζεται όταν η FADD με την σειρά της προσδένεται και προσλαμβάνει την ICE/CED-3-ομοιάζουσα πρωτεάση FLICE (CAP-4). Ο TNF-R1 με την σειρά του προσλαμβάνει μία πολλαπλή προσαρμοστική πρωτεΐνη που ονομάζεται TRADD, η οποία όπως και η FADD περιέχει έναν DD που απαιτείται για την σύνδεση του υποδοχέα. Η TRADD έχει βρεθεί πως προσδένεται σε διάφορα σηματοδοτικά μόρια όπως η FADD, η TNF-R-associated protein 2 και η RIP. Η FLICE είναι ομόλογη της FADD και της οικογένειας ICE/CED-3. Ο προτομέας (prodomain) της FLICE είναι ομόλογος με το DED της FADD, το οποίο απαιτείται για την εκκίνηση του αποπτωτικού μονοπατιού. Η TRADD ενεργοποιεί την απόπτωση και τον NF-κB. Η FADD/MORT-1 με τη σειρά της φαίνεται να συνδέεται με την προενζυμική μορφή της κασπάσης- 8 μέσω διμερισμού του τομέα DED. Η ενδογενής FADD συνδέεται με το Fas με τρόπο εξαρτώμενο της ενεργοποίησης, ενώ η ενδογενής TRADD και η RIP είναι συμπλοκοποιημένες στον ενεργοποιημένο TNF-R1.^{41,42}

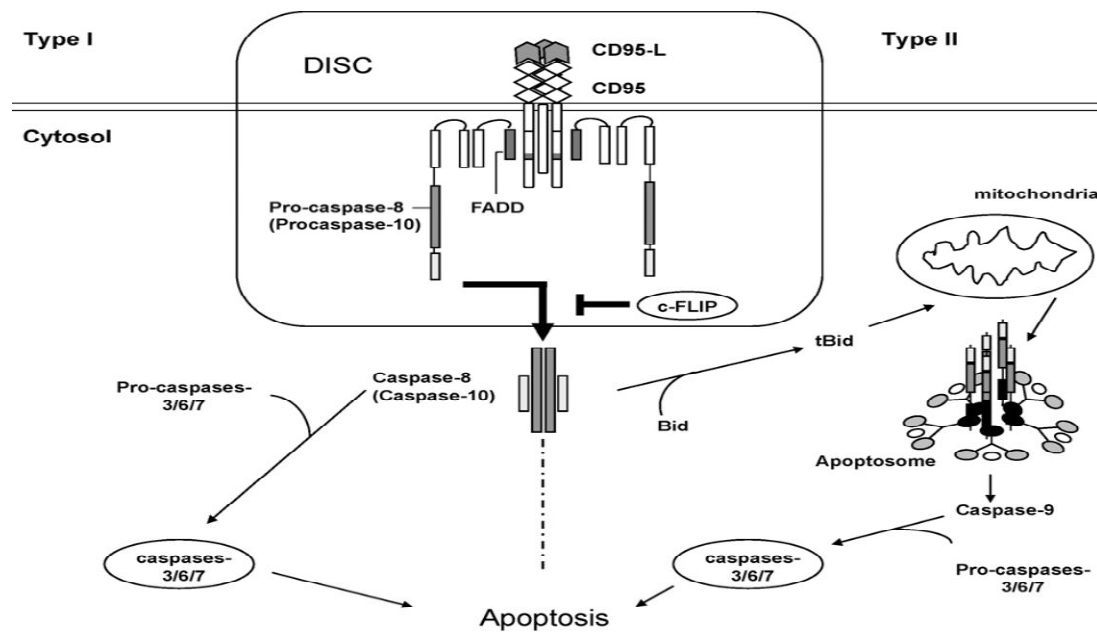


Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα της επαγόμενης απόπτωσης από τη σύνδεση Fas-FasL και ο μηχανισμός προστασίας έναντι του κυτταρικού θανάτου.⁶

Το εξωγενές μονοπάτι (εικόνα 8) ξεκινάει στην κυτταρική επιφάνεια μέσω της Fas/TNFR1 οικογένειας πρωτεϊνών. Η υποκατάσταση του Fas είτε από τον δεσμευτή

του FasL είτε από τα αγωνιστικά του αντισώματα πυροδοτεί την ομοτριμερική σύνδεση των υποδοχέων. Η ομαδοποίηση-συσπείρωση των τομέων θανάτου DD στο ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων, προσλαμβάνει την προσαρμοστική πρωτεΐνη FADD, η οποία έπειτα προσλαμβάνει την προκασπάση-8. Η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 μέσω αυτο-αποικοδόμησης οδηγεί σε μία σειρά μεταγενέστερων γεγονότων, συμπεριλαμβάνοντας την ενεργοποίηση της προκασπάσης-3, τη διάσπαση πολλαπλών υποστρωμάτων των κασπασών και την επαγωγή των μιτοχονδριακών καταστροφών. Οι Fas υποδοχείς εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων ως προσυνδεδεμένα ομοτριμερή. Το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών που σχηματίζεται μετά την ενεργοποίηση του Fas ονομάζεται DISC. Έχει βρεθεί πως ένας αριθμός πρωτεϊνών ρυθμίζει τον σχηματισμό ή την δραστηριότητα του DISC. Στο DISC η προσαρμοστική πρωτεΐνη FADD προσδένεται στο Fas. Η FADD αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μέσω των τομέων επίδρασης θανάτου DED συμπεριλαμβανομένης της κασπάσης-8. Η FADD και η κασπάση 8 είναι οι κύριες συνιστώσες του DISC. Μόλις η κασπάση-8 συνδεθεί με το FADD, η τοπικά υψηλή συγκέντρωση της κασπάσης-8 ίσως οδηγήσει σε αυτοπρωτεολυτική διάσπαση και ενεργοποίηση. Το DISC διαφέρει στους τρόπους που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της σηματοδότησης του Fas ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους.^{41,42}

Το DISC σχηματίζεται σωστά στα κύτταρα «τύπου I» (εικόνα 9) και στα επανενεργοποιημένα πρωταρχικά T κύτταρα, και η απόπτωση μπορεί να επαχθεί με δισθενή αντι-Fas διεγέρτη χωρίς επιπρόσθετη διασύνδεση. Η ενεργοποιημένη κασπάση-8 διασπά απευθείας την κασπάση-3.



Εικόνα 9: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Fas-FasL στα τύπου I και τύπου II κύτταρα.⁷

Στα κύτταρα «τύπου II» (εικόνα 9) και στα πρόσφατα ενεργοποιημένα πρωταρχικά T κύτταρα, το DISC δεν σχηματίζεται σωστά, η σύνδεση του Fas είναι αναγκαία για την επαγωγή της απόπτωσης και η κασπάση-8 δεν ενεργοποιεί την κασπάση-3, ενώ διασπά το Bid ταχέως. Το διασπώμενο tBid μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια.

Ο TNF-R1 είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας DR. Φαίνεται πως είναι ο επαγωγέας της σηματοδότησης του TNF. Μετά την πρόσδεση του δεσμευτή του, ο TNF-R1 πρσλαμβάνει αμέσως την προσαρμοστική πρωτεΐνη TRADD στο κυτταροπλασματικό δίκτυο της DD. Με την σειρά της η TRADD λειτουργεί ως μία πλατφόρμα συναρμολόγησης για τη μετάδοση του σήματος του TNF-R1 από τον DD: η αλληλεπίδραση της TRADD με την RIP-1 και την TRAF-2 οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB. Η TRADD μπορεί επίσης να προσλάβει το FADD και την προκασπάση-8, η οποία έπειτα ενεργοποιείται για την εκκίνηση της απόπτωσης.⁴¹

Υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 μονοπατιών. Η αποικοδόμηση του τομέα αλληλεπίδρασης των Bcl-2 πρωτεϊνών (Bcl-2 interacting domain, BID) των μελών της Bcl-2 οικογένειας, από την κασπάση-8 ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι μετά την επαγόμενη απόπτωση από τους DR και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απλοποίηση του αποπτωτικού σήματος.

✓ ΚΑΣΠΑΣΕΣ⁷⁰

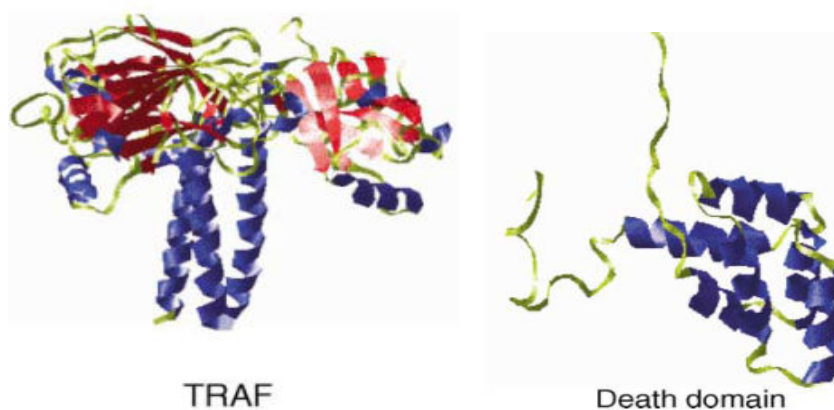
Οι κασπάσες συνθέτονται ως αδρανή πρόδρομα ένζυμα που πρέπει να διασπαστούν σε μεγάλες (17-21 kDa) και σε μικρές (10-13 kDa) υπομονάδες, σχηματίζοντας ένα ενεργό τετραμερές ένζυμο. Μία επιπλέον διάσπαση μπορεί να απομακρύνει το N-τελικό προ-τομέα (prodomain) των κασπασών. Οι μακριοί προ-τομείς κάποιων κασπασών περιέχουν μοτίβα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, τα οποία ονομάζονται DED (death effector domains), που στοχεύουν να δημιουργήσουν πρωτεϊνικά συμπλέγματα μέσα στο κύτταρο για την διευκόλυνση της ενεργοποίησης των κασπασών.

Όταν οι κασπάσες ενεργοποιηθούν, τότε διασπών και ενεργοποιούν άλλες κασπάσες για την παραγωγή μίας αλληλουχίας κασπασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Γενικά, οι κασπάσες με μακρύ προ-τομέα (κασπάση-8, κασπάση-9 και κασπάση-10) ονομάζονται εκκινήτες και διασπών και ενεργοποιούν τους μικρούς προ-τομείς της κασπάσης-2, της κασπάσης-3 και της κασπάσης-7, οι οποίες ονομάζονται ενεργοποιητές.

Τα δύο είδη πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που διευκολύνουν την ενεργοποίηση των κασπασών είναι τα «αποπτωτικά σώματα», τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και το «DISC», το οποίο εντοπίζεται στις κυτταροπλασματικές ουρές διάφορων μελών της οικογένειας των υποδοχέων TNF στην πλασματική μεμβράνη.

✓ TNF

Οι παράγοντες νέκρωσης όγκου TNF είναι μία υπερ-οικογένεια κυτταροκινών που είναι προσδεσμένες στις μεμβράνες και επάγει διάφορες διαδικασίες για την ανάπτυξη και διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες μέσω αντίστοιχων ειδικών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Σε αυτήν την οικογένεια ανήκουν ο TNF-α, το FasL, το TRAIL, το CD40L, η LTα, η 4-1BBL και άλλοι δεσμευτές. Πολλές κυταροκίνες που σχετίζονται με την οικογένεια TNF, παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για την παραγωγή φλεγμονωδών διαδικασιών ενάντια μολυσματικών και νεοπλασματικών νόσων. Δύο κύριες οικογένειες σηματοδοτικών πρωτεϊνών, η πρωτεΐνη DD και η TRAF (εικόνα 10), οι οποίες προσδένονται άμεσα στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, μεταδίδουν σήματα τα οποία αρχίζουν την κυτταρική απάντηση.⁶⁴

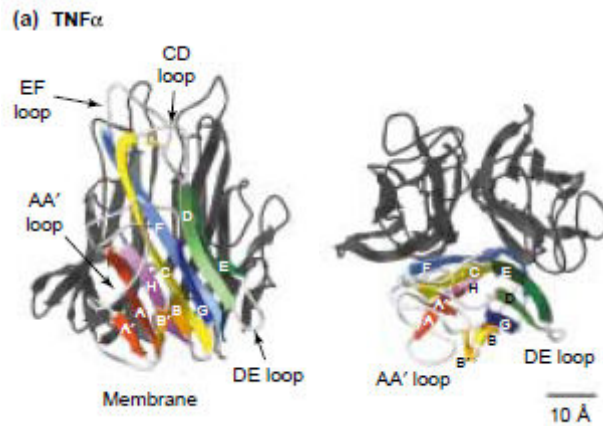


Εικόνα 10: τρισδιάστατη δομή των δύο σηματοδοτικών πρωτεϊνών DD και TRAF.⁸

Όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν είναι ευαίσθητα στην θανατηφόρο δράση του TNF. Ο μηχανισμός αντίστασης στην απόπτωση μπορεί να σχετίζεται με την επαγωγή γονιδίων που εξαρτώνται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ο NF-κB είναι κρίσιμος για την επαγωγή της αντίστασης στην από την TNF-επαγόμενη απόπτωση.

➤ **TNF-α**

Ο TNF-α (ή αλλιώς TNFSF2) είναι μια τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη με το C τελικό άκρο να βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα του κυττάρου, με μία διαμεμβρανική περιοχή και με μικρές κυτταροπλασματικές ουρές (15-25 κατάλοιπα σε μήκος). Η πρωταρχική δομή των TNF (εικόνα 11) είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία αναδιπλώνεται σε ένα αντιπαράλληλο τύπου σάντουιτς β-φύλλο με χαρακτηριστική τοπολογία «Ελληνικού κλειδιού», σχηματίζοντας ένα μόριο κωνικού σχήματος με φαρδιά βάση και στενή κορυφή. Το N-τελικό και C-τελικό άκρο βρίσκονται στη βάση του κώνου.⁶⁹



Εικόνα 11: η δομή του TNF-α.⁹

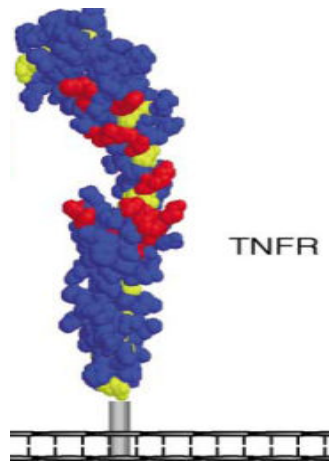
Ο TNF-α μεταφράζεται ως ένα πρόδρομο μόριο, μοριακού βάρους 26 kDa, το οποίο έπειτα υφίσταται επεξεργασία στην επιφάνεια του κυττάρου από μία μεταλλοπρωτεΐνωση (πρωτεΐνωση της κυτταρικής επιφάνειας) ώστε να παραχθεί η εκκρινόμενη μορφή με μοριακό βάρος 17 kDa. Ο TNF-α κωδικοποιείται από 3 ή 4 εξόνια και το τελευταίο εξόνιο είναι το μεγαλύτερο και κωδικοποιεί την πλειοψηφία των εξωκυττάρων περιοχών πρόσδεσης του υποδοχέα.^{64,69}

Ο TNF-α αρχικά παράγεται από τα μακροφάγα και τα T κύτταρα όταν υπάρξει αντιγονικό ή φλεγμονώδες ερέθισμα, αλλά επίσης παράγεται από τους ινοβλάστες, τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα. Ο εκκρινόμενος TNF-α διεγείρει την παραγωγή επιπρόσθετων χημειοκινών, προσταγλανδινών, πρωτεασών και παραγόντων ανάπτυξης, όπως και ουδετερόφιλων, B κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι Feldman και Maini το 1990 έδειξαν πως ο TNF-α είναι ο αρχικός επαγωγέας της καταστροφής της άρθρωσης. Η διαλυτή μορφή του TNF-α δρα με αυτοκρινή τρόπο για την απλοποίηση της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών των μακροφάγων και με παρακρινή τρόπο για την διέγερση του πολλαπλασιασμού των αρθρικών κυττάρων και την παραγωγή των πρωτεασών, χημειοκινών και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η διαλυτή μορφή του TNF-α σχετίζεται περισσότερο με την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις αρθρώσεις ενώ η μεμβρανική μορφή σχετίζεται περισσότερο με τη δραστηριότητα της νόσου στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁶⁶

➤ TNF-R

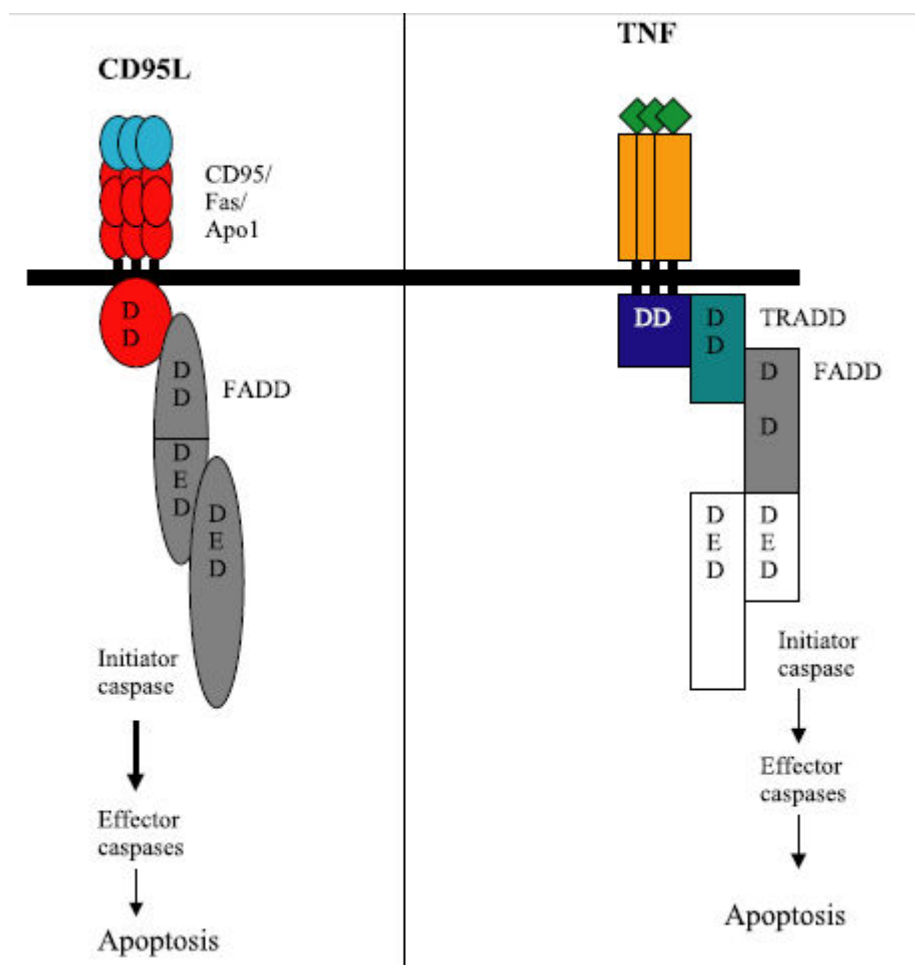
Ο TNF-α προσδένεται σε 2 υποδοχείς: τον TNF-R1 (CD120α ή TNFR60), που έχει μοριακό βάρος 55-60 kDa και τον TNF-R2 (CD120β ή TNFR80) με μοριακό βάρος 75-80 kDa.

Το γονίδιο του TNF-R1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12p13 και είναι μεμβρανικό υποδοχέας τύπου I (N τελικό άκρο στο εξωτερικό μέρος του κυττάρου) με μία μόνο διαμεμβρανική περιοχή. Το καθοριστικό χαρακτηριστικό αυτού του υποδοχέα (εικόνα 12) αλλά και των άλλων μελών της οικογένειας TNF-R (Fas, TNF-R2, CD40, 4-1BB, CD37 και άλλοι) είναι μία πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή στην εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης του δεσμευτή.⁶⁴⁻⁶⁶



Εικόνα 12: Η τρισδιάστατη δομή του TNFR.⁸

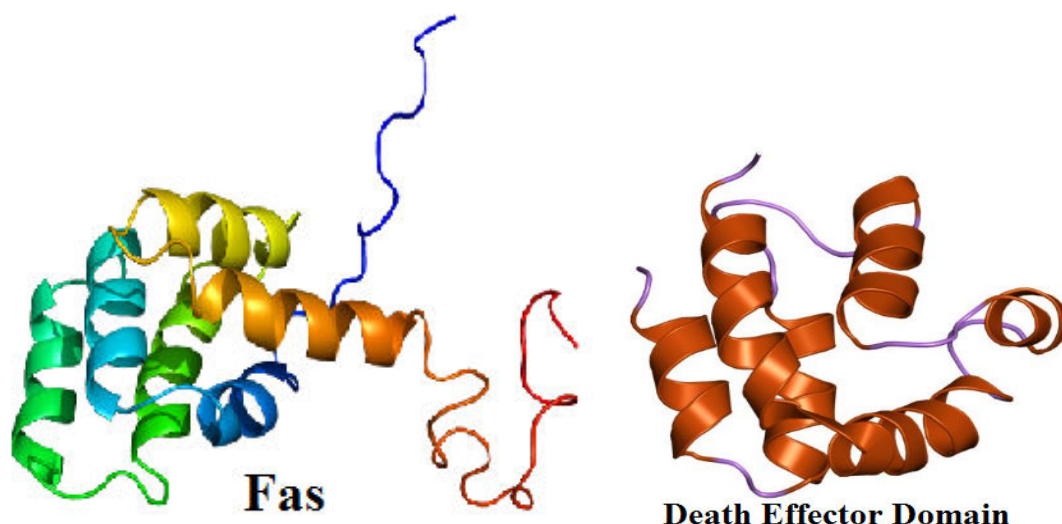
Ο TNF-R1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, όπως και στον αρθρικό ιστό και στην σύνδεση άρθρωσης-rannus όπως και στα χονδροκύτταρα.⁶⁶ Έχει μία ομόλογη περιοχή 80 αμινοξέων που ονομάζεται DD και αναδιπλώνεται σε έξι α-έλικες. Μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά ειδικά με τον TNF-R1, γνωστή ως TRADD (εικόνα 13), λειτουργεί ως ειδική προσαρμοστική πρωτεΐνη που προσλαμβάνει το FADD για την επαγωγή της απόπτωσης ή μπορεί να αλληλεπιδράσει και με την TRAF πρωτεΐνη. Ο TNF-α δηλαδή προσδένεται στον TNF-R1 και οι περιοχές του συμπλέγματος που έχουν δημιουργηθεί στο κυτταρόπλασμα προσλαμβάνουν το TRADD και το RIP σε ένα πολυσύνθετο σηματοδοτικό σύμπλοκο και η RIP ενεργοποιεί την προκάσπαση-8.⁶⁵⁻⁶⁹



Εικόνα 13: Το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης.¹⁰

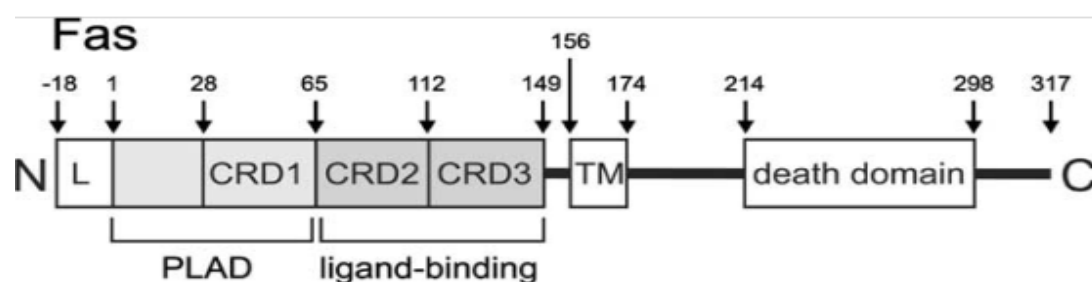
✓ FAS

Το Fas είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I με τρεις εξωκυττάριας περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (εικόνα 14), χαρακτηριστικό γνώρισμα της οικογένειας των TNF υποδοχέων. Παρόλο που οι περιοχές με τη μεγαλύτερη ομολογία αλληλουχίας ανάμεσα στα μέλη αυτής της υπερ-οικογένειας είναι εξωκυττάριας, το Fas και ο TNF-R1, έχουν μία κοινή περιοχή αλληλουχίας στο κυτταρόπλασμα που αποτελείται από 68 αμινοξέα και ονομάζεται DD. Η ικανότητα του Fas να επάγει την απόπτωση οφείλεται στον DD (εικόνα 13).⁵²



Εικόνα 14: Η τρισδιάστατη δομή του Fas και του FADD.¹¹

Το γονίδιο του Fas αποτελείται από 9 εξώνια και μία ποικιλία αντιγράφων, προερχόμενα από το συγκεκριμένο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα. Αυτά τα αντίγραφα κωδικοποιούν διάφορες διαλυτές παραλλαγές του Fas, που έχουν αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στο Fas που έχει εκφραστεί στην κυτταρική μεμβράνη. Το Fas ενεργοποιείται από το FasL.⁵⁰⁻⁵⁶



Εικόνα 15: Η δομή του Fas σε σχήμα.¹²

Το Fas είναι μια ευρέως εκφραζόμενη γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη της επιφάνειας του κυττάρου περίπου 45 kDa (335 αμινοξέα) (εικόνα 15), και ονομάστηκε Apo-1 από τον όρο apoptosis 1. Είναι ένας γλυκοσυλιωμένος τύπου I διαμεμβρανικός υποδοχέας, ο οποίος μπορεί να υπάρξει και σε διαλυτή μορφή. Το γονίδιο στον άνθρωπο για το Fas είναι το APT και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10q23. Η έκφραση του γονιδίου του Fas και των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας ενισχύεται από την ιντερφερόνη-γ (INF-γ), από το TNF και από την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων.⁵¹

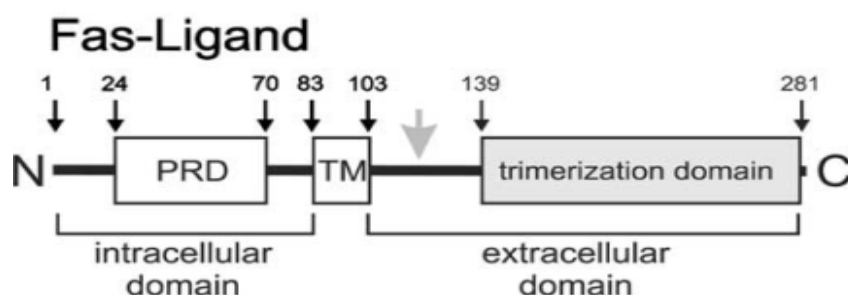
Ο υποκινητής του Fas γονιδίου έχει θέσεις πρόσδεσης για το AP1, το AP2, το Spl, το GAF, το NFκB, το NF-AT, το c-myb, το CP2, το GF1, το EBP20, και το NY-Υ.⁵²⁻⁵⁸

Το Fas μπορεί να εκφραστεί σε μία ποικιλία λεμφοκυττάρων και μη λεμφοκυττάρων όπως στα T, στα B και στα NK, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, στα μυελογενή κύτταρα και στους ινοβλάστες. Παρόλο που πολλοί κυτταρικοί τύποι εκφράζουν το Fas, κάθε κύτταρο που εκφράζει αυτόν τον υποδοχέα δεν είναι ευαίσθητο στην από το Fas-επαγόμενη απόπτωση.

Μετά την πρόσδεση του FasL, το Fas συνθέτει το DISC στον DD, το οποίο αποτελείται από το Fas, από τη προσαρμοστική πρωτεΐνη FADD, την προκασπάση-8, την προκασπάση-10 και τον ρυθμιστή της κασπάσης-8/10 c-FLICE. Ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8 οδηγεί στην διάσπασή της και απελευθέρωσή της από το DISC ως ενεργό ετεροτετραμερές. Έπειτα η ενεργή κασπάση-8 εκκινεί το πρόγραμμα απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3.⁵³

✓ FASL

Το FasL είναι μία γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη τύπου II με μοριακό βάρος 40 kDa (280 αμινοξέα) (εικόνα 16). Λόγω της αλληλουχίας των αμινοξέων ανήκει στην TNF υπερ-οικογένεια και υπάρχει 30% ομολογία ανάμεσα στο FasL και στο TNFα. Η ενεργή μορφή του FasL θεωρείται πως υπάρχει ως ομοτριμερές και μπορεί είτε να εκκριθεί ή να διασπαστεί ενζυματικά από την επιφάνεια των κυττάρων.^{52,59-63}



Εικόνα 16: Η δομή του FasL σε σχήμα.¹²

Το ανθρώπινο FasL και το FasL του μύος έχουν μεγάλη ομολογία με 76,9% ταυτοποίηση αμινοξέων. Στην πραγματικότητα το ανθρώπινο FasL μπορεί να προσδεθεί στο Fas του μύος και το FasL του μύος στο Fas του ανθρώπου. Το γονίδιο του FasL εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και περιέχει 5 εξώνια.⁵⁸⁻⁶³

Η έκφραση του FasL είναι πιο περιορισμένη από την έκφραση του Fas. Το ανθρώπινο FasL μπορεί να εκφραστεί στα Τους κύτταρα τα NK κύτταρα και στα μακροφάγα.

Το FasL εκφράζεται είτε στις κυτταρικές μεμβράνες (m FasL) είτε στη διαλυτή του μορφή (s FasL). Το s FasL προέρχεται από την m FasL μορφή μέσω διάσπασης από μεταλλοπρωτεϊνάσες. Υπάρχουν διάφορες απόψεις για το ποια μορφή είναι πιο δραστική. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η δραστικότητα δεν οφείλεται στην μορφή του δεσμεύτη αλλά στην κατάσταση διαφοροποίησης του ιστού.⁵⁷⁻⁶³

➤ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ Fas/ FasL⁵²⁻⁵⁸

Τα Fas/ FasL έχουν τρεις κύριες ανοσολογικές λειτουργίες:

- i. Η αλληλεπίδραση Fas/ FasL επηρεάζει την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων στους περιφερικούς ιστούς. Το Fas και το FasL είναι απαραίτητα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης των T κυττάρων, αλλά δεν έχουν κάποιο ρόλο στην αρχή ή ωρίμανση των T κυττάρων. Η αλληλεπίδραση Fas/ FasL δεν είναι κρίσιμη για την επιλογή των T κυττάρων που θα επιλεγθούν να αναπτυχθούν ή να μην αναπτυχθούν στον θύμο αδένα αλλά πιθανόν να ρυθμίζει την περιφερική καταστροφή των αυτοαντιδρώντων T κυττάρων. Τα B κύτταρα δεν εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση Fas/ FasL για την ανάπτυξή τους στον μυελό των οστών, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των B κυττάρων που είναι ανενεργά στην περιφέρεια, δηλαδή να ρυθμίσει την καταστροφή αυτών των ανενεργών κυττάρων.
- ii. Η έκφραση του FasL στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μπορεί να εκκινήσει την απόπτωση των κακοήθων κυττάρων, που εκφράζουν το Fas ή των κυττάρων που έχουν προσβληθεί με ιό.
- iii. Η αλληλεπίδραση Fas/ FasL μπορεί να διαδραματίσει κάποιον ρόλο στη μεταγενέστερη διαμόρφωση της ανοσολογικής απάντησης (επαγόμενος κυτταρικός θάνατος)

Το Fas/FasL επάγει την απελευθέρωση IL-1 β και την παραγωγή INF- γ στα δενδριτικά κύτταρα.

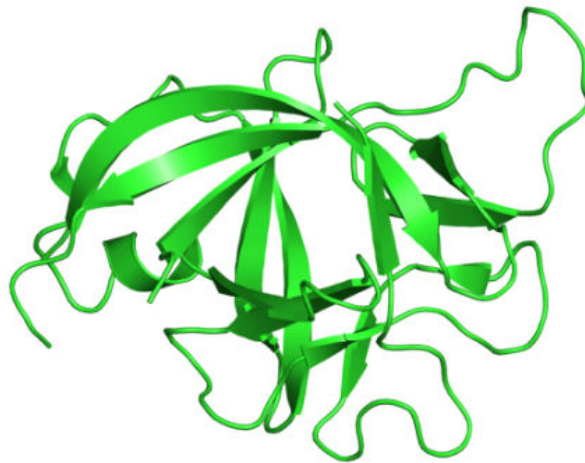
✓ INTERΛΕΥΚΙΝΗ-1, (IL-1)

Η IL-1 ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που περιγράφηκε ως πυρετογόνος και ονομάστηκε ανθρώπινο λευκοκυτταρικό πυρετογόνο. Στην οικογένεια υπάρχουν 11 μέλη.⁸⁵

Η IL-1β (εικόνα 17) είναι μία ισχυρή προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που δρα ως ενδογενές πυρετογόνο. Έχει ποικίλες δράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση, και στη λειτουργία των διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.⁸⁵

Η IL-1β επάγει τις φλεγμονώδεις νόσους εκκινώντας και ενισχύοντας ανοσολογικές και φλεγμονώδεις απαντήσεις.⁸⁶⁻⁸⁸

Τα γονίδια για την IL-1α, την IL-1β και την IL-1Ra είναι στενά συσχετιζόμενα στην περιοχή του 2q12-q21 του χρωμοσώματος 2. Οι IL-1α και IL-1β έχουν μικρή ομόλογη αλληλουχία και συντίθενται ως 31 kDa γλυκοζυλιωμένες προκυτταροκίνες που μοιράζονται το 25% τους πρόδρομης αμινοξικής αλληλουχίας και το 22% της ώριμης αμινοξικής αλληλουχίας. Η ώριμη αλληλουχία έχει μία β τρίφυλλη περιοχή, κοινή με τους ινοβλάστες και τους αυξητικούς παράγοντες.⁸⁹⁻⁹³



Εικόνα 17: Τρισδιάστατη δομή της IL-1β.¹³

Η IL-1β μεταφράζεται από την προ- IL-1β και δεν έχει βιολογική δραστηριότητα μέχρι να επεξεργαστεί από την κασπάση-1.⁸⁶

Η IL-1β παράγεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα

επιθηλιακά κύτταρα προς απάντηση σε μία κάκωση ιστού, από έναν λοιμογόνο παράγοντα ή μία τοξίνη μέσω των υποδοχέων TLR.¹⁰⁰

Η δράση της IL-1β είναι πλειοτροπική και σχεδόν όλα τα κύτταρα του οργανισμού έχουν υποδοχείς για αυτήν, κυρίως τα T και τα B λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και οι οστεοκλάστες. Έτσι λοιπόν ανάμεσα στις κύριες δράσεις της συγκαταλέγονται:⁹⁴⁻⁹⁹

- Η προσκόλληση και η μετακίνηση των φλεγμονωδών κυττάρων μέσω των πρωτεϊνών προσκόλλησης VCAM1 και ICAM1 των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Η παραγωγή προσταγλανδινών PGE2 και πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή των χόνδρων και των οστών.
- Η σύνθεση άλλων φλεγμονωδών πρωτεϊνών, όπως η CRP, η IL-6, το ινωδογόνο και το συμπλήρωμα.
- Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των B και των T κυττάρων, των μακροφάγων και των φυσικών φονιάδων (NK) κυττάρων.

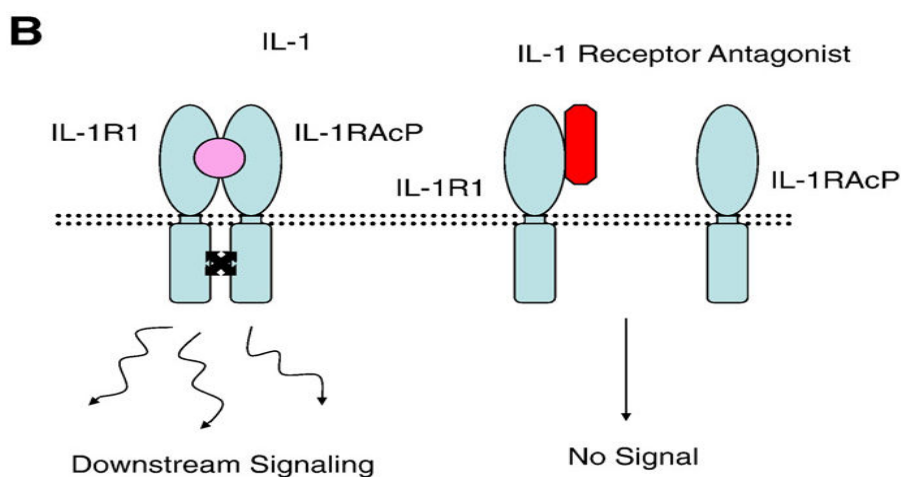
➤ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η IL-1β εκφράζεται από πολλά κύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα μικρογλοία, τα μεγακαρυοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τους ινοβλάστες και τα αρθρικά κύτταρα. Ο IL-1R1 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που ανταποκρίνονται στην IL-1β, κυρίως στα T κύτταρα, στους ινοβλάστες, στα επιθηλιακά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.⁸⁶⁻⁹¹

Ο υποδοχέας IL-1R ανήκει στην υπερικογενεία Toll- IL-1-υποδοχέων (Toll-IL1-Receptor, TIR), η οποία καθορίζεται από μία ενδοκυττάρια TIR περιοχή που εκκινεί το σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι TIR υποδοχείς χωρίζονται σε 2 υποομάδες όσον αφορά τις εξωκυττάρια περιοχές τους. Η μία ομάδα περιέχει μία περιοχή επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας πλούσιας σε λευκίνη και η άλλη ομάδα χαρακτηρίζεται από μία περιοχή ομοιάζουσα με ανοσοσφαιρίνη. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι TLR ενώ στην δεύτερη οι υποδοχείς IL-1R. Η IL-1β ασκεί τη δράση της μέσω των IL-1R1 υποδοχέων, ενώ επίσης προσδένεται και στον IL-1R2 υποδοχέα, ο οποίος αντιθέτως δρα ως παραπλανητικός υποδοχέας και δεν εμπλέκεται στην

μετάδοση σήματος, λόγω της αδυναμίας πρόσδεσης της IL-1R-AcP για την μεταγωγή του σήματος, εξαιτίας της μικρής ενδοκυττάριας αμινοξικής του αλληλουχίας.¹⁰⁰

Ο IL-1R1 υποδοχέας περιέχει μία περιοχή πρόσδεσης του δεσμευτή, η οποία αποτελείται από 3 περιοχές ομοιάζουσες με ανοσοσφαιρίνη. Επιπρόσθετα έχει ένα N-τελικό πεπτίδιο και μία περιοχή που εκτείνεται στην μία κυτταρική μεμβράνη και μία ενδοκυττάρια περιοχή 213 αμινοξέων στην οποία προσδένεται και δημιουργείται σύμπλοκο με την IL-1 accessory protein (IL-1RAcP) (εικόνα 18). Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από 319 αμινοξέα και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του δεσμευτή και αλληλεπιδρά με την ίδια συγγένεια και με την IL-1 β και με τον IL-1Ra.⁹¹⁻¹⁰⁰



Εικόνα 18: Η δράση του IL-1Ra στους υποδοχείς IL-1R1.¹⁴

Όταν οι δεσμευτές προσδεθούν στον IL-1R1 η προσέγγιση του IL-1RAcP είναι αναγκαία για τη μεταγωγή του σήματος, το οποίο εμπλέκει την πρόσληψη προσαρμοστικών πρωτεϊνών όπως της MyD88 και την ενεργοποίηση των κινασών που σχετίζονται με την IL-1R (IRAK) οδηγώντας σε ενεργοποίηση του NF-kB, των MAPK κινασών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (πχ JNK, p38).

Η μετάφραση των πρόδρομων προ IL-1 β ξεκινά μετά την κυτταρική ενεργοποίηση. Η προ- IL-1 β δεν προσδένεται στον IL-1R1 μέχρι να επεξεργαστεί από την κασπάση-1.

➤ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ IL-1β ΣΤΗΝ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η IL-1β επάγει την ενεργοποίηση των T κυττάρων, προάγει τον χημειοτακτισμό των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, διεγείρει την απελευθέρωση των πρωτεασών από τα μακροφάγα των ιστών, και ενισχύει τη διέλευση αυτών των μορίων στους ιστούς με φλεγμονή. Η IL-1β ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, οδηγώντας στο σχηματισμό pannus και διεγείρει την παραγωγή προσταγλανδινών E2 (PGE2). Με την ενεργοποίηση των αρθρικών ινοβλαστών και των χονδροκυττάρων, η IL-1β συνεισφέρει στην καταστροφή του χόνδρου, του οστού και του περιαρθρικού ιστού. Οι δράσεις της IL-1β στον χόνδρο συμπεριλαμβάνουν αύξηση της αποδόμησης της πρωτεογλυκάνης και μείωση της σύνθεσης της πρωτεογλυκάνης. Η αύξηση της αποδόμησης γίνεται μέσω της παραγωγής ουδέτερων μεταλλοπρωτεϊνών όπως η κολλαγενάση και η στρομελυσίνη, οι οποίες είναι ισχυρά ένζυμα αποδόμησης του συνδετικού ιστού. Η IL-1β αλλάζει επίσης την παραγωγή του κολλαγόνου από τα χονδροκύτταρα, μειώνοντας την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου II, το κύριο συστατικό του χόνδρου και αυξάνει της παραγωγής κολλαγόνου τύπου I.⁸⁶

➤ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΗΣ IL-1β

Τα πρωταρχικά αιμοποιητικά μονοκύτταρα, τα μακροφάγα των ιστών, και τα δ ενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούνται από την IL-1β οδηγώντας στο σχηματισμό του συμπλόκου IL-1R το οποίο αποτελείται από τον IL-1R1 υποδοχέα και το IL-1RAcP. Οι ενδοκυττάρειες περιοχές του TIR προσλαμβάνουν την MyD88 πρωτεΐνη και άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες (IRAK και TRAF) οδηγώντας στη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB μέσα στον πυρήνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή του γονιδίου και την κωδικοποίηση του πρόδρομου μορίου της IL-1β και τη μετάφρασή του σε πρωτεΐνη. Το ATP που απελευθερώνεται από τα μονοκύτταρα ή από τα κύτταρα που πεθαίνουν, συσσωρεύεται έξω από το κύτταρο. Καθώς τα εξωκυττάρια επίπεδα του ATP αυξάνονται, οι P2X υποδοχέας πουρίνης 7 (P2X7) υποδοχείς ενεργοποιούνται πυροδοτώντας την εκροή ιόντων καλίου από το κύτταρο. Τα χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα καλίου επιτρέπουν στην κασπάση-1 να συνδεθεί. Αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της προκασπάσης-1 σε ενεργή κασπάση-1. Τα συστατικά του «σώματος φλεγμονής» εντοπίζονται στα λυσοσώματα μαζί με το πρόδρομο μόριο της IL1β και με τα λυσοσωματικά ένζυμα. Στο λυσόσωμα

η κασπάση-1 διασπά το πρόδρομο μόριο της IL-1β και παράγει την ενεργή IL-1β. Έπειτα η IL-1β απελευθερώνεται μαζί με το πρόδρομο IL-1β και τα συστατικά του λυσοσώματος, ίσως μέσω της αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η ωρίμανση της πρόδρομης IL-1β ίσως να συμβαίνει και στο κυτταρόπλασμα ανεξάρτητα της δράσης της κασπάσης-1 και του «σώματος φλεγμονής».⁹⁸

➤ Ο ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ IL-1 (IL-1Ra)

Ο IL-1Ra, ανακαλύφθηκε το 1980, αναστέλλει την προφλεγμονώδη δράση της IL-1 λειτουργώντας ως ανταγωνιστικός αναστολέας για την πρόσδεση στον υποδοχέα IL-1R. Ενδογενώς ο IL-1Ra είναι παρών στον αρθρικό υμένα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο η παραγωγή ενδογενούς IL-1Ra στον αρθρικό υμένα είναι ανεπαρκής σε σχέση με την συνολική παραγωγή της IL-1. Επομένως υπάρχει μία ανισορροπία στο σύστημα, ευνοώντας τις μη ελεγχόμενες προφλεγμονώδεις δράσεις της IL-1. Η αποκατάσταση της ισορροπίας με την χορήγηση εξωγενούς ανασυνδυασμένου IL-1Ra αποτελεί μία θεραπευτική προσέγγιση.⁸⁶

Ο IL-1Ra συντίθεται και απελευθερώνεται προς απάντηση στον ίδιο διεγέρτη που οδήγησε στην παραγωγή της IL-1. Ο IL-1Ra δεν έχει την επιπρόσθετη περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών του υποδοχέα IL-1R έτσι ώστε η πρόσδεση του IL-1Ra στον IL-1R1 να αναστείλει τη σηματοδότηση της IL-1. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές του IL-1Ra. Οι τρεις βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και η τέταρτη έχει ένα πεπτίδιο και εκκρίνεται χωρίς να απαιτείται ωρίμανση.⁸⁵

Έχουν βρεθεί πολλαπλές μορφές της IL-1Ra, οι οποίες παράγονται από διαφορετικές διασπάσεις. Η διαλυτή μορφή (s IL-1Ra), η οποία είναι μία πρωτεΐνη με 152 αμινοξέα και εκκρίνεται σε γλυκοζυλιωμένη (22 kDa) και μη γλυκοζυλιωμένη μορφή (18 kDa), η ενδοκυττάρια τύπου I (ic IL-1RaI), η οποία αποτελείται από 159 αμινοξέα και δεν έχει σηματοδοτική αλληλουχία και παραμένει εντός των κυττάρων, και η ενδοκυττάρια τύπου II (ic IL-1RaII), η οποία περιέχει 21 επιπλέον αμινοξέα στο N τελικό άκρο. Ο IL-1Ra παράγεται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των πολυμορφοπύρηνων, και των ινοβλαστών. Τα κερατινοκύτταρα παράγουν σχεδόν αποκλειστικά την ic IL-1Ra. Αυτή η μορφή πιθανόν να είναι το απόθεμα των αντιφλεγμονωδών κυττάρων ώστε σε καταστάσεις εκτενούς βλάβης να απελευθερώνεται.⁸⁷

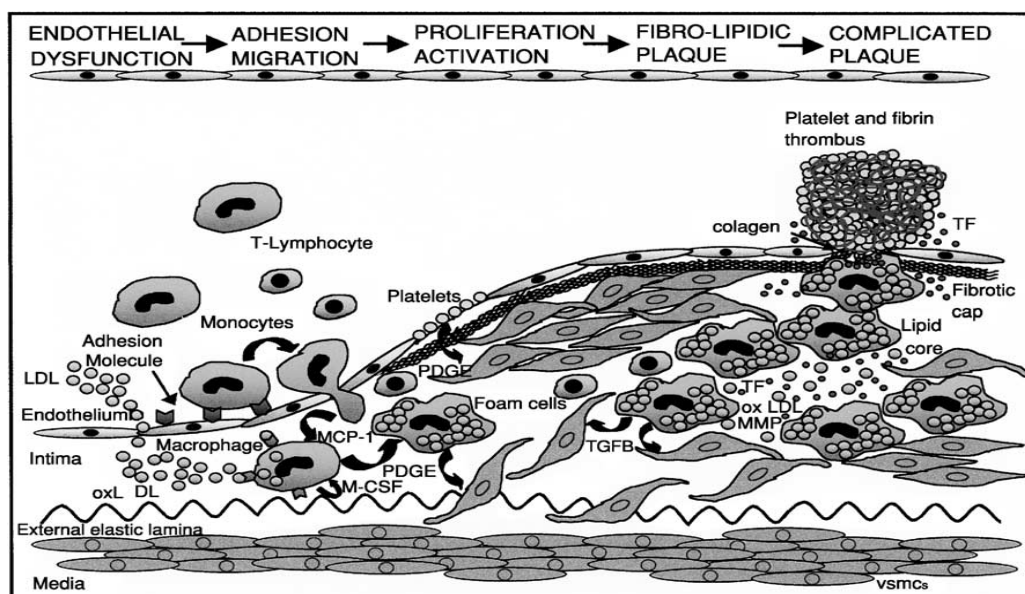
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί το μεγαλύτερο κίνδυνο για την υγεία, καθώς ένας στους τρεις θανάτους παγκοσμίως οφείλεται σε αυτήν, ενώ το 2020 εκτιμάται να είναι η πρώτη αιτία θανάτου στον κόσμο. Υπολογίζεται πως ανά 4 δευτερόλεπτα προκαλείται ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο και ανά 5 δευτερόλεπτα ένα αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.¹¹¹

Η θνησιμότητα προέρχεται από την νόσο των στεφανιαίων αγγείων, οδηγώντας σε έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιφνίδιο θάνατο ή σε χρόνια βάση, σε καρδιακή ανεπάρκεια και σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.¹⁰²

Η κύρια αιτία της ανάπτυξης της νόσου είναι η αθηροσκλήρυνση (εικόνα 19), η οποία εμφανίζεται ως αρχική συσσώρευση των λιπιδίων στο αγγειακό τοίχωμα, η οποία ακολουθείται από την αργή ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών και την αιφνίδια ρήξη τους οδηγώντας συχνά σε θανατηφόρο κλινική εκδήλωση.¹¹³

Μακροσκοπικά και σε πλήρη εκδήλωση της αθηροσκλήρυνσης, το τοίχωμα της αθηροσκληρωτικής αρτηρίας στο σημείο της πλάκας είναι πεπαχυμένο, με μειωμένη ελαστικότητα και η διάμετρος του αυλού είναι μικρότερη λόγω συσσώρευσης λιπιδίων στα μακροφάγα και είναι πιθανό τα λεία μυϊκά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται. Η πάχυνση του τοιχώματος που προκαλεί στένωση του αυλού, αντιμετωπίζεται αρχικά με εξωτερική αναδιαμόρφωση αλλά τελικά προκαλείται στένωση.¹¹¹⁻¹¹⁴

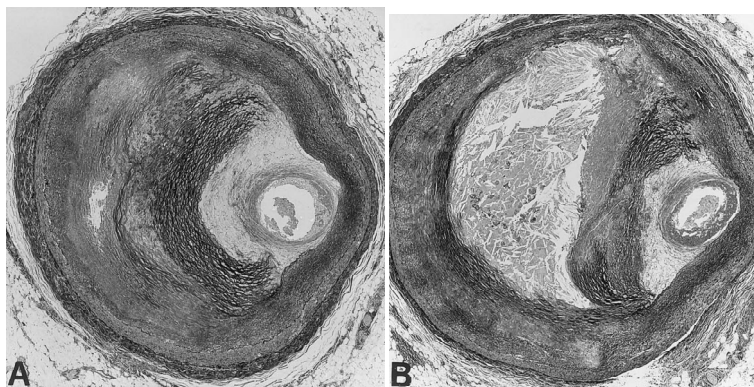


Εικόνα 19: Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εκκίνηση και εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών.¹⁹

Από μικρή ηλικία σχηματίζονται λιπώδεις γραμμώσεις (fatty streak) αλλά αυτές μπορεί να επαναπορροφηθούν. Στις μετέπειτα ηλικίες οι λιπώδεις γραμμώσεις αντιπροσωπεύουν τις αρχικές εναποθέσεις λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα ως κίτρινες, ελαφρώς διογκωμένες περιοχές στην ενδοαυλική επιφάνεια, συχνά κοντά σε περιοχές με στροβιλώδη ροή όπως στις διακλαδώσεις. Οι λιπώδεις γραμμώσεις περιέχουν συσσωρευμένα σταγονίδια λιπιδίων κάτω από το ενδοθήλιο, τα οποία βρίσκονται στους εξωκυττάριους χώρους και παγιδεύονται από τις υπερ-επιμήκειες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών, τις πρωτεογλυκάνες και μερικές φορές παγιδεύονται μέσα στα μακροφάγα δημιουργώντας τα αφρώδη κύτταρα. Οι σχηματιζόμενες αλλοιώσεις περιέχουν ζελατινώδη και οίδηματώδη εξογκώματα και αυξημένο νερό και άλας. Η ενδοθηλιακή πάχυνση στα σημεία διακλάδωσης των αρτηριών φαίνεται ως εξογκώσεις. Αυτές σχηματίζονται από τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (VSMC), το κολλαγόνο και από άλλες εξωκυττάριες πρωτεΐνες. Η αθηροσκληρωτική πλάκα φαίνεται κιτρινωπή λόγω της εναπόθεσης λιπιδίων και λευκή λόγω του επιφανειακού ινώδους ιστού κολλαγόνου. Οι νεκρωτικές περιοχές δημιουργούνται στα εσωτέρα τμήματα της βλάβης, μετατρέποντάς την σε μία χωρίς δομή συσσώρευση εξωκυττάριων λιπιδίων, κρυστάλλων χοληστερόλης και πολλών φλεγμονωδών κυττάρων. Καθώς η πλάκα σχηματίζεται και παχύνεται, ο μέσος χιτώνας λεπταίνει στην προσπάθειά του να διασταλεί και να διατηρήσει τη βατότητα και την επαρκή

ροή του αίματος για την αιμάτωση των ιστών. Η αύξηση της πλάκας εμπλέκει επίσης πολλαπλές μικροαγγειακές ρήξεις και επομένως θρομβώσεις και αιμόσταση.^{116,118,120}

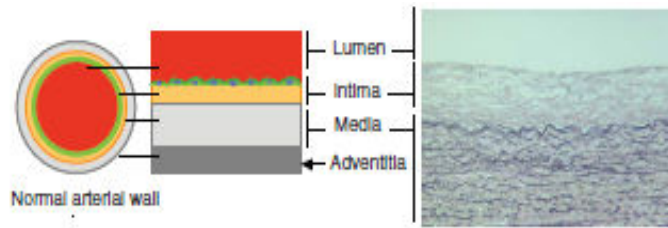
Οι πλάκες θεωρούνται και χαρακτηρίζονται ως σταθερές και ως ασταθείς (εικόνα 20). Οι ασταθείς θεωρούνται επικίνδυνες, διότι έχουν μαλακό επίκεντρο. Οι ασταθείς δεν είναι απαραίτητο να προκαλούν μεγάλη στένωση στον αυλό αλλά η ρήξη τους μπορεί να οδηγήσει σε θρόμβωση και μερική ή ολική απόφραξη οδηγώντας σε έμφραγμα ή εγκεφαλικό ή γενικά σε ισχαιμία κάτω άκρων.^{116,118,120}



Εικόνα 20: Ωριμες αθηρωματικές πλάκες (Α) σκληρή σκληρωτική πλάκα, (Β) μαλακή σκληρωτική πλάκα.¹⁶

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΡΤΗΡΙΑΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

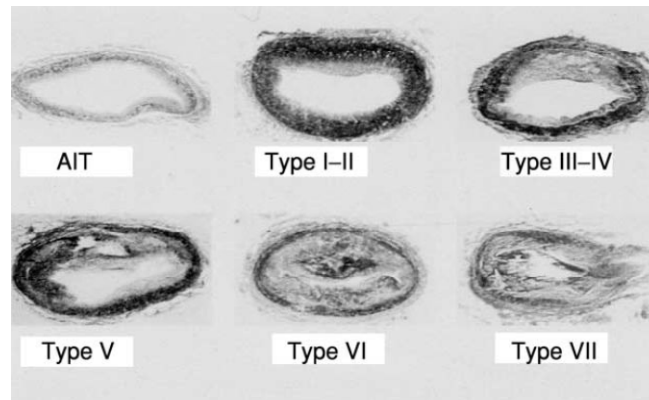
Η αρτηρία αποτελείται από τον έσω, μέσο, και έξω χιτώνα (εικόνα 21). Ο έσω χιτώνας στη βρεφική ηλικία είναι ένας λεπτός χιτώνας συνδετικού ιστού και μεμονωμένων λείων μυϊκών κυττάρων. Με την πάροδο της ηλικίας η βασική μεμβράνη παχύνεται με το σχηματισμό κολλαγόνου και την αύξηση των λείων μυϊκών ινών, αυξάνοντας την ποσότητα του συνδετικού ιστού. Στη μετέπειτα ηλικία παρατηρείται συγκεντρική αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων. Στον έσω χιτώνα εμφανίζεται η αθηροσκλήρυνση. Ο μέσος χιτώνας, που αποτελεί το μυϊκό χιτώνα της αρτηρίας και αποτελείται από στρώσεις λείων μυϊκών ινών με ενδιάμεσες στρώσεις ινών κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών, περικλείεται από ελαστικές ίνες με αρκετά ανοίγματα επιτρέποντας την είσοδο και την έξοδο των κυττάρων και των ουσιών στο αρτηριακό τοίχωμα. Ο έξω χιτώνας έχει πυκνή δομή κολλαγόνου, ελαστικών ινών και ινοβλαστών με μερικά λεία μυϊκά κύτταρα.¹¹⁹



Εικόνα 21: Η δομή του αρτηριακού τοιχώματος.¹⁷

- **ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ**

Η American Heart Association κατηγοριοποίησε τα στάδια των αθηρωματικών βλαβών σε 6 φάσεις-τύπους (εικόνα 22):¹¹⁰



Εικόνα 22: Κατηγοριοποίηση των αθηρωματικών βλαβών σύμφωνα με την American Heart Association.¹⁸

- ✓ **ΤΥΠΟΣ I:** πάχυνση του αρτηριακού χιτώνα (AIT), ξεκινά με τη μετακίνηση των λείων μυϊκών κυττάρων (VSMC) στον έσω χιτώνα και μικρή συσσώρευση LDL και μακροφάγων στον χώρο ανάμεσα στο υποενδοθήλιο-έσω χιτώνα.
- ✓ **ΤΥΠΟΣ II:** η τροποποιημένη LDL προσελκύει τα μονοκύτταρα και τα VSMC, τα οποία την προσλαμβάνουν σχηματίζοντας τα αφρώδη κύτταρα.
- ✓ **ΤΥΠΟΥ III, IV:** εκτός από την συσσώρευση των αφρώδων κυττάρων υπάρχει και εξωκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων, προερχόμενα από κύτταρα νέκρωσης. Αυτοί οι τύποι είναι χαρακτηριστικοί στην 3^η δεκαετία της ζωής.
- ✓ **ΤΥΠΟΥ V:** πολλές στρώσεις κολλαγόνου καλύπτουν το λιπιδικό πυρήνα ρυθμίζοντας την ευαισθησία της βλάβης να υποστεί ρήξη και να σχηματιστεί θρόμβος. Η συσσώρευση ινών κολλαγόνου οδηγεί σε προοδευτική στένωση του αυλού.

- ✓ ΤΥΠΟΥ VI: κατά τη διάρκεια της 4^{ης} δεκαετίας της ζωής. Οι βλάβες μπορούν να υποστούν ρήξη και να πυροδοτήσουν θρομβωτικές εναποθέσεις
- ✓ ΤΥΠΟΥ VII: κατά την 5^η δεκαετία της ζωής. Οι περισσότερες από τις βλάβες παρουσιάζουν προχωρημένο στάδιο και αποτελούνται από ασβεστοποίηση.
- ✓ ΤΥΠΟΥ VIII: κατά την 5^η δεκαετία της ζωής. Οι περισσότερες από τις βλάβες παρουσιάζουν προχωρημένο στάδιο και αποτελούνται από ινώδη ιστό.

• Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΣΗΣ

Οι αθηρωματικές πλάκες αποτελούνται: ^{114,116,117,120,121}

- ✓ Συνδετικό ιστό (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, και ελαστικές ίνες)
- ✓ Κρυσταλλική χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια
- ✓ Μακροφάγα, Τ λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα.

Ανάλογα με την ηλικία και τις ανάγκες του οργανισμού, η αρτηρία προσαρμόζεται στις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στο τοίχωμά της προσαρμόζοντας την πάχυνση του τοιχώματός της μέσω της διέγερσης των λείων μυϊκών της κυττάρων. Έτσι λοιπόν πιο παχιές περιοχές εμφανίζονται στις διακλαδώσεις των αγγείων. Στις περιοχές αυτές με την πάχυνση εναποτίθενται αφρώδη κύτταρα και λιπίδια. Ο βαθμός εναπόθεσης είναι κυρίως ανάλογος της διαπερατότητας των περιοχών αλλά και της διάρκειας της έκθεσης στα σωματίδια, τα οποία όταν έρχονται σε επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος μπορούν να εισαχθούν στο μέσο χιτώνα της αρτηρίας. Υπάρχουν τρεις τύποι διαπερατότητας στα λιπίδια: ^{114,116,117,120,121}

- ✓ Τύπος 1: περιοχές χωρίς προσαρμοστική πάχυνση και χαμηλής αθηρογένεσης (τα λιπίδια δεν αθροίζονται με εξαίρεση αν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών είναι υψηλά) όπως οι αρτηρίες των άνω άκρων και των πνευμόνων και η κατιούσα αορτή.
- ✓ Τύπος 2: περιοχές μέσης αθηρογένεσης (τύπος αθηρώματος I και II) δηλαδή περιοχές με βραδεία εξέλιξη της αθηρογένεσης.
- ✓ Τύπος 3: περιοχές με μεγάλη αθηρογένεση, όπως ο διχασμός της κοινής καρωτίδας και ο διχασμός των λαγόνιων. Σε αυτές τις περιοχές υπάρχει

μεγάλη πάχυνση του τοιχώματος αλλά και μεγάλος αριθμός αφρώδων κυττάρων.

- **ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ**

Η αθηροσκλήρυνση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος και τα φλεγμονώδη κύτταρα συσσωρεύονται στις αθηροσκληρωτικές βλάβες σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και συμμετέχουν σε παθολογικές απαντήσεις που οδηγούν σε περίπλοκες βλάβες.¹⁰²

- ✓ **ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ/ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ**

Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία προσλαμβάνουν και συσσωρεύουν αποθέματα λιπιδίων στον αρτηριακό έσω χιτώνα και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα προκαλούν άφθονες βλάβες και σχηματισμό λιπιδίων γραμμώσεων και είναι κρίσιμα για το σχηματισμό αθηρωμάτων.^{114,116,117,120,121}

Τα αφρώδη κύτταρα δεν μεταναστεύουν παραμένοντας παγιδευμένα μέσα στις βλάβες και αυτό ίσως να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της οξειδωμένης LDL με τον CD35 υποδοχέα-εκκαθαριστή Β τάξης των μακροφάγων.^{114,116,117}

Τα μακροφάγα είναι η κύρια πηγή κυτταροκινών στις αθηροσκληρωτικές βλάβες, και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 και τον ανασταλτικό παράγοντα μετακίνησης των μακροφάγων (MIF), όπως και τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10 και TGFβ. Ο TNF-α, η IL-1 και η IL-6 εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό από τα αφρώδη κύτταρα στις βλάβες, με αποτέλεσμα η IL-1β και ο TNF-α να αυξάνουν την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης.¹¹⁶

Τα μακροφάγα είναι σημαντική πηγή και για τις μεταλλοπρωτεΐνες, οι οποίες όχι μόνο επηρεάζουν την ανάπτυξη των βλαβών αλλά επίσης αποδομούν τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες οδηγώντας σε ανάπτυξη ασταθών αθηρωματικών βλαβών επιρρεπών σε ρήξη.^{114,116,117,120,121}

- ✓ **ΛΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

Αυτά συσσωρεύονται στις αθηρωματικές βλάβες και είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης της χοληστερόλης, της ανοσολογικής απάντησης και της πόλωσης των Τ κυττάρων. Στην ομοιόσταση της χοληστερόλης συνεισφέρουν άμεσα στην εκκίνηση και στην υποχώρηση της αθηροσκλήρυνσης.^{114,116,117,127}

Υπό υπερλιπιδαιμικές συνθήκες τα δενδριτικά κύτταρα φαίνεται να συσσωρεύονται στον υποενδοθηλιακό χώρο πριν τα μακροφάγα, όπου αυτά προωθούν τον σχηματισμό των πολύ αρχικών λιπιδίων γραμμώσεων. Είναι επίσης σημαντικοί ρυθμιστές της χοληστερόλης του πλάσματος και των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών και εμπλέκονται και στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από τις αθηρωματικές βλάβες. Όταν όμως αυτά τα επίπεδα είναι χαμηλά τα δενδριτικά κύτταρα απομακρύνουν αποτελεσματικά τα λιπίδια από τις βλάβες συνεισφέροντας στην υποχώρηση της βλάβης.^{114,116,117,120,127}

✓ **T ΚΥΤΤΑΡΑ**

Τα T κύτταρα και πιο συγκεκριμένα τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T κύτταρα συσσωρεύονται στις αθηρωματικές βλάβες και αυξάνονται σε αριθμό σε προχωρημένες βλάβες.^{102,116,117,120,121,127}

✓ **ΤΑ CD4⁺ TH1 ΚΑΙ TH2 ΚΥΤΤΑΡΑ**

Τα CD4⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται σε βοηθητικά T1 κύτταρα (TH1) ή σε TH2. Τα CD4⁺ TH1 κύτταρα παράγουν τον TNF-α, την IL-1, την IL-18 και την INF-γ. Η INF-γ μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, να περιορίσει την παραγωγή του κολλαγόνου και να αυξήσει την έκκριση των μεταλλοπρωτεϊνών οδηγώντας σε ανάπτυξη αθηρωματικών βλαβών, οι οποίες είναι επιρρεπείς σε ρήξη. Παρόλο που τα CD4⁺ TH2 κύτταρα φαίνεται να ανταγωνίζονται την προαθηρωματογόνο δράση των CD4⁺ TH1 κυττάρων, ο ρόλος τους φαίνεται να εξαρτάται από τις κυτταροκίνες που παράγουν. Εκκρίνουν IL-4, IL-5, IL-10, και IL-13 (η IL-4 φαίνεται να έχει προαθηρωματογόνο δράση, ενώ η IL-5 αντιαθηρωματογόνο).^{102,117,127}

✓ **T ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΙΑΔΕΣ- NKT**

Τα NKT είναι υποομάδα των T κυττάρων, έχοντας τη δράση των T κυττάρων και των NK. Αυτά τα κύτταρα όταν ενεργοποιηθούν παράγουν INF-γ και IL-4 και μπορούν να ενεργοποιηθούν από διάφορα λυσοφωσφολιπίδια, τα οποία παρουσιάζονται από τα δενδριτικά κύτταρα ή/και από τα μακροφάγα.^{102,116,126}

✓ **B ΚΥΤΤΑΡΑ**

Τα B κύτταρα ενίοτε είναι παρόντα στις αθηρωματικές βλάβες αλλά είναι επικρατέστερα στις αθηρωματικές βλάβες στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Στις προχωρημένες βλάβες τα B κύτταρα συσσωρεύονται στον έξω χιτώνα σε οργανωμένες δομές που μοιάζουν με λεμφικό θυλάκιο, γεγονός που υποδηλώνει τοπική παραγωγή χυμικών απαντήσεων. Παρόλα αυτά ο ρόλος τους στην αθηροσκλήρυνση δεν είναι ξεκάθαρος. Σύμφωνα με τους Yanaba et al¹²³ τα B κύτταρα υπάρχουν σε 3 υποομάδες στους μύες, την B1, την B2 και την B10. Τα B1 κύτταρα, βρίσκονται κυρίως στο περιτόναιο και παράγουν μόνο IgM αντισώματα, ενώ τα B2 κύτταρα απαιτούν τη συγγενή ενεργοποίηση των T κυττάρων και παράγουν διάφορους ισότυπους αντισωμάτων. Τα B10 κύτταρα θεωρούνται αρνητικοί ρυθμιστές της φλεγμονής και παράγουν IL-10. Τα B κύτταρα ίσως να προστατεύουν από την αθηροσκλήρυνση, αλλά δεν έχει γίνει κάποια μελέτη ώστε να απονεμηθεί αυτή η προστατευτική δράση σε κάποιον υπότυπο. Σύμφωνα με τους Karvonen et al¹²² στους ανθρώπους τα IgM αυτοαντισώματα για την οξειδωμένη LDL δείχνουν μεγάλη συσχέτιση με την καρωτιδική αθηροσκλήρυνση, δίδοντας έναν προστατευτικό ρόλο στα B κύτταρα που παράγουν IgM. Πολύ πρόσφατες όμως μελέτες των Kyaw et al¹²⁴ δείχνουν πως τα B κύτταρα μπορούν να έχουν και προαθηρογόνο δράση, αφού τα B2 κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί ως ο προαθηρογόνος υπότυπος των B κυττάρων.^{102,116,117,120}

✓ ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

Τα μαστοκύτταρα συσσωρεύονται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης, όπως και στα σημεία ρήξης, διάβρωσης και νεοαγγείωσης των στεφανιαίων αθηρωμάτων. Στις βλάβες τα μαστοκύτταρα παράγουν FGF-2 το οποίο προάγει την νέο-αγγείωση και συνεισφέρει στην εξέλιξη της βλάβης. Η IL-6 και η INF-γ που προέρχονται από τα μαστοκύτταρα, συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης.¹⁰²

Όσον αφορά τα ουδετερόφιλα, κάποιες μελέτες έδειξαν πως αυτά βοηθούν στην ανάπτυξη της βλάβης αλλά και συμμετέχουν στη ρήξη, ωστόσο θα πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες για εξακρίβωση.¹⁰²

• ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενδοθηλιακή μονοστιβάδα που εφάπτεται στο αίμα είναι αδρανής στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Ένα από τα μόρια προσκόλλησης λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο είναι το VCAM1 (μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων), το οποίο προσδένεται συγκεκριμένα στα

μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα. Μαζί με το VCAM1 η D και η E σελεκτίνη και το ICAM1 (ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης) φαίνεται να συνεισφέρουν στην πρόσληψη των λευκοκυττάρων. Το λευκοκύτταρο μόλις προσδεθεί στο ενδοθήλιο εισέρχεται στον έσω χιτώνα με διαπήδηση, μία διαδικασία που διευκολύνεται από διάφορα χημειοτακτικά όπως η MCP-1, η IL-8, χημειοτακτικά που επάγονται από την INF-γ. Μόλις εισαχθούν στον έσω χιτώνα τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα εκφράζοντας κάποιους υποδοχείς εκκαθάρισης (SR) όπως ο CD36, οι οποίοι εσωτερικεύουν τα τροποποιημένα LDL μόρια προς σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.^{114,116,117,120,121}

- **ΡΟΛΟΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

Η χοληστερόλη μεταφέρεται στο αγγειακό τοίχωμα ως συστατικό των λιποπρωτεϊνών. Οι LDL θεωρούνται οι πιο αθηρωματογόνες λιποπρωτεΐνες επειδή συσσωρεύονται στον έσω χιτώνα και μεταφέρουν μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης.

Εξωκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων στον έσω χιτώνα συμβαίνει σε απάντηση των αυξημένων επιπέδων λιποπρωτεϊνών. Η LDL μπορεί να υποστεί τροποποιήσεις όπως οξειδωση, ενζυματική και μη ενζυματική τροποποίηση. Αυτές οι μορφές LDL σχετίζονται με την αυξημένη αθηρογένεση επειδή οι φυσιολογικές ιδιότητες των λιποπρωτεϊνών αλλάζουν. Αυτό οδηγεί σε αλλαγές των βιολογικών ιδιοτήτων των LDL.^{112,115}

- **ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΦΡΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Οι τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες προσλαμβάνονται μέσω μηχανισμών οι οποίοι δεν ρυθμίζονται από τη χοληστερόλη, οδηγώντας σε υψηλή ενδοκυττάρια συσσώρευση εστέρα χοληστερόλης και σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων είναι ένα από τα αρχικά στάδια της πορείας της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας. Οι διάφορες τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες ρυθμίζουν προς τα άνω τους υποδοχείς. Για παράδειγμα η oxLDL αυξάνει την έκφραση διαφόρων SR υποδοχέων όπως των CD36 και SRA.¹²⁵

- **ΡΟΛΟΣ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ**

Το κολλαγόνο είναι το κύριο συστατικό του αγγειακού τοιχώματος και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της ελαστικότητας του αγγειακού τοιχώματος. Το κολλαγόνο εμπλέκεται στη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης, της προσκόλλησης, της μετακίνησης, του πολλαπλασιασμού και της

απόπτωσης. Το περισσότερο κολλαγόνο παράγεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα.^{111,125}

- **ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (VSMC)**

Τα VSMC αποτελούν το περίπου 50% των κυττάρων στην προχωρημένη αθηρωματική πλάκα. Προς απάντηση σε πολλαπλά ερεθίσματα τα VSMC ενεργοποιούνται και μετακινούνται από το μέσο προς τον έσω χιτώνα όπου και πολλαπλασιάζονται. Αυτή η διαδικασία φαίνεται να συμβαίνει στα αρχικά στάδια στην εκκίνηση της αθηρωματικής διαδικασίας.^{111,113}

- **ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ**

Στον υγιή πληθυσμό το ενδοθήλιο σχηματίζει ένα πολυλειτουργικό περιβάλλον ανάμεσα στο αίμα και στους διάφορους ιστούς και στα όργανα. Αποτελεί ένα φραγμό εκλεκτικής διαπέρασης για μακρομόρια όπως και μία μη θρομβογόνο επιφάνεια που διατηρεί ενεργά τη ρευστότητα του αίματος. Το ενδοθήλιο είναι ένα περίπλοκο όργανο που ανταποκρίνεται στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και ενεργοποιεί αγγειοσυσπαστικά μόρια όπως την αγγειοτασίνη II και αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες όπως το Μονοξείδιο του Αζώτου (NO). Οι αγγειοδραστικές ενώσεις επάγουν τον αγγειακό τόνο, τη δομή, και τη λειτουργία επηρεάζοντας την ανάπτυξη των VSMC, την απόπτωση, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα μονοκύτταρα και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και την θρόμβωση. Η ομοιόσταση αυτή διαταράσσεται από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, οδηγώντας σε αλλαγές στην αγγειακή δομή και λειτουργία. Οι παράγοντες κινδύνου των καρδιαγγειακών παθήσεων σχετίζονται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η αυξημένη αγγειοτασίνη II διεγείρει την NADPH/NADH οξειδάση στο ενδοθήλιο, στα VSMC και στον έξω χιτώνα των αγγείων προς παραγωγή ROS οδηγώντας σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φλεγμονή. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε ρύθμιση προς τα άνω της ενδοθηλίνης-1, του NF-kB, των μορίων προσκόλλησης και των άλλων επαγωγέων φλεγμονής όπως και αυξημένη αποδόμηση του NO και αποσύζευξη της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) οδηγώντας σε τραύμα.^{111,113,125}

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα μόρια προσκόλλησης υποκινούν την προσκόλληση και μετακίνηση των λευκοκυττάρων κατά μήκος των ενδοθηλιακών κυττάρων ώστε να εισέλθουν στο σημείο του τραύματος. Επιπλέον οι ROS επάγουν

τη διάσπαση της ακεραιότητας της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνοντας την προσκόλληση των oxLDL.¹²⁵

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν διαφορετικά στις διάφορες κυτταροκίνες. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β επάγουν παροδική και αναστρέψιμη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Ο TNF-α ενεργοποιεί τον NF-kB με επακόλουθη ρύθμιση προς τα άνω των προσκολλητικών πρωτεϊνών. Ο TNF-α ενισχύει την προσκόλληση στο ενδοθήλιο και την προσβολή των αγγείων από τα δενδριτικά κύτταρα. Επομένως ο TNF-α μπορεί να μειώσει την ενδοθηλιακή δραστηριότητά του μέσω διάφορων μονοπατιών. Επίσης το οξειδωτικό στρες που επάγεται από τον TNF-α μπορεί να προκαλέσει απόπτωση του ενδοθηλίου μέσω της ενεργοποίησης του Fas.^{111,113,125}

ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΣΥΝΥΠΑΡΧΟΥΣΕΣ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ

Ρευματοειδής αρθρίτιδα και καρδιαγγειακή νόσος:

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα, είναι η πιο συχνή συστηματική αυτοάνοση ασθένεια και συνδέεται με εκτεταμένη θνητότητα λόγω καρδιαγγειακών αιτιών.¹⁰³ Οι ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν επωμίζονται μόνο το υψηλό φορτίο της ίδιας της νόσου, αλλά επιπλέον έχουν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιακή νόσο, συγκριτικά με άτομα χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁰⁴ Περίπου μισοί από τους θανάτους ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα οφείλονται σε καρδιαγγειακά αίτια, με επικρατέστερα το έμφραγμα του μυοκαρδίου και τη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.¹⁰⁵ Επομένως, μπορεί να προταθεί ότι η κύρια αιτία θνητότητας και νοσηρότητας είναι η ισχαιμική καρδιακή νόσος για τους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁰⁵

Η φλεγμονώδης φύση της αθηροσκλήρωσης είναι πλέον καλά αναγνωρισμένη. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι το κλειδί της ανάπτυξης αθηροσκληρυντικής αγγειακής νόσου, η οποία σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό καρδιαγγειακών συμβαμάτων.¹⁰⁶ Πολλές επιδημιολογικές, κλινικές και εργαστηριακές μελέτες έχουν προτείνει ότι η χρόνια συστηματική φλεγμονή και η απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έχουν κεντρικό ρόλο στην επιτάχυνση της αθηροσκλήρωσης.^{103,104} Αν αυτό ισχύει, μπορεί να εξηγηθεί ο υψηλότερος από τον αναμενόμενο ρυθμό καρδιαγγειακής νόσου που παρατηρείται σε ασθενείς με χρόνια συστηματική φλεγμονώδη νόσο, όπως η

ρευματοειδής αρθρίτιδα.¹⁰⁷ Σύμφωνα με τα παραπάνω έχει βρεθεί ότι οι λειτουργικές ανωμαλίες του ενδοθηλίου σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφανίζονται ανεξάρτητα από την ηλικία, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της νόσου ή την ύπαρξη ρευματοειδούς παράγοντα.¹⁰⁸ Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει έκπτωση της αγγειοδιαστολής που εξαρτάται από το ενδοθήλιο των αγγείων σε ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα και έχουν μεγάλη έξαρση της φλεγμονής.¹⁰⁹ Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ένα υποκλινικό καρδιακό υπόβαθρο κατά τη διάρκεια της πορείας της νόσου.¹⁰³

Έχουν βρεθεί ομοιότητες μεταξύ της παθογένειας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της αθηροσκληρυντικής αγγειακής νόσου.^{107,110} Τα κοινά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν:

- Συμμετοχή κυτταροκινών, όπως ο TNF-α και η IL-6.¹⁰⁷
- Αυξημένες συγκεντρώσεις C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, ινωδογόνου και αμυλοειδούς-A.¹⁰⁷
- Αυξημένη τοπική έκφραση μορίων προσκόλλησης και ενδοθηλίνης-1.¹¹⁰
- Αναστολή της νεοαγγειογένεσης και της ανάπτυξης του κολλαγόνου μέσω της δράσης μακροφάγων και μαστοκυττάρων.¹⁰⁶

Οι παραπάνω ομοιότητες οδηγούν στην υπόθεση ότι ο φλεγμονώδης μηχανισμός που ευθύνεται για τις αρθρικές βλάβες στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, μπορεί επίσης να αναπτύσσεται και στο τοίχωμα των αγγείων των ασθενών και να διευκολύνει την ανάπτυξη αθηροσκληρυντικών αλλοιώσεων. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί η αυξημένη εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Πολλοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την εκτεταμένη εμφάνιση καρδιαγγειακής θνητότητας σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁰⁴

- Η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η καρδιαγγειακή νόσος χαρακτηρίζονται από μερικούς ίδιους παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα και η παχυσαρκία.¹¹⁰
- Οι ασθενείς με εγκατεστημένη ρευματοειδή αρθρίτιδα πιθανόν να έχουν μεγαλύτερη παρουσία κλασικών παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο συγκριτικά με άτομα χωρίς ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁰⁴

- Η συστηματική φλεγμονή στη ρευματοειδή αρθρίτιδα μπορεί να δρα ανεξάρτητα από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο μέσω βιολογικών μηχανισμών.¹⁰⁴
- Οι φλεγμονώδεις μηχανισμοί της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μπορεί να δρουν συνεργιστικά συνδυαζόμενοι με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου.

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS (OXIDATIVE STRESS)

Ο όρος οξειδωτικό stress χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κατάσταση που συμβαίνει στους αερόβιους οργανισμούς, όταν οι ανεπιθύμητες δευτερογενείς οξειδώσεις, που επάγονται από το οξυγόνο και τα παράγωγά του, δεν εξουδετερώνονται επαρκώς οδηγώντας σε ανώμαλο μεταβολισμό και απώλεια φυσιολογικής λειτουργίας.^{126,130}

Το οξειδωτικό stress ορίζεται ως η αστάθεια της ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού παραγωγής οξειδωτικών ενώσεων και του ρυθμού καταστροφής τους. Οι αερόβιοι οργανισμοί παράγουν την ενέργεια που χρειάζονται μέσω οξείδωσης οργανικών υποστρωμάτων από το μοριακό οξυγόνο. Η πλήρης αναγωγή των τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου γίνεται μέσα στα μιτοχόνδρια, παράγοντας νερό στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας. Μερικές φορές, το μοριακό οξυγόνο ελαττώνεται μερικώς και παράγονται με δευτερογενείς οξειδώσεις υπεροξείδιο του υδρογόνου και άλλα δραστικά ενδιάμεσα. Πέρα από αυτές τις φυσιολογικές οξειδώσεις και των αναπόφευκτων δευτερογενών αντιδράσεων, πολλά υποστρώματα, που περιέχονται στη τροφή, είναι είτε οξειδωτικά από μόνα τους είτε πρόδρομες ενώσεις οξειδωτικών. Άλλα οξειδωτικά προέρχονται από το περιβάλλον, όπως ατμοσφαιρικοί ρύποι, από την UV ακτινοβολία του ήλιου ή και από τον καπνό της φωτιάς. Τέλος, παρόλο που ο οργανισμός προσαρμόζεται σε κάθε ασταθή κατάσταση, προλαμβάνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες και επιδιορθώνοντας τα κατεστραμμένα μόρια και τους ιστούς, υπάρχουν ωστόσο μερικές ανεπιθύμητες ενέργειες που δεν προλαμβάνονται και δεν επιδιορθώνονται, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται με αργό ρυθμό και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα συσσώρευσης να αντιδρούν με ποικίλα βιομόρια οδηγώντας σε οξειδωτικό stress.^{126,130}

Μόρια που επάγουν το οξειδωτικό stress

Πίνακας 1 Μόρια που επάγουν το οξειδωτικό stress

Name	Structure	Main reactions
Superoxide	$\bullet\text{O}-\text{O}^-$	Catalysis of Haber-Weiß reaction by recycling Fe^{2+} and Cu^+ ions; formation of hydrogen peroxide or peroxyxynitrite
Hydrogen peroxide	$\text{HO}-\text{OH}$	Formation of hydroxyl radical; enzyme inactivation; oxidation of biomolecules
Hydroxyl radical	$\bullet\text{OH}$	Hydrogen abstraction; production of free radicals and lipid peroxides; oxidation of thiols
Ozone	$-\text{O}-\text{O}^+=\text{O}$	Oxidation of all kinds of biomolecules, especially those containing double bonds; formation of ozonides and cytotoxic aldehydes
Singlet oxygen	$\text{O}=\text{O}$	Reaction with double bonds, formation of peroxides; decomposition of amino acids and nucleotides
Nitric oxide	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formation of peroxyxynitrite; reaction with other radicals
Peroxyxynitrite	$\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$	Formation of hydroxyl radical; oxidation of thiols and aromatic groups; conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase; oxidation of biomolecules
Hypochlorite	ClO^-	Oxidation of amino and sulphur-containing groups; formation of chlorine
Radical	$\text{R}\bullet$	Hydrogen abstraction; formation of peroxy radicals and other radicals; decomposition of lipids and other biomolecules
Peroxy radical	$\text{R}-\text{O}-\text{O}\bullet$	Hydrogen abstraction; formation of radicals; decomposition of lipids and other biomolecules
Hydroperoxide	$\text{R}-\text{O}-\text{OH}$	Oxidation of biomolecules; disruption of biological membranes
Copper and iron ions	$\text{Cu}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Formation of hydroxyl radical by Fenton and Haber-Weiß reactions

Ορισμός των ελευθέρων ριζών

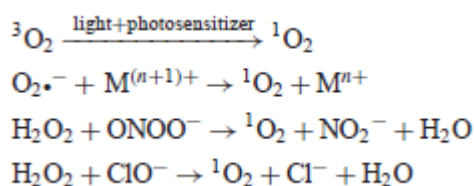
Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια και άτομα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Είναι πάρα πολύ δραστικές και σχηματίζονται με διαδικασίες που εμπλέκουν το οξυγόνο. Οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο ονομάζονται δραστικές ρίζες οξυγόνου, ROS, ενώ οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από την αντίδραση του οξυγόνου με το άζωτο θεωρούνται υποκατηγορία των ελευθέρων ριζών και ονομάζονται ενεργά ενδιάμεσα αζώτου, RNS.^{126,133,134}

Οι ROS περιλαμβάνουν τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ($\bullet\text{O}_2^-$) και τη ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\bullet$), ενώ οι RNS το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-). Η τελευταία προέρχεται από την αντίδραση της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου υπεροξειδικού ανιόντος με το μονοξείδιο του αζώτου. Οι RNS συμπεριλαμβάνουν επίσης το διοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}_2\bullet$) και το νιτροσύλο υδρίδιο (HNO).¹³³⁻¹³⁵

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα συχνά μελετάται με τις ROS λόγω της δραστικότητάς του. Μπορεί να σχηματιστεί από τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου και να παράγει ανιόν υδροξυλίου.¹³³⁻¹³⁵

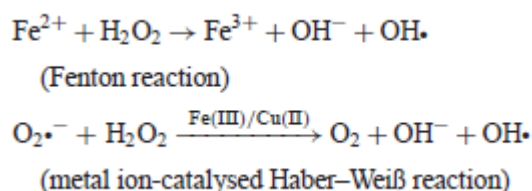
Σχηματισμός των ROS (εικόνα 23 και 24)

Μπορεί να παράγονται επίσης από διάφορες βιοχημικές οξειδώσεις συμπεριλαμβάνοντας τις υπεροξειδάσες και τις λιποξυγενάσες μέσω αντιδράσεων μεταξύ ROS ή παρουσία φωτός, οξυγόνου και ενός φωτοευαισθητοποιητή:¹²⁶

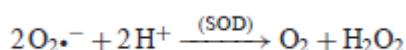


Άλλες ROS προέρχονται από δευτερογενή αναγωγή του O_2 (3Σ) στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (κυρίως από την οξείδωση της ουβικινόνης), όπου το οξυγόνο λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο στο ενεργό κέντρο της μεταλλοπρωτεΐνης της αναπνευστικής αλυσίδας.

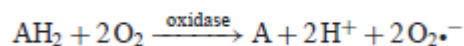
Η ρίζα υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορούν να αντιδράσουν με μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, για να σχηματίσουν την ισχυρή ρίζα υδροξυλίου $\cdot\text{OH}$:¹²⁶

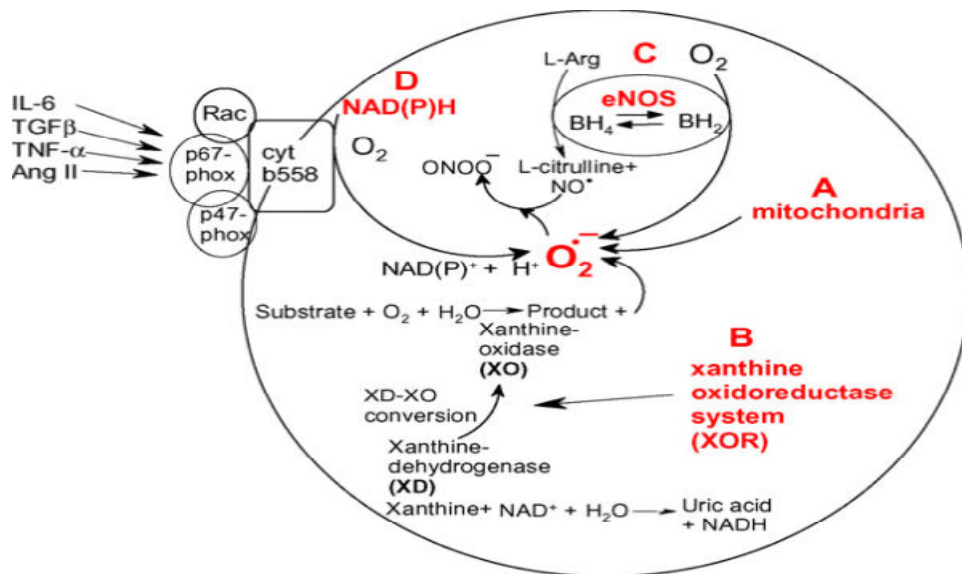


Έτσι σχηματίζεται, η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) σχηματίζεται και μπορεί να αυτοοξειδωαναχθεί σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , είτε έμμεσα, σε όξινο pH, είτε μέσω αντίδρασης που καταλύεται από την υπεροξειδική δεσμουτάση (SOD):¹²⁶



Γενικά όλες οι ενδογενείς οξειδάσες (ένζυμα που μεταφέρουν δύο ηλεκτρόνια από ένα υπόστρωμα, AH_2 , στο μοριακό οξυγόνο) παράγουν ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου:^{126,140}





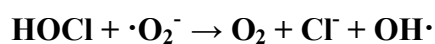
Εικόνα 23: Κύρια μονοπάτια παραγωγής των ROS.¹⁹

Σχηματισμός ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου στα φαγοκύτταρα

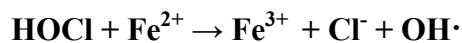
Τα φαγοκύτταρα, ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, όπως επίσης και τα μακροφάγα, κατέχουν ένα ισχυρό ενζυματικό σύστημα για την παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος, την NADPH οξειδάση. Αυτή καταλύει την αναγωγή του ενός ηλεκτρονίου του οξυγόνου προς σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος χρησιμοποιώντας NADPH ως ηλεκτρονιοδότη σύμφωνα με την αντίδραση:



Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου απελευθερώνεται στα φαγοκυτταρικά κυστίδια, όπου ασκεί την καταστροφική της ικανότητα. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι συνδυαζόμενοι μετατρέπουν τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου σε πολύ δραστικές ρίζες. Καταρχάς, η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μπορεί να πρωτονιωθεί στην πιο δραστική και ελεύθερα διαχεόμενη ρίζα $\cdot\text{HO}_2$, δεύτερον μπορεί να αυτο-οξειδοαναχθεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να παράγει ρίζα ανιόντος υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton, τρίτον μπορεί να αντιδράσει με υποχλωριώδες οξύ, ταυτόχρονα παραγόμενο από τη μυελοϋπεροξειδάση του φαγοκυττάρου για την παραγωγή ρίζας υδροξυλίου:



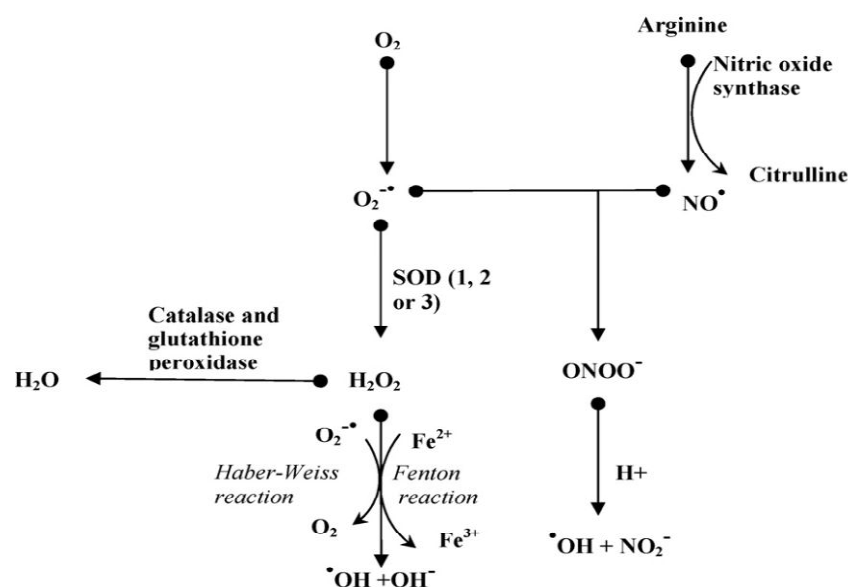
Και τέταρτον το υποχλωριώδες οξύ μπορεί να αντιδράσει επιπρόσθετα με μέταλλα μετάπτωσης οξειδώνοντάς τα και παράγοντας ρίζας υδροξυλίου:



ή μπορεί να διασπαστεί αμέσως και να παραχθεί αέριο χλωρίου, το οποίο είναι πολύ τοξικό:



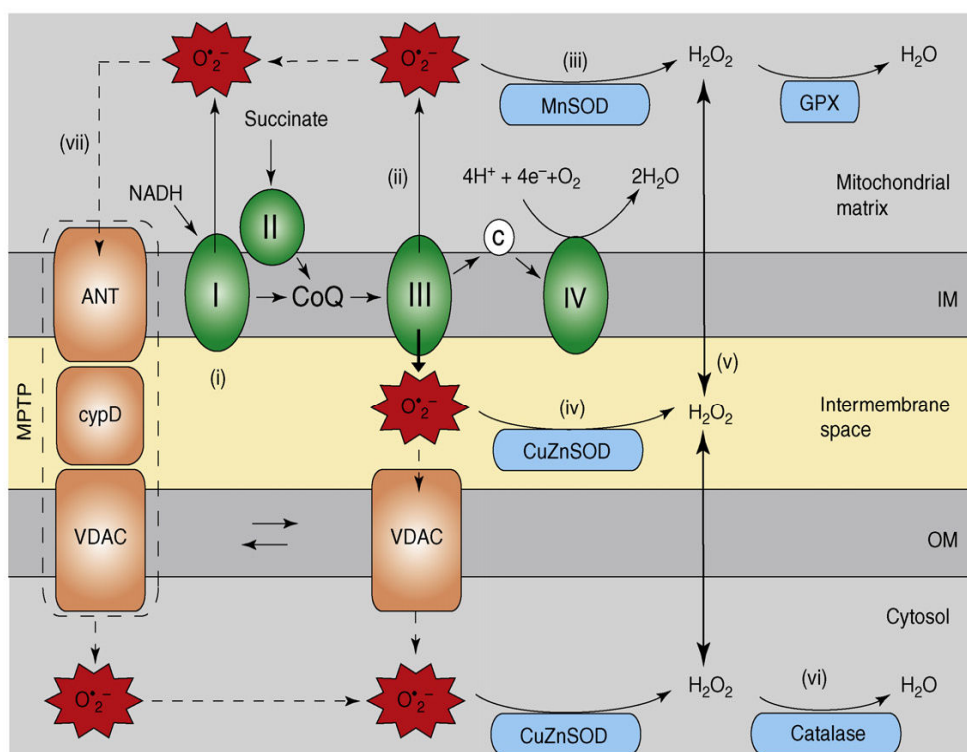
Επομένως η φαγοκυτταρική NADPH οξειδάση και η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου στα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν ένα κρίσιμο αμυντικό ρόλο στη φυσική έμφυτη άμυνα έναντι μικροοργανισμών.^{136,138,140,141}



Εικόνα 24: Κύριες αντιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό των ROS.²⁰

Σχηματισμός ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος στα μιτοχόνδρια

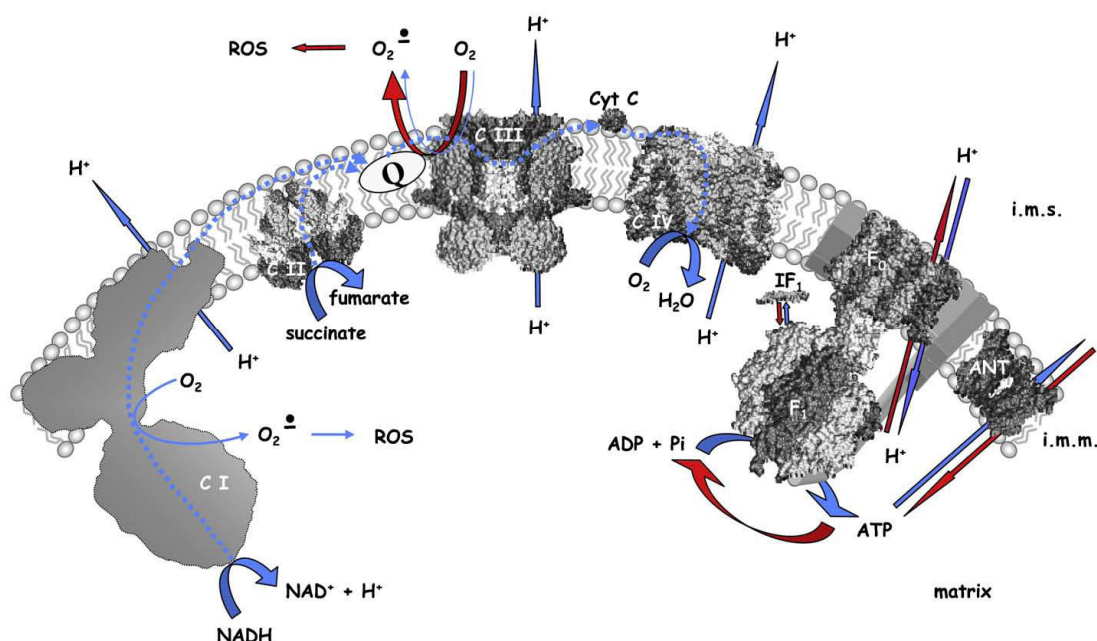
Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IM), αποτελείται από τέσσερα πολυμερή ακέραια συμπλέγματα πρωτεϊνών της μεμβράνης (συμπλέγματα I-IV), συνένζυμο Q (CoQ), και κυτόχρωμα C, μία περιφερική πρωτεΐνη που συνδέεται στην εξωτερική επιφάνεια της IM.



Εικόνα 25: Παραγωγή και εκκαθάριση των ROS. ²¹

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 25, το σύμπλεγμα I (NADH-ουβικινο οξειδοαναγωγή) δέχεται ηλεκτρόνια από την NADH και το σύμπλεγμα II (ηλεκτρική αφυδρογονάση) δέχεται ηλεκτρόνια από το ηλεκτρικό οξύ. Τα ηλεκτρόνια τότε μετακινούνται προς μία ηλεκτροχημική κλίση μέσω του CoQ στο σύμπλεγμα III (ουβικινο κυτόχρωμα C οξειδοαναγωγή), από το σύμπλεγμα III στο κυτόχρωμα C και από το κυτόχρωμα C στο σύμπλεγμα IV (κυτοχρωμική C οξειδάση), το οποίο χρησιμοποιεί τέσσερα ηλεκτρόνια για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. (i) Η αναγωγή του ενός ηλεκτρονίου του οξυγόνου σε ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου γίνεται κυρίως στα συμπλέγματα I και III, (ii) το σύμπλεγμα III παράγει ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μέσω αυτο-οξείδωσης της ουβισεμικινόνης ($QH^{\bullet}$), που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια το κύκλου Q. Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μπορεί να παραχθεί σε δύο θέσεις, Q_0 και Q_1 , μέσα στο σύμπλεγμα III. Η θέση Q_0 απελευθερώνει ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο, ενώ η Q_1 απελευθερώνει ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τα περισσότερα υπεροξειδικά ανιόντα που παράγονται από το σύμπλεγμα III προέρχονται από τη Q_0 θέση. Αντιθέτως, οι ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου που παράγονται από το σύμπλεγμα I, απελευθερώνονται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Οι μηχανισμοί της παραγωγής ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου στο σύμπλεγμα I δεν είναι πλήρως κατανοητοί, είναι

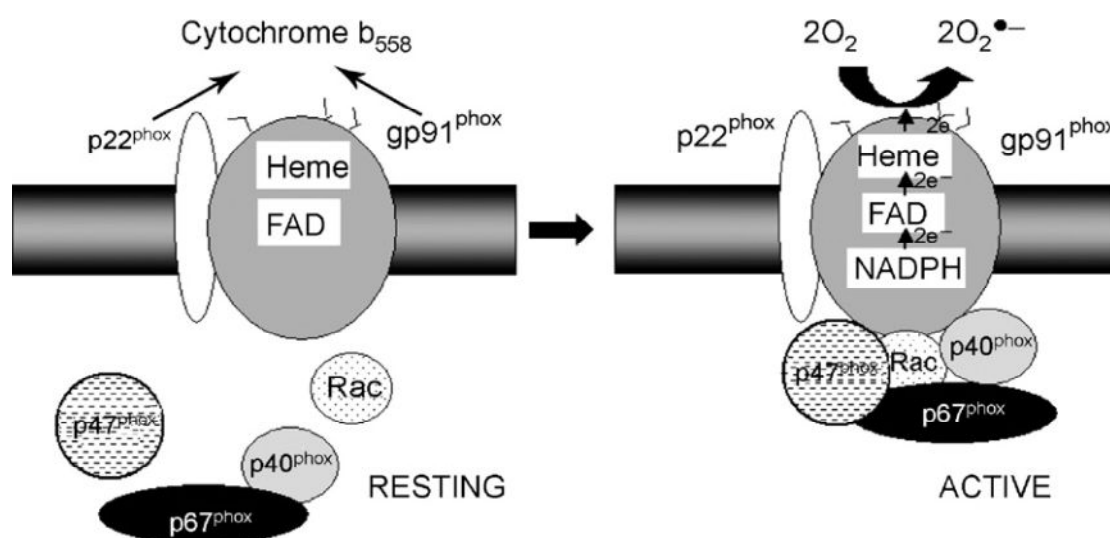
αμφιλεγόμενοι και εξαρτώμενοι των πειραματικών συνθηκών. Διάφορες μελέτες αποκάλυψαν έναν υψηλότερο ρυθμό παραγωγής ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου κατά την αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στο NAD^+ από ότι κατά τη διάρκεια της προς τα εμπρός μεταφοράς ηλεκτρονίων. (iii) η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου που παράγεται από τα συμπλέγματα I και III μπορεί να οξειδοαναχθεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου από τα CuZnSOD ή MnSOD ενζυμικά συστήματα, που υπάρχουν στα μιτοχόνδρια. Το MnSOD ενζυμικό σύστημα βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και (iv) το CuZnSOD ενζυμικό σύστημα βρίσκεται στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο και στο κυτταρόπλασμα. (v) Όταν παραχθεί το μη-φορτισμένο υπεροξείδιο του υδρογόνου, μεταφέρεται διαμέσου των μιτοχονδριακών μεμβρανών μέσα στο κυτταρόπλασμα. Το H_2O_2 μπορεί να εκκαθαριστεί είτε από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) στη μιτοχονδριακή μήτρα ή από το ένζυμο καταλάση στο κυτταρόπλασμα. (vi) η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου που απελευθερώνεται μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο μπορεί επίσης να αποκτήσει πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα μέσω των VDAC και να οξειδοαναχθεί σε H_2O_2 από το κυτταροπλασματικό CuZnSOD ενζυμικό σύστημα. (vii) Οι ROS της μιτοχονδριακής μήτρας μπορούν να περάσουν μέσω των μιτοχονδριακών διαύλων μεταφοράς και διαπερατότητας, MPTP, απευθείας στο κυτταρόπλασμα συνεισφέροντας στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (εικόνα 26).^{127,139-141,144}



Εικόνα 26: Επισκόπηση της ροής των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων κατά την υποξία.²²

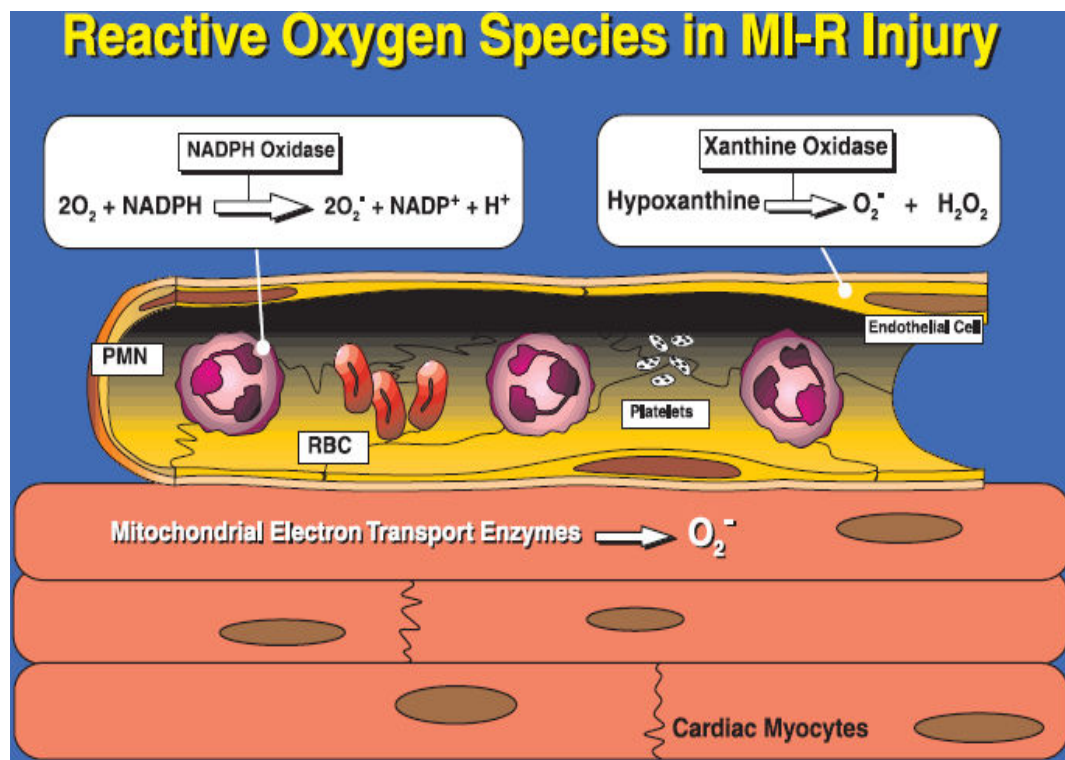
Σχηματισμός ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου από την NADPH οξειδάση

Η NADPH οξειδάση είναι ένα ετεροδιμερές φλαβοκυτόχρωμα που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, την p22-phox και είτε την p91-phox στους ινοβλάστες ή τη Nox1 στα κύτταρα των λείων μυών. Η NAD/NADPH οξειδάση είναι προσδεμένη στη μεμβράνη (εικόνα 27) και είναι η κυριότερη πηγή παραγωγής ενδογενούς ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου (εικόνα 28).



Εικόνα 27: Σχήμα που δείχνει τα μοριακά τμήματα της NADPH οξειδάσης.²³

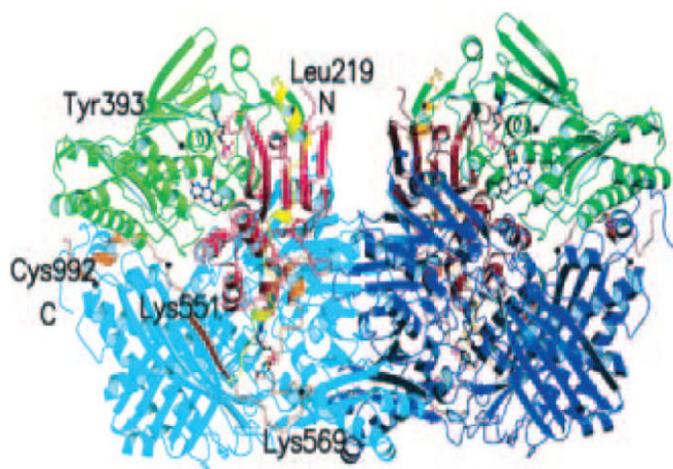
Έχει προταθεί πως η PKC και η φωσφολιπάση D εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης. Με την ενεργοποίηση τουλάχιστον δύο κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών συντίθενται η p47-phox και η p67-phox, ή αλλιώς rac2, η οποία είναι πρωτεΐνη που προσδένεται στο GTP. Όταν η p47-phox φωσφορυλιώνεται, αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το φλαβοκυτόχρωμα. Η έκφραση της NADPH οξειδάσης ποικίλει στα διάφορα κύτταρα. Μελέτες δείχνουν ότι η εξειδίκευση της NADPH οξειδάσης, που περιέχει διαφορετικές Nox υπομονάδες, μπορεί μερικώς να επιτευχθεί με ακριβή ενδοκυτταρικό εντοπισμό των Nox πρωτεϊνών.^{135,137,143}



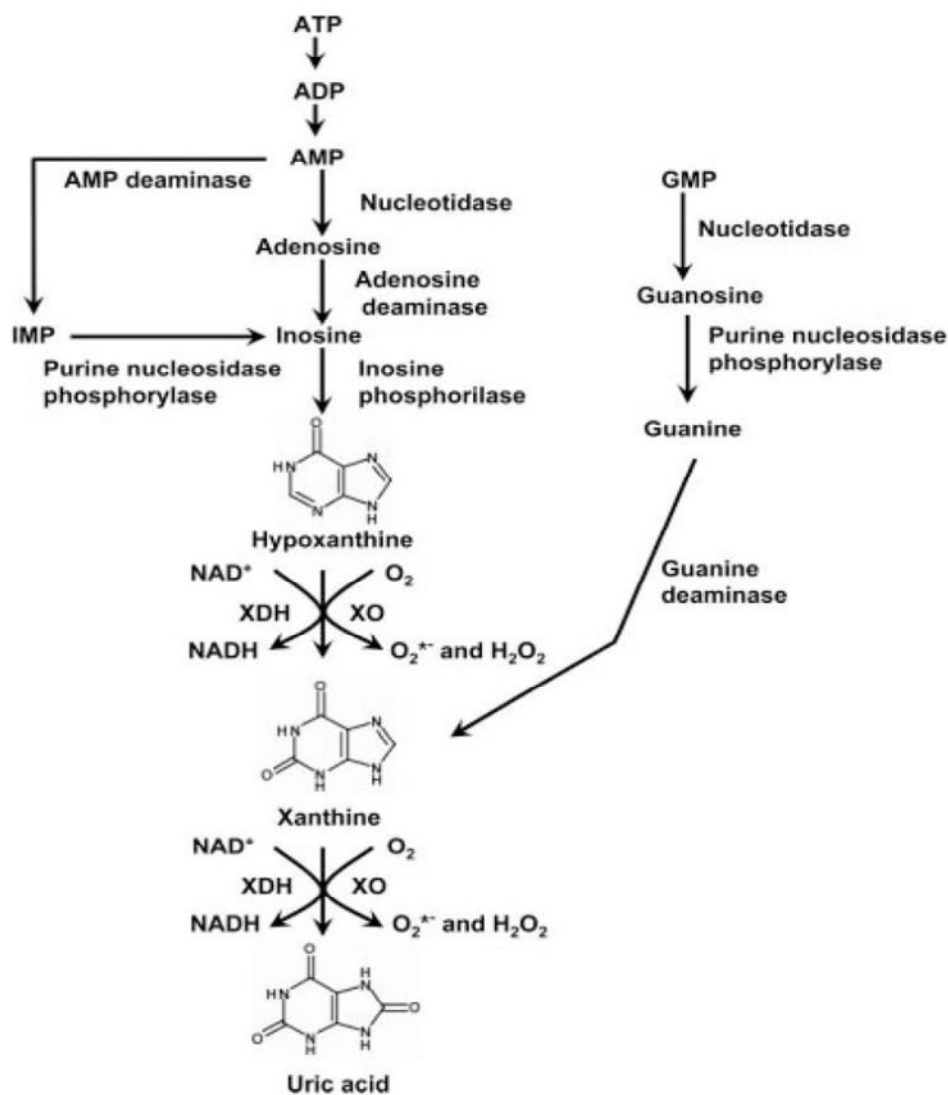
Εικόνα 28: Σχηματισμός ROS στη βλάβη επαναιμάτωσης²⁴

Σχηματισμός ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου από την οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR)

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μία ομοδιμερής φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει μόλυβδο και σίδηρο. Παρόλο που κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, εκφράζεται σε δύο μορφές τη αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) (εικόνα 29) και την οξειδάση της ξανθίνης (XO).

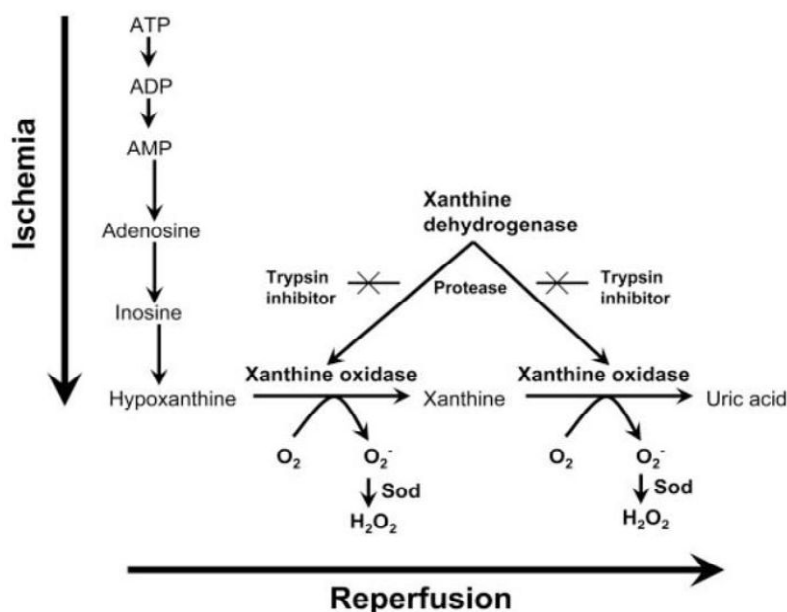


Εικόνα 29: Κρυσταλλική δομή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης.²⁵



Εικόνα 30: Σχηματικό διάγραμμα της πορείας σύνθεσης και διάσπασης της ξανθίνης.²⁵

Η XDH μπορεί να μετατραπεί σε XO είτε μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της θειόλης είτε μέσω μη αντιστρεπτής πρωτεόλυσης. Η XOR είναι κρίσιμη για την οδό διάσπασης των πουρινών, αφού οξειδώνει την υποξανθίνη σε ξανθίνη, οδηγώντας σε παραγωγή ουρικού οξέος (εικόνα 30). Κατά τη διάρκεια αυτών των αντιδράσεων παράγονται δύο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου και δύο μόρια ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου.

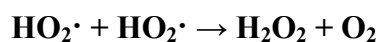


Εικόνα 31: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών και H_2O_2 κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση.²⁵

Η XO μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο και φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την κύρια παραγωγή ROS ενώ η XDH προτιμά τη NAD^+ ως ηλεκτρονιοδέκτη. Η δραστηριότητα της XO εμποδίζεται από το φάρμακο αλλοπουρινόλη. Παρόλα αυτά από τη στιγμή που η NAD^+ ανάγεται σε $NADH$, η XDH μπορεί να δράσει ως $NADH$ οξειδάση. Αυτή η διαδικασία τελικά οδηγεί στη παραγωγή ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου. Η XOR εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο. Είναι επίσης παρούσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυκλοφορεί στο αίμα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι εντοπίζεται και στα μυοκαρδιακά κύτταρα (εικόνα 31).^{135,137,142,143}

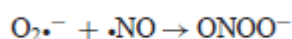
Γενική δραστηριότητα της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου

Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μπορεί να δράσει και ως αναγωγικός και ως οξειδωτικός παράγοντας. Η δραστηριότητά της καθορίζει τη σύντομη ζωή της στα βιολογικά υγρά, παρόλο που αντιδρώντας με κάποια άλλα μόρια θα δώσει νέες ελεύθερες ρίζες. Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με τον εαυτό της με τέτοιον τρόπο ώστε η μία ρίζα ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και η άλλη οξειδώνεται σε οξυγόνο. Αυτό αποτελεί την αυτόματη οξειδοαναγωγική αντίδραση. Μηχανιστικά, η οξειδοαναγωγή στα βιολογικά υγρά συμβαίνει με πρωτονίωση του ενός ή και των δύο υπεροξειδικών ανιόντων σε $HO_2^{\cdot}$ και η αυτόματη οξειδοαναγωγική αντίδραση έπεται με έναν από τους δύο παρακάτω τρόπους:



Εκτός από την αυτόματη οξειδοαναγωγή υπάρχει επιπλέον μία ομάδα από ένζυμα, οι υπεροξειδικές δεσμουτάσες οι οποίες είναι εξειδικευμένες στον περιορισμό των ριζών ανιόντων υπεροξειδίων μετατρέποντας τα σε οξυγόνο ή υπεροξείδιο του υδρογόνου.¹⁴⁰

Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρώντας με τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου, παράγει το ισχυρό οξειδωτικό υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO⁻):¹²⁶



Οι κύριοι βιολογικοί στόχοι των ελευθέρων ριζών και των ROS είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA.

Η πρωτεϊνική οξείδωση οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας ή πρόωρη αποσύνθεση σε πρωτεοσώματα. Η λιπιδική υπεροξείδωση, που λαμβανεί χώρα κυρίως στην πλασματική μεμβράνη, τροποποιεί την φυσική ιδιότητα των μεμβρανών και επομένως τη βιολογική τους λειτουργία. Η οξείδωση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιακή μετάλλαξη και επομένως σε ανώμαλη πρωτεϊνική σύνθεση, αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, απόπτωση και κυτταρικό θάνατο.

Λιπιδική υπεροξείδωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Η λιπιδική υπεροξείδωση, μία από τις κυριότερες οξειδωτικές αλλαγές των βιολογικών μεμβρανών, μπορεί να επάγεται από πολλά διαφορετικά οξειδωτικά μέσα. Αυτή η διαδικασία προάγεται από μία ελεύθερη ρίζα, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα της μεμβράνης οδηγώντας στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, οι οποίες τότε συνδυάζονται με το μοριακό οξυγόνο. Οι σχηματιζόμενες ρίζες μεταδίδουν την αλυσίδα της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία διακόπτεται από την αντίδραση μεταξύ δύο λιπιδικών ριζών ή από αντιοξειδωτικά μόρια.^{127,128,130}

Πιο συγκεκριμένα η OH[·] προσβάλλει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου προς μία ρίζα:



Χάρη στη μοριακή ανακατανομή προσλαμβάνεται O₂, παράγοντας λιπιδική υπεροξυ- ρίζα (Lipid-OO[·]):



Αυτή η ρίζα μπορεί να διαδώσει την αλυσιδωτή αντίδραση μέσω απόσπασης ενός άλλου ατόμου H, από ένα άλλο λιπαρό οξύ:



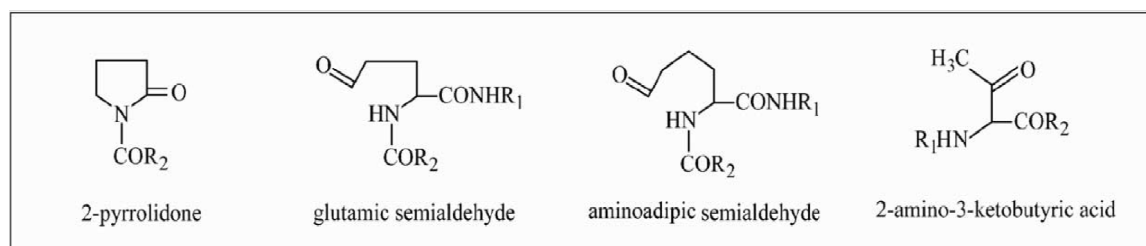
Τα λιπιδικά υπεροξειδία (Lipid-OOH) μπορούν να διασπαστούν σε αλκοξυ- (lipid O $\cdot$) ή υπερόξυ- ρίζες (lipid OO $\cdot$) παρουσία μετάλλων μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός.^{127,128,130}

Η λιπιδική υπεροξείδωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί σε μη-αναστρέψιμη απώλεια των μιτοχονδριακών λειτουργιών, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η μεταφορά ιόντων.

Πρωτεϊνική υπεροξείδωση των πρωτεϊνών των κυττάρων

Οι καρβονυλικές ομάδες (CO)-αλδεϋδες και κετόνες- παράγονται στις πρωτεϊνικές περιοχές των αλύσων της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της θρεονίνης όταν αυτές οξειδώνονται. Τα παράγωγα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μπορούν επίσης να προκύψουν μέσω της οξειδωτικής διάσπασης των πρωτεϊνών οδηγώντας στον σχηματισμό ενός πεπτιδίου, του οποίου το N-τελικό αμινοξύ παρεμποδίζεται από ένα α-κετοάκυλο παράγωγο. Οι καρβονυλικές ομάδες μπορεί να παράγονται στις πρωτεΐνες με δευτερογενή αντίδραση των πυρηνόφιλων περιοχών των αλύσων κυστεΐνης, και λυσίνης με τις αλδεϋδες που παράγονται κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση όπως η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) ή με δραστικά καρβονυλικά παράγωγα όπως οι κετοαμίνες και οι κεταλδεϋδες.¹⁴⁸

Παρόλα αυτά η παρουσία των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δεν αποτελεί απαραίτητα δείκτη της οξείδωσης των αμινοξέων των πρωτεϊνών, αλλά είναι χημικά σταθερά μόρια και αποτελούν τον πιο γενικό δείκτη πρωτεϊνικής οξείδωσης (εικόνα 32). Η συσσώρευση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έχει παρατηρηθεί σε διάφορες ασθένειες, όπως η αρθρίτιδα.¹⁴⁹

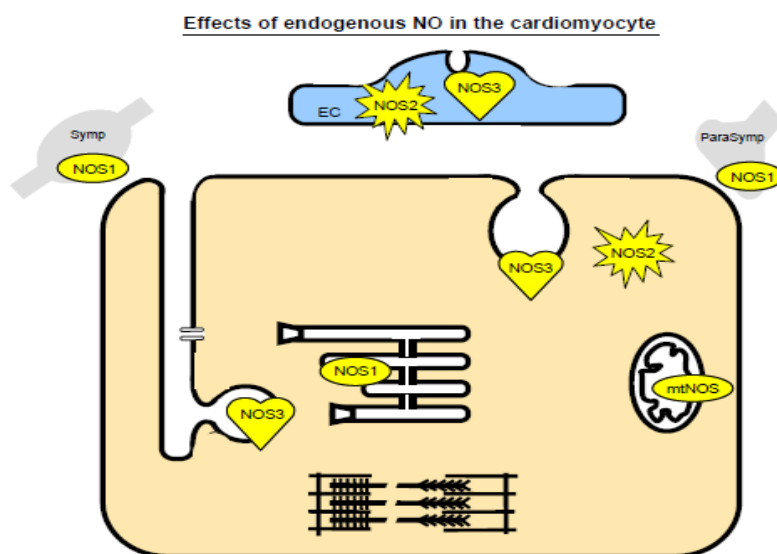


Εικόνα 32: Συνήθεις δομές πρωτεϊνικών καρβονυλίων.²⁶

RNS (REACTIVE NITROGEN SPECIES)

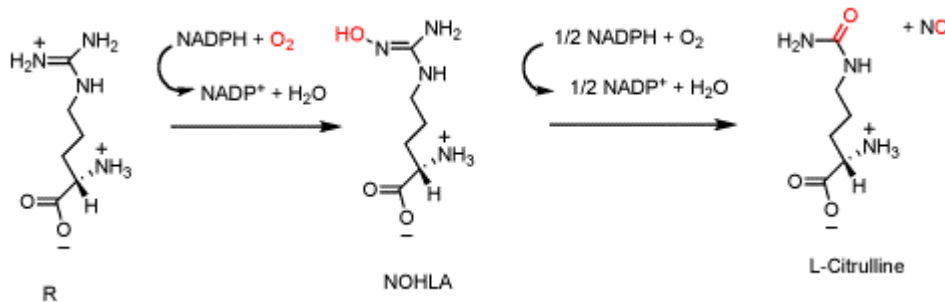
Σύνθεση NO στα μιτοχόνδρια (βιοσύνθεση NO)

Το NO παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη μέσω της ενζυματικής δράσης της συνθάσης του NO (NOS). Υπάρχουν τρία είδη NOS (εικόνα 33): η νευρωνική (neural NOS ή αλλιώς nNOS, τύπος I), η οποία λειτουργεί ως μεταβιβαστής στον εγκέφαλο και σε διαφορετικά νεύρα στο περιφερικό νευρικό σύστημα, η επαγόμενη (inducible NOS ή iNOS, τύπος II) και η ενδοθηλιακή NOS (eNOS, τύπος III).¹⁴⁷ Συμπαράγοντες για την eNOS αποτελούν το οξυγόνο, η NADPH, η τετραϋδροπτερίνη, και το φλαβινο-αδένινο-νουκλεοτίδιο.



Εικόνα 33 Τα σημεία που εντοπίζονται οι NOS.²⁷

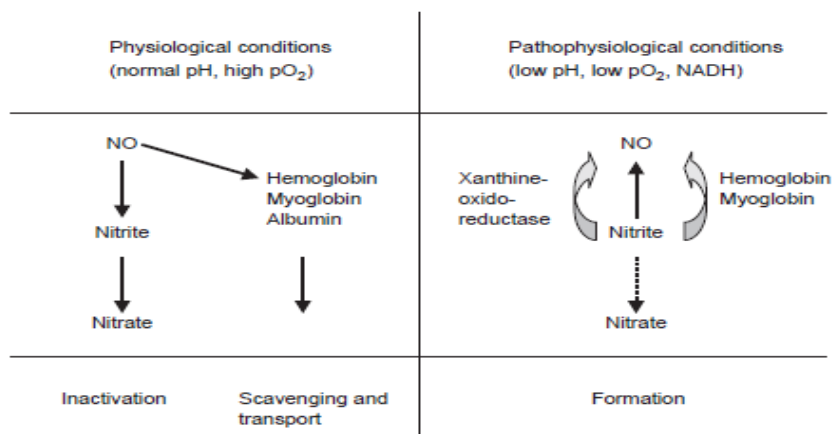
Υπό φυσιολογικές συνθήκες το NO παράγεται συνεχώς στα αιμοφόρα αγγεία από την eNOS, της οποίας η δραστηριότητα είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη. Υπάρχουν δύο βασικά μονοπάτια για τη διέγερση της eNOS, στα οποία εμπλέκεται η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τα σημεία αποθήκευσης στο σαρκείλημα. Το πρώτο είναι μέσω των δυνάμεων που ασκεί η αιματική ροή στο αγγειακό ενδοθήλιο προκαλώντας απελευθέρωση ασβεστίου με παραπέρα ενεργοποίηση της eNOS. Επομένως η αύξηση της αιματικής ροής διεγείρει το σχηματισμό του NO (σύνθεση εξαρτώμενη από τη ροή). Το δεύτερο είναι η διέγερση απελευθέρωσης του ασβεστίου από τους ενδοθηλιακούς υποδοχείς και η ακόλουθη παραγωγή NO. Η πορεία σύνθεσης του NO από την eNOS γίνεται μέσω κατάλυσης της οξείδωσης της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη με ενδιάμεσο προϊόν την N-υδροξυ-L-αργινίνη.^{145,146,148}



Όταν το NO σχηματιστεί, έχει μικρό χρόνο ζωής (για λίγα δευτερόλεπτα) επειδή η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου έχει μεγάλη συγγένεια με το NO (και τα δύο μόρια έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, και άρα είναι πολύ δραστικά). Συνεπώς η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Το NO συνδέεται επίσης στην αίμη της αιμογλοβίνης στα ερυθροκύτταρα και στην αίμη της γουανυλικής κυκλάσης, που βρίσκεται στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και στα περισσότερα κύτταρα του σώματος. Επομένως, όταν το NO σχηματίζεται από το αγγειακό ενδοθήλιο, διαχέεται γρήγορα στο αίμα όπου προσδένεται στην αιμογλοβίνη και μεταγενέστερα μεταβολίζεται. Επίσης διαχέεται στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα που είναι προσκολλημένα στο ενδοθήλιο όπου προσδένεται και ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση. Αυτό το ένζυμο καταλύει την αποφωσφορυλίωση του GTP σε cGMP, το οποίο λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος για πολλές σοβαρές κυτταρικές λειτουργίες, ιδιαίτερα για τη σηματοδότηση της χαλάρωσης των λείων μυών.^{145,146,148}

Εκτός από την οδό της NOS υπάρχει και άλλη μία οδός, της NO₂-οξειδοαναγωγής η οποία είναι ανεξάρτητη του οξυγόνου και ενεργοποιείται υπό ανοξικές και υποξικές συνθήκες (εικόνα 34).

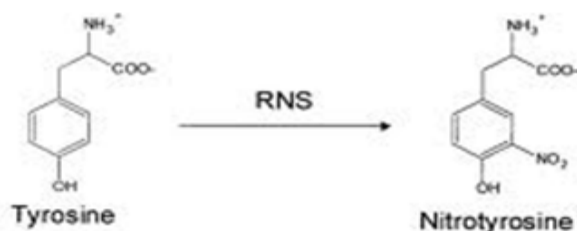
R. Schulz et al. / Pharmacology & Therapeutics 108 (2005) 225–256



Εικόνα 34: Σχηματισμός NO ανεξάρτητος των NOS.²⁷

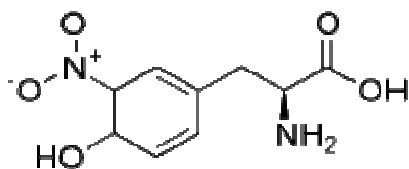
Νιτροτυροσίνη

Είναι προϊόν νίτρωσης (εικόνα 35) που παράγεται από την αντίδραση στον φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης με τις RNS. Το προϊόν που προκύπτει είναι πολύ σταθερό.



Εικόνα 35: Νίτρωση της τυροσίνης

Η νιτροτυροσίνη (εικόνα 36) είναι δείκτης νιτροξειδωτικού στρες, και σχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις¹⁵⁰ όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα.



Εικόνα 36: Δομή νιτροτυροσίνης

ΗΧΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ- ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Με την τεχνική Doppler λαμβάνουμε τους δείκτες:

- **Εκτασιμότητα της αορτής, AS** (aortic strain), η ποσοστιαία μεταβολή της διαμέτρου της αορτής κατά τη διάρκεια της συστολής.¹⁵⁵

$$AS = 100 \times \frac{\text{AoD systole} - \text{AoD diastole}}{\text{AoD diastole}}$$

- **Στεφανιαία εφεδρεία ροής, CFR** (coronary flow reserve), η αναλογία της ταχύτητας της αιματικής ροής της στεφανιαίας αρτηρίας κατά τη διάρκεια της υπεραιμίας, προς την αντίστοιχη ταχύτητα κατά την έναρξη της μέτρησης.¹⁵⁶

$$CFR = \frac{\text{Velocity-Time Integral (VTI-Vd) after adenosine infusion (140}\mu\text{g/kg/min)}}{\text{VTI-Vd at baseline}}$$

- και **αγγειοδιαστολή βραχιόνιου αρτηρίας, FMD** (flow mediated dilation), η ποσοστιαία μεταβολή της διαμέτρου της βραχιόνιας αρτηρίας μετά από την υπεραιμία.^{157,158}

$$FMD = \frac{\text{RH diameter} - \text{Basal diameter}}{\text{Basal diameter}}$$

Αυτοί οι δείκτες εξαρτώνται από την γωνία πρόσπτωσης της ηχοκαρδιογραφικής δέσμης και μελετούν την παραμόρφωση σε μία μόνο κατεύθυνση τη φορά, ενώ η διάταξη των μυοκαρδιακών ινών στο χώρο είναι περίπλοκη.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη των Abbate et al το 2008 εξέτασε τη δράση του anakinra σε δύο πειραματικά μοντέλα, στους μύες και στους επίμυες, με τη χορήγησή του κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας και 24 ώρες μετά το πέρας της ισχαιμίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η χορήγηση του anakinra μέσα σε 24 ώρες μετά από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) αναστέλλει την απόπτωση και βελτιώνει την παραμόρφωση του μυοκαρδίου, η οποία προκύπτει μετά το OEM.¹⁵¹

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας σε πειραματόζωα, οδήγησαν στη δική μας μελέτη το 2008, η οποία εξέτασε την επίδραση της χορήγησης του anakinra στο οξειδωτικό stress, στην αγγειακή λειτουργία και στη λειτουργία της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε μείωση του νιτροξειδωτικού stress, της CRP, της IL-6, της ενδοθηλίνης-1, και βελτίωση της καρδιαγγειακής λειτουργίας.¹⁵²

Σε επόμενο στάδιο, η μελέτη μας που δημοσιεύτηκε το 2009, εξέτασε τη συσχέτιση του νιτροξειδωτικού stress και της λειτουργίας του ενδοθηλίου με την παραμόρφωση του μυοκαρδίου, και την επίδραση της χορήγησης του anakinra πάνω στην παραμόρφωση του μυοκαρδίου σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, η παραμόρφωση του μυοκαρδίου είναι μειωμένη και σχετίζεται με το νιτροξειδωτικό stress και την λειτουργία του ενδοθηλίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ακόμα πως η χρόνια αναστολή της IL-1 βελτιώνει την παραμόρφωση της αριστερής κοιλίας παράλληλα με την ενδοθηλιακή λειτουργία και το νιτροξειδωτικό stress.¹⁵³

Έπειτα, η μελέτη μας που δημοσιεύτηκε το 2011, εξέτασε αν οι δείκτες απόπτωσης σχετίζονται με την μειωμένη λειτουργία της αριστερής κοιλίας και αν η χορήγηση του anakinra σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα μειώνει του δείκτες απόπτωσης, βελτιώνοντας την λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε μείωση των δεικτών απόπτωσης (Fas, Fas Ligand, TNF-α, IL-1β και κασπάση-9) και πως υπήρξε βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.¹⁵⁴

Έχοντας προηγηθεί αυτές οι μελέτες, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ερευνηθεί εάν η αναστολή της IL-1 από την οξεία χορήγηση του anakinra σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και συνυπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο έχει επίδραση στο

νιτροξειδωτικό stress και στην διαδικασία της απόπτωσης. Θα ερευνηθεί επίσης πόσο επηρεάζεται η λειτουργία του ενδοθηλίου και των στεφανιαίων αγγείων όπως και η λειτουργία του τοιχώματος της αορτής.

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 40 ασθενείς (13 άνδρες και 27 γυναίκες) ηλικίας 69 ± 9 ετών, με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια της Αμερικάνικης Ρευματολογικής Εταιρείας και με συνυπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο. Οι ασθενείς είχαν κλάσμα εξώθησης $52,8 \pm 15,6\%$.

Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν μία υποδόρροια δόση anakinra 100 mg ή placebo και μετά από 48 ώρες εναλλαγή της θεραπείας σε μία διπλή τυφλή κλινική δοκιμή.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης 23 ασθενείς με παρόμοιους παράγοντες κινδύνου, αλλά χωρίς ιστορικό στεφανιαίας νόσου και αρνητικό τεστ κοπώσεως για ισχαιμία και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου.

Τα κλινικά και δημογραφικά στοιχεία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 Κλινικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων μελέτης

	RA CAD (n=40)	Controls (n=23)	p
Disease activity score	5.2 ± 1.4	-	-
Age (years)	69 ± 9	66 ± 12	0.5
BMI (kg/m^2)	28.6 ± 3.5	28.4 ± 2	0.8
Sex (female)	27 (67.5%)	17 (73%)	0.8
Hypertension	17 (42.5%)	9 (39%)	0.5
Smoking	19 (47.5%)	7 (30%)	0.3
Dyslipidemia	21 (52.5%)	5 (22%)	0.5
Diabetes mellitus	5 (12.5%)	4 (17%)	0.6
SBP (mmHg)	132.4 ± 27.2	124.0 ± 8.3	0.4
DBP (mmHg)	81.4 ± 9.7	78.3 ± 5.6	0.5
EF (%)	52.8 ± 15.6	64.3 ± 12.6	<0.001
CRP (mg/L)	11.6 (6.5-35)	1.4 (0.01-2.0)	<0.001

SBP: συστολική πίεση, DBP: διαστολική πίεση, EF: κλάσμα εξώθησης, CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο της μελέτης κατατέθηκε στην Επιστημονική Επιτροπή και στην Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΓΝ «Αττικών». Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Ιγνάτιου Οικονομίδη, Επίκουρου Καθηγητή Καρδιολογίας στη Β' Πανεπιστημιακή Κλινική του Νοσοκομείου «Αττικών».

Η συγκεκριμένη μελέτη περιλάμβανε μόνο οξεία φάση μελέτης και είναι μία διπλή τυφλή διασταυρούμενη μελέτη.

Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, είτε να λάβουν μία δόση anakinra είτε εικονικό φάρμακο (placebo), και μετά από 48 ώρες οι δύο ομάδες των ασθενών διασταυρώθηκαν (cross over), ώστε η κάθε ομάδα να λάβει το εναλλακτικό φάρμακο. Το διάστημα των 48 ωρών μεταξύ των δύο μελετών ορίστηκε έτσι ώστε στην οξεία φάση να υπάρχει επαρκής περίοδος έκπλυσης σύμφωνα με το χρόνο ημιζωής του anakinra.

Κατά την έναρξη της χορήγησης του anakinra και 3 ώρες μετά την θεραπεία, λήφθηκαν δείγματα αίματος για την εκτίμηση του οξειδωτικού stress μετρώντας τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της μηλονικής διαλδεΰδης, και για την εκτίμηση της απόπτωσης, μετρώντας τα επίπεδα του Fas, του FasL, του TNF- α και της IL-1 β .

Εκτιμήθηκαν επίσης, Κατά την έναρξη της χορήγησης του anakinra και 3 ώρες μετά την θεραπεία, η στεφανιαία εφεδρεία ροής, CFR, η εκτασιμότητα της αορτής, AS, και η αγγειοδιαστολή βραχιόνιου αρτηρίας, FMD όπως και εκτιμήθηκαν αυτές οι παράμετροι και στην ομάδα ελέγχου.

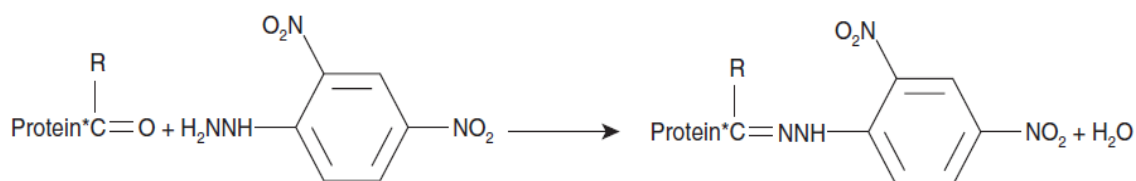
2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80° C και πριν από τον προσδιορισμό των διάφορων δεικτών αυτά απομακρύνονται από την κατάψυξη και αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από την πλήρη τήξη τους τα δείγματα ανακινούνται σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα. Όλα τα πειράματα έγιναν σε ορό εκτός από τη μέτρηση της μηλονικής διαλδεΰδης η οποία έγινε σε πλάσμα.

- **Μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

Αρχή μεθόδου:

Η αρχή της μεθόδου είναι η αντίδραση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με την 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) προς σχηματισμό μίας βάσης του Schiff και υδραζόνης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 360 nm και εκφράστηκε σε nmol/mg protein



Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Σε δύο σωλήνες erpendorf μεταφέρονται από 100μl ορού. Ο ένας σωλήνας περιέχει το control και ο άλλος το δείγμα ενός ασθενούς.
2. Στο control προστίθενται 500μl HCL 2N ενώ στο άγνωστο 500μl DNPH και οι σωλήνες αναδεύονται σε vortex.
3. Ακολουθεί επώαση για μία ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι σωλήνες αναδεύονται σε vortex ανά 15 λεπτά.
4. Όταν τελειώσει η επώαση προσθέτονται 600μl τριχλωροξικού οξέος 20% και στους δύο σωλήνες, οι οποίοι έπειτα αναδεύονται σε vortex και τοποθετούμε τα δείγματα σε πάγο για 5 λεπτά.
5. Γίνεται φυγοκέντρηση στους 4° C στις 12200rpm για 10 λεπτά
6. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και ακολουθεί έκπλυση του pellet με 1000μl μίγματος αιθανόλης/οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) με αποκόλληση του pellet από το τοίχωμα του σωλήνα με ειδική σπάτουλα, και έπειτα ανάδευση σε vortex.
7. Τα βήματα 5 και 6 επαναλαμβάνονται δύο φορές
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4° C στις 12200rpm για 10 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και το pellet αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 90 λεπτά.

10. Προστίθενται 1000μl υδατικού διαλύματος γουανιδίνης 6M, γίνεται ανάδευση σε vortex, επώαση σε υδατόλουτρο στους 45° C και ψύξη όλη τη νύχτα.
11. Το υπερκείμενο υγρό φασματοφωτομετρείται στα 360nm έχοντας ως τυφλό HCl
12. Για τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης $22000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και η συγκέντρωση υπολογίζεται ως εξής:

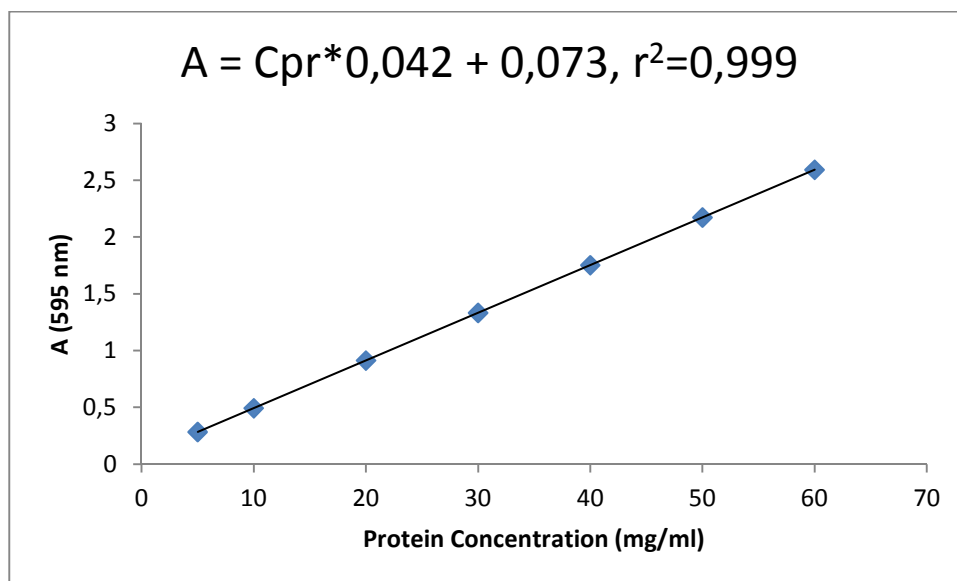
$$\text{nmol/mg protein} = [(A - A_o) / 22 * 100 * 10] / \text{cpr}$$
 (A: απορρόφηση δείγματος, A_o: απορρόφηση control, cpr: η μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 δειγμάτων)

Επειδή κατά την διαδικασία της έκπλυσης του pellet υπάρχει απώλεια πρωτεΐνης, προσδιορίζονται τα επίπεδα πρωτεΐνης του pellet μετά από τις εκπλύσεις:

1. Σε 10 σωλήνες eppendorf αραιώνουμε 5μl ορό από 10 τυχαία δείγματα με 45μl δις απεσταγμένο νερό στο καθένα
2. Έπειτα 10μl από το προηγούμενο διάλυμα το αραιώνουμε με 90μl δις απεσταγμένο νερό.
3. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθενται 1000μl διαλύματος Biorad Bradford Assay, 1:5 αραιωμένο με δις απεσταγμένο νερό.
4. Το υπερκείμενο υγρό φασματοφωτομετρήθηκε στα 595nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό δις απεσταγμένο νερό.
5. Το cpr υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Cpr} = (A - 0,073) / 0,042$$
 (A: απορρόφηση του δείγματος, cpr: μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 δειγμάτων.)

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση και σύμφωνα με αυτήν υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

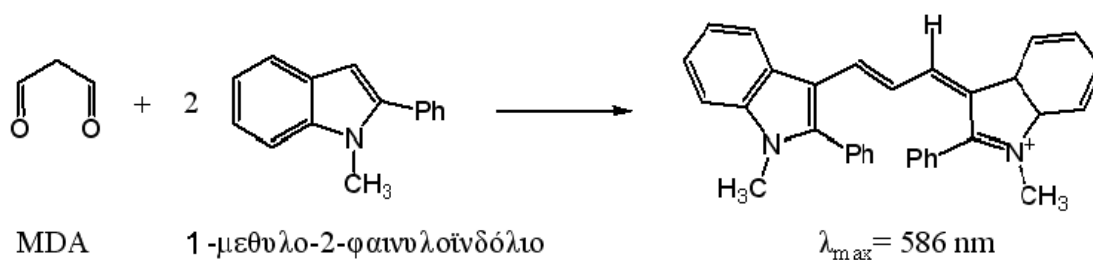


Εικόνα 37 Καμπύλη αναφοράς πρότυπου διαλύματος πρωτεΐνης σε mg/ml

- **Μέτρηση της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA)**

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην αντίδραση του χρωμογόνου αντιδραστήριου N-μεθυλο-2-φαινυλινδόλιο με την μηλονική διαλδεΐδη. Ένα μόριο της μηλονικής διαλδεΐδης αντιδρά με δύο μόρια του χρωμογόνου παράγοντα για να σχηματίσει ένα σταθερό χρωμοφόρο προϊόν που απορροφά σε μέγιστο μήκος κύματος 586 nm. Η συγκέντρωση της MDA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 586 nm και εκφράστηκε σε μM .



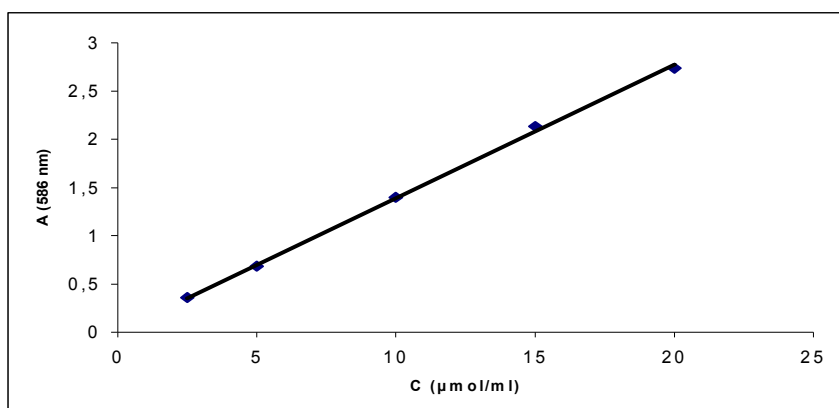
Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πλάσμα (30 erpendorf) - ξεπάγωμα (<1 hr).
2. Δ/μα σε beaker: 0.106gm 1-Me-2-Ph/indole
50cm³ acetonitrile
3. Αρίθμηση των δοκιμαστικών σωλήνων και επανατοποθέτηση στη βάση τους.

4. Ανάδευση των eppendorf. Εισαγωγή 400μl πλάσματος και (1000μl+300μl) διαλύματος beaker σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
5. 300μl HCl σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
6. Φυγοκέντρωση (4°/ 3500 RPM/ 15min)
7. Μέτρηση απορρόφησης στα 586 nm στο UV-Vis Spectrophotometer
8. Δημιουργήθηκε μία καμπύλη αναφοράς (calibration curve) από ένα προετοιμασμένο (standard) διάλυμα MDA (από 2 έως 20 μmol/ml) για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό. Οι μετρήσεις κάθε ομάδας πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές με την τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη από ±10% .

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση:

$$y = 0.0169 (\pm 0.0325) + 0.1377 (\pm 0.0026)x, R^2 = 0.9988$$



Σχήμα 3 : Καμπύλη αναφοράς προτύπου διαλύματος μηλονικής διαλδεύδης (MDA).

- **Μέτρηση της νιτροτυροσίνης (NT)**

Τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Hycult biotech, USA)

Αρχή Μεθόδου

Το kit είχε διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης, ο οποίος περιεχόταν

είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με τη βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλυτή στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη 2% οξαλικού οξέος (Stop Solution) και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μία καμπύλη αναφοράς.

Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το πλάσμα ή ο ορός αραιώθηκαν 10x με working dilution buffer. Δηλαδή, 10μl πλάσματος ή ορού αραιώθηκαν με 90 μl working dilution buffer. Το working dilution buffer προέκυψε από το dilution buffer που περιείχε το kit, έπειτα από αραιώση 1:10 με απιονισμένο νερό.
3. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: Στο πρότυπο διάλυμα νιτροτυροσίνης που περιείχε το kit προστέθηκαν 2,2 ml απιονισμένου νερού και με αυτόν τον τρόπο προέκυψε διάλυμα 4,5 M. Σε 7 αριθμημένους σωλήνες eppendorf προστέθηκαν από 300 μl working dilution buffer. Σε έναν επιπλέον (όγδοο) σωλήνα προστέθηκαν 500 μl working dilution buffer. 150 μl πρότυπου διαλύματος νιτροτυροσίνης 4,5 M προστέθηκαν στον πρώτο σωλήνα και έγινε καλή ανάδευση σε vortex. 150 μl από το περιεχόμενο του πρώτου σωλήνα μεταφέρθηκαν στο δεύτερο σωλήνα. Ακολούθησε διαδοχικά μεταφορά 150 μl από κάθε σωλήνα στον επόμενο. Στον όγδοο σωλήνα δεν προστέθηκε τίποτα και αποτέλεσε το τυφλό.
4. Τα πρότυπα διαλύματα και το τυφλό τοποθετήθηκαν στην πλάκα εις διπλούν. Οι σωλήνες eppendorf, οι οποίοι περιείχαν τα δείγματα ανακινούνται σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα για καλύτερη ομογενοποίηση. Στα μικροβοθρία της πλακέτας προστέθηκαν 100 μl πρότυπου διαλύματος, δείγματος ή control.
5. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιούνται 4 εκπλύσεις των μικροβοθρίων της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (working dilution buffer) σε ειδική πλυστική συσκευή. Ακολούθως, η πλακέτα αφήνεται για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένουσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του working dilution buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε dilution buffer (Tween-20) το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 40 φορές(40x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού. Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος στον ειδικό περιέκτη της πλυστικής συσκευής.
7. Μετά την πλύση προστίθενται στα μικροβοθρία 100 μl αντισώματος νιτροτυροσίνης.
8. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Ακολουθεί νέος κύκλος 4 εκπλύσεων των μικροβοθρίων της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας όπως προηγουμένως.
10. Έπειτα προστίθεται 100 μl του ενζύμου streptavidin peroxidase.
11. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται για επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Ακολουθεί νέος κύκλος 4 εκπλύσεων των μικροβοθρίων της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας όπως προηγουμένως.
13. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστίθενται 100 μl TMB υποστρώματος.
14. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
15. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 100 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης κιτρικού οξέος 2 M. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα μικροβοθρία και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
16. Η απορρόφηση μετρείται αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποιεί δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για την κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της νιτροτυροσίνης σε nmol/L.

- **Μέτρηση του Fas (CD95)**

Τα επίπεδα του Fas μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Diacclone, USA). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μικρότερη από 47pg/ml.

Αρχή Μεθόδου

Το kit Fas έχει διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονται προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης, ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με τη βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη θειικού οξέος (Stop Solution) και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μία καμπύλη αναφοράς.

Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: το λυοφιλοποιημένο δείγμα προτύπου (υπάρχει στο kit δύο φορές) ανασυστάται με το standard diluent buffer δημιουργώντας το πρότυπο διάλυμα (1) συγκέντρωσης 3000pg/ml. Σε 2 σειρές από 7 eppendorf μεταφέρονται 100μl από το standard diluents buffer εκτός από το 1^ο eppendorf που περιέχει 100μl από το πρότυπο διάλυμα (1), και στο 2^ο eppendorf της κάθε σειράς μεταφέρονται 100μl από το πρότυπο διάλυμα (1), οπότε και προκύπτει πρότυπο διάλυμα (2) συγκέντρωσης 1500pg/ml, από το πρότυπο διάλυμα (2) μεταφέρονται 100μl στο 3^ο eppendorf δημιουργώντας πρότυπο διάλυμα (3)

συγκέντρωσης 750pg/ml. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι και τον 7^ο eppendorf. Έτσι λοιπόν προκύπτουν 2 σειρές πρότυπων διαλυμάτων από τις οποίες μεταφέρονται 100μl στα αντίστοιχα κελιά της πλάκας εκτός από το A1 κελί που αποτελεί το τυφλό στο οποίο μεταφέρονται 100μl standard diluents buffer

3. Έπειτα μεταφέρονται 100μl ορού από το κάθε δείγμα στα αντίστοιχα κελιά
4. Έπειτα προστίθενται 50μl diluted biotinylated anti sCD95, το οποίο έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με τις οδηγίες, σε όλα τα κελιά.
5. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (washing buffer). Ακολούθως, η πλακέτα αφήνεται για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένουσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε washing buffer το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 200 φορές (200x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού.
7. Το HRP solution ετοιμάζεται, 5μl streptavidin HRP αραιώνονται σε 500μl strep-HRP-diluent. Έπειτα 150μl του διαλύματος που προκύπτει αραιώνονται με 10ml strep-HRP-diluent
8. Σε όλα τα κελιά της πλάκας προστίθενται από 100μl HRP solution και έπειτα η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα.
9. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται για επώαση μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Ακολουθεί απομάκρυνση νέος κύκλος 3 εκπλύσεων των κελιών της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας όπως προηγουμένως.
11. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστίθενται 100 μl TMB υποστρώματος.
12. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
13. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 100 μl θειικού οξέος. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα μικροβοθρία και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.

14. Η απορρόφηση μετρείται αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο.

Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποιεί δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για την κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του Fas σε pg/ml.

- **Μέτρηση του FasL (CD95L)**

Τα επίπεδα του FasL μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Diacclone, USA). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μικρότερη από 12pg/ml.

Αρχή Μεθόδου

Το kit FasL έχει διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονται προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης, ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με τη βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλυτή στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη θειικού οξέος (Stop Solution) και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μία καμπύλη αναφοράς.

Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: το λυοφιλοποιημένο δείγμα προτύπου (υπάρχει στο kit δύο φορές) ανασυστάται

με το standard diluent buffer δημιουργώντας το πρότυπο διάλυμα (1) συγκέντρωσης 2000pg/ml. Σε 2 σειρές από 7 erppendorf μεταφέρονται 100μl από το standard diluent buffer εκτός από το 1^ο erppendorf που περιέχει 100μl από το πρότυπο διάλυμα (1). Στο 2^ο erppendorf της κάθε σειράς μεταφέρονται 100μl από το πρότυπο διάλυμα (1), οπότε και προκύπτει πρότυπο διάλυμα (2) συγκέντρωσης 1000pg/ml, από το πρότυπο διάλυμα (2) μεταφέρονται 100μl στο 3^ο erppendorf δημιουργώντας πρότυπο διάλυμα (3) συγκέντρωσης 500pg/ml. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι και τον 7^ο erppendorf. Έτσι λοιπόν προκύπτουν 2 σειρές πρότυπων διαλυμάτων από τις οποίες μεταφέρονται 100μl στα αντίστοιχα κελιά της πλάκας εκτός από το A1 κελί που αποτελεί το τυφλό στο οποίο μεταφέρονται 100μl standard diluent buffer

3. Έπειτα μεταφέρονται 100μl ορού από το κάθε δείγμα στα αντίστοιχα κελιά
4. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
5. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (washing buffer). Ακολούθως, η πλακέτα αφήνεται για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένουσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε washing buffer το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 200 φορές(200x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού.
6. Έπειτα προστίθενται 50μl diluted biotinylated anti FasL, το οποίο έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με τις οδηγίες, σε όλα τα κελιά.
7. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας όπως προηγουμένως.
9. Το HRP solution ετοιμάζεται, 5μl streptavidin HRP αραιώνονται σε 500μl strep-HRP-diluent. Έπειτα 150μl του διαλύματος που προκύπτει αραιώνονται με 10ml strep-HRP-diluent.
10. Σε όλα τα κελιά της πλάκας προστίθενται από 100μl HRP solution και έπειτα η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα.

11. Η πλακέτα αφήνεται για επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Ακολουθεί απομάκρυνση νέος κύκλος 3 εκπλύσεων των κελιών της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας όπως προηγούμενως.
13. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστίθενται 100 μl TMB υποστρώματος.
14. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
15. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 100 μl θειικού οξέος. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα κελιά και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
16. Η απορρόφηση μετρείται αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποιεί δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για την κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του FasL σε pg/ml.

- **Μέτρηση του TNF-α**

Τα επίπεδα του TNF-α μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen, USA). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μικρότερη από 0,09pg/ml.

Αρχή Μεθόδου

Το kit TNF-α έχει διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των κελιών της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης, ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με τη βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας

του αναλυτή στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη θειικού οξέος (Stop Solution) και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μία καμπύλη αναφοράς.

Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: το λυοφιλοποιημένο δείγμα προτύπου (υπάρχει στο kit δύο φορές) ανασυστάται με το standard diluent buffer δημιουργώντας το πρότυπο διάλυμα (A) συγκέντρωσης 380pg/ml. Σε 2 σειρές από 7 erppendorf μεταφέρονται 300μl από το standard diluent buffer εκτός από το 1^ο erppendorf που περιέχει 50μl από το πρότυπο διάλυμα (A) και 550μl από το standard diluent buffer σχηματίζοντας το πρότυπο διάλυμα (1). Στο 2^ο erppendorf της κάθε σειράς μεταφέρονται 300μl από το πρότυπο διάλυμα (1), οπότε και προκύπτει πρότυπο διάλυμα (2) συγκέντρωσης 16pg/ml, από το πρότυπο διάλυμα (2) μεταφέρονται 300μl στο 3^ο erppendorf δημιουργώντας πρότυπο διάλυμα (3) συγκέντρωσης 8pg/ml. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι και τον 7^ο erppendorf. Έτσι λοιπόν προκύπτουν 2 σειρές πρότυπων διαλυμάτων από τις οποίες μεταφέρονται 100μl στα αντίστοιχα κελιά της πλάκας εκτός από το A1 κελί που αποτελεί το τυφλό στο οποίο μεταφέρονται 100μl standard diluent buffer
3. Έπειτα μεταφέρονται 50μl από το standard diluent buffer και έπειτα 50μl ορού από το κάθε δείγμα στα αντίστοιχα κελιά
4. Προστίθενται 50μl από το διάλυμα Hu TNF-α US Biotin Conjugate
5. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C
6. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 4 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (washing buffer). Ακολούθως, η πλακέτα αφήνεται για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένονσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε washing buffer το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 25

- φορές (25x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού.
7. Το HRP solution ετοιμάζεται, 120μl streptavidin HRP (100x) αραιώνονται σε 12ml strep-HRP-diluent.
 8. Έπειτα προστίθενται 100μl Streptavidin HRP working solution σε όλα τα κελιά.
 9. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 10. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 4 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας όπως προηγούμενως.
 11. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστίθενται 100 μl TMB υποστρώματος.
 12. Η πλακέτα καλύπτεται και αφήνεται στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
 13. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 100 μl stop solution. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα κελιά και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
 14. Η απορρόφηση μετρείται αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποιεί δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για την κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του TNF-α σε pg/ml.

• Μέτρηση της IL-1β

Τα επίπεδα της IL-1β μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (R&D, USA). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μικρότερη από 0,057pg/ml.

Αρχή Μεθόδου

Το kit IL-1β έχει διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των κελιών της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της

προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης, ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με τη βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος INT-violet σχηματίστηκε μώβ προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλυτή στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη θεικού οξέος (Stop Solution) και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 490nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μία καμπύλη αναφοράς.

Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: το λυοφιλοποιημένο δείγμα προτύπου ανασυστάται δημιουργώντας το πρότυπο διάλυμα IL-1 β Standard (A) συγκέντρωσης 80 pg/ml. Σε 2 σειρές από 7 erppendorf μεταφέρονται 500μl από το Calibrator Diluent RD6-44 εκτός από το 1^ο erppendorf που περιέχει 100μl από το πρότυπο διάλυμα (A) και 900 μl από το Calibrator Diluent RD6-44 σχηματίζοντας το πρότυπο διάλυμα (1) συγκέντρωσης 8 pg/ml. Στο 2^ο erppendorf της κάθε σειράς μεταφέρονται 500μl από το πρότυπο διάλυμα (1), οπότε και προκύπτει πρότυπο διάλυμα (2) συγκέντρωσης 4 pg/ml, από το πρότυπο διάλυμα (2) μεταφέρονται 500μl στο 3^ο erppendorf δημιουργώντας πρότυπο διάλυμα (3) συγκέντρωσης 2 pg/ml. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι και τον 7^ο erppendorf. Έτσι λοιπόν προκύπτουν 2 σειρές πρότυπων διαλυμάτων από τις οποίες μεταφέρονται 150μl στα αντίστοιχα κελιά της πλάκας
3. Έπειτα μεταφέρονται 100μl Assay Diluent RD1-82 σε όλα τα κελιά και 150μl ορού από το κάθε δείγμα στα αντίστοιχα κελιά
4. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 3 ώρες στο ultra rocker.
5. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 6 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας με διαλύτη πλύσης

(washing buffer). Ακολούθως, η πλακέτα αφήνεται για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένουσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε washing buffer το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 25 φορές (25x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού.

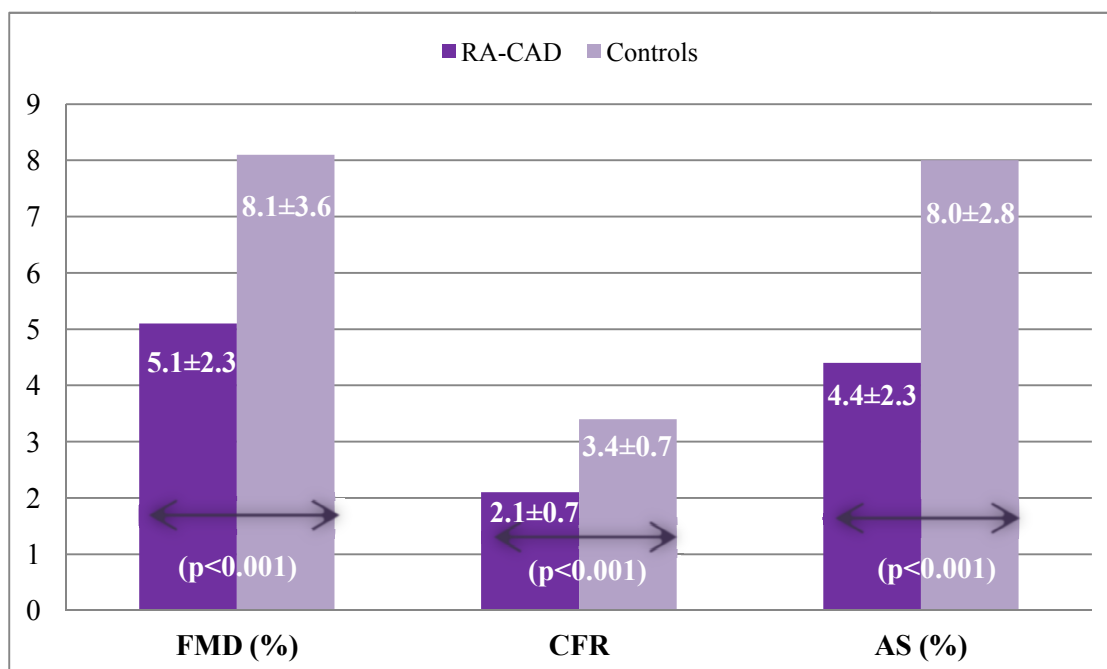
6. Έπειτα προστίθενται 200 μL του IL-1 β HS Conjugate σε όλα τα κελιά
7. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Με το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κελιών απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 6 εκπλύσεις των κελιών της πλακέτας όπως προηγουμένως.
9. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστίθενται 50 μL του Substrate Solution.
10. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
11. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 50 μL του Amplifier Solution.
12. Η πλάκα καλύπτεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να επωαστεί για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και αρχίζει ο σχηματισμός χρώματος
13. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθενται 50 μL Stop Solution σε κάθε κελί χωρίς να υπάρξει κάποια αλλαγή στο χρώμα.
14. Η απορρόφηση μετρείται αμέσως στα 490 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποιεί δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για την κατασκευή μίας καμπύλης αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της IL1 β σε pg/ml.

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές εξετάστηκαν για κανονικότητα χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov test. Για όσες μεταβλητές είναι μη κανονικές, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάμεσος (median), ενώ για όσες ακολουθούν κανονική κατανομή ως μέση τιμή με την τυπική απόκλιση ($\text{mean} \pm \text{SD}$) με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS Statistics 17.0. Οι συγκρίσεις μεταξύ των τιμών των βιολογικών δεικτών πριν τη χορήγηση και 3 ώρες μετά από τη χορήγηση του anakinra έγιναν με τη χρήση μη παραμετρικού test για τις μεταβλητές με μη κανονική κατανομή και παραμετρικού test για τις μεταβλητές με κανονική κατανομή με τη βοήθεια του SPSS Statistics 17.0 και θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η τιμή της μεταβλητής p (p value) που είναι μικρότερη από 0,05.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς είχαν επηρεασμένα FMD, CFR, και AS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$). Κατά την έναρξη της θεραπείας οι τιμές της NT σχετίζονταν με το AS και το FMD ($r = -0,401$ και $r = -0,386$ αντίστοιχα), ενώ οι τιμές του Fas και του FasL με το CFR ($r = -0,450$ και $r = -0,362$ αντίστοιχα) ($p < 0,05$).



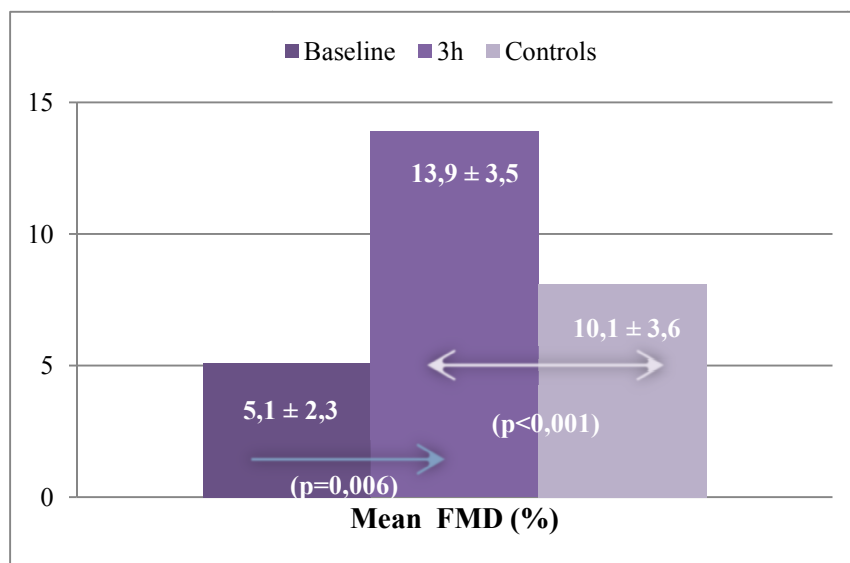
Εικόνα 38 Σύγκριση τιμών FMD, CFR, και AS μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Οι δείκτες FMD, CFR και AS ήταν μειωμένοι σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Τρεις ώρες μετά από τη θεραπεία με το anakinra, παρατηρήθηκε βελτίωση στα FMD, CFR και AS σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου, προσεγγίζοντας τιμές παρόμοιες με αυτές των ατόμων της ομάδας ελέγχου, και δεν παρατηρήθηκε διαφορά πριν και μετά τη χορήγηση του placebo.

- FMD: $5,1 \pm 2,3\%$ έναντι $13,9 \pm 3,5\%$ έναντι $8,1 \pm 3,6\%$, $p=0,006$,
- CFR: $2,1 \pm 0,7$ έναντι $3,0 \pm 1,1$ έναντι $3,4 \pm 0,7$, $p<0,001$,
- AS: $4,4 \pm 2,3\%$ έναντι $9,6 \pm 3,6\%$ έναντι $8,0 \pm 2,8\%$, $p=0,003$.

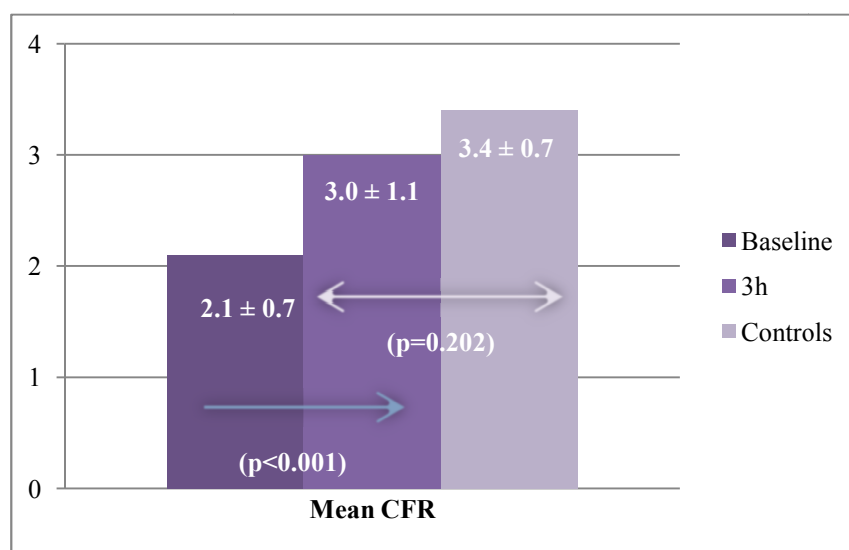
Ακολουθεί η παράθεση των αποτελεσμάτων σε ραβδογράμματα.

• Μέτρηση FMD



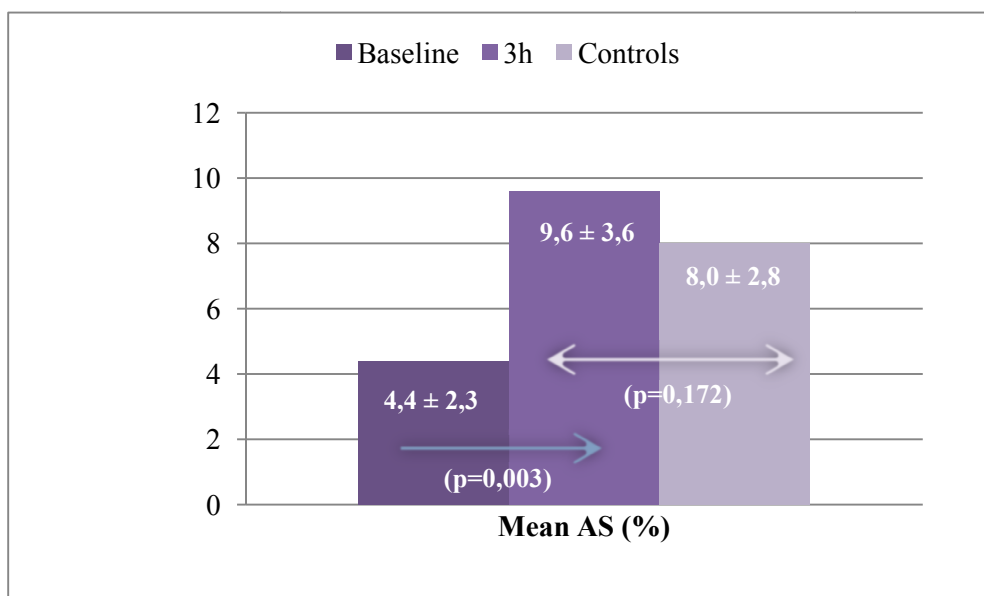
Εικόνα 39 το επί % ποσοστό του FMD στην ομάδα ελέγχου, κατά την έναρξη χορήγησης και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra

• Μέτρηση CFR



Εικόνα 40 Η CRF στην ομάδα ελέγχου, κατά την έναρξη χορήγησης και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του Anakinra

- **Μέτρηση AS**

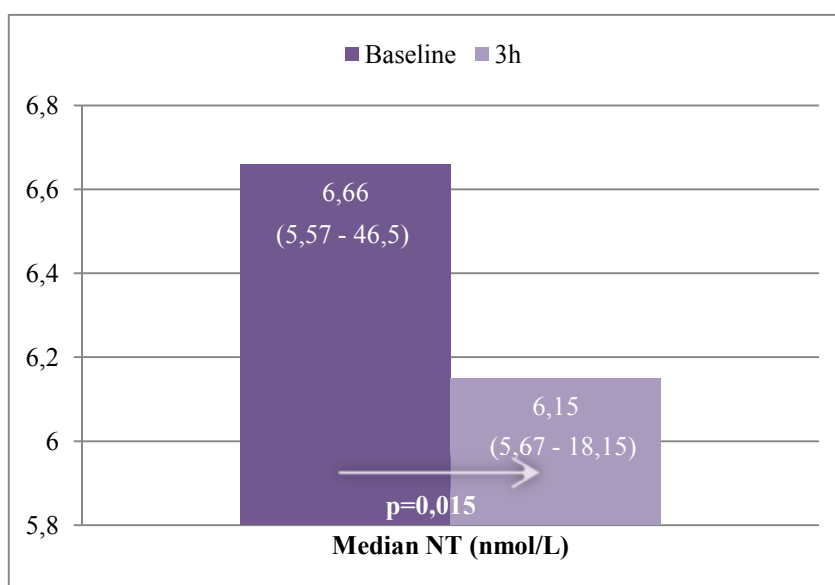


Εικόνα 41: Το επί τοις % ποσοστό του AS στην ομάδα ελέγχου, κατά την έναρξη χορήγησης και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra

- **Μέτρηση της νιτροτυροσίνης**

Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης μειώθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Η συγκέντρωση της νιτροτυροσίνης σε nmol/ml, φαίνεται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.

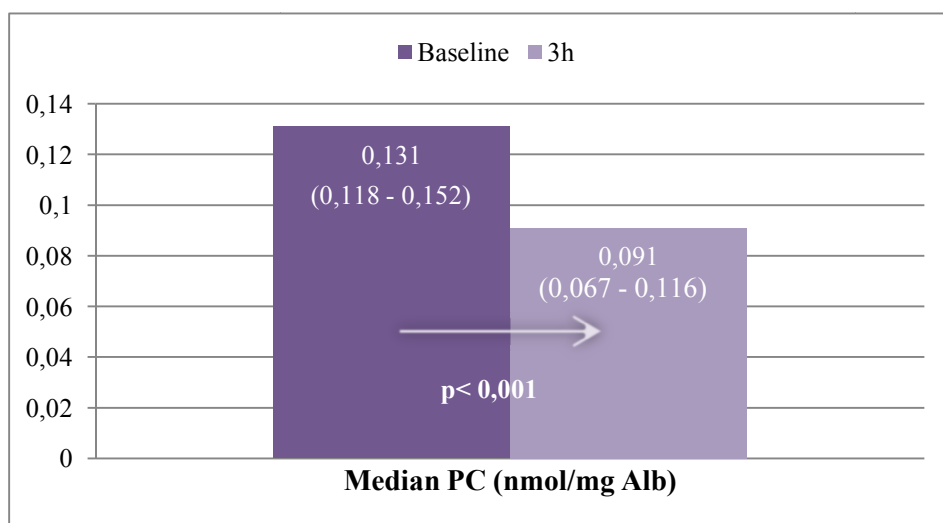


Εικόνα 42: Επίπεδα NT κατά την έναρξη χορήγησης και μετά τη χορήγηση του anakinra. Υπήρξε μείωση στα επίπεδα

- **Μέτρηση των Πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε nmol/mg protein πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου φαίνεται παρακάτω στο ραβδόγραμμα.

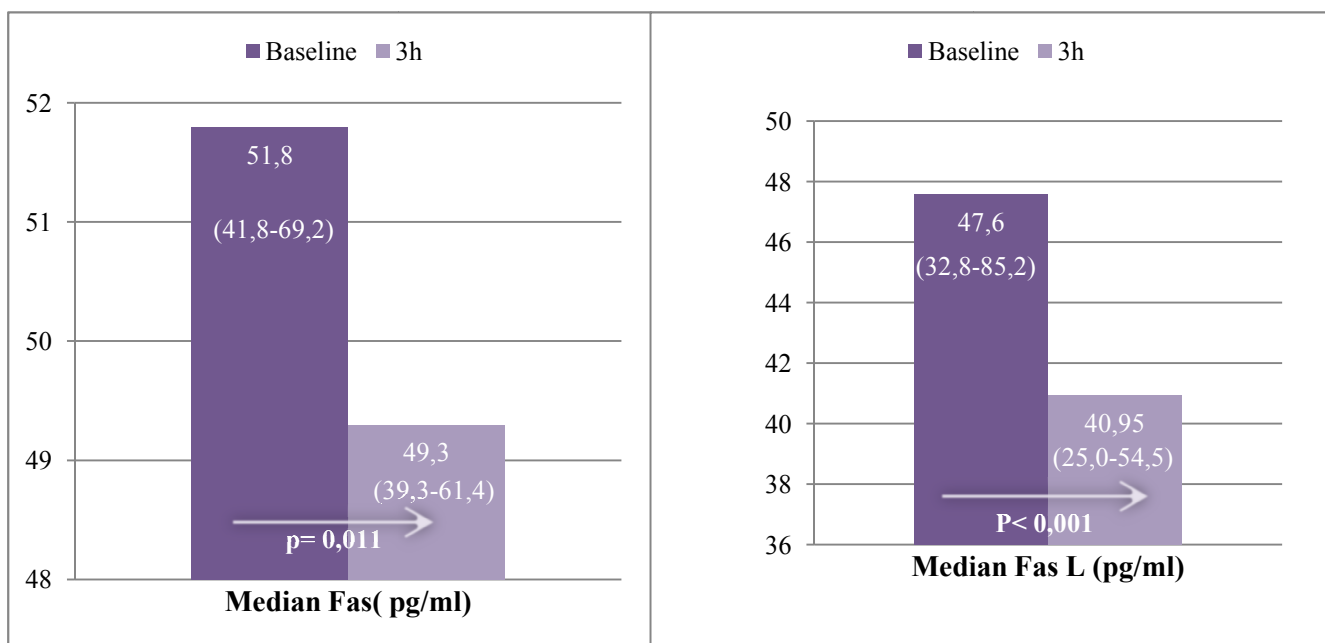


Εικόνα 43: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων πριν και μετά τη χορήγηση του anakinra. Υπήρξε μείωση των επιπέδων ($p < 0,05$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές μετά τη χορήγηση του placebo.

- **Μέτρηση του Fas (CD95) και του FasL (CD95L)**

Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα του Fas και του FasL μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Οι συγκεντρώσεις του Fas και του FasL σε pg/ml πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου φαίνονται παρακάτω στα ραβδογράμματα.

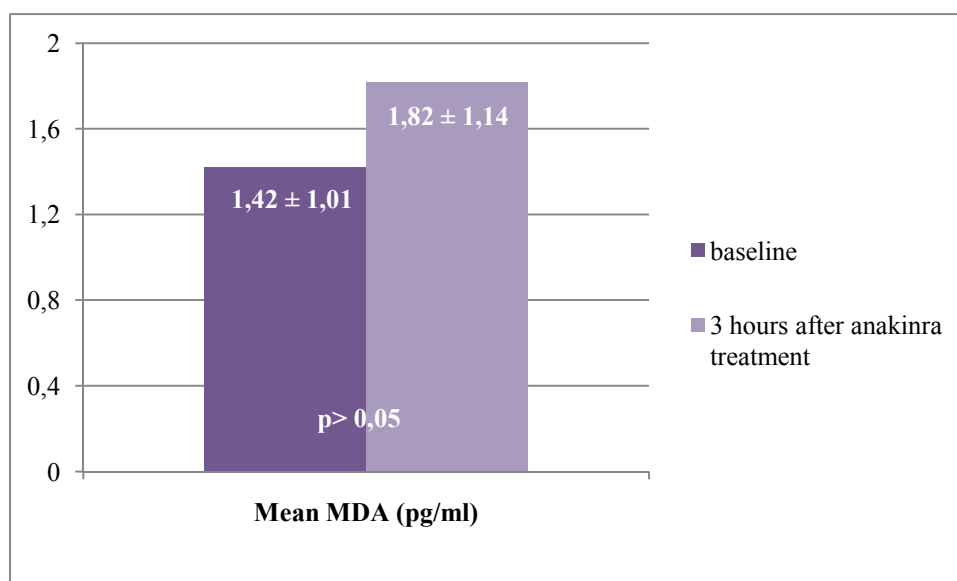


Εικόνα 44: Επίπεδα Fas και FasL κατά την έναρξη και μετά τη χορήγηση του anakinra. Υπήρξε μείωση στα επίπεδα Fas και FasL

• Μέτρηση της MDA

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα της MDA δεν άλλαξαν σε σχέση με κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Οι συγκεντρώσεις της MDA σε pg/ml πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου φαίνονται παρακάτω στο ραβδόγραμμα.

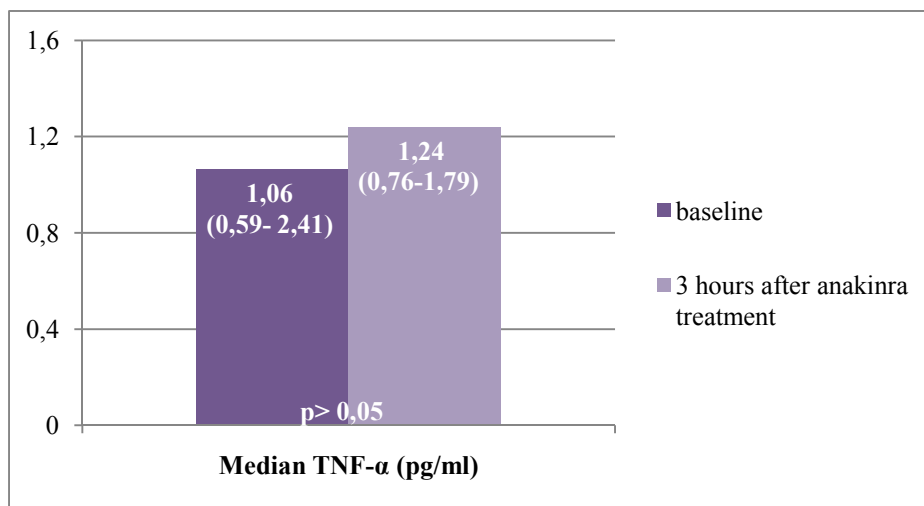


Εικόνα 45: Συγκέντρωση MDA πριν τη χορήγηση του anakinra και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra

- **Μέτρηση του TNF-α**

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα του TNF-α δεν άλλαξαν σε σχέση με κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Οι συγκεντρώσεις του TNF-α σε pg/ml πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου φαίνονται παρακάτω στο ραβδόγραμμα.

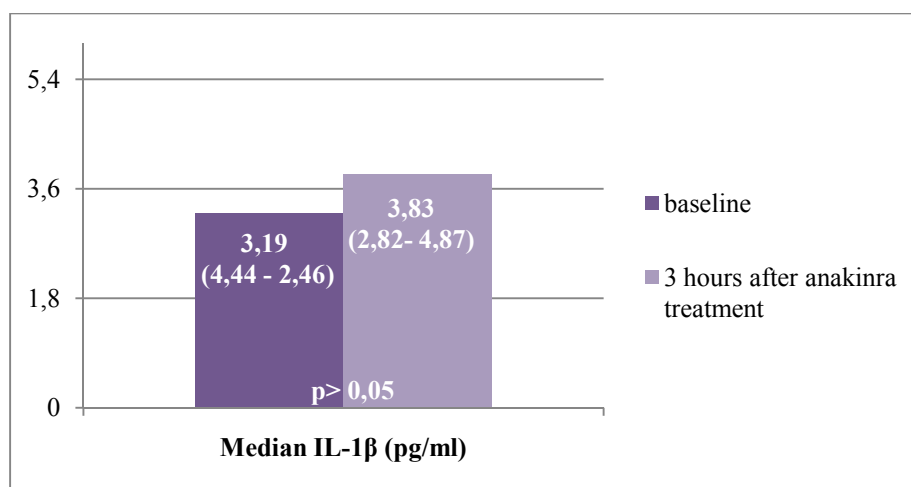


Εικόνα 46: Συγκέντρωση TNF-α πριν τη χορήγηση του anakinra και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra

- **Μέτρηση της IL-1β**

Δεν υπήρξε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων που σημαίνει πως 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra τα επίπεδα της IL1β δεν άλλαξαν σε σχέση με κατά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου.

Οι συγκεντρώσεις της IL-1β σε pg/ml πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου φαίνονται παρακάτω στο ραβδόγραμμα.



Εικόνα 47: Συγκέντρωση IL-1β πριν τη χορήγηση του anakinra και 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία δείχνει πως στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο η αυξημένη απόπτωση σχετίζεται με το αυξημένο οξειδωτικό στρες. Επιπροσθέτως, τα αυξημένα επίπεδα της νιτροτυροσίνης, δείκτη νιτροξειδωτικού stress, σχετίζονται με την εκτασιμότητα της αορτής, AS όπως και με τη αγγειοδιαστολή βραχιόνιου αρτηρίας, FMD, ενώ τα αυξημένα επίπεδα του Fas και του FasL, δεικτών απόπτωσης, σχετίζονται με τη στεφανιαία εφεδρεία ροής, CFR. Έτσι λοιπόν μετρήσαμε δείκτες νιτροξειδωτικού στρες και δείκτες απόπτωσης οι οποίοι είναι κοινοί και στις δύο παθήσεις.

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που επιλέξαμε να μετρήσουμε είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία αποτελούν ένα καλό δείκτη της οξείδωσης των αμινοξέων των πρωτεϊνών, και είναι χημικά σταθερά μόρια και μέχρι στιγμής ο πιο κοινά χρησιμοποιούμενος δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης.¹⁴⁹ Η συσσώρευση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έχει παρατηρηθεί σε διάφορες ασθένειες, όπως στην αρθρίτιδα την οποία και μελετάμε.¹⁴⁹ Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μετρήθηκαν όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα και στα αποτελέσματα βρέθηκε πως υπάρχει σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τη χορήγηση του anakinra και άρα μείωση της πρωτεϊνικής οξείδωσης.

Ένας άλλος δείκτης οξειδωτικού στρες που επιλέξαμε να μετρήσουμε είναι η μηλονική διαλδεΰδη, η οποία είναι δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης, δηλαδή δείκτης μίας από τις κυριότερες οξειδωτικές αλλαγές των βιολογικών μεμβρανών, οι οποίες οδηγούν σε μόνιμη βλάβη των κυττάρων.¹⁴⁸ Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν πως δεν υπήρξε μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης.

Ο τελευταίος δείκτης οξειδωτικού στρες που μετρήθηκε είναι η νιτροτυροσίνη, η οποία αποτελεί δείκτη νιτροξειδωτικού στρες, είναι το προϊόν νίτρωσης της τυροσίνης και σχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις¹⁵⁰ όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της νιτροτυροσίνης μετά την χορήγηση του anakinra και άρα σημαντική μείωση του νιτροξειδωτικού στρες.

Έπειτα μετρήσαμε δείκτες απόπτωσης για να δούμε αν υπάρχει μείωση της απόπτωσης. Οι πρώτοι δείκτες απόπτωσης που μετρήσαμε είναι κοινοί και για την ρευματοειδή αρθρίτιδα και για την καρδιαγγειακή νόσο και είναι το Fas, το οποίο είναι υποδοχέας στα κύτταρα (DR υποδοχέας) και όταν εκφράζεται μέσω σύνδεσης

με το δεσμεύτη του FasL σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης.⁵² Στις μετρήσεις που έγιναν υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση και στους δύο δείκτες μετά από την χορήγηση του anakinra δείχνοντας πως υπάρχει σημαντική μείωση της απόπτωσης που επάγεται από το συγκεκριμένο αποπτωτικό μονοπάτι.

Στην καρδιαγγειακή νόσο, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β, παράγονται στα μακροφάγα και άρα εκφράζονται στα αφρώδη κύτταρα επάγοντας ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.¹⁰² Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα αυτές οι δύο προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εμπλέκονται και στον παθογενετικό μηχανισμό της προκαλώντας φλεγμονή.^{4,14,15,32,34}

Η IL-1β βοηθάει στην καταστροφή του χόνδρου και του περιαρθρικού ιστού. Η καταστροφή του χόνδρου γίνεται μέσω της αύξησης της αποδόμησης της πρωτεογλυκάνης και της μείωσης της σύνθεσής της.³⁴ Η IL-1β αλλάζει την παραγωγή του κολλαγόνου από τα χονδροκύτταρα μειώνοντας την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου II, το κύριο συστατικό του χόνδρου, και αυξάνοντας την παραγωγή κολλαγόνου τύπου I.^{4,34}

Ο TNF-α είναι ο αρχικός επαγωγέας της καταστροφής της άρθρωσης και η διαλυτή του μορφή σχετίζεται περισσότερο με την ενεργοποίηση των φλεγμονώδων κυτταροκινών και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις αρθρώσεις, ενώ η μεμβρανική μορφή σχετίζεται περισσότερο με την δραστηριότητα της νόσου στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁶⁶

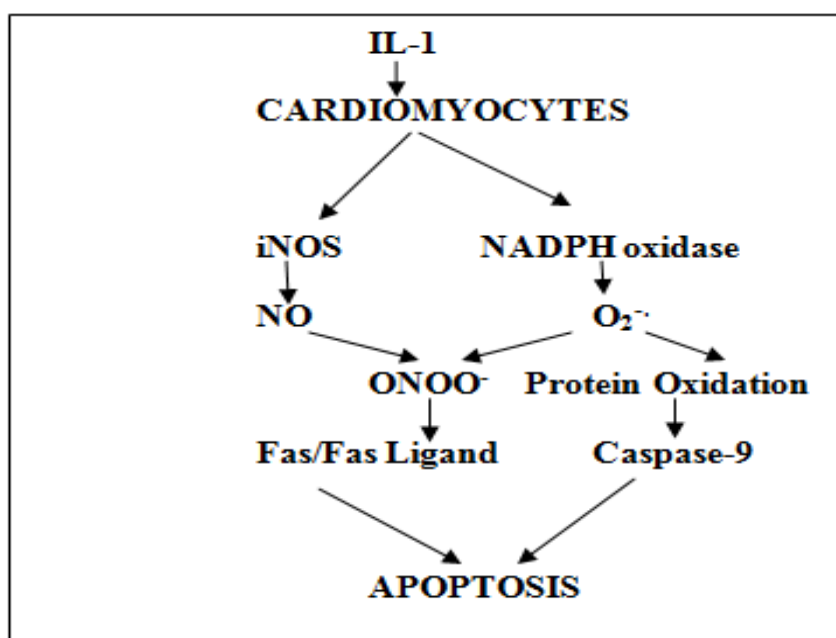
Έτσι λοιπόν προσδιορίσαμε τα επίπεδα της IL-1β πριν και μετά τη χορήγηση του anakinra και παρατηρήσαμε πως παρόλο που χορηγήθηκε αναστολέας της IL-1β (anakinra) τα επίπεδα της IL-1β αυξήθηκαν ελαφρώς, αλλά η αύξηση δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Αυτή η αύξηση ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι υποδοχείς της IL-1 μπλοκάρονται με τον ανταγωνιστή των υποδοχέων IL-1β και προκαλείται συσσώρευση της IL-1β αφού η μελέτη γίνεται σε οξεία φάση (η μέτρηση 3 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου) με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επαρκής χρόνος για δράσει επαρκώς το anakinra.

Παρόμοια εξήγηση υπάρχει και για την αύξηση των επιπέδων του TNF-α μετά από την χορήγηση του anakinra, η οποία αύξηση δεν είναι επίσης στατιστικά σημαντική. Λόγω του κοινού μονοπατιού της IL-1β και του TNF-α η συσσώρευση της IL-1β οδηγεί σε συσσώρευση του TNF-α και άρα αύξηση των επιπέδων του, 3 ώρες μετά τη χορήγηση του anakinra.

Συνοψίζοντας, η αναστολή της πρόσδεσης της IL-1β στους αντίστοιχους υποδοχείς της από την χορήγηση του anakinra βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία και επομένως τη λειτουργία του στεφανιαίου και αορτικού τοιχώματος, μέσω της μείωσης του νιτροξειδωτικού στρες το οποίο πιθανόν μειώνει την απόπτωση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο, το αυξημένο νιτροξειδωτικό stress σχετίζεται με τη μειωμένη λειτουργία του τοιχώματος της αορτής, ενώ η αυξημένη απόπτωση σχετίζεται με τη μειωμένη λειτουργία του τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων. Μετά τη χορήγηση αναστολέα της ιντερλευκίνης-1, η απόπτωση και το νιτροξειδωτικό stress μειώνονται και παρατηρείται βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθλίου και κατ'επέκταση βελτίωση της λειτουργίας του τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων και του τοιχώματος της αορτής. Ένας πιθανός μηχανισμός που συνδέει τη δράση της ιντερλευκίνης-1, του νιτροξειδωτικού stress και της απόπτωσης στα κύτταρα του μυοκαρδίου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 48).



Εικόνα 48 πιθανός μηχανισμός που συνδέει τη δράση της ιντερλευκίνης-1, του νιτροξειδωτικού stress και της απόπτωσης στα κύτταρα του μυοκαρδίου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

1. A Schuna, Rheumatoid Arthritis, DiPiro Pharmacotherapy, 94: 1505-16
2. Daniel E. Furst, Anakinra: Review of Recombinant Human Interleukin- I Receptor Antagonist in the Treatment of Rheumatoid Arthritis, Clinical Therapeutics (2004) 26: 1960-1971
3. Brian S.W. Choo-Kang, TNF-blocking therapies: an alternative mode of action? Trends in Immunology (2008) 26:518-522
4. Martin, Apoptosis, Encyclopedia of Immunology, Elsevier (1998) 220-228
5. Zodwa Dlamini, Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis, Pharmacology & Therapeutics (2004) 101: 1– 15
6. Hongtao Liu, The role of apoptosis in rheumatoid arthritis, Current Opinion in Pharmacology (2003), 3:317–322
7. Geoffrey Gloire, Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases, biochemical pharmacology (2008) 76: 1451– 1458
8. Karen G. Potter, Tumor Necrosis Factor Receptors, Encyclopedia of Biological Chemistry, Elsevier (2004) 4:277-283
9. Jean-Luc Bodmer The molecular architecture of the TNF superfamily, (2002) 27: 19-26
10. Zodwa Dlamini, Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis, Pharmacology & Therapeutics (2004) 101: 1– 15
11. Carl F. Ware, Tumor Necrosis Factors, Encyclopedia of Cancer, Elsevier (2002) 475- 489
12. Harald Wajant, Non-apoptotic Fas signaling, Cytokine & Growth Factor Reviews (2003)14:53–66
13. Lanny J. Rosenwasser, Biologic activities of IL-1 and its role in human disease, Journal of Allergy and Clinical Immunology, (1998) 102:344-355
14. Cailin Henderson, Monogenic IL-1 mediated autoinflammatory and immunodeficiency syndromes: Finding the right balance in response to danger signals, Clinical Immunology (2010) 135: 210–222
15. G Spinetti, M Wang, Atherosclerosis, encyclopedia (2007) 108-119
16. Steen Dalby Kristensen, Insights Into the Pathophysiology of Unstable Coronary Artery Disease, Am J Cardiol (1997) 80):5–9
17. Peter Adamson, Therapeutic strategies targeting interleukin-1 in vascular inflammation, Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 3(3):367-373
18. Lina Badimon and Vicenta Llorente-Cortes, Atherogenesis, Encyclopedia of Endocrine Diseases, (2004) 1: 278-288
19. Marian Valko, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 44–84
20. MacFarlane, P.M, Wilkerson, Reactive Oxygen Species and Respiratory Plasticity Following Intermittent Hypoxia Respiratory Physiology & Neurobiology 164 (2008) 263–271
21. Poyton, Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling (2009) 20:332–340
22. G. Solaini, et al., Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism, Biochim. Biophys. Acta (2010) x:xx-xx

23. Gonzalez C, Chemoreception in the context of the general biology of ROS Respiratory Physiology & Neurobiology (2007) 157:30–44
24. David Lefer, Oxidative stress and cardiac disease. The American Journal of Medicine, (2000) 109: 315–323
25. Pacher, Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev. (2006) 58: 87–114
26. Isabella Dalle-Donne, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, Clinica Chimica Acta (2003) 329: 23–38
27. R. Schulz, Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis, Pharmacology & Therapeutics (2005) 108: 225– 256

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A Schuna, Rheumatoid Arthritis, DiPiro Pharmacotherapy, 94: 1505-16
2. Gabriel SE, The epidemiology of rheumatoid arthritis. Rheum dis Clin North Am (2001) 27: 269-272
3. Coleman L A., Roubenoff P., Arthritis, Elsevier, (2005) 160-168
4. Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid arthritis—A molecular understanding. Ann Intern Med. (2002) 136:908–922
5. Klippel JH CL, Stone JH, Weyand CM, eds. Primer on the Rheumatic Diseases, Arthritis Foundation, (2001) 1060-82
6. Harris ED. The clinical features of rheumatoid arthritis. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, et al, Textbook of Rheumatology, Elsevier/Saunders, (2005): 1043–78.
7. Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol (2005) 19:55–72
8. Hard ER. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum (1979) 8:151–176.
9. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, et al. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: A prospective study. Lancet (2002) 359:1173–1177.
10. Wallberg-Jonsson S, Johansson H, Ohman ML, Rantapaa-Dahlqvist S. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. J Rheumatol (1999) 26:2562–2571.
11. Jiang H, Chess L. Regulation of immune response by T cells. N Engl J Med (2006) 354:1166–1176
12. Tsokos GC. B cells, be gone—B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis. N Engl J Med (2004) 350:2546–2548.
13. Weinstein E, Peeva E, Putterman C, Diamond B. B-cell biology. Rheum Dis Clin North Am (2004) 30:159–174.
14. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med (2001) 344: 907–916.

15. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* (2001) 45:101–106.
16. Choy E, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* (2001) 344:907–916.
17. Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, eds. *Textbook of Rheumatology* Elsevier, (2005):996–1042.
18. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis G. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum* (2002) 46:328–346.
19. Genovese MC, Harris ED. The treatment of rheumatoid arthritis. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, eds. *Textbook of Rheumatology*, (2005)
20. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: The importance of disease duration. *Arthritis Rheum* (2000) 43(1):22–29.
21. Fries JF. Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (2000) 39:30–35.
22. Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2002) 46:894–898.
23. Tsakonas E, Fitzgerald AA, Fitzcharles MA, et al. Consequences of delayed therapy with second-line agents in rheumatoid arthritis: A 3- year follow up on the Hydroxychloroquine in Early Rheumatoid Arthritis (HERA) study. *J Rheumatol* (2000) 27: 623–629.
24. Verstappen SM, Jacobs JW, Bijlsma JW, et al. Five-year follow up of rheumatoid arthritis patients after early treatment with disease-modifying antirheumatic drugs versus treatment according to the pyramid approach in the first year. *Arthritis Rheum* (2003) 48:1797–1807.
25. Gregory Gardner, Inflammatory arthritis in the era of the biologics, *Clinical and Applied Immunology Reviews*, (2005) 5: 19-44
26. Goldbach-Mansky R, Lipsky PE. New concepts in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med* (2003) 54:197–216.
27. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* (2004) 350:2591–2602.
28. Kalden JR, Schattenkirchner M, Sorensen H, et al. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis: A five-year followup study. *Arthritis Rheum* (2003) 48:1513–1520.
29. Buckley CD, Treatment of Rheumatoid Arthritis. Science, medicine and future. *BMJ* (1997) 315: 236-238
30. Choy E, Panayi G, Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl d Med* (2001) 344:907-916
31. Utsinger P, Rheumatoid arthritis, etiology, diagnosis and treatment. Lippincott (1985) 1-934
32. Harris E, Mechanisms of disease: rheumatoid arthritis- pathophysiology and implication for therapy. *NEJM* (1999) 322: 1277-1289

33. Boyle J, Buchanan W in: FA Davis, ed Clinical rheumatology, Lippincott (1971) 71-72
34. Short C, The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arth Rheum* (1994) 17:193-205
35. Rains CP, Noble S, Faulds D. Sulfasalazine: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* (1995) 50:137–156.
36. Genovese MC, Kremer JM. Treatment of rheumatoid arthritis with etanercept. *Rheum Dis Clin North Am* (2004) 30:311–328
37. Maini SR. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* (2004) 30:329–347
38. Keystone E, Haraoui B. Adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* (2004) 30:349–364
39. Hervey PS, Keam SJ. Abatacept. *BioDrugs* (2006) 20:53–61
40. De Vita S, Quartuccio L. Treatment of rheumatoid arthritis with rituximab: An update and possible indications. *Autoimmun Rev* (2006) 5:443–448.
41. Bhoola, Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis, *Pharmacology & Therapeutics* (2004) 101: 1– 15
42. A M K Choi , X Wang, APOPTOSIS, encyclopedia, Elsevier,(2006) 134-139
43. Seamus M., Apoptosis, *Encyclopedia of Immunology*, Elsevier(1998) 220-228
44. Le Roith D., Apoptosis, *Encyclopedia of Hormones*, Elsevier (2003) 154-158
45. Sidhara Ray, Apoptosis, encyclopedia of Elsevier, (2005) 152-166
46. Cummings, Apoptosis pathway-targeted drugs—from the bench to the clinic, *Biochimica et Biophysica Acta* (2004) 1705: 53– 66
47. Marie Hardwick, Cell Death, encyclopedia of cancer (2005) 553-564
48. Masato Enari, Cell Death(Apoptosis), encyclopedia (2002) 541-554
49. Guy C. Brown, Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c, *Biochimica et Biophysica Acta* (2008) 1777: 877–881
50. Harald Wajant, Non-apoptotic Fas signaling, *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2003) 14: 53–66
51. Krammer, CDSS(AP0-1 /Fas)-Mediated Apoptosis: Live and let Die, *advances in immunology*, (1999) 71: 163-191
52. Christine M. Eischen, The Fas Pathway in Apoptosis, *Advances in Pharmacology*, (1997) 41: 107-126
53. Marcus E. Peter, Does CD95 have tumor promoting activities?, *Biochimica et Biophysica Acta* (2005) 1755: 25– 36
54. Geoffrey Gloire, Edith Charlier, Jacques Piette, Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases, *biochemical pharmacology* (2008) 76: 1451-1458
55. Chulhee Choi, Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses, *Brain Research Reviews* (2004) 44: 65– 81
56. Marcus P., The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited, *Cell*, (2007) 129:447-50
57. J. Cleveland, Contenders in FasL/TNF Death Signaling, *Cell*, (1995)81:479-82

58. Luk van Parijs, Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses, *Current Opinion in Immunology* (1996) 8:355-361
59. Marcus E Peter and Peter H Krammer, Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis, *Current Opinion in Immunology* (1998) 10:545-551
60. Paul R Walker, Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences, *Current Opinion in Immunology* (1998) 10:564-572
61. Kimberly A Sabelko-Downes, The role of Fas ligand in vivo as a cause and regulator of pathogenesis, *Current Opinion in Immunology* (2000) 12:330-335
62. Haeock Lee, Thomas A. Ferguson, Biology of FasL, *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2003) 14: 325-335
63. Ann L. Jagger, FAS/FAS-L dependent killing of activated human monocytes and macrophages by CD4+/CD25- responder T cells, but not CD4+/CD25+ regulatory T cells, *Journal of Autoimmunity* (2012) 38: 29-38
64. Carl F. Ware, Tumor Necrosis Factors, *Encyclopedia of Cancer*, Elsevier (2002) 475- 489
65. Upasna Gaur, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily, *Biochemical Pharmacology* (2003) 66: 1403-1408
66. Segal, Tumor necrosis factor (TNF) inhibitor therapy for rheumatoid arthritis, oral surgery, oral medicine, (2008) 106: 155-164
67. V. Boschert, Single chain TNF derivatives with individually mutated receptor binding sites reveal differential stoichiometry of ligand receptor complex formation for TNFR1 and TNFR2, *Cellular Signalling* (2010) 22: 1088-1096
68. J. Muppidi, Life And Death Decisions: Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction, *Immunity*, (2004) 21:461-465
69. Bruce Beutler, Tumor Necrosis Factor (TNF), *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier (2003) 536-539
70. John C. Reed, Caspases and Cytokines: Roles in Inflammation and Autoimmunity, *Advances in Immunology*. (1999) 73: 265-284
71. Maqsood Elahi, NO-cGMP and TNF- α counter regulatory system in blood: Understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure, *Biochimica et Biophysica Acta* (2007) 1772: 5-14
72. Bruce Beutler, Flavia Bazzoni, TNF, Apoptosis and Autoimmunity: A Common Thread?, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* (1998) 31: 216-230
73. Dan Aderka, The Potential Biological and Clinical Significance of the Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, (1996) 7:231-240
74. John L. Cleveland and James N. Lhle, Contenders in FasL/TNF Death Signaling, *Cell*, (1995) 81: 479-482
75. Richard M. Locksley, The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology, *Cell*, (2001) 104: 487-501
76. Muneesh Tewari, Recent advances in tumor necrosis factor and CD40 signaling, *Current Opinion in Genetics & Development* (1996) 6:3-44

77. Richard J Armitage, Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands, *Current Opinion in Immunology* (1994) 6:407-413
78. David Wallach, Andrew V Kovalenko, Eugene E Varfolomeev, Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factorfamily: a Sanhedrin verdict, *Current Opinion in Immunology* (1998) 10:279-288
79. Klaus Pfeffer, Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors, *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2003) 14: 185–191
80. Karen G. Potter and Carl F. Ware, Tumor Necrosis Factor Receptors, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Volume 4. q 2004, Elsevier Inc.
81. Masatoshi Yamazaki and Haruyo Iwasawa, Tumor Necrosis Factor (TNF), *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, Elsevier (2004) 277-282
82. Lothar Rink, TNFa, *Encyclopedia of Immunology* (1998) 2435-2440
83. D. Wallace, TNF receptors, *Encyclopedia of Immunology* (1998) 1345-2349
84. S J Levine, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-a), Elsevier (2003) 307-311
85. Mubeccel Akdis, Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases, *J Allergy Clin Immunol* (2011) 127:701-21
86. Daniel E. Furst, Anakinra: Review of Recombinant Human Interleukin- I Receptor Antagonist in the Treatment of Rheumatoid Arthritis, *Clinical Therapeutics* (2004) 26: 1960-1971
87. Mantovani, Interleukin-1 (IL-1), *Encyclopedia of Hormones* (2003) 405-12
88. Danielle Burger, Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis?, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* (2006) 20: 879-896,
89. C. Henderson, R. Goldbach-Mansky, Monogenic IL-1 mediated auto-inflammatory and immunodeficiency syndromes: Finding the right balance in response to danger signals, *Clinical Immunology* (2010) 135:210–222
90. Y. Iwakura, Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models, *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2002)13:341–355
91. B. Foxwell, Cytokine Receptors, *Encyclopedia of Immunology* (1998)708-712
92. Diana Boraschi, Cytokine Receptors, *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, (2004) 1: 595-600
93. Andrea L. Wurster and Michael J. Grusby, Cytokines, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, (2004) 1: 550-554
94. Shoichiro Miyatake, Cytokines, Extracellular Transport and Processing, *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, (2004) 1: 609-613
95. Teresa Krakauer, Interleukine 1 and its Receptors, *Encyclopedia of Immunology* (1998) 1429-1435
96. E Stylianou, IL-1 and IL-18, *encyclopedia*, (2006) 350-353
97. F. Stephen Hodi, Interleukins, *Encyclopedia of Cancer*, (2002) 2:523-531
98. Lanny J. Rosenwasser, Biologic activities of IL-1 and its role in human disease, *J Allergy Clin Immunol* (1998) 102:344-350
99. Jean-Michel Dayer, The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis *Joint Bone Spine* (2002) 69: 123-32

- 100.Karine Chauffier, Jonathan London, Constance Beaudouin, Indications de l'anakinra, Presse Med. (2009) 38: 799–807
- 101.J. Marie Hardwick, Caspases in Programmed Cell Death, Encyclopedia of Cancer, (2002) 1: 369-373
- 102.Peter J. Little, Cellular and cytokine-based inflammatory processes as novel therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis, Pharmacology & Therapeutics (2011) 131: 255–268
- 103.Cifti O et al, impaired coronary microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis, Atherosclerosis (2008) 198:332-7
- 104.Maradit-Kremers H et al, cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. Arthritis Rheum, (2005) 52:722-32
- 105.Bacon P, Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. Autoimmun Rev (2002) 1:338-47
- 106.David Hurlimann, Anti-TNF- α treatment improves endothelial function in patients with Rheumatoid arthritis, Circulation (2002) 106:2184-87
- 107.Pasceri V, a tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis, Circulation, (1999) 100:2124-6
- 108.Sherer Y, mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. Nat Clin Pract Rheumatol (2006) 2:99-106
- 109.Hansel S, endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. Atherosclerosis (2003)170:177-80
- 110.Ross R, atherosclerosis: an inflammatory disease N Engl J Med (1999) 340:115-126
- 111.Lina Badimon and Vicenta Llorente-Cortes, Atherogenesis, Encyclopedia of Endocrine Diseases, (2004) 1: 278-288
- 112.Jesus A. Araujo and Aldons J. Lusis, Atherosclerosis, Encyclopedia of Endocrine Diseases, (2004) 1:288-294
- 113.G Spinetti, M Wang, Atherosclerosis, encyclopedia (2007) 108-119
- 114.Thomas F. Luscher, The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator, Atherosclerosis (1995) 118: 81-90
- 115.C K. Glass, Atherosclerosis: The Road Ahead, Cell, (2001) 104: 503–516
- 116.Peter Libby and Pierre Theroux, Pathophysiology of Coronary Artery Disease, Circulation (2005) 111:3481-3488
- 117.James Slater, Coronary Artery Disease: New Insights into the Pathophysiology, Prevalence, and Early Detection of a Monster Menace, Seminars in Ultrasound, CT, and MRI, (2004)25:113-121
- 118.F G Huffman, S Koutoubi and S Nath, Coronary Heart Disease, etiology and risk factor (2003) 1647-1654
- 119.E.A. Kaperonis, C.D. Liapis, J.D. Kakisis, D. Dimitroulis and V.G. Papavassiliou, Inflammation and Atherosclerosis, Eur J Vasc Endovasc Surg (2006) 31: 386-393

120. Steen Dalby Kristensen, Insights Into the Pathophysiology of Unstable Coronary Artery Disease, *Am J Cardiol* (1997) 80:5–9
121. Jawahar Mehta, Interactive Role of Infection, Inflammation and Traditional Risk Factors in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, *JACC* (1998) 31:1217–25
122. Karvonen, J., Paivansalo, M., Kesaniemi, Y. A., & Horkko, S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation*. (2003) 108: 2107–2112.
123. Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Magro, C. M., St Clair, E. W., & Tedder, T. F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev* (2008) 223: 284–299.
124. Kyaw, T., Tay, C., Khan, A., Dumouchel, V., Cao, A., To, K., et al. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol* (2010) 185: 4410–4419.
125. Xiao-Feng Yang, Vascular inflammation and atherogenesis are activated via receptors for PAMPs and suppressed by regulatory T cells, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* (2008) 5
126. Olivier Sorg, Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?, *C. R. Biologies* (2004) 327: 649–662
127. Alicia Kowaltowski, Anibal Vercesi, Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress, *Free Radical Biology & Medicine*, (1999) 26:463–471
128. Israeli, Adverse Effects Profile of Sulfhydryl Compounds in Man, *Chromatographia* (1997) 44: 1–4
129. Qiang Ma, Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications, *Pharmacology & Therapeutics* (2010) 125:376–393
130. B. Palmieri, V. Sblendorio, Oxidative stress tests: overview on reliability and use Part I, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* (2007) 11: 309–342
131. Nedeljkovic, Gokce, Loscalzo, Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction, *Postgrad Med J* (2003) 79:195–200
132. James F. Collawn, Zsuzsa Bebök, Structure and Functions of Biomembranes, *Current Topics in Membranes*, 61: 1–21
133. Claudia Penna, Daniele Mancardi, Raffaella Rastaldo, Pasquale Pagliaro, Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning, *Biochimica et Biophysica Acta* (2009) 1787: 781–793
134. Dominika Malinska, Sandra Mirandola, Wolfram Kunz, Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species, *FEBS Letters* (2010) xxx:xxx–xxx
135. P.M. MacFarlane, J.E.R. Wilkerson, M.R. Lovett-Barr, G.S. Mitchell, Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia, *Respiratory Physiology & Neurobiology* (2008) 164: 263–271
136. Alexey Kruglov, Ksenia Subbotina, Nils-Erik Saris, Redox-cycling compounds can cause the permeabilization of mitochondrial membranes by mechanisms other than ROS production, *Free Radical Biology & Medicine* (2008) 44: 646–656

137. Suvara Kimnate Wattanapitayakul, John Anthony Bauer, Oxidative pathways in cardiovascular disease Roles, mechanisms, and therapeutic implications, *Pharmacology & Therapeutics* (2001) 89: 187-206
138. Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2007) 39: 44–84
139. Paul S. Brookes, Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple, *Free Radical Biology & Medicine* (2005) 38: 12–23
140. C. Gonzalez, M.T. Agapito, A. Rocher, M.C. Gonzalez-Martin, V. Vega-Agapito, A. Gomez-Nino, R. Rigual, J. Castaneda, A. Obeso, Chemoreception in the context of the general biology of ROS, *Respiratory Physiology & Neurobiology* (2007) 157: 30–44
141. N.J.H. Raat, S. Shiva, M.T. Gladwin, Effects of nitrite on modulating ROS generation following ischemia and reperfusion, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2009) 61: 339–350
142. Pál Pacher, Alex Nivorozhkin, Csaba Szabó, Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol, *Pharmacol Rev.* (2006) 58: 87–114
143. *Methods in Enzymology*, Volume 441: 15-30
144. Robert O. Poyton, Kerri A. Ball, Pablo R. Castello, Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signalling, *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20 No.7: 1-10
145. Pasquale Pagliaro, Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO, *Life Sciences* (2003) 73:2137–2149
146. R. Rastaldo, P. Pagliaro, S. Cappello, C. Penna, D. Mancardi, N. Westerhof, G. Losano, Nitric oxide and cardiac function, *Life Sciences* (2007) 81:779–793
147. R. Schulz, T. Rassaf, P. Massion, M. Kelm, J. Balligand, Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis, *Pharmacology & Therapeutics* (2005) 108: 225– 256
148. Joshua M. Hare, Farideh Beigi, Konstantinos Tziomalos, Nitric Oxide and Cardiobiology Methods for Intact Hearts and Isolated Myocytes, Chapter 21, *Methods in Enzymology*, (2008) 441: 369-387,
149. Isabella Dalle-Donne, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta* (2003) 329: 23–38
150. Pacher P, Nitric oxide and peroxynitrate in health disease, *physiol Rev* (2007) 87:315
151. Antonio Abbate et al, Anakinra, a recombinant human Interleukin 1 Receptor Antagonist, Inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction, *Circulation* 2008; 117; 2670-2683
152. Ignatios Ikonomidis, John P. Lekakis, Maria Nikolaou, Ioannis Paraskevaidis, Ioanna Andreadou, Theophania Kaplanoglou, Pelagia Katsimbri, Grigorios Skarantavos, Panayiotis N. Soucacos and Dimitrios T. Kremastinos, Inhibition of Interleukin-1 by Anakinra Improves Vascular and Left Ventricular Function in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Circulation* (2008) 117: 2662-2669

153. Ignatios Ikonomidis, Stavros Tzortzis, John P. Lekakis, Maria Nikolaou, Ioannis Paraskevaidis, Ioanna Andreadou, Theophania Kaplanoglou, Pelagia Katsimbri, Grigorios Skarantavos, Panayiotis N. Soucacos and Dimitrios T. Kremastinos, Lowering interleukin-1 activity with anakinra improves myocardial deformation in rheumatoid arthritis, *Heart* (2009) 95(18):1502-7
154. Ignatios Ikonomidis, Stavros Tzortzis, John P. Lekakis, Maria Nikolaou, Pinelopi Dasou, Ioannis Paraskevaidis, Ioanna Andreadou, Sofia Markantonis, Pelagia Katsimbri, Grigorios Skarantavos, Association of soluble apoptotic markers with impaired left ventricular deformation in patients with rheumatoid arthritis. Effects of inhibition of interleukin-1 activity by anakinra. *Thromb Haemost.* (2011) 106:959-67
155. Stefanadis et al. Distensibility of the ascending aorta: comparison of invasive and non-invasive techniques in healthy men and in men with coronary artery disease *Eur Heart J* (1990) 11:990-996.
156. Paolo Voci et al. Coronary flow: a new asset for the echo lab? *European Heart Journal* (2004) 25:1867-1879
157. Corretti M, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery *J Am Coll Cardiol* (2002) 39:257-65
158. Anderson T, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* (1995) 26:1235-41