

Περιγραφή Πρότασης Διδακτορικής Διατριβής

Μπαντούνας Φώτιος

Προτεινόμενος Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής

Μελέτη της δράσης των ουδετερόφιλων κυττάρων μέσω της δημιουργίας Neutrophil Extracellular Traps (NETs) και ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας σε ένα ανθρωποποιημένο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού (huTNF-Tg197)

Θεματικές Περιοχές: Ανοσολογία, Μοριακή Γενετική, Βιοτεχνολογία, Ζώα Εργαστηρίου

Λέξεις-Κλειδιά: Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, NET's, Tg197, Ανθρωποποιημένα Διαγονιδιακά ζώα, anti-TNF Abs, anti-NETotic therapy

Προτεινόμενη γλώσσα εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής: Ελληνική

A.Εισαγωγή-Συνοπτική περιγραφή του θέματος

Η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA) αποτελεί μία χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος, που αναπτύσσεται συμμετρικά, πολυαρθρικά αλλά και συστηματικά. Προσβάλλει αρχικά τον αρθρικό υμένα μικρών αρθρώσεων και μπορεί σταδιακά να παρουσιάσει οστικές αλλοιώσεις στις περιοχές των αρθρώσεων αλλά ακόμα και συστηματικές εξωαρθρικές εκδηλώσεις που μπορεί να προηγούνται των συμπτωμάτων αρθρίτιδας. Παγκοσμίως, η ετήσια συχνότητα της RA είναι περίπου 3 περιπτώσεις/ 10.000 πληθυσμού, και ο επιπολασμός της νόσου φτάνει στο 1% στον γενικό πληθυσμό, αυξανόμενη με την ηλικία και κορυφούμενη στην ηλικία των 35-50 ετών, χωρίς κάποια φυλετική ή γεωγραφική προδιάθεση. Η συμφωνία της νόσου σε μονοζυγώτες διδύμους είναι περίπου 15-20 %, ένδειξη ότι και μη γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Οι γυναίκες προσβάλλονται από RA περίπου 3 φορές συχνότερα από τους άνδρες , αλλά η διαφορά αυτή μειώνεται στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες.

Το αίτιο ανάπτυξης της νόσου παραμένει άγνωστο, αν και φαίνεται ότι είναι πολυπαραγοντικό. Η πυροδότηση μιας υπέρμετρης και εμμένουσας ανοσολογικής απάντησης εντοπίζεται στην περιοχή του αρθρικού υμένα, προκαλώντας υπερτροφία και χρόνια φλεγμονή με προσδευτική καταστροφή των χόνδρων αλλά και των οστών. Ο κυρίαρχος κυτταρικός τύπος στην περιοχή του αρθρικού υμένα σε μια εγκατεστημένη φλεγμονή στην περιοχή της άρθρωσης είναι CD4- Τ λεμφοκύτταρα, ενώ στο αρθρικό υγρό τον κυρίαρχο κυτταρικό τύπο αποτελούν τα ουδετερόφιλα. Ποιός είναι όμως ο παράγοντας που προκαλεί την λεμφοκυτταρική διήθηση εντός του αρθρικού υμένα την πυροδότηση της φλεγμονής και εν τέλει την ιστική καταστροφή;

Το 2004, ο Brinkmann και οι συνεργάτες του μελετώντας τον ρόλο των ουδετεροφίλων έναντι μικροβιακών μολύνσεων περιέγραψαν, ότι εκτός από την φαγοκυττάρωση και την αποκοκκίωση, η ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων προκαλεί την απελευθέρωση δομών DNA που μοιάζουν με νημάτια

(Neutrophil Extracellular Traps;NET's). Περιγράφηκε λοιπόν ένας τρίτος τρόπος δράσης των ουδετεροφίλων έναντι μικροβιακών μολύνσεων. Τα NETs είναι ένα δίκτυο που αποτελείται από ίνες χρωματινής και πρωτεάσες που παγιδεύουν και σκοτώνουν τα μικρόβια, εξωκυττάρια. Εκτός από τις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους, τα NETs, μπορεί να χρησιμεύσουν και ως ένα φυσικό φράγμα που εμποδίζει την περαιτέρω εξάπλωση των παθογόνων παραγόντων.

Ενώ, αρχικά τα NETs περιγράφηκαν ως ένας αντιμικροβιακός μηχανισμός των ουδετεροφίλων, νέες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ρόλος τους εκτείνεται και στην παθοφυσιολογία μη μολυσματικών ασθενειών, όπως θρόμβωση (Kambas K et al 2012, de Boer OJ 2013, Stakos DA 2015), **αυτοάνοσες ασθένειες** (Kambas K et al 2014, Kahlenberg JM 2013, Leffler J 2012, Hakkim , 2010), γενετικά αυτοφλεγμονώδεις νόσοι (Apostolidou E, 2016) και άλλες φλεγμονώδεις ασθένειες (Mitroulis I 2011), μεταβολικές διαταραχές, πνευμονικές παθήσεις (Cheng OZ 2013), ίνωση (Chrysanthopoulou A,2014) και καρκίνος (Tohme S, 2016).

B.Σκοπός της Μελέτης

Ο σκοπός αυτής της Ερευνητικής πρότασης είναι η διερεύνηση του πιθανού ρόλου που διαδραματίζουν τα ουδετερόφιλα κύτταρα και ειδικότερα μέσω των NET's, στην ανάπτυξη της παθοφυσιολογίας της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας. Έως τώρα δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς ο ρόλος των NET's στην ανάπτυξη και στην παθοφυσιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε σχέση με τον χρόνο. Θα διερευνηθούν πιθανοί μηχανισμοί ανάπτυξης της νόσου σύμφωνα με ανοσολογικούς και βιοχημικούς δείκτες αντιπροσωπευτικούς με τον βαθμό εξέλιξης της νόσου.

Γ.Μέθοδοι-Οργάνωση Πειραματικής Διαδικασίας

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες θα πραγματοποιηθούν στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, υπό την καθοδήγηση του Δρ. Κωνσταντίνου Καμπά και της Δρ. Χρυσάνθης Βογιατζάκη στο Εργαστήριο Μοριακής γενετικής & στο Εργαστήριο Διαγονιδιακής Τεχνολογίας

In Vivo πειραματισμός

Ανθρωποποιημένο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού (huTNF-Tg197)

Το ζωικό πρότυπο που θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη είναι ένα διαγονιδιακό ποντίκι στο οποίο υπερεκφράζεται το γονίδιο για τον ανθρώπινο παράγοντα νέκρωσης όγκων (huTNF) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αρθρίτιδας της οποίας η παθολογία προσομοιάζει με την ανθρώπινη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Φαινοτυπικά, η νόσος εμφανίζεται σε ηλικία 4-6 εβδομάδων, σταδιακά χειροτερεύει και το τελικό σημείο της (αρθριτικός δείκτης 3) εμφανίζεται συνήθως στις 12 εβδομάδες.(Kefffer et al., EMBO,1991). Κατά τη διάρκεια της νόσου πραγματοποιείται κλινική εκτίμηση με μέτρηση της δύναμης του ποντικού σε ειδικό μηχάνημα μέτρησης δύναμης, καθώς και καταγραφή του αρθριτικού κλινικού δείκτη (ΑΚΔ) σύμφωνα με τη διεθνή ημιποσοτική κλίμακα (0-3/ άρθρωση των πίσω ποδιών). Μέχρι της εμφάνισης του τελικού σημείου τα ζώα κινούνται και τρώνε κανονικά. Παρακολουθούνται μία φορά την εβδομάδα, εκτός αν κατ' εξαίρεση εμφανιστεί οξύ σύμπτωμα, οπότε η φροντίδα για φαγητό και νερό γίνεται συχνότερη

- Συγχρονισμένη αναπαραγωγή
- Γοντύπηση
- Δημιουργία ομάδων μελέτης
- Μέτρηση και καταγραφή του βάρους
- Κλινική αξιολόγηση της προσδευτικής ανάπτυξης της νόσου (Οίδημα των αρθρώσεων και των ποδιών, παραμόρφωση των δακτύλων, απώλεια δύναμης πρόσφυσης-λαβής
- Κλινική αξιολόγηση της γενικής ευημερίας των ζώων με την ανάπτυξη καχεξίας
- Δειγματοληψίες Αίματος

In Vitro πειραματισμός

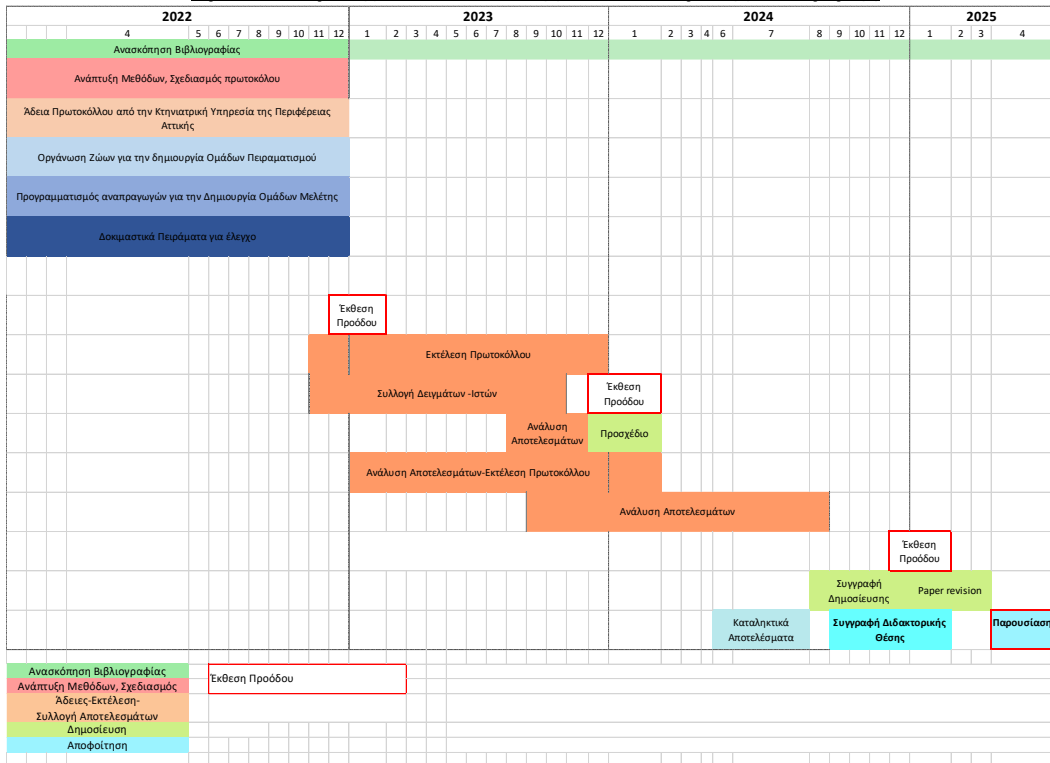
Ιστοπαθολογική ανάλυση χαρακτηριστικών στην άρθρωση

- Ιστολογία
- Ανοσοιστοχημεία
- Ανοσοφθορισμός μέσω χρήσης συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscope)

Ανοσολογική Αναλυση ορού αίματος

Κυτταροκαλλιέργειες και Δοκιμασίες επίδρασης των NET's

Χρονικό Προσχέδιο Εκτέλεσης Διαδακτορικής Διατριβής



Δ. Συνεισφορά και πρωτοτυπία της προτεινόμενης διατριβής

Η πρόταση αυτή αναδεικνύει μια καινοτόμο προσέγγιση όσον αφορά την παθοφυσιολογία και την ανάπτυξη της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας προβάλλοντας μια διαφοροποιημένη ερμηνεία όσον αφορά

τους μηχανισμούς ανάπτυξης αλλά και την πιθανή αιτιολογική συσχέτιση της νόσου. Η μελέτη αυτή μπορεί πιθανά να οδηγήσει στον εντοπισμό αλλά και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων όσον αφορά την αντιμετώπιση της νόσου, μέσω νέων στόχων. Η δράση των NET's δεν έχει μελετηθεί σε *in vivo* αυθόρμητα πρότυπα χρόνιας πολυαρθρίτιδας και η προσέγγιση αυτή αποτελεί μια καινοτόμο προσπάθεια αποσαφήνισης της.

Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385. PMID: 15001782.
- Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, Arelaki S, Froudarakis M, Nakopoulou L, Giatromanolaki A, Sidiropoulos P, Koffa M, Boumpas DT, Ritis K, Mitroulis I. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct;73(10):1854-63. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203430. Epub 2013 Jul 19. PMID: 23873874.
- Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, Nakos K, Tsironidou V, Koffa M, Boumpas DT, Ritis K. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):269-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205958. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25261578.
- Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol*. 2013 Feb 1;190(3):1217-26. doi: 10.4049/jimmunol.1202388. Epub 2012 Dec 24. PMID: 23267025; PMCID: PMC3552129.
- Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood K, Truedsson L, Bengtsson AA, Blom AM. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3522-31. doi: 10.4049/jimmunol.1102404. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22345666.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9813-8. doi: 10.1073/pnas.0909927107. Epub 2010 May 3. PMID: 20439745; PMCID: PMC2906830. Mitroulis I 2011
- Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, et al. (2011) Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Associated with IL-1 β and Autophagy-Related Signaling in Gout. *PLOS ONE* 6(12): e29318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029318>
- Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol*. 2013 Jan 24;4:1. doi: 10.3389/fimmu.2013.00001. PMID: 23355837; PMCID: PMC3553399.
- Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, Sivridis E, Koffa M, Giatromanolaki A, Boumpas D.T., Ritis K. and Kambas K. (2014), Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J. Pathol.*, 233: 294-307.
- Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, Wang Y, Simmons RL, Huang H, Tsung A. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1367-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26759232; PMCID: PMC4794393
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 1991 Dec;10(13):4025-31. PMID: 1721867; PMCID: PMC453150.