



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος:

**Μελέτη του δικτύου αναγνώρισης και επιδιόρθωσης
της βλάβης του DNA
σε ανθρώπινα λεμφομονοκύτταρα**

Μαρία Παππά

Ιατρός

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2020

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δημήτριος Βασιλόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας- Ρευματολογίας, Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ

Δημήτριος Μπούμπας, Καθηγητής Παθολογίας- Ρευματολογίας, Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ

Κλειώ Μαυραγάνη, Αν. Καθηγήτρια Πειραματικής και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας, ΕΚΠΑ

Υπό την επίβλεψη των:

Πέτρου Π. Σφηκάκη, Καθηγητή Παθολογίας,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή,

Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική και Ειδική Νοσολογία

Βασιλείου Λ. Σουλιώτη, Ερευνητή Α'.

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών,

Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος “Ρευματολογία και Μυοσκελετική Υγεία” της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πριν από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή της διπλωματικής εργασίας και Διευθυντή μου, Καθηγητή κύριο Πέτρο Σφηκάκη για την καθοδήγηση του, καθώς και για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα, Ερευνητή Α' κύριο, Βασίλειο Σουλιώτη για την πολύτιμη βοήθειά του και την υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Οι συμβουλές, η πείρα και η καθοδήγηση αμοτέρων υπήρξε πολύτιμη σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στους συναδέλφους μου, μέλη του εργαστηρίου Ρευματολογίας της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και φίλους Νικόλαο Βλαχόγιαννη, Αλεξάνδρα Αργυρίου και Παναγιώτη Ντούρο που με υπομονή και κουράγιο ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν με την πειραματική διαδικασία, καθώς και με τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Σταυρούλα, για την αμέριστη υποστήριξη και την απαραίτητη συμπαράσταση που μου προσέφεραν για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη του δικτύου αναγνώρισης και επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA σε ανθρώπινα λεμφομονοκύτταρα

Παπά Μ.

Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική και Ειδική Νοσολογία, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Εισαγωγή: Προηγούμενα επιστημονικά δεδομένα προτείνουν ότι οι ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα έχουν ελαττωματική επιδιορθωτική ικανότητα του DNA.

Σκοπός: Θα εξεταστεί η υπόθεση ότι η επιδιορθωτική ικανότητα του DNA είναι ελαττωματική σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ) και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ), συνδέεται με τη συσσώρευση ενδογενών βλαβών και θα αναζητηθούν κλινικο-εργαστηριακές συσχετίσεις.

Μέθοδοι: Λεμφομονοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 20 ασθενείς με ΡΑ, 20 με ΣΕΛ και 50 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Καταγράφηκαν δημογραφικά και κλινικο-εργαστηριακά στοιχεία για καθένα συμμετέχοντα στη μελέτη. Η συσσώρευση ενδογενών βλαβών μελετήθηκε με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης υπό αλκαλικές συνθήκες (comet assay).

Αποτελέσματα: Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενδογενών βλαβών βρέθηκαν στους ασθενείς συγκριτικά με ΥΜ [Μονάδες Olive Tail Moment: ΥΜ: 4.5 ± 2.3 (1.5-10.7), ΡΑ: 11.8 ± 6.9 (5.1-35.5), ΣΕΛ: 8.2 ± 4.5 (2.4-23.0), $p < 0.05$]. Ο OTM παρουσιάζει μια τάση συσχέτισης με τον ρευματοειδή παράγοντα στους ασθενείς με ΡΑ, ωστόσο στην υποομάδα των ασθενών με ΣΕΛ δεν ανεδείχθησαν σημαντικές κλινικές συσχετίσεις.

Συμπεράσματα: Η συσσώρευση ενδογενών βλαβών του DNA είναι κοινό χαρακτηριστικό ασθενών με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα και συνδέεται με την κλινικο-εργαστηριακή εικόνα αυτών των ασθενών.

ABSTRACT

The DNA Damage Response and Repair Network in human peripheral blood mononuclear cells

Pappa M.

A' Propaedeutic and Internal Medicine Department, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens

Introduction: Recent studies highlight that defects in DNA Damage Response and Repair Network are present in patients with systemic autoimmune diseases.

Aim: Our purpose is to study DDR/R network in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and to test the hypothesis that these patients show defects in this network.

Methods: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated from 20 patients with RA, 20 with SLE and 50 apparently healthy controls (HC). Clinical and laboratory data were obtained from each participant after informed consent. Endogenous DNA damage [Single Strand (SSBs) and Double Strand (DSBs) DNA breaks] was measured by alkaline comet assay.

Results: Increased levels of endogenous DNA damage were present in patients compared to healthy controls [Olive Tail Moment arbitrary units: HC: 4.5 ± 2.3 (1.5-10.7), RA: 11.8 ± 6.9 (5.1-35.5), SLE: 8.2 ± 4.5 (2.4-23.0), $p < 0.05$]. Rheumatoid factor (RF) is related with OTM in patients with RA; however, no statistically significant correlations were observed in SLE subgroup.

Conclusions: Patients with systemic autoimmune diseases accumulate endogenous DNA damage, that is related with clinical and laboratory characteristics of these patients.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA	10
2.1 Άμεση επιδιόρθωση DNA	10
2.2 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair- BER).....	11
2.3 Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair- NER)	12
2.4 Επιδιόρθωση μη συμπληρωματικής βάσης (Mismatch Repair- MMR)	14
2.5 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραυσμάτων DNA (Double Strand Break Repair- DSB)	16
2.5.1 Μη Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Non Homologous End Joining- NHEJ)	16
2.5.2 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous recombination- HR) ...	17
3. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ- ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	20
3.1 Γενικά.....	20
3.2 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα.....	21
3.3 Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος.....	24
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΗ	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29

2.1 Πληθυσμός της μελέτης.....	29
2.2 Μέθοδοι	29
2.2.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από συνολικό αίμα.....	29
2.2.2 Μελέτη της ενδογενούς βλάβης του DNA με ηλεκτροφόρηση μοναδιαίων κυττάρων υπό αλκαλικές συνθήκες	30
2.2.3 Στατιστική Ανάλυση.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	33
3.2 Αυξημένη ενδογενής βλάβη του DNA στους ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα.....	36
3.3 Κλινικές συσχετίσεις της ενδογενούς βλάβης του DNA των PBMCs σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης.....	37
3.4 Κλινικές συσχετίσεις της ενδογενούς βλάβης του DNA των PBMCs σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3.000.000.000 ζεύγη βάσεων τα οποία κωδικοποιούν περίπου 30.000- 40.000 γονίδια. Η μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας αναλλοίωτη από γενιά σε γενιά είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία και ομοιοστασία του οργανισμού. Ωστόσο, το ανθρώπινο γονιδίωμα αντιμετωπίζει καθημερινά μερικές χιλιάδες DNA βλάβες, είτε εξαιτίας “λαθών” κατά την αντιγραφή είτε εξαιτίας ενδογενών (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) ή/και εξωγενών “απειλών”, όπως η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία ή μεταλλαξιογόνοι παράγοντες και χημειοθεραπευτικές ουσίες, που απειλούν την ακεραιότητά του. Για το λόγο αυτό, η σταθερότητα του γενετικού υλικού εξασφαλίζεται από ένα σύστημα ελέγχου, αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των βλαβών που επισυμβαίνουν (1).

Η διαδικασία αυτή εκτελείται από ένα εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό, που ονομάζεται δίκτυο κυτταρικής απόκρισης και επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA (DNA Damage Response and Repair System, DDR/R). Πρόκειται για ένα δίκτυο ιεραρχικά δομημένων μονοπατιών σηματοδότησης, που ενεργοποιείται με την ανίχνευση βλάβης του DNA μέσω ειδικών αισθητήρων και ακολουθείται από μια διαδικασία μεταγωγής σήματος η οποία, στο τελικό βήμα, ενεργοποιεί μηχανισμούς προστασίας του γονιδιώματος (2, 3).

Η άθροιση βλαβών επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων και του οργανισμού. Η αδυναμία επιδιόρθωσης των συσσωρευμένων βλαβών οδηγεί το κύτταρο, είτε σε δημιουργία μεταλλάξεων και αλλαγή της γενετικής πληροφορίας του γονιδιώματος των απογόνων του, είτε σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ή γήρανση (4).

Μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός από ερευνητικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η αναποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA συσχετίζεται με κληρονομικές γενετικές διαταραχές, όπως η Αταξία- Τηλεαγγειεκτασία (AT) και η αναιμία Fanconi (FA) (5), καθώς και με νεοπλασίες (6, 7). Πιο πρόσφατες, νεότερες, δημοσιεύσεις αναδεικνύουν, όμως, τη συμμετοχή του παραπάνω δικτύου στην παθογένεια και την εξέλιξη και των συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων, μεταξύ των οποίων η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA) (8- 11) και ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) (12, 13).

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Η πληθώρα των βλαβών του DNA απαιτεί και την ύπαρξη πολλαπλών, διαφορετικών μηχανισμών επιδιόρθωσης, αντίστοιχων προς το είδος των βλαβών.

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA είναι: (i) Άμεση επιδιόρθωση DNA (Direct DNA repair), (ii) Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair- BER), (iii) Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair- NER), (iv) Επιδιόρθωση μη συμπληρωματικής βάσης (Mismatch Repair- MMR), και (v) Επιδιόρθωση δίκλωνων θραυσμάτων DNA (Double Strand Break Repair- DSB)

2.1 Άμεση επιδιόρθωση DNA

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται 3 μηχανισμοί επιδιόρθωσης:

Επιδιόρθωση από την O6 μεθυλγουανίνη- DNA μεθυλοτρανσφεράση (MGMT): η MGMT επιδιορθώνει σημειακές βλάβες στο DNA που επάγονται από την επίδραση αλκυλιωτικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα, η O6- μεθυλγουανίνη, που οδηγεί σε μεταστροφή του τύπου GC>AT κατά τη διάρκεια αντιγραφής του DNA (14). Ο ρόλος της MGMT είναι προστατευτικός για τη λειτουργία του κυττάρου, όπως αποδεικνύεται από πειραματικά μοντέλα επίμυων, στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου της MGMT. Αν και οι επίμυες είχαν φυσιολογικό φαινότυπο, παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα των ιστών που πολλαπλασιάζονται ταχέως, όπως ο μυελός των οστών, ο θύμος αδένας και ο σπλήνας, ύστερα από την επίδραση του αλκυλιωτικού παράγοντα MNU (15).

Ανάταξη βλάβης του DNA από ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας AlkB: πρόκειται για ακόμα έναν μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών του DNA που επάγονται από την επίδραση αλκυλιωτικών παραγόντων που μεσολαβείται από ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας AlkB. Η δράση αυτού του ενζύμου έχει μελετηθεί εκτενώς στο βακτήριο *Escherichia coli*, ενώ στον άνθρωπο έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα οχτώ ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας AlkB (16).

Φωτοεπιδιόρθωση: ο συγκεκριμένος μηχανισμός επιδιόρθωσης αποκαθιστά βλάβες στο DNA που προκαλούνται από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV radiation). Η υπεριώδης ακτινοβολία δημιουργεί δύο τύπους βλαβών, τα διμερή πυριμιδίνης (CPDs) και τα 6- 4 πυριμιδίνη- πυριμιδόνη φωτοπροϊόντα, τα οποία διασπώνται σε μονομερή, ύστερα από τη δράση πρωτεϊνών της οικογένειας των φωτολυασών/ κρυπτοχρωμάτων (17).

2.2 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair- BER)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (BER) είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση βάσεων του DNA που έχουν υποστεί βλάβη μέσω οξειδωσης, απαμίνωσης ή αλκυλίωσης από ενδογενείς ή εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες (18,19).

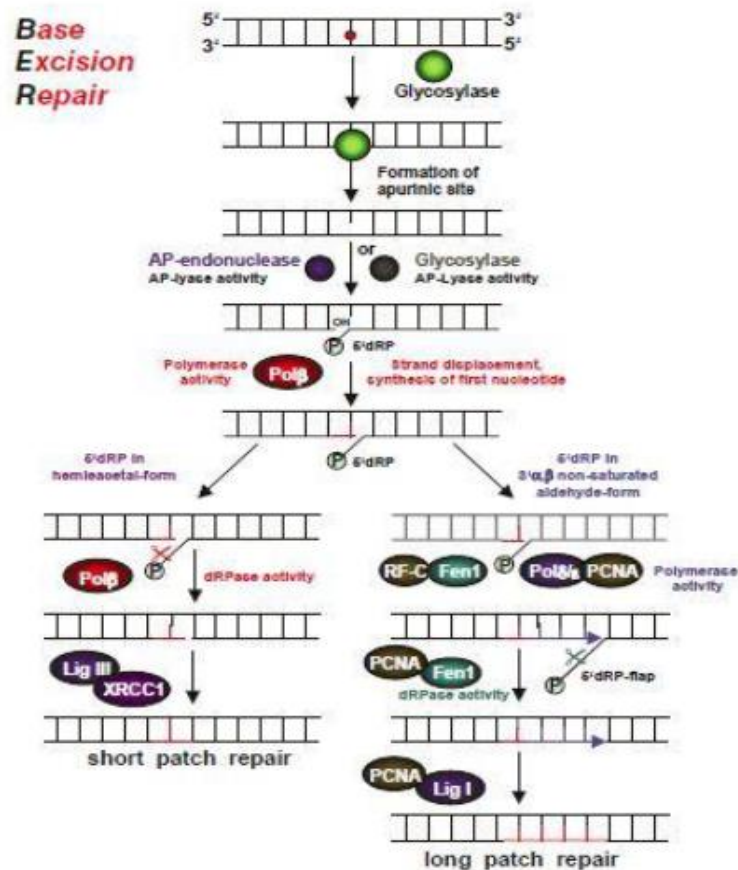
Ο BER αποτελείται από δύο μονοπάτια. Το απλούστερο μονοπάτι, που ονομάζεται Short Patch BER (SP- BER) αφήνει κενό μήκους ενός νουκλεοτιδίου, αντίθετα, το δεύτερο μονοπάτι, το Long Patch BER (LP- BER), δημιουργεί κενό που έχει μήκος ορισμένα νουκλεοτίδια (δύο έως οχτώ) (20). Η επιλογή μεταξύ του ενός ή του άλλου μονοπατιού εξαρτάται από τον τύπο της βλάβης, το είδος της αβασικής θέσης (Apyriminic/ apyrimidinic site, AP site) που δημιουργείται κατά το πρώτο βήμα της επιδιόρθωσης και από τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

Η διαδικασία επιδιόρθωσης ολοκληρώνεται σε πέντε στάδια:

1. Αναγνώριση της βλάβης, απομάκρυνση της βάσης και διάνοιξη: στο αρχικό στάδιο οι DNA γλυκοζυλάσες αναγνωρίζουν τις τροποποιημένες βάσεις ή τις βάσεις που έχουν ενσωματωθεί κατά λάθος και τις απομακρύνουν με υδρόλυση του N- γλυκοζιδικού δεσμού (21). Διακρίνονται δύο κατηγορίες γλυκοζυλασών, η κατηγορία I, όπου απομακρύνεται η λανθασμένη βάση και δημιουργείται μια αβασική θέση στο DNA και η κατηγορία II, όπου την απομάκρυνση της βάσης ακολουθεί διάσπαση της αβασικής θέσης και δημιουργία ενός μονόκλωνου θραύσματος DNA σε εκείνο το σημείο.
2. Εισαγωγή νουκλεοτιδίου: η εισαγωγή του πρώτου νουκλεοτιδίου είναι ανεξάρτητη από τη χημική δομή της αβασικής θέσης. Το κύριο ένζυμο σε αυτό το στάδιο είναι η DNA πολυμεράση β (Pol β), η οποία συμμετέχει και στα δύο BER μονοπάτια, εισάγοντας το πρώτο νουκλεοτίδιο (14).
3. Απόφαση μεταξύ SP- BER ή LP-BER: το κρίσιμο σημείο μεταξύ SP- BER ή LP- BER αποτελεί η απομάκρυνση του 5' δεοξυριβοφωσφορικού (5' dRP) άκρου μετά την εισαγωγή του πρώτου νουκλεοτιδίου. Η Pol β απομακρύνει το 5' dRP άκρο και προσθέτει ένα νουκλεοτίδιο στο κενό, στην περίπτωση του SP- BER. Μεταξύ των δύο μονοπατιών το SP- BER είναι το σημαντικότερο, αφού επιδιορθώνονται πάνω από 75% των βλαβών διαμέσου αυτού.
4. Αποκατάσταση του μονόκλωνου θραύσματος και επιδιορθωτική σύνθεση του DNA διαμέσου του LP- BER: στην περίπτωση που η Pol β δεν απομακρύνει το 5' dRP άκρο,

τότε η Pol δ/ε προσθέτει 2-8 νουκλεοτίδια στην περιοχή της επιδιόρθωσης, σε συνεργασία με τα ένζυμα PCNA και RF-C. Αυτό το μονοπάτι αποκαλείται LP- BER (22).

5. Συνένωση: το στάδιο της συνένωσης πραγματοποιείται από τις DNA λιγάσες I και III. Στο LP- BER η λιγάση I αλληλοεπιδρά με την PCNA και την Pol β και ενώνει τα εναπομείναντα άκρα του DNA, ενώ στο SP- BER η λιγάση III αλληλοεπιδρά με τις XRCC1, Pol β και PARP-1 και ολοκληρώνει τη συνένωση (22).



Εικόνα 1: Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair, BER) (14)

2.3 Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair - NER)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου (NER) επιδιορθώνει ένα μεγάλο εύρος DNA βλαβών. Κοινό γνώρισμα των βλαβών αυτών είναι ότι πρόκειται για ογκώδεις DNA βλάβες, οι οποίες λόγω του όγκου τους προκαλούν αλλαγές στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του DNA.

Τέτοιες βλάβες είναι τα διμερή πυριμιδίνης και τα 6-4 φωτοπροϊόντα που προκαλούνται από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς και οι βλάβες που προκαλούνται από

πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, από χημειοθεραπευτικά φάρμακα με αλκυλιωτική δράση, όπως η μελφαλάνη κ.ά. (23).

Διακρίνονται δύο ξεχωριστά μονοπάτια στο NER. Το πρώτο μονοπάτι περιλαμβάνει το μηχανισμό του NER που επιδιορθώνει τις DNA βλάβες κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος και αναφέρεται ως Global Genome Repair- GGR ή GG- NER, και το δεύτερο αναλαμβάνει να επιδιορθώσει βλάβες που απαντώνται κατά μήκος μόνο των μεταγραφόμενων αλυσίδων του DNA των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων και αναφέρεται Transcription Coupled Repair- TCR ή TC- NER (24).

Συνολικά, πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλά διαφορετικά στάδια στην οποία συμμετέχουν περίπου 30 διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια (25).

Το αρχικό στάδιο της διαδικασίας αφορά την αναγνώριση της βλάβης και είναι διαφορετικό για τους δύο υπομηχανισμούς. Στην περίπτωση του GGR, η αναγνώριση της βλάβης πραγματοποιείται από το μόριο XPC, που είναι μέρος του διμερούς XPC- HR23B. Η πρόσδεση του συμπλόκου XPC- HR23B στην περιοχή της βλάβης, σε συνδυασμό με το σύμπλοκο XPE αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την περαιτέρω οργάνωση όλων των απαιτούμενων πρωτεϊνών στα παρακάτω βήματα (26). Από την άλλη, στην περίπτωση του TCR, από τη στιγμή της ακινητοποίησης της RNA πολυμεράσης II (RNAPII) στο σημείο της βλάβης, καθοριστικό ρόλο στο στάδιο της αναγνώρισης της βλάβης έχουν οι πρωτεϊνικοί παράγοντες CSA και CSB (27).

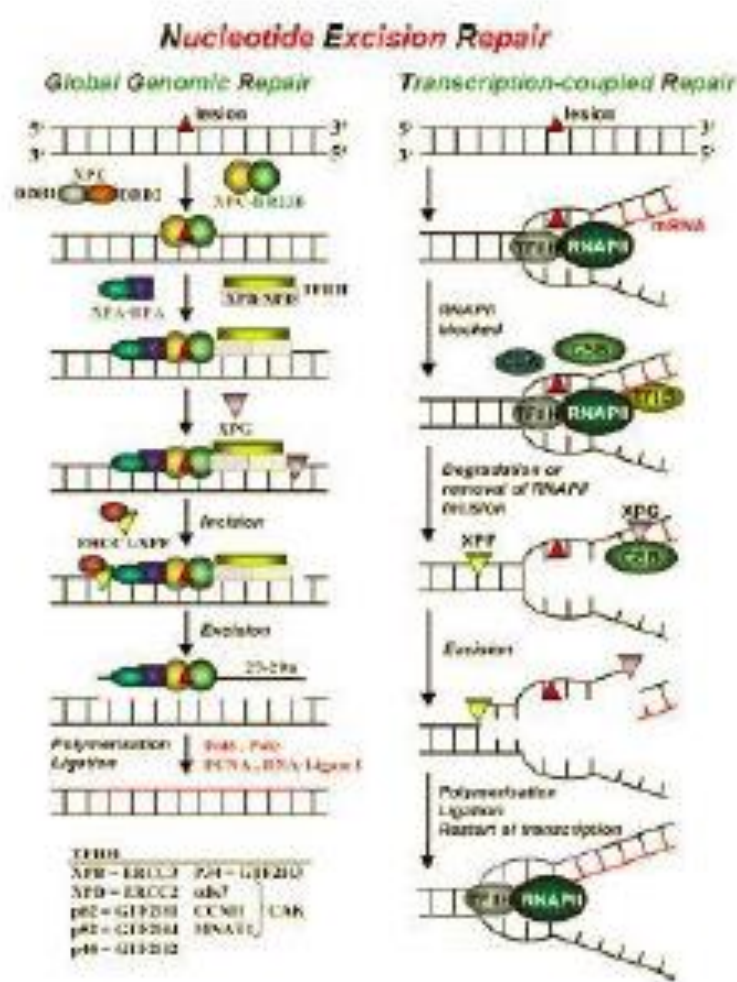
Στο επόμενο στάδιο ακολουθεί το ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA στην περιοχή όπου εντοπίζεται η βλάβη. Στο συγκεκριμένο στάδιο πρωταρχικό ρόλο διαδραματίζει το μόριο TFIIH και η πρωτεΐνη RPA (Replication Protein A). Ο TFIIH είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τουλάχιστον δέκα διαφορετικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και δύο με ενεργότητα ελικάσης, που συνεπάγεται το ξετύλιγμα της διπλής έλικας στη συγκεκριμένη περιοχή (27).

Στη συνέχεια, οι ενδονουκλεάσες XPG και ERCC1- XPF τέμνουν και απομακρύνουν την περιοχή που φέρει τη βλάβη κατά την κατεύθυνση 5'→3', δεξιά της βλάβης (28, 29).

Στο τελικό στάδιο, οι DNA πολυμεράσες δ και ε αναλαμβάνουν την σύνθεση του DNA χρησιμοποιώντας τον άθικτο κλώνο ως μήτρα και η επιδιόρθωση ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των γειτονικών νουκλεοτιδίων με τη δράση της DNA λιγάσης I.

Η βιολογική σημασία του NER αποτυπώνεται στην εμφάνιση κληρονομικών γενετικών συνδρόμων στον άνθρωπο που οφείλονται σε ελαττωματική λειτουργία διαφορετικών

πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτόν. Πρόκειται για τα σύνδρομα Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum- XP), σύνδρομο Cockayne (Cockayne Syndrome- CS) και Τριχοθιοδυστροφία (Trichothiodystrophy- TTD) που χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στην ηλιακή ακτινοβολία, εμφάνιση νεοπλασιών, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, ανοσολογικά ελλείμματα κ.ά. (30).



Εικόνα 2: Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair, NER) (14)

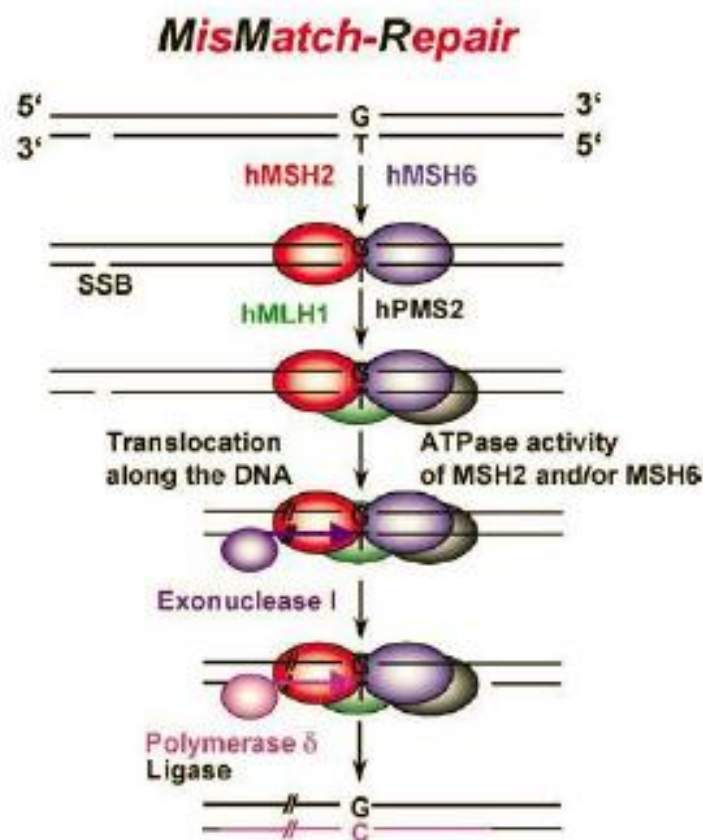
2.4 Επιδιόρθωση μη συμπληρωματικής βάσης (Mismatch Repair- MMR)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μη συμπληρωματικής βάσης (MMR) είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση μη συμπληρωματικών βάσεων στο DNA που μπορεί να προκύψουν, είτε από απαμίνωση, οξείδωση ή μεθυλίωση, είτε από λάθη κατά την αντιγραφή (31). Μέσω του MMR επιτυγχάνεται η επιδιόρθωση μη συμπληρωματικών ζευγών G/T, G/G, A/C και C/C, καθώς και η επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται από εξωγενείς, τοξικούς προς το κύτταρο

παράγοντες, όπως το ζευγάρι της 8- οξογουανίνης με τη θυμίνη ή της Ο6- μεθυλγουανίνης με την κυτοσίνη ή τη θυμίνη (32).

Στο αρχικό στάδιο, η αναγνώριση της βλάβης επιτυγχάνεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο MutSa, ένα ετροδιμερές των MSH2, MSH6 πρωτεϊνών και στη συνέχεια, στο σημείο αυτό φθάνει ένα άλλο ετροδιμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο το MutLa (MLH1- PMS2) ή MutLβ (MLH1- MLH3), που τέμνει το DNA πλησίον της περιοχής που φέρει τη βλάβη προς επιδιόρθωση. Ακολούθως, συμβαίνει ο διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA στο σημείο της βλάβης από το ένζυμο DNA ελικάση II και η εξωνουκλεάση I απομακρύνει το τμήμα του κλώνου που περιέχει τη βλάβη. Η DNA πολυμεράση δ (Pol δ) συνθέτει το νέο τμήμα του κλώνου του DNA και η σύνδεσή του επιτελείται από την λιγάση I (32).

Η σημασία του MMR για την επίτευξη της σταθερότητας του γενωμικού υλικού διαφαίνεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις σε τέσσερα γονίδια (MSH2, MLH1, PMS2 και MSH6) προδιαθέτουν στην εμφάνιση κληρονομικού μη πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC / Lynch syndrome) (33).



Εικόνα 3: Επιδιόρθωση μη συμπληρωματικής βάσης (Mismatch Repair, MMR) (14)

2.5 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραυσμάτων DNA (Double Strand Break Repair- DSB)

Τα δίκλινα θραύσματα του DNA (Double Strand Breaks- DSBs) αποτελούν σοβαρή απειλή για την σταθερότητα του γονιδιώματος και την ομοιοστασία του κυττάρου. Τα DSBs είναι δυνατόν να προκύψουν από ενδογενείς ή εξωγενείς επιδράσεις (34). Στις ενδογενείς επιδράσεις συγκαταλέγονται βλάβες που επάγονται από οξειδωτικό stress ή κατά τη διάρκεια βασικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως για παράδειγμα στη διάρκεια της μείωσης και της μίτωσης (35). Επιπλέον, DSBs δημιουργούνται και από εξωγενείς επιδράσεις, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (Ionizing radiation), η υπεριώδης ακτινοβολία (UV radiation) και χημικοί παράγοντες, που χρησιμοποιούνται κυρίως ως αντινεοπλασματικά, χημειοθεραπευτικά φάρμακα (αναστολείς τοποϊσομεράσης I, II: ιρινοτεκάνη, ετοποσίδη κ.α.) (34, 36, 37).

Στην περίπτωση που τα DSBs δεν επιδιορθωθούν, αυτό επιφέρει κυτταρικό θάνατο μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως ελλείψεις ή/και μετατοπίσεις, που ενισχύουν την γονιδιακή αστάθεια και μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου ή μεταβίβαση των μεταλλάξεων στους απογόνους. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανίχνευση τέτοιων βλαβών και η αποκατάστασή τους μέσω του κατάλληλου μηχανισμού (38).

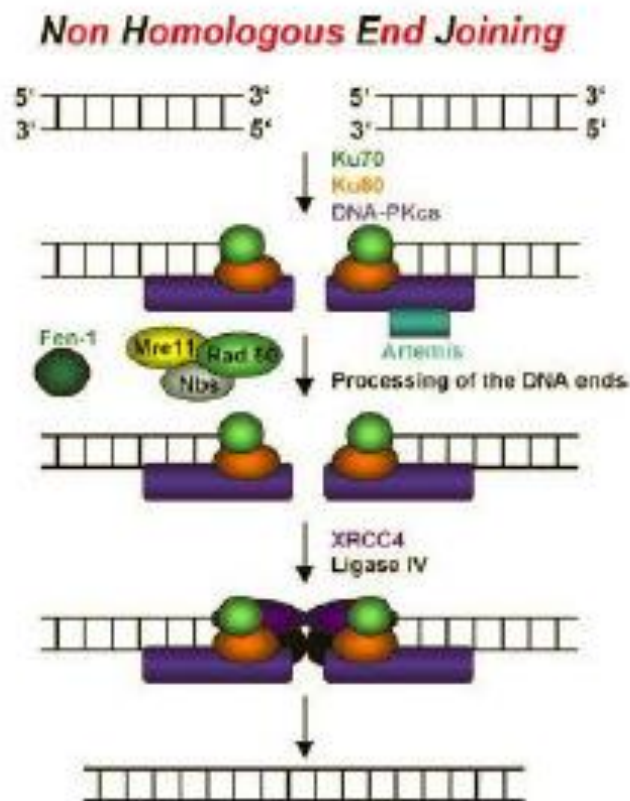
Τα κύρια μονοπάτια για την επιδιόρθωση των DSBs είναι δύο: i) Μη Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Non Homologous End Joining- NHEJ) και ii) Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination- HR) (39, 40).

2.5.1 Μη Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Non Homologous End Joining- NHEJ)

Ο NHEJ αποτελεί τον κύριο επιδιορθωτικό μηχανισμό στα θηλαστικά και είναι ένας ταχύς αλλά επιρρεπής σε λάθη μηχανισμός επιδιόρθωσης.

Στο αρχικό στάδιο το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Ku70/80 προσδένεται στα δύο άκρα του δίκλωνου θραύσματος DNA και προσελκύει τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στην διαδικασία, μεταξύ αυτών η καταλυτική υπομονάδα της DNA εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PKs). Τα δύο ένζυμα μετακινούνται προς το σημείο του θραύσματος και η DNA- PK φέρνει τα δύο άκρα του DNA κοντά για να σχηματιστεί ένα αρχικό σύμπλεγμα.

Εάν τα δύο άκρα του DSB καταλήγουν σε ζεύγος βάσεων, τότε μπορεί να ενωθούν απευθείας. Τις περισσότερες φορές, όμως, αυτό δεν συμβαίνει, οπότε θα πρέπει να γίνουν συμπληρωματικά προς τα αντίστοιχα άκρα του απέναντι κλώνου. Αυτό επιτυγχάνεται, είτε με τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας, είτε με εκτομή του προεξέχοντος άκρου και απώλειας ορισμένων νουκλεοτιδίων. Το ένζυμο που καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η ενδονουκλεάση Artemis. Στο τέλος, το σύμπλοκο λιγάση IV/XRCC4 θα ολοκληρώσει τη σύνδεση των άκρων του DNA (41- 43) .



Εικόνα 4: Μη ομόλογος ανασυνδυασμός (Non Homologous End-Joining, NHEJ) (14)

2.5.2 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous recombination- HR)

Ο HR αποτελεί έναν επιδιορθωτικό μηχανισμό υψηλής ακρίβειας που επιδιορθώνει δίκλωνα θραύσματα DNA στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου.

Ο HR ξεκινά με την επεξεργασία του DNA, ώστε να προκύψουν 3'- άκρα, στα οποία θα ξεκινήσει η συγκρότηση του νηματίου της RAD51. Αυτό το στάδιο ονομάζεται προσύναψη (presynapsis). Η εκτομή του 5' άκρου που συμβαίνει κατά το στάδιο αυτό, ώστε να προκύψουν

ελεύθερα 3'- άκρα απαιτεί το σύμπλοκο των πρωτεϊνών MRX ή MRN (Mre11- Rad50- Xrs2/NBS1), καθώς επίσης και την 5'- 3' εξωνουκλεάση Exo1 και το προϊόν του γονιδίου SAE2.

Η αναζήτηση ομολογίας στο δίκλωνο DNA και η διείσδυση στον ομόλογο κλώνο του DNA αποτελούν το στάδιο της σύναψης (synapsis), που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών- διαμεσολαβητών (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad52, Rad54 και BRCA2). Σε αυτό το στάδιο δημιουργείται η ενδιάμεση θηλειά D (D loop), όπου το 3'- άκρο του κλώνου που διεισδύει αρχίζει τη σύνθεση του DNA με μήτρα το δίκλωνο μόριο στο οποίο έχει διεισδύσει.

Στο επόμενο στάδιο, που ονομάζεται μετασύναψη, πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA μέσω της αλυσίδας- μήτρας/εκμαγείο. Στο στάδιο αυτό, ο μηχανισμός μπορεί να ακολουθήσει διάφορες πορείες:

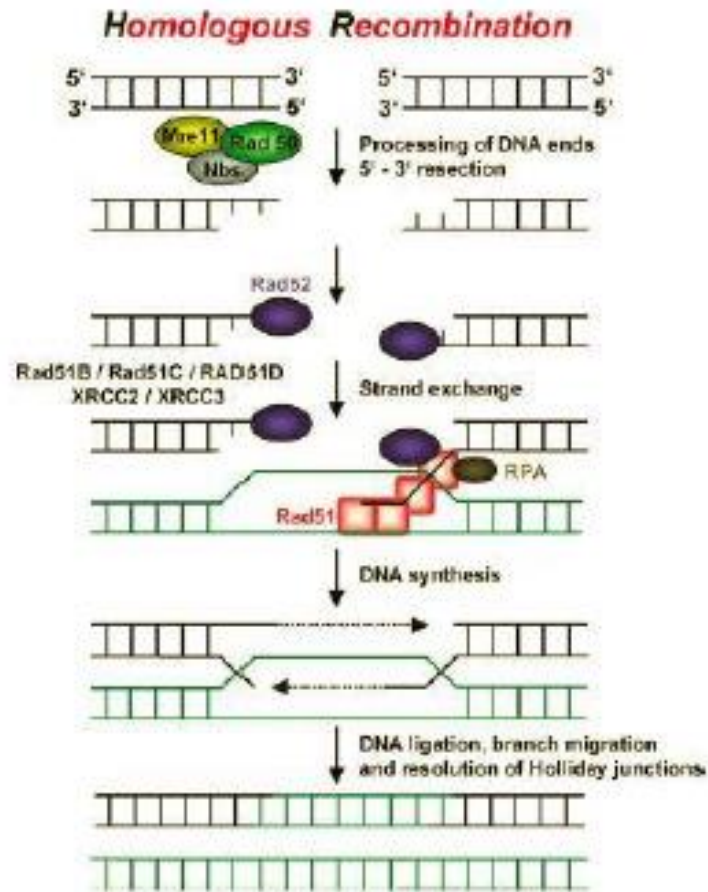
Το δεύτερο άκρο του DNA μπορεί να δεσμευτεί στην περιοχή του δίκλωνου ρήγματος και να αρχίσει η σύνθεση του DNA στην περιοχή αυτή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας διπλής διακλάδωσης Holliday (double Holliday junction), η οποία θα διαλυθεί είτε από την τοποϊσομεράση III σε προϊόντα χωρίς επιχiasμό, είτε από μια ενδονουκλεάση σε προϊόντα με και χωρίς επιχiasμό.

Σε μια άλλη πορεία, η D loop διαλύεται αφού πρώτα το ένα άκρο (αυτό που διεισδύει στο δίκλωνο μόριο DNA) πραγματοποιεί μια μικρής έκτασης σύνθεση DNA και στη συνέχεια αποδεσμεύεται και υβριδοποιείται πάλι με το άλλο άκρο του DNA που έχει υποστεί τη βλάβη. Κατ' αυτό τον τρόπο, προκύπτουν πάντα προϊόντα χωρίς επιχiasμό.

Σε μια τελευταία πορεία, ο κλώνος που διεισδύει στο δίκλωνο μόριο DNA δημιουργεί μια διγάλα αντιγραφής και αντιγράφει όλο το DNA που χρησιμεύει ως μήτρα από το σημείο της σχάσης και πέρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ετεροζυγωτίας από το σημείο της σχάσης και μετά, με όποιες συνέπειες αυτό μπορεί να συνεπάγεται (ενεργοποίηση ογκογονιδίων, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων κ.α.) (44-45).

Ο HR, σε αντιδιαστολή με τον NHEJ, αποτελεί έναν επιδιορθωτικό μηχανισμό μεγάλης ακρίβειας, από τη στιγμή που χρησιμοποιεί ομόλογες αλληλουχίες εντός του γονιδιώματος για να αρχίσει η επιδιόρθωση της σχάσης. Από την άλλη, ο NHEJ, αν και θεωρείται υπεύθυνος για την πλειονότητα των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων, συμβάλλει ταυτοχρόνως στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας διαμέσου της επιδιόρθωσης των DSBs με έναν αρκετά μεγάλο βαθμό ακρίβειας.

Επομένως, και τα δύο μονοπάτια του DSB repair διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος και της καταστολής των όγκων (45).



Εικόνα 5: Ομόλογος Ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR) (14)

3. ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ - ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

3.1 Γενικά

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η ικανότητα να διακρίνει και να αντιδρά στα αντιγόνα που είναι ξένα προς αυτό και όχι σε στοιχεία του εαυτού του. Αυτή η έλλειψη αντιδραστικότητας του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των αντιγόνων του εαυτού του ονομάζεται ανοσολογική ανοχή ή αυτοανοχή και αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη λειτουργία του. Η ανάπτυξη και η διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής είναι μια συνεχής διεργασία η οποία στηρίζεται στην καταστροφή ή την αδρανοποίηση των αντιδραστικών κυττάρων, δηλαδή των λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα του εαυτού (αυτοαντιγόνα). Η αυτοανοχή εγκαθίσταται και επιτελείται από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του ανοσολογικού συστήματος στο μυελό των οστών και το θύμο αδένα (κεντρική ανοσολογική ανοχή) και συνεχίζεται στους περιφερικούς ιστούς (περιφερική ανοσολογική ανοχή) (46).

Η απώλεια της ανοσολογικής ανοχής προς τα στοιχεία του εαυτού οδηγεί στην αυτοανοσία, που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη υπέρμετρων ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι αντιγόνων του εαυτού. Τα νοσήματα που οφείλονται στην ανάπτυξη παθολογικών αυτοάνοσων αποκρίσεων με συνακόλουθη ιστική βλάβη ονομάζονται αυτοάνοσα νοσήματα. Τα αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζουν μεγάλο εύρος και ένταση κλινικών συμπτωμάτων και εκτείνονται από εντοπισμένη, σε ένα μόνο όργανο, έως συστηματική προσβολή (οργανοειδικά και συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα) και παρουσιάζουν από ήπιες έως πολύ βαριές κλινικές εκδηλώσεις. Μπορεί να έχουν σταθερή ή εξελικτική, προϊούσα πορεία. Επίσης, συχνά, σε ένα άτομο με ήδη ένα αυτοάνοσο νόσημα είναι δυνατόν να εμφανιστεί και κάποιο δεύτερο. Άλλες πάλι φορές, παρουσιάζονται ασθενείς με κλινική εικόνα στην οποία συμμετέχουν, ταυτόχρονα, εκδηλώσεις διαφορετικών αυτοάνοσων νοσημάτων.

Οι παράγοντες που οδηγούν στην απώλεια της ανοσολογικής ανοχής και την ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων δεν είναι πλήρως γνωστοί. Πολλαπλοί γενετικοί, περιβαλλοντικοί, ορμονικοί και νευροψυχολογικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν και εμπλέκονται στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων. Μελέτες σε επίπεδο πληθυσμών, οικογενειών και μονοζυγωτικών διδύμων έχουν υποδείξει την ύπαρξη τουλάχιστον 20 διαφορετικών γονιδιακών τόπων, οι οποίοι σχετίζονται ισχυρά με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και γονίδια που κωδικοποιούν μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν άλλες πρωτεΐνες

(STAT4, IRF3, IRF5 κ.α.) (47-49). Επιπλέον, με τα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν συσχετισθεί διάφοροι ιοί, βακτήρια, αλλά και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως φάρμακα, τοξίνες και η υπεριώδης ακτινοβολία. Ενώ, πολύ πρόσφατα, επιστημονικά δεδομένα, από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, εμπλέκουν και τη μη αποτελεσματική λειτουργία επιδιόρθωσης του DNA στην παθογένεια και την εξέλιξη των αυτοάνοσων νοσημάτων (50).

3.2 Ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ)

Εισαγωγή

Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης αυτοάνοση νόσος που προσβάλλει κατά κύριο λόγο τις αρθρώσεις, αλλά μπορεί να συνοδεύεται και από εξωαρθρικές εκδηλώσεις (51). Η μη έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου μπορεί να οδηγήσει σε αναπηρία και μόνιμες παραμορφώσεις, που επιδρούν κατά αρνητικό τρόπο στην ποιότητα της καθημερινής ζωής των ασθενών με ΡΑ. Επιπλέον, οι ασθενείς με ΡΑ εμφανίζουν συχνότερα συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό διάφορες συννοσηρότητες που αυξάνουν τη νοσηρότητα και την θνησιμότητα αυτών των ασθενών (52).

Επιδημιολογία

Η ΡΑ προσβάλλει το 0.5- 1% του πληθυσμού και έχει παγκόσμια κατανομή. Προσβάλλει συνηθέστερα γυναίκες μεταξύ 3ης και 5ης δεκαετίας της ζωής (53).

Παθοφυσιολογία

Από μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους έχει φανεί ότι στο 50% νοσούν ταυτόχρονα και οι δύο από ΡΑ, ενώ οι συγγενείς ασθενών με ΡΑ παρουσιάζουν 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό για την εμφάνιση ΡΑ (53). Επιπλέον, συγκεκριμένοι επίτοποι έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση ΡΑ, ο πιο συχνός από τους οποίους είναι το HLA-DRB1 (23). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί κατέχουν επίσης κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ΡΑ; πολλές επιγενετικές και μετα-μεταφραστικές αλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΡΑ, μερικές από τις οποίες είναι διαταραχές της μεθυλίωσης του DNA και της ακετυλίωσης των ιστόνων (54, 55).

Ταυτόχρονα, πολλαπλοί διαφορετικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν, επίσης, ενοχοποιηθεί στην ανάπτυξη της ΡΑ. Η περιοδοντική λοίμωξη από *Porphyromonas gingivalis*

μπορεί να ενέχεται στην παθογένεια της RA μέσω κιτρολλινοποίησης πεπτιδίων και δημιουργίας αντισωμάτων έναντι αυτών [αντισώματα έναντι κιτρολλινοποιημένων πρωτεϊνών (ACPAs)] (56). Άλλοι λοιμογόνιοι παράγοντες (για παράδειγμα EBV λοίμωξη) και αλλαγές στη χλωρίδα της στοματικής κοιλότητας και του εντέρου έχουν, επίσης, συνδεθεί με την ανάπτυξη της RA (57). Τέλος, η παχυσαρκία, όπως επίσης και το κάπνισμα έχουν συσχετισθεί με μικρή αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη RA (52, 58).

Σε μοριακό επίπεδο, τα ACPAs συνδέονται σε κιτρολλινοποιημένα αυτό-αντιγόνα και οδηγούν στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος (59). Ο ρευματοειδής παράγοντας, εκτός από ότι ευοδώνει αυτή την ενεργοποίηση, κινητοποιεί και την έμφυτη ανοσία (μακροφάγα). Η απώλεια της ανοσολογικής ανοχής οδηγεί σε διήθηση του αρθρικού υμένα από ενεργοποιημένα κύτταρα της έμφυτης (μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα κ.α.) και της επίκτητης ανοσίας (Th1 λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα- πλασματοκύτταρα κ.α.). Επιπροσθέτως, οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα αποκτούν έναν πιο “επιθετικό” φαινότυπο και οδγούμαστε σε υπερπλασία του υμένα και νεοαγγειογένεση. Η υπερπαραγωγή κυτταροκινών σε τοπικό επίπεδο συντηρεί μακροχρόνια τη φλεγμονή, αλλά συγχρόνως οδηγεί σε αυξημένο καταβολισμό των χονδροκυττάρων και αύξηση της οστεοκλαστογένεσης, με αποτέλεσμα την απώλεια του χόνδρου, παρα- αρθρικές οστικές διαβρώσεις και οστεοπόρωση. (60, 61).

Συνολικά, η γενετική προδιάθεση, υπό την περιβαλλοντική επίδραση και σε συνδυασμό με επιγενετικές τροποποιήσεις, οδηγούν σε ρήξη της ανοσολογικής ανοχής και στην εμφάνιση συστηματικής αυτοανοσίας, διαμεσολαβούμενης, κυρίως, από τα T λεμφοκύτταρα, στους ασθενείς με RA. Η χρόνια συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση προκαλεί υπερτροφία του αρθρικού υμένα και σταδιακή διάβρωση του αρθρικού χόνδρου και των οστών, οδηγώντας σε μόνιμες παραμορφώσεις των αρθρώσεων.

Κλινική Εικόνα και Διάγνωση

Η RA εκδηλώνεται, συνήθως, ως συμμετρική πολυαρθρίτιδα των μικρών αρθρώσεων, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η προσβολή και των μεγάλων αρθρώσεων ή η ασυμμετρία. Χαρακτηρίζεται από πρωινή δυσκαμψία διάρκειας άνω των 30 λεπτών. Η RA δεν προσβάλλει τις άπω μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις των άκρων χειρών και άκρων ποδών, ούτε τη θωρακική και οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, ούτε τις ιερολαγόνιες αρθρώσεις. Οι προσβεβλημένες αρθρώσεις είναι οιδηματώδεις, επώδυνες, θερμές και εμφανίζουν περιορισμό στην παθητική ή ενεργητική κίνηση. Η RA διαχωρίζεται σε “οροθετική” ή “οροαρνητική”

ανάλογα με την ανίχνευση στον ορό των πασχόντων του ρευματοειδούς παράγοντα (RF) ή των ACPAs. Ο διαχωρισμός αυτός έχει να κάνει με προγνωστικούς, κυρίως, λόγους, όπως επίσης και με την αποτελεσματικότητα ορισμένων θεραπειών.

Η διάγνωση της PA στηρίζεται στο ιστορικό, την κλινική εικόνα, καθώς και σε εργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα, από τη στιγμή που δεν υπάρχουν διαγνωστικά κριτήρια της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, μάλιστα, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην αναγνώριση και την έγκαιρη θεραπεία ασθενών με πρόιμη αρθρίτιδα (Early Arthritis) που θα προφυλάξει από την πρόοδο της νόσου και την καταστροφή των αρθρώσεων.

Θεραπεία

Η θεραπεία της PA στηρίζεται στην επίτευξη ύφεσης ή χαμηλής ενεργότητας νόσου όσο πιο σύντομα, σε συνδυασμό με την αντιμετώπιση των συννοσηροτήτων, ειδικότερα των καρδιαγγειακών συμβαμάτων (λογική treat to target). Ο ακρογωνιαίος λίθος στη θεραπεία των ασθενών με PA είναι η μεθοτρεξάτη, που ανήκει στην κατηγορία των συμβατικών τροποποιητικών της νόσου φαρμάκων (conventional Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs- cDMARDs). Επί αποτυχίας ή δυσανεξίας της μεθοτρεξάτης ή άλλων cDMARDs ή συνδυασμού αυτών, ακολουθεί η προσθήκη βιολογικού παράγοντα (biologic DMARD-bDMARD), κυρίως αναστολέα έναντι του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (antiTNF), καθώς και άλλων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα τελευταία χρόνια ελπιδοφόρα μηνύματα λαμβάνονται και από τη χρήση μιας άλλης ομάδας φαρμάκων, των αναστολέων των JAK κινασών.

Για την παρακολούθηση της ενεργότητας της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία των ασθενών με PA χρησιμοποιούνται διάφορα εργαλεία, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι ο δείκτης DAS-28. Στον υπολογισμό του λαμβάνονται υπόψη ο αριθμός των επώδυνων αρθρώσεων, ο αριθμός των διογκωμένων αρθρώσεων, οι δείκτες φλεγμονής (TKE ή CRP) και η γνώμη του ασθενούς. Το αποτέλεσμα κατατάσσει τον ασθενή ως έχοντα νόσο σε ύφεση, ή μικρής, μέτριας ή υψηλής ενεργότητας.

Ολοκληρώνοντας, η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, καθώς και η αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου έχει αλλάξει σημαντικά την κοινωνική και εργασιακή ζωή των ασθενών με PA και έχει βελτιώσει την ποιότητα ζωής τους (62).

3.3 Συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ)

Εισαγωγή

Ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (ΣΕΛ) αποτελεί την πρότυπη αυτοάνοση νόσο στον άνθρωπο και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων σε συνδυασμό με συστηματική φλεγμονή και ιστική βλάβη. Η διάγνωση του ΣΕΛ μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη, αφού απαιτεί συνδυασμό κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων, γεγονός που από μόνο του μπορεί να καθυστερήσει τη διάγνωση και την θεραπεία. Η θεραπεία στηρίζεται καταρχήν στον περιορισμό και τον έλεγχο των κλινικών εκδηλώσεων και ύστερα στην επίτευξη ύφεσης για μακροχρόνιο διάστημα. Η έγκαιρη διάγνωση και οι σύγχρονες θεραπείες έχουν συνεισφέρει σήμερα στην αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών με ΣΕΛ, παρόλο που η νόσος παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά λοιμώξεων και νεφρικών επιπλοκών στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς και αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό (63).

Επιδημιολογία

Ο ΣΕΛ προσβάλλει, συνηθέστερα, τις γυναίκες, έως και εννιά φορές συχνότερα συγκριτικά με τους άντρες, και εμφανίζει διακυμάνσεις στη φυσική πορεία με περιόδους εξάρσεων και υφέσεων.

Παθοφυσιολογία

Η αιτιοπαθογένεια του ΣΕΛ παραμένει, κατά κύριο λόγο άγνωστη, αν και έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι παράγοντες, μεταξύ των οποίων γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ορμονικοί. Το γενετικό υπόβαθρο της νόσου υποδεικνύεται από μελέτες που έχουν γίνει σε μονοζυγωτικούς διδύμους, ενώ επίσης γνωστή είναι και η συσχέτιση του ΣΕΛ με τους γονιδιακούς τόπους του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), καθώς και με πολυμορφισμούς άλλων τόπων που κωδικοποιούν για τα γονίδια IRF5 και STAT4 (64, 65). Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένεια του ΣΕΛ θα πρέπει να αναφέρουμε, εκτός από διάφορες λοιμώξεις, την έκθεση στο φως, ιδιαίτερα στην υπεριώδη ακτινοβολία, που θεωρείται εκλυτικός και επιβαρυντικός παράγοντας για τους ασθενείς με ΣΕΛ (66).

Το “σήμα κατατεθέν” της νόσου θεωρείται η πληθώρα αυτοαντισωμάτων που κυκλοφορούν στο ορό ασθενών με ΣΕΛ, καθώς επίσης και η δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων που

εναποτίθενται στα αγγεία, στα νεφρικά σπειράματα και σε άλλα όργανα και προκαλούν ιστική βλάβη. Τα αυτοαντισώματα στον ΣΕΛ στρέφονται έναντι αντιγόνων του κυτταροπλάσματος, του πυρήνα, της κυτταρικής μεμβράνης ή είναι διαλυτά. Αυτοαντισώματα τάξεως IgG τα οποία αναγνωρίζουν διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA) θεωρούνται ειδικά για τον ΣΕΛ και αποτελούν ένα από τα διαγνωστικά κριτήρια, μαζί με χαμηλούς τίτλους πρωτεϊνών του συμπληρώματος, κυρίως C3, C4 και CH50. Πολύ συχνά απαντώνται αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα (ANA) στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ, παρόλο που αυτά είναι μη ειδικά και ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με άλλα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα (ΡΑ, σύνδρομο Sjogren) (67).

Κλινική Εικόνα και Διάγνωση

Ο ΣΕΛ εμφανίζει μεγάλη κλινική ετερογένεια και ποικιλομορφία όσο αφορά την προσβολή των οργάνων- στόχων, την ενεργότητα και τη βαρύτητα. Οι κλινικές εκδηλώσεις του ΣΕΛ ποικίλουν όχι μόνο από ασθενή σε ασθενή, αλλά και στον ίδιο τον ασθενή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της νόσου. Εκδηλώνεται με γενικά συμπτώματα, όπως πυρετός, κακουχία, ανορεξία και αδυναμία στην πλειοψηφία των ασθενών και μπορεί, επίσης, να εμφανιστούν εκδηλώσεις από διαφορετικά συστήματα: αρθρώσεις/μυοσκελετικό, δέρμα και βλεννογόνοι, νεφροί, νευρικό σύστημα, αιμοποιητικό σύστημα, πνεύμονες και καρδιά.

Έτσι, ο ΣΕΛ μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με τη βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων και την ενεργότητά του με βάση τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί (68, 69).

Η διάγνωση του ΣΕΛ αποτελεί μια πρόκληση για τον κλινικό ιατρό και θα πρέπει να στηρίζεται στην προσεκτική λήψη του ιστορικού, την κλινική εικόνα, καθώς και σε εργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα.

Θεραπεία

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες συστάσεις της EULAR (European League Against Rheumatism) όλοι οι ασθενείς με ΣΕΛ θα πρέπει να λαμβάνουν υδροξυχλωροκίνη. Οι ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, όπως η μεθοτρεξάτη και η αζαθειοπρίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ήπια έως μέτρια νόσο που δεν ελέγχεται καλώς μόνο με την υδροξυχλωροκίνη ή σε συνδυασμό με γλυκοκορτικοειδή. Άλλες θεραπείες, όπως το μυκοφαινολικό οξύ και η κυκλοφωσφαμίδη χρησιμοποιούνται σε σοβαρή νόσο [νεφρική προσβολή, προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (όχι το μυκοφαινολικό οξύ),

προσβολή του καρδιοαναπνευστικού συστήματος]. Ο βιολογικός παράγοντας Belimumab συστήνεται στην αντιμετώπιση εμμένουσας εξωνεφρικής νόσου που είναι δύσκολη η διακοπή των κορτικοστεροειδών (70).

Στόχος της θεραπείας είναι η επίτευξη χαμηλής ενεργότητας ή ύφεσης σε σύντομο χρονικό διάστημα, η πρόληψη των υποτροπών και η βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΣΕΛ. Η εκτίμηση της ενεργότητας στον ΣΕΛ πραγματοποιείται με τη χρήση δεικτών μέτρησης ενεργότητας. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης είναι το SLEDAI-2K, που περιλαμβάνει 24 εκδηλώσεις, 16 κλινικές και 8 εργαστηριακές και η βαθμολογία που μπορεί να λάβει ο ασθενής είναι 0-105 και τον κατατάσσει σε ανενεργό νόσο (SLEDAI=0), νόσο με ήπια ενεργότητα (SLEDAI=1-5), με μέτρια ενεργότητα (SLEDAI=6-10), με υψηλή ενεργότητα (SLEDAI=11-19) και με πολύ υψηλή ενεργότητα (SLEDAI.=20) (71).

Συμπερασματικά, ο ΣΕΛ είναι μια νόσος που διαδράμει με εξάρσεις και υφέσεις κατά την κλινική της πορεία. Εμφανίζει υψηλή θνητότητα, ιδίως στις αναπτυσσόμενες περιοχές, κυρίως λόγω αυξημένου ποσοστού λοιμώξεων και νεφρικών επιπλοκών, ενώ και ο καρδιαγγειακός κίνδυνος παρουσιάζει αύξηση σε αυτούς τους ασθενείς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η παρακολούθηση των ασθενών με ΣΕΛ αποτελεί πρόκληση για τον κλινικό ιατρό και είναι συνισταμένη της εκτίμησης κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΗ

Το κυτταρικό δίκτυο απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR/R) αποτελεί έναν μηχανισμό σταθερότητας και προστασίας του γονιδιώματος από ενδογενείς και εξωγενείς απειλές. Μέχρι σήμερα, η μελέτη των μοριακών συστατικών του δικτύου αυτού έχει εστιαστεί σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται από ελαττώματα του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι οι νεοπλασίες, ενώ οι αλλαγές στο δίκτυο της ανοσολογικής απάντησης έχουν συσχετισθεί με μολυσματικές ασθένειες και αυτοάνοσες διαταραχές.

Πιο πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα παρουσιάζουν ότι το δίκτυο DDR/R αλληλοεπιδρά με το δίκτυο ανοσολογικής απάντησης και συνιστούν επιμέρους τμήματα του συνολικού μηχανισμού προστασίας του κυττάρου από ενδογενείς και εξωγενείς απειλές (50).

Νεότερες δημοσιευμένες μελέτες έδειξαν ότι το δίκτυο DDR/R είναι απορυθμισμένο στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα; κυκλοφορούντα λεμφομονοπύρηνια από ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζουν ελαττώματα σε σημαντικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, συσσώρευση βλαβών του DNA και διαταραχή στη δομή συμπύκνωσης της χρωματίνης, συμβάλλοντας κατά ένα μέρος στην παθογένειά αυτών των νοσημάτων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θα διερευνηθεί η υπόθεση εάν μοριακές αλλαγές στο δίκτυο DDR/R έχουν τη δυνατότητα να απορυθμίζουν το σύστημα της ανοσολογικής απόκρισης, συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεια των συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων.

Στην υπόθεση αυτή θα χρησιμοποιήσουμε λεμφομονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ) και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) με σκοπό την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μοριακών αλλαγών στο DDR/R δίκτυο που συνδέονται με την παθογένεια και τη διατήρηση της αυτοανοσίας. Τέλος, θα αναζητηθούν συσχετίσεις μεταξύ των αλλαγών στο δίκτυο DDR/R και τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΡΑ και ΣΕΛ.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμός της μελέτης

Η παρούσα διπλωματική εργασία συμπεριέλαβε 40 διαδοχικούς ασθενείς με συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα οι οποίοι παρακολουθούνται στο τακτικό ρευματολογικό ιατρείο του ΓΝΑ “Λαϊκό”. Από αυτούς οι 20 είχαν Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ) σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης που υιοθέτησαν το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (ACR) και η Ευρωπαϊκή Ένωση Εναντίον των Ρευματικών Νοσημάτων (EULAR) το 2010 και 20 είχαν Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) με βάση τα κριτήρια ταξινόμησης της ομάδας SLICC για το Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (72, 73). Πενήντα (50) υγιείς εθελοντές απετέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων (ΥΜ). Η περίοδος ένταξης στη μελέτη είχε διάρκεια από τον Δεκέμβριο 2017 έως τον Απρίλιο 2019.

Για κάθε ένα συμμετέχοντα στη μελέτη συλλέχθηκαν τα δημογραφικά του στοιχεία, όπως είναι η ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα και, επιπλέον, για κάθε ασθενή καταγράφηκαν στοιχεία σχετικά με τη νόσο και τη θεραπευτική αγωγή.

Όλοι οι συμμετέχοντες έχουν υπογράψει έντυπο ενημερωμένης συγκατάθεσης εγκεκριμένο από το Επιστημονικό Συμβούλιο και την Επιτροπή Βιοηθικής του Λαϊκού Νοσοκομείου.

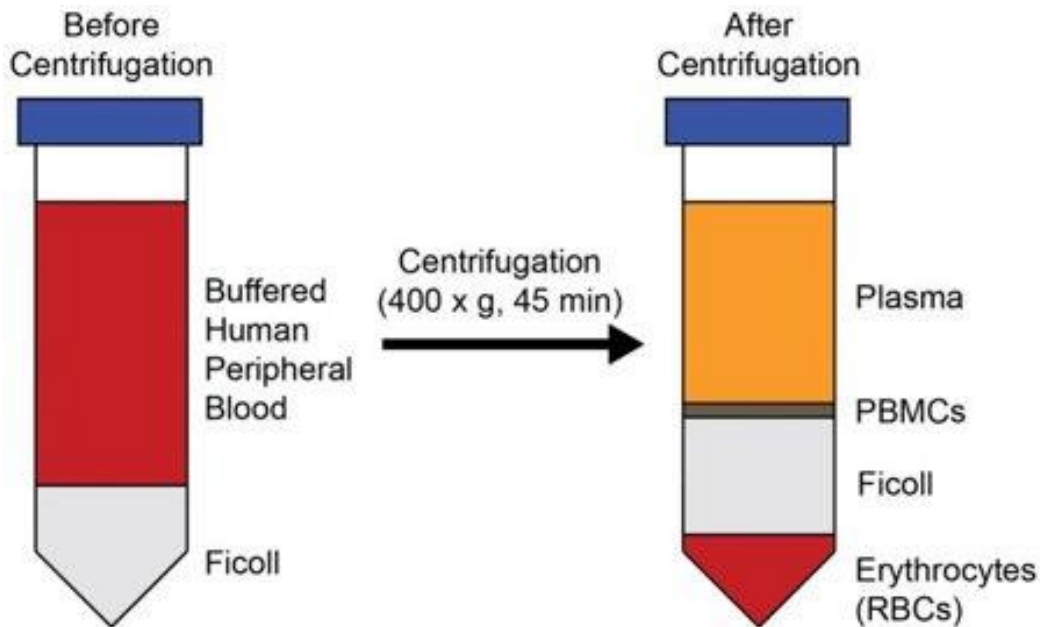
2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από συνολικό αίμα

Αρχικά, συλλέγονται 15-20 ml συνολικού αίματος από κάθε δότη τα οποία μεταφέρονται και ισομοιράζονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια (falkon) και γίνεται αραίωση 1:1 με PBS (Phosphate Buffer Saline). Στη συνέχεια, σε νέα falkons τοποθετούνται 3-5 ml φικόλης (Ficoll-PaquePlus, Sigma-Aldrich) πάνω στην οποία επιστοιβάζεται το αραιωμένο αίμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1400 rpm για 30 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρησης προκύπτουν τρεις φάσεις σε κάθε falkon και συλλέγεται η λευκή γραμμή της μεσόφασης στην οποία είναι συσσωρευμένα τα λεμφοκύτταρα. Το εναιώρημα των λεμφοκυττάρων τοποθετείται σε νέο falkon, συμπληρώνεται με διάλυμα PBS, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 12 ml και φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 10 λεπτά. Ακολουθεί ακόμα μια πλύση στις ίδιες συνθήκες, μετά από το τέλος της οποίας το ίζημα των κυττάρων ψύχεται με το κατάλληλο μέσο ψύξης

(Freezing Medium, 90% FBS + 10% DMSO) και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

Σημειώνεται ότι σε κανέναν από τους δότες δεν είχε προηγηθεί της συλλογής του αίματος η χορήγηση οποιουδήποτε γονοτοξικού φαρμακευτικού παράγοντα και η επεξεργασία του αίματος πραγματοποιήθηκε την ημέρα της λήψης του.



Εικόνα 6: Απομόνωση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από συνολικό αίμα

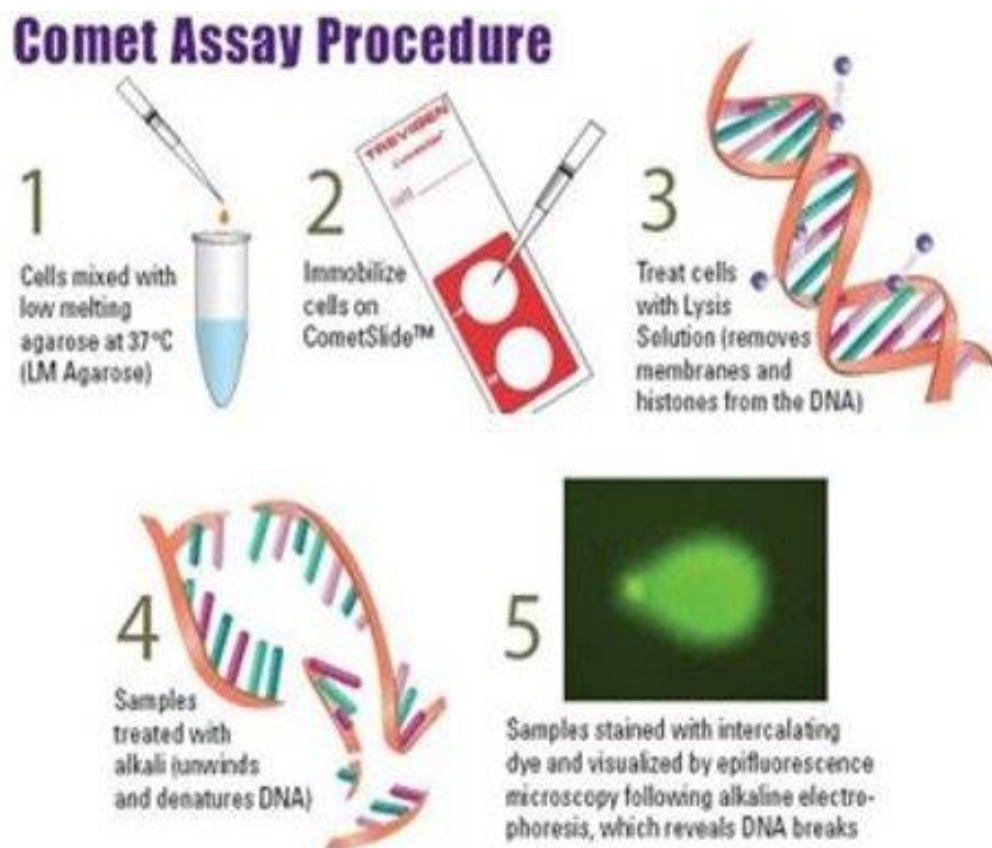
2.2.2 Μελέτη της ενδογενούς βλάβης του DNA με ηλεκτροφόρηση μοναδιαίων κυττάρων υπό αλκαλικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση μοναδιαίων κυττάρων που πραγματοποιείται υπό αλκαλικές συνθήκες (alkaline comet assay) προσδιορίζει ταυτόχρονα μονόκλωνα και δίκλωνα θραύσματα του DNA [single- and double-strand breaks (SSBs, DSBs)] σε επίπεδο κυττάρου. Είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της βλάβης του DNA, αφού ο μικρός αριθμός κυττάρων ανά δείγμα, η εύκολη επεξεργασία και η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου την καθιστούν εύκολα εφαρμόσιμη (74).

Η τεχνική του alkaline comet assay ακολουθεί τα εξής βήματα: το ίζημα των λεμφοκυττάρων επαναιωρείται σε 1% αгарόζη χαμηλού σημείου τήξης σε διάλυμα PBS στους 37°C και επιστρώνεται, ακολούθως, σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες από τον οίκο Trevigen (CometAssay HT Slide, Trevigen, USA). Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιηθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών σε ειδικό αποστειρωμένο διάλυμα λύσης (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA,

10mM Tris, pH10, στο οποίο έχει προστεθεί 1% Triton X-100) στους 4°C για 2 ώρες, τα πλακίδια τοποθετούνται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και επωάζονται με αποστειρωμένο και κρύο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0.3 M NaOH, 1mM EDTA) για 40 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει αποδιάταξη του γενετικού υλικού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 30 λεπτά σε συνθήκες 1 V/cm και, έπειτα, τα πλακίδια πλένονται με αποστειρωμένο διάλυμα εξουδετέρωσης (0.4 M Tris-HCl, pH7.5) και διπλά αποσταγμένο νερό και φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος.

Πραγματοποιείται, στη συνέχεια, χρώση με τη χρωστική SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fischer Scientific) και μικροσκόπηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss), όπου η ποσοτική αξιολόγηση της παρουσίας βλαβών στο DNA γίνεται με τον δείκτη Olive Tail Moment [OTM= (Tail Mean- Head Mean) x (% of DNA)/100] σε 200 τυχαία κύτταρα. Η ανάλυση των εικόνων και των παραμέτρων πραγματοποιείται, τελικά, μέσω του λογισμικού προγράμματος ImageJ Analysis/Open Comet.



Εικόνα 7: Τεχνική της ηλεκτροφόρησης μοναδιαίων κυττάρων υπό αλκαλικές συνθήκες (alkaline comet assay procedure)

2.2.3 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS v.25.0. Οι μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή αναλύθηκαν με το Mann-Whitney U test. Η αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ του δείκτη OTM και των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο έγινε με τη χρήση γραμμικής λογιστικής παλινδρόμησης. Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας ήταν $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Συνολικά καταγράφηκαν δεδομένα από 40 ασθενείς με συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα, 20 ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ) και 20 ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) που προσήλθαν διαδοχικά στο τακτικό ρευματολογικό ιατρείο του ΓΝΑ “Λαϊκό” και από 50 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ).

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με ΡΑ είναι τα 63 χρόνια, ενώ οι ασθενείς με ΣΕΛ είναι κατά μέσο όρο 21 χρόνια νεότεροι (Μ.Ο 42 έτη, ± 14.5), όπως και οι υγιείς μάρτυρες είναι κατά 24 χρόνια νεότεροι (Μ.Ο 39 έτη ± 13.5). Όπως αναμενόταν, η επικράτηση των γυναικών έναντι των ανδρών είναι σαφής και στις δύο υποομάδες του πληθυσμού των ασθενών (70% θήλεα άτομα στην ομάδα της ΡΑ και 95% στην ομάδα του ΣΕΛ). 64% των ατόμων από την ομάδα των υγιών μαρτύρων είναι θήλεα άτομα, επίσης. Τη χρονική στιγμή της καταγραφής το 32% των υγιών μαρτύρων δηλώνει καπνιστής, έναντι 20% των ασθενών με ΡΑ και μόλις 10% των ασθενών με ΣΕΛ. Η διάρκεια της νόσου υπολογίζεται στα 7.3 χρόνια κατά μέσο όρο για την υποομάδα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και στα 6 χρόνια για τους ασθενείς με ΣΕΛ.

Ο πίνακας 1 παρουσιάζει συνοπτικά τα κύρια δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών μαρτύρων τη στιγμή της καταγραφής.

	ΥΜ (n= 50)	ΡΑ (n= 20)	ΣΕΛ (n= 20)
Ηλικία (mean \pm SD)	39 \pm 13.5	63.1 \pm 12.3	42.6 \pm 14.5
Θήλυ φύλο, n (%)	32 (64)	14 (70)	19 (95)
Κάπνισμα, n (%)	16 (32)	4 (20)	2 (10)
Διάρκεια νόσου σε έτη (mean \pm SD)	n/a	7.3 \pm 10.2	6.0 \pm 7.9

Πίνακας 1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά και διάρκεια νόσου σε έτη 50 υγιών μαρτύρων, 20 ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) και 20 ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ).

Από την υποομάδα των ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα το 45% εμφανίζει μέτρια ενεργότητα νόσου, ενώ το 55% παρουσιάζει σοβαρή νόσο τη στιγμή της καταγραφής σύμφωνα με τον δείκτη ενεργότητας νόσου DAS28- ESR. Αναφορικά με το προφίλ των αντισωμάτων, 44.4% των ασθενών με μέτρια ενεργότητα έχουν θετικό ρευματοειδή παράγοντα (RF), έναντι 72.7% στην ομάδα των ασθενών με σοβαρή ενεργότητα νόσου, ενώ τα ποσοστά ανεύρεσης

θετικών αντισωμάτων έναντι κυκλικών κιτρογλυκοποιημένων πεπτιδίων (anti- CCP) είναι περίπου συγκρίσιμα και στις δύο ομάδες (55.6% στην ομάδα με μέτρια ενεργότητα νόσου έναντι 63.6% στην ομάδα με σοβαρή ενεργότητα). Οι ασθενείς με μέτρια ενεργότητα νόσου εμφανίζουν κατά μέσο όρο 5 επώδυνες αρθρώσεις και 2 διογκωμένες αρθρώσεις, σε αντίθεση με τους ασθενείς με σοβαρή ενεργότητα που παρουσιάζουν 8 επώδυνες και 6 διογκωμένες αρθρώσεις κατά μέσο όρο τη χρονική στιγμή της εκτίμησης. Η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) μετρήθηκε στο 16 για τους πρώτους ασθενείς με μέτριας βαρύτητας νόσο, ενώ διπλάσια ΤΚΕ (ΤΚΕ= 35) είχαν οι ασθενείς με ΡΑ και σοβαρή νόσο.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) τη στιγμή της εκτίμησης

ΡΑ (n= 20)			
DAS28- ESR	Ήπια (2.6- 3.2) (n= 0)	Μέτρια (3.2- 5.1) (n= 9)	Σοβαρή (>5.1) (n= 11)
Tender Joint Count, (mean ±SD)	n/a	5.1 ± 3.9	8.5 ± 2.5
Swollen Joint Count, (mean ±SD)	n/a	2.8 ± 1.6	6.6 ± 3.3
RF positivity, n (%)	n/a	4 (44.4)	8 (72.7)
Anti-CCP positivity, n (%)	n/a	5 (55.6)	7 (63.6)
TKE, (mean ±SD)	n/a	16 ± 7.6	35 ± 15.3

Πίνακας 2: Κλινικά χαρακτηριστικά και προφίλ αυτοαντισωμάτων των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, με βάση το δείκτη ενεργότητας της νόσου DAS28- ESR

Η ομάδα των ασθενών με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) ταξινομήθηκε με βάση το δείκτη ενεργότητας νόσου SLEDAI- 2Κ σε ασθενείς με ήπια ενεργότητα νόσου (SLEDAI- 2Κ= 0-5), σε ασθενείς με μέτρια ενεργότητα νόσου (SLEDAI- 2Κ= 6-12) και σε ασθενείς με σοβαρή νόσο (SLEDAI- 2Κ= 13-20). 15 ασθενείς είχαν ήπια νόσο και 5 ασθενείς μέτρια νόσο τη χρονική στιγμή της εκτίμησης. Η πλειοψηφία των ασθενών με ήπια νόσο είχε ως κύριες εκδηλώσεις εξάνθημα (73.3%), αφθώδη έλκη (46.7%), αρθρίτιδα (33.3%), αλωπεκία (26.7%) και πυρετό (20%). Οι τρεις συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με μέτρια νόσο ήταν: εξάνθημα (50%), αρθρίτιδα (50%) και αφθώδη έλκη (25%). Αναφορικά με την

εργαστηριακή εικόνα των ασθενών με ήπια νόσο το 6.7% εμφάνιζε πρωτεϊνουρία ή/και αιματουρία στη γενική ούρων και ΤΚΕ 16 κατά μέσο όρο. Αντιθέτως, οι ασθενείς με μέτρια νόσο εκδήλωναν πρωτεϊνουρία ή/και αιματουρία σε ποσοστό 75% και η ΤΚΕ μετρήθηκε στο 58, κατά μέσο όρο, τη στιγμή της εκτίμησης. Αναφορικά με το ανοσολογικό προφίλ των ασθενών, οι ασθενείς με ήπια νόσο είχαν σε ποσοστό 86.7% (n=13) θετικά ANA και χαμηλό τίτλο συμπληρώματος, ενώ μόλις το 20% (n=3) έχει θετικά anti- dsDNA αντισώματα. Οι ασθενείς που εκδήλωναν νόσο με μέτρια ενεργότητα είχαν σε ποσοστό 100% θετικά ANA και χαμηλό τίτλο συμπληρώματος και οι μισοί από αυτούς είχαν, επίσης, θετικά anti- dsDNA αντισώματα (n=2).

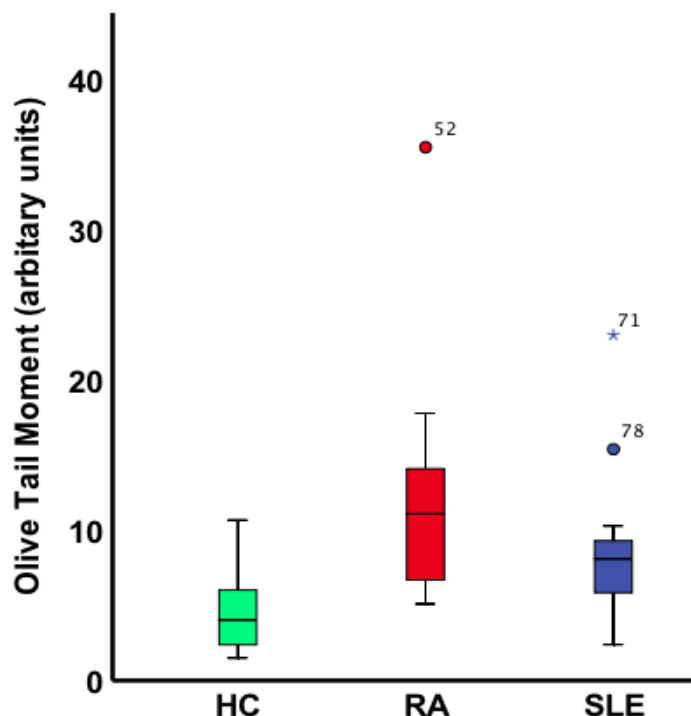
Στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται οι κλινικές εκδηλώσεις και το προφίλ αυτοαντισωμάτων των ασθενών με ΣΕΛ τη χρονική στιγμή της εκτίμησης.

ΣΕΛ (n= 20)			
SLEDAI- 2K	Ήπια (0- 5) (n= 15)	Μέτρια (6- 12) (n= 5)	Σοβαρή (13- 20) (n= 0)
Εξάνθημα, n (%)	11 (73.3)	2 (50)	n/a
Αλωπεκία, n (%)	4 (26.7)	0 (0)	n/a
Αρθρίτιδα, n (%)	5 (33.3)	2 (50)	n/a
Έλκη, n (%)	7 (46.7)	1 (25)	n/a
Πυρετός, n (%)	3 (20)	0 (0)	n/a
Πρωτεϊνουρία, n (%)	1 (6.7)	3 (75)	n/a
Αιματουρία, n (%)	1 (6.7)	3 (75)	n/a
ANA positivity, n (%)	13 (86.7)	4 (100)	n/a
dsDNA positivity, n (%)	3 (20)	2 (50)	n/a
Χαμηλό Συμπλήρωμα, n (%)	13 (86.7)	4 (100)	n/a
ΤΚΕ, (mean ±SD)	16.5 ± 7.9	58.6 ± 36.4	n/a

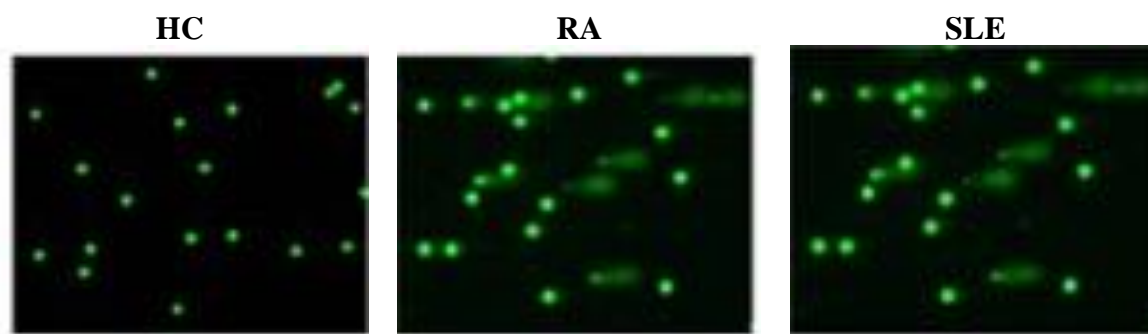
Πίνακας 3: Κλινικά χαρακτηριστικά και προφίλ αυτοαντισωμάτων των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, με βάση το δείκτη ενεργότητας της νόσου SLEDAI-2K

3.2 Αυξημένη ενδογενής βλάβη του DNA στους ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα

Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται γραφικά η σύγκριση των τιμών του δείκτη OTM στα απομονωθέντα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος στους ασθενείς με RA (mean \pm SD= 11.8 \pm 6.9 arbitrary units, median= 11.1 arbitrary units, range= 5.1- 35.5 arbitrary units), στους ασθενείς με ΣΕΛ (mean \pm SD= 8.2 \pm 4.5 arbitrary units, median= 8.1 arbitrary units, range= 2.4- 23.0 arbitrary units) και σε 50 υγιείς μάρτυρες (mean \pm SD= 4.5 \pm 2.3 arbitrary units, median= 4.0 arbitrary units, range= 1.5- 10.7 arbitrary units). Οι ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, δηλαδή με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς βλάβης του DNA συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες με τη μέθοδο του alkaline comet assay, που προσδιορίζει μονόκλωνα (SSBs, single-strand breaks) και δίκλωνα (DSBs, double-strand breaks) θραύσματα του DNA, όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση της μη παραμετρικής μεθόδου Mann- Whitney U test ($p= 0.001$). Η σύγκριση των ομάδων ανά δύο με την ίδια μέθοδο ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με RA και των υγιών μαρτύρων ($p= 0.001$), όπως επίσης και μεταξύ των ασθενών με ΣΕΛ και υγιών μαρτύρων ($p= 0.001$).



Εικόνα 8: Αυξημένη ενδογενής βλάβη του DNA στους ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα. Τα boxplots αναπαριστούν τα επίπεδα της ενδογενούς βλάβης του DNA (Olive Tail Moment, arbitrary units) όπως βρέθηκαν με τη μέθοδο alkaline comet assay στα περιφερικά λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα από YM (n=50), ασθενείς με RA (n=20) και ασθενείς με ΣΕΛ (n=20). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Mann- Whitney U test.



Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικές εικόνες alkaline comet assay από το μικροσκόπιο φθορισμού από υγιείς μάρτυρες (HC), ασθενείς με RA και ασθενείς με SLE

3.3 Κλινικές συσχετίσεις της ενδογενούς βλάβης του DNA των PBMCs σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης

Οι συσχετίσεις των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με PA (n= 20) με την ενδογενή βλάβη του DNA (δείκτης OTM) στα απομονωθέντα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος τη χρονική στιγμή της εκτίμησης φαίνονται στον πίνακα 4. Η μονοπαραγοντική ανάλυση αποκάλυψε ότι η ενδογενής βλάβη του DNA που συσσωρεύεται στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα από το περιφερικό αίμα και ποσοτικοποιείται με την μέθοδο του alkaline comet assay συσχετίζεται οριακά με την παρουσία θετικού ρευματοειδούς παράγοντα (p= 0.083, 95.0% C.I. -12.663- 0.863). Ωστόσο, δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανέναν από τους δημογραφικούς παράγοντες που μελετήθηκαν, δηλαδή με την ηλικία, το θήλυ φύλο και το κάπνισμα. Επίσης, ο δείκτης OTM δεν εμφανίζει συσχέτιση με κάποιο από τα κλινικά χαρακτηριστικά της PA που εκτιμήθηκαν, όπως είναι το πλήθος των ευαίσθητων και διογκωμένων αρθρώσεων, η TKE, η παρουσία θετικών αντισωμάτων anti-CCP και ο δείκτης ενεργότητας νόσου DAS28- ESR, ούτε με τη χρήση θεραπευτικής αγωγής (μεθοτρεξάτη ή λεφλουνομίδη) από τους ασθενείς, τη στιγμή της μελέτης.

	Sig.	95.0% Confidence Interval
Ηλικία	0.224	-0.491- 0.125
Διάρκεια Νόσου	0.628	-0.288- 0.463
DAS28- ESR	0.976	-0.491- 0.125
TKE	0.813	-0.257- 0.322
Tender Joint count	0.960	-1.284- 1.346
Swollen Joint count	0.396	-0.825- 1.972
RF	0.083	-12.663- 0.863

Anti- CCP	0.242	-3.034- 11.124
Ανοσοτροποποιητική Αγωγή	0.538	-3.875- 7.108

Πίνακας 4: Συσχέτιση της ενδογενούς βλάβης του DNA με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (n= 20) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης. Απεικονίζονται οι μονοπαραγοντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από την ανάλυση παλινδρόμησης.

3.4 Κλινικές συσχετίσεις της ενδογενούς βλάβης του DNA των PBMCs σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης

Οι συσχετίσεις των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΣΕΛ (n= 20) με την ενδογενή βλάβη του DNA (δείκτης OTM) στα απομονωθέντα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος τη χρονική στιγμή της εκτίμησης φαίνονται στον πίνακα 5.

	Sig.	95.0% Confidence Interval
Ηλικία	0.321	-0.324- 0.115
Διάρκεια Νόσου	0.720	-0.302- 0.424
SLEDAI- 2K	0.562	-0.568- 0.997
TKE	0.851	-0.171- 0.143
Πρωτεϊνουρία	0.526	-132.273- 114.398
ANA ή/και dsDNA	0.553	-5.402- 9.722
Χαμηλό Συμπλήρωμα	0.688	-6.102- 9.022
Ανοσοτροποποιητική Αγωγή	0.519	-3.107- 5.927

Πίνακας 5: Συσχέτιση της ενδογενούς βλάβης του DNA με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (n= 20) τη χρονική στιγμή της εκτίμησης. Απεικονίζονται οι μονοπαραγοντικές συσχετίσεις που προκύπτουν από την ανάλυση παλινδρόμησης.

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν: η ηλικία, η διάρκεια νόσου, ο δείκτης ενεργότητας SLEDAI- 2K, η TKE, η παρουσία πρωτεϊνουρίας, η ύπαρξη θετικών αντισωμάτων ANA ή/και dsDNA, η παρουσία χαμηλών τίτλων συμπληρώματος και η χορήγηση ανοσοτροποποιητικής αγωγής (χορήγηση δηλαδή κυκλοφωσφαμίδης, μεθοτρεξάτης ή μυκοφαινολικού οξέως). Ως προς τις κλινικές συσχετίσεις του δείκτη OTM στους ασθενείς με ΣΕΛ, η μονοπαραγοντική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το δίκτυο επιδιόρθωσης βλαβών του DNA στα απομονωθέντα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος από 40 διαδοχικούς ασθενείς με συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα, δηλαδή 20 ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και 20 ασθενείς με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο που παρακολουθούνται στο τακτικό ρευματολογικό ιατρείο του ΓΝΑ Λαϊκό, καθώς και από 50 υγιείς μάρτυρες. Στόχος ήταν να προσδιοριστεί η ενδογενής βλάβη του DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μοναδιαίων κυττάρων υπό αλκαλικές συνθήκες ανά υποομάδα ασθενών και στην ομάδα των υγιών μαρτύρων και να διερευνηθούν οι συσχετίσεις του δείκτη OTM με τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά κάθε νοσήματος.

Αρχικά, δείξαμε ότι λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα (Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο) παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση ενδογενούς βλάβης του DNA (δείκτης OTM), συγκριτικά με τα κύτταρα υγιών μαρτύρων, υποδηλώνοντας ότι SSBs και DSBs συσσωρεύονται στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, απουσία γονοτοξικού φαρμακευτικού παράγοντα.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και σε άλλες μελέτες ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο (11, 12); μάλιστα, ασθενείς με άλλα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως το Συστηματικό Σκληρόδερμα, εμφανίζουν, επίσης, υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς βλάβης του DNA, που σχετίζονται με ελαττωματικό δίκτυο επιδιόρθωσης των βλαβών (75).

Ως προς τη συσχέτιση των επιπέδων του OTM με τα κλινικά χαρακτηριστικά, αρχικά, των ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα η μονοπαραγοντική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ανέδειξε μια τάση στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του OTM με την παρουσία θετικού ρευματοειδούς παράγοντα.

Στη δική μας μελέτη δεν διαπιστώσαμε, ωστόσο, συσχέτιση του OTM με κάποιο από τα άλλα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα που εξετάστηκαν. Παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι ούτε η διάρκεια της νόσου δεν φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το OTM, αν και οι ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν κατά μέσο όρο διάρκεια νόσου 7.3 χρόνια. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι ορισμένοι από τους ασθενείς ελάμβαναν ήδη φαρμακευτική αγωγή, αφού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει φανεί ότι η

συσσώρευση ενδογενών βλαβών είναι μικρότερη σε όσους ασθενείς λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή συγκριτικά με αυτούς που δεν λαμβάνουν (9).

Από την άλλη, στους ασθενείς με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο, η μονοπαραγοντική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν.

Μια βασική αδυναμία της μελέτης μας είναι αναμφίβολα ο μικρός αριθμός ασθενών στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα των οποίων μετρήθηκε ο OTM. Επιπλέον, η πλειοψηφία των ασθενών με ΣΕΛ που εξετάστηκαν έχει πολύ ήπια νόσο (SLEDAI= 0-5) και λιγοστές κλινικές εκδηλώσεις, ενώ η βιβλιογραφία έχει δείξει ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ με διαφορετική ενεργότητα και βαρύτητα νόσου, οι ασθενείς που εμφάνιζαν νεφρίτιδα λύκου παρουσίασαν και τις μεγαλύτερες διαταραχές στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA (12, 13).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη εργασία επιχειρεί να μελετήσει αλλαγές στο δίκτυο DDR/R σε ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα και να συσχετίσει ορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά αυτών με τον OTM, δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση. Η συσσώρευση ενδογενούς βλάβης υπό τη μορφή μονόκλωνων και δίκλωνων DNA θραυσμάτων, που μελετήθηκε με το alkaline comet assay, είναι υψηλότερη σε ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Από την ανάλυση παλινδρόμησης ο OTM έδειξε μια τάση συσχέτισης με τον ρευματοειδή παράγοντα, όχι όμως με τη διάρκεια νόσου ή την ενεργότητα νόσου στους ασθενείς με ΡΑ. Από την άλλη, στην υποομάδα των ασθενών με ΣΕΛ, η ανάλυση παλινδρόμησης δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Επί τη βάση αυτών των δεδομένων, θα είχε νόημα η καταγραφή και η κλινικο-εργαστηριακή περιγραφή μιας μεγαλύτερης κοόρτης ασθενών με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα που θα επέτρεπε τη διενέργεια πολυπαραγοντικών αναλύσεων με επαρκή αξιοπιστία και την περαιτέρω εμβάθυνση στη διερεύνηση των μοριακών αλλαγών που επισυμβαίνουν στο DDR/R δίκτυο, προσφέροντας, τελικά, στη βαθύτερη κατανόηση και ερμηνεία των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που σχετίζονται με την παθογένεια και εξέλιξη της αυτοανοσίας.

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001 May 17;411(6835):366-74.
2. Jackson S P, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461;1071-8.
3. Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fouteri MI, Mullenders LH. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)*. 2011; 10:743-50.
4. Ciccia A, Elledge S. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010; 40:179-204.
5. Boutou E, Pappa V, Stuerzbecher H-W, Vorgias CE. Structure- function relationship of DNA repair proteins: lessons from BRCA1 and RAD51 studies. 2011.
6. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research* 2008 Jan;18(1):85-98
7. Chan KK, Zhang QM, Dianov GL. Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. *Mutagenesis* 2006May;21(3):173-8.
8. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem*. 40 (2007):167-171.
9. Shao L, Fujii H, Colmegna I, Oishi H, Goronzy J.J, Weyand C.M. Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis, *J. Exp. Med*. 206 (2009):1435-1449.
10. Martelli- Palomino G, Paoliello- Paschoalato A.B, Crispim J.C.O, Rassi D.M, Oliveira R.D, Louzada P, Lucisano- Valim Y.M, Donadi E.A. DNA damage increase in peripheral neutrophils from patients with rheumatoid arthritis is associated with the disease activity and the presence of shared epitope. *Clin. Exp. Rheumatol*. 35(2017):247-254.
11. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, Argyriou A, Sfikakis PP. DNA damage accumulation, defective chromatin organization and deficient DNA repair capacity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunology*. 203 (2019):28-36.
12. Souliotis VL, Sfikakis PP. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2015; 24:804-15.
13. Souliotis VL, Gorgoulis VG, Vougas K, Sfikakis PP. Defective DNA repair and chromatin organization in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18:182.

14. Christman M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003 Nov 15; 193(1-2):3-34.
15. Glassner BJ, Weeda G, Allan JM, Broekhof LM, et al. DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis*. 1999 May 14; 3(339-347).
16. Falnes P, Johansen RF, Seeberg E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 2002; 419:178-82.
17. Thompson CL, Sancar A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* 2002; 21:9043-56.
18. Wilson SH. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutation research*. 1998 Jun;407(3):203-15.
19. Wilson DM, Bohr VA. The mechanisms of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA repair*. 2007 Apr 1;6(4):544-59.
20. Hedge ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell research*. 2008 Jan;18(1):27-47.
21. Scharer OD, Jiricny J. Recent progress in biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*. 2001; 23:270-81.
22. Stucki M, Pascucci B, Parlanti E, Fortini P, Wilson SH, Hubscher U, Dogliotti E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 1998; 17:835-43.
23. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of molecular histology*. 2006 Sep;37(5-7):225-38.
24. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002 Dec 16;21(58):8949-56.
25. Moser J, Volker M, Kool H, Alekseev S, Vrieling H, Yasui A, et al. The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA repair*. 2005 May 2;4(5):571-82.
26. Ropic-Otrin V, McLenigan MP, Bisi DC, Gonzalez M, Levine AS. Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic acids research*. 2002 Jun 1;30(11):2588-98.

27. Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes & development*. 2001 Jul;8(1):213-24.
28. Evans E, Fellows J, Coffey A, Wood RD. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *The EMBO journal*. 1997 Feb 3;16(3):625-38.
29. Emmert S, Schneider TD, Khan SG, Kraemer KH. The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research*. 2001 Apr 1;29(7):1443-52.
30. Kamiuchi S, Saijo M, Citterio E, de Jager M, Hoeijmakers JH, Tanaka K. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jan 8;99(1):201-6.
31. Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 1996; 87:65-73.
32. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews molecular cell biology*. 2006 May;7(5):335-46.
33. Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildemore BM, Ganguly A, Batten J, Sperduti I, Iacofano AJ, Chung DC. Deficient DNA Mismatch Repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. *J Mol Diagn*. 2009 May; 11(3): 238-247.
34. Smith JA, Bannister LA, Bhattacharjee V, Wang Y, Waldman BC, Waldman AS. Accurate homologous recombination is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian chromosomes and is modulated by mismatch repair protein Msh2. *Molecular and cellular biology*. 2007 Nov;27(22):7816-27.
35. Bootsma D, Hoeijmakers JH. The molecular basis of nucleotide excision repair syndromes. *Mutation research*. 1994 May 1;307(1): 15-23.
36. Keeney S, Neale MJ. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society transactions*. 2006 Aug;34(pt4):523-5.
37. Murnane JP. Telomeres and chromosome instability. *DNA repair*. 2006 Sep 8;5(9-10):1082-92.

38. Bosco EE, Mayhew CN, Hennigan RF, Sage J, Jacks T, Knudsen ES. RB signaling prevents replication-dependent DNA double-strand breaks following genotoxic insult. *Nucleic acids research* 2004;32(1):25-34.
39. Su TT. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annual review of genetics*. 2006;40: 187-208.
40. Shrivastava M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research* 2008 Jan;18(1):134-47.
41. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*. 2010; 79:181-211.
42. Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation research*. 2011 Jun 3;711(1-2):61-72.
43. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell research* 2008 Jan;18(1):114-24.
44. Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008 Jan; 18(1):99-113.
45. Mimitou EP, Symington LS. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences*. 2009 May;34(5):264-72.
46. Mackay JR. Science, medicine and the future: tolerance and autoimmunity. *BMJ*. 2000 Jul 8; 321(7253):93-96
47. Merriman TR, Todd JA. Genetics of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 1995 Dec; 7(6):786-792.
48. Fugger L. Human autoimmunity genes in mice. *Curr Opin Immunol*. 2000 Dec; 12(6):698-703.
49. Encinas JA, Kuchroo VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol*. 2000 Dec; 12(6):691-697.
50. Pateras IS, Havaki S, Nikitopoulou X, Vougas K, Townsend PA, Panayiotidis MI, et al. The DNA damage response and immune signaling alliance: is it good or bad? Nature decides when and where. *Pharmacol Ther*. 2015; 154:36–56.
51. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct 22; 388(10055):2023-38.
52. Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):8-14.

53. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3: S265-72.
54. Klein K, Gay S. epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27(1):76-82.
55. Ospelt C, Gay S, Klein K. epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Imunopathol.* 2017;39(4):409-19.
56. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated pteoin antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol.* 2010;37(6):1105-12.
57. Scher JU, Litman DR, Abramson SB. Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis rheumatol.* 2016;68(1):35-45.
58. Qin B, Yang M, Fu H, Ma N, Wei T, Tang Q, et al. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17:86.
59. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol.* 2015;194(8):3664-74.
60. Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg ba;ance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012;32(9):2731-6.
61. Wang W, Shao S, Jiao Z, Guo M, Xu H, Wang S. the Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012;32(4):887-93.
62. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of the rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease- modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):960-77.
63. Tektonidou MG, Lewandowski LB, Hu J, Dasgupta A, Ward MM. Survival in adults and children with systemic lupus erythematosus: a systemic review and Bayesian meta-analysis of studies from 1950 to 2016. *Ann Rheum Dis* 2017 Dec;76(12):2009-2016.

64. Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. meta-analysis reveals an association of STAT 4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-ds DNA antibody. *Hum Immunol* 2013 Aug;74(8):986-92.
65. Cham CM, Ko K, Niewold TB. Interferon regulatory factor 5 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012:780436.
66. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998 Jul; 41(7):1241-1250.
67. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol.* 2000 Jun;53(6):424-32.
68. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992 Jun; 35(6):630-640.
69. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Fortin P, Ginzler E, et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol* 2000 Feb; 27(2):373-376.
70. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019 Jun;78(6):736-745.
71. Abrahamowicz M, Fortin PR, du Berger R, Nayak V, Neville C, Liang MH. The relationship between disease activity and expert physician's decision to start major treatment in active systemic lupus erythematosus: a decision aid for development of entry criteria for clinical trials. *J Rheumatol.* 1998 Feb;25(2):277-84.
72. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Dec;51 Suppl 6:vi5-9.
73. Petri M, Orbi A-M, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677-86.
74. Piperakis SM. Comet assay: a brief history. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Feb;25(1):1-3.
75. Palomino GM, Bassi CL, Wastowski IJ, Xavier DJ, Lucisano- Valim YM, Crispim JCO, et al. Patients with systemic sclerosis present increased DNA damage

differentially associated with DNA repair gene polymorphisms. *J Rheumatol* 2014; 41:458-465.