

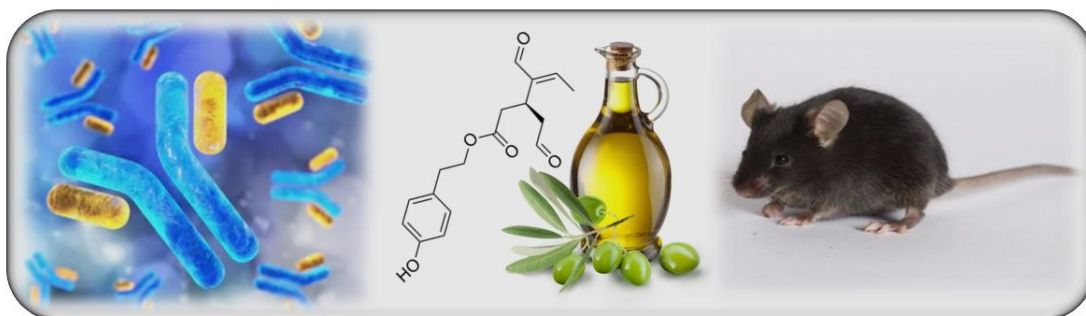


ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θεραπείες με βιολογικούς παράγοντες σε ποντίκια,
πρότυπα πολυαρθρίτιδας



ΡΗΓΚΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Γεωπόνος-Βιοτεχνολόγος

Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τσιτσιλώνη Ουρανία

Επιστημονική Υπεύθυνη: Διευθύντρια Ερευνών Χαραλάμπους Σύλβα

ΑΘΗΝΑ 2018

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θεραπείες με βιολογικούς παράγοντες σε ποντίκια, πρότυπα πολυαρθρίτιδας: Μελέτη της συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης αντι-TNF παράγοντα με ολεοκανθάλη στη χρόνια πολυαρθρίτιδα με χρήση διαγονιδιακών ποντικών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια

Σύλβα Χαραλάμπους, Ερευνήτρια Α΄

Ο ορισμός της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε από την Ειδική Διατμηματική Επιτροπή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» στη συνεδρίαση της στις 18-05-2018.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο πλαίσιο του διατμηματικού ΠΜΣ «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μελέτης Φλεγμονής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) με επιστημονική υπεύθυνη τη Διευθύντρια Ερευνών Σύλβα Χαραλάμπους σε συνεργασία με τον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή εξεταστική επιτροπή η οποία αποτελείται από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη, την Καθηγήτρια και Πρόεδρο του Τμήματος Βιολογίας Ισιδώρα Παπασιδέρη και τη Διευθύντρια Ερευνών Σύλβα Χαραλάμπους για τη συνεργασία στην εκπόνηση και εξέταση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ Σύλβα Χαραλάμπους για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία μου στο εργαστήριό της υπό την επίβλεψη και καθοδήγησή της, για την καθημερινή συνεργασία, την οργάνωση και υλοποίηση της μελέτης, τις γνώσεις, τις συμβουλές και τις καθοδηγήσεις που αποτέλεσαν κίνητρο της εξέλιξής μου τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Τεχνολόγο του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας και πολύτιμο μέλος της ομάδας μας, Φώτη Μπαντούνα, για την καθοριστική συμβολή του στην εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών, την αρμονική συνεργασία μας στην εργαστηριακή καθημερινότητα και την εκμάθηση χειρισμών και τεχνικών.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την υπεύθυνη κτηνίατρο του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του ΕΙΠ Δρ Ειρήνη Φραγκιαδάκη καθώς και τα μέλη του τμήματος Αργυρώ Λάππα, Αριάδνη Κάρλες, Άγγελο Βαγιωνά και Νίκο Βλαχογιάννη για την πολύτιμη συνεισφορά τους σε ό,τι αφορά την αδειοδότηση της πειραματικής διαδικασίας, τον αποτελεσματικό χειρισμό, την ηθική χρήση των ζώων εργαστηρίου τα οποία αποτέλεσαν σημαντικό μέρος της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά τη συνεργάτιδα της ερευνητικής ομάδας μας Δρ Ελένη Ντότσικα Διευθύντρια Ερευνών του εργαστηρίου Κυτταρικής Ανοσολογίας του ΕΙΠ για την ευγενική προσφορά της καθαρής ολεοκανθάλης που παρασκευάστηκε στο πλαίσιο συνεργασίας της με τον Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Καλλιόπη Καραμπέτσου του εργαστηρίου Κυτταρικής Ανοσολογίας του ΕΙΠ για την εκτέλεση όλου του προπαρασκευαστικού σταδίου της ολεοκανθάλης που μου διατέθηκε για την εργασία μου καθώς και για την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ρευματοειδής αρθρίτιδα	12
1.1.1 Επιδημιολογία και Αιτιοπαθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	13
1.1.2 Παθοφυσιολογία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	17
1.2 Θεραπεία Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας.....	24
1.2.1 Αναστολείς του TNF	25
1.2.2 Ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (Anakinra)	28
1.2.3 Αναστολέας της ενεργοποίησης των T-κυττάρων (Abatacept)	29
1.2.4 Αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD20 των B-κυττάρων (Rituximab).....	29
1.2.5 Αναστολέας της IL-6 (Tocilizumab)	29
1.3 Ζωικά πρότυπα Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας	30
1.3.1 Επαγόμενα πρότυπα	32
1.3.2 Αυθόρμητα πρότυπα	34
1.4 Ολεοκανθάλη: ένα φυσικό προϊόν με αντιφλεγμονώδη δράση	37
1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1 Ζώα πειράματος.....	45
2.2 Διαδικασίες ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου.....	46
2.3 Γονοτυπική ανάλυση διαγονιδιακών ποντικών με τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	46
2.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από βιοψία ουράς	46
2.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	47
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	50
2.4 Πειραματικές ομάδες.....	51
2.5 Κλινική αξιολόγηση της αρθρίτιδας.....	52
2.6 Αιμοληψία από την ουρά και συλλογή ορού	53
2.7 Ιστολογική ανάλυση.....	53
2.7.1 Απομόνωση ιστών και μονιμοποίηση.....	54

2.7.2 Αφαλάτωση ιστών.....	54
2.7.3 Εμποτισμός ιστών σε παραφίνη με χρήση ιστοκινέτας.....	55
2.7.4 Εμπέδωση-Εγκλιση σε κύβους παραφίνης και παραγωγή τομών των ιστών	56
2.7.5 Χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης	57
2.7.6 Χρώση με κυανό της τολουϊδίνης (Toluidine Blue).....	58
2.7.7 Αξιολόγηση των τομών των ιστών	58
2.8 Ανοσολογικός έλεγχος	60
2.9 Στατιστική ανάλυση	60
2.10 Χρονοδιάγραμμα της μελέτης	61
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
3.1 Κλινική αξιολόγηση.....	62
3.2 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση	66
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACPA (Anti-Citrullinated Peptide/Protein Antibody)	Αντίσωμα έναντι κιτρουλλινωμένου πεπτιδίου/πρωτεΐνης
APC (Antigen Presenting Cell)	Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
AREs (AU-Rich Elements)	Στοιχεία πλούσια σε αδερίνη και ουρακίλη
COX (Cyclooxygenase)	Κυκλοξυγενάση
DC (Dendritic Cell)	Δενδριτικό κύτταρο
EMA (European Medicines Agency)	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
FDA (Food and Drug Administration)	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FLS (Fibroblast-Like Synoviocytes)	Ινοβλάστες του αρθρικού υμένα
HLA (Human Leukocyte Antigen)	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
IFN (Interferon)	Ιντερφερόνη
IL (Interleukin)	Ιντερλευκίνη
MHC (Major Histocompatibility Complex)	Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
MLS (Macrophage-Like Synoviocytes)	Μακροφάγα του αρθρικού υμένα
MMP (Matrix Metalloproteinase)	Μεταλλοπρωτεΐνάση
NK (Natural Killer cell)	Φυσικό φονικό κύτταρο
NO (Nitric Oxide)	Οξειδίο του αζώτου
NOS (Nitric Oxide Synthase)	Συνθάση οξειδίου του αζώτου
OLEO (Oleocanthol)	Ολεοκανθάλη
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PGE ₂ (Prostaglandin E ₂)	Προσταγλανδίνη E ₂
RA (Rheumatoid Arthritis)	ΡΑ (Ρευματοειδής Αρθρίτιδα)
RF (Rheumatoid Factor)	Ρευματοειδής Παράγοντας
TCR (T Cell Receptor)	Υποδοχέας T-κυττάρου
Tg (Transgenic)	Διαγονιδιακός
TGF (Transforming Growth Factor)	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
T _H (T-Helper)	T-βοηθητικά
TLR (Toll-Like Receptor)	Υποδοχέας τύπου Toll
TNF (Tumor Necrosis Factor)	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
TNFR1/ p55 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)	Υποδοχέας 1 του παράγοντα νέκρωσης όγκων
TNFR2/ p75 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2)	Υποδοχέας 2 του παράγοντα νέκρωσης όγκων
Wt (Wild type)	Αγρίου τύπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης και καταστροφική για τις αρθρώσεις νόσος με σοβαρές συστηματικές επιπλοκές στην υγεία που η αιτιολογία της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και υπερπλασία του αρθρικού υμένα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και του οστού. Σήμερα, στις καθιερωμένες θεραπείες έχουν προστεθεί οι βιολογικοί παράγοντες, όπως οι αναστολείς του TNF. Ωστόσο, ούτε και τα φάρμακα αυτά δεν είναι πάντα πλήρως αποτελεσματικά, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιορίζουν τη μακροχρόνια χρήση τους. Αν και στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης (optimization) των ήδη εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικότερες συνδυαστικές θεραπείες βιολογικών παραγόντων με συμβατικά νοσοτροποποιητικά αντι-ρευματικά φάρμακα, η περαιτέρω βελτιστοποίηση των θεραπευτικών σχημάτων συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό στόχο. Προς αυτή την κατεύθυνση, διερευνώνται συστατικά φυσικών προϊόντων με πιθανή φαρμακευτική δράση. Η ολεοκανθάλη, συστατικό του φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου, έχει συσχετισθεί με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, και άλλες δράσεις σε διάφορα *in vitro* και *in vivo* πρότυπα ασθενειών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης του αντι-TNF (D2E7) με ολεοκανθάλη στην χρόνια πολυαρθρίτιδα, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο ζωικό πρότυπο, τον διαγονιδιακό ποντικό Tg197. Ο ποντικός αυτός υπερεκφράζει τον ανθρώπινο TNF-α αποτελώντας ένα proof-of-concept πρότυπο αξιολόγησης αντι-ρευματικών φαρμάκων. Η θεραπευτική δράση της ολεοκανθάλης ελέγχθηκε σε δύο δόσεις, χωρίς ή σε συνδυασμό με τον D2E7. Η συγκέντρωση του D2E7 που χρησιμοποιήθηκε είχε προηγουμένως δείξει τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα σε αυτό το ζωικό πρότυπο, αλλά χορηγήθηκε σε αραιότερα χρονικά διαστήματα. Η επιλογή αυτή έγινε με σκοπό το D2E7 να εμφανίζει μικρότερη αποτελεσματικότητα και να αναδειχθεί με αυτό τον τρόπο η πιθανή θετική δράση της ολεοκανθάλης. Το θεραπευτικό σχήμα εφαρμόστηκε στους διαγονιδιακούς ποντικούς σε ηλικία 6 εβδομάδων, για διάστημα 6 εβδομάδων. Η αξιολόγηση της αρθρίτιδας έγινε βάσει κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων. Η παρούσα μελέτη αποτελεί πρώτη αναφορά της *in vivo* της δράσης της ολεοκανθάλης, είτε σε συνδυαστικό θεραπευτικό σχήμα, είτε ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση της ΡΑ, σε ζωικό πρότυπό της. Τέλος, τα

αποτελέσματα συμπληρώνουν προηγούμενες *in vitro* μελέτες της δράσης της ολεοκανθάλης σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων και χονδροκυττάρων.

Τα κλινικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα έδειξαν ότι το συνδυαστικό σχήμα ολεοκανθάλη 5mg/Kg με D2E7 μείωσε περισσότερο την παθολογία των αρθρώσεων των διαγονιδιακών ποντικών σε σχέση με τη μονοθεραπεία με D2E7 στο ίδιο θεραπευτικό σχήμα. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης των κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων των ποντικών που έλαβαν μονοθεραπεία ολεοκανθάλης έναντι των παραμέτρων των ποντικών χωρίς θεραπεία. Ωστόσο, η μείωση των τιμών των κλινικο-ιστοπαθολογικών ευρημάτων των ποντικών που έλαβαν μονοθεραπεία ολεοκανθάλης ήταν μικρότερη από αυτή των ποντικών που έλαβαν, είτε μονοθεραπεία με D2E7, είτε συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη, η οποία ήταν σημαντικά μικρότερη ως προς τις τιμές των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία.

Τα αποτελέσματα αυτά ανέδειξαν α) τη θετική δράση της ολεοκανθάλης στην έκβαση της νόσου και β) τη δυνατότητα χορήγησης του D2E7 σε αραιότερα χρονικά διαστήματα όταν συνδυάζεται με λήψη ολεοκανθάλης, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού καθιστά τη θεραπεία περισσότερο φιλική στον ασθενή.

Περαιτέρω μελέτη σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, όπως ο ρόλος κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, οι δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα κυτταροκινών, θα δώσει περισσότερες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης της ολεοκανθάλης ώστε να μπορούν να γίνουν εκμεταλλεύσιμες στο σχεδιασμό για βελτιστοποίηση των αντι-TNF θεραπευτικών στρατηγικών ή ακόμα και σε προληπτικές ή ήπιες θεραπείες της πολυαρθρίτιδας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory and destructive joint disease of unclear cause with severe systemic implications. It is characterized by synovial inflammation and hyperplasia, autoantibody production, cartilage destruction and bone erosion. Today, together with traditional therapies, biological agents such as TNF inhibitors have been introduced for RA treatment. However, none of these drugs are always fully effective while side effects limit their long term use. Although combinational therapies of biological agents with conventional disease-modifying antirheumatic drugs with higher efficacy have been developed in the context of optimization of commercially available drugs, further optimization of the treatment regimens is still a considerable goal. To this end, compounds derived from natural products with potent pharmaceutical action are under investigation. Oleocanthal, olive oil's phenolic fraction component, has been associated with anti-inflammatory, anti-oxidant and other activities in various *in vitro* and *in vivo* disease models.

The aim of this study is to investigate the combinatorial therapeutic effect of anti-TNF agent (D2E7) with oleocanthal in chronic polyarthritis, using the relevant animal model, the Tg197 transgenic mouse. This mouse overexpresses human TNF- α being a proof-of-concept model to assess anti-rheumatic drugs. Oleocanthal's therapeutic effect was tested in two different doses (5 mg/Kg and 10 mg/Kg 3 times weekly) alone or in combination with D2E7. D2E7 was administrated at a dose which was optimal for this model but at less frequent time periods, every 2 weeks. The aim of this choice was to reduce the efficacy of D2E7 in order to show oleocanthal's potent beneficial effect. Transgenic mice were treated for 6 weeks starting at week 6 of age. Arthritis was assessed based on clinical and histopathological parameters. This study is the first report of oleocanthal's *in vivo* therapeutic effect either in combinational therapy or alone in an animal model of RA. Results complement previous *in vitro* studies of oleocanthal's effect in macrophage and chondrocyte cell lines.

Clinical and histopathological findings showed that combinational therapy of oleocanthal 5 mg/Kg with D2E7 resulted in higher reduction of joint pathology than anti-TNF treatment alone at the same therapeutic regimen. Moreover, a trend in reducing clinical and histopathological parameters with oleocanthal treatment alone compared to untreated mice was observed. However, reduction of these parameters with oleocanthal treatment alone was lower than this with anti-TNF treatment alone

or combinational treatment of oleocanthal along with anti-TNF which was significantly lower compared to untreated mice.

These findings clearly show that a) oleocanthal exerts a beneficial effect in disease outcome and b) anti-TNF can be administrated at less frequent time periods when combined with oleocanthal, making the therapy more patient-friendly.

Further study at cellular and molecular level including the role of various cell populations of immune system, inflammation and oxidative stress markers and cytokine levels will provide us with more information about oleocanthal's way of action which can be useful for optimizing anti-TNF therapeutic strategies or even for preventive or mild therapies of polyarthritis.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος ασαφούς αιτιολογίας. Εκδηλώνεται ως προοδευτική και καταστροφική πολυαρθρίτιδα σε συνδυασμό με ορολογικές ενδείξεις αυτοδραστικότητας. Προκαλεί πόνο, οίδημα και δυσκαμψία των αρθρώσεων καθώς και άλλες εξωαρθρικές εκδηλώσεις όπως ρευματικά οζίδια, πνευμονικές διαταραχές, αγγειίτιδα και συστηματικές συννοσηρότητες, οδηγώντας σε αναπηρία και σημαντική μείωση της ποιότητας ζωής. Αν δεν αντιμετωπιστεί κατάλληλα, οδηγεί τελικά σε σημαντικά αυξημένη θνησιμότητα (van Nies *et al.*, 2010).

Η διάγνωση της ΡΑ στηρίζεται σε κριτήρια ταξινόμησης και περιλαμβάνουν τέσσερις παραμέτρους: α) προσβολή αρθρώσεων, β) αυτοαντισώματα, γ) πρωτεΐνες οξείας φάσης και δ) διάρκεια συμπτωμάτων (δημοσιεύθηκαν από το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας¹ και τον Ευρωπαϊκό Αντιρευματικό Σύνδεσμο²) (Aletaha *et al.*, 2010). Σκοπός της ταξινόμησης αυτής είναι να διευκολύνει την αναγνώριση ασθενών σε πρώιμα στάδια της νόσου.

Παρόλο που τα αίτια της ΡΑ είναι άγνωστα, η πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου έχει συμβάλει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών, με βελτιωμένα αποτελέσματα. Η θεραπεία περιλαμβάνει συμβατικά, βιολογικά και νέα μη-βιολογικά νοσοτροποποιητικά αντιρευματικά φάρμακα. Η έγκαιρη χρήση των συμβατικών φαρμάκων οδηγεί σε βελτίωση της έκβασης της νόσου με μείωση της αρθρίτιδας και της συστηματικής φλεγμονής καθώς επίσης καλύτερη διαχείριση των συννοσηροτήτων. Όταν η αρθρίτιδα είναι ανεξέλεγκτη ή δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα συμβατικά φάρμακα λόγω σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, ενδείκνυται η χρήση βιολογικών παραγόντων οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένα

¹ Το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (American College of Rheumatology) είναι ένας οργανισμός για επαγγελματίες υγείας και επιστήμονες που συμβάλλει στην εξέλιξη του τομέα της ρευματολογίας μέσω εκπαιδευτικών προγραμμάτων, έρευνας και πρακτικής υποστήριξης σχετικά με τη φροντίδα ανθρώπων με αρθρίτιδα, ρευματικές και μυοσκελετικές παθήσεις. Οργανώνει, επίσης, επιστημονικές συναντήσεις και διαχειρίζεται δύο ιατρικά περιοδικά (Arthritis & Rheumatology και Arthritis Care & Research).

² Ο Ευρωπαϊκός Σύνδεσμος Ρευματολογίας (European League Against Rheumatology) είναι ένας μη κυβερνητικός οργανισμός που αντιπροσωπεύει ανθρώπους με αρθρίτιδα/ρευματικές νόσους, επαγγελματίες υγείας και επιστήμονες ρευματολογίας από όλα τα κράτη της Ευρώπης. Στοχεύει στη μείωση του βάρους των ρευματικών νόσων στο άτομο και την κοινωνία και τη βελτίωση, πρόληψη και αποκατάσταση μυοσκελετικών νόσων.

μόρια που συμμετέχουν στους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, όπως οι αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Ωστόσο, τόσο οι συμβατικές όσο οι βιολογικές θεραπείες κάποιες φορές αποτυγχάνουν ή έχουν μερική απόκριση ή η κλινική ύφεση δεν διατηρείται χωρίς συνεχιζόμενη θεραπεία. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων θεωρείται αναγκαία. Σε αυτό το πλαίσιο, η βελτιστοποίηση υπαρχουσών θεραπειών με τη χρήση, σε μερικές περιπτώσεις, συνδυαστικών θεραπειών με διαφορετική στόχευση αποτελεί βασικό στόχο της έρευνας για την αντιμετώπιση της ΡΑ.

1.1.1 Επιδημιολογία και Αιτιοπαθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Η ΡΑ έχει συχνότητα εμφάνισης 0,5- 1% με εμφανή μείωση από το βορρά στο νότο (στο βόρειο ημισφαίριο) και από τις αστικές στις αγροτικές περιοχές (Alamanos *et al.*, 2006, Smolen *et al.*, 2016). Η νόσος είναι τρεις φορές πιο συχνή στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Ο επιπολασμός της αυξάνεται με την ηλικία και είναι υψηλότερος σε γυναίκες άνω των 65 ετών. Λόγω αυτών των δεδομένων διαπιστώνεται η θεωρία ότι οι ορμονικοί παράγοντες θα μπορούσαν να έχουν παθογενετικό ρόλο (Symmons *et al.*, 2002). Η συσχέτιση της νόσου με γενετικούς παράγοντες προκύπτει από μελέτες σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους. Τα ποσοστά αντιστοιχίας (concordance rates) σε αυτούς είναι 15- 30% και 5% αντίστοιχα (MacGregor *et al.*, 2000). Η κληρονομικότητα για την οροθετική³ ΡΑ εκτιμάται στο 40-65%, ενώ για την οροαρνητική⁴ στο 20% (Jiang *et al.*, 2015, Frisell *et al.*, 2016).

Στην κατανόηση της γενετικής της ασθένειας, σημαντικό ρόλο έχει διαδραματίσει η εφαρμογή των σύγχρονων τεχνολογιών γενετικής όπως οι μικροσυστοιχίες και η αλληλούχιση νέας γενιάς, σε συνδυασμό με μελέτες που έχουν γίνει σε μεγάλες και καλά χαρακτηρισμένες κλινικές ομάδες. Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από εκατό γενετικοί τόποι που σχετίζονται με ΡΑ. Οι περισσότεροι από αυτούς εμπλέκονται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς, κάποιοι εκ των οποίων είναι κοινοί με άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους όπως η ψωρίαση (Roberson and Bowcock, 2010) και ο συστηματικός ερυθρεμάτης λύκος (Remmers *et al.*, 2007).

³ Οροθετική θεωρείται η ρευματοειδής αρθρίτιδα όταν στον ορό του ασθενούς ανιχνεύεται η παρουσία αυτοαντισωμάτων όπως ο ρευματοειδής παράγοντας ή τα αυτοαντισώματα έναντι κίτρουλλινωμένων πεπτιδίων.

⁴ Οροαρνητική θεωρείται η ρευματοειδής αρθρίτιδα όταν δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα στον ορό του ασθενούς.

Ο ισχυρότερος γενετικός παράγοντας κινδύνου για ΡΑ είναι τα αλληλόμορφα HLA-DRB1 του συμπλέγματος μορίων HLA τάξης II. Οι αλυσίδες που κωδικοποιούνται από τα αλληλόμορφα αυτά έχουν μια κοινή αμινοξική αλληλουχία (QKRAA) στην αύλακα πρόσδεσης του πεπτιδίου που ονομάζεται «κοινός επίτοπος» (Gregersen *et al.*, 1987). Ο κοινός επίτοπος έχει μεγάλη συσχέτιση με την οροθετική για αυτοαντισώματα έναντι κιτρουλλινωμένων πεπτιδίων (Anti-Citrullinated Peptide Antibodies, ACPAs) και της ανοσοσφαιρίνης IgG (ρευματοειδής παράγοντας, Rheumatoid Factor, RF) νόσο, ενώ έχει μικρή συσχέτιση με την οροαρνητική για ACPAs/RF νόσο (Viatte *et al.*, 2015). Η πρόσδεση των αντιγόνων στις HLA αλυσίδες που φέρουν τον κοινό επίτοπο γίνεται με μεγαλύτερη συγγένεια κατά την μετατροπή της αργινίνης του αντιγόνου σε κιτρουλλίνη, μια διαδικασία που ονομάζεται κιτρουλλινοποίηση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διακοπή της ανοχής, επιτρέποντας τη δημιουργία αντισωμάτων έναντι αυτών των αντιγόνων (Hill *et al.*, 2003). Τα χαρακτηριστικά αυτά αυτοαντισώματα υπάρχουν στο 50- 70% των ασθενών κατά τη διάγνωση και παραμένουν σταθερά καθ' όλη την πορεία της νόσου (Barra *et al.*, 2011).

Άλλοι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με οροθετικότητα ή οροαρνητικότητα για ACPA, φαίνεται να εμπλέκονται σε διαδικασίες ανοσολογικής ρύθμισης όπως η διέγερση, ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T- κυττάρων, όπως ο PTPN22 (Begovich *et al.*, 2004).

Η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκαλεί, μεταξύ άλλων, και επιγενετικές τροποποιήσεις συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην παθογένεια της νόσου. Αλλαγές στην ακετυλίωση των ιστονών και τη μεθυλίωση του DNA ρυθμίζουν τη βιολογία των ινοβλαστών και των μακροφάγων του αρθρικού υμένα (Klein and Gay, 2015). Σε πρόσφατη μελέτη ταυτοποιήθηκαν δέκα διαφορετικές θέσεις μεθυλίωσης που πιθανώς προάγουν τον κίνδυνο για ρευματοειδή αρθρίτιδα (Liu *et al.*, 2013). Τα microRNAs αποτελούν έναν επιπλέον επιγενετικό παράγοντα, πολλά εκ των οποίων έχουν αναγνωρισθεί ως κρίσιμοι ρυθμιστές των βιολογικών λειτουργιών των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων και ινοβλαστών του αρθρικού υμένα, όπως το miR155 (Blum *et al.*, 2011).

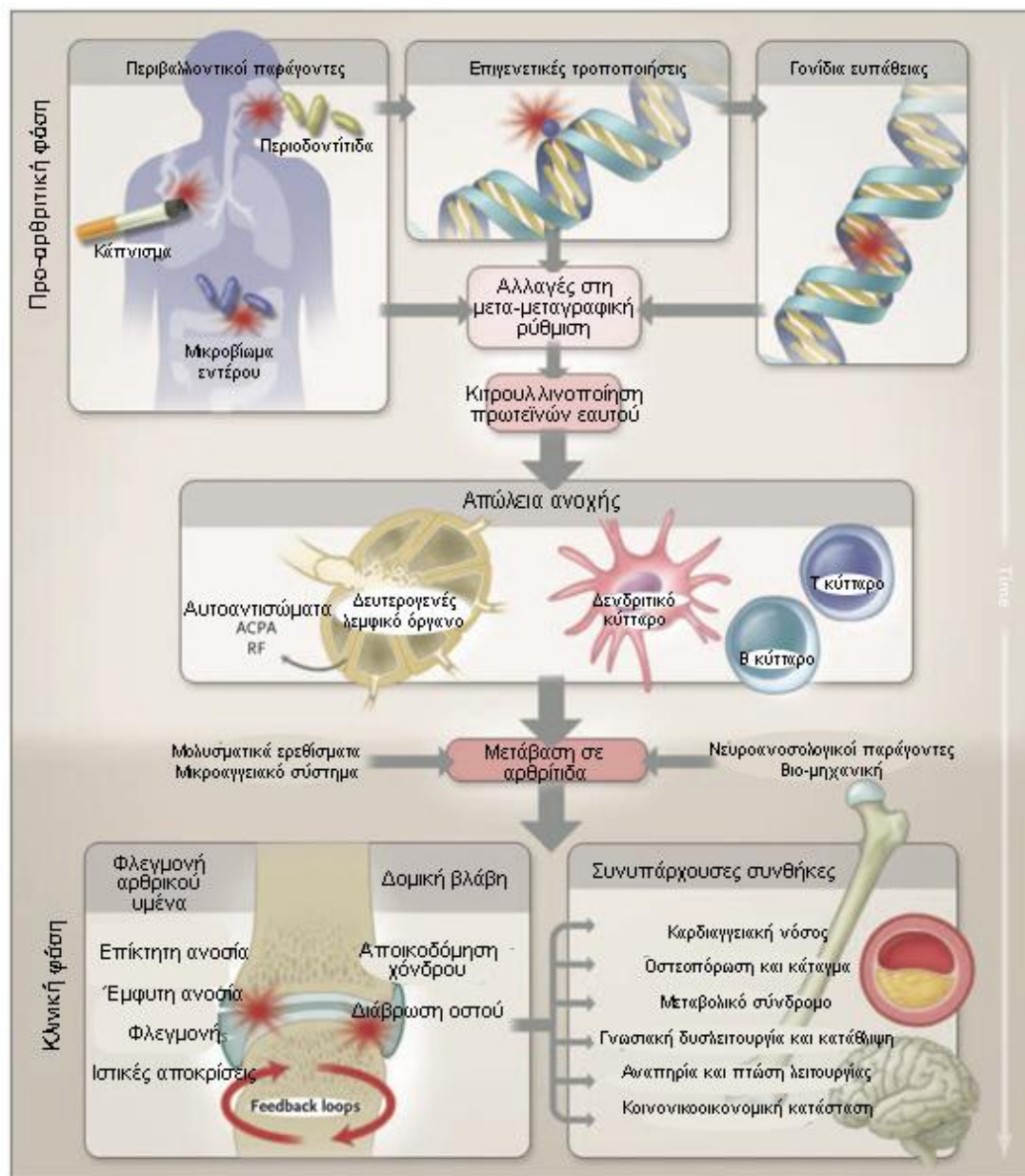
Η ανάπτυξη της ΡΑ σχετίζεται επιπλέον με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως ο ιός Epstein- Barr, ο κυτταρομεγαλοϊός, είδη του γένους *Proteus* και το βακτήριο *Escherichia coli* καθώς και προϊόντα τους όπως οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, έχουν από καιρό συσχετισθεί με ΡΑ και παρόλο

που οι ενοχοποιητικοί μηχανισμοί δεν είναι ξεκάθαροι, θεωρείται ότι υπάρχει κάποια μορφή μοριακής μίμησης (Auger and Roudier, 1997, Ebringer and Wilson, 2000). Επιπροσθέτως, η PA φαίνεται να σχετίζεται με την περιοδοντική νόσο η οποία προκαλείται από το βακτήριο *Porphyromonas gingivalis*. Το βακτήριο αυτό εκφράζει το ένζυμο PADI4 (Peptidyl Arginine Deiminase type 4) το οποίο προάγει την κιτρουλλινοποίηση των πρωτεϊνών (Wegner *et al.*, 2010). Τέλος, όπως και στην περίπτωση πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον η επίδραση του μικροβιώματος στον κίνδυνο εμφάνισης και προόδου της νόσου (Honda and Littman, 2012, Scher *et al.*, 2016).

Έναν, επίσης, σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου της ρευματοειδούς αρθρίτιδας αποτελεί το κάπνισμα. Το κάπνισμα σε άτομα που φέρουν τα αλληλόμορφα HLA-DRB1 αυξάνει συνεργιστικά τον κίνδυνο εμφάνισης οροθετικής ACPA νόσου (Klareskog *et al.*, 2011).

Τέλος, ο τρόπος διαβίωσης, όπως η κατανάλωση αλκοόλ και καφέ, τα επίπεδα βιταμίνης D, η χρήση αντισυλληπτικών και η χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση, αν και θεωρείται ότι επηρεάζει την εμφάνιση της νόσου, δεν υπάρχουν ισχυρά στοιχεία που να το τεκμηριώνουν (Liao *et al.*, 2009).

Παρά τις εκτεταμένες μελέτες στο πεδίο, ανεπίλυτα παραμένουν τα εξής ερωτήματα: α) ποιοι είναι οι λόγοι που η συστηματική απώλεια της ανοχής συνδέεται με εντοπισμένη έναρξη της φλεγμονής στην άρθρωση (μεταβατική φάση της PA), και β) γιατί τα αυτοαντισώματα, όπως ο RF και τα ACPAs, είναι συχνά, αλλά όχι πάντα, ανιχνεύσιμα στους ασθενείς πριν την εκδήλωση της αρθρίτιδας (προ-αρθριτική φάση). Στην Εικόνα 1 συνοψίζονται τα στάδια εκδήλωσης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας με βάση τα γνωστά μέχρι τώρα στοιχεία.



Εικόνα 1: Στάδια εκδήλωσης ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Αλληλεπιδράσεις περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων οδηγούν σε απώλεια της ανοχής πρωτεϊνών του εαυτού που περιέχουν κατάλοιπο κιτρουλλίνης, που δημιουργείται μετά από μετα- μεταφραστική τροποποίηση. Η απόκριση έναντι κιτρουλλινωμένης πρωτεΐνης ανιχνεύεται σε πληθυσμούς B και T κυττάρων και πιθανώς ξεκινά στα δευτερογενή λεμφικά όργανα ή το μυελό των οστών. Στη συνέχεια, η φλεγμονώδης απόκριση λαμβάνει χώρα στην άρθρωση λόγω μηχανισμών οι οποίοι πιθανώς περιλαμβάνουν μικροαγγειακά, νευρολογικά, βιομηχανικά ή άλλα ιστο-ειδικά μονοπάτια. Η φλεγμονή του αρθρικού υμένα αρχίζει και διαιωνίζεται με θετική ανάδραση και με τη σειρά της προάγει συστηματικές διαταραχές που συνθέτουν το σύνδρομο ρευματοειδούς αρθρίτιδας. RF: ρευματοειδής παράγοντας, ACPA: αντισώματα έναντι κιτρουλλινωμένων πεπτιδίων. (Ανατύπωση από McInnes and Schett, 2011)

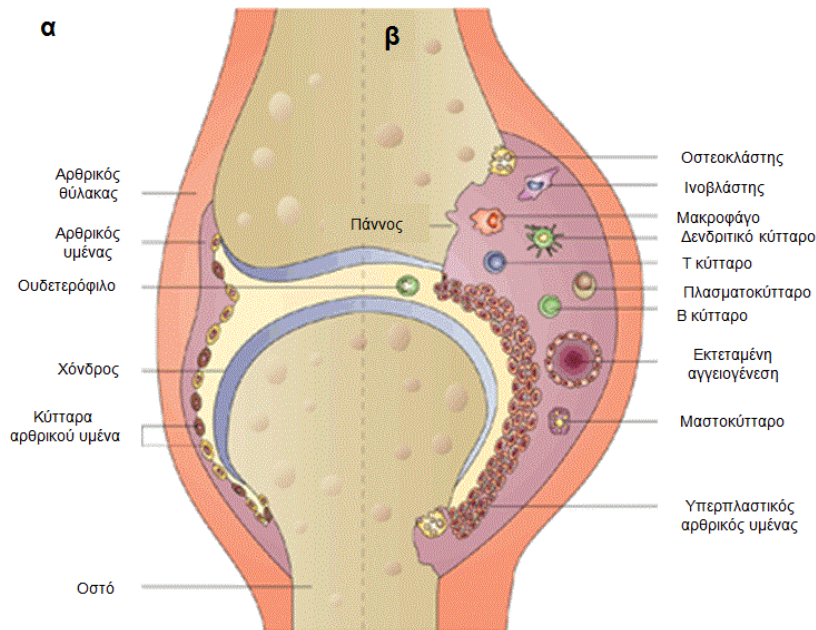
1.1.2 Παθοφυσιολογία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Η γενικότερη εικόνα που παρατηρεί κανείς σε μια φυσιολογική άρθρωση και σε μία άρθρωση με ΡΑ φαίνεται χαρακτηριστικά στην Εικόνα 2. Αναλυτικότερα:

Η φυσιολογική άρθρωση αποτελείται από δύο άκρα γειτονικών οστών, καλυμμένα με ένα στρώμα χόνδρου, που χωρίζονται από μια αρθρική κοιλότητα και περιβάλλονται από τον αρθρικό υμένα (μεμβράνη) και την αρθρική κάψα. Ο αρθρικός υμένας φυσιολογικά έχει πάχος $< 100 \mu\text{m}$ και η οριοθέτησή του (προς τη μεριά του οστού και του χόνδρου) αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα 1-3 κυττάρων, τους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα (Fibroblast- Like Synoviocytes, FLSs) και τα μακροφάγα του αρθρικού υμένα (Macrophage- Like Synoviocytes, MLS).

Η ΡΑ χαρακτηρίζεται από μια φλεγμονώδη απόκριση του αρθρικού υμένα (synovitis) που μεσολαβείται από την εισροή ή/και τοπική ενεργοποίηση μιας ποικιλίας μονοπύρηνων κυττάρων, όπως Τ κύτταρα, Β κύτταρα, πλασματοκύτταρα, δενδριτικά, μακροφάγα, μαστοκύτταρα καθώς επίσης από το σχηματισμό νέων αγγείων. Η λεμφοκυτταρική διήθηση μπορεί να είναι είτε διάχυτη είτε να σχηματίζει δομές που μοιάζουν με θυλάκια. Το στρώμα οριοθέτησης της μεμβράνης γίνεται υπερπλαστικό (μπορεί να έχει πάχος > 20 κύτταρα) και ο αρθρικός υμένας επεκτείνεται και σχηματίζει λάχνες. Η καταστροφή του οστού είναι, επίσης, κύριο χαρακτηριστικό της νόσου. Ο καταστρεπτικός ιστός που σχηματίζεται λέγεται «πάννος» και ο καταστρεπτικός κυτταρικός τύπος είναι ο οστεοκλάστης. Πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα εντοπίζονται στο αρθρικό υγρό, αλλά πολύ σπάνια στη μεμβράνη, πιθανώς λόγω της πολύ γρήγορης μετάβασής τους από το αίμα στην αρθρική κοιλότητα. Τα ένζυμα των ουδετερόφιλων μαζί με αυτά που εκκρίνονται από τα κύτταρα του αρθρικού υμένα και τα χονδροκύτταρα οδηγούν σε αποδόμηση του χόνδρου.

Η ΡΑ εν γένει χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και υπερπλασία του αρθρικού υμένα, παραγωγή αυτοαντισωμάτων ACPAs και RF, καταστροφή του οστού και του χόνδρου.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση μιας φυσιολογικής άρθρωσης (α) και των αλλαγών της στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (β) (Ανατύπωση από Smolen and Steiner 2003).

Φλεγμονή

Η φλεγμονή του αρθρικού υμένα που προκύπτει μετά από ανοσολογική διέγερση και χαρακτηρίζεται από λευκοκυτταρική διήθηση του αρθρικού χώρου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οιδήματος στις αρθρώσεις.

Η εισροή των κυττάρων στην άρθρωση γίνεται μέσω των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (Εικόνα 3). Διάφοροι κυτταρικοί τύποι, ειδικά τα δενδριτικά κύτταρα, εκφράζουν μόρια αναγνώρισης μοτίβου όπως υποδοχείς τύπου Toll (Toll-Like Receptors, TLRs), τα οποία προσδένονται σε διάφορες ξένες δομές και δομές του εαυτού ως μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, ακολούθως ενεργοποιούνται και δρουν σε κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας.

Τα αντιγόνα που σχετίζονται με την αρθρίτιδα φαίνεται να παρουσιάζονται στα Τ-κύτταρα από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) όπως δενδριτικά, μακροφάγα ή ενεργοποιημένα Β-κύτταρα, μέσω των μορίων MHC τάξης II αλληλεπιδρώντας με τους Τ-υποδοχείς τους (T Cell Receptor, TCR). Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο σήμα που απαιτείται για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Το δεύτερο σήμα αποτελεί η πρόσδεση των μορίων της επιφάνειας των APC, CD80 και CD86 στο CD28 που εκφράζεται στα Τ-κύτταρα. Για να αποφευχθεί

η υπερ-ενεργοποίηση, τα T-κύτταρα ακολούθως εκφράζουν CTLA 4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), το οποίο έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τα CD80 και CD86 από ότι το CD28 και δρα ανασταλτικά. Η καταστολή της ενεργοποίησης των T-κυττάρων ελέγχεται, επίσης, από τα ρυθμιστικά T-κύτταρα (Regulatory T cell, Tregs, CD25⁺ CD4⁺ FOXP3⁺).

Τα CD4⁺ T βοηθητικά-κύτταρα (T helper cells, T_H) ασκούν την πλειονότητα των λειτουργιών τους μέσω χαρακτηριστικών, για κάθε υποπληθυσμό, εκκρινόμενων κυτταροκινών είτε δρώντας στα κύτταρα που τις παράγουν είτε διαμορφώνοντας τις αποκρίσεις άλλων κυττάρων. Ο υποπληθυσμός T_H1 εκκρίνει IL-2, IFN- γ και TNF- β και ο υποπληθυσμός T_H2 εκκρίνει IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Το περιβάλλον των κυτταροκινών, που δημιουργείται μετά από αντιγονικό ερέθισμα καθορίζει τον υποπληθυσμό των T_H-κυττάρων που θα αναπτυχθεί. Συγκεκριμένα, για την ανάπτυξη της T_H1 απόκρισης είναι απαραίτητη η IL-12 και για την ανάπτυξη της T_H2 απόκρισης είναι απαραίτητη η IL-4 (Kindt *et al.*, 2007). Η φλεγμονή στη PA θεωρείται ότι μεσολαβείται κυρίως από τον υποπληθυσμό T_H1, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η προσοχή έχει επικεντρωθεί στο ρόλο του υποπληθυσμού T_H17, ο οποίος παράγει IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 και TNF- α (Miossec *et al.*, 2009). Το περιβάλλον κυτταροκινών που δημιουργείται από τα μακροφάγα και DCs τα οποία εκκρίνουν TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 και IL-23, υποστηρίζει τη διαφοροποίηση των T_H17 κυττάρων ενώ καταστέλλει τη διαφοροποίηση Tregs, μετατοπίζοντας έτσι την ομοιόσταση των T-κυττάρων προς τη φλεγμονή (McInnes and Schett, 2011).

Τα B-κύτταρα εκφράζουν διάφορα μόρια κυτταρικής επιφάνειας, ιδιαίτερα τον αντιγονικό υποδοχέα τους, ανοσοσφαιρίνη και αντιγόνα διαφοροποίησης όπως CD20 και CD22, και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν αντισώματα, συμπεριλαμβανομένων αυτοαντισωμάτων. Τα ενεργοποιημένα B-κύτταρα δρουν, επίσης, ως APCs οδηγώντας στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων με αποτέλεσμα μεταξύ άλλων και τη διαιώνιση της (αυτο)άνοσης απόκρισης (Panayi, 2005).

Τα μακροφάγα του αρθρικού υμένα παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, καθώς εκκρίνουν κυτταροκίνες (Εικόνα 3) όπως TNF- α , IL-1 και IL-6, (Smolen *et al.*, 2007).

Μέσα στον πάσχοντα αρθρικό υμένα, α) συσσωρεύονται διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί μέσω των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, β) γίνεται

νεοαγγειογένεση και γ) αυξάνεται ο αριθμός των ινοβλαστών του αρθρικού υμένα, αποκτώντας έναν ημιαυτόνομο φαινότυπο. Οι ινοβλάστες παράγουν κυτταροκίνες, και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές όπως προσταγλανδίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix Metalloproteinases, MMPs) (Firestein, 1996). Οι MMPs αλλά και η άμεση εισβολή των ινοβλαστών του αρθρικού υμένα στο χόνδρο, τον καταστρέφουν συμβάλλοντας τελικά στην διάβρωση του οστού (Muller-Ladner *et al.*, 1996, Pap *et al.*, 2003).

Η γενική ιεραρχία των γεγονότων κατά την ανάπτυξη της PA παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, το γεγονός ότι τόσο διαφορετικά είδη μορίων και κυττάρων, που εμπλέκονται στην παθογένεια της PA, έχουν αποτελέσει επιτυχή θεραπευτικό στόχο, σημαίνει ότι πρόκειται για ένα φαινόμενο με πολλαπλούς μηχανισμούς.

Καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση του οστού

Ο υπερπλαστικός αρθρικός υμένας είναι ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στη βλάβη του χόνδρου στη PA αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά πρωτεϊνικής πρόσδεσης της επιφάνειας του χόνδρου και προάγοντας την εισβολή και προσκόλληση των ινοβλαστών του αρθρικού υμένα. Η σύνθεση MMPs από τους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα προάγει την αποδιοργάνωση του δικτύου κολλαγόνου τύπου II, μια διαδικασία η οποία αλλάζει την περιεκτικότητα σε γλυκοσαμινογλυκάνες και την κατακράτηση νερού και οδηγεί απευθείας σε εμβιομηχανική βλάβη (Sabeh *et al.*, 2010).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απορρόφησης του οστού. Σε ασθενείς με PA η ισορροπία αυτή διαταράσσεται προς όφελος της οστικής απορρόφησης. Η οστική απορρόφηση πραγματοποιείται από τους οστεοκλάστες οι οποίοι είναι πολυπύρηνια γιγαντοκύτταρα που αναπτύσσονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα της μονοκυτταρικής/ μακροφαγικής σειράς. Οι οστεοκλάστες διαθέτουν τον όξινο ενζυμικό μηχανισμό που είναι απαραίτητος για την καταστροφή του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού. Η εισροή πρόδρομων κυττάρων οστεοκλαστών στη φλεγμαίνουσα άρθρωση και η διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοκλάστες ρυθμίζεται από κυτταροκίνες όπως ο M-CSF (Macrophage-colony-stimulating factor) και ο RANKL (Receptor activator of nuclear factor κB ligand) που εκφράζονται από τους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα (Gravallese *et al.*, 2000), ενώ η ενίσχυση και ενεργοποίησή τους καθορίζεται από τις κυτταροκίνες TNF-α, IL-1, IL-6 και πιθανώς

IL-17 (Schett and Teitelbaum, 2009). Η εισβολή κυττάρων του αρθρικού υμένα στο οστό οδηγεί στο σχηματισμό ενός ιστού που καλείται «πάννος» (pannus). Ο «πάννος» είναι ένα ανώμαλο στρώμα κοκκιώδους ιστού που αποτελείται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αιμοφόρα αγγεία και ινώδη κύτταρα. Αρχίζει να αναπτύσσεται από τον αρθρικό υμένα και τελικά εισβάλλει στην άρθρωση, προκαλώντας μη αναστρέψιμη καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση του οστού.

Ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα σχετίζεται με σοβαρότερα συμπτώματα και βλάβη άρθρωσης καθώς και αυξημένη θνησιμότητα (van Gaalen *et al.*, 2004, Gonzalez *et al.*, 2008). Τα κυριότερα αυτοαντισώματα που συναντώνται σε ασθενείς με ΡΑ είναι ο RF έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG και τα ACPAs. Τα ACPAs δεσμεύονται σε κιτρουλλινιωμένα κατάλοιπα πολλών εαυτών πρωτεϊνών όπως η βιμεντίνη, η α-ενολάση, η φμπρονεκτίνη, το ινωδογόνο, οι ιστόνες και το κολλαγόνο τύπου II, και είναι ανιχνεύσιμα στην κυκλοφορία μέχρι και δέκα χρόνια πριν τη διάγνωση (προ-ρευματοειδής αρθρίτιδα) (Nielen *et al.*, 2004).

Το παθογενετικό δυναμικό των ACPA έγκειται στην ικανότητα ενεργοποίησης κυττάρων όπως μακροφάγα και οστεοκλάστες καθώς επίσης το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων. Η έκφραση κιτρουλλινιωμένων πρωτεϊνών στον αρθρικό χόνδρο πιθανώς να επιτρέπει στα ACPAs να προσδεθούν στην επιφάνειά του και να ξεκινήσουν τοπική φλεγμονή μέσω του σχηματισμού ανοσοσυμπλεγμάτων. Τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται από την πρόσδεση των ACPA στα κιτρουλλινιωμένα πεπτίδια και την ακόλουθη πρόσδεση του RF σε αυτά, προάγουν περαιτέρω τη φλεγμονή, καθώς οδηγούν σε ισχυρή ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Trouw *et al.*, 2009, Anquetil *et al.*, 2015) και των μακροφάγων. Στα μακροφάγα τα ανοσοσυμπλέγματα δεσμεύουν τους TLR4 και Fc υποδοχείς τους (Sokolove *et al.*, 2011), πυροδοτώντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-6 και του TNF-α (Clavel *et al.*, 2008), που είναι κύρια χαρακτηριστικά της φλεγμονής στη ΡΑ.

Ο TNF και ο ρόλος του στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

Ο TNF-α είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία δρα πλειοτροπικά σε διάφορους τύπους κυττάρων και παίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια χρόνιων

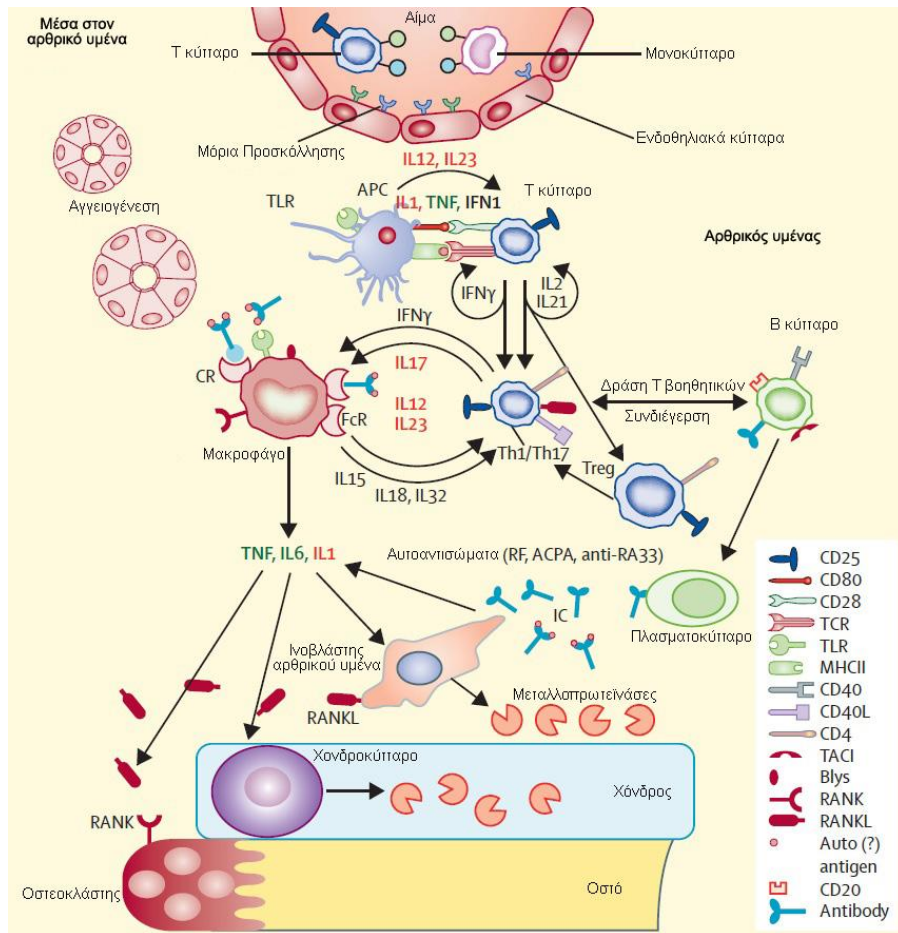
φλεγμονωδών ασθενειών. Ο TNF-α παράγεται κατά κύριο λόγο από ενεργοποιημένα μακροφάγα, καθώς επίσης λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα κ.α.

Ο TNF-α συναντάται σε δύο βιολογικά ενεργές μορφές, τη διαμεμβρανική, μοριακού βάρους 26 KDa, η οποία ανιχνεύεται στην επιφάνεια μακροφάγων και T-κυττάρων (Kriegler *et al.*, 1988), και τη διαλυτή, μοριακού βάρους 17 KDa, η οποία προκύπτει μετά από πέψη του διαμεμβρανικού TNF-α από πρωτεολυτικά ένζυμα (Gearing *et al.*, 1994, Black *et al.*, 1997). Ο διαμεμβρανικός TNF-α ασκεί τη βιολογική του δράση όταν το κύτταρο από το οποίο παράγεται είναι σε επαφή με το κύτταρο στόχο, σε αντίθεση με την εκκριτική μορφή που μπορεί να επιδρά σε κύτταρα στόχους που βρίσκονται σε απόσταση από τα κύτταρα από τα οποία παράγεται (Perez *et al.*, 1990).

Η βιολογική δράση των δύο μορφών του TNF-α (διαλυτή και διαμεμβρανική) πραγματοποιείται μέσω των δύο υποδοχέων του (p55 ή TNFR1 και p75 ή TNFR2) που παρουσιάζουν διαφορετική βιολογική δράση όταν συνδέονται με τον TNF. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπερικογενεία υποδοχέων του TNF, παράγονται στους περισσότερους ιστούς αλλά έχουν διαφορετικές ενδοκυττάρειες περιοχές επάγοντας με αυτό τον τρόπο διαφορετικά φαινόμενα. Μέσω του p55 υποδοχέα επάγονται σχεδόν όλες οι γνωστές δράσεις του TNF-α, όπως η κυτταροτοξικότητα, η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αντίθετα η δράση του p75 υποδοχέα είναι περιορισμένη και φαίνεται να έχει ρόλο στο λεμφοκυτταρικό σύστημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ανθρώπινος TNF-α μπορεί να προσδεθεί μόνο στον p55 του ποντικού και όχι στον p75 ο οποίος παρουσιάζει ειδικότητα στο είδος (Lewis *et al.*, 1991).

Ο TNF-α διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΡΑ και οι anti-TNF παράγοντες που έχουν αναπτυχθεί από τη φαρμακοβιομηχανία ως φάρμακα, παρουσιάζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπισή της. Ο TNF δρα σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων στην άρθρωση οδηγώντας σε ενίσχυση και διαιώνιση της φλεγμονώδους διαδικασίας. Η σχετική έρευνα που ξεκινάει από τις αρχές του αιώνα έχει δείξει ότι ο TNF-α ενεργοποιεί τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα, επάγει την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης, προάγει την αγγειογένεση, καταστέλλει τη λειτουργία των Tregs και ενεργοποιεί τους οστεοκλάστες προάγοντας την καταστροφή του οστού (McInnes

and Schett, 2011). Τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα στον ορό και το αρθρικό υγρό ασθενών με PA σε σχέση με τα υγιή άτομα (Moelants *et al.*, 2013).



Εικόνα 3: Μονοπάτια παθογένειας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που πιθανώς συμβαίνουν στον αρθρικό υμένα, καθώς και στον αρθρικό χόνδρο και το υποχόνδριο οστό, τα οποία περιβάλλονται από επιθετική αρθρίτιδα. Τα βέλη δείχνουν κάποιες από τις πολλές αλληλεπιδράσεις στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Τα πράσινα γράμματα αναφέρονται σε μόρια τα οποία έχουν στοχευθεί με επιτυχία από τις αντίστοιχες θεραπείες, ενώ τα κόκκινα αναφέρονται σε μόρια για τα οποία η στόχευση δεν ήταν αποτελεσματική. Blys (B lymphocyte stimulator): διεγέρτης B κυττάρων, C (complement): συμπλήρωμα, CP (citrullinated peptide): κιτρουλλινιωμένο πεπτίδιο, CR (complement receptor): υποδοχέας συμπληρώματος, FcR (receptor for the Fc portion of IgG): υποδοχέας του Fc θραύσματος της IgG, IC (immune complex): ανοσοσύμπλεγμα, IFN (interferon): ιντερφερόνη, IFN1 (type 1 interferons): ιντερφερόνες τύπου 1, IL (interleukin): ιντερλευκίνη, RF (rheumatoid factor): ρευματοειδής παράγοντας, TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor): διαμεμβρανικός ενεργοποιητής και ρυθμιστής ασβεστίου και αλληλεπιδρών με τον συνδέτη κυκλοφιλίνης, TCR (T cell receptor): υποδοχέας T-κυττάρου, Th1 (T-helper 1 cell): T-βοηθητικά υποπληθυσμός 1, TLR (Toll-like receptor): υποδοχέας τύπου Toll, Treg (regulatory T cell): ρυθμιστικό T-κύτταρο. (Ανατύπωση από Smolen *et al.*, 2016).

1.2 Θεραπεία Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Η συμβατική φαρμακευτική αγωγή για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας περιλαμβάνει μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), κορτικοστεροειδή και νοσο-τροποποιητικά αντιρευματικά φάρμακα (Disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs). Η χρήση των NSAIDs και των κορτικοστεροειδών αποσκοπεί κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, ενώ τα DMARDs όχι μόνο βελτιώνουν τα συμπτώματα αλλά περιορίζουν την ανάπτυξη της νόσου. Τα συμβατικά DMARDs που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της PA είναι η μεθοτρεξάτη, τα άλατα χρυσού, η υδροξυχλωροκίνη, η λεφλουνομίδα, σουλφασαλαζίνη και η κυκλοσπορίνη Α. Τα φάρμακα αναδείχθηκαν μέσα από την διαδικασία της επανατοποθέτησης (repositioning /repurposing) καθώς αυτά είχαν ήδη ελεγχθεί και εγκριθεί για άλλες ενδείξεις πριν φανούν χρήσιμα στη θεραπεία της PA.

Από τη δεκαετία του '90, η μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου οδήγησε στην ανάπτυξη των βιολογικών φαρμάκων (βιολογικά DMARDs). Αυτά περιλαμβάνουν αντισώματα έναντι προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α) ή των υποδοχέων τους (IL-1, IL-6), ή στόχευση των B-κυττάρων (CD20) ή συνδιεγερτικά μόρια (CTLA4) (Smolen *et al.*, 2007). Τα εγκεκριμένα βιολογικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την θεραπευτική αντιμετώπιση της PA συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Μια ομάδα φαρμάκων που μελετάται τα τελευταία χρόνια είναι τα νέα συνθετικά DMARDs τα οποία στοχεύουν στη μεταγωγή συγκεκριμένου ενδοκυττάριου σήματος που εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου. Από αυτά εγκρίθηκε πρόσφατα για κλινική χρήση το Tofacitinib το οποίο δρα ως αναστολέας των Janus κινασών (Dowty *et al.*, 2014).

Επειδή οι μονοθεραπείες επιδέχονται βελτιστοποιήσεις (optimization) με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της PA, αναπτύχθηκε η συνδυαστική θεραπεία, μια προσέγγιση που τελικά φαίνεται ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα και μειώνει πιθανές παρενέργειες. Όλοι οι βιολογικοί παράγοντες εμφανίζουν αυξημένη αποτελεσματικότητα όταν συνδυάζονται με μεθοτρεξάτη και πιθανώς οποιοδήποτε άλλο συμβατικό DMARD, αναστέλλοντας ισχυρότερα την πρόοδο της δομικής βλάβης σε σχέση με τις μονοθεραπείες (Smolen *et al.*, 2016).

Παρόλο που τα φάρμακα αυτά έχουν βελτιώσει την καθημερινή ζωή ενός σημαντικού αριθμού ασθενών, υπάρχουν ακόμα ασθενείς που δεν αποκρίνονται στη θεραπεία γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια της νόσου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ένα επιπλέον ζήτημα που περιορίζει τη χρήση των διαθέσιμων φαρμάκων. Επομένως, υπάρχει ξεκάθαρα η ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση για αποτελεσματικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις τα οποία θα πρέπει να είναι περισσότερο στοχευμένα, ίσως στο πλαίσιο της εξατομικευμένης θεραπείας,

Πίνακας 1: Βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. FDA: Food and Drug Administration. EMA: European Medicines Agency.

Βιολογική ονομασία (Εμπορική ονομασία)	Έτος έγκρισης	Δομή	Στόχος
Infliximab⁵ (Remicade)	1998	Χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα	TNF-α
Etanercept⁵ (Enbrel)	1998	Ανθρώπινη διμερής πρωτεΐνη σύντηξης	TNF-α
Anakinra (Kineret)	2001	Ανταγωνιστής υποδοχέα	IL-1
Adalimumab⁵ (Humira)	2002	Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα	TNF-α
Abatacept (Orencia)	2005	Ανθρώπινη διμερής πρωτεΐνη σύντηξης	CD-28
Rituximab (Rituxan, Mabthera)	2006	Χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα	CD-20
Certolizumab pegol (Cimzia)	2008	Ανθρωποποιημένο τμήμα Fab	TNF-α
Golimumab (Simponi)	2009	Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα	TNF-α
Tocilizumab (RoActemra)	2009 (EMA), 2010 (FDA)	Ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα	Υποδοχέας IL-6

1.2.1 Αναστολείς του TNF

Επειδή ο TNF-α παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΡΑ, η ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων έναντι αυτού έφερε την επανάσταση στη θεραπεία της ήδη

⁵ Οι βιολογικοί παράγοντες infliximab, etanercept και adalimumab ελέγχθηκαν στο ζωικό πρότυπο *TgHuTNF* (Tg197) στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.

από τη δεκαετία του 1990. Σήμερα, έχουν εγκριθεί πέντε αντι-TNF-α παράγοντες για τη θεραπεία της PA, που ανήκουν σε τρεις δομικές ομάδες: μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του TNF-α (infliximab, adalimumab και golimumab), ένα πεγκυλιωμένο τμήμα Fab (certolizumab) και μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης διαλυτού υποδοχέα (Εικόνα 4). Η ιδέα για τη χρήση των παραγόντων αυτών στη θεραπεία της αρθρίτιδας άρχισε να ισχυροποιείται από τη μελέτη των Keffer et al. οι οποίοι δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον ανθρώπινο TNF, ως πρότυπο της PA, και έδειξαν ότι η προφυλακτική θεραπεία με αντισώματα έναντι του TNF καταστέλλουν την ανάπτυξη της νόσου. Για να αποδειχθεί το θεραπευτικό δυναμικό των παραγόντων δοκιμάστηκε *in vivo* και σε άλλα ζωικά πρότυπα της PA όπως η αρθρίτιδα επαγόμενη από κολλαγόνο (Collagen Induced Arthritis, CIA) (Piguet *et al.*, 1992). Οι προκλινικές αυτές μελέτες αποτέλεσαν τις βάσεις για την έναρξη κλινικών δοκιμών με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του TNF σε ασθενείς με PA. Παρόλο που τα φάρμακα αυτά έχουν δείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα μειώνοντας τη δραστηριότητα της νόσου και βελτιώνοντας τη λειτουργία των αρθρώσεων, περίπου το 25-30 % των ασθενών αδυνατούν να ανταποκριθούν (Colmegna *et al.*, 2012). Επίσης, οι βιολογικοί παράγοντες είναι ανοσογονικοί και πολλές φορές οδηγούν στο σχηματισμό αντισωμάτων έναντι του φαρμάκου (Anti-Drug Antibodies, ADAs), τα οποία μπορούν να εξουδετερώσουν τη δράση του φαρμάκου καθώς και να προκαλέσουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (Matucci *et al.*, 2016).

Infliximab (Ινφλιξιμάμπη)

Το infliximab είναι χημειρικό IgG1κ μονοκλωνικό αντίσωμα, που αποτελείται από τη μεταβλητή περιοχή του αντισώματος έναντι του ανθρώπινου TNF-α του ποντικού και τη σταθερή περιοχή της ανθρώπινης IgG. Το infliximab αναγνωρίζει ειδικά και προσδένεται τόσο στο διαλυτό όσο στο διαμεμβρανικό TNF-α με υψηλή συγγένεια, σχηματίζοντας σταθερά ανοσοσυμπλέγματα. Η πρόσδεση αυτή εξουδετερώνει τη βιολογική δραστηριότητα του TNF-α, καθώς εμποδίζει την πρόσδεσή του στον υποδοχέα. Τον Αύγουστο του 1998, ο FDA ενέκρινε το infliximab για τη θεραπεία της PA, σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη, σε ασθενείς με ελλιπή απόκριση σε μονοθεραπεία μεθοτρεξάτης (Malviya *et al.*, 2013).

Adalimumab (Ανταλιμουμάμπη)

Το adalimumab είναι ανασυνδυασμένο ανθρώπινο IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα, που αποτελείται από δύο κ ελαφριές αλυσίδες και δύο IgG1 βαριές αλυσίδες, και εκφράζεται σε ωοθυλακιακά κύτταρα κινέζικου χάμστερ. Λόγω της ανθρώπινης προέλευσής του είναι λιγότερο ανοσογονικό από ότι το infliximab. Το adalimumab αναγνωρίζει τόσο το διαλυτό όσο το διαμεμβρανικό TNF-α με υψηλή συγγένεια και αναστέλλει τη βιολογική του δράση εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους TNFR1 και TNFR2 υποδοχείς. Μπορεί, επίσης, να προκαλέσει λύση κυττάρων που εκφράζουν TNF παρουσία του συμπληρώματος. Το Δεκέμβριο του 2002, ο FDA ενέκρινε το adalimumab για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη, σε ασθενείς με ελλιπή απόκριση σε μονοθεραπεία μεθοτρεξάτης. Ενδείκνυται, επίσης, για τη θεραπεία ενεργής, σοβαρής PA σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει μεθοτρεξάτη ή άλλα DMARDs, για την ψωριασική αρθρίτιδα, αγκυλωτική σπονδυλίτιδα κ.α. (Malviya *et al.*, 2013).

Golimumab (Γκολιμουμάμπη)

Το golimumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο IgG1κ μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF-α το οποίο στοχεύει και εξουδετερώνει τόσο τη διαλυτή όσο τη διαμεμβρανική μορφή του TNF-α. Τον Απρίλιο του 2009, ο FDA ενέκρινε το golimumab για κλινική χρήση, και πιο πρόσφατα ο EMA υιοθέτησε θετική άποψη προτείνοντας το golimumab ως υποδόρια θεραπεία μια φορά το μήνα, για τη θεραπεία μέτριας προς σοβαρής αρθρίτιδας, σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη, σε ασθενείς με ελλιπή απόκριση σε μονοθεραπεία μεθοτρεξάτης. Ενδείκνυται, επίσης, για τη θεραπεία ενεργής, σοβαρής PA σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει μεθοτρεξάτη ή άλλα DMARDs (Malviya *et al.*, 2013).

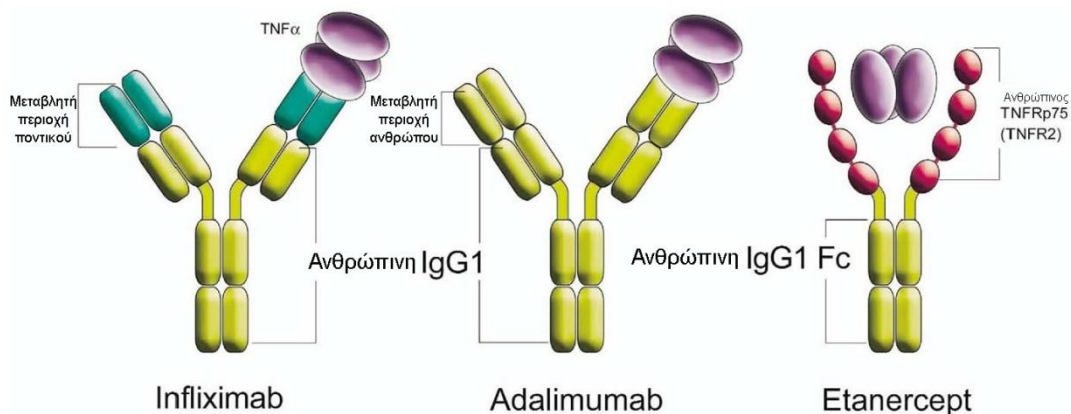
Certolizumab pegol (Σερτολιζουμάμπη)

Το certolizumab pegol είναι ένα ανασυνδυασμένο, ανθρωποποιημένο anti-TNF-α τμήμα Fab, συζευγμένο με μια πολυαιθυλενογλυκόλη για αύξηση του χρόνου ημιζωής. Το certolizumab pegol προσδένεται στον ανθρώπινο TNF-α με υψηλή συγγένεια και εξουδετερώνει τόσο τη διαλυτή όσο τη διαμεμβρανική μορφή του. Το 2008 ο FDA ενέκρινε το certolizumab pegol, ένα πεγκυλιωμένο φάρμακο έναντι του TNF-α, για τη θεραπεία ασθενών με μέτριας προς σοβαρής μορφής αρθρίτιδα σε

συνδυασμό με μεθοτρεξάτη, οι οποίοι εμφάνισαν ελλιπή απόκριση σε μονοθεραπεία μεθοτρεξάτης (Malviya *et al.*, 2013).

Etanercept (Ετανερσέπη)

Το etanercept είναι μια πλήρως ανθρώπινη διμερής πρωτεΐνη σύντηξης. Αποτελείται από δύο μόρια, το εξωκυττάριο τμήμα του διαλυτού TNFR2 (p75) υποδοχέα και την σταθερή περιοχή της IgG1 βαριάς αλυσίδας. Ως διμερής διαλυτή μορφή του p75 υποδοχέα του TNF, το etanercept είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της πρόσδεσης του TNF-α στον κυτταρικής επιφάνειας υποδοχέα του, και προσδένεται σε δύο TNF μόρια. Αναστέλλει τη βιολογική δράση του TNF-α εμποδίζοντας τη διέγερση του υποδοχέα. Προσδένεται, πρωτίστως, στο διαλυτό TNF-α καθώς επίσης στον TNF-β μέσω των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Το 1998, ο FDA ενέκρινε το etanercept για τη θεραπεία του επώδυνου οιδήματος των αρθρώσεων και των αλλοιώσεων που προκαλούνται από τη PA (Malviya *et al.*, 2013).



Εικόνα 4: Τα anti-TNF μόρια προσδένονται στον TNF-α και εξουδετερώνουν τη δράση του. Το infliximab και το adalimumab είναι μονοκλωνικά αντισώματα. Το infliximab είναι χμιαϊκό και αποτελείται από τις μεταβλητές περιοχές της ανοσοσφαιρίνης του ποντικού και τη σταθερή περιοχή της ανθρώπινης IgG1, και το adalimumab είναι ανθρώπινο IgG1 αντίσωμα. Το etanercept είναι διμερής πρωτεΐνη σύντηξης που αποτελείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα του TNF p75 (TNFR2) συνδεδεμένο με το Fc τμήμα της ανθρώπινης IgG1. (Ανατύπωση από Anderson, 2005)

1.2.2 Ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (Anakinra)

Το anakinra είναι μια ανασυνδυασμένη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή του ανθρώπινου ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra). Εμποδίζει τη βιολογική δράση των IL-1α και IL-1β καθώς αναστέλλει την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα IL-

1 τύπου I (IL-1RI). Η χρήση του anakinra στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας δεν είναι συχνή, λόγω της χαμηλής αποτελεσματικότητας και απόκρισης από τους ασθενείς σε σχέση με τους άλλους βιολογικούς παράγοντες. Το anakinra εγκρίθηκε από τον FDA το Νοέμβριο του 2001 για ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα όταν η θεραπεία με ένα ή περισσότερα DMARDs έχει αποτύχει (Nixon *et al.*, 2007).

1.2.3 Αναστολέας της ενεργοποίησης των T-κυττάρων (Abatacept)

Το abatacept είναι μια πλήρως ανθρώπινη διαλυτή πρωτεΐνη σύντηξης που αποτελείται από την εξωκυττάρια περιοχή του ανθρώπινου CTLA-4 συνδεδεμένη με το Fc τμήμα της ανθρώπινης IgG1. Αποτελεί τον πρώτο εγκεκριμένο ρυθμιστή συνδιέγερσης. Το abatacept προσδένεται στα CD80 και CD86 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι το CD28, εμποδίζοντας, έτσι, την αλληλεπίδρασή τους με το CD28 στα T-κύτταρα. Επομένως, το abatacept εμποδίζει το συν-διεγερτικό σήμα που απαιτείται για την πλήρη ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Το Δεκέμβριο του 2005, ο FDA ενέκρινε το abatacept για τη θεραπεία ασθενών με μέτρια προς σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα με ανεπαρκή απόκριση σε ένα ή περισσότερα DMARDs και ανταγωνιστές του TNF (Malviya *et al.*, 2013).

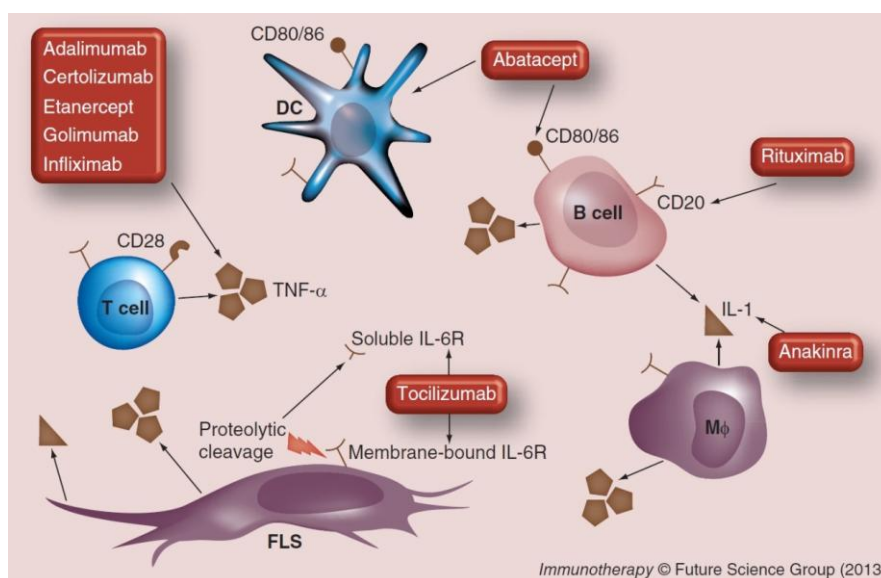
1.2.4 Αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD20 των B-κυττάρων (Rituximab)

Το rituximab είναι ένα σχεδιασμένο με γενετική μηχανική χημειοκλινικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου, το οποίο προσδένεται στο αντιγόνο CD20 που βρίσκεται στην επιφάνεια των B-κυττάρων και οδηγεί σε μείωση του αριθμού τους (Malviya *et al.*, 2013). Το rituximab ήταν το πρώτο χημειοκλινικό αντίσωμα που εγκρίθηκε από τον FDA για ανθρώπινη χρήση το 1997 για τη θεραπεία του CD20⁺ μη-Hodgkin λεμφώματος, όταν το Φεβρουάριο του 2006 βρέθηκε να έχει θεραπευτική αξία στη ρευματοειδή αρθρίτιδα σε ασθενείς με ανεπαρκή απόκριση σε έναν ή περισσότερους ανταγωνιστές του TNF.

1.2.5 Αναστολέας της IL-6 (Tocilizumab)

Το tocilizumab είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου υποδοχέα της IL-6, το οποίο προσδένεται στην περιοχή πρόσδεσης της IL-6 του υποδοχέα, αναστέλλει ανταγωνιστικά τη σηματοδότηση και

εξουδετερώνει τις δράσεις της IL-6. Η χορήγηση του tocilizumab με μεθοτρεξάτη εγκρίθηκε από τον EMA το 2009 και από τον FDA το 2010 για τη θεραπεία ασθενών με μέτρια προς σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα που δεν ανταποκρίνονται σε ένα ή περισσότερα DMARDs και ανταγωνιστές του TNF (Malviya *et al.*, 2013).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των εγκεκριμένων βιολογικών φαρμάκων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Απλουστευμένη περιγραφή των κυτταροκινών και υποδοχέων που στοχεύονται από τα διαθέσιμα βιολογικά αντιρευματικά φάρμακα. DC: Dendritic cell. FLS: Fibroblast-like synoviocyte. Mφ: Macrophage. R: Receptor. (Ανατύπωση από Meier *et al.*, 2013)

1.3 Ζωικά πρότυπα Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας

Τα ζωικά πρότυπα έχουν αποτελέσει πολύτιμα εργαλεία στην προκλινική έρευνα που αποτελεί ένα από τα στάδια της μεταφραστικής έρευνας. Τα *in vivo* πρότυπα δίνουν τη δυνατότητα μελέτης και κατανόησης των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ασθένειας, καθώς επίσης, είναι σημαντικά στον έλεγχο υποψήφιων φαρμάκων ως proof of concept συστήματα μελέτης. Είναι υψίστης σημασίας το πειραματικό πρότυπο να διαθέτει τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της υπό μελέτη ανθρώπινης ασθένειας. Η πολυπλοκότητα του ανοσοποιητικού συστήματος καθιστά δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό μηχανισμών της ασθένειας. Επιπλέον θα πρέπει να αποσαφηνιστούν οι σημαντικές διαφορές μεταξύ τρωκτικών και ανθρώπου, ώστε να εκτιμηθεί σωστά η χρησιμότητα του κάθε *in vivo* προτύπου στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Sardar and Andersson, 2016). Με το πέρασμα των χρόνων έχει δημιουργηθεί μεγάλος αριθμός ζωικών προτύπων για κάθε ασθένεια. Η επιλογή του κατάλληλου προτύπου και η

εφαρμοσιμότητα των αποτελεσμάτων της έρευνας σε αυτά στην ανθρώπινη ασθένεια, αποτελεί βαθειά γνώση της επιστήμης των παθολογιών του ανθρώπου και των ζώων εργαστηρίου καθώς και σαφή διατύπωση του εκάστοτε επιστημονικού ερωτήματος. (Vincent *et al.*, 2012).

Τα ζωικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της ΡΑ διακρίνονται σε επαγόμενα, στα οποία η αρθρίτιδα επάγεται μετά από ενεργητική ανοσοποίηση με διάφορες πρωτεΐνες ή παθητική ανοσοποίηση ή από εξωγενή/μολυσματικά ερεθίσματα, και τα αυθόρμητα, τα οποία περιλαμβάνουν στελέχη ποντικών με φυσικές μεταλλάξεις και γενετικά τροποποιημένα στελέχη ποντικών (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Ζωικά πρότυπα ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

A. Επαγόμενα Πρότυπα	B. Αυθόρμητα Πρότυπα
1. Collagen- induced arthritis (CIA)	1. Tg197 (hu-TNF α)
2. Antigen- induced arthritis (AIA)	2. Tg5453 (cd2-hu-TNF α)
3. Proteoglycan- induced arthritis (PGIA)	3. Tg3647 (hu-TNF α , low copy)
4. Streptococcal cell wall arthritis (SCW)	4. Tg197-huTNFRI Knock-In
5. Pristane- induced arthritis (PIA)	5. TNF Δ ARE (dual model)
6. Collagen Antibody- induced arthritis (CAIA)	6. K/BxN TCR
7. Zymosan- induced arthritis	7. SKG
8. Passive Rheumatoid arthritis	8. IL1 α Knock-Out
9. Anti- collagen II and GPI antibody transfer- induced arthritis	



Εικόνα 6: Διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου στα οποία αντιστοιχίζονται διαφορετικά πρότυπα. (Ανατύπωση από Vincent *et al.*, 2012)

1.3.1 Επαγόμενα πρότυπα

Αρθρίτιδα επαγόμενη από κολλαγόνο (Collagen-induced arthritis, CIA)

Η αρθρίτιδα επάγεται στα ευπαθή στελέχη ποντικού και αρουραίου μετά από ανοσοποίηση με κολλαγόνο τύπου II σε πλήρες ή ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund, αντίστοιχα. Η ευπάθεια ενός στελέχους στη CIA εξαρτάται σε μεγάλη έκταση από τον απλότυπο MHC. Όπως και στη RA έτσι και στη CIA, η ανάπτυξη της νόσου εξαρτάται από τα T-κύτταρα, ιστολογικά παρατηρείται κυτταρική διήθηση και καταστροφή του χόνδρου και του οστού, καθώς επίσης τίτλοι αντισωμάτων έναντι του κολλαγόνου στον ορό. Το πρότυπο αυτό της RA έχει καθιερωθεί και είναι από τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα ζωικά πρότυπα (Trentham, 1982, Holmdahl *et al.*, 1989).

Αρθρίτιδα επαγόμενη από πρωτεογλυκάνες (Proteoglycan-induced arthritis, PGIA)

Η PGIA επάγεται σε θηλυκά BALB/c ποντίκια μετά από επαναλαμβανόμενες ανοσοποιήσεις με πρωτεογλυκάνες του χόνδρου σε ανοσοενισχυτικό, οδηγώντας σε πολυαρθρίτιδα και ακόλουθη διάβρωση του αρθρικού χόνδρου και του οστού. Η ανάπτυξη της αρθρίτιδας εξαρτάται, όπως στη CIA, από τα CD4⁺ T-κύτταρα, καθώς και από τα B-κύτταρα, και σχετίζεται με την εμφάνιση των ειδικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου (Glant *et al.*, 2003).

Αρθρίτιδα επαγόμενη από ανοσοενισχυτικά (Adjuvant-induced arthritis, AA)

Στην AA η αρθρίτιδα επάγεται με έγχυση στελέχους του βακτηρίου *Mycobacterium Tuberculosis*, σε ευπαθή στελέχη αρουραίων, όπου η ανάπτυξη της νόσου εξαρτάται τόσο από τον απλότυπο MHC όσο και από άλλα γονίδια εκτός του MHC (Kim and Moudgil, 2009). Στην αρθρίτιδα επαγόμενη από λάδι (oil-induced arthritis, OIA) και στην αρθρίτιδα επαγόμενη από pristane (pristane-induced arthritis, PIA), η αρθρίτιδα αναπτύσσεται μετά από ενδοδερμική ένεση ορυκτέλαιου και pristane, αντίστοιχα. Τα πρότυπα αρθρίτιδας που συνιστούν τις AAs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη μελέτη των μηχανισμών της ασθένειας καθώς επίσης για τον γενετικό έλεγχο των διαφορετικών φάσεων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της αρθρίτιδας (Kleinau *et al.*, 1991, Holmdahl *et al.*, 2001).

Αρθρίτιδα επαγόμενη από αντιγόνα (Antigen-induced arthritis, AIA)

Στην AIA γίνεται τοπική επαγωγή της αρθρίτιδας με ανοσοποίηση με κάποιο πρωτεϊνικό αντιγόνο (αλβουμίνη ορού βοός-BSA) μετά από ενδο-αρθρική ένεση στις αρθρώσεις των γονάτων (Brackertz *et al.*, 1977). Σε αντίθεση με τα άλλα πρότυπα, η αρθρίτιδα αναπτύσσεται μόνο στις αρθρώσεις όπου γίνεται η έγχυση και η ανοσολογική απόκριση περιορίζεται στην πάσχουσα άρθρωση, όπου τα ιστολογικά χαρακτηριστικά είναι όμοια με αυτά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ανοσοποίηση, που γίνεται με έγχυση αντιγόνου που δε σχετίζεται με την άρθρωση, οδηγεί στην εμφάνιση T κυτταρικής απόκρισης έναντι αντιγόνων της άρθρωσης, και το πρότυπο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες αυτοδραστικών T-κυττάρων (Nickdel *et al.*, 2009).

Αρθρίτιδα επαγόμενη από κυτταρικό τοίχωμα στρεπτόκοκκου (Streptococcal cell-wall-induced arthritis, SCW-A)

Στο πρότυπο αυτό, αναπτύσσεται μη συμμετρική αρθρίτιδα μετά από ενδο-αρθρική ένεση συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος στρεπτόκοκκου σε προ-ανοσοποιημένους ποντικούς ή αρουραίους ή σε ζώα στα οποία γίνεται συστηματική ανοσοποίηση μετά από την ένεση. Η παθολογία που παρατηρείται στην άρθρωση περιλαμβάνει διήθηση από μονοκύτταρα, φλεγμονή του αρθρικού υμένα και διάβρωση του χόνδρου και του οστού (Esser *et al.*, 1985).

Αρθρίτιδα επαγόμενη από αντισώματα έναντι του κολλαγόνου (Collagen antibody-induced arthritis, CAIA)

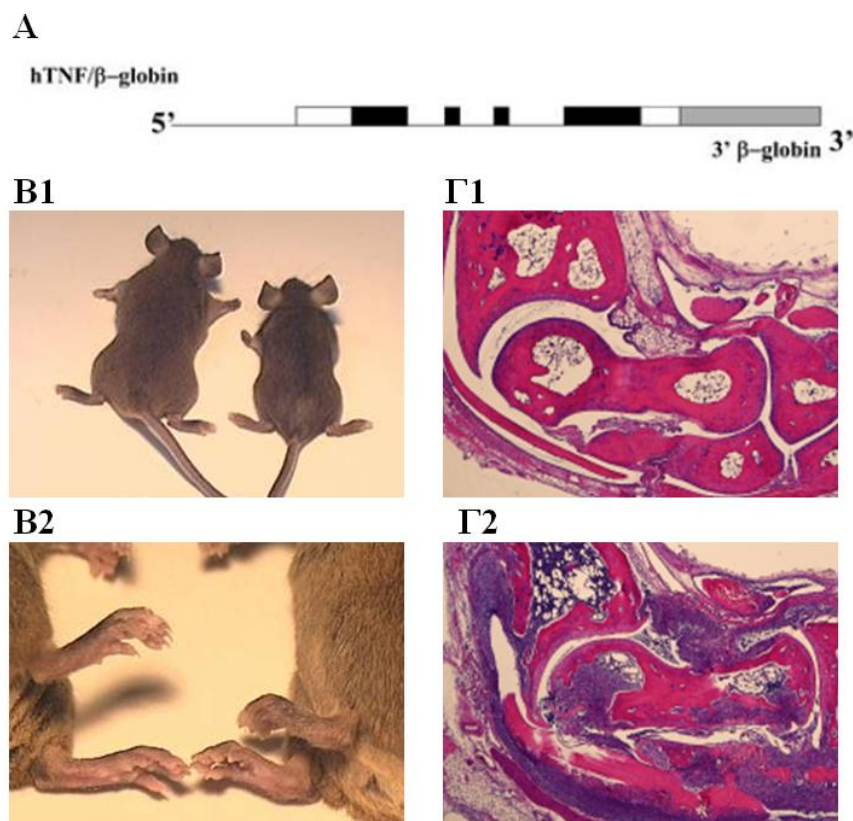
Η εμφάνιση των παθογόνων αντισωμάτων έναντι του κολλαγόνου τύπου II στις αρθρώσεις των ανοσοποιημένων με κολλαγόνο τύπου II ποντικών συμβάλλουν στην σοβαρότητα της αρθρίτιδας στη CIA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή αρθρίτιδας στο CAIA πειραματικό πρότυπο. Η CAIA δεν περιλαμβάνει την προκλινική φάση, μετά την ανοσοποίηση με αντιγόνο του χόνδρου, όταν χάνεται η αυτο-ανοχή, αντίθετα, καλύπτει μια οξεία ανοσολογική φάση. Το πρότυπο αυτό ποντικού, ενώ εμφανίζει χαρακτηριστικά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να επαχθεί σε στελέχη ποντικών που εκφράζουν μόρια MHC που δεν σχετίζονται φυσιολογικά με την ευαισθησία στην αρθρίτιδα (Terato *et al.*, 1992, Nandakumar *et al.*, 2003).

1.3.2 Αυθόρμητα πρότυπα

Διαγονιδιακός ποντικός TghuTNF (Tg197)

Ο TNF παίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ο ποντικός *TghuTNF* φέρει το γονίδιο του ανθρώπινου TNF-α στο οποίο έχει γίνει αντικατάσταση της 3' αμετάφραστης περιοχής από την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του mRNA και ακολούθως της μετάφρασης του TNF. Το πρότυπο αυτό χαρακτηρίζεται από απορυθμισμένη έκφραση του ανθρώπινου TNF που οδηγεί στην ανάπτυξη χρόνιας, διαβρωτικής και συμμετρικής πολυαρθρίτιδας.

Το πρότυπο αυτό, το οποίο δημιουργήθηκε σε μικτό γενετικό υπόβαθρο CBA×C57Bl/6, παρουσιάζει 100% διεισδυτικότητα και η εμφάνιση της αρθρίτιδας γίνεται σε ηλικία 4- 6 εβδομάδων, με πρήξιμο των αρθρώσεων του αστραγάλου, ενώ στις 9- 10 εβδομάδες παρατηρείται πλήρης παθολογία με απώλεια της κίνησης των κάτω άκρων. Επίσης, η προοδευτική απώλεια βάρους είναι κοινό χαρακτηριστικό των ποντικών αυτών. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως η υπερπλασία του αρθρικού υμένα και η διήθηση του αρθρικού χώρου από πολυμορφοπύρρηνα και λεμφοκύτταρα είναι εμφανή σε σχεδόν όλες τις αρθρώσεις. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου είναι εμφανής ο σχηματισμός «πάννου», η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και η παραγωγή ινώδους ιστού (Εικόνα 7). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά είναι κοινά με την ανθρώπινη ρευματοειδή αρθρίτιδα, παρόλο που δεν ανιχνεύεται ρευματοειδής παράγοντας έναντι της IgG του ποντικού στον ορό (Keffer *et al.*, 1991). Ίσως το σημαντικότερο στοιχείο των ποντικών αυτών που προσομοιάζει στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και το διακρίνει από τα υπόλοιπα ζωικά πρότυπα, είναι η προοδευτική φύση της αρθρίτιδας η οποία είναι χρόνια και μη υποχωρούσα, σε αντίθεση με τα πρότυπα αρθρίτιδας επαγόμενης από κολλαγόνο και ανοσοεπιχυστικά στα οποία η νόσος είναι πιο οξεία και αυτό-περιοριζόμενη (Li and Schwarz, 2003). Ο ποντικός *TghuTNF* αποτελεί ένα πολύτιμο πρότυπο που περιορίζεται στους TNF-εξαρτώμενους μηχανισμούς της ασθένειας και, έτσι, μπορεί να μην είναι κατάλληλο για μελέτη άλλων μονοπατιών που είναι αναρροϊκά ή ανεξάρτητα του TNF (Kollias *et al.*, 2011). Το διαγονιδιακό πρότυπο *TghuTNF* έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας πολλών ήδη εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων και συνιστάται από τον FDA για τον έλεγχο πιθανών αντιρευματικών φαρμάκων.



Εικόνα 7: Πρότυπο διαγονιδιακού ποντικού TghuTNF (Tg197). (A) Διαγονίδιο huTNF-gI στο οποίο έχει γίνει αντικατάσταση της 3' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου του ανθρώπινου TNF-α από την αντίστοιχη του γονιδίου της β-σφαιρίνης (Keffler et al., 1991), (B) Μακροσκοπική εικόνα των όπου φαίνεται η απώλεια βάρους (B1) και το πρήξιμο των αστραγάλων (B2) των Tg197 ποντικών (δεξιά) σε σχέση με μάρτυρες αγρίου τύπου (αριστερά), (Γ) Εικόνες από τομές αστραγάλων όπου φαίνεται η υπερπλασία του αρθρικού υμένα, η διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα και η καταστροφή του χόνδρου και του οστού στους Tg197 ποντικούς (Γ2) σε σχέση με μάρτυρες αγρίου τύπου (Γ1). (Εικόνες από το αρχείο του Εργαστηρίου Φλεγμονής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ).

SKG

Στο SKG πρότυπο η αρθρίτιδα αναπτύσσεται λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο ZAP-70, η οποία επηρεάζει τη μεταγωγή σήματος από τον T-κυτταρικό υποδοχέα και οδηγεί στη θετική επιλογή αυτοδραστικών T-κυττάρων στο θύμο και, επομένως, σε αυτοανοσία (Sakaguchi *et al.*, 2003).

Αρθρίτιδα KRN- Διαγονιδιακός ποντικός K/BxN

Οι ποντικοί K/BxN που εκφράζουν τόσο τον διαγονιδιακό υποδοχέα T-κυττάρων KRN, που αναγνωρίζει ένα πεπτίδιο της παγκρεατικής RNάσης του βοός και την ενδογενή 6-φωσφο-ισομεράση της γλυκόζης (glucose-6-phosphate isomerase,

G6PI), όσο και τον MHC απλότυπο H-2^{B7} του στελέχους NOD (Non-obese Diabetic), αναπτύσσουν αυθόρμητα αρθρίτιδα (Kouskoff *et al.*, 1996). Η αρθρίτιδα μπορεί, επίσης, να επαχθεί σε διαφορετικά στελέχη ποντικών με μεταφορά του ορού (IgG αντισωμάτων) των K/BxN αρθριτικών ποντικών.

Ποντικός με έλλειψη των ρυθμιστικών στοιχείων ARE του γονιδίου του TNF (TNF^{ΔARE})

Στο πρότυπο ποντικού TNF^{ΔARE} έχει γίνει απαλοιφή των ρυθμιστικών στοιχείων AU (AU-rich elements, AREs) του γονιδίου του TNF με μεθόδους γονιδιακής στόχευσης. Τα AREs ευθύνονται για την αποδόμηση των TNF-α μεταγραφημάτων εκτός αν αυτά σταθεροποιηθούν κατά την κυτταρική ενεργοποίηση. Λόγω του ότι ο TNF-α ρυθμίζεται πρωτίστως σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, η έλλειψη των ARE οδηγεί σε αυξημένη σταθερότητα και μετάφραση του mRNA του ενδογενούς TNF. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν χρόνια πολυαρθρίτιδα, φλεγμονώδη εντεροπάθεια και καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, αρχικά, περιλαμβάνουν υπερπλασία του αρθρικού υμένα και διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα, ενώ σε αργότερα στάδια παρατηρείται σχηματισμός «πάννου» και ινώδους ιστού καθώς και καταστροφή του αρθρικού χόνδρου. Όλα τα παθολογικά ευρήματα, συμπεριλαμβανόμενης της παρουσίας ρευματοειδούς παράγοντα, είναι κοινά με τη PA (Kontoyiannis *et al.*, 1999).

Διαγονιδιακός ποντικός TghuIL-1α και ποντικός με ανεπάρκεια του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra^{-/-})

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της IL-1 στην αρθρίτιδα, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη IL-1α τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητα πολυαρθρίτιδα, υπερπλασία του αρθρικού υμένα και καταστροφή του οστού και του χόνδρου (Niki *et al.*, 2001). Ένα άλλο πειραματικό πρότυπο αρθρίτιδας που σχετίζεται με τη σηματοδότηση της IL-1, είναι ο ποντικός με ανεπάρκεια του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra^{-/-}), το οποίο όταν διασταυρωθεί σε υπόβαθρο BALB/c, αναπτύσσει αυθόρμητα πολυαρθρίτιδα. Το πρότυπο αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στις αρθρώσεις, λόγω της έλλειψης ελέγχου της δραστηριότητας της IL-1, τον ακόλουθο σχηματισμό «πάννου» και τη διήθηση του αρθρικού χώρου από μονοκύτταρα (Horai *et al.*, 2000), και θεωρείται κατάλληλο για μελέτες του ρόλου άλλων κυτταροκινών στην αρθρίτιδα (Koenders *et al.*, 2008).

Στην έρευνα για τη διαλεύκανση των μοριακών και κυτταρικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, εγκατάστασης, θεραπείας και πρόληψης της ΡΑ δημιουργούνται πολλαπλά διαγονιδιακά ζώα τα οποία χρησιμοποιούνται ανάλογα με το ερώτημα που τίθεται.

1.4 Ολεοκανθάλη: ένα φυσικό προϊόν με αντιφλεγμονώδη δράση

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει επισημάνει την επίδραση της διατροφής στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών. Στις μέρες μας, είναι σαφές ότι η ανθυγιεινή διατροφή, μεταξύ άλλων επιβλαβών συνηθειών του τρόπου ζωής, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών τόσο στις ανεπτυγμένες όσο στις αναπτυσσόμενες χώρες. Πράγματι, τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί έντονη αύξηση της εμφάνισης φλεγμονωδών και αυτοάνοσων διαταραχών στο δυτικό κόσμο. Αυτό οφείλεται σε αλλαγές στη διατροφή των ανθρώπων όπως η αυξημένη κατανάλωση θερμίδων, η μειωμένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών υψηλής ποιότητας και η τάση για κατανάλωση επεξεργασμένων τροφών. Στον αντίποδα, διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν επισημάνει τη συσχέτιση παραδοσιακών διατροφών, όπως η Μεσογειακή, με τη μειωμένη εμφάνιση συγκεκριμένων παθολογιών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, τη χρόνια φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα (Aparicio-soto *et al.*, 2016).

Η ευεργετική επίδραση της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής στην υγεία έχει αναγνωρισθεί εδώ και δεκαετίες, με την πρώτη αναφορά στη μελέτη των Επτά Χωρών (Keys, 1970). Επίσης, είναι γνωστό ότι οι κάτοικοι της Μεσογείου παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά χρόνιων νόσων και υψηλότερο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με άλλους πληθυσμούς παγκοσμίως (Sofi *et al.*, 2010). Η Μεσογειακή διατροφή περιλαμβάνει έναν αριθμό από διατροφικά συστατικά που θεωρούνται ότι συμβάλλουν στις προστατευτικές επιδράσεις στην υγεία, όπως το παρθένο ελαιόλαδο το οποίο έχει αναγνωρισθεί ως πολύτιμος φαρμακολογικός παράγοντας στα χέρια των Αρχαίων Ελλήνων ιατρών, με τον Ιπποκράτη να αναφέρει περίπου 60 καταστάσεις στις οποίες η χρήση του ελαιολάδου μπορεί να είναι ωφέλιμη.

Το παρθένο ελαιόλαδο συνίσταται από δύο κλάσματα: το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (90-99%) και ένα μικρότερο κλάσμα (1%) που συνίσταται από δύο υπο-κλάσματα, το ασαπωνοποίητο και το φαινολικό. Τα κύρια συστατικά του

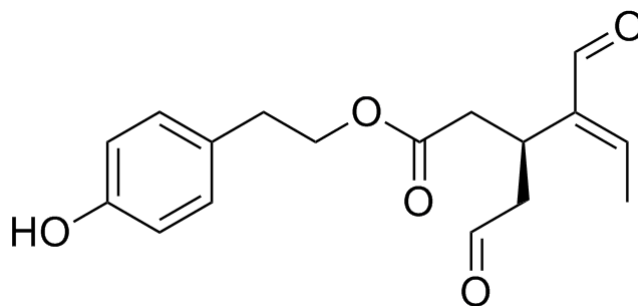
σαπωνοποιήσιμου κλάσματος είναι τα λιπαρά οξέα από τα οποία το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ αποτελεί μέχρι και το 80% της συνολικής λιπιδικής σύστασης. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα περιέχει έναν αριθμό από συστατικά με ενδιαφέρουσα βιολογική αξία όπως υδρογονάνθρακες, αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες, στερόλες, βιταμίνες κ.α. Το φαινολικό κλάσμα είναι ένα σύνθετο μίγμα φαινολικών συστατικών, το οποίο είναι εν μέρει υπεύθυνο για την οξειδωτική σταθερότητα και τις αισθητήριες ιδιότητες του ελαιολάδου και θεωρείται σημαντική παράμετρος της ποιότητάς του. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η καλλιέργεια της ελιάς και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι συνθήκες απομόνωσης και αποθήκευσης. Στο φαινολικό κλάσμα περιλαμβάνονται τουλάχιστον 36 διακριτές δομικά ενώσεις, κυρίως φαινολικά οξέα καθώς και άλλα βιοδραστικά συστατικά όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ολευροπεΐνη, η ολεασίνη, η ολευροπεΐνη-αγλυκόνη, η ολεοκανθάλη και η λουτεολίνη μεταξύ άλλων (Aparicio-soto *et al.*, 2016).

Παλαιότερα, οι ωφέλιμες επιδράσεις του ελαιολάδου είχαν αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, και ιδιαίτερα σε ελαϊκό οξύ. Ωστόσο, σήμερα, όλο και περισσότερα στοιχεία αναδεικνύουν τη συμβολή των ενώσεων, που αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό της σύστασης του ελαιολάδου, στις ευεργετικές επιδράσεις που συνοδεύουν την κατανάλωσή του. Μια σειρά από μελέτες (*in vivo* και *in vitro*) έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου έχουν πιθανές ωφέλιμες βιολογικές επιδράσεις ως αποτέλεσμα των αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους (Cicerale *et al.*, 2012). Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του παρθένου ελαιολάδου και συστατικών του στην κλινική εικόνα και σε διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος με τη χρήση *in vivo* και *in vitro* προτύπων της PA.

Πίνακας 3: Δράσεις του παρθένου ελαιολάδου και των συστατικών του σε *in vivo* και *in vitro* πρότυπα μελέτης ρευματοειδούς αρθρίτιδας. ↓: μείωση, CIA: Collagen induced arthritis, intraperitoneal, i.p: ενδοπεριτοναϊκή και per os, p.o: δια του στόματος χορήγηση.

Συστατικό	Πειραματικό σύστημα	Δοσολογικό σχήμα ή συγκέντρωση	Μηχανισμός δράσης	Βιβλιογραφία
ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ				
<i>In vivo</i> μελέτες				
Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο	CIA σε ποντικούς	100 g/Kg διατροφής για 12 εβδομάδες	- Αναστολή της ανάπτυξης αρθρίτιδας - ↓ TNF-α, IL-1β και IL-17 σε εκχύλισμα άρθρωσης και ↓ MMP-3 και COMP στον ορό μέσω των μονοπατιών JAK/STAT, MAPKs, NF-κB και Nrf2	(Rosillo <i>et al.</i> , 2015a)
Υδροξυτυροσόλη	CIA σε αρουραίους	40 mg/Kg/ημέρα i.p για 13 ημέρες	- ↓ πρήξιμο άκρων και ιστολογική βλάβη - ↓ έκφρασης COX-2 και iNOS	(Silva <i>et al.</i> , 2015)
Υδροξυτυροσόλη- Acetate	CIA σε ποντικούς	0,5 g/Kg διατροφής για 12 εβδομάδες	- ↓ COMP και MMP-3 - Τροποποίηση Nrf2/HO-1 και αναστολή μονοπατιών JAK/STAT, MAPKs και NF-κB	(Rosillo <i>et al.</i> , 2015b)
Ολευροπεΐνη- Αγλυκόνη	CIA σε ποντικούς	5 mg/Kg/ημέρα i.p για 7 ή 10 ημέρες	- Βελτίωση κλινικών συμπτωμάτων και ιστοπαθολογικών σκορ - ↓ προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στο πλάσμα - ↓ MPO ενεργότητας	(Impellizzeri <i>et al.</i> , 2011)
Φαινολικό εκχύλισμα	CIA σε ποντικούς	100 και 200 mg/Kg/ημέρα p.o για 13 ημέρες	- ↓ TNF-α, IL-1β, IL-6 και PGE ₂ σε εκχύλισμα άρθρωσης - ↓ COX-2 και mPGES-1 μέσω μονοπατιών NF-κB, STAT3 και MAPK	(Rosillo <i>et al.</i> , 2014)
<i>In vitro</i> μελέτες				
Ολεοκανθάλη	LPS-challenge σε ATDC5 χονδροκύτταρα ποντικού	10 και 25 μM	- αναστολή της έκφρασης iNOS και παραγωγής NO	(Iacono <i>et al.</i> , 2010)
		15 μM	- ↓ έκφρασης IL-6 και MIP-1α	(Scotece <i>et al.</i> , 2012)
	LPS-challenge σε J774 μακροφάγα ποντικού	50 μM	- ↓ έκφρασης IL-6 και MIP-1α - ↓ IL-1β, TNF-α, GM-CSF	

Το 2003, ταυτοποιήθηκε μια από τις ενώσεις του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, η decarboxy methyl ligstroside aglycone, η οποία προκαλεί το κάψιμο στο λαιμό χαρακτηριστικό του ελαιολάδου (Andrewes *et al.*, 2003). Η ένωση αυτή, έπειτα, μελετήθηκε από τους Beauchamp *et al.* και ονομάστηκε ολεοκανθάλη (Εικόνα 8). Η ιδέα ότι η ολεοκανθάλη είναι μια πιθανή αντιφλεγμονώδης ένωση, προήλθε λόγω της αισθητήριας ιδιότητας της να προκαλεί κάψιμο/τίσιμψη στο λαιμό, η οποία είναι κοινή με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofen, παρόλο που οι δομές τους διαφέρουν. Όμοια με το ibuprofen, οι Beauchamp *et al.* ανέφεραν ότι η ολεοκανθάλη αναστέλλει τη δράση των κυκλοοξυγενασών 1 και 2 (COX-1 και COX-2), ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση των προσταγλανδινών, ρυθμιστών της φλεγμονής (Beauchamp *et al.*, 2005). Εκτός από τις COX, η ολεοκανθάλη έχει δειχθεί ότι αναστέλλει τη δράση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης 5-λιποξυγενάσης (5-LOX) (Vougianniopoulou *et al.*, 2014). Η 5-LOX είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των προφλεγμονωδών λευκοτριενίων, και το γεγονός ότι ανεπιθύμητες αντιδράσεις που σχετίζονται με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα οφείλονται εν μέρει στην αδυναμία τους να αναστείλουν την 5-LOX, καθιστά την ολεοκανθάλη καλύτερο υποψήφιο μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (Pang and Chin, 2018).

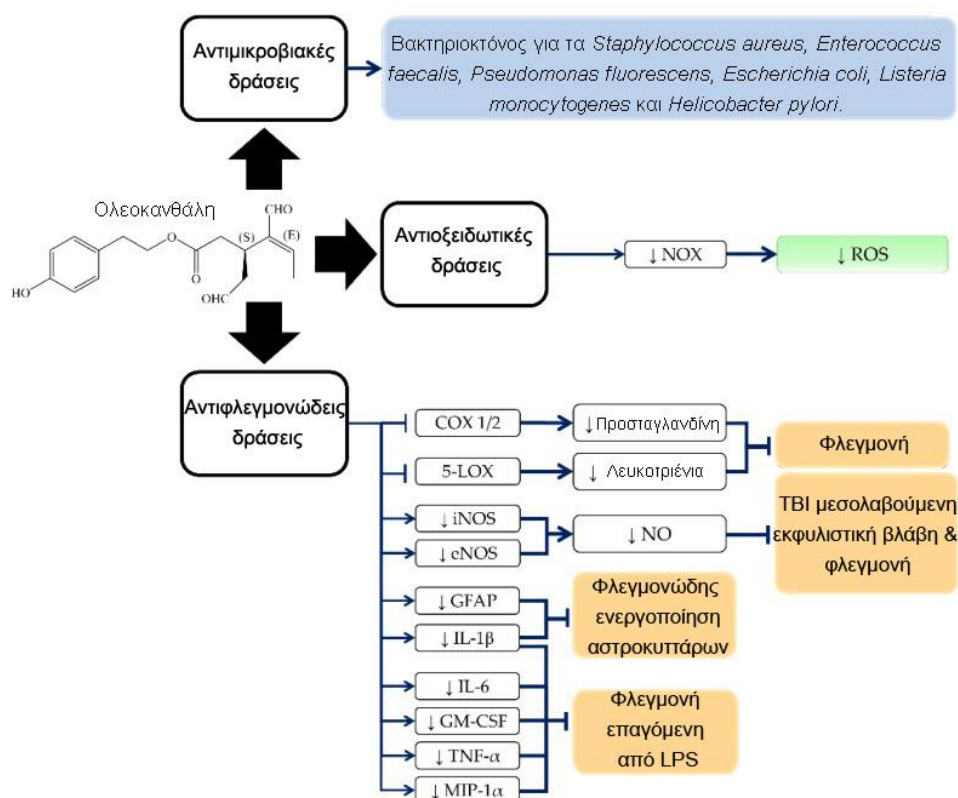


Εικόνα 8: Χημική δομή της ολεοκανθάλης.

Το οξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide, NO) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διεργασιών όπως η αγγειοδιαστολή, η νευροδιαβίβαση και η φλεγμονή. Το NO παράγεται από διαφορετικές μορφές της συνθάσης του NO (Nitric Oxide Synthase, NOS) όπως η ενδοθηλιακή και η νευρωνική NOS. Η τρίτη μορφή της NOS, γνωστή ως επαγόμενη NOS (inducible NOS, iNOS) δεν υπάρχει στα κύτταρα όταν βρίσκονται σε ηρεμία αλλά επάγεται μετά από την επίδραση κάποιου ερεθίσματος όπως ο λιποπολυσακχαρίτης και διάφορες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Scher *et al.*, 2007).

Οι επιδράσεις της ολεοκανθάλης σε φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές έχουν μελετηθεί *in vitro* σε κυτταρικές σειρές χονδροκυττάρων (ATDC5) και μακροφάγων (J774) μετά από έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS-challenged). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η ολεοκανθάλη μειώνει την έκφραση της iNOS και την παραγωγή του NO στα κύτταρα αυτά (Iacono *et al.*, 2010, Scotece *et al.*, 2012). Επιπροσθέτως, η ολεοκανθάλη ανέστειλε την παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων, όπως η IL-1β, η IL-6, MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein 1α), ο TNF-α και ο GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor) στα μακροφάγα και χονδροκύτταρα μετά από την έκθεση σε LPS (Scotece *et al.*, 2012). Λαμβάνοντας όλα αυτά τα δεδομένα υπόψη, η ολεοκανθάλη αποτελεί ένωση θεραπευτικού ενδιαφέροντος στην αναζήτηση κατάλληλων φυσικών μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών.

Εκτός από την αντιφλεγμονώδη δράση, σε πολλές μελέτες έχει εξεταστεί η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και νευροπροστατευτική δράση της ολεοκανθάλης. Από αυτές, μελέτες για αντικαρκινική δράση είναι οι πιο εκτεταμένες δείχνοντας ότι η ολεοκανθάλη καταστέλλει καρκινικά κύτταρα μελανώματος, μαστού, ήπατος και εντέρου. Άλλες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη δράση της ολεοκανθάλης στη νόσο Alzheimer's, όπου δείχθηκε βελτίωση της εκκαθάρισης β αμυλοειδούς από τους νευρώνες και μείωση της φλεγμονής των αστροκυττάρων από την ολεοκανθάλη. Στην Εικόνα 9 συνοψίζονται οι αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις της ολεοκανθάλης με βάση τα γνωστά στοιχεία. Παρόλο που τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι θετικά, η επικύρωση των βιολογικών επιδράσεων της ολεοκανθάλης σε ζωικά πρότυπα ασθενειών είναι περιορισμένη και πρέπει να ληφθεί υπόψη σε μελλοντικές μελέτες (Pang and Chin, 2018).



Εικόνα 9: Αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις της ολεοκανθάλης.
 ↓: μείωση, NOX (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase): φωσφορική οξειδάση του νικοτιναμιδο αδενο δινουκλεοτιδίου, ROS (reactive oxygen species): αντιδρώντα στοιχεία οξυγόνου, COX 1/2: κυκλοξυγενάση 1/2, 5-LOX: 5-λιποξυγενάση, NO: οξείδιο του αζώτου, iNOS: επαγόμενη συνθάση του NO, eNOS: ενδοθηλιακή συνθάση του NO, GFAP (glial fibrillary acidic protein): γλοιακή ινιδιακή όξινη πρωτεΐνη, TBI (traumatic brain injury): Τραυματική βλάβη εγκεφάλου. (Ανατύπωση από Pang and Chin, 2018)

1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η βελτιστοποίηση της δράσης των φαρμάκων αποτελεί πεδίο συνεχούς έρευνας λόγω της χαμηλής αποτελεσματικότητας και των παρενεργειών τους. Οι βιολογικοί παράγοντες, όπως τα αντισώματα έναντι του TNF, αποτελούν πρώτης γραμμής θεραπεία στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο, υπάρχουν ασθενείς που εμφανίζουν, μικρή ή καθόλου απόκριση στις θεραπείες αυτές, περιορισμένη καταστολή της φλεγμονής στις αρθρώσεις ή/και ανάπτυξη ανεπιθύμητων ενεργειών. Αν και στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων έχουν ήδη αναπτυχθεί συνδυαστικές θεραπείες βιολογικών παραγόντων με συμβατικά νοσοτροποποιητικά αντι-ρευματικά φάρμακα που είναι αποτελεσματικότερες, η περαιτέρω βελτιστοποίηση των θεραπευτικών σχημάτων συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό στόχο.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η μελέτη του ρόλου της διατροφής και ειδικότερα της μεσογειακής στην υγεία, έχει ωθήσει την αναζήτηση φυσικών προϊόντων και συστατικών τους με πιθανή φαρμακευτική δράση. Η ολεοκανθάλη, συστατικό του φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου, έχει δείξει ότι εμφανίζει, μεταξύ άλλων, αντιφλεγμονώδη, δράση *in vitro* και *in vivo*, οπότε έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως πιθανός θεραπευτικός παράγοντας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης ενός εμπορικά διαθέσιμου αντισώματος έναντι του TNF (adalimumab/D2E7) με ολεοκανθάλη στη χρόνια πολυαρθρίτιδα, *in vivo*. Για την μελέτη επιλέχθηκε το διαγονιδιακό πρότυπο της TNF διαμεσολαβούμενης χρόνιας πολυαρθρίτιδας το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση αντι-TNF φαρμάκων. Ο ποντικός αυτός υπερεκφράζει τον ανθρώπινο TNF και εμφανίζει χρόνια πολυαρθρίτιδα η οποία προσομοιάζει στη ΡΑ. Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, σε διαγονιδιακούς ποντικούς που υποβλήθηκαν στη ζητούμενη θεραπευτική προσέγγιση, πραγματοποιήθηκε αρχικά κλινική ανάλυση ελέγχοντας το σωματικό βάρος και τον αρθριτικό δείκτη. Στο τέλος της θεραπείας πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση σε τομές των αρθρώσεων των ποντικών ελέγχοντας δείκτες όπως η υπερπλασία του αρθρικού υμένα, η διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων στην αρθρική περιοχή, η καταστροφή του χόνδρου και η διάβρωση του οστού.

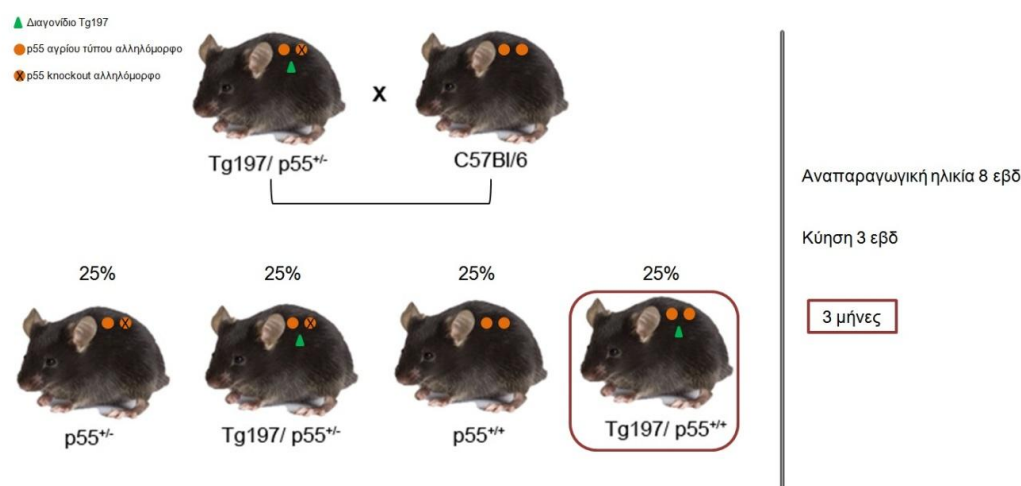
Οι αναλύσεις αυτές πρόκειται να συμπληρωθούν και με ανοσολογικούς ελέγχους που είναι υπό εξέλιξη στο πλαίσιο των ενδιαφερόντων του εργαστηρίου ελέγχοντας Th1, Th17, Treg αποκρίσεις μέσω των χαρακτηριστικών κυτταροκινών που παράγουν κατά την ανάπτυξη της φλεγμονώδους νόσου, άλλους χαρακτηριστικούς δείκτες σηματοδοτικών μονοπατιών φλεγμονής καθώς και δείκτες οξειδωτικού στρες. Τέλος, με ανάλογο τρόπο πρόκειται να διερευνηθεί η πιθανή προστατευτική δράση της ολεοκανθάλης στην αρθρίτιδα πριν την έναρξη της νόσου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ζώα πειράματος

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί ποντικοί γενετικού υποβάθρου C57Bl/6, οι οποίοι υπερεκφράζουν το γονίδιο του ανθρώπινου TNF-α (B6.TghuTNF-g1, Tg197). Επειδή οι ποντικοί αυτοί αναπτύσσουν αυθόρμητα αρθρίτιδα, διατηρούνται υγιείς μόνο αν διακοπεί η σηματοδότηση του TNF. Αυτό είναι εφικτό είτε με εβδομαδιαία χορήγηση αντισώματος έναντι του TNF ξεκινώντας πριν την κλινική εμφάνιση της νόσου, είτε με τη δημιουργία διπλών διαγονιδιακών ποντικών μετά από διασταύρωση των Tg197 ποντικών με ελλειματικούς ως προς τον υποδοχέα τύπου I του TNF (*Tnfrsf1a*^{tm1/mx}, p55 KO) (Peschon *et al.*, 1998). Για λόγους ευζωίας (3Rs) κατά τη διατήρηση της σειράς αλλά και για τη δημιουργία γεννητόρων για τη χρήση τους σε πειραματικές διαδικασίες, χρησιμοποιούνται ποντικοί με γονότυπο Tg197^{+/-}/ p55^{+/-} οι οποίοι εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα μετά την 16^η-18^η εβδομάδα έναντι των 6 -8 εβδομάδων που εμφανίζουν οι ποντικοί Tg197.

Για τον σχηματισμό ομάδων με TNF αρθριτικά διαγονιδιακά ποντίκια σε μια πειραματική διαδικασία, γεννήτορες ποντικοί Tg197 p55^{+/-} διασταυρώνονται με ποντικούς άγριου τύπου του ίδιου στελέχους (C57Bl/6) ώστε να προκύψουν οι ποντικοί Tg197 p55^{+/+} (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Στρατηγική αναπαραγωγής για την επαναφορά των διαγονιδιακών ποντικών Tg197 σε αγρίου τύπου υπόβαθρο ως προς τον υποδοχέα του TNF p55 (p55^{+/+}). Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη γέννηση των ποντικών που θα συγκροτήσουν τις ομάδες μελέτης είναι περίπου 3 μήνες.

2.2 Διαδικασίες ηθικής διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου

Η διατήρηση των ποντικών και ο *in vivo* πειραματισμός πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες SPF (specific pathogen free) στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του ΕΠΠ, οι οποίες είναι αδειοδοτημένες από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Νομαρχίας Αττικής με κωδικούς αδειών EL25BIO013 και EL25BIO012. Οι χώροι που στεγάζουν τα ζώα έχουν σταθερή θερμοκρασία 22 ± 2 °C, σχετική υγρασία 40-70% και κύκλο φωτός/σκότους 12 ωρών. Το πρωτόκολλο πειραματισμού αξιολογήθηκε από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων (ΕΑΠ) του ΕΠΠ και εγκρίθηκε από την Περιφερειακή Κτηνιατρική Αρχή του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Οικονομίας. Όλες οι διαδικασίες συμβαδίζουν με τις διατάξεις του Π.Δ. 56/2013 και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (οδηγία 2010/630/EU), τις αρχές ορθής και ηθικής χρήσης ζώων εργαστηρίου 3+1R: Replacement, Reduction, Refinement και Respect και τις αρχές που αφορούν στα Animal Research: Reporting *in vivo* experiments (ARRIVEs). Ως τελικά σημεία για το πρότυπο Tg197 ορίζονται η απώλεια βάρους > 10% του φυσιολογικού και η σοβαρά μειωμένη κινητικότητα.

2.3 Γονοτυπική ανάλυση διαγονιδιακών ποντικών με τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος απαιτεί ως πρώτο στάδιο την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τους απογόνους με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου huTNF- α και του γονιδίου p55 με την πραγματοποίηση δύο ανεξάρτητων αντιδράσεων PCR. Στην πρώτη χρησιμοποιείται ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει αποκλειστικά σε αλληλουχίες του διαγονιδίου huTNF- α , το προϊόν μεγέθους 300 bp είναι ειδικό για τους διαγονιδιακούς ποντικούς (Εικόνα 11). Στη δεύτερη PCR χρησιμοποιούνται τρεις εκκινητές και είναι πιθανή η παραγωγή δύο προϊόντων εκ των οποίων το ένα (1200 bp) αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και το άλλο (1100 bp) στο knockout αλληλόμορφο του γονιδίου p55 (Εικόνα 12). Η παραγωγή των προϊόντων διαπιστώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και οπτικοποίηση μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε ακτινοβολία UV.

2.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από βιοψία ουράς

- Από την άκρη της ουράς κόβεται τμήμα περίπου 3 mm και τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf 1,5 mL.

- Προσθήκη 150 μL διαλύματος πέψης και 8 μL πρωτεΐνάσης K.
- Έντονη σύντομη ανάμιξη.
- Επώση όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο στους 55 °C. Προσθήκη ίσου όγκου (150 μL) διαλύματος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1).
- Έντονη ανάμιξη για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση στις 11800 rpm για 10 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου (υδάτινη φάση) σε νέο eppendorf.
- Προσθήκη 0,7 όγκων (105 μL) ισοπροπανόλης.
- Ελαφριά ανάμιξη και «ψάρεμα» του DNA με γυάλινη πιπέτα Pasteur κλειστή στην άκρη.
- Εμβάπτιση της πιπέτας διαδοχικά σε 70% αιθανόλη και 100% αιθανόλη (10-15 φορές).
- Η πιπέτα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 5-10 λεπτά.
- Τοποθέτηση της πιπέτας σε eppendorf με ~150 μL ddH₂O για τουλάχιστον 20 λεπτά ώστε να διαλυθεί και να ενυδατωθεί το DNA.
- Απομάκρυνση της πιπέτας και αποθήκευση του DNA στους 4 °C ή -20 °C.

Υλικά: Διάλυμα πέψης: 0,05 M Tris pH 8, 0,1 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1% SDS, Πρωτεΐνάση K (Roche): διάλυμα 10 mg/mL σε 50 mM Tris.

Συσκευές: Φυγόκεντρος 5417 C (Eppendorf), Vortex Genie 2 (Scientific Industries).

2.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA, εξασφαλίζοντας την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός αρχικού τμήματος DNA απειροελάχιστης ποσότητας. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών τμημάτων DNA (εκκινητές).

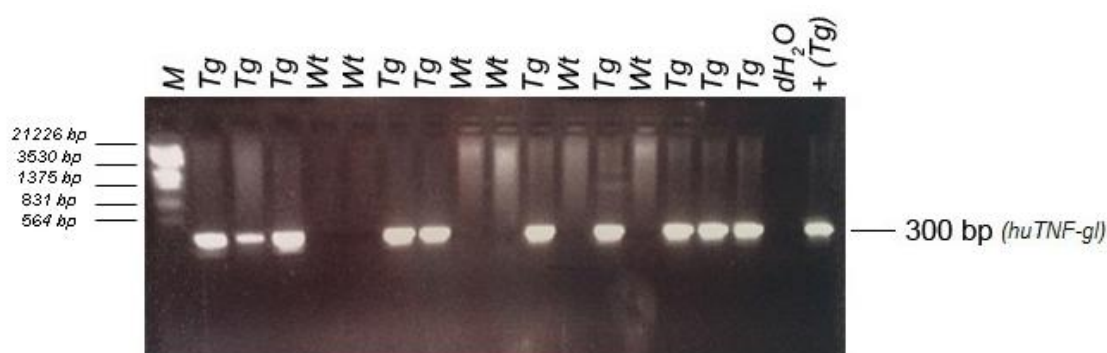
Η σύνθεση καταλύεται από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq), παρουσία των εκκινητών, ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων καθώς και

ιχνοστοιχείων που βελτιώνουν την απόδοσή της (Mg^{2+}). Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης, σε πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με θέρμανση στους 94 °C, ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας στους 55- 60 °C και υβριδισμός των εκκινητών στα συμπληρωματικά τμήματα και σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από τη DNA πολυμεράση στους 72 °C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 30 κύκλους αντιγραφής.

Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για το διαγονίδιο huTNF-gI και το γονίδιο p55 δίνονται στον Πίνακα 4 και Πίνακα 5, αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης PCR γονοτύπησης διαγονιδιακών ποντικών huTNF-gI (Tg197).

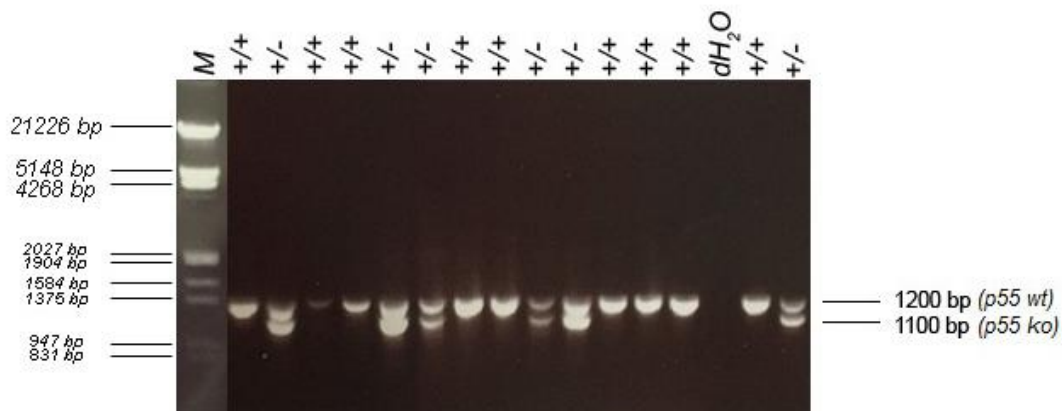
Παρασκευή διαλύματος		Κατανομή κύκλων
DNA μήτρα	1 μ L	1. Προεπώαση στους 94 °C για 5 λεπτά 2. Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό 3. Υβριδισμός εκκινητών στους 58 °C για 1 λεπτό 4. Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό 5. Επανάληψη 2,3,4 για 29 κύκλους 6. Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά 7. Αναμονή στους 6 °C
Taq Buffer 5x	4 μ L	
dNTPs (2,5 mM)	2 μ L	
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μ L	
Εκκινητής F (5 pmol/ μ L)	1 μ L	
Εκκινητής R (5 pmol/ μ L)	1 μ L	
Taq πολυμεράση	0,2 μ L	
ddH ₂ O	9,6 μ L	
Σύνολο	20 μ L	
Εκκινητές (Eurofins):	F: 5'- TAC CCC CTC CTT CAG ACA CC- 3' R: 5'- GCC CTT CAT AAT ATC CCC CA- 3'	



Εικόνα 11: Ενδεικτική PCR γονοτύπησης διαγονιδιακών ποντικών Tg197. Το προϊόν 300 bp είναι ειδικό για τη διαγονιδιακή κατασκευή huTNF-gI. Tg: διαγονιδιακό, Wt: αγρίου τύπου ως προς το διαγονίδιο, M: marker γνωστών μοριακών βαρών (λ DNA με EcoRI/HindIII), +: θετικός μάρτυρας (διαγονιδιακό).

Πίνακας 5: Συνθήκες αντίδρασης PCR γονοτύπησης ποντικών p55 knockout.

Παρασκευή διαλύματος		Κατανομή κύκλων
DNA μήτρα	2 μ L	1. Αποδιάταξη στους 94 °C για 4 λεπτά
Taq Buffer 5x	4 μ L	2. Υβριδισμός εκκινητών στους 56 °C για 45 δευτερόλεπτα
dNTPs (2,5 mM)	1,5 μ L	3. Επιμήκυνση στους 72 °C για 1,5 λεπτό
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μ L	4. Αποδιάταξη στους 93 °C για 45 δευτερόλεπτα
Εκκινητής F ₁ (5 pmol/ μ L)	2 μ L	5. Υβριδισμός εκκινητών στους 56 °C για 45 δευτερόλεπτα
Εκκινητής F ₂ (5 pmol/ μ L)	2 μ L	6. Επιμήκυνση στους 72 °C για 1,5 λεπτό
Εκκινητής R (5 pmol/ μ L)	2 μ L	7. Επανάληψη 4,5,6 για 33 κύκλους
Taq πολυμεράση	0,2 μ L	8. Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά
ddH ₂ O	5,1 μ L	9. Αναμονή στους 6 °C
Σύνολο	20 μ L	
Εκκινητές (Eurofins):		F ₁ : 5'- CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA- 3' F ₂ : 5'- CTC TCT TGT GAT CAG CAC TG- 3' R: 5'- CTG GAA GTG TGT CTC AC- 3'



Εικόνα 12: Ενδεικτική PCR γονοτύπησης p55 (TNFR1) knockout ποντικών. Το ένα προϊόν (1200 bp) αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wt) και το δεύτερο προϊόν (1100 bp) αντιστοιχεί στο knockout (ko) αλληλόμορφο του p55. +/+ : αγρίου τύπου και +/- : ετερόζυγοι ως προς το γονίδιο p55, M: marker γνωστών μοριακών βαρών (λ DNA με EcoRI/HindIII).

Υλικά: Taq Buffer 5x: 250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH: 9, 1% Triton-X100, dNTPs set (dATP, dTTP, dGTP, dCTP): stock 100 mM το καθένα (Invitrogen).

Συσκευές: Θερμοκυκλοποιητής: PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα, όπως και κάθε άλλο φορτισμένο σωματίδιο, μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, που διαχωρίζει τα κλάσματα με βάση το μέγεθός τους. Το πήκτωμα αγαρόζης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν μικροσκοπικούς πόρους κατά το σχηματισμό του πηκτώματος, μέσω των οποίων μετακινούνται τα DNA κλάσματα. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο διαμέσου του πηκτώματος και επειδή το DNA έχει αρνητικό φορτίο, τα κλάσματα μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα σε μέγεθος DNA κλάσματα μετακινούνται ευκολότερα μέσω των πόρων, οπότε και μεταναστεύουν ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης σχηματίζεται μια σκάλα από ξεχωριστές ζώνες, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από ένα σύνολο μορίων DNA ίδιου μήκους.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% 1X TBE

- Προετοιμασία του εκμαγείου με τις χτένες για το σχηματισμό των πηγαδιών.
- Αραίωση διαλύματος 10X TBE σε 1X TBE, 300 mL σε τελικό όγκο 3000 mL με dH₂O.
- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 300 mL 1X TBE και 3 g αγαρόζης.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαφανές.
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει ελαφρώς σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο με τις χτένες μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα (30 λεπτά).
- Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχει προστεθεί το υπόλοιπο διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TBE.
- Προσθήκη 35 μ L βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Μια ποσότητα (12 μ L) από το διάλυμα PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% 1X TBE αφού προστεθούν 5 μ L διαλύματος φόρτωσης. Οι ζώνες DNA

γίνονται ορατές μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει προστεθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, και έκθεση σε UV ακτινοβολία.

Υλικά: Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X TBE: 10,78% w/v Tris, 5,5% w/v Boric acid, 0,93% w/v EDTA, Διάλυμα φόρτωσης: 15% Ficoll 400 (Sigma), 0,25% Orange G (BDH), Αγαρόζη (Nippon Genetics Europe).

Συσκευές: Συσκευή ηλεκτροφόρησης μοντέλο A2 (Owl), Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης: EC 105 (E-C Apparatus Corporation), Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP).

2.4 Πειραματικές ομάδες

Μετά την γονοτυπική ανάλυση, μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ποντικών με τον επιθυμητό γονότυπο και έγινε τυχαία κατανομή τους σε 6 ομάδες έτσι ώστε οι μέσες τιμές των σωματικών βαρών και των ηλικιών να είναι περίπου ίσες. Για την εκτίμηση του ελάχιστου απαραίτητου αριθμού ζώων ανά ομάδα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GPower 3.1, χρησιμοποιώντας δεδομένα παλαιότερων μελετών. Οι ομάδες μελέτης συγκροτήθηκαν ως εξής:

- 1^η Ομάδα: Ομάδα ελέγχου ανάπτυξης της νόσου (**ΦΟ / DMSO**). Η ομάδα ελέγχου χωρίστηκε σε δύο υποομάδες με n=3 (2 ♂, 1 ♀) η καθεμία. Στη μια χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (διαλύτης του D2E7) ενδοπεριτοναϊκά κάθε εβδομάδα και στη δεύτερη χορηγήθηκε DMSO σε φυσιολογικό ορό (διαλύτης της ολεοκανθάλης) ενδοπεριτοναϊκά 3 φορές την εβδομάδα.
- 2^η Ομάδα: (**D2E7**). Στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε D2E7 5 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά κάθε δύο εβδομάδες (n=6/ 3 ♂, 3 ♀).
- 3^η Ομάδα: (**OLEO 5**). Στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε ολεοκανθάλη 5 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά 3 φορές την εβδομάδα (n=6/ 3 ♂, 3 ♀).
- 4^η Ομάδα: (**D2E7 + OLEO 5**). Στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε D2E7 5 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά κάθε δύο εβδομάδες και ολεοκανθάλη 5 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά 3 φορές την εβδομάδα (n=6/ 3 ♂, 3 ♀).
- 5^η Ομάδα: (**OLEO 10**). Στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε ολεοκανθάλη 10 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά 3 φορές την εβδομάδα (n=6/ 3 ♂, 3 ♀).

- ο 6^η Ομάδα: **(D2E7 + OLEO 10)**. Στην ομάδα αυτή χορηγήθηκε D2E7 5 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά κάθε δύο εβδομάδες και ολεοκανθάλη 10 mg/Kg ενδοπεριτοναϊκά 3 φορές την εβδομάδα (n=6/ 3 ♂, 3 ♀).

Δεδομένου ότι ο σκοπός της μελέτης είναι η θεραπευτική δράση της συνδυαστικής θεραπείας, οι χορηγήσεις ξεκίνησαν όταν οι ποντικοί ήταν 6 εβδομάδων και διήρκησαν 6 εβδομάδες. Η επιλογή της δοσολογίας και της συχνότητας των χορηγήσεων του αντισώματος έναντι του TNF (D2E7) έγινε με βάση την εμπειρία από προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Φλεγμονής του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, και της ολεοκανθάλης με βάση τη βιβλιογραφία (Abuznait *et al.*, 2013, Ayoub *et al.*, 2017).

Υλικά:

Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF: κλώνος D2E7, βιολογική ονομασία Adalimumab, εμπορική ονομασία Humira (Abbvie).

Ολεοκανθάλη: Η ολεοκανθάλη απομονώθηκε και καθαρίστηκε σύμφωνα με καθιερωμένο πρωτόκολλο στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ. Η ολεοκανθάλη αποθηκεύτηκε στους – 70°C σε ποσότητες των 12-13 mg/φιαλίδιο. Η ποσότητα ολεοκανθάλης σε κάθε φιαλίδιο διαλύθηκε αρχικά σε 50 µL DMSO. Η επιθυμητή τελική συγκέντρωση της ολεοκανθάλης που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε ακριβώς πριν τη χορήγηση στα ζώα με τη χρήση φυσιολογικού ορού.

Φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl (Adipharm), DMSO (Sigma), Γυάλινες σύριγγες Hamilton- Bonabuz, Schweiz (Gastight), Βελόνες 22G (BD).

2.5 Κλινική αξιολόγηση της αρθρίτιδας

Κατά τη διάρκεια του *in vivo* πειραματισμού οι ποντικοί παρακολουθούνται καθημερινά και κάθε εβδομάδα καταγράφεται το σωματικό βάρος, το πάχος των αστραγάλων των κάτω άκρων (μέτρηση με παχύμετρο) και η δύναμη των άκρων (μέτρηση με δυναμόμετρο Grip Strength Test, μοντέλο BIO-GS3, Bioseb). Για την μέτρηση της δύναμης οι ποντικοί ακουμπάνε με τα τέσσερα πόδια πάνω στο μεταλλικό πλέγμα του δυναμόμετρου και τραβώνται μαλακά από την ουρά μέχρι να

βρεθούν εκτός πλέγματος. Η μέση τιμή της δύναμης προκύπτει από 5 επαναληπτικές μετρήσεις.

Το αρθριτικό σκορ καταγράφεται κάθε εβδομάδα. Η αρθρίτιδα αξιολογείται με παρατήρηση στις αρθρώσεις των αστραγάλων χρησιμοποιώντας μια ημιποσοτική κλίμακα που κυμαίνεται από 0 έως 3 (Douni *et al.*, 2004).

0= όχι αρθρίτιδα (φυσιολογική εμφάνιση και δύναμη άκρων)

1= ήπια αρθρίτιδα (πρήξιμο των αρθρώσεων)

2= μέτρια αρθρίτιδα (σοβαρό πρήξιμο των αρθρώσεων και παραμόρφωση δακτύλων, όχι δύναμη άκρων)

3= βαριά αρθρίτιδα (αγκύλωση στην κάμψη και σοβαρά μειωμένη κινητικότητα)

Ζώα που κατά την διάρκεια του πειραματισμού έφθασαν στο τελικό σημείο, όπως αυτό ορίστηκε παραπάνω (παράγραφος 2.2), ευθανατώθηκαν για λόγους ευζωίας και σύμφωνα με το πρωτόκολλο πειραματισμού όπως αυτό εγκρίθηκε από την κτηνιατρική υπηρεσία.

2.6 Αιμοληψία από την ουρά και συλλογή ορού

Ο ποντικός συγκρατείται σε ειδική συσκευή ώστε να υπάρχει πρόσβαση στην ουρά. Η ουρά θερμαίνεται και τραυματίζεται ελαφρώς με αποστειρωμένο ξυράφι και μια ποσότητα 100- 200 μL αίματος συλλέγεται σε erpendorf του 1,5 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο, ο ορός, μεταφέρεται σε νέο erpendorf και ο ορός αποθηκεύεται στους -80 °C μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Συσκευές: Ψυχόμενη φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf).

2.7 Ιστολογική ανάλυση

Μετά το τέλος του *in vivo* πειραματισμού, οι ποντικοί θυσιάζονται και συλλέγονται οι αρθρώσεις των αστραγάλων. Η διαδικασία της ιστολογικής ανάλυσης των αρθρώσεων περιλαμβάνει τα στάδια της μονιμοποίησης, της αφαλάτωσης, της αφυδάτωσης και της έγκλεισης σε παραφίνη. Στη συνέχεια κόβονται τομές των ιστών σε μικροτόμο και βάφονται με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης ή χρώσεις ενδιαφέροντος, σύμφωνα με το καθιερωμένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Ακολουθεί η ιστολογική αξιολόγηση των τομών των αρθρώσεων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

2.7.1 Απομόνωση ιστών και μονιμοποίηση

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας ενός ιστού για ιστολογική ανάλυση είναι η μονιμοποίηση, η οποία έχει σκοπό τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του ιστού για μεγάλο χρονικό διάστημα και την προστασία του από την αυτόλυση και την ανάπτυξη βακτηρίων. Η μονιμοποίηση πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την συλλογή του ιστού. Τα πιο κοινά μονιμοποιητικά είναι οι αλδεύδες όπως η φορμαλδεΰδη και η γλουτεραλδεΰδη, τα άλατα του υδραργύρου, οι αλκοόλες, τα οξειδωτικά και το πικρικό οξύ. Η επιλογή του κατάλληλου μονιμοποιητικού γίνεται με βάση το είδος του υλικού και το σκοπό της μελέτης. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μονιμοποιητικό στην ιστοπαθολογία είναι το διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% (ή φορμαλίνης 10%), η οποία σχηματίζει δεσμούς με τις πρωτεΐνες χωρίς να καταστρέφεται η δομή τους.

- Τα ζώα θυσιάζονται σε κορεσμένη ατμόσφαιρα CO₂.
- Απομονώνονται οι αρθρώσεις των αστραγάλων των κάτω άκρων και αφαιρείται το δέρμα.
- Οι ιστοί τοποθετούνται σε κασσέτες ιστολογίας.
- Οι κασσέτες με τους ιστούς τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει μονιμοποιητικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% για τουλάχιστον 24 ώρες.

Υλικά: Φορμαλδεΰδη διάλυμα 4% (Applichem), κασσέτες ιστολογίας (Omnicell).

2.7.2 Αφαλάτωση ιστών

Ιστοί όπως τα οστά περιέχουν μεγάλες ποσότητες ασβεστίου το οποίο τους προσδίδει μια στερεότητα που δεν επιτρέπει τον αποτελεσματικό εμποτισμό τους με παραφίνη και καθιστά δύσκολη την παραγωγή τομών. Για το λόγο αυτό, το ασβέστιο απομακρύνεται με τη διαδικασία της αφαλάτωσης (ή απασβεστοποίησης) χρησιμοποιώντας ουσίες όπως το υδροχλωρικό οξύ, το νιτρικό οξύ, οργανικά οξέα ή χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA. Η επεξεργασία με υδροχλωρικό ή νιτρικό οξύ προκαλεί ταχεία απομάκρυνση του ασβεστίου αλλά καταστρέφει τη μορφολογία των

κυττάρων. Η διαδικασία αφαλάτωσης με EDTA είναι πολύ αργή αλλά πολύ ήπια, συνεπώς, συνίσταται για εφαρμογές όπου απαιτείται υψηλή ποιότητα μορφολογίας.

Οι ιστοί απομακρύνονται από το διάλυμα φορμαλδεΰδης και ξεπλένονται με νερό. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε διάλυμα αφαλάτωσης 10% EDTA για 7 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Για καλύτερη αφαλάτωση το διάλυμα ανανεώνεται κάθε 3 ημέρες.

Υλικά: Διάλυμα αφαλάτωσης 10% EDTA, 1,5 % Tris, pH 7,2-7,4.

2.7.3 Εμποτισμός ιστών σε παραφίνη με χρήση ιστοκινέτας

Για να παραχθούν λεπτές τομές θα πρέπει ο ιστός να εμποτιστεί με κάποιο υλικό που θα δώσει την απαραίτητη για το κόψιμο σταθερή συνοχή και σκληρότητα, όπως η παραφίνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτη σε οπτικό μικροσκόπιο. Προκειμένου να γίνει ο εμποτισμός με παραφίνη, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του νερού από τον ιστό. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχική εμβάπτιση του ιστού σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (αφυδάτωση)., Επειδή η αιθανόλη δεν είναι διαλυτή στην παραφίνη, στη συνέχεια πρέπει να γίνει αντικατάσταση με κάποιο διαλύτη που μπορεί να αναμιχθεί με την παραφίνη, όπως η ξυλόλη. Οι διαλύτες αυτοί καθιστούν τον ιστό διάφανο (διαύγαση). Μετά τη διαύγαση με ξυλόλη, ο ιστός εμβαπτίζεται σε υγρή παραφίνη σε θερμοκρασία 58-60 °C, όπου απομακρύνεται η ξυλόλη και γίνεται εμποτισμός με παραφίνη.

Πρωτόκολλο λειτουργίας της Ιστοκινέτας:

Οι ιστοί ξεπλένονται με νερό ώστε να απομακρυνθεί το αφαλατωτικό διάλυμα και τοποθετούνται στην ιστοκινέτα, στο ειδικό καλάθι, όπου γίνεται εμβάπτιση σε:

- Αιθανόλη 50% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 70% για 15 λεπτά
- Αιθανόλη 70% για 15 λεπτά
- Αιθανόλη 80% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 96% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 96% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά
- Ξυλόλη για 30 λεπτά

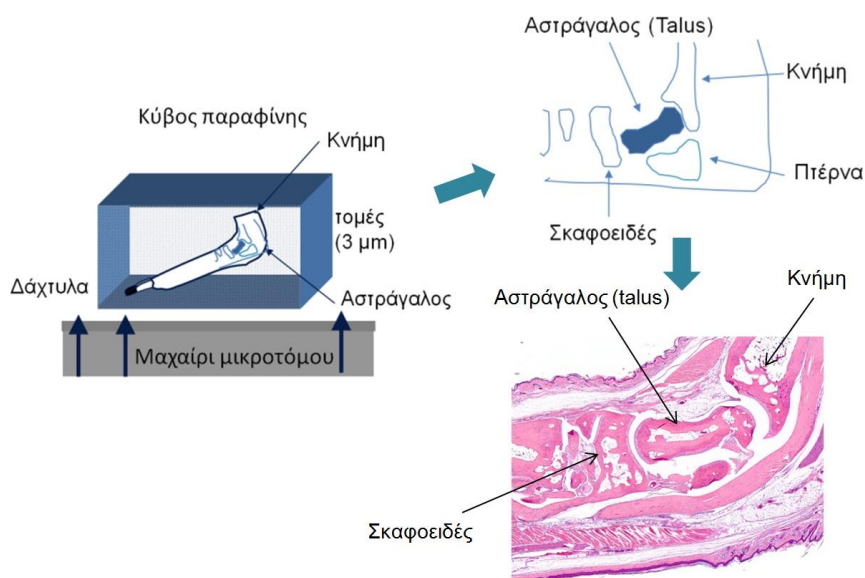
- Ξυλόλη για 15 λεπτά
- Υγρή παραφίνη για 45 λεπτά
- Υγρή παραφίνη για 1 ώρα και 30 λεπτά

Υλικά: Αιθανόλη απόλυτη (VWR Chemicals), Ξυλόλη (VWR Chemicals), Παραφίνη (Scharlau).

Συσκευές: Ιστοκινέτα TP 1010 (Leica).

2.7.4 Εμπέδωση-Έγκλιση σε κύβους παραφίνης και παραγωγή τομών των ιστών

- Πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα, προστίθεται υγρή παραφίνη σε μεταλλικό καλούπι και τοποθετείται ο ιστός (58 °C).
- Μεταφορά σε ψυχρή πλάκα (-12 °C) και στερεοποίηση του ιστού με τον επιθυμητό προσανατολισμό.
- Τοποθέτηση του καπακιού και γέμισμα με υγρή παραφίνη.
- Τοποθέτηση σε ψυχρή πλάκα (-12 °C) μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη.
- Κόψιμο τομών πάχους 3 μm σε μικροτόμο παραφίνης όπως φαίνεται στην Εικόνα 13.
- Τοποθέτηση των τομών πάνω σε ζεστό νερό 42 °C.
- Προσκόλληση των τομών σε αντικειμενοφόρες πλάκες.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας παραλαβής τομών παραφίνης από αστράγαλο ποντικού. Το πόδι του ποντικού τοποθετείται έτσι ώστε να παραληφθούν τομές από την εσωτερική του πλευρά. Η γωνία κοπής ρυθμίζεται ώστε να είναι ευδιάκριτη η περιοχή ενδιαφέροντος που περιλαμβάνει τα οστά κνήμης-αστραγάλου (talus)-σκαφοειδούς όπως φαίνεται στο σχήμα.

Υλικά: Παραφίνη (Scharlau), Αντικειμενοφόροι πλάκες (Delta Lab).

Συσκευές: Συσκευή σκλήνωσης EC 350-2 (Myr), Μικροτόμος RM2135 (Leica), Συσκευή ψύξης EG1130 (Leica), Συσκευή θέρμανσης νερού TFB35 (Meditel).

2.7.5 Χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης

Οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι, γεγονός που καθιστά δύσκολη την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι χρώσης των ιστολογικών παρασκευασμάτων, που επιτρέπουν την παρατήρηση των διάφορων συστατικών του ιστού και τη διάκριση μεταξύ τους. Οι περισσότερες χρωστικές δρουν σε υδατικό περιβάλλον, γι' αυτό είναι απαραίτητη η ενυδάτωση της τομής, αφού πρώτα γίνει αποπαραφίνωση. Αυτό επιτυγχάνεται με εμβάπτιση της τομής σε ξυλόλη ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη και στη συνέχεια σε φθίνουσες συγκεντρώσεις διαλυμάτων αιθανόλης και τελικά σε νερό. Ακολουθεί η διαδικασία ιστοχημικής χρώσης. Το νερό απομακρύνεται από την τομή με εμβάπτιση σε ανιούσα σειρά διαλυμάτων αιθανόλης και κάλυψη της τομής με καλυπτρίδα με την χρήση κόλλας DPX. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρώση στην ιστοπαθολογική ανάλυση είναι αιματοξυλίνη-ηωσίνης. Η αιματοξυλίνη είναι βασική χρωστική και βάφει μπλε τον πυρήνα και περιοχές του κυτταροπλάσματος πλούσιες σε RNA, ενώ η ηωσίνη είναι όξινη χρωστική και βάφει ροζ το κυτταρόπλασμα.

Πρωτόκολλο χρώσης με αιματοξυλίνη- ηωσίνη:

- Οι τομές επωάζονται σε κλίβανο στους 58 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.
- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 2 λεπτά επί 3 φορές.
- Εμβάπτιση σε κατιούσα σειρά αλκοολών 100%, 96%, 70%, 50% για 2 λεπτά στο καθένα.
- Εμβάπτιση σε νερό για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη για 2 λεπτά.
- Έκπλυση με νερό για 1 λεπτό επί 3 φορές.
- Εμβάπτιση σε διάλυμα bluing για 1 λεπτό.
- Εμβάπτιση σε αιθανόλη 96% για 1 λεπτό.
- Εμβάπτιση σε ηωσίνη για 2 λεπτά.
- Έκπλυση σε αιθανόλη 96% για 2 λεπτά επί 2 φορές.
- Έκπλυση σε αιθανόλη 100% για 2 λεπτά επί 2 φορές.

- Εμβάπτιση σε ξυλόλη μέχρι να τοποθετηθεί η καλυπτρίδα.
- Προσθήκη μιας σταγόνας DPX στην καλυπτρίδα και κάλυψη των τομών.

2.7.6 Χρώση με κυανό της τολουιδίνης (Toluidine Blue)

Το κυανό της τολουιδίνης είναι μια βασική χρωστική που χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, για ιστοχημική χρώση του αρθρικού χόνδρου καθώς βάφει τις πρωτεογλυκάνες και τις γλυκοζαμινογλυκάνες του χόνδρου, δίνοντας τη δυνατότητα εκτίμησης της περιεκτικότητας του χόνδρου σε πρωτεογλυκάνες, ανάλογα με την ένταση. Η μήτρα του χόνδρου και οι πυρήνες βάφονται μωβ, ενώ το κυτταρόπλασμα και άλλα στοιχεία του ιστού βάφονται με διάφορες αποχρώσεις του γαλάζιου (Schmitz *et al.*, 2010).

Πρωτόκολλο ιστοχημικής χρώσης με κυανό της τολουιδίνης:

- Οι τομές επωάζονται σε κλίβανο στους 58 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.
- Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 2 λεπτά επί 3 φορές.
- Εμβάπτιση σε κατιούσα σειρά αλκοολών 100%, 96%, 70%, 50% για 2 λεπτά στο καθένα.
- Εμβάπτιση σε νερό για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα κυανού της τολουιδίνης 0,1% για 10 λεπτά.
- Σύντομη έκπλυση με νερό.
- Σύντομη έκπλυση με αιθανόλη 96%.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη μέχρι να τοποθετηθεί η καλυπτρίδα.
- Προσθήκη μιας σταγόνας DPX στην καλυπτρίδα και κάλυψη των τομών.

Υλικά χρώσεων: Ξυλόλη (VWR Chemicals), Αιθανόλη απόλυτη (VWR Chemicals), Shandon Gill 2 Hematoxylin (Thermo Scientific), Shandon Bluing Reagent (Thermo Scientific), Shandon Eosin Y (Thermo Scientific), Toluidine Blue (Sigma), Καλυπτρίδες (Knittel Glaser), DPX Mountant (VWR).

2.7.7 Αξιολόγηση των τομών των ιστών

Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση (ιστοπαθολογικό σκόρ) γίνεται χρησιμοποιώντας μια ημιποσοτική κλίμακα από 0 έως 3 για τις εξής παραμέτρους:

Υπερπλασία αρθρικού υμένα

0: Φυσιολογικός αρθρικός υμένας

1:Υπερπλασία του αρθρικού υμένα (20 στρώσεις κυττάρων), συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στις ενδοαρθρικές κοιλότητες

2: Σχηματισμός αρθριτικού πάννου και ινώδους ιστού

3: Εκτεταμένος σχηματισμός αρθριτικού πάννου και ινώδους ιστού

Καταστροφή χόνδρου

0: φυσιολογικός/άθικτος

1: μέτρια (<50%)

2. υψηλή (50-80%)

3: σοβαρή (80-100%)

Διάβρωση οστού

0: φυσιολογικό

1: περιορισμένος αριθμός τοπικών υποχόνδριων διαβρώσεων

2: εκτεταμένη/ πολλαπλή υποχόνδρια διάβρωση

3: εκτεταμένες διαβρώσεις σε όλα τα οστά της άρθρωσης του αστραγάλου

Κυτταρική διήθηση

Αξιολογήθηκαν τέσσερα χαρακτηριστικά:

A. Πολλαπλασιασμός αιμοφόρων αγγείων

B. Περιαγγειακή διήθηση από λεμφοκύτταρα

Γ. Τοπικά συσσωματώματα λεμφοκυττάρων

Δ. Διάχυτη διήθηση από λεμφοκύτταρα

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με παρατήρηση 2-3 τουλάχιστον τομών και των δύο αστραγάλων για κάθε ποντίκι, με τυφλό τρόπο, από τρεις ανεξάρτητους παρατηρητές σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με χρήση του λογισμικού cell[^]A.

Μικροσκόπιο: Olympus BX50, Κάμερα: Olympus DP71.

Το ιστοπαθολογικό σκορ είναι η μέση τιμή καθεμιάς από τις παραμέτρους της κυτταρικής διήθησης, της υπερπλασίας του αρθρικού υμένα,, της καταστροφής του χόνδρου και της διάβρωσης του οστού

2.8 Ανοσολογικός έλεγχος

Κατά τη θυσία των ζώων συλλέχθηκαν οι αρθρώσεις των άνω άκρων και λεμφαδένες, εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για τον έλεγχο του ανοσολογικού προφίλ των ποντικών που έλαβαν τα διάφορα θεραπευτικά σχήματα. Από τους ιστούς αυτούς θα γίνει απομόνωση πρωτεϊνών και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανασοαποτύπωσης κατά western και ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA. Επιπλέον, οι αρθρώσεις των κάτω άκρων θα χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας.

Υλικά που θα χρησιμοποιηθούν:

Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-COX-2 (Cell Signalling Technology κωδ. 12282)

Πολυκλωνικό αντίσωμα anti-iNOS (Millipore Merck κωδ. ABN16)

Πολυκλωνικό αντίσωμα anti-MMP3 (Sigma κωδ. SAB4501892)

IL-6 ποντικού Elisa Kit (Diacclone)

IL-10 ποντικού Elisa Kit (Diacclone)

IFN- γ ποντικού Elisa Kit (Diacclone)

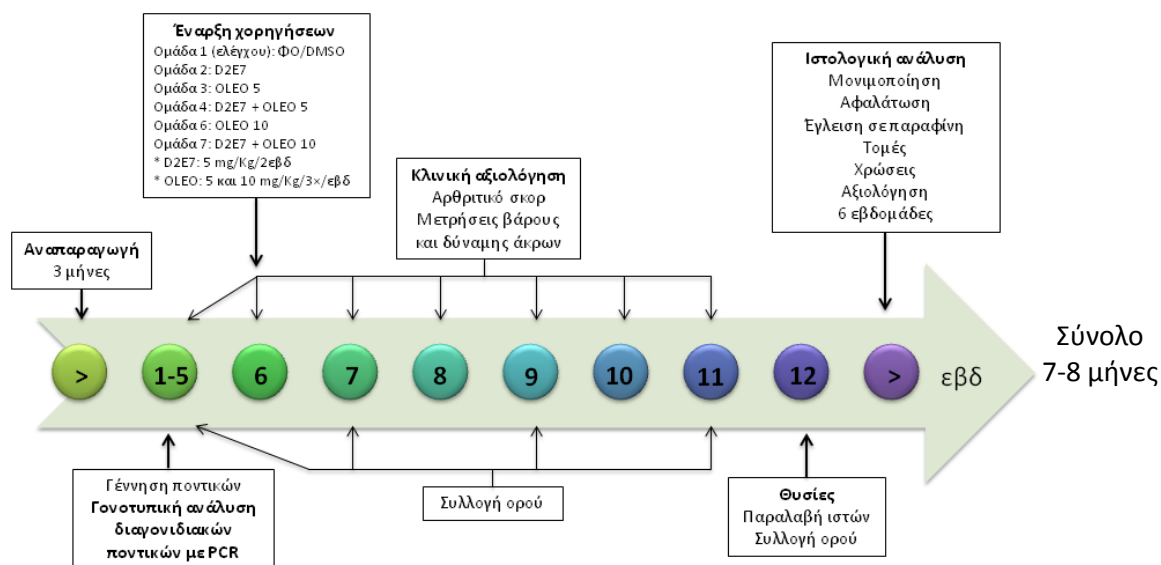
IL-1 β ποντικού Elisa Kit (R&D Systems)

PGE2 Elisa Kit (Cayman Chemical)

2.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 6. Χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά τεστ Mann-Whitney U για την ανάλυση των αρθριτικών και ιστοπαθολογικών σκορ και t-test για την ανάλυση δεδομένων από τις μετρήσεις του βάρους και της δύναμης άκρων. Τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με την εξής διαβάθμιση: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι αντιπροσωπευτικά ενός πειραματισμού.

2.10 Χρονοδιάγραμμα της μελέτης



Εικόνα 14: Χρονοδιάγραμμα της μελέτης όπου απεικονίζονται τα κύρια στάδια και μέθοδοι.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να εξετασθεί εάν η θεραπεία της πολυαρθρίτιδας με αντι-TNF μπορεί να βελτιστοποιηθεί σε συνδυασμό με τη χορήγηση ολεοκανθάλης *in vivo*, επιλέχθηκε το καθιερωμένο διαγονιδιακό ζωικό πρότυπο της TNF μεσολαβούμενης πολυαρθρίτιδας.

Η επίδραση της ολεοκανθάλης στην τροποποίηση της εξέλιξης της νόσου ελέγχθηκε χορηγούμενη α) σε δόσεις 5 και 10 mg/Kg σε συνδυασμό με αντι-TNF παράγοντα (D2E7) σε δοσολογικό σχήμα τέτοιο ώστε η αποτελεσματικότητά του να μην είναι η βέλτιστη, για να αναδειχτεί η πιθανή συνεργατική θεραπευτική δράση της και β) σε δόσεις 5 και 10 mg/Kg, χωρίς αντι-TNF. Οι παράγοντες χορηγήθηκαν στους διαγονιδιακούς ποντικούς ενδοπεριτοναϊκά για χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων, ξεκινώντας στην ηλικία των 6 εβδομάδων. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται θεραπευτική εφόσον οι ποντικοί αυτοί εμφανίζουν χρόνια πολυαρθρίτιδα η οποία αρχίζει να εκδηλώνεται κλινικά σε ηλικία 6-8 εβδομάδων και ιστολογικά από την ηλικία των 4-5 εβδομάδων.

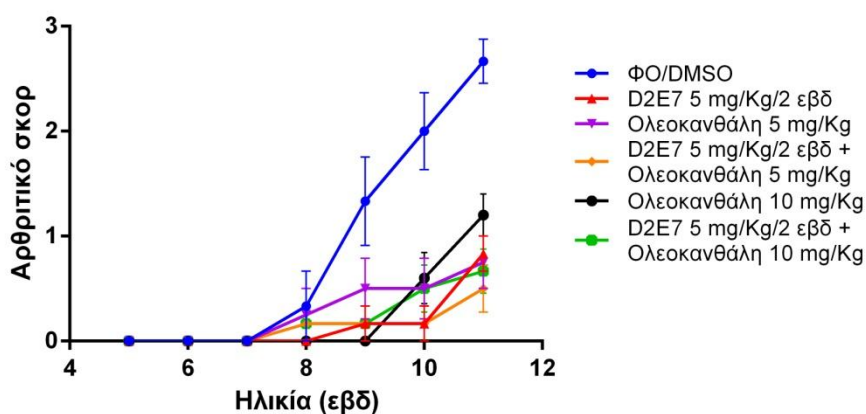
Η αξιολόγηση της επίδρασης της ολεοκανθάλης σχεδιάστηκε να πραγματοποιηθεί σε κλινικό, ιστοπαθολογικό και ανοσολογικό επίπεδο. Στην παρούσα μελέτη αναφέρονται αποτελέσματα από το κλινικό και ιστοπαθολογικό μέρος της ανάλυσης, ενώ η εργασία θα συνεχιστεί πέρα από το πλαίσιο αυτής της διπλωματικής και με την ανοσολογική ανάλυση με σκοπό τον έλεγχο αλλαγών έκφρασης δεικτών της φλεγμονής όπως COX-2 και iNOS στην άρθρωση με ανοσοϊστοχημεία και της παραγωγής προσταγλανδίνης E2 και διάφορων κυτταροκινών όπως IL-6, IL-1 β , IFN- γ και IL-10 στον ορό ή/και στην άρθρωση με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

3.1 Κλινική αξιολόγηση

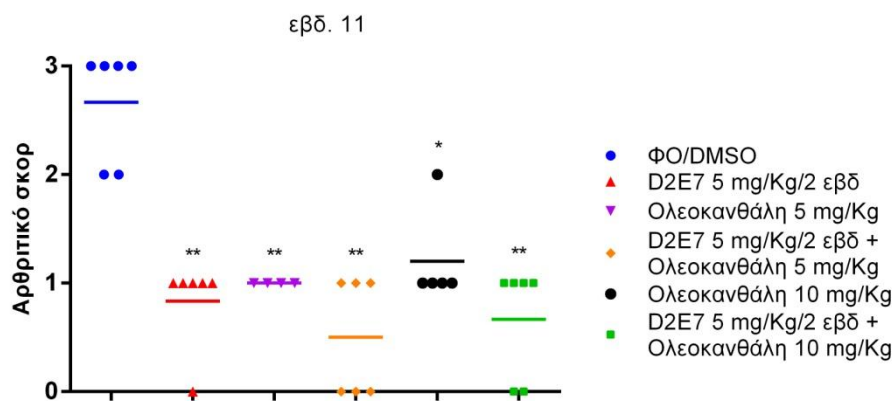
Για την κλινική αξιολόγηση της αρθρίτιδας στους Tg197 ποντικούς που έλαβαν είτε ολεοκανθάλη και D2E7, είτε ολεοκανθάλη, είτε φυσιολογικό ορό / DMSO (vehicle), πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της δύναμης των τεσσάρων άκρων, του σωματικού βάρους και καταγράφηκαν των αρθριτικά σκορ, μια φορά την εβδομάδα από την 5^η έως την 11^η εβδομάδα ηλικίας.

Το αρθριτικό σκορ είναι μια καθιερωμένη ημιποσοτική κλίμακα από 0 μέχρι 3 που χρησιμοποιείται για την κλινική/ μακροσκοπική αξιολόγηση της αρθρίτιδας

στο πρότυπο Tg197, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5. Όλες οι ομάδες που έλαβαν θεραπεία εμφάνισαν μειωμένα αρθριτικά σκορ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 15). Συγκεκριμένα, στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του κλινικού αρθριτικού σκορ, ενώ σε όλες τις ομάδες που χορηγήθηκε D2E7, ολεοκανθάλη και ο συνδυασμός τους, σε όλες τις δοσολογίες το αρθριτικό σκορ ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στην 11^η εβδομάδα ($p < 0,05$) (Εικόνα 16). Οι ομάδες που έλαβαν συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 και 10 mg/Kg, εμφάνισαν τα μικρότερα αρθριτικά σκορ στην 11^η εβδομάδα τα οποία ήταν 0,5 και 0,66 αντίστοιχα, ωστόσο δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε κάθε παράγοντας ξεχωριστά ή συνδυασμός αυτών.

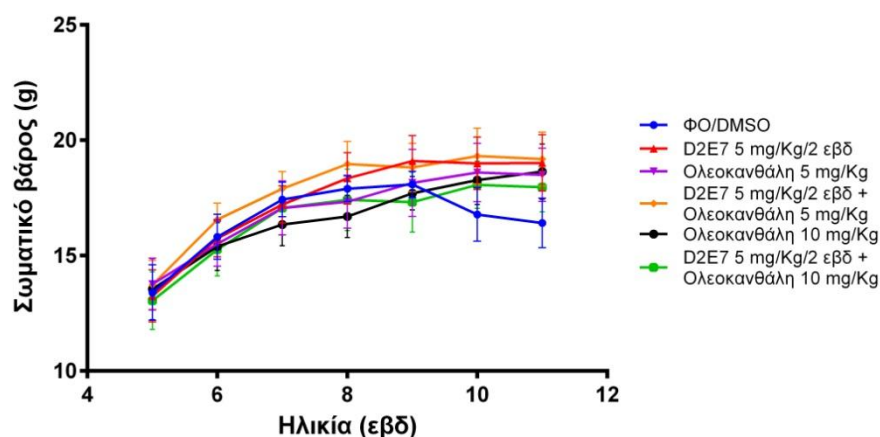


Εικόνα 15: Το κλινικό αρθριτικό σκορ των Tg197 ποντικών κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO ($n=6$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ ($n=6$), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=4$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=6$), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=5$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=6$).



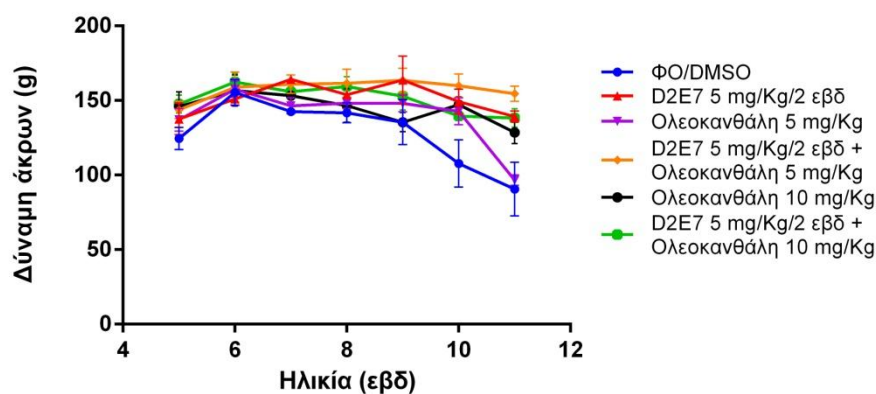
Εικόνα 16: Το κλινικό αρθριτικό σκορ των Tg197 ποντικών στην 11^η εβδομάδα. Οι γραμμές συμβολίζουν τη μέση τιμή κάθε ομάδας και κάθε σύμβολο αντιστοιχεί σε ένα ποντικό. ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO (n=6), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ (n=6), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6). * p < 0,05, ** p < 0,01 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία για μη παραμετρικά δεδομένα Mann-Whitney U.

Το σωματικό βάρος των ποντικών που έλαβαν οποιοδήποτε σχήμα θεραπείας δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε απώλεια σωματικού βάρους σε ποντικούς της ομάδας ελέγχου μετά από την 9^η εβδομάδα, σε αντίθεση με τους ποντικούς των ομάδων που έλαβαν θεραπεία, το σωματικό βάρος των οποίων δεν μειώθηκε κατά την εξέλιξη της νόσου (Εικόνα 17).

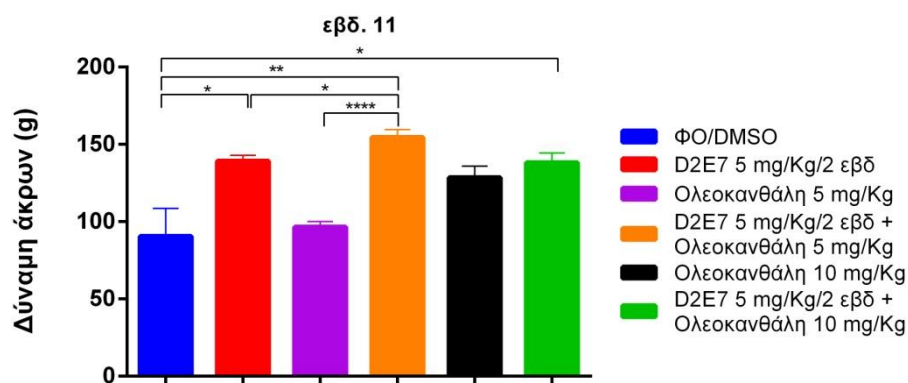


Εικόνα 17: Καμπύλες σωματικού βάρους Tg197 ποντικών. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO (n=6), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ (n=6), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6).

Κατά τον έλεγχο της δύναμης των ποντικών, παρατηρήθηκε ότι οι ποντικοί στους οποίους χορηγήθηκε D2E7 και συνδυασμός D2E7 με ολεοκανθάλη σε όλες τις δοσολογίες εμφάνισαν σταθερή δύναμη των άκρων κατά τη διάρκεια της μελέτης (Εικόνα 18), η οποία ήταν σημαντικά αυξημένη ($p < 0,05$) σε σχέση με τους ποντικούς της ομάδας ελέγχου στην ηλικία των 11 εβδομάδων (Εικόνα 19). Επιπροσθέτως, η δύναμη των άκρων στην ηλικία των 11 εβδομάδων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ποντικούς που έλαβαν συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 mg/Kg, συγκριτικά με τους ποντικούς που έλαβαν μόνο D2E7 ($p < 0,05$) και τους ποντικούς που έλαβαν μόνο ολεοκανθάλη 5 mg/Kg ($p < 0,0001$). Η μονοθεραπεία με ολεοκανθάλη δεν συνέβαλλε σημαντικά στη διατήρηση της δύναμης άκρων των Tg197 ποντικών.



Εικόνα 18: Δύναμη άκρων των Tg197 ποντικών κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO ($n=4$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ ($n=6$), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=4$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=6$), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=5$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα ($n=6$).



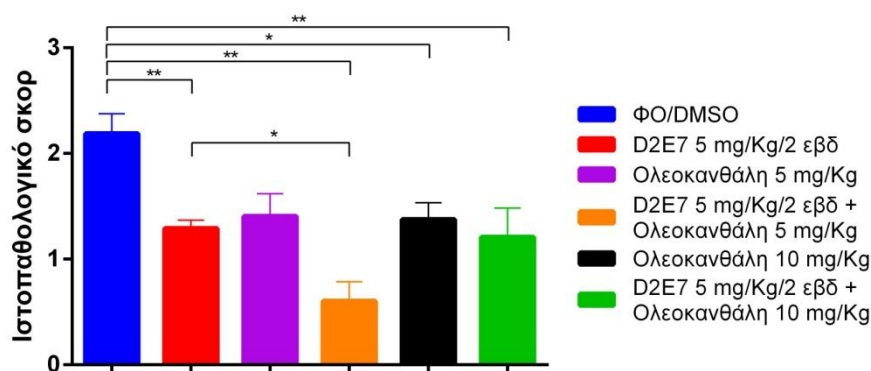
Εικόνα 19: Δύναμη άκρων των Tg197 ποντικών στην 11^η εβδομάδα. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO ($n=4$), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ

(n=6), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία t-test για κάθε ζεύγος ομάδων.

3.2 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ιστολογική βλάβη, πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική ανάλυση σε τομές αστραγάλων των δύο κάτω άκρων των ποντικών μετά από θυσία, λήψη ιστών, μονιμοποίηση, έγκλιση σε παραφίνη και χρώση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7. Αξιολογήθηκαν τέσσερις παράμετροι: η υπερπλασία του αρθρικού υμένα, η διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα, η καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και η διάβρωση του οστού. Κάθε παράμετρος αξιολογήθηκε με βάση μια ημιποσοτική κλίμακα από 0 έως 3 (ιστοπαθολογικό σκορ) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.7. Για τη συνολική εκτίμηση της ιστολογικής βλάβης, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επιμέρους ιστοπαθολογικών σκορ των τεσσάρων παραμέτρων και στους δύο αστραγάλους των ποντικών για κάθε ομάδα (μέσο ιστοπαθολογικό σκορ).

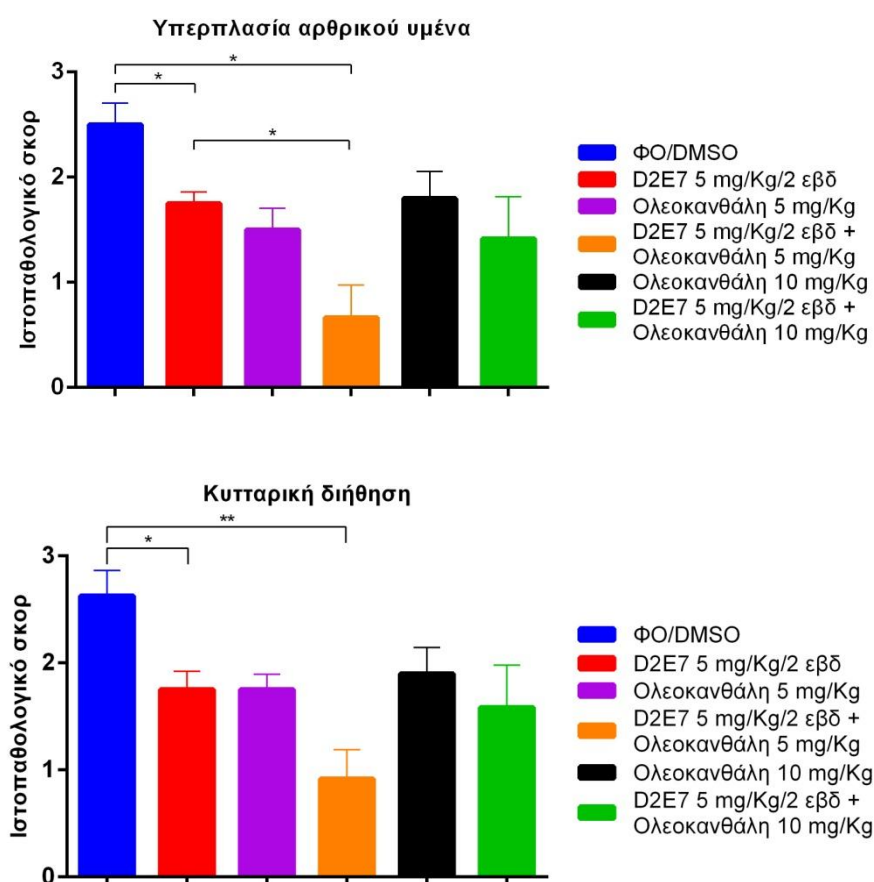
Το μέσο ιστοπαθολογικό σκορ ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στις ομάδες που έλαβαν μονοθεραπεία D2E7 ($p < 0,01$), συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 και 10 mg/Kg ($p < 0,01$) και μονοθεραπεία ολεοκανθάλης 10 mg/Kg ($p < 0,05$), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, στην ομάδα που έλαβε συνδυασμό D2E7 με ολεοκανθάλη 5 mg/Kg, το μέσο ιστοπαθολογικό σκορ ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μονοθεραπεία D2E7 ($p < 0,05$) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ιστοπαθολογική ανάλυση σε τομές των αρθρώσεων των αστραγάλων των Tg197 ποντικών στην ηλικία των 12 εβδομάδων. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο (n=6), Ολεοκανθάλη 5

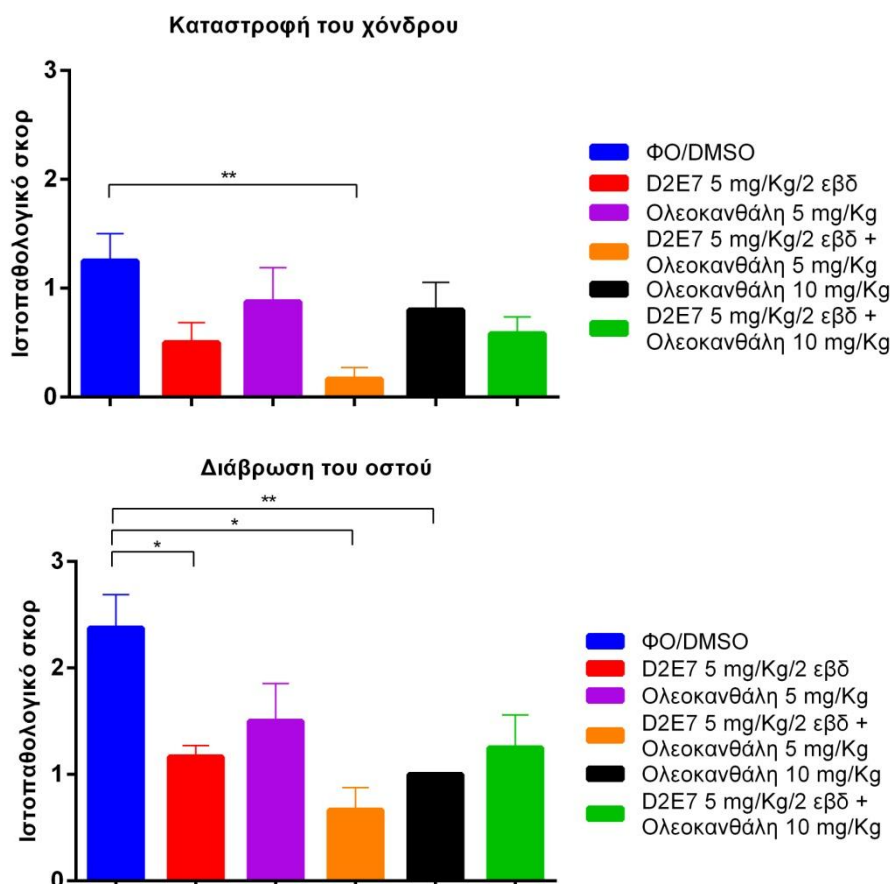
mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία για μη παραμετρικά δεδομένα Mann-Whitney U για κάθε ζεύγος ομάδων.

Αναλυτικά, όπως προκύπτει από τα ιστοπαθολογικά σκορ για κάθε παράμετρο: α) η συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 mg/Kg, οδήγησε σε σημαντική μείωση της κυτταρικής διήθησης, της υπερπλασίας του αρθρικού υμένα, της καταστροφής του χόνδρου και του οστού, β) η μονοθεραπεία D2E7 οδήγησε σε σημαντική μείωση της κυτταρικής διήθησης, της υπερπλασίας του αρθρικού υμένα, και της διάβρωσης του οστού και γ) η μονοθεραπεία ολεοκανθάλης 10 mg/Kg οδήγησε σε σημαντική μείωση της διάβρωσης του οστού, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$) (Εικόνα 21 και 22). Επιπλέον, η υπερπλασία του αρθρικού υμένα ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα που έλαβε τη συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 mg/Kg σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μονοθεραπεία D2E7 ($p < 0,05$) (Εικόνα 3.7).



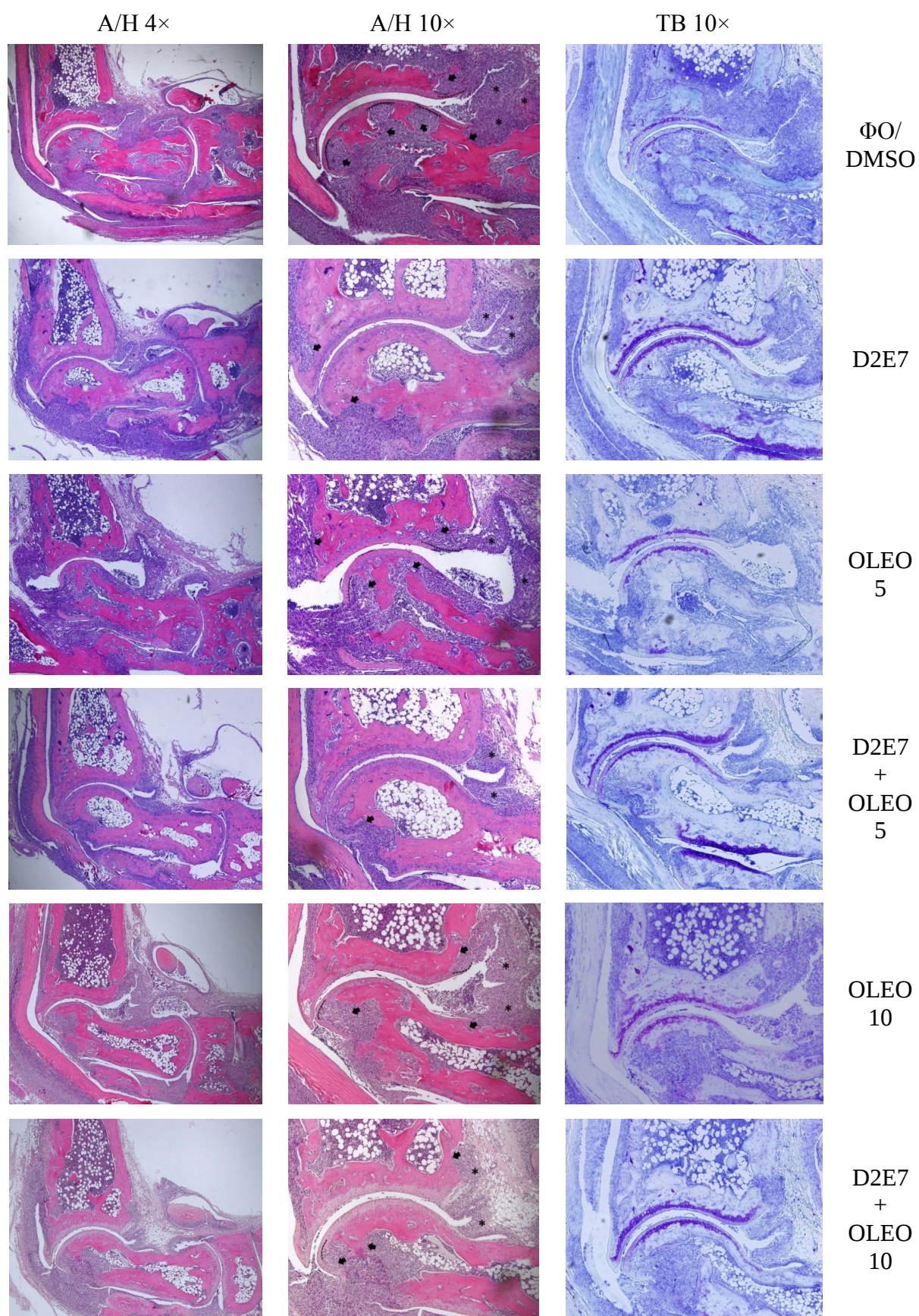
Εικόνα 21: Αναλυτική ιστοπαθολογική αξιολόγηση υπερπλασίας του αρθρικού υμένα και κυτταρικής διήθησης σε τομές των αρθρώσεων των αστραγάλων των Tg197 ποντικών στην

ηλικία των 12 εβδομάδων. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). *ΦΟ*: Φυσιολογικός Ορός/DMSO (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ (n=6), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία για μη παραμετρικά δεδομένα Mann-Whitney U για κάθε ζεύγος ομάδων.



Εικόνα 22: Αναλυτική ιστοπαθολογική αξιολόγηση καταστροφής του χόνδρου και διάβρωσης του οστού σε τομές των αρθρώσεων των αστραγάλων των Tg197 ποντικών στην ηλικία των 12 εβδομάδων. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (SEM). *ΦΟ*: Φυσιολογικός Ορός/DMSO (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ (n=6), Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=4), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6), Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=5), D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία για μη παραμετρικά δεδομένα Mann-Whitney U για κάθε ζεύγος ομάδων.

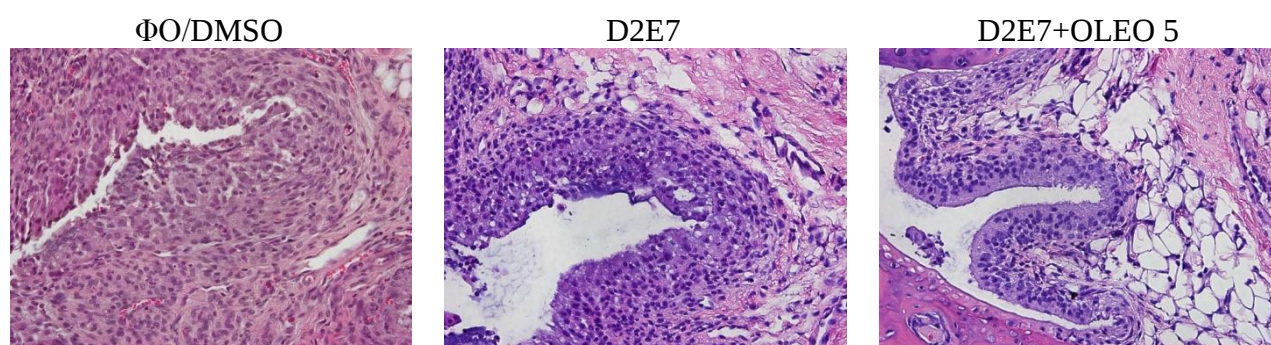
Στην εικόνα 23 φαίνεται η επίδραση του D2E7, της ολεοκανθάλης και του συνδυασμού τους στη δομή της άρθρωσης σε αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες τομών των αρθρώσεων των αστραγάλων από τους ποντικούς που αξιολογήθηκαν με ιστοπαθολογικά σκορ περίπου ίσα με το μέσο όρο της ομάδας τους.



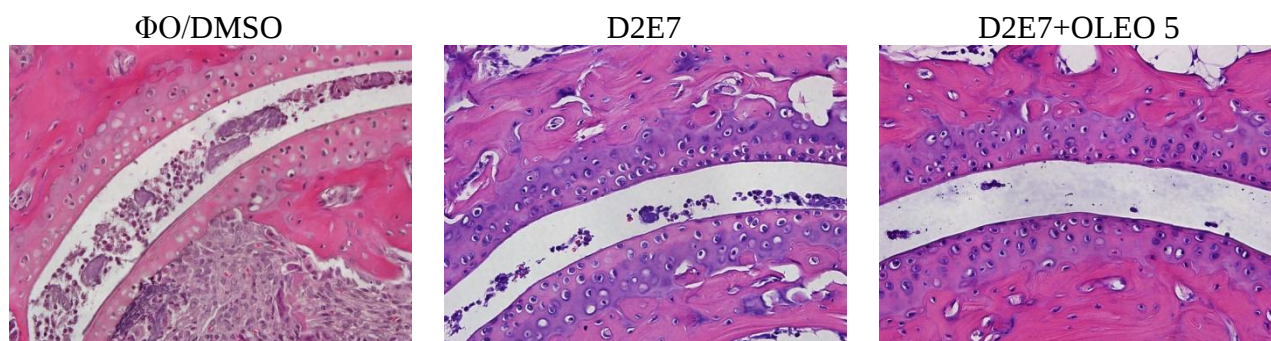
Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες ιστολογίας από τομές των αρθρώσεων των αστραγάλων ποντικών με μέσο ιστοπαθολογικό σκορ περίπου ίσο με το μέσο όρο της ομάδας

τους. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη φλεγμονή και υπερπλασία του αρθρικού υμένα, τα βέλη υποδεικνύουν τη διάβρωση του οστού και οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την καταστροφή του χόνδρου. Α/Η: Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη, ΤΒ: Toluidine Blue, Μεγεθύνσεις: φακοί 4× και 10×. ΦΟ: Φυσιολογικός Ορός/DMSO, D2E7: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ, OLEO 5: Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα, D2E7+OLEO 5: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα, OLEO 10: Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα, D2E7+OLEO 10: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 10 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα.

Η συνδυαστική θεραπεία D2E7 με ολεοκανθάλη 5 mg/Kg οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση όλων των παραμέτρων που εξετάστηκαν συγκριτικά με τους ποντικούς που δεν έλαβαν θεραπεία. Στις εικόνες 24, 25 και 26 φαίνεται η επίδραση της συνδυαστικής αυτής θεραπείας στην υπερπλασία του αρθρικού υμένα, την καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση του οστού, αντίστοιχα, σε τομές αστραγάλων, σε σχέση με τομές από αστραγάλους ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία και ποντικών που έλαβαν μονοθεραπεία με D2E7.

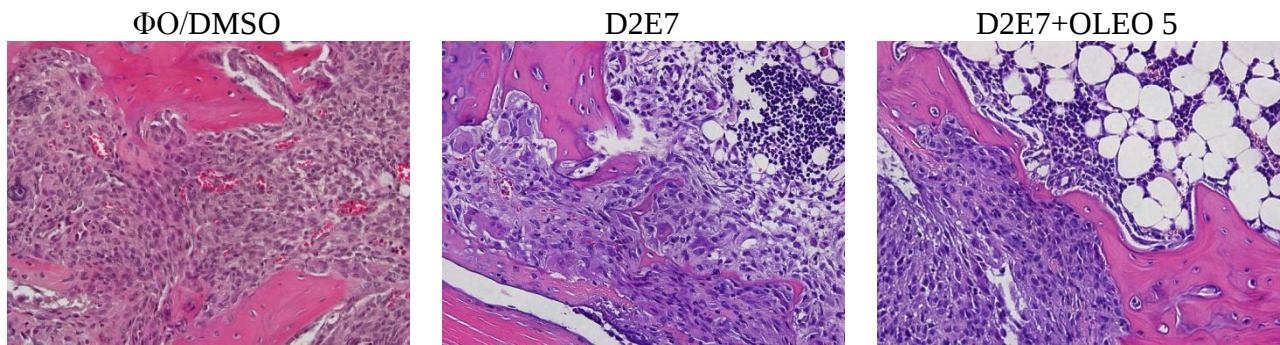


Εικόνα 24: Τομές αρθρώσεων των αστραγάλων ποντικών όπου φαίνεται επίδραση των θεραπευτικών σχημάτων στην υπερπλασία του αρθρικού υμένα. Φυσιολογικός Ορός/DMSO, D2E7: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ, D2E7+OLEO 5: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδ + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα. Χρώση Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη. Μεγέθυνση 40×.



Εικόνα 25: Τομές αρθρώσεων των αστραγάλων ποντικών όπου φαίνεται επίδραση των θεραπευτικών σχημάτων στην καταστροφή του χόνδρου. Φυσιολογικός Ορός/DMSO, D2E7: D2E7

5 mg/Kg/2 εβδο, D2E7+OLEO 5: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα.
Χρώση Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη. Μεγέθυνση 40×.



Εικόνα 26: Τομές αρθρώσεων των αστραγάλων ποντικών όπου φαίνεται επίδραση των θεραπευτικών σχημάτων στη διάβρωση του οστού. Φυσιολογικός Ορός/DMSO, D2E7: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο, D2E7+OLEO 5: D2E7 5 mg/Kg/2 εβδο + Ολεοκανθάλη 5 mg/Kg/3 φορές την εβδομάδα.
Χρώση Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη. Μεγέθυνση 40×.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των αρθρώσεων και σοβαρή αναπηρία, με σοβαρές συστηματικές επιπλοκές στην υγεία και επιπτώσεις στην παγκόσμια οικονομία λόγω του μεγάλου ποσοστού πασχόντων (~ 1%). Παρόλο που υπάρχει ποικιλία διαθέσιμων φαρμάκων, η θεραπεία της ΡΑ δεν είναι πλήρως αποτελεσματική στους περισσότερους ασθενείς και οι ανεπιθύμητες ενέργειες συχνά περιορίζουν την μακροχρόνια χρήση τους. Η χρήση των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων αποσκοπεί κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, ενώ δεν περιορίζουν τη βλάβη στις αρθρώσεις και, ως εκ τούτου, δεν είναι νοσοτροποποιητικά. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν συμπτωματική καθώς και νοσοτροποποιητική δράση, αλλά η μακροχρόνια χρήση τους σχετίζεται με σοβαρές παρενέργειες (Smolen *et al.*, 2016). Η θεραπεία με συμβατικά νοσοτροποποιητικά αντιρευματικά φάρμακα, όπως η μεθοτρεξάτη, ανακουφίζει από τα συμπτώματα και επιβραδύνει τη βλάβη των αρθρώσεων, αλλά δεν είναι πάντα αποτελεσματική. Οι βιολογικοί παράγοντες όπως οι αναστολείς του TNF έχουν δείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα στην καταστολή των συμπτωμάτων της νόσου και της δομικής βλάβης των αρθρώσεων, ωστόσο έχουν συσχετιστεί με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως λοιμώξεις και κακοήθειες, λόγω της ανοσοκατασταλτικής τους δράσης (Hernández *et al.*, 2016). Περιορισμοί στην αποτελεσματικότητα των φαρμάκων που προκύπτουν από την αντιγονικότητά τους, την εν μέρει δραστηριότητά τους, τη δημιουργία αντισωμάτων έναντι αυτών, τη στόχευση, τον τρόπο και τη συχνότητα χορήγησης (dosing), αποτελούν βασικά ζητήματα της βελτιστοποίησης (optimization) και της επανατοποθέτησης (repositioning/ repurposing) των ήδη εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων. Σήμερα, αν και οι συνδυαστικές θεραπείες βιολογικών παραγόντων με συμβατικά νοσοτροποποιητικά αντιρευματικά φάρμακα δείχνουν να είναι αποτελεσματικότερες από τις μονοθεραπείες, η περαιτέρω βελτιστοποίηση των θεραπευτικών σχημάτων είναι αναγκαία.

Τα όλο και αυξανόμενα στοιχεία που υποστηρίζουν την ευεργετική επίδραση της σωστής διατροφής στην υγεία καθώς και τη συσχέτιση συγκεκριμένων διατροφών, όπως η Μεσογειακή, με τη μειωμένη εμφάνιση κάποιων ασθενειών, έχουν κατευθύνει το ενδιαφέρον των ερευνητών στη μελέτη συγκεκριμένων τροφών και συστατικών τους και της πιθανής θεραπευτικής χρήσης τους. Στην κατεύθυνση

αυτή, η μελέτη του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου και των συστατικών του έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Aparicio-Soto *et al.*, 2016, Cicerale *et al.*, 2012). Η ολεοκανθάλη, συστατικό του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, έχει επισημανθεί πρόσφατα ως μια ένωση θεραπευτικού ενδιαφέροντος στην αναζήτηση κατάλληλων φυσικών μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών ενώσεων για την αντιμετώπιση ποικιλίας ασθενειών, συμπεριλαμβανόμενης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Μέχρι στιγμής, η δράση της ολεοκανθάλης έχει μελετηθεί *in vivo* σε πρότυπα καρκίνου (Ayoub *et al.*, 2017) και νόσου Alzheimer's (Abuznait *et al.*, 2013), ενώ τα στοιχεία για τη δράση της στην αρθρίτιδα περιορίζονται σε *in vitro* συστήματα μελέτης (Iacono *et al.*, 2010, Scotece *et al.*, 2012). Συνολικά, τα μέχρι τώρα στοιχεία κάνουν λόγο για αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και νευροπροστατευτική δράση της ολεοκανθάλης (Pang and Chin, 2018).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πιλοτική μελέτη της συνδυαστικής δράσης αντι-TNF παράγοντα με ολεοκανθάλη, στη χρόνια πολυαρθρίτιδα χρησιμοποιώντας το πρότυπο της μεσολαβούμενης από τον TNF αρθρίτιδας, το διαγονιδιακό ποντικό Tg197 (Keffer *et al.*, 1991). Ο υπερπλαστικός αρθρικός υμένας και η συσσώρευση διηθημάτων από φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα τόσο της ΡΑ όσο και της παθολογίας των Tg197 ποντικών, και θεωρούνται προαπαιτούμενα για την καταστροφή του χόνδρου και τη διάβρωση του οστού. Το πρότυπο ποντικού Tg197 αποτελεί αξιόπιστο εργαλείο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας πιθανών αντι-ρευματικών φαρμάκων, καθώς επίσης για τη διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια της χρόνιας φλεγμονώδους αρθρίτιδας.

Ο αντι-TNF παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNF-α που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (εργαστηριακή ονομασία: D2E7, βιολογική ονομασία: Adalimumab, εμπορική ονομασία: Humira). Η αποτελεσματικότητα του αντισώματος στην παθολογία των Tg197 ποντικών ποικίλει ανάλογα με τη δοσολογία που χορηγείται και έχει διαφορετικές επιδράσεις στη φλεγμονή, την καταστροφή του χόνδρου και του οστού. Χορηγώντας υψηλή δόση adalimumab αναστέλλεται τόσο η φλεγμονή όσο και η δομική βλάβη της άρθρωσης. Ωστόσο, με χαμηλή δόση η αποτελεσματικότητα του adalimumab περιορίζεται μόνο στην αναστολή της καταστροφής του οστού, χωρίς σημαντική επίδραση στη φλεγμονή

(κλινικά και ιστολογικά), την απώλεια του αρθρικού χόνδρου και τα επίπεδα έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων (Binder *et al.*, 2013). Η θεραπευτική δράση της ολεοκανθάλης ελέγχθηκε με τη χορήγησή της σε δύο δόσεις, 5 mg/Kg και 10 mg/Kg τρεις φορές την εβδομάδα, χωρίς ή με τον D2E7. Η δόση του D2E7 ήταν η βέλτιστη που έχει χρησιμοποιηθεί σε αυτό το ζωικό πρότυπο, αλλά χορηγήθηκε σε αραιότερα χρονικά διαστήματα (κάθε δύο εβδομάδες). Η επιλογή αυτή έγινε προκειμένου να αναδειχθεί α) η θετική επίδραση της ολεοκανθάλης στην έκβαση της νόσου και β) η δυνατότητα χορήγησης του D2E7 σε αραιότερα χρονικά διαστήματα όταν συνδυάζεται με λήψη ολεοκανθάλης, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού καθιστά τη θεραπεία περισσότερο φιλική στον ασθενή.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η συνδυαστική θεραπεία ολεοκανθάλης 5 mg/Kg με D2E7 μειώνει την παθολογία των αρθρώσεων των ποντικών σε σχέση με τη μονοθεραπεία με D2E7 στο ίδιο θεραπευτικό σχήμα, η οποία έδειξε λιγότερο μειωμένη παθολογία των αρθρώσεων έναντι των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία, όπως υποδεικνύεται από τα κλινικά ευρήματα, δηλαδή αρθριτικός δείκτης και δύναμη των άκρων και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα όπως υπερπλασία του αρθρικού υμένα, διήθηση της άρθρωσης από φλεγμονώδη κύτταρα, καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση του οστού. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά, αποδείχθηκε ότι η ολεοκανθάλη μειώνει τη φλεγμονή του αρθρικού υμένα. Επομένως, η διατήρηση της αρχιτεκτονικής της άρθρωσης μετά από συγχορήγηση D2E7 με ολεοκανθάλη φαίνεται να οφείλεται σε σημαντική καταστολή της υπερπλασίας του αρθρικού υμένα, και, κατά συνέπεια, του σχηματισμού αρθριτικού πάννου ο οποίος αποτελείται από κύτταρα του αρθρικού υμένα (ινοβλάστες και μακροφάγα) με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και από φλεγμονώδη κύτταρα που έχουν διηθήσει στην άρθρωση.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης των κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων με μονοθεραπεία ολεοκανθάλης, η οποία ήταν μεγαλύτερη στη δόση των 10 mg/Kg από ότι των 5 mg/Kg ως προς τους ποντικούς που δεν έλαβαν θεραπεία. Ωστόσο, η μείωση των τιμών των κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων με μονοθεραπεία ολεοκανθάλης ήταν μικρότερη από αυτή της μονοθεραπείας με D2E7 και της συνδυαστικής θεραπείας D2E7 με ολεοκανθάλη, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ως προς τις τιμές που καταγράφηκαν από τους ποντικούς που δεν έλαβαν θεραπεία.

Η αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας ολεοκανθάλης με D2E7 παρατηρήθηκε μόνο στη δόση των 5 mg/Kg και όχι των 10 mg/Kg ολεοκανθάλης. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να είναι εν μέρει πρόκληση τοξικότητας. Πρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε απώλεια βάρους ή θάνατος σε κάποιον από τους ποντικούς που έλαβε ολεοκανθάλη. Ωστόσο, κατά τη θυσία των ζώων παρατηρήθηκε ότι η περιτοναϊκή κοιλότητα των ποντικών που έλαβαν ολεοκανθάλη, είτε συνδυαστικά με D2E7 είτε ως μονοθεραπεία, παρουσίασε χαρακτηριστικά ίνωσης, σε μεγαλύτερο βαθμό στους ποντικούς που έλαβαν 10 mg/Kg (προσωπική παρατήρηση), ένα φαινόμενο που θα μπορούσε να επηρεάσει την κατάσταση της υγείας και τη φυσιολογία τους. Η εικόνα αυτή δεν ήταν αποτέλεσμα της συχνότητας των ενδοπεριτοναϊκών εγχύσεων, καθ' ότι δεν παρουσιάστηκε κάτι ανάλογο στους ποντικούς που έλαβαν το διαλύτη της ολεοκανθάλης με το ίδιο σχήμα χορήγησης. Ένας πιθανός παράγοντας στην εξήγηση του φαινομένου αυτού, είναι η ικανότητα απορρόφησης του ενέσιμου διαλύματος ολεοκανθάλης από την περιτοναϊκή κοιλότητα των ποντικών, η οποία είναι συναρτημένη με τον όγκο χορήγησης. Η φαρμακοκινητική μελέτη της ολεοκανθάλης ενδεχομένως να έδινε χρήσιμες πληροφορίες ως προς την επιλογή εναλλακτικής οδού χορήγησης στο μέλλον. Επιπλέον, η κατανόηση του τρόπου δράσης της ολεοκανθάλης μόνη της ή σε συνδυασμό κατά την ανάπτυξη της φλεγμονής και της TNF μεσολαβούμενης αρθρίτιδας μέσω της διερεύνησης των *in vivo* μηχανισμών δράσης της, θεωρείται αναγκαία για την περαιτέρω ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η αντιφλεγμονώδης δράση της ολεοκανθάλης είναι συνδεδεμένη με την ικανότητά της να αναστέλλει τα ένζυμα COX-1 και COX-2 στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών (Beauchamp *et al.*, 2005), όμοια με ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, το ibuprofen. Σε *in vitro* μελέτες έχει δειχθεί, επίσης, ότι η ολεοκανθάλη μειώνει την έκφραση της iNOS σε μακροφάγα και χονδροκύτταρα, η οποία δεν υπάρχει στα κύτταρα αυτά όταν βρίσκονται σε ηρεμία αλλά επάγεται μετά από την επίδραση κάποιου ερεθίσματος όπως ο LPS, ο TNF- α , η IL-1 β κ.α. (Iacono *et al.*, 2010, Scotece *et al.*, 2012). Συνεπώς, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της COX-2 και της iNOS στην άρθρωση και της παραγωγής προσταγλανδίνης E2 στον ορό ή/και σε εκχύλισμα άρθρωσης στους ποντικούς που έλαβαν ολεοκανθάλη με ή χωρίς τον D2E7, θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τον *in vivo* μηχανισμό δράσης της.

Είναι γνωστό ότι οι κυτταροκίνες που παράγονται από τους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς στην άρθρωση, παίζουν καίριο ρόλο στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Μεταξύ αυτών, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6, IL-1β και TNF-α αναστέλλονται από την ολεοκανθάλη σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων και χονδροκυττάρων κατόπιν έκθεσής τους σε LPS (Scotece *et al.*, 2012). Ωστόσο, τα στοιχεία αυτά περιορίζονται σε *in vitro* πειραματικό σχεδιασμό και θα πρέπει να επεκταθούν σε *in vivo* μελέτες χρησιμοποιώντας ζωικά πρότυπα, όπως το πρότυπο της TNF μεσολαβούμενης αρθρίτιδας. Ως εκ τούτου, πρόκειται να γίνει περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της ολεοκανθάλης με ή χωρίς τον D2E7 στα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-6, IL-1β, TNF-α και IFN-γ, η οποία ενδέχεται να ενισχύσει τα ευρήματα της παρούσας εργασίας.

Εν κατακλείδι, η βελτιστοποίηση της D2E7 θεραπείας της χρόνιας πολυαρθρίτιδας με ολεοκανθάλη είναι εφικτή στη δοσολογία και στο ζωικό πρότυπο που εφαρμόστηκε. Παράλληλα, αξιοσημείωτο είναι ότι για πρώτη φορά αναδείχθηκε η δυνατότητα της ολεοκανθάλης να μειώνει από μόνη της τα συμπτώματα της νόσου *in vivo*.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η συνδυαστική θεραπεία του συγκεκριμένου αντι-TNF παράγοντα με ολεοκανθάλη σε σχέση με την αντίστοιχη μονοθεραπεία με τον αντι-TNF είναι αποτελεσματικότερη στην καταστολή της εξέλιξης εγκατεστημένης παθολογίας των αρθρώσεων των διαγονιδιακών ποντικών. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την εύρεση των μηχανισμών δράσης της ολεοκανθάλης σε συνδυασμό με τον αντι-TNF ή και της ολεοκανθάλης μόνο, στην αρθρίτιδα. Στο πλαίσιο αυτό, πρόκειται να γίνει ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ των ζώων, τα οποία έλαβαν τα σχήματα θεραπείας, που θα περιλαμβάνει μελέτη της έκφρασης δεικτών της φλεγμονής όπως COX-2 και iNOS στην άρθρωση, της παραγωγής προσταγλανδίνης E2 και διάφορων κυτταροκινών όπως IL-6, IL-1β, IFN-γ και IL-10 στον ορό ή/και στην άρθρωση. Εφόσον επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής δράσης του αντι-TNF με ολεοκανθάλη σε αυτό το διαγονιδιακό πρότυπο, θα έχει ενδιαφέρον να γίνει ανάλογη μελέτη και σε άλλο ζωικό πρότυπο της PA ώστε να κατοχυρωθεί η *in vivo* δράση της σε αυτή τη φλεγμονώδη κατάσταση. Τέλος, πρόκειται να διερευνηθεί η προστατευτική δράση της ολεοκανθάλης στην αρθρίτιδα πριν την έναρξη της νόσου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abuznait, A. H. *et al.* (2013) ‘Olive-Oil-Derived Oleocanthal Enhances β - Amyloid Clearance as a Potential Neuroprotective Mechanism against Alzheimer’ s Disease: In Vitro and in Vivo Studies’, *ACS Chemical Neuroscience*, 4, pp. 973–982.
- Alamanos, Y., Voulgari, P. V and Drosos, A. A. (2006) ‘Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review’, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(3), pp. 182–188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2006.08.006>.
- Aletaha, D. *et al.* (2010) ‘2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative’, *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), pp. 2569–2581. doi: 10.1002/art.27584.
- Anderson, P. J. (2005) ‘Tumor Necrosis Factor Inhibitors: Clinical Implications of Their Different Immunogenicity Profiles’, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34(S1), pp. 19–22. doi: 10.1016/j.semarthrit.2005.01.005.
- Andrewes, P. *et al.* (2003) ‘Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 1415–1420. doi: 10.1021/jf026042j.
- Anquetil, F. *et al.* (2015) ‘IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor– and Complement-Dependent Effector Functions of the Disease-Specific Anti–Citruillinated Protein Autoantibodies’, *The Journal of Immunology*, 194, pp. 3664–3674. doi: 10.4049/jimmunol.1402334.
- Aparicio-soto, M. *et al.* (2016) ‘EXTRA VIRGIN OLIVE OIL: A KEY FUNCTIONAL FOOD FOR PREVENTION OF IMMUNE- INFLAMMATORY DISEASES’, *Food and Function*, 7(11), pp. 4492–4505. doi: 10.1039/C6FO01094F.
- Auger, I. and Roudier, J. (1997) ‘A Function for the QKRAA Amino Acid Motif: Mediating Binding of DnaJ to DnaK Implications for the Association of Rheumatoid Arthritis with HLA-DR4’, *J Clin Invest*, 99(8), pp. 1818–1822.
- Ayoub, N. M. *et al.* (2017) ‘The olive oil phenolic (-)-oleocanthal modulates estrogen receptor expression in luminal breast cancer in vitro and in vivo and synergizes with tamoxifen treatment’, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 810, pp. 100–111. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.06.019.
- Barra, L. *et al.* (2011) ‘Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citruillinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review’, *Rheumatology*, 50, pp. 311–316. doi: 10.1093/rheumatology/keq190.
- Beauchamp, G. K. *et al.* (2005) ‘Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil’, *Nature*. Nature Publishing Group, 437, pp. 45–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/437045a>.

- Begovich, A. B. *et al.* (2004) 'A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis', *The American Journal of Human Genetics*, 75, pp. 330–337.
- Binder, N. B. *et al.* (2013) 'Tumor Necrosis Factor – Inhibiting Therapy Preferentially Targets Bone Destruction but Not Synovial Inflammation in a Tumor Necrosis Factor – Driven Model of Rheumatoid Arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 65(3), pp. 608–617. doi: 10.1002/art.37797.
- Black, R. A. *et al.* (1997) 'A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 385, pp. 729–733. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/385729a0>.
- Bluml, S. *et al.* (2011) 'Essential Role of MicroRNA-155 in the Pathogenesis of Autoimmune Arthritis in Mice', *Arthritis and Rheumatism*, 63(5), pp. 1281–1288. doi: 10.1002/art.30281.
- Brackertz, D., Mitchell, G. F. and Mackay, I. A. N. R. (1977) 'ANTIGEN-INDUCED ARTHRITIS IN MICE', *Arthritis and Rheumatism*, 20(3), pp. 841–850.
- Cicerale, S., Lucas, L. J. and Keast, R. S. J. (2012) 'Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 23, pp. 129–135. doi: 10.1016/j.copbio.2011.09.006.
- Clavel, C. *et al.* (2008) 'Induction of Macrophage Secretion of Tumor Necrosis Factor α Through Fc γ Receptor IIa Engagement by Rheumatoid Arthritis – Specific Autoantibodies to Citrullinated Proteins Complexed With Fibrinogen', *Arthritis and Rheumatism*, 58(3), pp. 678–688. doi: 10.1002/art.23284.
- Colmegna, I., Ohata, B. R. and Menard, H. A. (2012) 'Current Understanding of Rheumatoid Arthritis Therapy', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Nature Publishing Group, 91(4), pp. 607–620. doi: 10.1038/clpt.2011.325.
- Douni, E. *et al.* (2004) 'Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols', *Arthritis Research and Therapy*, 6, pp. 65–72. doi: 10.1186/ar1028.
- Dowty, M. E. *et al.* (2014) 'Preclinical to Clinical Translation of Tofacitinib, a Janus Kinase Inhibitor, in Rheumatoid Arthritis', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348, pp. 165–173.
- Ebringer, A. Å. and Wilson, C. (2000) 'HLA molecules, bacteria and autoimmunity', *Journal of Medical Microbiology*, 49, pp. 305–311.
- Esser, R. E. *et al.* (1985) 'REACTIVATION OF STREPTOCOCCAL CELL WALL-INDUCED ARTHRITIS BY HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS CELL WALL POLYMERS', *Arthritis and Rheumatism*, 28(12), pp. 1402–1411.
- Firestein, G. S. (1996) 'INVASIVE FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS: Passive Responders or Transformed Aggressors?', *Arthritis & Rheumatism*, 39(11), pp. 1781–1790.
- Frisell, T. *et al.* (2016) 'Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case- control

study in Sweden', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(1), pp. 183–189. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206133.Familial.

van Gaalen, F. A. *et al.* (2004) 'Association Between HLA Class II Genes and Autoantibodies to Cyclic Citrullinated Peptides (CCPs) Influences the Severity of Rheumatoid Arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 50(7), pp. 2113–2121. doi: 10.1002/art.20316.

Gearing, A. J. H. *et al.* (1994) 'Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases', *Nature*. Nature Publishing Group, 370, pp. 555–557. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/370555a0>.

Glant, T. T., Finnegan, A. and Mikecz, K. (2003) 'Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics.', *Critical reviews in immunology*. United States, 23(3), pp. 199–250.

Gonzalez, A. *et al.* (2008) 'Mortality Trends in Rheumatoid Arthritis: The role of Rheumatoid Factor', *Journal of Rheumatology*, 35(6), pp. 1009–1014.

Gravallese, E. M. *et al.* (2000) 'SYNOVIAL TISSUE IN RHEUMATOID ARTHRITIS IS A SOURCE OF OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FACTOR', *Arthritis & Rheumatism*, 43(2), pp. 250–258.

Gregersen, P. K., Silver, J. and Winchester, R. J. (1987) 'The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis', *Arthritis & Rheumatism*. Wiley-Blackwell, 30, pp. 1205–1213. doi: 10.1002/art.1780301102.

Hernández, M. V., Sanmartí, R. and Cañete, J. D. (2016) 'The safety of tumor necrosis factor-alpha inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis', *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(5), pp. 613–624. doi: 10.1517/14740338.2016.1160054.

Hill, J. A. *et al.* (2003) 'Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1*0401 MHC Class II Molecule', *The Journal of Immunology*, 171, pp. 538–541. doi: 10.4049/jimmunol.171.2.538.

HOLMDAHL, R. *et al.* (1989) 'Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis', *APMIS*. Wiley/Blackwell (10.1111), 97(7), pp. 575–584. doi: 10.1111/j.1699-0463.1989.tb00446.x.

Holmdahl, R. *et al.* (2001) 'Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis.', *Immunological reviews*. England, 184, pp. 184–202.

Honda, K. and Littman, D. R. (2012) 'The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation', *Annual Review in Immunology*, 30, pp. 759–795. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074937.The.

Horai, B. R. *et al.* (2000) 'Development of Chronic Inflammatory Arthropathy Resembling Rheumatoid Arthritis in Interleukin 1 Receptor Antagonist– deficient Mice', *Journal of Experimental Medicine*, 191(2), pp. 313–320.

Iacono, A. *et al.* (2010) 'Effect of Oleocanthol and Its Derivatives on Inflammatory

Response Induced by Lipopolysaccharide in a Murine Chondrocyte Cell Line', *Arthritis and Rheumatism*, 62(6), pp. 1675–1682. doi: 10.1002/art.27437.

Impellizzeri, D. *et al.* (2011) 'Oleuropein Aglycone, an Olive Oil Compound, Ameliorates Development of Arthritis Caused by Injection of Collagen Type II in Mice', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(3), pp. 859–869. doi: 10.1124/jpet.111.182808.mune.

Jiang, X. *et al.* (2015) 'To What Extent Is the Familial Risk of Rheumatoid Arthritis Explained by Established Rheumatoid Arthritis Risk Factors?', *Arthritis and Rheumatism*, 67(2), pp. 352–362. doi: 10.1002/art.38927.

Keffer, J. *et al.* (1991) 'Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis', *The EMBO Journal*, 10(13), pp. 4025–4031.

Keys, A. (1970) 'Coronary Heart Disease in Seven Countries', *Circulation*, 41, pp. 186–195.

Kim, E. Y. and Moudgil, K. D. (2009) 'The determinants of susceptibility/ resistance to adjuvant arthritis in rats', *Arthritis Research and Therapy*, 11, pp. 239–248. doi: 10.1186/ar2755.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A. (2007) *Kuby Immunology*. sixth. W. H. Freeman and Company.

Klareskog, L. *et al.* (2011) 'Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis', *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd, 23(2), pp. 92–98. doi: 10.1016/j.smim.2011.01.014.

Klein, K. and Gay, S. (2015) 'Epigenetics in rheumatoid arthritis', *Current Opinion in Rheumatology*, 27, pp. 76–82. doi: 10.1097/BOR.0000000000000128.

Kleinau, S. *et al.* (1991) 'Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement', *Journal of Autoimmunity*. Academic Press, 4(6), pp. 871–880. doi: 10.1016/0896-8411(91)90050-M.

Koenders, M. I. *et al.* (2008) 'Interleukin-1 Drives Pathogenic Th17 Cells During Spontaneous Arthritis in Interleukin-1 Receptor Antagonist – Deficient Mice', *Arthritis and Rheumatism*, 58(11), pp. 3461–3470. doi: 10.1002/art.23957.

Kollias, G. *et al.* (2011) 'Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(8), pp. 1357– 1362. Available at: <http://ard.bmj.com/content/70/8/1357.abstract>.

Kontoyiannis, D. *et al.* (1999) 'Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements: Implications for Joint and Gut-Associated Immunopathologies', *Immunity*, 10, pp. 387–398.

Kouskoff, V. *et al.* (1996) 'Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity', *Cell*, 87, pp. 811–822.

Lewis, M. *et al.* (1991) 'Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific.',

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(7), pp. 2830–2834. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51333/>.

Li, P. and Schwarz, E. M. (2003) 'The TNF- α transgenic mouse model of inflammatory arthritis', *Springer Seminars in Immunopathology*, 25, pp. 19–33. doi: 10.1007/s00281-003-0125-3.

Liao, K. P., Alfredsson, L. and Karlson, E. W. (2009) 'Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis', *Current Opinion in Rheumatology*, 21(3), pp. 279–283. doi: 10.1097/BOR.0b013e32832a2e16.Environmental.

Liu, Y. *et al.* (2013) 'Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in Rheumatoid Arthritis', *Nature Biotechnology*, 31(2), pp. 142–147. doi: 10.1038/nbt.2487.Epigenome-wide.

MacGregor, A. J. *et al.* (2000) 'CHARACTERIZING THE QUANTITATIVE GENETIC CONTRIBUTION TO RHEUMATOID ARTHRITIS USING DATA FROM TWINS', *Arthritis and Rheumatism*, 43(1), pp. 30–37.

Malviya, G. *et al.* (2013) 'Biological therapies for rheumatoid arthritis: Progress to date', *BioDrugs*, 27(4), pp. 329–345. doi: 10.1007/s40259-013-0021-x.

Matucci, A. *et al.* (2016) 'Influence of anti-TNF immunogenicity on safety in rheumatic disease: a narrative review', *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor & Francis, 15(S1), pp. 3–10. doi: 10.1080/14740338.2016.1221398.

McInnes, I. B. and Schett, G. (2011) 'The pathogenesis of rheumatoid arthritis.', *New England Journal of Medicine*, 365, pp. 2205–2219.

Meier, F. M. *et al.* (2013) 'Current immunotherapy in rheumatoid arthritis', *Immunotherapy*, 5(9), pp. 955–974.

Miossec, P., Korn, T. and Kuchroo, V. (2009) 'Interleukin-17 and type 17 helper T cells.', *N Engl J Med*, 361(9), pp. 888–98.

Moelants, E. A. V *et al.* (2013) 'Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis', *Immunology and Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 1–9. doi: 10.1038/icb.2013.15.

Muller-Ladner, U. *et al.* (1996) 'Synovial Fibroblasts of Patients with Rheumatoid Arthritis Attach to and Invade Normal Human Cartilage when Engrafted into SOID Mice', *American Journal of Pathology*, 149(5), pp. 1607–1615.

Nandakumar, K. S., Svensson, L. and Holmdahl, R. (2003) 'Collagen Type II-Specific Monoclonal Antibody- Induced Arthritis in Mice', *American Journal of Pathology*, 163(5), pp. 1827–1837.

Nickdel, M. B. *et al.* (2009) 'Dissecting the contribution of innate and antigen-specific pathways to the breach of self-tolerance observed in a murine model of arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, pp. 1059–1066. doi: 10.1136/ard.2008.089300.

Nielen, M. M. J. *et al.* (2004) 'Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of

Rheumatoid Arthritis A Study of Serial Measurements in Blood Donors', *Arthritis and Rheumatism*, 50(2), pp. 380–386. doi: 10.1002/art.20018.

van Nies, J. A. B. *et al.* (2010) 'Improved treatment strategies reduce the increased mortality risk in early RA patients', *Rheumatology*, 49, pp. 2210–2216. doi: 10.1093/rheumatology/keq250.

Niki, Y. *et al.* (2001) 'Macrophage- and neutrophil- dominant arthritis in human IL-1 α transgenic mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 107(9), pp. 1127–1135.

Nixon, R., Bansback, N. and Brennan, A. (2007) 'The efficacy of inhibiting tumour necrosis factor α and interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis and adjusted indirect comparisons', *Rheumatology*, 46, pp. 1140–1147. doi: 10.1093/rheumatology/kem072.

Panayi, G. S. (2005) 'B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?', *Rheumatology*, 44(S2), pp. ii3–ii7. doi: 10.1093/rheumatology/keh616.

Pang, K. and Chin, K. (2018) 'The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective', *Nutrients*, 10(5), p. 570. doi: 10.3390/nu10050570.

Pap, T. *et al.* (2003) 'Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells', *Arthritis Research and Therapy*, 5(3), pp. 163–173. doi: 10.1186/ar752.

Perez, C. *et al.* (1990) 'A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact', *Cell*, 63, pp. 251–258.

Peschon, J. J. *et al.* (1998) 'TNF Receptor-Deficient Mice Reveal Divergent Roles for p55 and p75 in Several Models of Inflammation', *The Journal of Immunology*, 160(2), p. 943 LP – 952. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/160/2/943.abstract>.

Piguet, P. F. *et al.* (1992) 'Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor', *Immunology*, 77, pp. 510–514.

Remmers, E. F. *et al.* (2007) 'STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus', *The New England journal of medicine*, 357(10), pp. 977–986. doi: 10.1056/NEJMoa073003.

Roberson, E. D. O. and Bowcock, A. M. (2010) 'Psoriasis genetics: breaking the barrier', *Trends in Genetics*, 26(9), pp. 415–423. doi: 10.1016/j.tig.2010.06.006.Psoriasis.

Rosillo, M. A., Sánchez-Fidalgo, M., *et al.* (2015a) 'Dietary extra - virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen - induced arthritis', *European Journal of Nutrition*, 55(1), pp. 315–325. doi: 10.1007/s00394-015-0850-0.

Rosillo, M. A., Sánchez-Hidalgo, M., *et al.* (2015b) 'Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis', *Molecular Nutrition & Food Research*. Wiley-Blackwell, 59(12), pp. 2537–2546. doi: 10.1002/mnfr.201500304.

- Rosillo, M. Á. *et al.* (2014) 'Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis', *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 25(12), pp. 1275–1281. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.07.006.
- Sabeh, F., Fox, D. and Weiss, S. J. (2010) 'Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function', *The Journal of Immunology*, 184, pp. 6396–6406. doi: 10.4049/jimmunol.0904068.
- Sakaguchi, N. *et al.* (2003) 'Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 426, p. 454. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02119>.
- Sardar, S. and Andersson, Å. (2016) 'Old and new therapeutics for Rheumatoid Arthritis: In vivo models and drug development', *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(1), pp. 2–13. doi: 10.3109/08923973.2015.1125917.
- Scher, J. U., Littman, D. R. and Abramson, S. B. (2016) 'Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases', *Arthritis Rheumatology*, 68(1), pp. 35–45. doi: 10.1002/art.39259.Microbiome.
- Scher, J. U., Pillinger, M. H. and Abramson, S. B. (2007) 'Nitric Oxide Synthases and Osteoarthritis', *Current Rheumatology Reports*, 9, pp. 9–15.
- Schett, G. and Teitelbaum, S. L. (2009) 'Osteoclasts and Arthritis', *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(7), pp. 1142–1146. doi: 10.1359/JBMR.090533.
- Schmitz, N. *et al.* (2010) 'Basic methods in histopathology of joint tissues', *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd, 18, pp. S113–S116. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.026.
- Scotece, M. *et al.* (2012) 'Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: Inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes', *Life Sciences*. Elsevier Inc., 91, pp. 1229–1235. doi: 10.1016/j.lfs.2012.09.012.
- Silva, S. *et al.* (2015) 'Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis', *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier, 26(4), pp. 360–368. doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2014.11.011.
- Smolen, J. S. *et al.* (2007) 'New therapies for treatment of rheumatoid arthritis', *Lancet*, 370(9602), pp. 1861–1874. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60784-3.
- Smolen, J. S., Aletaha, D. and McInnes, I. B. (2016) 'Rheumatoid arthritis', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 388(10055), pp. 2023–2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
- Smolen, J. S. and Steiner, G. (2003) 'Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(6), pp. 473–488. doi: 10.1038/nrd1109.
- Sofi, F. *et al.* (2010) 'Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health : an updated systematic review and meta-analysis', *Am J*

Clin Nutr, 92, pp. 1189–1196. doi: 10.3945/ajcn.2010.29673.INTRODUCTION.

Sokolove, J. *et al.* (2011) ‘Immune Complexes Containing Citrullinated Fibrinogen Co- Stimulate Macrophages via Toll-like receptor 4 and Fc γ receptor’, *Arthritis and Rheumatism*, 63(1), pp. 53–62. doi: 10.1002/art.30081.Immune.

Symmons, D. *et al.* (2002) ‘The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century’, *Rheumatology*, 41, pp. 793–800.

Terato, K. *et al.* (1992) ‘Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen’, *The Journal of Immunology*, 148(7), pp. 2103–2108.

Trentham, D. E. (1982) ‘COLLAGEN ARTHRITIS AS A RELEVANT MODEL FOR RHEUMATOID ARTHRITIS’, *Arthritis and Rheumatism*, 25(8), pp. 911–916.

Trouw, L. A. *et al.* (2009) ‘Anti – Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies From Rheumatoid Arthritis Patients Activate Complement via Both the Classical and Alternative Pathways’, *Arthritis and Rheumatism*, 60(7), pp. 1923–1931. doi: 10.1002/art.24622.

Viatte, S. *et al.* (2015) ‘Association of HLA-DRB1 Haplotypes With Rheumatoid Arthritis Severity, Mortality, and Treatment Response’, *The Journal of the American Medical Association*, 313(16), pp. 1645–1656. doi: 10.1001/jama.2015.3435.Association.

Vincent, T. L. *et al.* (2012) ‘Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models’, *Rheumatology*, 51, pp. 1931–1941. doi: 10.1093/rheumatology/kes035.

Vougogiannopoulou, K. *et al.* (2014) ‘One-Step Semisynthesis of Oleacein and the Determination as a 5 - Lipoxygenase Inhibitor’, *Journal of Natural Products*, 77, pp. 441–445. doi: 10.1021/np401010x.

Wegner, N. *et al.* (2010) ‘Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis’, *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), pp. 2662–2672. doi: 10.1002/art.27552.Peptidylarginine.