

**Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΧΡ.ΤΖΟΥΜΑΚΑ-ΜΠΑΚΟΥΛΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ
&
ΕΙΔΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ**



**In vitro μελέτη των αποπτωτικών παραγόντων-
Survivin και Cytochrome C-
στην παθογένεια της Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας (NIA)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΒΡΑΪΛΑ ΒΕΝΕΤΙΑ-ΜΑΡΙΑ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2013

« Μοναδικό μας χρέος,
να κυνηγήσουμε το όνειρό μας»

ΕΘΝΙΚΟΝ ὡς ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΟΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΣΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΗΣΑΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΘΕΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΓΓΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΨΟΦΑΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΡΑΨΗΣ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΕΣΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΟΝ ΠΙΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΑΒΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΨΟΦΑΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΟΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ. ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ. Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ. ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΟΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ· ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Ημερομηνία αίτησης: 28.01.2005

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής : 7.02.2005

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Α. Κωνσταντόπουλος	Ομότιμος Καθηγητής
Δ. Γουργιώτης	Αναπλ. Καθηγητής – Επιβλέπον μέλος
Π. Κουκουτσάκης	Επικ. Καθηγητής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23.02.2005

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: 5.12.2012

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 25.02.2013

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

Τα μέλη της επταμελούς επιτροπής

Α. Κωνσταντόπουλος	Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής
Χ. Τζουμάκα-Μπακούλα	Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Δ. Γουργιώτης	Αναπλ. Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας
Β. Παπαευαγγέλου	Αναπλ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Π. Κουκουτσάκης	Επικ. Καθηγητής Παιδιατρικής
Α. Γαρούφη	Επικ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Λ. Κόσσυβα	Επικ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα (ΝΙΑ) είναι μία από τις πιο συχνές χρόνιες παθήσεις των παιδιών με άλλοτε βαριά και μακρά κλινική πορεία. Μία νόσος που ταλαιπωρεί τους μικρούς μας ασθενείς. Η κατανόηση της παθογένειας της νόσου θα συμβάλλει ουσιαστικά στην καλύτερη και αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπισή της.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρεί να διερευνήσει το μηχανισμό της απόπτωσης στην άρθρωση ασθενών με ΝΙΑ, και να προσδιορίσει το ρόλο της στην έκφραση και εξέλιξη αυτής., με την *in vitro* μελέτη δύο βασικών μορίων της, τη Survivin και Cytochrome-c. Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με υπεύθυνο τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δ. Γουργιώτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τη Διευθύντρια της Β'ΠΠΚ Καθηγήτρια Χ. Τζουμάκα-Μπακούλα υπό τη διεύθυνση της οποίας ήρθε σε πέρας η παρούσα μελέτη, για τη συμπαράστασή της και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Δ. Καφετζή, Διευθυντή της Β'ΠΠΚ, για τη στήριξή του στη μελέτη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της διατριβής αυτής:

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Τον Ομότιμο Καθηγητή Α. Κωνσταντόπουλο, Διευθυντή της Β'ΠΠΚ, υπό τη διεύθυνση του οποίου έγινε η ανάθεσή της.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δ. Γουργιώτη, επιβλέποντα της διατριβής, τον Δάσκαλό μου, για τη βοήθειά του στη σύλληψη της ιδέας, τον τρόπο πραγματοποίησής της και την Τέχνη. Για την αγάπη που μου έδειξε, την εμπιστοσύνη του, την μεταλαμπάδευση των γνώσεών του σε εργαστηριακό, ερευνητικό και συγγραφικό επίπεδο, καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε για τη συμμετοχή μου σε σημαντικές επιστημονικές εκδηλώσεις. Η συμβολή του είναι καθοριστική στην επαγγελματική μου πορεία.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Π. Κουκουτσάκη, με ιδιαίτερο σεβασμό, για τη συνεχή στήριξή του, την πολύτιμη βοήθειά του και σοφία του.

Επίσης, τη Διευθύντρια της Ειδικής Μονάδας Παιδιατρικής Ρευματολογίας, Δρ.Ο.Βουγιούκα, για την συνεργασία της, και την παραχώρηση του βιολογικού

υλικού. Χωρίς την προσφορά της δε θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της παρούσας διατριβής.

Τον Βιολόγο Α. Μαρμαρινό, για τη συνεργασία του και τη βοήθειά του στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους.

Τον φίλο Δρ.Π.Ζιάκα, αιματολόγο-βιοστατιστικό, για τη σημαντική βοήθειά του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τις ερευνήτριες Μ.Παλατιανού, βιολόγο, και Α.Σταμάτη, ιατρό, για την πρόθυμη πάντα βοήθειά τους.

Την Ιερά Σύνοδο της Εκκλησίας της Ελλάδας για τη χορήγηση υποτροφίας για την οικονομική στήριξη επί έτους για τη διενέργεια της παρούσας διατριβής.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για τις αρχές που μου έδωσαν, τη φροντίδα τους, την αγόγγυστη στήριξή τους. Γιατί πίστεψαν σε εμένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	10
Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1. Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα.....	15
1.1 Αιτιολογία και παθογένεια της ΝΙΑ	15
1.1.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	15
1.1.2 Γενετικοί παράγοντες	16
1.1.3 Ανοσολογικοί παράγοντες.....	16
1.2 Απόπτωση	18
1.2.1 Απόπτωση και αυτοάνοσα νοσήματα.....	22
1.2.2 Απόπτωση και Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα	27
1.3 Survivin	30
1.4 Cytochrome-c	33
1.5 Η άρθρωση: το στρατηγείο της ΝΙΑ.....	34
1.6 Θεραπευτική προσέγγιση της ΝΙΑ	35
2. Υπόθεση- Σκοπός- Όφελος	36
Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
3. Υλικά και Όργανα	38
3.1 Υλικά	38
3.1.1 Ασθενείς	38
3.1.2 Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα.....	38
3.2 Όργανα	39

4.	Μέθοδοι.....	40
4.1	Προσδιορισμός Survivin και Cytochrome-c με Ανοσοενζυμική Μέθοδο	40
4.1.1	Αρχή της Μεθόδου	40
4.1.2	Υπολογισμοί (Ποσοτικοί Προσδιορισμοί)	40
4.2	Επεξεργασία αποτελεσμάτων	41
5.	Αποτελέσματα	42
5.1	Στοιχεία ασθενών	42
5.2	Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με την κλινική έκφραση της νόσου	45
5.3	Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με την αναιμία	46
5.4	Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με τις λοιπές παραμέτρους της Γενικής Αίματος	47
5.5	Μελέτη των Survivin και Cytochrome-c σε σχέση με γνωστούς δείκτες φλεγμονής	50
5.6	Επίδραση της φαρμακευτικής αγωγής στις τιμές των Survivin και Cytochrome-c	51
6.	Συζήτηση	52
7.	Συμπεράσματα.....	60
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	61
	Abstract	63
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Βράιλα Βενετία-Μαρία

Ημερομηνία γέννησης: 19.04.1979

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1998 - 2004: Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ) (βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς 7.37)

2/2005 – 1/2013: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα «In-vitro μελέτη των αποπτωτικών παραγόντων- Survivin και Cytochrome-C- στην παθογένεια της Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας (NIA)»

10/2005 - 6/2007: Εκπλήρωση Υπηρεσίας Υπαίθρου στο Π.Ι.Λογγάστρας, Λακωνία.

11/2008 - 8/2012: Ειδικευόμενη Παιδιάτρος στην Β'Παιδιατρική Πανεπιστημιακή Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ν. Παίδων Παν.&Αγλαΐα Κυριακού

10/2012: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Παιδιάτρου

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ακαδημαϊκό έτος

2012-2013: Συμμετοχή ως διδάσκουσα στο ΜΠΣ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα: Παιδιατρική και Νοσηλευτική Φροντίδα και Έρευνα

2004 - 2005: Διδασκαλία ανατομίας και κλινικής παθολογίας στο δημόσιο ΙΕΚ Αγ.Αναργύρων στις ειδικότητες Ιατρικών Οργάνων και Απεικονίσεων, Διαιτολογίας και Κλινικής Διατροφής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2003- Συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Β' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και εκπαίδευση σε εργαστηριακές τεχνικές

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Α.Επιχορήγηση από το Υπουργείο Παιδείας

Συνερευνητής στο πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II

Θέμα: «ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ, ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ, ΓΟΝΙΔΙΟΥ BCL2L12, ΣΤΗΝ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ. ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ?»

Β.Ερευνητικά προγράμματα/κλινικές μελέτες

Συνερευνητής

α) Μελέτη Διάρκειας 12 εβδομάδων, τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή, και ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, παράλληλων ομάδων, σε δύο σκέλη για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της τοκιλιζουμάμπης σε ασθενείς με ενεργό συστηματική νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα (σΝΙΑ), με επέκταση σε ανοιχτή μελέτη, διάρκειας 92 εβδομάδων σε ένα σκέλος , για να εξεταστεί η μακροχρόνια χρήση τοκιλιζουμάμπης, ακολουθούμενη από 3ετή συνέχιση της ανοιχτής μελέτης για να εξεταστεί η μακροχρόνια χρήση τοκιλιζουμάμπης», κωδικός μελέτης WA18221, Roche Hellas.

β) Μελέτη ανοιχτής επέκτασης του canakinumab (ACZ885) σε ασθενείς με Συστηματική Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα (ΣΝΙΑ) και ενεργές συστηματικές εκδηλώσεις που συμμετείχαν στις μελέτες ACZ885G2301 και ACZ885G305, και μελέτη χαρακτηρισμού της ανταπόκρισης σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς με ενεργό ΣΝΙΑ με και χωρίς πυρετό. Κωδικός μελέτης CAZ885G2301E1, Novartis.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Άριστα: First Certificate in English, University of Cambridge (1993)

Γαλλικά: Πολύ καλά: Sorbonne 2ème Degré (1998), Sorbonne 1ère Degré(1995), DELF (1995)

Γερμανικά: Πολύ καλά: Mittelstufe (2001), Grundstufe (2000)

Ισπανικά : Αρκετά καλά

ΛΟΙΠΕΣ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

- JOINT ASSESSOR VALIDATION, awarded by PRINTO (PAEDIATRIC RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL TRIALS ORGANISATION)
- Εκπαίδευση στο **GCP** (πιστοποίηση)

ΛΟΙΠΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

- Γνώση της ελληνικής νοηματικής γλώσσας (βεβαίωση σπουδών)
- Πιάνο (Ανωτέρα Σχολή)

ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ Η/Υ

Γνώση των Windows, Microsoft Office

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. STRIPELI F., LOGOTHETI I., VRAILA V., BALTA CH., PATRSIOURA A., PAPAENVAGGELOU V., PAPADATOS I., BAKA A., TSIODRAS S., TSOLIA MN.
“Clinical characteristics of children hospitalized with pandemic influenza A and comparison with seasonal influenza”
Influenza and other respiratory viruses (υπό κρίση)
2. BRIANA DD, GOURGIOTIS D, BAKA S, BOUTSIKOU M, VRAILA VM, BOUTSIKOU T, HASSIAKOS D., MALAMITSI-PUCHNER A
“The effect of intrauterine growth restriction on circulating surfactant protein D concentrations in the perinatal period”
*Reprod Sci.*2010 Jul;17(7):653-8
3. DESPINA D. BRIANA, STAVROULA BAKA, MARIA BOUTSIKOU, SOFIA LIOSI, VENETIA-MARIA VRAILA, DIMITRIOS GOURGIOTIS, DIMITRIOS HASSIAKOS, ARIADNE MALAMITSI-PUCHNER
“Soluble Fas Antigen and Soluble Fas Ligand in Intrauterine Growth Restriction”
Neonatology;2010;97:31-35 (I.F.=1.920)
4. BRIANA DD, GOURGIOTIS D, BOUTSIKOU M, BAKA S, HASSIAKOS D. VRAILA VM, CREATSAS G, MALAMITSI-PUCHNER A.
“Perinatal bone turnover in term pregnancies: the influence of intrauterine growth restriction”
Bone ; 2008 feb; 42(2):307-13 (I.F.= 3.829) Cited: 1
5. IACOVIDOU N, BRIANA DD, BOUTSIKOU M, GOURGIOTIS D, BAKA S, VRAILA VM, HASSIAKOS D, MALAMITSI –PUCHNER A.
“Perinatal changes of circulating N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in normal and intrauterine-growth-restricted pregnancies.”
Hypertens Pregnancy; 2007;26(4):463-71(I.F.= 1.217)
6. NICOLETTA IACOVIDOU, MARIA BOUTSIKOU, DIMITRIOS GOURGIOTIS, DESPINA D.BRIANA, STAVROULA BAKA, VENETIA-MARIA VRAILA, LOUIZA KONTARA, DIMITRIOS HASSIAKOS, and ARIADNE MALAMITSI-PUCHNER

“Perinatal changes of cardiac troponin-I in normal and intrauterine growth restricted pregnancies.”

Mediators of Inflammation ; 2007;2007:53921 (I.F= 0.819)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΩΣ SUPPLEMENTS ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. OLGA VOUGIOUKA, VENETIA-MARIA VRAILA, LYDIA KOSSIVA, DIMITRA KALLINIKOU, DIMITRIOS KAFETZIS

“An 11-year old boy with long lasting headaches”

Pediatric Rheumatology 2011, Volume 9 Suppl

2. VENETIA-MARIA VRAILA, HELENI GEORGOULI, CHRISTINA BALDA, MARIA MACHAIRA, ATHINA KATSAROU, MARIA KOSTAKI, ELIAS KONSTANTOPOULOS, LYDIA KOSSIVA

“Recurrent eosinophilia due to treatment with growth hormone”

Child: Care, Health and Development 36; s1:61, Jan 2010 (I.F.=1.154)

3. CHRISTINA MPALTA, ASTEROULA PAPATHANASIOUM GARYFALIA LEKKA, VENETIA VRAILA, ATHINA KATSAROU, LYDIA KOSSIVA, MARIA MACHAIRA, SOFIA TZALAVRA, ELENI GEORGOULI

“Male, 9-years-old, with two episodes of septic shock and seizures”

Child: Care, Health and Development 36; s1:61, Jan 2010 (I.F.=1.154)

4. D.BRIANA, S.BAKA, D.GOURGIOTIS, M.BOUTSIKOU, V-M.VRAILA, T.BOUTSIKOU, D.HASSIAKOS, A.MALAMITSI-PUCHNER.

“Serum vaspin concentrations in full-term pregnancies: the impact of intrauterine growth restriction”

Acta Paediatrica 98: 183 Suppl.460, Oct 2009 (I.F.=1.411)

5. S.LIOSI, DD.BRIANA, D.GOURGIOTIS, M.BOUTSIKOU, S.BAKA, VM.VRAILA, D.HASSIAKOS, A.MASAMITSI-PUCHNER

“Cord blood GLP-1 concentrations in human full-term normal and intrauterine growth restricted pregnancies”

Archives of Disease in Childhood 2008; 93: ps301

6. MALAMITSI –PUCHNER A., BOUTSIKOU M., LIOSIS., GOURGIOTIS D., VRAILA VM., HASSIAKOS D., BAKA S., BRIANA D.

“ Fetal Survivin concentrations in normal and complicated pregnancies at term”

Acta Paediatrica 97:59-59 Suppl.459, Jun 2008 (I.F.=1.411)

7. PALEOLOGOU N., ANTONAKI G., KALLERGI K., VRAILA V., ALATZATZOGLOU A., TSONOPOYLOS E., GOURIOTIS D.

“Egg allergy in children in Greece”

Allergy 63:166-166, 415, Suppl.88, 2008 (I.F.=5.014)

8. PALEOLOGOU N., ANTONAKI G., VRAILA V., LEBESSI E., MARMARINOS A., KALLERGI K., DOXARA A., TOULIKA S., GOURIOTIS D.

“Serum IL-15 in inhalant allergic children”

Allergy 63:313-313, 842, Suppl.88, 2008 (I.F.=5.014)

9. PALEOLOGOU N., ANTONAKI G., KALLERGI K., VRAILA V.,
GOURGIOTIS D., FOUSTOUKOU M.

“Sensitisation to common indoor allergens in atopic children in Greece”

Allergy 62:408-408 Suppl.83 Jun 2007 (I.F.=5.014)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. ΜΠΙΡΙΑΝΑ Δ., ΜΠΟΥΤΣΙΚΟΥ Μ., ΓΟΥΡΓΙΩΤΗΣ Δ., ΜΠΑΚΑ Σ.,
ΒΡΑΪΛΑ Β-Μ., ΜΠΟΥΤΣΙΚΟΥ Θ., ΧΑΣΙΑΚΟΣ Δ., ΜΑΛΑΜΙΤΣΙ-
ΠΟΥΧΝΕΡ Α.

**“Βιοχημικοί πνευμονικοί δείκτες περιφερικού αίματος στην ενδομήτρια
υπολειπόμενη αύξηση”**

*Περιγεννητική Ιατρική και Νεογνολογία, Τομ.4 Τευχ.3, Ελεύθερες ανακοινώσεις,
2009*

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ/POSTER ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ-ΕΥΡΩΠΑΪΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

**1. 18th Pediatric Rheumatology European Society (PreS) Congress, Bruges,
Belgium, 14-18 September 2011**

AN 11-YEAR-OLD BOY WITH LONG LASTING HEADACHES

(Poster Area P87)

Olga Vougiouka, Venetia-Maria Vraila, Lydia Kossiva, Dimitra Kallinikou,
Dimitrios Kafetzis

2. Excellence in Paediatrics, Florence, Italy, 3-6 December, 2009

RECURRENT EOSINOPHILIA DUE TO TREATMENT WITH GROWTH
HORMONE (Poster Area PP028)

Venetia-Maria Vraila, Heleni Georgouli, Christina Balda, Maria Machaira,
Athina Katsarou, Maria Kostaki, Elias Konstantopoulos, Lydia Kossiva

3. Excellence in Paediatrics, Florence, Italy, 3-6 December, 2009

MALE, 9-YEARS-OLD, WITH TWO EPISODES OF SEPTIC SHOCK AND
SEIZURES (Poster Area PP030)

Christina Mpalta, Asteroula Papathanasiou, Garyfalia Lekka, Venetia Vraila,
Athina Katsarou, Lydia Kossiva, Maria Machaira, Sofia Tzalavra, Eleni
Georgouli

**4. 9th World Congress of Perinatal Medicine. Berlin, Germany, 24-28
October, 2009**

PERINATAL CHANGES OF CIRCULATING CLARA CELL PROTEIN
CONCENTRATIONS IN PREGNANCIES WITH NORMAL AND
RESTRICTED FETAL GROWTH

Despina Briana, Dimitrios Gourgiotis, Meria Boutsikou, Stavroula Baka, Venetia-Maria Vraila, Theodora Boutsikou, Dimitrios Hassiakos, Ariadne Malamitsi-Puchner

5. 50th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research. Hamburg, Germany, October 9-12, 2009

SERUM VASPIN CONCENTRATIONS IN FULL-TERM PREGNANCIES: THE IMPACT OF INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION (Poster Area 499)

D.Briana, S.Baka, D.Gourgiotis, M.Boutsikou, V-M.Vraila, T.Boutsikou, D.Hassiakos, A.Malamitsi-Puchner

6. 41st Annual Conference of the International Society of Paediatric Oncology, SIOP 2009, Sao Paulo, Brazil, October 5-9 2009

SERUM SURVIVIN LEVELS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: CORRELATION TO RESPONSE TO THERAPY (Poster Area 004)

M.Baka, V-M.Vraila, A.Orfanakou, D.Bouhoutsou, D.Doganis, M.Konstantinou, M.Palatianou, N.Paleologou, P.Ziakas, D.Gourgiotis, H.Kosmidis

7. 4th Europaediatrics 2009, Moscow, Russia, July 2009

SERUM SURVIVIN LEVELS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: CORRELATION TO RESPONSE TO THERAPY (Poster Area)

Vraila Venetia-Maria, Gourgiotis Dimitrios, Baka Margarita, Orfanakou Archontoula, Paleologou Nikoletta, Ziakas Panagiotis, Kosmidis Eleni

8. 4th Europaediatrics 2009, Moscow, Russia, July 2009

SERUM EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN IN INHALANT ALLERGIC CHILDREN (G138-1)

Paleologou N., Antonaki G., Lebessi H., Margoni A., Kallergi K., Vraila V., Gourgiotis D.

9. XXVII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Barcelon, Spain, June 2008

EGG ALLERGY IN CHILDREN IN GREECE (Poster Area 415)

Paleologou N., Antonaki G., Kallergi K., Vraila V., Alatzatzoglou A., Tsonopoulos E., Gouriotis D.

10. XXVII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Barcelon, Spain, June 2008

SERUM IL-15 IN INHALANT ALLERGIC CHILDREN (Poster Area 842)

Paleologou N., Antonaki G., Vraila V., Lebessi E., Marmarinos A., Kallergi K., Doxara A., Touluka S., Gouriotis D.

11. XXVI Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Goetemborg, Sweden , June 2007

SENSITISATION TO COMMON INDOOR ALLERGENS IN ATOPIC CHILDREN IN GREECE (Poster Area)

Paleologou N., Antonaki G., Kallerg K., Vraila V., Gouriotis D., Foustoukou M.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ/POSTER ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 47^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χανια, 19-21 Ιουνίου 2009

“ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ SURVIVIN ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΠΑΙΔΙΩΝ ΜΕ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ:ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ?”(Poster Area AA172)

Βενετία-Μαρία Βράϊλα, Δημήτριος Γουργιώτης, Μαργαρίτα Μπάκα, Αρχοντούλα Ορφανάκου, Μαρία Κωνσταντίνου, Μαρία Παλατιανού, Παναγιώτης Ζιάκας, Νικολέττα Παλαιολόγου, Ελένη Κοσμίδου

2. 46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κέρκυρα, 13-15 Ιουνίου 2008

“ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IL-15 ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΕ ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ”(Poster Area AA015)

Ν.Παλαιολόγου, Γ.Αντωνάκη, Β-Μ.Βράϊλα, Α.Μαρμαρινός, Κ.Καλλέργη, Δ.Γουργιώτης

3. 46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κέρκυρα, 13-15 Ιουνίου 2008

“ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΟ ΑΥΓΟ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ”(Poster Area AA029)

Ν.Παλαιολόγου, Γ.Αντωνάκη, Β-Μ.Βράϊλα, Α.Μαρμαρινός, Κ.Καλλέργη, Δ.Γουργιώτης

4. 46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κέρκυρα, 13-15 Ιουνίου 2008

“ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΙΚΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΠΑΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ”(Poster Area AA030)

Ν.Παλαιολόγου, Γ.Αντωνάκη, Β-Μ.Βράϊλα, Τ.Σκαλίδης, Π.Τσιάλτα, Κ.Καλλέργη, Δ.Γουργιώτης

5. 45^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 25-27 Μαΐου 2007

“ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΕΝΔΟΟΙΚΙΑΚΑ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ” (Poster Area AA008)

Ν.Παλαιολόγου, Α.Μαρμαρινός, Β.-Μ.Βράϊλα, Φ.Στέφου, Δ.Γουργιώτης, Φ.Σαζώνη-Παπαγεωργίου

6. 45^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 25-27 Μαΐου 2007

“ΖΗΤΗΣΗ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΟ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΤΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΕΙΓΟΝΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ” (Poster Area AA182)

Καπτανής Σ., Γιαννούλης Γ., Βράϊλα Β-Μ., Γεωργούντζου Α., Ρουμελιώτης Α., Λιαράκος Ν., Σωτηριανάκος Σ., Τορνάρης Γ., Σολωμού Γ.

7. 33^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2-5 Μαΐου 2007

“ΠΡΟΣΕΛΕΥΣΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΤΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΕΙΓΟΝΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ” (Poster Area)

Γ.Γιαννούλης, Σ.Καπτανής, Β-Μ.Βράϊλα, Α.Γεωργούντζου, Α.Ρουμελιώτης, Ν.Λιαράκος, Σ.Σωτηριανάκος, Μ.Σαλαπάτα, Γ.Τορνάρης, Γ.Σολωμού

8. 33^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2-5 Μαΐου 2007

“ΑΝΟΣΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Α ΚΑΙ Β ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΟΜΑΔΑ ΑΘΙΓΓΑΝΩΝ ΤΟΥ ΔΗΜΟΥ ΣΠΑΡΤΗΣ”(Poster Area)

Μ.Παπασωτηρίου, Α.Κουκουσέλης, Π.Κάρκουλας, Β-Μ.Βράιλα, Γ.Αλτουβάς, Αικ.Κοκκορού, Μ.Γαζέτα, Μ.Λαμπρινάκου, Μ.Σαλαπάτα.

9. 4^ο πολυθεματικό Ιατρικό Συνέδριο Λακωνίας, Σπάρτη, 23-24 Ιουνίου 2006

“ΟΥΡΟΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ : ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΟΥΡΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ”(Poster Area)

Γ.Αλτουβάς, Ε.Λιναρδή, Η.Μουντζούρης, Β.Βράιλα, Μ.Κουνάβη, Σ.Φωκάς, Μ.Καλκάνη, Μ.Διονυσοπούλου

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- XXIV Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Munich, Germany , Ιούνιος 2005
- XXV Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Vienna, Austria , Ιούνιος 2006
- XXVI Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Goetemborg, Sweden , Ιούνιος 2007
- 33ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2007
- 45ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χαλκιδική , Μάιος 2007
- XXVII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Barcelona, Spain, Ιούνιος 2008
- 46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κέρκυρα, Ιούνιος 2008
- 47^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χανιά, Ιούνιος 2009
- 4th Europaediatrics, Moscow, Russia, Ιούλιος 2009
- Excellence in Paediatrics, Florence, Italy, 3-6 December, 2009
- Journees Dermatologiques De Paris 2009
- 17th Pediatric Rheumatology European Society (PreS) Congress, Valencia, Spain, 9-12 September 2010
- 18th Pediatric Rheumatology European Society (PreS) Congress, Bruges, Belgium, 14-18 September 2011
- Συμμετοχή σε όλα τα συνέδρια της Β'Παιδιατρικής Πανεπιστημιακής Κλινικής από το 2004 έως σήμερα.

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

2/2008 - 10/2008: Έμμισθη Επιστημονική Συνεργάτης της Β'ΠΠΚ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

2008 - 2009: Medical Advisor για την εταιρεία Medwork (part-time απασχόληση)

2004 - 2005: Διδασκαλία ανατομίας και κλινικής παθολογίας στο δημόσιο ΙΕΚ Αγ.Αναργύρων στις ειδικότητες Ιατρικών Οργάνων και Απεικονίσεων, Διαιτολογίας και Κλινικής Διατροφής

- Μεταφράσεις ιατρικών κειμένων για εκδοτικούς οίκους και ιδιώτες.
- Φαρμακευτικός αντιπρόσωπος, της εταιρίας ANACHEM, σε Ιατρικά Συνέδρια

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ/ΜΕΛΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

- Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών από το 2004
- Μέλος της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (EAACI) (2005-2010)
- Μέλος της Ευρωπαϊκής Παιδορευματολογικής Εταιρίας (Pediatric Rheumatology European Society) από το 2010

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ANA : Αντιπυρηνικά αντισώματα
Anti-CCP : Αντισώματα έναντι του κυκλικού κιτρουλλινιομένου πεπτιδίου
APAF-1: Αποπτωτική πρωτεάσης ενεργοποίησης παράγοντα-1
CRP : C-Αντιδρώσα πρωτεΐνη
DISC : Σύμπλεγμα ενεργοποίησης επαγωγής του θανάτου
ESR : Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ)
FasL : Υποδοχέας της πρωτεΐνης Fas
FLICE : Πρωτεΐνη εξαρτώμενη από τον επαγόμενο μέσω Fas θάνατο
FLIP : Επαγωγέας της πρωτεΐνης FLICE
FLS : Αρθροκύτταρα ομοιάζοντα με ινοβλάστες (αρθροβλάστες)
Hgb : Αισφαιρίνη
IAPs : Πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης
IgG : Ανοσοσφαιρίνη γ
IL-: Ιντερλευκίνη -
ΜΣΑΦ : Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη
NIA : Νεανική Ισιοπαθής Αρθρίτιδα
PLT : Αιμοπετάλια
PA : Ρευματοειδής αρθρίτιδα
RF : Ρευματοειδής παράγοντας
ΣΕΛ : Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
SD : Σταθερή απόκλιση
sFasL : Διαλυτός υποδοχέας της πρωτεΐνης Fas
TNF-a : Παράγοντας-α νέκρωσης του όγκου
TRAFs : Παράγοντες σχετιζόμενοι με τον υποδοχέα TNF
TRAIL : Υποδοχέας
VEGF : Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
WBC : Λευκά αιμοσφαίρια

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρόνια αρθρίτιδα αποτελεί το πιο συχνό χρόνιο ρευματικό νόσημα της παιδικής ηλικίας και ένα από τα πιο συχνά χρόνια νοσήματα των παιδιών. Στην πορεία της προκαλεί μικρότερου ή μεγαλύτερου βαθμού αναπηρία, για μικρό ή μεγάλο διάστημα [1].

Ο όρος Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα χρησιμοποιείται από το 1994, και έχει αντικαταστήσει τους όρους Νεανική Χρόνια Αρθρίτιδα και Νεανική Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα στην Ευρώπη και τη Β.Αμερική αντίστοιχα [2]. Σημειώνεται ότι η χρόνια αρθρίτιδα στα παιδιά διαφέρει κλινικά, γενετικά και πιθανώς παθογενετικά από τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα των ενηλίκων, με εξαίρεση ίσως την οροθετική στον ρευματοειδή παράγοντα πολυαρθρίτιδα.

Με στόχο την ορθότερη και ασφαλέστερη διάγνωση, μελέτη και αντιμετώπιση της χρόνιας αρθρίτιδας στα παιδιά, προτάθηκαν κατά το παρελθόν διαφορετικά κριτήρια ταξινόμησής της. Επικρατέστερο όλων, αυτό της International League of Associations for Rheumatology (ILAR) και οι αναθεωρήσεις του, το οποίο εφαρμόστηκε και στην παρούσα μελέτη [3]. Σύμφωνα με αυτό διακρίνονται οι ακόλουθες κατηγορίες.

α) **Συστηματική αρθρίτιδα:** αποτελεί μία από τις πιο περίπλοκες μορφές ΝΙΑ, και ίσως νόσους της παιδικής ηλικίας. Η ποικιλία και η βαρύτητα των εξωαρθρικών εκδηλώσεων της κατατάσσουν την οντότητα αυτή ως μία συστηματική νόσο με συνοδό παρουσία μέτριας έως σοβαρής φλεγμονής των αρθρώσεων. Εκπροσωπεί το 10-20% του συνόλου των νεανικών ιδιοπαθών αρθρίτιδων στους καυκάσιους πληθυσμούς [4]. Σύμφωνα με τα κριτήρια κατά ILAR για τη διάγνωση απαιτείται η παρουσία αρθρίτιδας και καθημερινού πυρετού, διάρκειας τουλάχιστον 2 εβδομάδων, σε παιδί ηλικίας μικρότερης των 16 ετών, καθώς και ένα από τα ακόλουθα: τυπικό ρευματικό εξάνθημα, γενικευμένη λαμφαδενοπάθεια, ηπατο- ή σπληνομεγαλία, ή ορογονίτιδα. Σπάνιες, αλλά σοβαρές δευτεροπαθείς επιπλοκές της, αποτελούν η στασιμότητα στην αύξηση, η οστεοπόρωση, οι δυσμορφίες, και η απώλεια λειτουργικότητας. Πληθυσμιακές μελέτες από την Ευρώπη δείχνουν ετήσια επίπτωση της συστηματικής ΝΙΑ 0.3-0.8 περιπτώσεων ανά 100.000 παιδιών ηλικίας μικρότερης των 16 ετών [1].

β) **Ολιγοαρθρίτιδα:** ορίζεται ως χρόνια φλεγμονώδης αρθρίτιδα αγνώστου αιτιολογίας, με έναρξη πριν την ηλικία των 16ετών, και προσβολή λιγότερων από 4

αρθρώσεων τους πρώτους 6 μήνες της νόσου. Διακρίνεται σε *επίμονη* εάν συμμετέχουν λιγότερες από 4 αρθρώσεις καθόλη τη διάρκεια της νόσου, και σε *επεκταθείσα* εάν μετά τους πρώτους 6 μήνες προσβληθούν περισσότερες των 4 αρθρώσεις. Αποτελεί το 50-80% των παιδιών με χρόνια αρθρίτιδα, καυκάσιας καταγωγής, με ετήσια επίπτωση 7-23/100.000, σύμφωνα με μελέτες σε ευρωπαϊκές χώρες [5].

γ) **Πολυαρθρίτιδα**: πρόκειται για τη χρόνια αρθρίτιδα της παιδικής ηλικίας που προβάλλει με προσβολή περισσότερων από 4 αρθρώσεων κατά τους πρώτους 6 μήνες της νόσου. Διακρίνεται σε **οροαρνητική** και **οροθετική** για τον ρευματοειδή παράγοντα. Αποτελεί το 20% των περιπτώσεων NIA, με περίπου 85% αυτών οροαρνητικές, αναλογία που ποικίλει στις διαφορετικής εθνικότητας πληθυσμιακές ομάδες. Η ετήσια επίπτωση της οροαρνητικής μορφής σε καυκάσιους πληθυσμούς εκτιμάται περίπου 1-4/100.000 [1].

δ) **Ψωριασική αρθρίτιδα**: πρόκειται για αρθρίτιδα διάρκειας τουλάχιστον 6 εβδομάδων, που εμφανίζεται σε ηλικία μικρότερη των 16 ετών, με συνοδό ψωρίαση ή δακτυλίτιδα, ονυχόλυση, ή ψωρίαση σε 1^{ου} βαθμού συγγενή. Εκπροσωπεί περίπου το 7% των ασθενών με NIA [1].

ε) **Ενθεσίτιδα σχετιζόμενη με αρθρίτιδα**: με συμμετοχή της σπονδυλικής στήλης, παρουσία HLA-B27, ιριδοκυκλίτιδα, έκφραση σε αγόρια μεγαλύτερα των 8 ετών, ή θετικό οικογενειακό ιστορικό για HLA-B27. Αποτελεί περίπου το 10.6% των παιδιών με NIA, σε μία πρόσφατη μελέτη [6].

στ) **Αταξινόμητη αρθρίτιδα**: πρόκειται για περιπτώσεις που δεν πληρούν τα κριτήρια καμίας από τις ανωτέρω ομάδων, ή πληρούν τα κριτήρια περισσότερων της μίας.

Στην παρούσα μελέτη συμμετέχουν παιδιά, που ανήκουν στις 3 πρώτες ομάδες.

Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου παραμένει άγνωστος, παρόλα αυτά είναι σχεδόν βέβαιο ότι πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα, και ίσως αυτός διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων έκφρασης. Η θεραπευτική προσέγγιση της NIA βασίζεται σε συνδυασμό φαρμάκων, τα οποία παρόλο που δε θεραπεύουν τη νόσο, βελτιώνουν σημαντικά την πρόγνωση αυτής. 40-60% των ασθενών εμφανίζουν μη ενεργό νόσο, ή κλινική ύφεση τα τελευταία 10 χρόνια, ενώ λιγότεροι από 10% παρουσιάζουν σοβαρή νόσο ή αναπηρία μετά από 15 χρόνια [2,7].

Η κατανόηση των μηχανισμών της ανοσολογικής απάντησης και της φλεγμονώδους διαδικασίας, καθώς και νέες θεραπείες που θα στοχεύουν σε συγκεκριμένα μοριακά

μονοπάτια, προσφέρουν σίγουρα νέα δεδομένα στη παθογένεια της νόσου και τη θεραπευτική προσέγγιση αυτής, βελτιώνοντας εντυπωσιακά την πρόγνωσή της.

1. Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

1.1 Αιτιολογία και παθογένεια της ΝΙΑ

Τόσο η αιτιολογία όσο και η παθογένεια της ΝΙΑ έχουν μόνο σε μερικό βαθμό κατανοηθεί. Φαίνεται όμως ότι συμμετέχουν γενετικά και περιβαλλοντικά αίτια, ενώ η ετερογένειά της ενοχοποιεί πολλαπλούς διαφορετικούς παράγοντες. Κάθε ένας από αυτούς επιδρά σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα με διαφορετική γενετική σύνθεση, που τροποποιείται από προηγούμενες αντιγονικούς ερεθισμούς, ορμονικές διαταραχές, Stress, ή/και ανοσολογική ωριμότητα. Η σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση ενός αυτοάνοσου νοσήματος αποδεικνύεται τόσο σε μελέτες μονοζυγωτικών διδύμων, που σημειώνεται μικρή αύξηση στην έκφραση της νόσου, όσο και σε μετακινούμενους πληθυσμούς, οι οποίοι αποκτούν την υπάρχουσα επίπτωση της περιοχής που εγκαταστάθηκαν.

1.1.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Μελέτες για τις περιβαλλοντικές επιδράσεις στην παθογένεια της νόσου, όπως ο ρόλος του μητρικού θηλασμού και το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δείχνουν συσχέτιση μετρίως στατιστικά σημαντική [1]. Φαίνεται ότι παράγοντες που με τη δράση τους σχετίζονται με την εμβρυϊκή διάπλαση και την εβδομάδα κύησης, να είναι σημαντικοί στην αιτιολογία της ΝΙΑ [8].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των λοιμογόνων παραγόντων. Δεν έχει αποδειχτεί η εποχιακή κατανομή της νόσου, η οποία θα μπορούσε να τη συνδέσει με την παρουσία κάποιου μικροβιακού ή ιογενούς αιτίου, παρόλα αυτά οι αυξημένοι τίτλοι αντισωμάτων για συγκεκριμένους λοιμογόνους παράγοντες, όπως οι ιοί της ερυθράς, παρωτίτιδας, οι αδενοϊοί, ο Coxsackie ιοί, ο Parvo B19, ο ιός Epstein-Barr και το μυκόπλασμα της πνευμονίας, θέτουν την υποψία ότι μπορεί να αποτελούν αιτία ή εκλυτικό παράγοντα με τη δράση-παρουσία τους κατά το παρελθόν. Η επικρατέστερη θεωρία για τον μηχανισμό δράσης τους, είναι αυτή της μοριακής μίμησης. Σύμφωνα με αυτή μία ή περισσότερες πρωτεΐνες αντιγόνα του λοιμογόνου παράγοντα, με σημαντική ομολογία στην αλληλουχία τους με αυτοαντιγόνα,

προκαλούν διασταυρούμενη αντίδραση προς αυτά, με αποτέλεσμα την εκδήλωση του αυτοάνοσου νοσήματος [9,10,11,12,13]. Άλλωστε ο κυτταρικός θάνατος λόγω της ιστικής καταστροφής, που προκαλείται δευτεροπαθώς από τη λοίμωξη, οδηγεί στην απελευθέρωση αυτοαντιγόνων, και πιθανή ενεργοποίηση «αυτοαντιδρώντων» λεμφοκυττάρων. Μία άλλη ιδιαίτερα ελκυστική θεωρία, βασίζεται στην παρουσία και δράση των υπεραντιγόνων των ιών-βακτηρίων. Πρόκειται για αντιγόνα που συνδέονται με το Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (HLA), και ενεργοποιούν αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα [14,15].

1.1.2 Γενετικοί παράγοντες

Η οικογενής χρόνια αρθρίτιδα είναι ιδιαιτέρως σπάνια. Σε μελέτες αδελφών που εκδήλωσαν ΝΙΑ, σημειώνεται αυξημένη επίπτωση στην ολιγοαρθρική μορφή [2]. Φαίνεται ότι αδέρφια και πρώτα ξαδέλφια παιδιών με ΝΙΑ, να έχουν αυξημένο σχετικό κίνδυνο για εμφάνιση ΝΙΑ [16,17], ενώ η κλινικές εκδηλώσεις και ο τύπος της νόσου μεταξύ αυτών είναι ταυτόσημα [18,19], υπογραμμίζοντας το γενετικό υπόστρωμά της. Η μελέτη συγκεκριμένων γενετικών τόπων δεν αποδεικνύει σαφή αιτιοπαθογένεια, δείχνει όμως ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία τους μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων [20]. Η συμμετοχή του HLA και γονιδίων συγκεκριμένων κυτοκινών, φαίνεται να είναι μεγίστης σημασίας για την εμφάνιση και τον τύπο την νόσου, καθώς και την ανταπόκριση αυτής στη θεραπεία [21,22,23,24].

1.1.3 Ανοσολογικοί παράγοντες

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι αυτό που κυριαρχεί στη φλεγμονώδη απάντηση, η οποία αποτελεί και τον ακρογωνιαίο λίθο στην παθοφυσιολογία της ΝΙΑ. Σχεδόν ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους ανοσολογικής απάντησης, ενεργοποιείται παλλίνδρομος μηχανισμός ρύθμισης, με στόχο τον αυτοπεριορισμό της. Φαίνεται ότι στην περίπτωση της ΝΙΑ, η ισορροπία αυτή είναι διαταραγμένη.

Η υπεργαμμασφαιριναιμία και η παρουσία αυτοαντισωμάτων είναι συχνά ευρήματα στον ορό παιδιών με ΝΙΑ [1]. Συγκεκριμένα αυτοαντισώματα, όπως τα αντιπυρηνικά

(ANA), τα anti-CCP (anti-cyclic citrullinated peptide) και ο ρευματικός παράγοντας (RF), σχετίζονται με συγκεκριμένη έκφραση και βαρύτητα της νόσου [25,26,27]. Ο φλεγμαίνων αρθρικός θύλακος βρίθει από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως T- και B-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα [2], υπογραμμίζοντας τον κυρίαρχο ρόλο τους. Η παραγωγή από αυτά κυτοκινών και άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση είναι βαρύτατης σημασίας για την παθογένεια της ΝΙΑ, γεγονός που αποδεικνύεται από την επιτυχία των νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με βιολογικούς παράγοντες [28,29,30,31]. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στο προφίλ κυτοκινών της συστηματικής μορφής ΝΙΑ, όπου κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι IL-6, IL-18 και η IL-1, ερμηνεύοντας τις εξωαρθρικές εκδηλώσεις της και τις ομοιότητες της με τα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα [2,32].

Η απάντηση στην έντονη ανοσολογική δράση, με αυξημένη παραγωγή κυττάρων και πρωτεϊνών, είναι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης, με στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.2 Απόπτωση

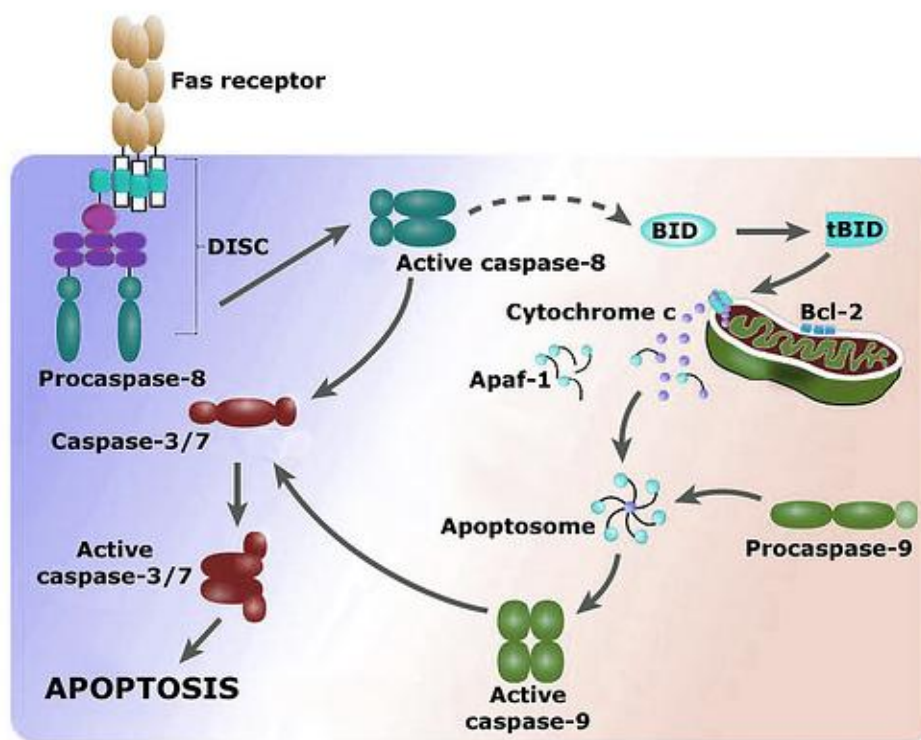
Πρόκειται για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Είναι ένας φυσιολογικός και απόλυτα ελεγχόμενος μηχανισμός, απαραίτητος τόσο για την αύξηση, όσο και την επιβίωση κάθε πολυκύτταρου οργανισμού, μία ενεργός διαδικασία καταστροφής «ανεπιθύμητων» ή «πλεοναζόντων» κυττάρων. Σαν όρος χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1972 από τον Kerr για να περιγράψει έναν ιδιαίτερο τρόπο κυτταρικού θανάτου, στην πραγματικότητα μία ελεγχόμενη «αυτοκαταστροφή», κατά την οποία το κύτταρο τεμαχίζεται σε μικρά αποπτωτικά σωματίδια, περιβαλλόμενα από κυτταρική μεμβράνη. Είναι μία διαδικασία γενετικά καθορισμένη, που χαρακτηρίζεται από μορφολογικά και βιοχημικά κριτήρια, και μπορεί να θεωρηθεί ως ο αντίποδας την μίτωσης. Το κύτταρο συρρικνώνεται και η χρωματίνη συμπυκνώνεται και παρατάσσεται στην πυρηνική μεμβράνη. Στη συνέχεια ο πυρήνας με το DNA και το κυτταρόπλασμα σπάνε σε μικρά κομμάτια. Είναι μία διαδικασία τελείως διαφορετική από τη νέκρωση του κυττάρου. Η νέκρωση είναι μία παθολογική διαδικασία κυτταρικού θανάτου, μετά από υποξία ή λοίμωξη, κατά την οποία το κύτταρο τεμαχίζεται και τα συστατικά του απελευθερώνονται στο χώρο [33,34,35].

Η απόπτωση λαμβάνει χώρα μέσω δύο διακριτών βιοχημικών μονοπατιών, το ενδογενές και το εξωγενές, τα οποία βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση. Και στα δύο κυρίαρχο ρόλο έχει μία ομάδα πρωτεϊνών της κυστεΐνης, οι κασπάσες, οι οποίες αποτελούν τους «εκτελεστές» της απόπτωσης [36,37,38].

Στα μιτοχόνδρια λαμβάνει χώρα το ενδογενές μονοπάτι, το οποίο ενεργοποιείται από την καταστροφή του DNA, την υποξία, και άλλες καταστάσεις στρες του οργανισμού. Οι πρωτεΐνες p53 και οι προαποπτωτικές της οικογένειας Bcl-2 (B cell lymphoma-2) με τη δράση τους στη μιτοχονδριακή μεμβράνη επιτρέπουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C (Cytochrome-C) και της πρωτεΐνης SMAC/DIABLO στο κυτταρόπλασμα. Το Cytochrome-C με τη σύνδεσή του στο Apaf-1 (Apoptotic protease to activate factor-1) σχηματίζουν το αποπτόσωμα, το οποίο ενεργοποιεί την procaspase 9 σε Caspase 9. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των Caspase 3, Caspase 6 και Caspase 7.

Το άλλο μονοπάτι, το εξωγενές, ενεργοποιείται με τη δράση εκκινητών της απόπτωσης στους κυτταρικούς υποδοχείς τους (πχ. Fas/Ligand- Fas) στα κύτταρα στόχος, και τον ακόλουθο σχηματισμό του συμπλέγματος DISC (death-inducing

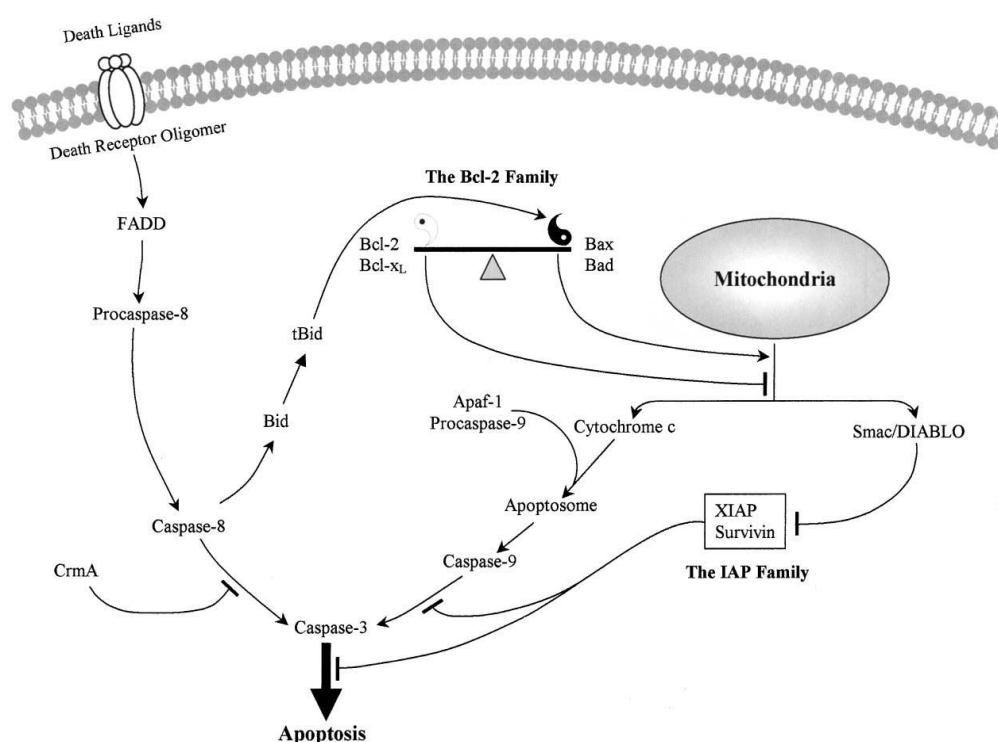
signaling complex). Με την κινητοποίηση και ένωση του μορίου FADD (Fas-associated death domain protein) στο σύμπλεγμα DISC επιστρατεύεται η procaspase 8, η οποία αυτοκαταλύεται και ενεργοποιείται. Η ενεργός πλέον Caspase 8 απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα DISC και ενεργοποιεί των καταρράκτη των κασπασών καταλύοντας την Caspase 3. Και τα δύο μονοπάτια ακολουθεί ένας καταρράκτης βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύουν τη διάσπαση του DNA καθώς και την μετουσίωση δομικών πρωτεϊνών, με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή του κυττάρου. (Εικ.1.1)



Εικ.1.1 Τα μονοπάτια ενεργοποίησης των κασπασών , ενδογενές και εξωγενές, και η απόπτωση [39]

Ο μεταβολικός καταρράκτης της απόπτωσης βρίσκεται συνεχώς υπό την εποπτεία ομάδων πρωτεϊνών, των αντιαποπτωτικών. Πρόκειται για τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 (όπως οι Bcl-2, Bcl-w), που ελέγχουν το ενδογενές μονοπάτι, τις πρωτεΐνες FLIP (FLICE inhibitory proteins), που αποτελούν τους κύριους

ρυθμιστές του εξωγενούς μονοπατιού, παρεμβαίνοντας στο σχηματισμό του συμπλέγματος DISC, καθώς και τις πρωτεΐνες αναστολής της απόπτωσης (IAP, inhibitors of apoptosis proteins), που δρουν ανταγωνιστικά τόσο στο ενδογενές όσο και στο εξωγενές μονοπάτι. Το μιτοχονδριακό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα SMAC/DIABLO είναι ο κύριος αναστολέας των IAPs. Με τη συνεχή διαδραστική σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών (αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών) διασφαλίζεται η λειτουργία και η ισορροπία της απόπτωσης. (Εικ.1.2)



Εικ.1.2 Η διαδραστική σχέση των πρωτεϊνών στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, σε λεπτή ισορροπία, μεταξύ των δύο αποπτωτικών μονοπατιών -του μιτοχονδρίου και του ειδικού μεμβρανικού υποδοχέα- και των αντιαποπτωτικών μορίων [36].

Η απόπτωση λοιπόν με την ενεργοποίηση είτε του ενδογενούς είτε του εξωγενούς μεταβολικού μονοπατιού αποτελεί βασική λειτουργία του κυττάρου. Παρόλα αυτά υπάρχουν πληθυσμοί κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα ηπατοκύτταρα, που αντιστέκονται στην επαγόμενη μέσω του εξωγενούς μονοπατιού απόπτωση, και

οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο μόνο με την ενεργοποίηση του ενδογενούς, σημειώνοντας έτσι μία διαφοροποίηση ως προς την απαντητικότητα στα αποπτωτικά σήματα [40].

Πλήθος ρυθμιστικών παραγόντων επηρεάζουν την επιλογή για το ποια κύτταρα θα οδηγηθούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και ποια θα επιβιώσουν. Διαταραχή στην ισορροπία αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πλήθους νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, λοιμώξεων, νευροεκφυλιστικών διαταραχών, και αυτοάνοσων νοσημάτων [41,42].

1.2.1 Απόπτωση και αυτοάνοσα νοσήματα

Διαταραχή στον μηχανισμό της απόπτωσης εκφράζεται είτε με επιτάχυνση του ρυθμού της, είτε με έκτοπη θέση της ή μη φυσιολογική διαδικασία, σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, συντελώντας στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων. Οι σχετικές μελέτες αφορούν τόσο στους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς όσο και στα διάφορα νοσήματα.

Μετά την έκθεση σε αντιγόνο ειδικοί προς αυτό κλώνοι T- και B- λεμφοκυττάρων πολλαπλασιάζονται ραγδαία έως και 1000 φορές μέσα σε μία εβδομάδα. Με την πάροδο μερικών μηνών ο αριθμός τους επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα, αφήνοντας βέβαια λειτουργικά κύτταρα μνήμης. Αυτή η ταχεία μείωση των ειδικών προς αντιγόνο λεμφοκυττάρων οφείλεται στον μηχανισμό της απόπτωσης, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα λεμφοκύτταρα υπό τη δράση κυτοκινών χάνουν τη δυνατότητα έκφρασης ειδικών αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, που ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των Bcl-2 και οδηγούνται σε παθητικό κυτταρικό θάνατο. Είναι ίσως ο πιο σημαντικός μηχανισμός ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης [1].

Σε μελέτη των μονοπύρηνων κυττάρων σε διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα, τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνών όσο και σε επίπεδο γονιδίων, φαίνεται ότι οι κυτοκίνες και τα αντιαποπτωτικά γονίδια εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα η απόπτωση και η χημειοταξία, ενώ είναι ενεργοποιημένες, χρησιμοποιούν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια. Διαφορετικά όχι μόνο συγκρινόμενα με αυτά των υγιών μαρτύρων, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών αυτοάνοσων νοσημάτων [43].

Η μελέτη του ρόλου της απόπτωσης στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) των ενηλίκων, έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών μελετητών, και τα αποτελέσματά τους παρέχουν ιδιαίτερες χρήσιμες πληροφορίες. Τρία είναι τα βασικά χαρακτηριστικά στην παθοφυσιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας: Η διήθηση της άρθρωσης από φλεγμονώδη λευκοκύτταρα, η υπερπλασία των αρθρικών κυττάρων, με τη συνοδό παρουσία των ομοιαζόντων με ινοβλάστες κυττάρων (Fibroblast-like cells, FLS) και η εκτεταμένη νεοαγγειογένεση [44,45].

Η διαταραχή της απόπτωσης των FLS αποτελεί σημαντικό παράγοντα αυτής της διαδικασίας [46]. Τα κύτταρα του αρθρικού θυλάκου στη ΡΑ φαίνεται ότι αποπίπτουν με εξαιρετικά αργό ρυθμό. Αυτό ερμηνεύεται από την παρατηρούμενη υπερέκφραση της Bcl-2 από τους αρθρικούς ινοβλάστες, πρωτεΐνης που καταστέλλει την

απόπτωση, προκαλώντας υπερπλασία του αρθρικού θύλακου. Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο τόσο στη φυσική πορεία της νόσου, όσο και στο μορφολογικό της προφίλ [47]. Πειραματικές μελέτες καταστολής του Bcl-2, αυξάνουν την απόπτωση και βελτιώνουν την κλινική εικόνα [48].

Η πρωτεΐνη Fas (CD95) εκφράζεται έντονα στον αρθρικό θύλακο ασθενών με PA, καθώς και στα φλεγμονώδη κύτταρα που τον διηθούν, σε αντίθεση με την Fas-Ligand (FasL/CD95L), διαταράσσοντας την ισορροπία της απόπτωσης. Η σημασία της διαταραχής αυτής στην παθογένεια και πορεία της νόσου επιβεβαιώνεται με μελέτη γονιδιακής θεραπείας σε ποντίκια, όπου η συνεχής χορήγηση-έκφραση του γονιδίου FasL, αυξάνει την απόπτωση στο θύλακο, προκαλώντας «μοριακή θυλακιοεκτομή» και αναστολή της φλεγμονώδους διαδικασίας [49,50].

Η σημασία του συστήματος Fas/FasL στην πορεία και κλινική εικόνα της PA μπορεί να εκτιμηθεί μελετώντας τον διαλυτό Fas στον ορό ασθενών με PA (serum-soluble Fas, sFas). Οι ασθενείς με ενεργό νόσο εμφανίζουν υψηλούς τίτλους sFas, και μάλιστα φαίνεται να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους σε ασθενείς με ιστορικό PA και ανενεργό νόσο. Επίσης σημαντικές είναι οι διαφορές του τίτλου σχετιζόμενες με την βαρύτητα της καταστροφής της άρθρωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές δίνουν στο σύστημα Fas/FasL, και συνεπώς στην απόπτωση, κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου [51].

Παρόλο που μελέτες δείχνουν ότι στη PA τα T-λεμφοκύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον αρθρικό θύλακο παράγουν FasL που συνδέεται με το αντιγόνο Fas του αρθροκυττάρου και κυρίως με τα FLS, προκαλώντας απόπτωση, παράλληλα η IL-1b αναστέλλει την έκφραση του Fas αντιγόνου [52]. Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι τα ίδια τα αρθροκύτταρα παράγουν κυτοκίνες που μπλοκάρουν τον κυτταρικό τους θάνατο (πχ.IL-19) [53]

Σε πρόσφατη μελέτη σε FLS ασθενών με PA, σημειώνεται υπερέκφραση του SUMO-1, πρωτεΐνης που συμβάλλει στην αντίσταση των κυττάρων αυτών στη Fas μεσολαβούμενη απόπτωση [54,55]. Ομοίως ο διαλυτός υποδοχέας DcR3 (Decoy Receptor 3), συνδεόμενος με την FasL, αναστέλλει τη Fas μεσολαβούμενη απόπτωση, και φαίνεται ότι υπερεκφράζεται στη PA [56].

Ενώ οι Fas/FasL αποτελούν σημαντικό ζεύγος εκκίνησης της απόπτωσης, οι παραπάνω μελέτες δείχνουν διαφορετικούς μηχανισμούς αναστολής της δράσης τους κατά την πορεία της PA, δίνοντας σε αυτές, καθώς και στην απόπτωση, ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Δύο άλλες πρωτεΐνες του μηχανισμού της απόπτωσης φαίνεται να παίζουν με τη σειρά τους ρόλο στην παθογένεια της νόσου, διαταράσσοντας την εξέλιξη της αποπτωτικής διαδικασίας. Η κασπάση 7 αποτελεί την τελική κασπάση στον καταρράκτη κασπασών και οδηγεί μαζί με την κασπάση 3 στην απόπτωση του κυττάρου. Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου για την κασπάση 7 ανιχνεύονται συχνότερα σε ασθενείς με PA, επηρεάζοντας ίσως τη δράση της [57]. Η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 φαίνεται να αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο των αρθροκυττάρων (FLS) και να μειώνει την υπερπλασία του αρθρικού θυλάκου [58]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της έκφρασης του FLIP (FLICE-inhibitory protein, FLICE=caspase8), μίας πρωτεΐνης αναστολέα της απόπτωσης. Η έκφρασή της στον αρθρικό θύλακο ενεργοποιεί την φλεγμονώδη δράση του Fas επί των FLS και αναστέλει την αποπτωτική [59,60]. Στην ουσία η FLIP λειτουργεί σα διακόπτης που τροποποιεί τη δράση του Fas σε φλεγμονώδη ή αποπτωτική.

Καθώς τα λευκοκύτταρα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια και διατήρηση του αυτοάνοσου μηχανισμού, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη τους στη PA. Η διαρκής αλληλεπίδραση των διηθημένων στην άρθρωση λεμφοκυττάρων και μακροφάγων με τα FLS, φαίνεται να λειτουργεί προς δύο κατευθύνσεις: αυτή της διατήρησης της φλεγμονώδους διαδικασίας, και αυτή της αποφυγής της απόπτωσης και άρα επιβίωσης των δύο αυτών κυτταρικών ομάδων [61,62].

Στα λεμφοκύτταρα μέσω της δράσης της Fas/FasL και του TRAIL/TNF- α επάγεται ο ενεργός κυτταρικός θάνατος, που φαίνεται να είναι σημαντικός για τον έλεγχο της δράσης των T-λεμφοκυττάρων [63]. Η φλεγμονή του αρθρικού θυλάκου χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη αντίσταση στην αποπτωτική δράση του συστήματος Fas/FasL [64]. Τα T-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο αρθρικό υγρό ασθενών με PA δείχνουν αντίσταση στην απόπτωση, η οποία αντιστρέφεται κατά την απομάκρυνσή τους από αυτό. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι το μικροπεριβάλλον τροποποιείται από τους ίδιους τους ινοβλάστες με την παραγωγή κυτοκινών, συντελώντας στην επιβίωση των λεμφοκυττάρων [65,66,67]. Όμοια φαίνεται να είναι η δράση του αρθρικού υγρού και στα μακροφάγα καθυστερώντας την απόπτωσή τους [68,69]. Οι τελευταίες αυτές μελέτες αποδίδουν έναν αντιαποπτωτικό ρόλο στο αρθρικό υγρό μέσω των επαγόμενων από τα κύτταρά του κυτοκινών.

Τα B-λεμφοκύτταρα παίζουν επίσης παθογενετικό και ρυθμιστικό ρόλο στα αυτοάνοσα νοσήματα με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και κυτοκινών, καθώς και

με την αντιγονο-παρουσιαστική δράση τους στα T-λεμφοκύτταρα. Η υπερέκφραση σε αυτά του Bcl-2 και Bcl-xl από τη μία τα καθιστά ανθεκτικά στην απόπτωση, ενώ από την άλλη οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή κυτοκινών (IFN- γ) και την επαγόμενη δράση των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Αυτή η λειτουργία των B-λεμφοκυττάρων παρατείνει τη δράση τους μέσα στην άρθρωση, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τη δράση των T-λεμφοκυττάρων, ερμηνεύοντας τη συνεχή φλεγμονώδη αντίδραση της PA [70,71].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της αποπτωτικής διαδικασίας στη νεοαγγειογένεση που παρατηρείται στη PA. Η πειραματική χορήγηση sFasL (soluble Fas-ligand, διαλυτός υποδοχέας Fas) ανακόπτει την εξέλιξη της αρθρίτιδας σε ποντικούς ενισχύοντας την απόπτωση των αρθροκυττάρων, και εμποδίζοντας τη νεοαγγειογένεση, αυξάνοντας την απόπτωση των κυττάρων που παράγουν VEGF αλλά και εμποδίζοντας τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων εξαρτώμενη από τη VEGF [72,73].

Επιπλέον είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα παρατηρείται στους οστεοβλάστες της άρθρωσης με PA, και παράλληλη αντιαποπτωτική συμπεριφορά των οστεοκλαστών, ερμηνεύοντας της οστεοπόρωση που χαρακτηρίζει τη νόσο [52,74,75]

Από τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές είναι φανερό ότι η διαταραχή της απόπτωσης παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεια της PA, συμμετέχοντας με διαφορετικό τρόπο στην παθοφυσιολογία της. Τα ευρήματα αυτά για τον ιδιαίτερο ρόλο της απόπτωσης στη PA επιβεβαιώνονται και από συγκριτικές μελέτες ασθενών με PA, οστεοαρθρίτιδα και αρθρίτιδα μετά από τραύμα [76].

Σημαντικές αναφορές υπάρχουν και για το ρόλο της απόπτωσης και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Συγκεκριμένα σε μελέτη θυρεοειδικών κυττάρων ασθενών με αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto φαίνεται αυξημένη έκφραση Fas/FasL, μετά από δράση των αυτοααντισωμάτων, οδηγώντας στην καταστροφή τους [77]. Ομοίως αύξηση του sFas στον ορό ασθενών με Συστηματικό ερυθματώδη λύκο φαίνεται να σχετίζεται με λευκοπενία, λόγω κυτταροτοξικής δράσης στο λεμφοκύτταρο, και αυξημένη ιστική καταστροφή [78]. Σε μελέτη σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, αυτοάνοσο νόσημα του νευρικού συστήματος μεσολαβούμενο από T-λεμφοκύτταρα, η διαταραχή της ρύθμισης του μηχανισμού της απόπτωσης φαίνεται να ελέγχεται κεντρικά (επίπεδο γονιδίου). Η αλληλουχία ρύθμισης του κυτταρικού

θανάτου, σε έξαρση ή ύφεση της νόσου, διαφέρει από αυτή των υγιών μαρτύρων. [79]

Μία άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση του ρόλου της απόπτωσης στα αυτοάνοσα νοσήματα αναφέρει ότι κατά τη διαδικασία της απόπτωσης τροποποιούνται τα αυτοαντιγόνα, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων [80]. Συγκεκριμένα η τροποποίηση του U1snRNP, που λαμβάνει χώρα κατά τον κυτταρικό θάνατο, αποτελεί το αυτοαντιγόνο στόχο στον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και στη Μεικτή νόσο του Συνδετικού Ιστού [81]. Επίσης σε μελέτες πάνω στον (ΣΕΛ) φαίνεται ότι η καθυστερημένη ή με λάθος τρόπο απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων, αποτελεί έναν διαρκή αντιγονικό ερεθισμό για τα Β-λεμφοκύτταρα, μία συνεχή ανατροφοδότηση του αυτοάνοσου μηχανισμού [82]. Διαταραχή στην απόπτωση των Τ-και Β-λεμφοκυττάρων, επιτρέπει την επιβίωση αυτών των αυτοαντιδρώντων κυττάρων [52].

Τέλος σημαντικές πληροφορίες για τον κυρίαρχο ρόλο της απόπτωσης στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, και ιδίως της ΡΑ, παρέχει η μελέτη του μηχανισμού δράσης των νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η κλινική παρατήρηση ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντι-TNF και μεθοτρεξάτη και η μελέτη σε επίπεδο κυττάρων-μορίων δείχνουν αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων του αρθρικού θυλάκου σαν απάντηση στη θεραπεία [83,84,85].

1.2.2 Απόπτωση και Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα

Η ΝΙΑ αποτελεί μία ξεχωριστή οντότητα αυτοάνοσου νοσήματος, που εκδηλώνεται σε παιδιά και εφήβους ηλικίας μικρότερης των 16 ετών. Τόσο στις κλινικές εκδηλώσεις/μορφές της, όσο και στη φυσική της πορεία διαφέρει σημαντικά από τη ΡΑ των ενηλίκων. Παρόλα αυτά η παθοφυσιολογική εικόνα της άρθρωσης, του οργάνου στόχου της νόσου, είναι παρόμοια με αυτή της ΡΑ. Παρατηρείται έντονη υπερπλασία και υπερτροφία των κυττάρων του αρθρικού θυλάκου, υπερπλασία και οίδημα των υποκείμενων δομών, νεοαγγειογένεση και υπερπλασία του ενδοθηλίου των αγγείων. Έντονη είναι η παρουσία των λευκοκυττάρων. Τ-βοηθητικά και Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, δενδριτικά και πολυμορφοπύρηνα, ανευρίσκονται στην άρθρωση [86]. Η δράση των κυττάρων αυτών- τροποποιημένων γηγενών και μεταναστών- οδηγεί με το χρόνο σε καταστροφή της άρθρωσης, που ευτυχώς συμβαίνει σπάνια στη ΝΙΑ. Σχετικά με τις εξωαρθρικές εκδηλώσεις της νόσου (εξάνθημα, λεμφαδενίτιδα, ήπατο-σπληνομεγαλία, ορογονίτιδα, υποδόρια οζίδια), παρατηρείται επίσης διαταραχή της αρχιτεκτονικής και υπερπλασία των γηγενών εμπλεκόμενων κυττάρων, καθώς και διήθηση λευκοκυττάρων [1].

Ποιος είναι όμως ο ρόλος της απόπτωσης, τόσο στα παθοφυσιολογικά ευρήματα, όσο και στην κλινική έκφραση και πορεία της νόσου;

Η συμπεριφορά των Τ-λεμφοκυττάρων του αρθρικού υγρού ασθενών με ΝΙΑ όσον αφορά την απόπτωση δίνει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της τελευταίας στην παθογένεια της νόσου. Συγκεκριμένα CD95+ (Fas+) Τ-λεμφοκύτταρα ασθενών και υγιών μαρτύρων εκτέθηκαν σε sCD95L (sFasL). Η απόπτωσή τους στην περίπτωση των ασθενών ήταν ιδιαιτέρως μειωμένη συγκρινόμενη με αυτή των μαρτύρων, ενώ ταυτόχρονα δείχνουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης FLIP [87]. Φαίνεται δηλαδή ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα του αρθρικού υγρού ασθενών με ΝΙΑ δείχνουν αντίσταση στην απόπτωση, είτε λόγω της έκφρασης της αντιποπρωτικής πρωτεΐνης FLIP, είτε μέσω άλλου μηχανισμού.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται από μελέτη λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και αρθρικού υγρού ασθενών με ΝΙΑ. Σημειώνεται αυξημένη απόπτωση αυτών του περιφερικού αίματος λόγω μειωμένης έκφρασης του Bcl-2, αυξημένης έκφρασης του p53 και αυξημένη τιμή IL-15, και μειωμένη απόπτωση αυτών του αρθρικού υγρού. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει διαφοροποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης στην

περιφέρεια και στο αρθρικό υγρό, και πιθανά συμβάλει στην κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου, λόγω συνεχούς φλεγμονώδους αντίδρασης στο χώρο της άρθρωσης [88, 89].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, προσθέτοντας μία άλλη προσέγγιση, παρουσιάζει μελέτη πληθυσμού λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και στο αρθρικό υγρό. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση του ρυθμού απόπτωσης των λεμφοκυττάρων της περιφέρειας και του αριθμού των δενδριτικών κυττάρων που βρίσκονται στο αρθρικό υγρό, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων του αρθρικού υγρού. Επιπλέον θετική συσχέτιση παρατηρείται στη συγκέντρωση/παραγωγή του TNFα στο αρθρικό υγρό και την παρουσία δενδριτικών κυττάρων, με επακόλουθη θετική συσχέτιση με τον ρυθμό απόπτωσης των περιφερικών λεμφοκυττάρων. Η μελέτη αυτή συνδέει την «στρατολόγηση» των δενδριτικών κυττάρων στο αρθρικό υγρό με την αποπώση στην περιφέρεια, μέσω του ακόλουθου μηχανισμού. Τα αποπτωτικά σωματίδια από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα, προσλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στην άρθρωση, και με τον αντιγονοπαρουσιαστικό ρόλο τους ενεργοποιούν τα γηγενή λεμφοκύτταρα, ανατροφοδοτώντας τον αυτοάνοσο μηχανισμό. Η θεωρία αυτή ενισχύεται περισσότερο από την αυξημένη συγκέντρωση TNFα στο αρθρικό υγρό, και την επάγουσα την απόπτωση δράση της στα λεμφοκύτταρα της περιφέρειας [90].

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και εμπλουτίζονται από μία άλλη μελέτη που δείχνει επίσης αύξηση της απόπτωσης των περιφερικών λεμφοκυττάρων με συνοδό αύξηση της IL-15, με στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την μορφή και ενεργότητα της νόσου (πιο υψηλή στη σNIA και την έντονη ενεργότητα) [91].

Μία άλλη ομάδα λευκοκυττάρων που συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της νόσου είναι τα μονοκύτταρα. Σε μελέτη αυτών στο περιφερικό αίμα και στο αρθρικό υγρό ασθενών με ολιγοαρθρική μορφή NIA σημειώνεται αναστροφή του λόγου Fas/sFas, υποδηλώνοντας διαταραχή του ρυθμού της απόπτωσης, η οποία δεν περιορίζεται στην άρθρωση [92]. Ομοίως τα μονοκύτταρα ασθενών με σ.NIA διαπιστώθηκε ότι είναι ανθεκτικά στην απόπτωση, παρά τη δράση διαφόρων παραγόντων. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκλύονται στη σ.NIA αναστέλλουν την απάντηση των μονοκυττάρων στη δράση του FasL, το οποίο εκφράζεται όμοια σε μονοκύτταρα ασθενών και υγιών μαρτύρων. Επιπλέον παρατηρείται διαταραχή και στη λειτουργία του ενδογενούς μονοπατιού, με συνεχή

έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl, και μάλιστα του Bcl-w. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μονοκύτταρα υγιών μαρτύρων με φυσιολογική αποπτωτική λειτουργία σημείωσαν αντοχή στην απόπτωση όταν εκτέθηκαν σε ορό ασθενών με σ.NIA. Φαίνεται λοιπόν ότι η αντοχή στην απόπτωση ενδέχεται να προκύπτει από μηχανισμούς συγκεκριμένους που σχετίζονται με τη σ.NIA και ενδεχομένως να αφορά και στους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν στη νόσο [93].

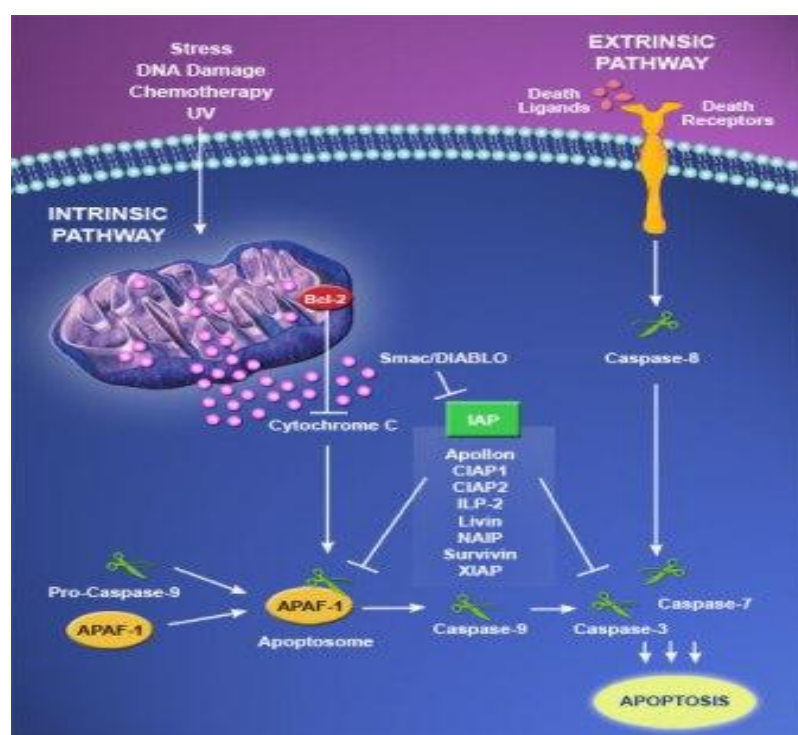
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη σύμφωνα με την οποία τα διηθημένα στην άρθρωση μονοκύτταρα συμπεριφέρονται διαφορετικά σε ότι αφορά τον ρυθμό απόπτωσης τους, ανάλογα με την έκφραση της νόσου. Συγκεκριμένα στην ολιγοαρθρική μορφή παρατηρείται αυξημένη έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, και άρα χαμηλός αποπτωτικός ρυθμός στα μονοκύτταρα, με ταυτόχρονη αυξημένη διηθητική ικανότητα του αρθρικού θυλάκου για αυτά. Στην πολυαρθρική δε μορφή σημειώνεται ακόμα χαμηλότερου βαθμού απόπτωση, με μικρότερη όμως διηθητική ικανότητα του αρθρικού θυλάκου. Ο ρυθμός δηλαδή απόπτωσης ενδέχεται να ορίζει τον τύπο-έκφραση της νόσου [94].

Η διαταραχή στην ισορροπία της απόπτωσης είναι έκδηλη και στους οστεοβλάστες, βασικό κυτταρικό πληθυσμό της άρθρωσης. Η απώλεια οστεοβλαστών αποτελεί παθολογοανατομικό εύρημα της άρθρωσης ασθενών με NIA. Οστεοβλάστες καλλιεργήθηκαν με ορό ασθενών με πολυαρθρική μορφή NIA και ορό υγιών μαρτύρων. Στην περίπτωση των καλλιεργειών με ορό ασθενών, σημειώθηκε αυξημένη απόπτωση των οστεοβλαστών και αυξημένη συγκέντρωση IL-6. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι στον ορό των ασθενών κυκλοφορούν μόρια, τα οποία με τη δράση τους επάγουν την απόπτωση των οστεοβλαστών. Πιθανά, όπως φαίνεται, ένα από τα μόρια αυτά είναι η IL_6 [95].

Ανακεφαλαιώνοντας, η απόπτωση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της NIA. Συγκεκριμένα συμβάλλει στο κυτταρικό προφίλ των κυττάρων της άρθρωσης και του περιφερικού αίματος, στο συνεχή αντιγονικό ερεθισμό, στις παραγόμενες κυτοκίνες, και κατ'επέκταση στην κλινική μορφή/έκφραση και ενεργότητα της νόσου.

1.3 Survivin

Η Survivin ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης πρωτεϊνών (IAPs, Inhibitors of Apoptosis Proteins). Εκφράζεται συνεχώς κατά την εμβρυογένεση, την αύξηση και διαφοροποίηση των ιστών, αλλά είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στους πλήρως διαφοροποιημένους ιστούς, με εξαίρεση τους συνεχώς αναγεννώμενους (πχ αγγειακό ενδοθήλιο). Παρόλα αυτά είναι έντονα παρούσα σε μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές, όπως οι καρκινικές. Η Survivin αναστέλλει την επαγόμενη από τα Fas, Caspases, Bax απόπτωση, κάτω από τον έλεγχο των κυτοκινών, παρεμβαίνοντας στο εξωγενές και ενδογενές μονοπάτι. Η δράση αυτή της Survivin επί των κασπασών ελέγχεται από το smac/Diablo, μία άλλη πρωτεΐνη των IAPs, ρυθμίζοντας την απόπτωση στο μιτοχόνδριο. Φαίνεται ότι παίζει διπλό ρόλο ενώνοντας τον κυτταρικό θάνατο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [96,97,98,99].



Εικ.1.3 Η Survivin και η δράση της στο ενδογενές μονοπάτι [100]

Στη PA η Survivin του ορού αποτελεί δείκτη βαρύτητας της νόσου και πιθανό δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία. Υψηλές τιμές Survivin σχετίζονται με βαρύτερες ακτινολογικές βλάβες και φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία [101]. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και ενισχύονται από μελέτη των κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι της Survivin. Υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων βρέθηκαν σε ασθενείς με μη διαβρωτική PA. Επιπλέον σημειώθηκε πτώση της τιμής της στην περίπτωση ασθενών με νόσο ανταποκρινόμενη στη θεραπευτική προσέγγιση [102].

Σε συγκριτική μελέτη ιστού αρθρικού θυλάκου ασθενών με ενεργό και μη PA, OA, σπονδυλαρθρίτιδα και υγιών μαρτύρων, βρέθηκε ότι στην ενεργό PA εκφράζονται έντονα οι TRAIL, υποδοχείς που επάγουν την απόπτωση. Παρόλα αυτά σημειώνεται μειωμένη απόπτωση λόγω της παράλληλα αυξημένης έκφρασης Survivin και της αναστολής της κασπάσης 3, που προκαλεί με τη δράση της [103].

Η Survivin με την αντιαποπτωτική της δράση φαίνεται να συμμετέχει και στην αγγειογένεση, που παρατηρείται στην PA, επάγοντας αυτή σε συνεργασία με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες και τροποποιώντας το ιστικό προφίλ της νόσου [104].

Η μελέτη των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, δείχνει ότι η Survivin επηρεάζει το φαινότυπό τους. Ο φαινότυπος των λευκοκυττάρων είναι μείζονος σημασίας για τη στρατολόγησή τους, τη μετανάστευσή του και την εγκατάστασή τους στους ιστούς. Άρα η Survivin συμμετέχει ενδεχομένως με αυτό τον μηχανισμό στην ανατροφοδότηση της φλεγμονώδους διαδικασίας [105].

Είναι προφανές ότι η Survivin είναι παρούσα σε όλες της εκφράσεις του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της PA, επηρεάζοντας την επιβίωση των αρθροκυττάρων, τη νεοαγγειογένεση, την μετανάστευση και ενεργότητα των λευκοκυττάρων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη μελέτη κατά την οποία το διπλής έλικας RNA των ιών φαίνεται να επάγει την έκφραση της Survivin. Η Survivin με τη σειρά της αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την αντοχή στην απόπτωση των αρθροκυττάρων [106]. Τα ευρήματα αυτά ενώνουν τα κομμάτια του puzzle, συνδέοντας την από χρόνια θέση ότι οι ιοί συμμετέχουν στην παθογένεια της PA με την απόπτωση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η Survivin εκτός από την αντιαποπτωτική δράση της, φαίνεται να συμμετέχει και με άλλο τρόπο στην παθογένεια της PA. Η ουροκινάση, ένα μόριο με αρθριτογόνο δράση, έχει μελετηθεί κατά το παρελθόν και ο ρόλος της είναι γνωστός στην παθογένεια της PA. Σύμφωνα με νέα δεδομένα η Survivin είναι

απαραίτητη για τη δράση της αυτή [107]. Αποτελεί λοιπόν έναν πολυδιάστατο μόριο που συμμετέχει σε διαφορετικά μονοπάτια, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή, την εκδήλωση και τη «συντήρηση» της PA.

Δυστυχώς λίγες είναι μελέτες που αφορούν στη Survivin και το ρόλο της στη NIA. Προς την κατεύθυνση αυτή, μελετήθηκε η συγκέντρωσή της στον ορό ασθενών με NIA και υγιών μαρτύρων, και βρέθηκε αυξημένη σε τιμές στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Ιδιαίτερος όμως αυξημένη ήταν στην ενεργό πολυαρθρική μορφή της νόσου. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι εκτός από τη συμμετοχή της στην παθογένεια της νόσου, αντίστοιχα με των ενηλίκων (PA), αποτελεί ίσως και έναν νέο προγνωστικό δείκτη έκφρασης και βαρύτητας της νόσου [108].

1.4 Cytochrome-c

Το Cytochrome C είναι μία πρωτεΐνη που φυσιολογικά βρίσκεται μεταξύ των δύο μεμβρανών του μιτοχονδρίου. Το κυτταρικό στρες οδηγεί στην μεταφορά από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο των προαποπτωτικών παραγόντων της οικογένειας Bcl-2, και την επαγόμενη απελευθέρωση του Cytochrome C στο κυτταρόπλασμα. Εκεί το τελευταίο ενώνεται με μία αποπτωτική πρωτεάση την Araf-1, και μαζί επάγουν την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, και τον καταρράκτη των κασπασών, που καταλήγει στην απόπτωση του κυττάρου [109-114]. Στην ενεργοποίηση του ίδιου μονοπατιού οδηγεί και η σύνδεση του Fas με τον υποδοχέα του [115]. (Εικ.1.1)

Παρόλο που το Cytochrome C αποτελεί βασικό μόριο της απόπτωσης, φαίνεται ότι στην παθογένεια της ΡΑ συμμετέχει με διαφορετικό τρόπο. Έχει βρεθεί ότι το Cytochrome C επάγει τη φλεγμονώδη αντίδραση μέσω των πολυμορφοπύρηνων και των μακροφάγων. Η δράση του αυτή λαμβάνει χώρα με την απελευθέρωση ενεργοποιητών των λευκοκυττάρων και προφλεγμονώδων κυτοκινών, όπως ο TNF-α και η IL-6. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και πειραματικά, καθώς η ένεσή του σε αρθρώσεις υγιών επίμυων, προκαλεί φλεγμονή της άρθρωσης. Η μέτρησή του σε ορό και αρθρικό υγρό ασθενών με ΡΑ και υγιών μαρτύρων δείχνει μειωμένα επίπεδα στον ορό των ασθενών, και ακόμα πιο μειωμένα στο αρθρικό υγρό. Θεωρώντας το Cytochrome C ως δείκτη της απόπτωσης των κυττάρων επιβεβαιώνεται από τη μελέτη αυτή ότι στην άρθρωση ασθενών με ΡΑ η απόπτωση είναι μειωμένη. Λαμβάνοντας υπόψη και τα προηγούμενα ευρήματα, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στην άρθρωση της ΡΑ το Cytochrome C καταναλώνεται παίζοντας το ρόλο επαγωγέα της φλεγμονής και ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων, μειώνοντας την αποπτωτική του δράση [116].

Η υποξία, μία κατάσταση κυτταρικού στρες, επάγει την απόπτωση με τη δράση της στο μιτοχόνδριο και την απελευθέρωση του Cytochrome C. Το Cytochrome C αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα του κυττάρου [117]. Παρόλο που στον αρθρικό θύλακο της ΡΑ το μικροπεριβάλλον είναι εντόνως υποξικό φαίνεται ότι τα FLS αντιστέκονται στην απόπτωση με τη δράση προφλεγμονωδών κυτοκινών [118, 119].

1.5 Η άρθρωση: το στρατηγείο της ΝΙΑ

Η άρθρωση αποτελεί το όργανο στόχο της ΝΙΑ, και καθ' υπερβολή μπορεί να θεωρηθεί το στρατηγείο της νόσου κατά την πορεία της. Συνήθως η έναρξη της αρθρίτιδας είναι οξεία, και μπορεί να είναι συνεχής ή διαλείπουσα. Η πρωινή δυσκαμψία ή η αγκύλωση μετά από παρατεταμένη ακινησία είναι ενδεικτικά σημεία ενεργού αρθρίτιδας. Οι αρθρώσεις διογκώνονται λόγω υπερτροφίας του αρθρικού θυλάκου και αύξησης του αρθρικού υγρού. Πιο συχνά προσβάλλονται οι μεγάλες αρθρώσεις, όπως η κατά γόνα, η ποδοκνημική, και η κατ' αγκώνα, με επέκταση σταδιακά και στις μικρότερες, όπως για παράδειγμα οι μεσοφαλαγγικές, ιδίως κατά την πορεία της πολυαρθρικής μορφής και της συστηματικής. Οι αρθρώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των διαρθρώσεων, όπου σημειώνεται σημαντικού βαθμού κινητικότητα, και μεταξύ των οστών υπάρχει «διάστημα». Τα οστά που συμμετέχουν στην άρθρωση καλύπτονται από την αρθρική μεμβράνη, η οποία σχηματίζεται από ειδικούς ινοβλάστες, τα αρθροκύτταρα. Τα αρθροκύτταρα παίζουν το ρόλο των φαγοκυττάρων, παράγουν κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες. Στη φλεγμαίνουσα άρθρωση πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.

Το «διάστημα» μεταξύ των οστών πληρούται με αρθρικό υγρό. Το αρθρικό υγρό, που στις υγιείς αρθρώσεις βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, έχει ως προορισμό του την λίπανση και θρέψη των δύο επιφανειών. Αποτελείται από φιλτραρισμένο πλάσμα και υαλουρονικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των μικρομοριακών μορίων/ενώσεων είναι όμοιες με αυτές του πλάσματος, ενώ μακρομοριακές ενώσεις, όπως οι ανοσοσφαιρίνες, το συμπλήρωμα και οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως βρίσκονται σε μικρές ποσότητες σε σύγκριση με το πλάσμα. Σημειώνεται ότι στερείται πλήρως παραγόντων πήξης. Στην περίπτωση της ενεργού αρθρίτιδας, το αρθρικό υγρό αποκτά χαρακτηριστικά υγρού που φλεγμαίνει. Μακροσκοπικά είναι θολερό. Παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση λευκοκυττάρων, και κυρίως πολυμορφοκυττάρων. Επίσης αυξημένο είναι το συμπλήρωμα, ενώ μειωμένο είναι το ιξώδες λόγω μειωμένης συγκέντρωσης υαλουρονικού οξέος.

Το αρθρικό υγρό λοιπόν αποτελεί τον καθρέφτη της παθοφυσιολογίας και πιθανά της παθογένειας της ΝΙΑ [1, 120-123].

1.6 Θεραπευτική προσέγγιση της ΝΙΑ

Η αντιμετώπιση των ασθενών με ΝΙΑ βασίζεται σε συνδυασμό φαρμακοθεραπείας, φυσικο- και κινησιοθεραπείας, καθώς και ψυχοκοινωνικής υποστήριξης. Παρά το γεγονός ότι ακόμα δεν έχει επιτευχθεί ίαση της νόσου, η πρόγνωση αυτής έχει βελτιωθεί σημαντικά. Σκοπός της θεραπείας είναι ο πλήρης έλεγχος της νόσου, η διατήρηση της λειτουργικότητας των μικρών ασθενών, και η πρόληψη των μακροπρόθεσμων επιπλοκών της ίδιας της νόσου ή της θεραπευτικής αγωγής. Εξαιτίας των πολλαπλών εκφράσεων της ΝΙΑ, η θεραπευτική προσέγγιση διαφέρει και διαρκώς αναπροσαρμόζεται. Η συνεχής και για μακρύ διάστημα παρακολούθηση είναι επιβεβλημένη.

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ), όπως η ιβουπροφαίνη, η ναπροξένη, η μελοξικάμη και η ινδομεθακίνη, αποτελούν για δεκαετίες τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση των ασθενών με ΝΙΑ, και είναι ακόμα και σήμερα η θεραπεία έναρξης. Σε ασθενείς με μονο- ή ολιγοαρθρίτιδα τα ΜΣΑΦ χρησιμοποιούνται συχνά ως μονοθεραπεία, ενώ η ενδοαρθρική χορήγηση κορτικοστεροειδούς, αποτελεί την εναλλακτική ή συμπληρωματική θεραπεία, με μακρά διάρκειας δράση, των ασθενών αυτών.

Στην περίπτωση των ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ΜΣΑΦ και σε αυτούς με σΝΙΑ συστήνεται η συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών. Δεύτερης γραμμής επιλογή για τις περιπτώσεις εμμένουσας ενεργού αρθρίτιδας αποτελεί η μεθοτρεξάτη, με καλή αποτελεσματικότητα και μέτρια τοξικότητα. Σημειώνεται ότι για την προστασία από τις τοξικές δράσεις της μεθοτρεξάτης απαραίτητη είναι η συγχορήγηση φυλλικού οξέος.

Τομή στη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με σ.ΝΙΑ και εμμένουσα αρθρίτιδα αποτελούν οι αναστολείς του TNF-α, είτε ως αντισώματα έναντι του υποδοχέα του, είτε έναντι του ίδιου του TNF-α (Etanercept, Infliximab, Adalimumab). Η θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες δείχνει να είναι καλά ανεκτή, προσφέροντας ικανοποιητικό έλεγχο της νόσου.

Κλινικές μελέτες με νέους βιολογικούς παράγοντες, όπως η anti-IL1 και η anti-IL6, για τη θεραπεία της σ.ΝΙΑ δείχνουν να είναι πολλά υποσχόμενες [28,31,124-129].

2. Υπόθεση- Σκοπός- Όφελος

Η ΝΙΑ είναι ένα χρόνια νόσημα της παιδικής ηλικίας. Η κλινική της πορεία είναι μακρά με εξάρσεις και υφέσεις, ταλαιπωρώντας τους μικρούς ασθενείς και τις οικογένειές τους. Σε ποσοστό ευτυχώς σχετικά μικρό, αλλά όχι αμελητέο, μερικοί από τους ασθενείς πάσχουν από βαριά αναπηρία, που δύναται να τους καθηλώσει, ενώ άλλοι έρχονται αντιμέτωποι με την πιθανότητα τύφλωσης λόγω ιριδοκυκλίτιδας, βαριάς εξωαρθρικής εκδήλωσης της νόσου. Παρά το γεγονός ότι πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να κατανοήσουν την παθογένεια της νόσου, και πολλές γνώσεις έχουν προστεθεί στον τομέα αυτό, η σαφής αιτιοπαθογένειά της παραμένει άγνωστη. Οι έρευνες στον τομέα αυτό συνεχίζονται και είναι σχεδόν βέβαιο ότι καθώς νέα δεδομένα έρχονται στην επιφάνεια, βελτιώνονται τόσο οι δυνατότητες θεραπευτικής προσέγγισης, όσο και η ποιότητα ζωής των μικρών ασθενών.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να έχει ο ρόλος της απόπτωσης, του εγγυητή της ομοιόστασης του πολυκύτταρου οργανισμού μας, στα αυτοάνοσα νοσήματα, και ιδίως στα ρευματικά αυτοάνοσα νοσήματα. Φαίνεται ότι η διαταραχή της ισορροπίας του μηχανισμού της απόπτωσης, παίζει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένειά τους και ίσως και της ΝΙΑ, πιθανά επιδρώντας σε περισσότερους από έναν κυτταρικούς πληθυσμούς. Η αναζήτηση νέων παραμέτρων παρακολούθησης της βαρύτητας και της πορείας της νόσου, επιτρέπει την αρτιότερη αντιμετώπισή της, και το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Με στόχο μας να μελετήσουμε την απόπτωση στη ΝΙΑ, τόσο στην έκφραση και κλινική πορεία της νόσου, όσο και ως δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία, επιλέξαμε δύο βασικά μόρια του μηχανισμού της. Το Cytochrome C, ως απαραίτητο μόριο για την πυροδότηση του καταρράκτη των κασπασών, και τη Survivin, ως βασικό μόριο αναστολέα της απόπτωσης. Αναζητήσαμε τα μόρια αυτά στο αρθρικό υγρό, υλικό από το όργανο στόχο της ΝΙΑ, σε παιδιά με ΝΙΑ, με διαφορετικούς τύπους της νόσου και υπό διαφορετική θεραπευτική αγωγή.

Με την ολοκλήρωση της μελέτης μας στοχεύουμε να εμπλουτίσουμε τις γνώσεις μας σχετικά με το πώς λειτουργεί η απόπτωση τόσο στην παθογένεια όσο και κατά την πορεία της νόσου. Η δυνατότητα να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές στρατηγικές αποτελεί το σκοπό κάθε ιατρικής έρευνας.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Υλικά και Όργανα

3.1 Υλικά

3.1.1 Ασθενείς

Μελετήθηκαν 80 δείγματα αρθρικού υγρού ασθενών με Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα, μετά από ενημέρωση των ιδίων και των κηδεμόνων τους. Το αρθρικό υγρό ελήφθη με αρθροκέντηση της κατά γόνυ άρθρωσης κάτω από απολύτως άσηπτες συνθήκες, μετά την εφαρμογή τοπικής αναισθησίας. Η διαδικασία λήψης του αρθρικού υγρού έγινε στα πλαίσια θεραπευτικής εκκενωτικής παρακέντησης, την οποία ακολούθησε ενδαρθρική έγχυση κορτικοστεροειδούς, σύμφωνα με τα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Το αρθρικό υγρό συλλέχθηκε σε αποστειρωμένους περιέκτες, φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (στις 800g για 15min), και τα υπερκείμενα μετά την κλασματοποίησή τους φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη μέχρι την επεξεργασία τους. Το υλικό προέρχεται από ασθενείς της Ειδικής Μονάδας Παιδιατρικής Ρευματολογίας της Β' Παιδιατρικής Πανεπιστημιακής Κλινικής, από πρωτόκολλα που είχαν πάρει έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου.

3.1.2 Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και λοιπών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε από τις εξής πηγές:

- Για τη μέτρηση με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) των συγκεντρώσεων των Survivin και Cytochrome-c χρησιμοποιήθηκαν τα kit της εταιρίας Enzo Life Sciences (Assay Designs), Cat.No.ADI-900-111 και Cat.No.ADI-900-141, αντιστοίχως. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τα πρωτόκολλα του κατασκευαστή.
- Οι αποστειρωμένοι περιέκτες των 10ml Yellow cap της εταιρίας Sarstedt
- Τα tips yellow 200μl και blue 1000μl, καθώς και τα Eppendorfs (1.5ml) από την εταιρία Greiner
- Οι μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων F-Bottom V-Bottom της εταιρίας Greiner

- Οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα (100μl, 200μl, 1000μl, πολυκάναλη 8X100μl) της εταιρίας Gilson

3.2 Όργανα

- Η διατήρηση των δειγμάτων έγινε σε βαθιά κατάψυξη Jouan VX5706 (-80° C)
- Οι φυγοκεντρήσεις των δειγμάτων έγιναν στη ψυχόμενη φυγόκεντρο Jouan CR 1000
- Οι μετρήσεις οπτικής απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του φωτόμετρου Tecan Infinite M200, Tecan Group Ltd. Austria.

4. Μέθοδοι

4.1 Προσδιορισμός Survivin και Cytochrome-c με Ανοσοενζυμική Μέθοδο

4.1.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μη ανταγωνιστικού τύπου ή Sandwich Elisa προϋποθέτει ακινητοποίηση του αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (αντίσωμα επικάλυψη) και επώαση με το πολυσθενές αντιγόνο. Με έκπλυση απομακρύνεται το αντιγόνο που δεν αντέδρασε. Προστίθεται στη συνέχεια δεύτερο αντίσωμα (αντίσωμα προσδιορισμού) ως προς το αντιγόνο. Το αντίσωμα προσδιορισμού είναι συνδεδεμένο με ένζυμο, που καταλύει αντίδραση με κατάλληλο υπόστρωμα. (Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της Survivin)

Μετά την προσθήκη του υποστρώματος μετράται η συγκέντρωση της χρωμογόνου ουσίας που προκύπτει από την αντίδραση. Εμμέσως μετράται η ενζυμική ενεργότητα η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό προσδιορισμό αντιγόνου.

Μία παραλλαγή της Sandwich μεθόδου είναι η σύνδεση για το σχηματισμό συμπλόκου του αντισώματος προσδιορισμού και του ενζύμου μέσω του συστήματος Βιοτίνης- Στρεπταβιδίνης. (Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του Cytochrome-c) [130].

4.1.2 Υπολογισμοί (Ποσοτικοί Προσδιορισμοί)

Στους ποσοτικούς προσδιορισμούς αντιγόνου χρησιμοποιούνται πάντα παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα διαλύματα αναφοράς αντιγόνου. Πρόκειται για «πρότυπα διαλύματα» διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, απαραίτητα για το σχηματισμό πρότυπης καμπύλης, η οποία μπορεί να είναι γραμμική ή αλγοριθμική ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Με τη μέθοδο της παρεμβολής η πρότυπη καμπύλη επιτρέπει την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μονάδες συγκέντρωσης.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια σε κάθε δείγμα γίνονται δύο ανεξάρτητες μετρήσεις.

4.2 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

- Η καταχώρηση των ασθενών, των δημογραφικών τους χαρακτηριστικών, των τιμών των εργαστηριακών μετρήσεων και των μετρήσεων των υπό μελέτη πρωτεϊνών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel.
- Οι ευαισθησίες των μεθόδων ήταν 4pg/ml (Intra Assay Variation CV%, 7.2%, Inter Assay Variation CV%, 12%) για τη Survivin και 6.03pg/ml (Intra Assay Variation CV%, 2.7%, Inter Assay Variation CV%, 6.5%) για το Cytochrome-c.
- Ο προσδιορισμός των τελικών συγκεντρώσεων των μετρούμενων παραγόντων στο αρθρικό υγρό γίνεται με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης τεσσάρων παραμέτρων που παράγεται από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης.
- Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο Stata v.11 (College Station, TX). Χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson's r), ο οποίος επιτρέπει τη μελέτη της γραμμικής συσχέτισης δύο παραμέτρων, με όρια $-1 < r < +1$, ορίζοντας αρνητική και θετική συσχέτιση αντίστοιχα. Τα όρια σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και τέθηκε ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τιμές $p < 0.05$.

Για τη μελέτη της διαγνωστικής αξίας των τιμών που μελετήσαμε έγινε μη παραμετρικός έλεγχος με καμπύλες ROC (Separate receiver operating characteristics, ROC). Σημαντική διαγνωστική αξία αναφέρεται σε τιμές > 0.8 , ενώ τιμές < 0.6 και < 0.8 δηλώνουν μέτρια διαγνωστική αξία.

5. Αποτελέσματα

5.1 Στοιχεία ασθενών

Στη μελέτη μας έλαβαν μέρος 80 διαδοχικοί ασθενείς με νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα. Για κάθε ασθενή τηρήθηκε πλήρες αρχείο με τα δημογραφικά του στοιχεία, το ιστορικό και την πορεία της νόσου, τυχόν συνοδά νοσήματα, τη φαρμακευτική αγωγή, και τις αιματολογικές εργαστηριακές παραμέτρους προ της αρθροκέντησης.

Τα δημογραφικά στοιχεία παρατίθενται στον πίνακα 5.1, ενώ στον πίνακα 5.2 τα δεδομένα των αιματολογικών εργαστηριακών παραμέτρων πριν την αρθροκέντηση.

Τα θήλεα είναι η πλειοψηφία των ασθενών με αναλογία 61/19 (θήλεα/άρρενα). Η διάμεση ηλικία των ασθενών μας είναι τα 11 έτη (εύρος 2.5-22.4 έτη), με διάμεση ηλικία διάγνωσης της νόσου 3.75 έτη (εύρος 1-14 έτη). Η διάμεση διάρκεια νόσου των ασθενών μας κατά τη στιγμή της αρθροκέντησης είναι 2.9 έτη (εύρος 0-21.4 έτη). Συνολικά έγιναν στο αρθρικό υγρό 80 μετρήσεις για τη Survivin και το Cytochrome-c μετά από διάμεσο διάστημα 35 μηνών (εύρος 0-257 μήνες) από την ημέρα της διάγνωσης της νόσου.

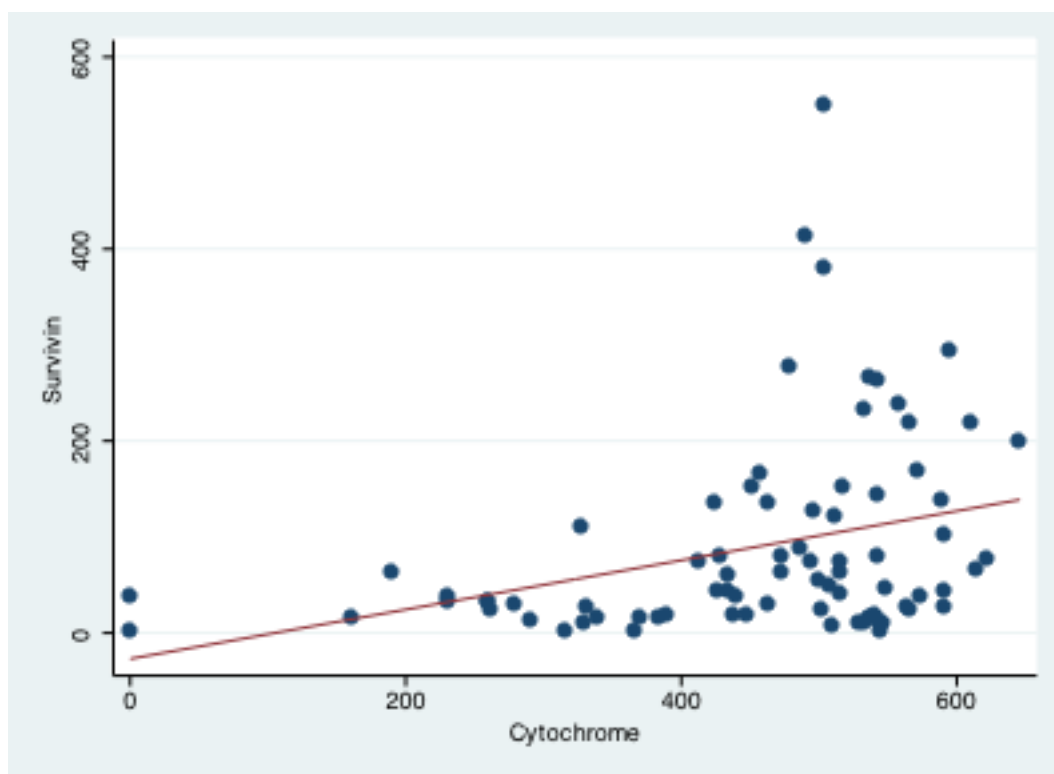
Η μέση συγκέντρωση (SD) της Survivin και του Cytochrome-c στο αρθρικό υγρό ήταν 89.260 pg/ml (104.040) και 455.050 pg/ml (132.540) αντιστοίχα (πίνακας 5.3). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι μεταξύ των τιμών των δύο παραμέτρων σημειώνεται σημαντική συσχέτιση (Pearson's $r = +0.35$, $p=0.003$). (Εικ.5.1), ενώ αρνητική είναι η συσχέτιση και των δύο μορίων με την ηλικία των ασθενών, με $r = -0.32$ ($p=0.005$) και -0.29 ($p=0.01$) αντίστοιχα. Όσον αφορά δε τη διάρκεια της νόσου σημειώνεται αρνητική συσχέτιση αυτής με το Cytochrome-c ($r = -0.28$, $p=0.02$), ενώ δεν παρατηρείται σχέση με στατιστική σημαντικότητα αυτής και της Survivin.

Πίνακας 5.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	
Διάμεση Ηλικία [έτη] (εύρος)	11 (2.5-22.4)
Φύλο (θήλεα/άρρενα) [%]	76/24
Διάμεση Ηλικία Διάγνωσης [έτη] (εύρος)	3.75 (1-14)
Διάμεση Διάρκεια Νόσου [έτη] (εύρος)	2.9 (0-21.4)
Τύπος Νόσου (%)	
Ολιγοαρθρίτιδα	78
Ολιγοαρθρίτιδα επεκταθείσα	9
Πολυαρθρίτιδα οροαρνητική	6.5
Πολυαρθρίτιδα οροθετική	0
Συστηματική Μορφή	6.5
Αγωγή με Βιολογικό Παράγοντα (%)	16

Πίνακας 5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (Μέση τιμή/Σταθερή απόκλιση)	
Hgb (g/dl)	12.2 (+/- 1.06)
WBC (per μ l)	8484 (+/- 2386)
• Πολυμορφοπύρηνα	4599 (+/- 1871)
• Λεμφοκύτταρα	3028 (+/- 1280)
PLT (per μ l)	335.411 (+/- 78.292)
CRP (mg/L)	11.7 (+/- 21.2)
ESR (1 st hour)	24.0 (+/- 20.2)
IgG* (υψηλές τιμές για την ηλικία) (%)	10
ANA (θετικά) (%)	42
C3* (υψηλές τιμές για την ηλικία) (%)	40
C4* (χαμηλές τιμές για την ηλικία) (%)	3
RF (θετικό)	2/80
Alpha1 (%)	3.5 (+/- 1.0)

*Οι 61/80 ασθενείς είχαν μέτρηση για τις παραμέτρους

Πίνακας 5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (Μέση τιμή/Σταθερή Απόκλιση)	
Survivin (pg/ml)	89.260 (+/- 104.03)
Cytochrome-c (pg/ml)	455.050 (+/- 132.54)



Εικ.5.1 Καμπύλη συσχέτισης συγκέντρωσης Survivin και Cytochrome-c (σε pg/ml)

5.2 Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με την κλινική έκφραση της νόσου

Η NIA είναι ένα νόσημα με 4 διαφορετικούς τύπους έκφρασης, κάθε ένας από τους οποίους έχει τη δική του κλινική εικόνα και πορεία. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1, η ολιγοαρθρίτιδα αποτελεί το συχνότερα απαντώμενο τύπο, με την οροαρνητική πολυαρθρίτιδα και συστηματική μορφή να έπονται με την ίδια συχνότητα, ενώ στην υπό μελέτη πληθυσμιακή μας ομάδα δεν είχαμε ασθενείς με οροθετική πολυαρθρίτιδα. Μελετήσαμε την ύπαρξη συσχέτισης των Survivin και Cytochrome-c με την μορφή της νόσου, και διαπιστώσαμε ότι τόσο οι τιμές της Survivin όσο και οι τιμές του Cytochrome-c εμφάνιζαν διαφορά στις συγκεντρώσεις τους μεταξύ των μη συστηματικών μορφών και της σ.NIA. Συγκεκριμένα η συστηματική μορφή είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη διάμεση συγκέντρωση Survivin στο αρθρικό υγρό, σε σχέση με τις μη συστηματικές μορφές (19.059pg/ml vs 56.711pg/ml, $p=0.05$). Ομοίως η συστηματική μορφή είχε χαμηλότερη διάμεση συγκέντρωση Cytochrome-c, σε οριακή όμως σημαντικότητα (340.387pg/ml vs 501.841pg/ml, $p=0.08$), σε σχέση με τις μη συστηματικές μορφές. Σημειώνεται ότι δεν καταγράφεται διαφορά μεταξύ των τιμών των υπό μελέτη μορίων και των μη συστηματικών μορφών, δηλαδή της ολιγοαρθρίτιδας, επεκταθείσας ή μη, και της πολυαρθρίτιδας.

Οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις αποτελούν συνηθισμένο εύρημα στους ασθενείς με NIA. Στην περίπτωση των δικών μας ασθενών η παρουσία αυτών κατά φθίνουσα συχνότητα ήταν πυρετός (79%), πρωινή δυσκαμψία (56%), εξάνθημα (21%) και ιριδοκυκλίτιδα (7%). Από την μελέτη τόσο της Survivin όσο και του Cytochrome-c δε σημειώθηκε διαφορά στατιστικά σημαντική στη συγκέντρωση αυτών και τη συχνότητα εμφάνισης των αναφερόμενων εξωαρθρικών εκδηλώσεων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι 5 από τους 80 ασθενείς μας (6.6%) είχαν συνοδό δεύτερο αυτοάνοσο νόσημα. Συγκεκριμένα 3 ασθενείς έπασχαν από αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ένας από σαρκοείδωση, και ένας από σ.Reiter. Στην ομάδα αυτή των ασθενών δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της Survivin και του Cytochrome-c, σε σύγκριση με την άλλη ομάδα ασθενών.

5.3 Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με την αναιμία

Στο σύνολο των 80 ασθενών μας το 30% αυτών εμφάνιζαν αναιμία, με τιμή αιμοσφαιρίνης <12g/dl σε πρόσφατη μέτρηση πριν την αρθροκέντηση.

Στην ομάδα αυτή των ασθενών διαπιστώθηκε ότι τόσο οι υψηλές τιμές της Survivin, όσο και αυτές του Cytochrome-c εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με την τιμή της αιμοσφαιρίνης σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($r = -0.25$, $p = 0.04$ και $r = -0.33$, $p = 0.005$, αντιστοίχως).

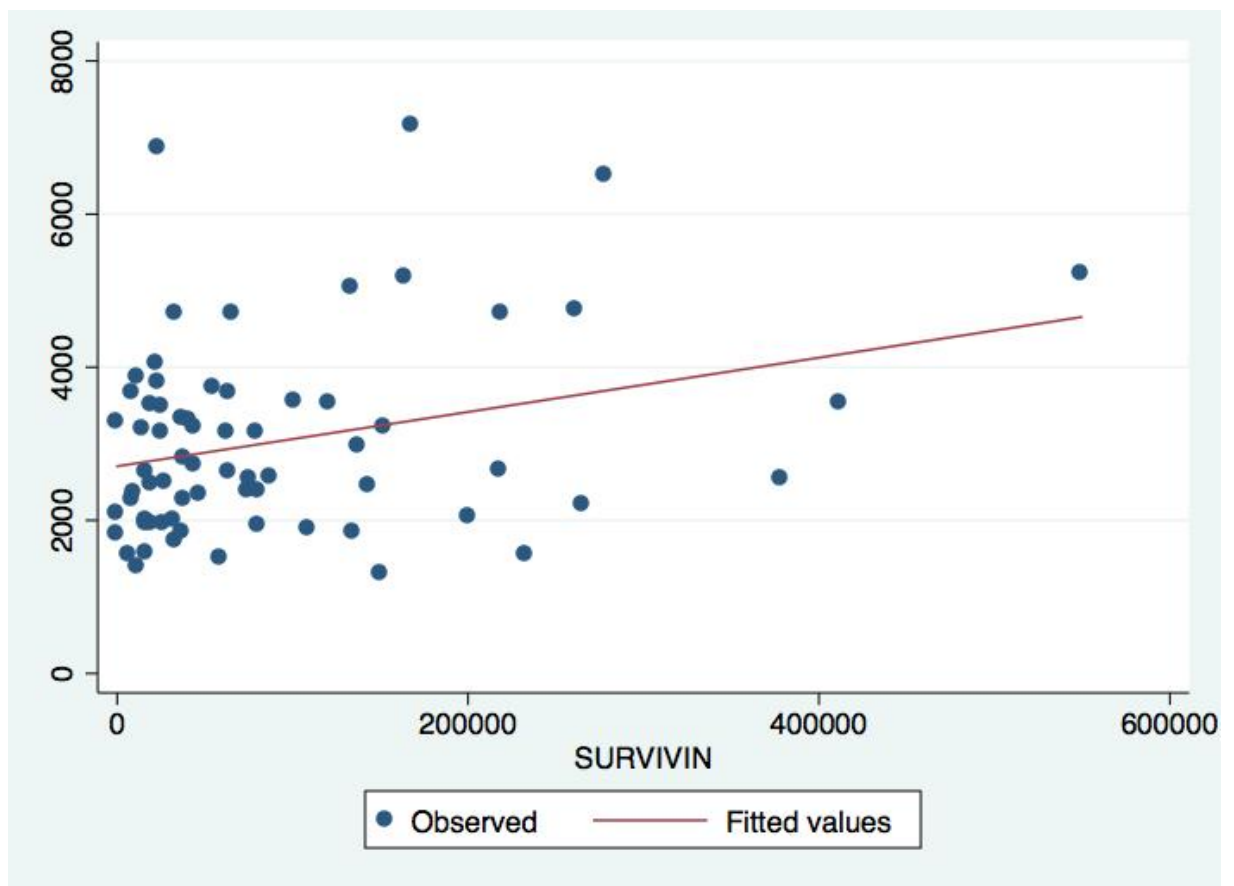
Στις περιπτώσεις ασθενών που δεν εμφάνιζαν αναιμία (με $Hb > 12g/dl$) κατά την περίοδο της δειγματοληψίας, φαίνεται ότι οι μέσες τιμές του Cytochrome-c ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των ασθενών με αναιμία ($\Delta = -74.35$, 95%, -137.1 έως -11.6 , $p = 0.02$). Δε σημειώθηκε όμως τέτοια διαφορά και στην περίπτωση της Survivin.

Μελετώντας τα επίπεδα του Cytochrome-c διαπιστώσαμε ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο αναιμίας (OR 1.06, 95% CI 1.01-1.12, για κάθε 10.000pg/ml αύξησης αυτών, $p = 0.03$), σε αντίθεση με τα επίπεδα της Survivin (OR 1.04, 95% CI 0.99-1.09, $p = 0.09$). Δηλαδή καθώς αυξάνονται τα επίπεδα του Cytochrome-c αυξάνεται στατιστικά σημαντικά η πιθανότητα εμφάνισης αναιμίας στους ασθενείς μας.

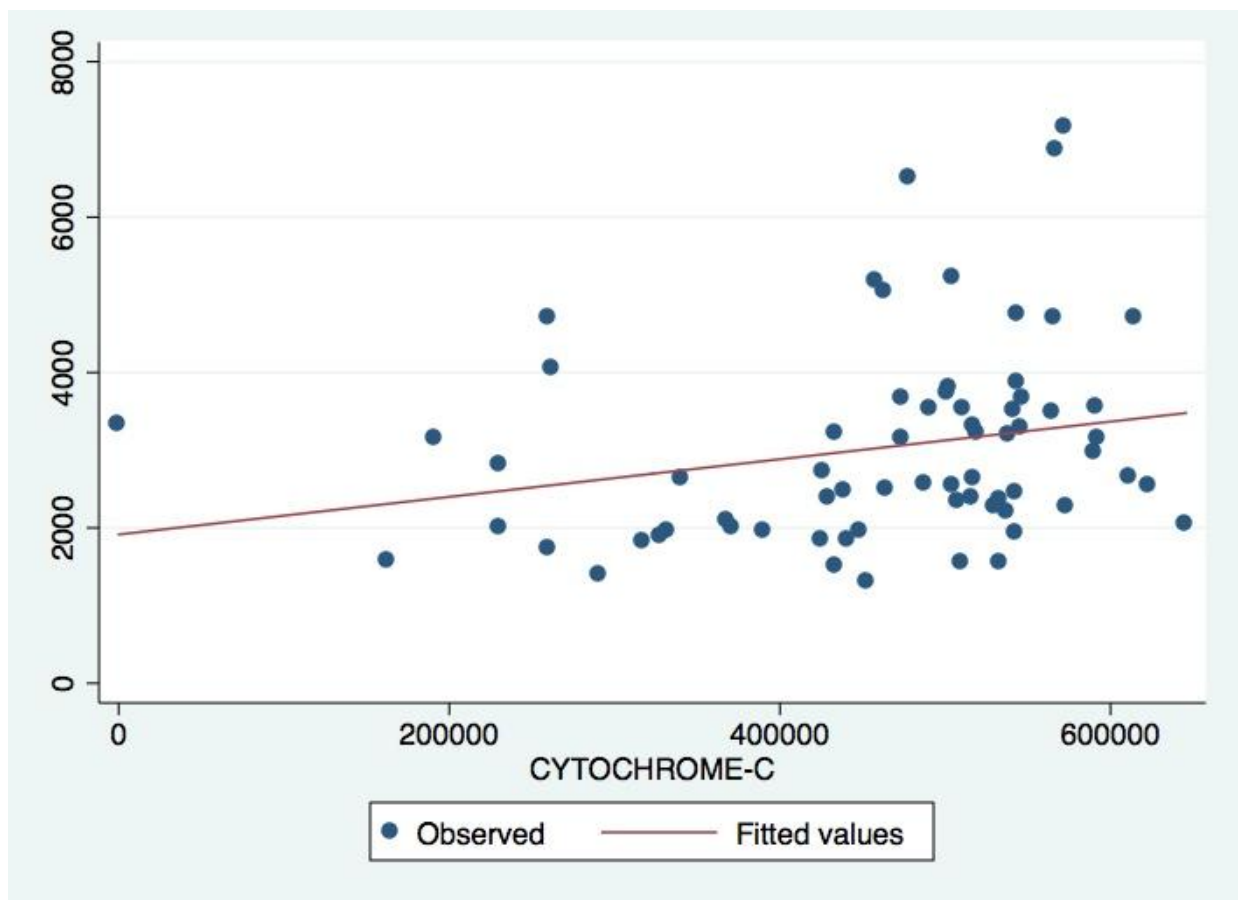
5.4 Προσδιορισμός της σχέσης των Survivin και Cytochrome-c με τις λοιπές παραμέτρους της Γενικής Αίματος

Η σχέση της Survivin και του Cytochrome-c με τον αριθμό των πολυμορφοπυρήνων φαίνεται να είναι οριακή με $r = -0.21$, $p = 0.09$ και $r = -0.20$, $p = 0.1$ αντιστοίχως. Ομοίως οριακή είναι η σχέση της Survivin με τον αριθμό των αιμοπεταλίων ($r = +0.21$, $p = 0.09$), ενώ δε σημειώνεται στατιστική σημαντικότητα στη σχέση αυτών με τις τιμές του Cytochrome-c.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της σχέσης των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος με τις τιμές των υπό μελέτη μορίων. Πιο συγκεκριμένα, τόσο τα επίπεδα της Survivin, όσο και του Cytochrome-c παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος με $r = 0.29$, $p = 0.01$ για την Survivin, και $r = 0.24$, $p = 0.05$ για το Cytochrome-c. Η σχέση αυτή φαίνεται χαρακτηριστικά στις Εικ.5.2 και 5.3



Εικ. 5.2 Καμπύλη συσχέτισης συγκέντρωσης Survivin (pg/ml) και αριθμού λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (ανά μl)



Εικ.5.3 Καμπύλη συσχέτισης συγκέντρωσης Cytochrome-c (pg/ml) και αριθμού λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (ανά μl)

5.5 Μελέτη των Survivin και Cytochrome-c σε σχέση με γνωστούς δείκτες φλεγμονής

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις της Survivin και του Cytochrome-c δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις τιμές της CRP και ESR, γνωστών δεικτών φλεγμονής και παρακολούθησης την νόσου. Αντιθέτως φαίνεται ότι υψηλές τιμές του Cytochrome-c σημειώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το κλάσμα Alpha-1 των λευκωμάτων ($r=+0.40$, $p=0.02$). Δε σημειώθηκε ανάλογη συσχέτιση και για τη Survivin.

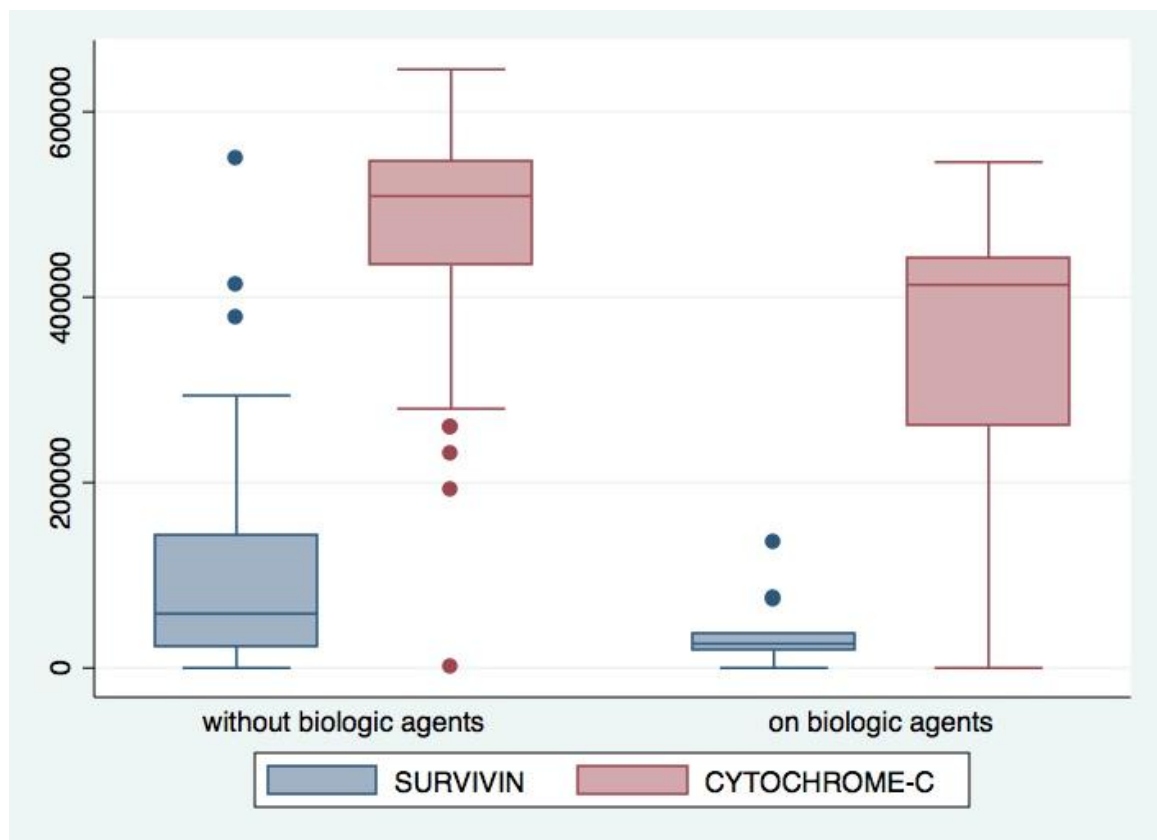
Σε μη παραμετρικό έλεγχο με καμπύλες ROC (Separate receiver operating characteristics, ROC) μελετήσαμε τη διαγνωστική αξία των δεικτών φλεγμονής (CRP, ESR, alpha1), καθώς και της Survivin και του Cytochrome-c, όσον αφορά στην εμφάνιση αναιμίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.4. Η συγκέντρωση του Cytochrome-c φαίνεται να υπερτερεί σε σχέση με τους άλλους δείκτες, με μέτρια βέβαια χρησιμότητα (AUC 0.64. 95% CI 0.51-0.77).

	Area Under the Curve (95% CI)	
Cytochrome	0.65	0.53-0.78
ESR	0.59	0.44-0.74
Survivin	0.58	0.43-0.73
Alpha1	0.51	0.30-0.72
CRP	0.50	0.35-0.65

Πίνακας 5.4. Αποτελέσματα παραμετρικού ελέγχου με καμπύλες ROC. Διαγνωστική αξία για τιμές >0.8

5.6 Επίδραση της φαρμακευτικής αγωγής στις τιμές των Survivin και Cytochrome-c

13 από τους 80 ασθενείς μας (16%) βρίσκονταν υπό αγωγή με βιολογικό παράγοντα. Συγκεκριμένα 11 ελάμβαναν Etanercept και 2 Adalimumab. Οι ασθενείς της ομάδας αυτής είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες διάμεσες τιμές Survivin σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν ελάμβαναν αγωγή με βιολογικό παράγοντα (26.153pg/ml vs 58.5569pg/ml, $p=0.04$). Ομοίως και για τη συγκέντρωση του Cytochrome-c, 413.219 vs 509.073, $p=0.001$. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται σχηματικά στην Εικ.5.4.



Εικ.5.4 Η επίδραση των βιολογικών παραγόντων στις συγκεντρώσεις των Survivin και Cytochrome-c (pg/ml)

6. Συζήτηση

Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας και της αιτιοπαθογένειας της Νεανικής Ιδιοπαθούς Αρθρίτιδας αποτελεί κομβικό σημείο στην αντιμετώπιση της νόσου. Όσο το τοπίο παραμένει σκοτεινό, τόσο επικεντρώνονται σε αυτό οι έρευνες με στόχο νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και καλύτερο έλεγχο της νόσου. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς την κατεύθυνση αυτή, και με την εφαρμογή των νεότερων θεραπευτικών μεθόδων έχει βελτιωθεί αξιοσημείωτα τόσο το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών αυτών, όσο και η ποιότητα ζωής τους. Δεδομένου ότι η ΝΙΑ αποτελεί μία συνεχώς ενεργοποιημένη φλεγμονώδη διαδικασία, μία διαταραχή της ισορροπίας του οργανισμού, ήταν επόμενο να αναρωτηθεί κανείς ποιος είναι ο ρόλος της απόπτωσης, ενός μηχανισμού εγγυητή της ομοιόστασης, στην παθοφυσιολογία της νόσου. Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη δύο βασικών πρωτεϊνικών μορίων της απόπτωσης, της Survivin και του Cytochrome-c, στη ΝΙΑ. Μελέτη του ρόλου τους στην κλινική έκφραση και πορεία της νόσου, αλλά και στην απαντητικότητα στη θεραπευτική αγωγή.

Τόσο η Survivin όσο και το Cytochrome-c μελετώνται για πρώτη φορά στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΝΙΑ, και μάλιστα σε μία προσπάθεια ταυτόχρονης προσέγγισης και κατανόησης της ισορροπίας μεταξύ του αποπτωτικού και αντιαποπτωτικού μηχανισμού. Η επιλογή του αρθρικού υγρού, ως υλικό μελέτης, βασίστηκε στην ανάγκη παροχής πληροφοριών από το όργανο στόχο της νόσου, την άρθρωση, και τη χρησιμότητα αυτών για τη μελέτη και αντιμετώπιση της ΝΙΑ. Γνωρίζουμε άλλωστε ότι η διαταραχή της αρχιτεκτονικής της άρθρωσης και η δράση των αρθροκυττάρων παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη παθογένειά της.

Ο αρθρικός θύλακος έχει μικρή διαπερατότητα σε μακρομοριακές ενώσεις, όπως είναι και η Survivin και το Cytochrome-c. Επομένως η μελέτη των μορίων αυτών στο αρθρικό υγρό, αντικατοπτρίζει τη γηγενή παραγωγή τους και την τοπική δράση τους. Η μελέτη αυτού του μικροπεριβάλλοντος δύναται να προσφέρει λοιπόν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αιτιοπαθογένειά της και την κλινική πορεία της [131]. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ενήλικες με ρευματοειδή αρθρίτιδα φαίνεται ότι το προφίλ των αποπτωτικών μορίων είναι διαφορετικό μεταξύ του αρθρικού υγρού και του περιφερικού αίματος. Το εύρημα αυτό δηλώνει μια αλλαγή της δραστηριότητας της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης, μία αλλαγή που δεν μπορεί να

διερευνηθεί μελετώντας μόνο την περιφέρεια [76,132], και που ίσως σχετίζεται με την παθογένεια και έκφραση της νόσου.

Το υλικό μας προέρχεται από εκκενωτική παρακέντηση της άρθρωσης, διαδικασία που προηγείται της ενδαρθρικής έγχυσης κορτικοστεροειδούς, θεραπευτικής προσέγγισης που έχει επιλεγεί για τους ασθενείς μας. Παρά το γεγονός ότι σε κάθε κλινική μελέτη είναι σημαντικό να υπάρχει ομάδα σύγκρισης από μη νοσούντες, στην περίπτωση της δικής μας έρευνας αυτό δεν είναι εφικτό, καθώς σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία μελετών αρθρικού υγρού η ομάδα αυτή αποτελείται είτε από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα που υποβάλλονται σε αρθροπλαστική αντικατάστασης, είτε ασθενείς με τραύμα. Στην περίπτωση των μικρών ασθενών μας, δεν υφίστανται οι ανωτέρω ομάδες ασθενών.

Η επιλογή των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη μας ήταν τυχαία και αντιπροσώπευαν τους τρεις τύπους της ΝΙΑ (συστηματική, ολιγοαρθρίτιδα, και πολυαρθρίτιδα με αρνητικό ρευματοειδή παράγοντα). Η συχνότητα εμφάνισης των τύπων της νόσου στον υπό μελέτη πληθυσμό μας είναι σύμφωνη με αυτή της βιβλιογραφίας, με υπεροχή της ολιγοαρθρικής μορφής, και την πολυαρθρική και συστηματική μορφή να ακολουθούν με την ίδια μεταξύ τους συχνότητα. Σημειώνεται η απουσία ασθενών με πολυαρθρίτιδα οροθετική, ομάδα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στον πληθυσμό των ασθενών αποτελεί 15% αυτών με πολυαρθρικό τύπο [133]. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, έτσι και στο δικό μας πληθυσμό ασθενών υπερέχουν τα κορίτσια [134]. Μελετήσαμε λοιπόν ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα υποπληθυσμού.

Σε πειραματικά μοντέλα πρόκλησης αρθρίτιδας φαίνεται ότι η αναστολή της απόπτωσης με τη συνεχή δράση και έκφραση αντιαποπτωτικών μορίων, όπως τα Bcl-2 και FLIP συμβάλλει στην παθογένεια αυτής, ενώ η αναστολή της δράσης τους επάγει την απόπτωση και βελτιώνει την εξέλιξη της αρθρίτιδας [135,136]. Η Survivin, που δεν ανευρίσκεται σε ώριμους πια ιστούς, αποτελεί μόριο κλειδί της ομάδας αναστολέων της απόπτωσης, καθώς ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα το ενδογενές και το εξωγενές μονοπάτι αυτής. Φαίνεται ότι η δράση της επικεντρώνεται στην αναστολή της δράσης των κασπασών [137]. Το Cytochrome-c από την άλλη είναι εκείνο το μόριο που ενεργοποιεί των καταρράκτη των κασπασών, ως τελικός αποδέκτης ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μηνυμάτων, οδηγώντας στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο [138,139]. Άλλωστε το Cytochrome C απελευθερώνεται αμέσως στις κυτταρικές καλλιέργειες, και μπορεί να χρησιμεύσει

ως δείκτης κυτταρικού θανάτου in-vivo, όπως έχει δείξει μελέτη σε σειρά λευχαιμικών κυττάρων [140]. Η επιλογή λοιπόν για τη μελέτη μας των δύο αυτών μορίων βασίστηκε στην ανεξάρτητη δράση τους, καθώς το ένα δεν αναστέλλει το άλλο, ενώ η κλίση του ζυγού του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εξαρτάται απόλυτα από την αντίπαλη δράση τους. Η υπεροχή του ενός από τα δύο θα καταλήξει στον κυτταρικό θάνατο ή στην κυτταρική επιβίωση. Η ισορροπία αυτή και τα αποτελέσματά της έχουν μελετηθεί in-vivo και in-vitro σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, δίνοντας σημαντικές πληροφορίες για την μεταξύ τους δράση, και προτείνοντας νέους θεραπευτικούς στόχους, αλλά ποτέ σε αρθρικό υγρό ασθενών με NIA [141-143].

Από τις πειραματικές μας μετρήσεις φαίνεται ότι τα μόρια αυτά είναι παρόντα στην άρθρωση, υποδηλώνοντας δραστηριότητα του μηχανισμού της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον αυτό. Μελετώντας τη συγκέντρωσή τους διαπιστώνουμε ότι το ένα ακολουθεί το άλλο. Η αύξηση του ενός συνοδεύεται από αύξηση του άλλου και αντίστροφα, ακολουθώντας μία παράλληλη πορεία και μάλιστα σε βαθμό στατιστικά σημαντικό. Τα ευρήματά μας δύνανται να ερμηνευθούν από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η υπερπλασία του αρθρικού θυλάκου και η δράση των αρθροβλαστών είναι αποτέλεσμα περιορισμένης απόπτωσης, δηλαδή πολλαπλασιασμός κυττάρων που αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο [46,144]. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι αναγνωρίζοντας ο οργανισμός τη διαταραχή της ισορροπίας του κυτταρικού πληθυσμού, επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης με την ενεργοποίηση αυτής και την αύξηση του Cytochrome-c. Από την άλλη προκειμένου να διατηρηθεί η ικανή συνθήκη- υπερπλασία αρθρικού θυλάκου και συνεχής δράση αρθροβλαστών- για την κλινική έκφραση της αρθρίτιδας, πρέπει να ανασταλεί η απόπτωση, με τη δράση της Survivin. Όσο λοιπόν παραμένει ενεργή η νόσος και δεν ελέγχεται, όπως στην περίπτωση των ασθενών μας, η Survivin και το Cytochrome-c θα βρίσκονται σε μία συνεχή αντίπαλη δράση, ακολουθώντας το ένα την αύξηση του άλλου.

Ο μηχανισμός της απόπτωσης λοιπόν ανεξάρτητα από την αποτελεσματικότητά του, φαίνεται σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ότι είναι ενεργός κατά τη διάρκεια της νόσου. Καθώς η NIA δεν αποτελεί ένα ενιαίο νόσημα και εμφανίζει διαφορετικούς τύπους, είναι σημαντική η μελέτη των μορίων αυτών, του μηχανισμού δηλαδή της απόπτωσης, όσον αφορά τον τύπο της νόσου, την έκφρασή της. Οι συγκεντρώσεις των Survivin και Cytochrome-c στο αρθρικό υγρό των ασθενών μας με μη συστηματική έκφραση της νόσου δε διαφέρουν σημαντικά, ενώ είναι σημαντικά

μικρότερες στην περίπτωση των ασθενών με σ.ΝΙΑ. Παρόλο που στη βιβλιογραφία δεν αναφέρεται μελέτη της απόπτωσης ως προς την έκφραση της νόσου, υπάρχουν καταγραφές που δηλώνουν ότι η παθοφυσιολογία και τα ευρήματα στη σ.ΝΙΑ διαφέρουν σημαντικά ως προς τις άλλες μορφές. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται σε επίπεδο κυττάρου και μορίων που συμμετέχουν στην παθογένειά της, όπως είναι οι κυτοκίνες, και θέτουν την υποψία μιας άλλης κατά κάποιο τρόπο ξεχωριστής οντότητας [2,145]. Τα αποτελέσματά μας συμπληρώνουν την παρατήρηση αυτή και την επεκτείνουν σε ένα νέο παθογενετικό πλαίσιο. Ενώ λοιπόν η παρουσία των Survivin και Cytochrome-c υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι ενεργός στην προσβεβλημένη άρθρωση, φαίνεται ότι στην περίπτωση της σ.ΝΙΑ η έντασή του είναι μικρότερη, παίζοντας δευτερεύοντα ρόλο στην κλινική έκφραση και πορεία του τύπου αυτού της νόσου.

Η κλινική πορεία και έκφραση της ΝΙΑ συμπληρώνεται με τις εξωαρθρικές εκδηλώσεις της και είναι ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη του ρόλου των μορίων μας στην εμφάνισή τους. Παρά το γεγονός ότι σημαντικό ποσοστό των ασθενών μας εμφανίζει εξωαρθρικές εκδηλώσεις, τα υπό μελέτη μόρια δε φαίνεται να σχετίζονται με αυτές. Οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις της νόσου, με ιδιαίτερη αναφορά στην ιριδοκυκλίτιδα, φαίνονται να σχετίζονται με τη δράση των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή από αυτά κυτοκινών [1,146,147]. Μία δράση που όπως προκύπτει από τη μελέτη μας είναι ανεξάρτητη του μηχανισμού της απόπτωσης, τουλάχιστον αυτού που λαμβάνει χώρα στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης.

Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας φαίνεται ότι η ηλικία έκφρασης της νόσου (ηλικία διάγνωσης) επηρεάζει την κλινική πορεία και διάρκεια της νόσου, ιδίως στις περιπτώσεις των ασθενών με ολιγοαρθρική και πολυαρθρική μορφή, με την μικρότερη ηλικία έκφρασης να προμηνύει μακρύτερη πορεία [148]. Η αρνητική συσχέτιση της Survivin και του Cytochrome-c με την ηλικία της διάγνωσης ενισχύουν την άποψη αυτή, δηλώνοντας εντονότερη έκφραση του μηχανισμού της απόπτωσης και άρα της δραστηριότητας της νόσου στην περίπτωση των νεαρότερων ασθενών μας. Επιπλέον η αρνητική συσχέτιση του Cytochrome-c με τη διάρκεια της νόσου προτείνει την υπεροχή της αντιπαποπρωτικής δράσης ως δείκτη βαρύτητας και χρονιότητας αυτής, καθώς η δράση του φαίνεται να υστερεί στις χρονίζουσες περιπτώσεις.

Με στόχο μας να διαπιστώσουμε κατά πόσο αυτή η ενεργότητα του μηχανισμού της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης αντικατοπτρίζει ή σχετίζεται με την

ένταση της φλεγμονώδους διαδικασίας, μελετήσαμε το αιματολογικό προφίλ των ασθενών με NIA και το ρόλο των δύο αυτών μορίων στον αριθμό και τον τύπο των λευκών αιμοσφαιρίων και στην εμφάνιση αναιμίας.

Όσον αφορά τα λευκοκύτταρα, σειρές μελετών και κλινικής παρατήρησης δείχνουν ότι είναι αυξημένα στο περιφερικό αίμα παιδιών με NIA, με κυρίαρχο στοιχείο τα πολυμορφοπύρηνα, διατηρώντας τη συνεχή ανοσολογική απάντηση και παράγοντας πρωτεΐνες προαγωγής της φλεγμονώδους διαδικασίας [149]. Από τη μελέτη μας φαίνεται ότι η Survivin και το Cytochrome-c έχουν οριακή συσχέτιση με την τιμή των πολυμορφοπυρήνων, δείχνοντας μάλλον ότι δε συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης, τουλάχιστον όχι στο μονοπάτι αυτής που εξαρτάται από τα πολυμορφοπύρηνα. Αντίθετα από τα ευρήματα άλλων μελετών, οι οποίες περιγράφουν αυξημένη απόπτωση στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με NIA [88, 89], στη δική μας μελέτη αυτά ακολουθούν την αύξηση των Survivin και Cytochrome-c αντικατοπτρίζοντας την διαταραχή της ισορροπίας της απόπτωσης και στο περιφερικό αίμα, τροφοδοτώντας τη φλεγμονώδη αντίδραση. Το εύρημά μας αυτό είναι συμβατό με τη συνεχή παραγωγή και στρατολόγηση λεμφοκυττάρων προς τη φλεγμαίνουσα άρθρωση, με στόχο τη διατήρηση της φλεγμονής.

Όσον αφορά την τιμή της αιμοσφαιρίνης, η αναιμία αποτελεί εύρημα χρόνιας νόσου, και ιδίως στην περίπτωση της συστηματικής μορφής NIA φαίνεται να σχετίζεται με τις κυκλοφορούσες κυτοκίνες [150,151]. Δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για το ρόλο των μορίων της απόπτωσης στην εμφάνιση αναιμίας σε ασθενείς με NIA. Στη δική μας μελέτη το 30% των ασθενών εμφάνιζαν αναιμία. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι αυξημένη ενεργότητα των αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μηχανισμών σχετίζεται με πτώση της τιμής της αιμοσφαιρίνης και εμφάνιση αναιμίας. Και μάλιστα στην περίπτωση του Cytochrome-c φαίνεται ότι ο κίνδυνος εμφάνισης αναιμίας αυξάνεται κατά αναλογία με την αύξηση της συγκέντρωσης αυτού. Δίνεται λοιπόν ένας νέος ρόλος και ίσως ένας νέος τρόπος δράσης του μορίου αυτού, ως ανάγκη επαγωγής του κυτταρικού θανάτου και έξω από το μικροπεριβάλλον της άρθρωσης, είτε με την απευθείας δράση του είτε με την επαγωγή από αυτό κυτοκινών. Το εύρημα αυτό συμπληρώνει τα αποτελέσματα μελέτης σε ενήλικες ασθενείς με PA, σύμφωνα με τα οποία η δράση του TNF- α , κυτοκίνης κλειδί στην παθογένεια της νόσου, στον μυελό των οστών, αναστέλλει της ερυθροποίηση, επάγοντας την απόπτωση [152]. Σύμφωνα με άλλη μελέτη σε

ασθενείς με PA το Cytochrome-c επάγει την παραγωγή του TNF- α . Η σχέση του Cytochrome-c με την εμφάνιση αναιμίας ενισχύεται σύμφωνα με τη μελέτη μας και από τη σύγκριση μεταξύ των ασθενών που εμφάνιζαν αναιμία και αυτών που είχαν φυσιολογικές τιμές αιμοσφαιρίνης. Στην περίπτωση των τελευταίων η συγκέντρωσή του ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι σχέσεις αυτές δε φαίνεται να αλλάζουν μεταξύ των διαφορετικών τύπων νόσου, δείχνοντας ίσως ότι ο μηχανισμός πτώσης της αιμοσφαιρίνης στην πορεία της NIA είναι κοινός.

Στους ασθενείς με βαριά και χρόνια νόσο παρατηρείται αναιμία, και σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως η πτώση της αιμοσφαιρίνης σχετίζεται με τη Survivin και το Cytochrome-c. Αναζητήσαμε κατόπιν αυτού σε αυτά το ρόλο ενός νέου βιοχημικού δείκτη παρακολούθησης της ενεργότητας και βαρύτητας της νόσου, υπό το πρίσμα της αναιμίας. Συγκρίναμε τα υπό μελέτη μόρια, με γνωστούς δείκτες φλεγμονής, όπως η ESR, η CRP και η πρωτεΐνη Alpha 1 των λευκωμάτων, ως προς την εμφάνιση αναιμίας. Διαπιστώσαμε ότι το Cytochrome-c αποτελεί τον πιο ευαίσθητο δείκτη. Η παρακολούθηση δηλαδή της συγκέντρωσης του Cytochrome-c επιτρέπει την πρόβλεψη εμφάνισης αναιμίας, προσφέροντας έναν νέο δείκτη έμμεσης εκτίμησης-πρόβλεψης της χρονιότητας της νόσου. Παρά το γεγονός ότι η μέτρησή του στο αρθρικό υγρό δεν μπορεί να καθιερωθεί ως μία εξέταση ρουτίνας, η παραπάνω διαγνωστική του αξία ενισχύει το νέο δεδομένο που προκύπτει από την παρούσα μελέτη της συμμετοχής της απόπτωσης στην παθογένεια της NIA, αλλά και την εξωαρθρική δράση του Cytochrome-c στην πορεία της νόσου.

Με σκοπό να μελετήσουμε κατά πόσο η Survivin και το Cytochrome-c αποτελούν δείκτες πρόγνωσης της νόσου όσον αφορά την ένταση της φλεγμονώδους διαδικασίας, τα συγκρίναμε με τους γνωστούς δείκτες, οι οποίοι μπορεί να είναι φυσιολογικοί ή και αυξημένοι στην πορεία της NIA. Οι βιοχημικοί δείκτες πρόγνωσης αποτελούν μόρια, που η μέτρησή τους μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε τη βαρύτητα και την πορεία της νόσου, την αναγκαιότητα άμεσης παρέμβασης και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα με ποικίλες εκφράσεις, που καθιστά δύσκολη την ανάδειξη τέτοιων δεικτών [153], πλήθος ερευνητικών μελετών έχουν επικεντρωθεί σε αυτό το σκοπό, με απώτερο στόχο τον καλύτερο έλεγχο της νόσου. Εκτός από τους γνωστούς δείκτες φλεγμονής πολλά μόρια έχουν μελετηθεί προς την κατεύθυνση αυτή. Τέτοια είναι τα αντισώματα anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP), ο RF, καθώς και διάφορες πρωτεΐνες του κολλαγόνου (πχ η οστεοποντίνη, οι μεταλλοπρωτεΐνάσες). Η μέτρησή

τους και η σε συνδυασμό ανάλυσή τους φαίνεται ότι τους καθιστά σημαντικούς βιοχημικούς δείκτες σχετικά με τη βαρύτητα της νόσου και την καταστροφή της άρθρωσης [154-157]. Μελέτη του αποπτωτικού μορίου sFas σε ορό ασθενών με αυτοάνοσο νόσημα προσφέρει έναν νέο δείκτη όσον αφορά την παρουσία της νόσου και επιβεβαίωση της διάγνωσης [158], εισάγοντας τα μόρια της απόπτωσης για πρώτη φορά στο κάδρο των βιοχημικών δεικτών. Στη δική μας μελέτη τόσο η Survivin όσο και το Cytochrome-c, δε φαίνεται να σημειώνουν συσχέτιση με τις τιμές των CRP και ESR, οι οποίες είναι μετρίως αυξημένες στους ασθενείς μας. Δε φαίνεται δηλαδή να αποτελούν δείκτη της φλεγμονώδους διαδικασίας. Παρόλα αυτά σημειώνεται σημαντική συσχέτιση του Cytochrome-c με το κλάσμα Alpha-1 των πρωτεϊνών. Το τελευταίο αποτελεί πρωτεΐνη με αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται να παρεμβαίνει στην εξέλιξη της αρθρίτιδας και της αυτοανοσίας [159]. Η σχέση αυτή δηλώνει ίσως την προστατευτική δράση του Cytochrome-c στην αναστολή της διαδικασίας της αρθρίτιδας.

Επειδή η NIA αποτελεί ένα αυτοάνοσο νόσημα μελετήσαμε τη σχέση των Survivin και Cytochrome-c με την παρουσία αυτοαντισωμάτων στην ομάδα των ασθενών μας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία θετικοί τίτλοι του ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) σχετίζονται με την κλινική έκφραση και κλινική πορεία της νόσου [1,27,160]. Από τη μελέτη μας δεν προκύπτει συσχέτιση αυτών με τη συγκέντρωση των μορίων μας, διαχωρίζοντας το ρόλο της αυτοάνοσης αντίδρασης και της απόπτωσης στην παθογένεια της νόσου, ως δύο ανεξάρτητα μονοπάτια. Την παρατήρηση αυτή συμπληρώνει η μελέτη της υποομάδας των ασθενών μας που εμφανίζει δεύτερο αυτοάνοσο νόσημα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ασθενείς με ένα αυτοάνοσο νόσημα εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης δεύτερου αυτοάνοσου νοσήματος σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [161-163]. Στην ομάδα αυτή των ασθενών μας δε σημειώθηκε διαφορά της συγκέντρωσης των υπό μελέτη μορίων, και άρα της ενεργότητας της απόπτωσης.

Σκοπός όμως κάθε κλινικής μελέτης, όπως και της δικής μας είναι η ανεύρεση νέων θεραπευτικών στόχων. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι σε πρόσφατη μελέτη παιδιών με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, η Survivin εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η in vitro αναστολή της έκφρασής της φαίνεται να μειώνει τη βιωσιμότητα των βλαστών, αποτελώντας ίσως έναν νέο θεραπευτικό στόχο [164]. Μελέτες των τελευταίων ετών επικεντρώνονται στην επαγωγή της απόπτωσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, προτείνοντας μία νέα θεραπευτική προσέγγιση [165-167]. Οι

anti-TNF παράγοντες, εκτός από την αναστολή της δράσης του TNF, φαίνεται να επάγουν την απόπτωση των αρθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων, συμβάλλοντας στον έλεγχο της φλεγμονής [83,168]. Ο TNF-α μαζί με τις επαγόμενες από αυτόν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (TRAFs) επάγει την παραγωγή αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών [169], ενώ οι IAPs είναι απαραίτητες για την παραγωγή των εξαρτώμενων από τον TNF προφλεγμονωδών παραγόντων [170]. Βρίσκονται δηλαδή σε μία συνεχή αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση για την επαγωγή της φλεγμονής και την επιβίωση του κυττάρου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση μας, κατά την οποία οι τιμές των Survivin και Cytochrome-c είναι σημαντικά χαμηλότερες στην περίπτωση των ασθενών που βρίσκονται σε αγωγή με βιολογικό παράγοντα, και συγκεκριμένα με anti-TNF, σε σύγκριση με αυτές των ασθενών που δεν λαμβάνουν αγωγή με βιολογικό παράγοντα. Η παρατήρηση αυτή, που επιβεβαιώνει την ήδη περιγραφείσα σχέση του TNF με το μηχανισμό της απόπτωσης, υποδεικνύει ένα νέο θεραπευτικό στόχο.

7. Συμπεράσματα

Με την παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά ο αποπτωτικός μηχανισμός στο αρθρικό υγρό ασθενών με ΝΙΑ, με προσέγγιση της δράσης των αποπτωτικών και αντιποπτωτικών παραγόντων.

Είναι φανερό ότι στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης η απόπτωση είναι ενεργή, μέσα από μία συνεχή αλληλεπίδραση των δύο μορίων, της Survivin και του Cytochrome-c, με μία παράλληλη και αντιρροπιστική δράση, επηρεάζοντας τη βαρύτητα και τη χρονιότητα της νόσου. Η συμμετοχή της στην παθογένεια της ΝΙΑ φαίνεται να είναι σταθερή και ανεξάρτητη από τον τύπο έκφρασης αυτής, καθώς και από την εμφάνιση των εξωαρθρικών εκδηλώσεών της. Παρόλα αυτά υπάρχει η ένδειξη ότι η ένταση της έκφρασης της απόπτωσης στην περίπτωση της συστηματικής μορφής της ΝΙΑ είναι σημαντικά μικρότερη. Είναι άλλωστε γνωστό ότι η κλινική έκφραση της σ.ΝΙΑ οφείλεται κυρίως στη δράση κυτοκινών, που τη διαφοροποιούν από τους υπόλοιπους τύπους.

Η δράση αυτή της απόπτωσης στην παθογένεια της νόσου φαίνεται να μην περιορίζεται μόνο στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης. Η Survivin και το Cytochrome-c επηρεάζουν την τιμή της αιμοσφαιρίνης, πιθανά μέσα από τη δράση των κυτοκινών, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στη διατήρηση της φλεγμονώδους διαδικασίας επάγοντας την περιφερική αύξηση των λεμφοκυττάρων. Ιδίως το Cytochrome-c αναδεικνύεται ως ένας δείκτης με σημαντική διαγνωστική αξία για την εμφάνιση αναιμίας, ένας νέος έμμεσος δείκτης πρόγνωσης της χρονιότητας και βαρύτητας της ΝΙΑ. Εύρημα που αποδίδει στο μόριο αυτό ιδιαίτερο παθογενετικό ρόλο.

Παρά το γεγονός ότι η ΝΙΑ είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα, η απόπτωση δε συμμετέχει στην παρουσία και εξέλιξη του αυτοάνοσου μηχανισμού σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Φαίνεται ότι πρόκειται για δύο διαφορετικούς και ανεξάρτητους μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την εμφάνισή της.

Η δράση του βιολογικού παράγοντα anti-TNF-α επί των συγκεντρώσεων της Survivin και του Cytochrome-c προκαλώντας την μείωση αυτών ως απάντηση στη θεραπεία, αποδεικνύει τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου, και προτείνει νέους θεραπευτικούς στόχους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Νεανική Ιδιοπαθής αρθρίτιδα είναι ένα νόσημα της παιδικής ηλικίας με χρόνια και μερικές φορές βαριά κλινική πορεία. Η μελέτη του παθογενετικού μηχανισμού της αποτελεί το επίκεντρο πολλών ερευνών, με στόχο τον έλεγχο, την αντιμετώπιση και την πρόληψη αυτής. Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός παραμένει άγνωστος, παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος προς την κατεύθυνση αυτή

Βασικό στοιχείο της παθοφυσιολογίας της ΝΙΑ αποτελεί η συνεχώς ενεργοποιημένη φλεγμονώδης αντίδραση, η οποία εκφράζεται με την επιστράτευση των λευκοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών, και ο διαρκής πολλαπλασιασμός των αρθροκυττάρων. Μία διαδικασία που οδηγεί στην εμφάνιση της αρθρίτιδας και την έκφραση των διαφορετικών τύπων της νόσου.

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού της απόπτωσης στην άρθρωση ασθενών με ΝΙΑ και η διερεύνηση του ρόλου της στην παθογένεια αυτής. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν *in vitro* δύο βασικά μόρια της απόπτωσης, η Survivin και το Cytochrome-c, που είναι γνωστό ότι έχουν αντιαποπτωτική και αποπτωτική δράση αντιστοίχως.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προκύπτει ότι:

1. Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι ενεργός στην πάσχουσα άρθρωση, με τη Survivin και το Cytochrome-c να ασκούν παράλληλα την ανταγωνιστική δράση τους.
2. Η παρουσία και έκφραση των Survivin και Cytochrome-c είναι ανεξάρτητη από τον τύπο έκφρασης της νόσου και την κλινικής της εικόνα όσον αφορά τις εξωαρθρικές εκδηλώσεις της. Στην περίπτωση των ασθενών με σ.ΝΙΑ εκφράζονται με μικρότερη ένταση, επιβεβαιώνοντας την ιδιαιτερότητα του τύπου αυτού.
3. Η δράση των υπό μελέτη μορίων και ιδίως του Cytochrome-c επεκτείνεται και εκτός της άρθρωσης, επηρεάζοντας την τιμή της αιμοσφαιρίνης και των λεμφοκυττάρων, δίνοντάς του ιδιαίτερη διαγνωστική αξία στη χρονιότητα, βαρύτητα και εξέλιξη της νόσου.
4. Η απόπτωση δε σχετίζεται με την ενεργότητα και δράση του αυτοάνοσου μηχανισμού.

5. Οι συγκεντρώσεις τόσο της Survivin όσο και του Cytochrome-c επηρεάζονται από τη θεραπευτική δράση του βιολογικού παράγοντα anti-TNF, με αποτέλεσμα τη μείωση τους.

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η απόπτωση είναι ενεργή, σε μία προσπάθεια αντιρροπιστικής δράσης μεταξύ των αντιαποπτωτικών και αποπτωτικών μορίων, κατά την πορεία την NIA συμμετέχοντας στην παθογένεια αυτής. Για πρώτη φορά διαπιστώνεται στα παιδιά ότι η Survivin και το Cytochrome-c πιθανά επηρεάζουν την κλινική πορεία και προφίλ της νόσου. Η μείωση στη συγκέντρωσή τους ως απάντηση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες καθιστά πιθανότατα τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της NIA. Η καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους στο μικροπεριβάλλον της πάσχουσας άρθρωσης ανοίγει δρόμο για νέους θεραπευτικούς στόχους.

“In vitro study of the apoptotic agents –Survivin and Cytochrome-c- in the pathogenesis of Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA)”

Abstract

Juvenile Idiopathic Arthritis is a chronic disease of childhood, and is sometimes accompanied with severe clinical manifestations. A lot of researches are focused on the pathogenesis of JIA in order to reach better control, treatment and the prevention of the disease. Despite the fact that new evidence came to light, the exact mechanism of pathogenesis remains unknown.

The pathophysiological features of JIA are the consistent inflammatory reaction, with the recruitment of white blood cells and the production of cytokines, and the continuous augmentation of FLS (fibroblast like synoviocytes). These features result in arthritis and the different types of onset.

The aim of this research was the study of the mechanism of apoptosis in the joints of patients with JIA and the investigation of its role in the pathogenesis of the disease. For this reason two principal molecules, Survivin which acts as an inhibitor and Cytochrome-c which induces the apoptosis, were studied in vitro.

According to the results in this trial:

1. The mechanism of apoptosis is present in harmed joint. As far as Survivin and Cytochrome-c is concerned, they act simultaneously and antagonistically.
2. The presence and the expression of Survivin and Cytochrome-c is irrelevant to the type of disease and its extraarticular manifestations. In the case of systematic JIA the expression of Survivin and Cytochrome-c is of a lower impact, confirming the heterogeneity of this subset.
3. The effect of these two agents, and especially of this Cytochrome-c, expands extraarticularly, affecting Hgb levels and WBC counts. According to these findings Cytochrome-c acquire a special diagnostic significance as it concerns the chronicity, the severity and the prognosis of the disease.
4. Apoptosis is irrelevant to the activity and the effect of the autoimmunity.
5. The concentration of Survivin and Cytochrome-c is affected by the treatment with the biological agent anti-TNF, showing a reduction in its levels.

It is obvious that the mechanism of apoptosis is active through a constant interaction between the antiapoptotic and apoptotic agents, as a pathogenic factor of JIA. It is showed for the first time that these two agents, Survivin and Cytochrome-c, possibly affect the progress and the clinical profile of the disease. The effect of the biological agents on the concentration of these two molecules, as a response to the treatment, suggests new promising therapeutical targets.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cassidy JT, Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Textbook of Pediatric Rheumatology. Sixth Edition
2. A.Ravelli, A.Martini. "Juvenile Idiopathic arthritis" The Lancet. 2003 March 3;369:767-778
3. Petty RE, et al, International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. J Rheumatol. 2004 Feb;31(2):390-2.
4. Woo P. "Systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, management, and outcome." Nat Clin Pract Rheumatol. 2006 Jan;2(1):28-34
5. Berntson L, et al., Incidence of juvenile idiopathic arthritis in the Nordic countries. A population based study with special reference to the validity of the ILAR and EULAR criteria. J.Rheumatol. 2003 Oct;30(10):2275-82
6. Sauermann RK, et al., Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in a multiethnic cohort: ethnicity as a risk factor. Arthritis Rheum.2007 Jun;56(6):1974-84
7. Mason TG, Reed AM, Update in juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2005 Oct 15;53(5):796-9
8. Carlens C, et al, Perinatal characteristics, early life infections and later risk of rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. Ann rheum Dis. 2009 Jul;68(7):1158-64. Epub 2008 Oct 28.
9. Massa M, et al, Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum 2002 Oct;46(10):2721-9.
10. Albani S. "Infection and molecular mimicry in autoimmune diseases of childhood". Clin Exp Rheumatol. 1994 Sep-Oct; 12 Suppl 10:S35-41
11. Pugh MT, Southwood TR, Gaston JS. "The role of infection in juvenile chronic arthritis", Br J Rheumatol. 1993 Sep; 32(9):838-44
12. B.M.Feldman, N.Bidi, J.E.Boone, P.B.Dent, C.M.Duffy, J.E.Ellsworth, B.A.Lang, R.M.Laxer, R.M.Lewkonia, P.N.Malleson, K.G.Oen, J.D.Paquin, A.M.Rosenberg, R.Schneider, E.D.Silverman. "Seasonal onset of systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis" J Ped. 1996 Oct;129(4):513-518

13. Nielsen HE, Dorup J, Herlin T, Larsen K, Nielsen S, Pedersen FK. "Epidemiology of juvenile chronic arthritis; risk dependent on sibship, parental income, and housing". *J Rheumatol*. 1999 Jul;26(7):1600-5
14. Massa M, et al, Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 oct;46(10):2721-9
15. Sicat J, et al. Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005 Sep;32(9):1821-31
16. Prahalad S, et al, Quantification of the familial contribution to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;62(8):2525-9
17. Prahalad S, et al, Familial aggregation of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 Dec;50(12):4022-7
18. Al-Mayouf SM, et al, Comparison of clinical and laboratory variables in familial versus sporadic systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2006 Mar;33(3):597-600
19. Moroldo MB, et al, Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1928-34
20. Mitterski B, et al, Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet*. 2004 Feb 4;5:2
21. Saila H, et al, HLA and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis: a study of affected sibpairs in an isolated Finnish population. *J Rheumatol*. 2004 Nov;31(11):2281-5
22. Crawley E, et al, Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999 Jun; 42(6):1101-1108
23. Prahalad S, Glass DN, A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2008 Jul 21;6:11
24. Thompson SD, et al, A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2920-30

25. Rantapaa-Dahlgvist S, et al, Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Oct;48(10):2741-9
26. Tebo AE, et al, Profiling anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2012 Aug 29;10(1):29.
27. Ravelli A, et al, Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Jan;63(1):267-75.
28. K.A.Haines. "Juvenile Idiopathic Arthritis. Therapies in the 21st Century" *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;65(3):205-11
29. Forre O, Smerdel A., Genetic epidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2003;31(3):123-8
30. Ravelli A, Martini A, Juvenile idiopathic arthritis. *Mancet.* 2007 Mar 3;369(9563):767-78
31. M.Frosch, J.Roth. "New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis- from pathophysiology to treatment" *Rheum.* 2008;47:121-125
32. Pascual V, et al, Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1479-86. Epub 2005 Apr 25.
33. Formigli L, et al, "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med.* 2004 Apr;95(2):159-64
34. Majno G, Joris I, Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, Vol.146, No.1, January 1995
35. Green DR, Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell*, Vol.102, 1-4, July 7, 2000
36. Huang Z, The Chemical Biology of Apoptosis: Exploring Protein-Protein Interactions and the Life and Death of Cells with Small Molecules. *Chemistry & Biology/ Vol.9*, 1059-1072, October, 2002
37. Green DG, Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell*, Vol. 94, 695-698, September 18, 1998
38. Chipuk JE, Green DR, Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, 2006;13:994-1002
39. www.flickr.com

40. Certo M, et al, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*. 2006 May; 9(5):351-65
41. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.
42. Munoz LE, et al, Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008 May;17(5):371-5
43. Tuller T, Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2012 Nov 29.
44. Korb A, et al, Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*, 2009 Apr;14(4):447-54.
45. Buckley CD, Why does chronic inflammatory joint disease persist? *Clin Med*. 2003 Jul-Aug;3(4):361-6.
46. Baier A, et al, Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr opin Rheumatol*. 2003 May;15(3):274-9.
47. Sugiyama M., et al, Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996 Jul;55(7):442-9.
48. Perlman H, et al, Bcl-2 Expression in Synovial Fibroblasts Is Essential for Maintaining Mitochondrial Homeostasis and Cell Viability. *J Immunol*. 2000; 164:5227-5235;
49. Zhang H, et al, Elimination of rheumatoid synovium in situ using a Fas ligand 'gene scalpel'. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6):R1235-43.
50. Yao Q, et al, Adenoviral mediated delivery of FAS ligand to arthritic joints causes extensive apoptosis in the synovial lining. *J Gene Med*. 2000 May-Jun;2(3):210-9.
51. Ates A, et al, The levels of serum-soluble Fas in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2003 Oct;23(5):421-425
52. Eguchi K, Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*. 2001 Apr;40(4):275-84.
53. Sakurai N, et al, Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jun;47(6):815-20.

54. Meinecke I, et al, Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Mar 20;104(12):5073-8
55. Pap T. Regulation of apoptosis in aggressive fibroblasts. *Z Rheumatol*. 2007 May;66(3):239-40, 242
56. Hayashi S, et al, Decoy receptor 3 expressed in rheumatoid synovial fibroblasts protects the cells against Fas-induced apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1067-75.
57. Garcia-Lozano JR, et al, Caspase 7 influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Aug;46(8):1243-7. Epub 2007 May 15.
58. Byun HS, et al, Caspase-8 has an essential role in resveratrol-induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Mar;47(3):301-8.
59. Palao G, et al, Fas activation of a proinflammatory program in rheumatoid synoviocytes and its regulation by FLIP and caspase 8 signaling. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1473-81.
60. Kim WU, et al, Hydroxychloroquine potentiates Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes. *Clin Exp Immunol*. 2006 Jun;144(3):503-11.
61. Pap T, et al, Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000; 2(5): 361–367.
62. Buckley CD, Michael Mason prize essay 2003. Why do leucocytes accumulate within chronically inflamed joints? *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Dec;42(12):1433-44.
63. Ju ST, et al, Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995 Feb 2;373(6513):444-8.
64. Peng SL, Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jan;45(1):26-30.
65. Salmon M, et al, Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):439-46.
66. Du F, et al, Role of GADD45 beta in the regulation of synovial fluid T cell apoptosis in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*. 2008 Aug;128(2):238-47. doi: 10.1016/j.clim.2008.03.523. Epub 2008 May 23.

67. Lin YP, et al, Aberrant integrin activation induces p38 MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: implications for rheumatoid arthritis. *Mol Immunol.* 2009 Oct;46(16):3328-35.
68. Cross A, et al, Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J Leukoc Biol.* 2006 Sep;80(3):521-8.
69. Hallett JM, et al, Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 May;29(5):250-7
70. Edwards JC, Cambridge J, Is rheumatoid arthritis a failure of B cell death in synovium? *Ann Rheum Dis.* 1995 September; 54(9): 696–700.
71. Zheng B, et al, Overexpression of Bcl(XL) in B cells promotes Th1 response and exacerbates collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2007 Nov 15;179(10):7087-92.
72. Kim WU, et al, Soluble Fas ligand inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R42.
73. Okamoto K, et al, Induction of apoptosis in the rheumatoid synovium by Fas ligand gene transfer. *Gene Ther.* 1998 Mar;5(3):331-8
74. Kawakami A, et al, Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res.* 1997 Oct;12(10):1637-46.
75. Zhang Q, et al, Tumor necrosis factor prevents alendronate-induced osteoclast apoptosis in vivo by stimulating Bcl-xL expression through Ets-2. *Arthritis Rheum.* 2005 Sep;52(9):2708-18.
76. Chou CT, et al, Apoptosis in rheumatoid arthritis--expression of Fas, Fas-L, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. *J Pathol.* 2001 Jan;193(1):110-6.
77. Sioud M, et al, Analysis of the NF-kappa B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2-related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA. *Clin Exp Rheumatol.* 1998 Mar-Apr;16(2):125-34.
78. Telegina E, et al, A possible role of Fas-ligand-mediated "reverse signaling" in pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett.* 2009 Jan 29;122(1):12-7.
79. Tuller T, et al, Global map of physical interactions among differentially expressed genes in multiple sclerosis relapses and remissions. *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 15;20(18):3606-19.

80. Schiller M, et al, Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):183-91.
81. Hof D, Apoptotic modifications affect the autoreactivity of the U1 snRNP autoantigen. *Autoimmun Rev.* 2005 Jul;4(6):380-8.
82. Munoz LE, et al, The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 May;6(5):280-9
83. Catrina AI, et al, Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum.* 2005 Jan;52(1):61-72.
84. Mazur AJ, et al, Methotrexate induces apoptosis in CaSki and NRK cells and influences the organization of their actin cytoskeleton. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jun 24;613(1-3):24-33.
85. Wijbrandts CA, Analysis of apoptosis in peripheral blood and synovial tissue very early after initiation of infliximab treatment in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2008 Nov;58(11):3330-9.
86. Kruithof E, et al, Distinct Synovial Immunopathologic Characteristics of Juvenile-Onset Spondylarthritis and Other Forms of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 54, No. 8, August 2006, pp 2594–2604
87. Feyen O, et al, Impaired CD95-mediated apoptosis in autoimmunity and occurrence of a p22 Caspase-8 cleavage product in JIA. *Klin Padiatr.* 2008 Nov-Dec;220(6):358-64
88. Smolewska E, et al, Regulation of peripheral blood and synovial fluid lymphocyte apoptosis in juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(1):7-12.
89. Smolewska E, et al, Inhibited apoptosis of synovial fluid lymphocytes in children with juvenile idiopathic arthritis is associated with increased expression of myeloid cell leukemia 1 and XIAP proteins. *J Rheumatol.* 2006 Aug;33(8):1684-90.
90. Smolewska E, Relationship between impaired apoptosis of lymphocytes and distribution of dendritic cells in peripheral blood and synovial fluid of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008 August; 56(4): 283–289.

91. Smolewska E, et al, Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Aug;62(8):761-3.
92. Haas JP, et al, Inverted ratio of m-fas/s-fas expression in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Eur J Immunogenet*. 1999 Oct;26(5):325-9.
93. Munoz LE, et al, The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 May;6(5):280-9.
94. Harjacek M, et al, Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2001 Aug;28(8):1914-22.
95. Caparbo VF, et al, Serum from children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis (pJIA) inhibits differentiation, mineralization and may increase apoptosis of human osteoblasts "in vitro". *Clin Rheumatol*. 2009 Jan;28(1):71-7.
96. LaCasse EC, et al, The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25):3247-59.
97. Kawasaki H, et al, Inhibition of Apoptosis by Survivin Predicts Shorter Survival Rates in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-5074.
98. Ambrosini G, et al, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):917-21.
99. Carter BG, et al, Cytokine-regulated expression of *survivin* in myeloid leukemia. *Blood*, 2001 97: 2784-2790.
100. <http://imgenex.com>
101. Isgren A, et al, High survivin levels predict poor clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Apr;41(5):652-7.
102. Bokarewa M, et al, Balance between survivin, a key member of the apoptosis inhibitor family, and its specific antibodies determines erosivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(2):R349-58
103. Dharmapatni AA, et al, Elevated expression of caspase-3 inhibitors, survivin and xIAP correlates with low levels of apoptosis in active rheumatoid synovium. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R13.

104. Park Mc, et al, Relationship of angiogenic factors to disease activity and radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Sep-Oct;26(5):881-6.
105. Mera S, et al, Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. *J Leukoc Biol*. 2008 Jan;83(1):149-55. Epub 2007 Oct 15.
106. Bokarewa M, et al, Pathological survivin expression links viral infections with pathogenesis of erosive rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):192-8.
107. Baran M, et al, Survivin is an essential mediator of arthritis interacting with urokinase signalling. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9B):3797-808
108. Galeotti L, et al, Circulating survivin indicates severe course of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Mar-Apr;26(2):373-8.
109. Figueroa B Jr, et al, Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Mar 20;85(6):589-600.
110. Yang J, et al, Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1129-32.
111. Cai J, et al, Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):139-49.
112. Bossy-Wetzel E, Grenn DR, Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res*. 1999 Jul 30;434(3):243-51.
113. Twiddy D, et al, Pro-apoptotic Proteins Released from the Mitochondria Regulate the Protein Composition and Caspase-processing Activity of the Native Apaf-1/Caspase-9 Apoptosome Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. May 2004;279(19):19665–19682.
114. Zimmermann KC, et al, The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001 Oct;92(1):57-70.
115. Itoh K, et al, Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2004 Mar;43(3):277-85. Epub 2003 Nov 17
116. Pullerits R, et al, Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Jan;44(1):32-9

117. Skulachev VP, Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998 Feb 27;423(3):275-80.
118. Biniecka M, et al, Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* August 2011;63(8):2172-82
119. Kammouni W, et al, Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep;56(9):2854-63.
120. Archer CW, et al, Development of synovial joints. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews.* 2003 May;69(2):144-155
121. Simkin PA, Synovial perfusion and synovial fluid solutes. *Ann Rheum Dis.* 1995 May; 54(5): 424–428.
122. Aceves-Avila FJ, et al, The first descriptions of therapeutic arthrocentesis: a historical note. *Rheumatology* 2003;42:180–183
123. Corvetta A, et al, An immunochemical study of the synovial fluid can contribute to the distinction between rheumatoid and non rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1984 Apr-Jun;2(2):111-7.
124. Beukelman T, et al, Optimal Treatment of Knee Monarthritis in Juvenile Idiopathic Arthritis: A Decision Analysis. *Arthritis & Rheumatism* 2008 Nov;59(11):1580-1588
125. Reiff A, et al, Evaluation of the comparative efficacy and tolerability of rofecoxib and naproxen in children and adolescents with juvenile rheumatoid arthritis: a 12-week randomized controlled clinical trial with a 52-week open-label extension. *J Rheumatol.* 2006 May;33(5):985-95.
126. Gutierrez-Suarez R, Burgos-Vargas R, The use of methotrexate in children with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5 Suppl 61):S122-7.
127. Lovell DJ, et al, Etanercept in children with polyarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis. *N Engl j Med.* 2000;342:763-9.
128. Lovell DJ, et al, Long-Term Safety and Efficacy of Etanercept in Children With Polyarticular-Course Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* Vol. 54, No. 6, June 2006, pp 1987–1994
129. D.J.Lovell. “Update on treatment of arthritis in children. New treatments, new goals” *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2006;64(1&2):72-76.

130. Ternynck T, Avrameas S, Ανοσοενζυμικές Τεχνικές 1990. Έκδοση Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.
131. Aman S, et al, The value of synovial fluid analysis in the assessment of knee joint destruction in arthritis in a three year follow up study. *Ann Rheum Dis.* 1999 Sep;58(9):559-62.
132. Hashimoto H, et al, Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998 Apr;41(4):657-62.
133. Oen K, Cheang M, Epidemiology of chronic arthritis in childhood.. *Semin Arthritis Rheum.* 1996 Dec;26(3):575-91.
134. Petty RE, et al, International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004 Feb;31(2):390-2.
135. Kurowska M, et al, Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients Express Functional IL-15 Receptor Complex: Endogenous IL-15 in Autocrine Fashion Enhances Cell Proliferation and Expression of Bcl-xL and Bcl-2. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 1760–1767.
136. Perlman H, et al, Differential expression pattern of the antiapoptotic proteins, Bcl-2 and FLIP, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 Dec;44(12):2899-908.
137. Fengzhi L., Survivin Study: What Is the Next Wave? *J. Cell. Physiol.* 2003, 197: 8–29.
138. Liu X, et al, Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*, 1996, July 12; Vol. 86: 147–157.
139. Zou H, et al, An APAF-1γCytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9.
140. Renz A, et al, Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. *Blood*, 2001; 98: 1542-1548.
141. Li WX, et al, Thimerosal-Induced Apoptosis in Mouse C2C12 Myoblast Cells Occurs through Suppression of the PI3K/Akt/Survivin Pathway. *PLoS One.* 2012; 7(11): e49064.

142. Lu XL, et al, Sinomenine hydrochloride inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo: involvement of cell cycle arrest and apoptosis induction. *Int J Oncol*. 2013 Jan;42(1):229-38.
143. Arbab IA, et al, Dentatin Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Bcl-2, Bcl-xL, Survivin Downregulation, Caspase-9, -3/7 Activation, and NF-κB Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:856029.
144. Firestein GS, et al, Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest*. 1995 Sep;96(3):1631-8.
145. Gattorno M, Martini A, Inherited autoinflammatory syndromes: an expanding new group of chronic inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2005 Mar-Apr;23(2):133-6.
146. Ooi KG, et al, Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006 Dec;4(4):294-309.
147. Parikh JG, et al, Immunohistochemical study of chronic nongranulomatous anterior uveitis in juvenile idiopathic arthritis. *Ophthalmology*. 2008 Oct;115(10):1833-6.
148. Oen K, et al, Early predictors of longterm outcome in patients with juvenile rheumatoid arthritis: subset-specific correlations. *J Rheumatol*. 2003 Mar;30(3):585-93.
149. Jarvis JN, et al, Neutrophils: the forgotten cell in JIA disease pathogenesis. *Pediatric Rheumatology* 2007, 5:13.
150. Martini A, et al, Intravenous iron therapy for severe anaemia in systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Lancet*. 1994 Oct 15;344(8929):1052-4.
151. Cazzola M, et al, Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood*. 1996 Jun 1;87(11):4824-30.
152. Papadaki HA, et al, Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):474-82.
153. N.Adib, S.Tomson, W.Tomson. "Outcome following onset of juvenile idiopathic inflammatory arthritis: Ii. Predictors of outcome in juvenile arthritis" *Rheumatol*. 2005;44:1002-1007

154. Omar A, et al, Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody in juvenile idiopathic arthritis (JIA): Correlations with disease activity and severity of joint damage (a multicenter trial). *Joint Bone Spine*. 2012 May 8.
155. Gilliam BE, Measurement of biomarkers in juvenile idiopathic arthritis patients and their significant association with disease severity: a comparative study. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 May-Jun;26(3):492-7.
156. Hakala M, et al, Application of markers of collagen metabolism in serum and synovial fluid for assessment of disease process in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1995 Nov;54(11):886-90.
157. Aman S, et al, Prediction of disease progression in early rheumatoid arthritis by ICTP, RF and CRP. A comparative 3-year follow-up study. *Rheumatology* 2000 Sep;39(9):1009-13.
158. Sahim M, et al, Serum soluble Fas levels in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Biochem*. 2007 Jan;40(1-2):6-10.
159. Grimstein C, et al, Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model. *J Transl Med*. 2011; 9: 21.
160. McGhee JL, et al, Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *BMC Pediatr*. 2004; 4: 13.
161. Harel L, et al, Increased prevalence of antithyroid antibodies and subclinical hypothyroidism in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2006 Jan;33(1):164-6.
162. Pohjankoski H, et al, Diabetes, coeliac disease, multiple sclerosis and chronic arthritis in first-degree relatives of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Acta Paediatr*. 2012 Jul;101(7):767-71.
163. Iaccarino L, et al, Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev*. 2013 Jan;12(3):363-73.
164. Tyner JW, et al, Targeting survivin and p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2012) 26, 623–632.
165. Majumdar KN, et al, Leishmanial lipid suppresses tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide production by adherent synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients and induces apoptosis through the mitochondrial-mediated pathway. *Arthritis Rheum*. 2008 Mar;58(3):696-706.

166. Kreuter M, et al, Stroke, myocardial infarction, acute and chronic inflammatory diseases: caspases and other apoptotic molecules as targets for drug development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004 May-Jun;52(3):141-55.
167. Cornelis S, et al, Inflammatory caspases: targets for novel therapies. *Curr Pharm Des*. 2007;13(4):367-85.
168. Shen C, et al, Caspase activation and apoptosis induction by adalimumab: demonstration in vitro and in vivo in a chimeric mouse model. *Imflamm Bowel Dis*. 2006 Jan;12(1):22-8.
169. Wajant H, Scheurich P, Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Jan;33(1):19-32.
170. Kearney CJ, et al, IAPs and their Antagonists Regulate Spontaneous and TNF-Induced Pro-Inflammatory Cytokine and Chemokine. *J Biol Chem*. 2012 Dec 28.