ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Α. Σπαντίδος

ΑΝΔΡΕΑΣ Μ. ΠΑΣΣΑΜ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΟΔΟ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ HIV-1 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ ΑΓΩΓΗ ΜΕ HAART

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Αυτό το οφείλω πρωτίστως στον Καθηγητή κ. Δ.Α. Σπαντίδο που μου έδωσε την ευκαιρία να ενασχοληθώ με την έρευνα και να συμμετέχω στις δραστηριότητες του παραγωγικού αυτού εργαστηρίου. Η φιλικότητα, η υπομονή και η απλότητα αυτού του διακεκριμένου επιστήμονα απέναντι στους συνεργάτες του αποτελεί για μένα παράδειγμα και πρότυπο στο δύσκολο αυτό ακαδημαϊκό χώρο. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Καθηγητή κ. Ε. Κουμαντάκη και Καθηγητή κ. Γ. Σαμώνη που στήριξαν τη διατριβή αυτή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθηγητή κ. Α. Ζαφειρόπουλο ο οποίος με εισήγαγε στη μεθοδολογία της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας και συντέλεσε στο σχεδιασμό και την επιτυχή έκβαση της παρούσας διατριβής. Παράλληλα θα πρέπει να ευχαριστήσω από το Νοσοκομείο Α. Συγγρού Αθηνών τον Ιατρό κ. Ι. Ζαγοραίο και Καθηγητή κ. Ν. Σταυριανέα που ήταν υπεύθυνοι για τους ασθενείς της μελέτης και έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη συλλογή των δειγμάτων και των κλινικών δεδομένων.

Επίσης θα πρέπει να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Η. Κραμποβίτη, τους Επικ. Καθηγητές κ. Γ. Σουρβίνο, και κ. Ε. Δαφνή και την ιατρό κα. Ε. Βαρδάκη για τη στήριξη και την επιμονή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής. Σημαντική ήταν η βοήθεια των συνοδοιπόρων μεταπτυχιακών του εργαστηρίου και νυν διδακτόρων Γ. Σούφλα, Σ. Παναγιωτάκη, Ν. Σουλιτζή, Ν. Κρίκα, Δ. Αρβανίτη, Δ. Πανουτσόπουλου, Ι. Διαλυνά, καθώς και του Θ. Αλεγκάκη, που έδρασαν καταλυτικά στην υπέρβαση των δυσκολιών της καθημερινότητας του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Σπύρο Μυγιάκη και τη Φρίντα Πάσσαμ για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους σε όλη την πορεία της διατριβής, καθώς και τους γονείς μου Χάρολντ και Σωτηρία και τη σύζυγό μου Μαριάννα που με στήριξαν και με ώθησαν στην εκπλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Βιογραφικό σημείωμα

ΟΝΟΜΑ:	Ανδρέας Μιχαήλ
ΕΠΩΝΥΜΟ:	Πάσσαμ
ΗΜΕΡ.ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	22.06.1975
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	Λονδίνο, Αγγλία
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:	Ν. Σουκατζίδη 2, Ηράκλειο, 71305, Κρήτη
ΤΗΛΕΦΩΝΟ:	2810235541, 6973986384
E-MAIL:	passamma@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΤΙΤΛΟΙ:

16.01.2001: Πτυχίο Ιατρικής με βαθμό "Λίαν Καλώς" - Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

14.03.2001-13.06.2001: 3μηνη άσκηση για την εκπλήρωση της υπηρεσίας υπαίθρου στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Ρεθύμνου.

18.06.2001-19.12.2002: 18μηνη υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Περάματος νομού Ρεθύμνου.

26.05.2003-26.02.2004: Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας στο σώμα υγειονομικού του Στρατού Ξηράς ως ιατρός άνευ ειδικότητας.

21.04.2004-21.01.2006: Ολοκλήρωση 2 χρόνων άσκησης στην Παθολογία ως ειδικευόμενος ιατρός της Β Παθολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου "Βενιζέλειο Πανάνειο".

14.04.2006-σήμερα: Άσκηση στην Νεφρολογία στη Νεφρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου

ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2001-2002 **7**^{o} Μετεκπαιδευτικό Πρόγραμμα Επείγουσας Προνοσοκομειακής Ιατρικής, Υπουργείο Υγείας Πρόνοιας-ΕΚΑΒ.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Proficiency in English of Cambridge

Certificat de la langue Francaise.

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2001 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "6th World Congress on Advances in Oncology" και "4th International Symposium on MolecularMedicine", Οκτώβριος 2001, Χερσόνησος, Κρήτη

2002 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "7th World Congress on Advances in Oncology" και "5th International Symposium on MolecularMedicine", Οκτώβριος 2002, Χερσόνησος, Κρήτη

2003 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "8th World Congress on Advances in Oncology" και "6th International Symposium on MolecularMedicine", Οκτώβριος 2003, Χερσόνησος, Κρήτη

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Passam AM, Sourvinos G, Krambovitis E, Miyakis S, Stavrianeas N, Zagoreos I, Spandidos DA: Polymorphisms of Cx(3)CR1 and CXCR6 receptors in relation to HAART therapy of HIV type 1 patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:1026-1032, 2007
2. Panagiotakis SH, Soufla G, Baritaki S, Sourvinos G, Passam A, Zagoreos I, Stavrianeas N, Spandidos DA: Concurrent CMV and EBV DNAemia is significantly correlated with a delay in the response to HAART in treatment-naive HIV type 1-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:10-18, 2007
3. Passam AM, Zafiropoulos A, Miyakis S, Zagoreos I, Stavrianeas NG, Krambovitis E, Spandidos DA: CCR2-64I and CXCL12 3'A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy. *J Clin Virol* 34:302-309, 2005
4. Sfiridaki A, Miyakis S, Tsirakis G, Alegakis A, Passam AM, Kandidaki E, Margioris AN, Alexandrakis MG: Systemic levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple myeloma may be useful as prognostic indexes of bone disease. *Clin Chem Lab Med* 43:934-938, 2005
5. Alexandrakis MG, Passam FH, Pappa CA, Damilakis J, Tsirakis G, Kandidaki E, Passam AM, Stathopoulos EN, Kyriakou DS: Serum evaluation of angiogenic cytokine basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor and TNF-alpha in patients with myelodysplastic syndromes: correlation with bone marrow microvascular density. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18:287-295, 2005

6. Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki K, Passam AM, Nalbanti F, Stathopoulos ES, Kyriakou DS: The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining in myelodysplastic syndromes and its prognostic significance. *Eur J Histochem* 49:27-32, 2005
7. Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA: Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 41:e59, 2004

Περίληψη

ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ: Περισσότερα από 20 χρόνια έχουν περάσει από την εμφάνιση της επιδημίας του HIV-1. Στο διάστημα αυτό οι γνώσεις για την παθογένεια της λοίμωξης έχουν αυξηθεί θεαματικά και έχουν σημειωθεί σημαντικά βήματα στην πρόληψη και θεραπευτική της αντιμετώπιση. Ορόσημο αποτελεί η εισαγωγή της HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), που έχει παρατείνει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών. Ωστόσο η HAART δεν επιφέρει την ίαση και συνεπώς η αναζήτηση εναλλακτικών θεραπειών συνεχίζεται.

Το σύστημα των χημειοκινών αποτελεί ένα ελπιδοφόρο πεδίο έρευνας. Αποτελείται από ανοσοδραστικά μόρια και υποδοχείς που εκφράζονται από λευκά αιμοσφαίρια και ιστούς, ιδιαίτερα σε καταστάσεις φλεγμονής. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση ανοσολογικών απαντήσεων για την άμυνα του οργανισμού. Ωστόσο ο ιός του HIV-1 εκμεταλλεύεται το σύστημα των χημειοκινών και ιδιαίτερα τους υποδοχείς του, προκειμένου να προσκολληθεί στα λευκά αιμοσφαίρια και να τα μολύνει. Χαρακτηριστικά ο HIV-1 χρησιμοποιεί τους υποδοχείς CXCR4 και CCR5 για να μολύνει λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Η μετάλλαξη CCR5Δ32 οδηγεί στην παραγωγή ενός τεμαχισμένου υποδοχέα CCR5 που δεν εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανοσία στη μόλυνση σε ομόζυγα CCR5Δ32 άτομα και την ανθεκτικότητα στην εξέλιξη της λοίμωξης στους ετερόζυγους CCR5Δ32 ασθενείς. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στη δημιουργία συνθετικών ανταγωνιστών του CCR5 που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική θεραπεία της λοίμωξης από HIV-1. Εκτός όμως από το CCR5, έχει βρεθεί πως η εξέλιξη της λοίμωξης επηρεάζεται και από άλλους πολυμορφισμούς του συστήματος χημειοκινών.

ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Διερευνήθηκαν οι επιδράσεις εννέα πολυμορφισμών του συστήματος χημειοκινών στην ανοσολογική και ιολογική ανταπόκριση μετά την έναρξη θεραπείας με HAART σε 149 ασθενείς που παρακολουθήθηκαν στο νοσοκομείο "Α. Συγγρός" (Αθήνα). Οι πολυμορφισμοί ήταν οι ακόλουθοι: CCR5Δ32, CXCL12-3A, CCR2-64I, CCR5-59029G/A, CXCR6-3E/K, In1.1T/C, απλότυπος H7, CX_3CR1-V249I και CX_3CR1-T280M.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση στους ασθενείς χρησιμοποιώντας PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και ακρυλαμιδίου. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση κατά Kaplan-Meier χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα τελικά σημεία: 1) Χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι τη μείωση του ιικού φορτίου (VL) κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50cps/ml), 2) διάρκεια καταστολής του VL κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα, 3) χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4≥200cells/mm^3 και ≥500cells/mm^3 για ασθενείς που είχαν αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3 και <500cells/mm^3 αντίστοιχα, 4) χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πτώση των CD4 κάτω από την αρχική τιμή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι σε ασθενείς με αρχική τιμή CD4 μεταξύ 200-499cells/mm3 και ετερόζυγους ή ομόζυγους για το αλληλόμορφο CCR2-64I υπήρξε ταχύτερη πτώση του VL (3.5±0.5μήνες) κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα συγκριτικά με τους ομόζυγους για το φυσικό αλληλόμορφο του CCR2 υποδοχέα (10.2±1.4 μήνες)(p=0.018, n=69). Επιπλέον ασθενείς με το αλληλόμορφο CCR2-64I διατηρούσαν VL κάτω από 50cps/ml για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με ασθενείς ομόζυγους για το φυσικό αλληλόμορφο του CCR2 (28±2 και 20±2 μήνες αντίστοιχα, p=0.048, n=69). Σε ασθενείς με αρχική

τιμή CD4 μεταξύ 200-499cells/mm3 και ετερόζυγους ή ομόζυγους για το αλληλόμορφο CXCL12-3A, τα CD4 αυξήθηκαν ταχύτερα πάνω από 500cells/mm^3 (9±2 μήνες) συγκριτικά με ασθενείς ομόζυγους για το φυσικό αλληλόμορφο του CXCL12 (14±2 μήνες) (p=0.023, n=69). Οι φορείς του CXCL12-3A αλληλομόρφου εμφάνισαν και μια τάση για ταχύτερη πτώση του VL μετά την έναρξη της HAART συγκριτικά με τους ομόζυγους φορείς του φυσικού αλληλομόρφου (7.4±1.6 και 10.5±1.7 μήνες αντίστοιχα, p=0.103, n=69). Σε ασθενείς με το αλληλόμορφο CXCR6-3K σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση παρατηρήθηκε μικρότερη διάρκεια καταστολής του VL<50cps/ml συγκριτικά με τους ομόζυγους CXCR6-3E (19±6 και 48±3 μήνες αντίστοιχα, p=0.036, n=137). Απεναντίας η παρουσία του CX_3CR1-249I και του του CX_3CR1-280M σε ομόζυγη κατάσταση συσχετίστηκε με ταχύτερη άνοδο των CD4 σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τον ομόζυγο CX_3CR1-249V και CX_3CR1-280T γονότυπο αντίστοιχα (3±1 μήνες σε ομόζυγους CX_3CR1-249I/I, 16±2 μήνες σε ομόζυγους CX_3CR1-249V/V ασθενείς, p=0.001, n=115), (3±2 μήνες σε ομόζυγους CX_3CR1-280M/M, 19±3 μήνες σε ομόζυγους CX_3CR1-280T/T ασθενείς, p=0.024, n=115).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Οι πολυμορφισμοί CCR2-64I, CXCL12-3A, CXCR6-3E/K, CX_3CR1-V249I και CX_3CR1-T280M επηρεάζουν την έκβαση της HAART με βάση τους ιολογικούς και ανοσολογικούς δείκτες παρακολούθησης σε ασθενείς με λοίμωξη από HIV-1. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι οι παραπάνω χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της λοίμωξης από HIV-1 και μπορούν να προσφέρουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους μετά από καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεών τους.

Abstract

BACKGROUND: More than 25 years have passed since the emergence of the HIV-1 epidemic. During this time our knowledge about the pathogenesis of HIV-1 infection has increased substantially achieving many accomplishments in its prevention and medical treatment. A critical step has been the introduction of HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) which has significantly prolonged the survival of infected patients. However HAART does not cure the infection and new targets for therapy are being pursued.

The chemokine network is a promising field of research. It consists of receptors and molecules produced by tissue cells at sites of inflammation and leucocytes. Its role is to mediate the creation of immune responses. However HIV-1 exploits the chemokine network and uses its receptors for cell adhesion and infection. The receptors CXCR4 and CCR5 are used by HIV-1 to enter lymphocytes and macrophages. The mutation CCR5Δ32 leads to a truncated form of CCR5 which does not appear on the cell surface conferring infection immunity to homozygous individuals and resistance to infection progression in heterozygous patients. This has resulted in the creation of CCR5 antagonists for use in HIV-1 medical treatment. Other mutations in chemokine receptors or their ligands have also been shown to affect the progression of HIV-1 infection.

OBJECTIVE: In this study we examined the effects of nine chemokine polymorphisms on immunologic and virologic response to HAART in a group of 149 patients followed in "A. Syngros" Hospital (Athens). The polymorphisms were CCR5Δ32, CXCL12-3A, CCR2-64I, CCR5-59029G/A, CXCR6-3E/K, In1.1T/C, H7 haplotype, CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M.

STUDY DESIGN: We genotyped our patients using PCR and agarose and acrylamid gel electrophoresis. We performed Kaplan-Meier analysis using the following end-point criteria: 1) time from HAART initiation to undetectable viral load (VL<50 copies/ml),(2) maximum duration of viral suppression, (3) time from HAART administration until CD4 elevation ≥200 cells/mm^3 for patients with baseline CD4 below 200 cells/mm^3 and ≥500 cells/mm^3 for patients with baseline CD4 between 200 and 499 cells/mm^3, respectively, and (4) time from HAART initiation until CD4 reduction below baseline values.

RESULTS: Our results revealed that patients with baseline CD4 between 200-499 cells/mm^3 and heterozygous or homozygous for the CCR2-64I allele achieved undetectable VL counts at 3.5±0.5 months as compared to 10.2±1.4 months in the group homozygous for the wild type receptor CCR2 (p =0.018, n=69). Additionally patients with CCR2-64I retained undetectable VL for 28±2 months in contrast to 20±2 months in the homozygous wild type group (p =0.048, n=69). Patients with baseline CD4 between 200-499 cells/mm^3 carrying CXCL12-3A restored the CD4 population faster than the homozygous wild type group (mean: 9±2 and 14±2 months, respectively, p =0.023, n=69) and demonstrated a trend for faster VL suppression than the wild type group (7.4±1.6 months and 10.5±1.7 months respectively, p=0.103, n=69). Patients with the CXCR6-3K in homozygous or eterozygous state exhibited a shorter duration of viral suppression (<50cps/ml) in comparison to homozygous CXCR6-3E patients (mean 19±6 and 48±3 months respectively, p=0.036, n=137). On the other hand the CX_3CR1-249I and CX_3CR1-280M alleles in homozygous states were correlated with a favourable response to HAART by faster restoration of CD4 counts to higher levels compared to the homozygous CX_3CR1-249V and CX_3CR1-

280T states respectively (mean: 3±1 months in CX_3CR1-249I/I patients, 16±2 months in CX_3CR1-249V/V patients, p =0.001, n =115 and mean 3±2 months in CX_3CR1-280M/M patients and 19±3 months in CX_3CR1-280T/T patients, p =0.024, n =115).

CONCLUSION: The polymorphisms CCR2-64I, CXCL12-3A, CXCR6-3E/K, CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M affect the immunological and virological response to the initiation of HAART in HIV-1 infected patients. The results from this study suggest that the above chemokines and receptors are important in the pathogenesis of HIV-1 infection and may provide new targets for therapy in the future after better understanding of their interactions.

Συντομογραφίες

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

APC: Antigen Presenting Cell

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CD: Cluster Differentiation marker

Cps: Copies

gp: glycoprotein

GPC: G Protein Coupled Receptor

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy

HEV: High Endothelial Venules

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HSV: Herpes Simplex Virus

HTLV: Human T cell Leukaemia Virus

IL: Interleukin

IFN: Interferon

IP-10: IFNγ inducible Protein 10

I-TAC: Interferon inducible T cell A Chemoattractant

LARC: Liver and Activation Regulated Chemokine

LDL: Low Density Lipoprotein

LTR: Long Terminal Repeats

MCP: Monocyte Chemoattractant Protein

MDC: Macrophage Derived Chemokine

MEC: Mucosae associated Epithelial Chemokine

MIG: Monokine Induced by γ interferon

MIP: Macrophage Inflammatory Protein

NK: Natural Killer lymphocytes

NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

NNRTI: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

PCP: Pneumocystis carinii Pneumonia

PCR: Polymerase Chain Reaction

PI: Protease Inhibitors

RANTES: Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RT: Reverse Transcriptase

RNA: Ribonucleic Acid

SDF: Stromal cell Derived Factor

TARC: Thymus and Activation Regulated Chemokine

Taq: Thermophilus aquaticus polymerase

Th: T-helper

TNF: Tumor Necrosis Factor

UTR: Untranslated Region

VL: Viral Load

Περιεχόμενα

	σελίδα
Ευχαριστίες	ii
Βιογραφικό σημείωμα	iii
Περίληψη	vi
Abstract	viii
Συντομογραφίες	x

Ι. Γενικό Μέρος

Α. HIV ΛΟΙΜΩΞΗ	2
Α1. Εισαγωγή	2
Α2. Ιολογικά χαρακτηριστικά του HIV-1	3
Α3. Προσβολή κυττάρου ξενιστή	4
Α4. Παθογένεια της λοίμωξης από HIV-1	6
Α5. Αντιρετροϊκή αγωγή	10
Α6. Δείκτες παρακολούθησης: CD4 και VL	12
Β. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ	15
Β1. Γενικά χαρακτηριστικά	15
Β2. Χημειοκίνες και ανοσολογικό σύστημα	17
Β3. Χημειοκίνες και νοσήματα	19
Β4. Οι χημειοκίνες στη λοίμωξη από HIV-1	22
Β5. Επίδραση γενετικών πολυμορφισμών των χημειοκινών στη λοίμωξη από HIV-1	24

ΙΙ. Ειδικό Μέρος

Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	32
Δ. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
Δ1. Δείγμα ασθενών	33
Δ2. Μέτρηση των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων και του ιικού φορτίου HIV-1 (VL)	34
Δ3. Απομόνωση DNA ασθενών, χρήση PCR για ανίχνευση γονιδιακών πολυμορφισμών του συστήματος χημειοκινών	35
Δ4. Στατιστική ανάλυση	42

Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 44
Ε1. Επίδραση των πολυμορφισμών CCR5Δ32, CCR4-59029G/A, CCR2-64I, CXCL12-3A στην ανταπόκριση ασθενών στην έναρξη της HAART 44
Ε2. Επίδραση των πολυμορφισμών CXCR6-E3K, In1.1T/C, promEotaxin-1385G/A, CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M στην ανταπόκριση ασθενών στην έναρξη της HAART 50
Ε3. Επίδραση κοινών μεταβλητών στην απόκριση των ασθενών στην έναρξη της HAART 55
ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 62
ΣΤ1. Η επίδραση κοινών μεταβλητών στην έκβαση της HAART 62
ΣΤ2. Η επίδραση του αλληλομόρφου CCR2-64I 62
ΣΤ3. Η επίδραση του αλληλομόρφου CXCL12-3A 63
ΣΤ4. Η επίδραση του αλληλομόρφου CCR5Δ32 64
ΣΤ5. Η επίδραση του πολυμορφισμού CCR5-59029G/A 66
ΣΤ6. Η επίδραση του πολυμορφισμού CXCR6-E3K 66
ΣΤ7. Η επίδραση των πολυμορφισμών CX_3CR1-249I και CX_3CR1-T280M 67
ΣΤ8. Η επίδραση του αλληλομόρφου promEotaxin-1385A ή απλοτύπου H7 69
ΣΤ9. Η επίδραση του πολυμορφισμού In1.1T/C 69
ΣΤ10. Συμπεράσματα 70
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 72
Θ. ΑΝΑΤΥΠΑ ΕΡΓΑΣΙΩΝ 83

Ι. Γενικό Μέρος

Α. HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

Α1. Εισαγωγή

Έχουν περάσει 25 χρόνια από την πρώτη αναφορά για ομοφυλόφιλους ασθενείς με πνευμονία από Pneumocystis carinii σε έδαφος ανοσοανεπάρκειας. Ακολούθησαν σύντομα νέες αναφορές περιστατικών, ώσπου ένα χρόνο μετά υιοθετήθηκε ο όρος σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS: acquired immune deficiency syndrome), για να συμπεριλάβει ασθενείς με ευκαιριακές λοιμώξεις και κακοήθη νεοπλάσματα σε έδαφος επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας άγνωστης αιτιολογίας. Το 1983 απομονώθηκε για πρώτη φορά ένας νέος ρετροϊός από το αίμα ασθενών με AIDS, που αρχικά ονομάστηκε HTLV-III (Human T cell Leukaemia Virus III) και στη συνέχεια HIV (Human Immunodeficiency Virus). Ο HIV έκτοτε έχει ενοχοποιηθεί για το θάνατο περισσοτέρων από 25 εκατομμυρίων ανθρώπων, ενώ ιδιαίτερα βαρύ είναι το πλήγμα της επιδημίας για τις χώρες της Αφρικανικής Ηπείρου, όπου βρίσκεται το 70% των μολυσμένων ατόμων παγκοσμίως. Για το λόγο αυτό ο Γ. Γραμματέας του ΟΗΕ έχει χαρακτηρίσει τον HIV βασικό εμπόδιο για την ανάπτυξη των χωρών αυτών[3].

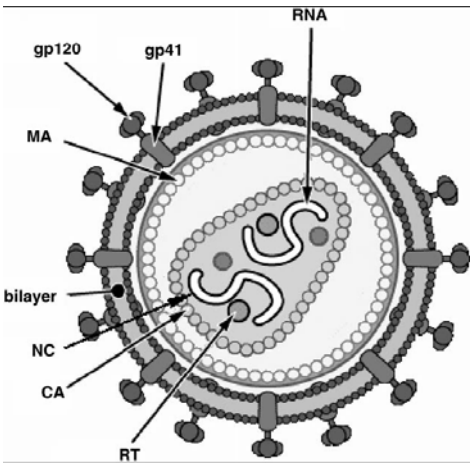
Από την εμφάνιση του HIV μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί σημαντικά βήματα στην προσπάθεια ελέγχου της επιδημίας και στη φαρμακευτική αντιμετώπιση της λοίμωξης. Ενδεικτικά σε μικρό σχετικά χρονικό διάστημα δημιουργήθηκαν ευαίσθητα διαγνωστικά τεστ, ελέγχθηκαν οι τράπεζες αίματος, εισήχθη ο προληπτικός έλεγχος σε πολλούς τομείς, δημιουργήθηκαν ειδικά κέντρα παρακολούθησης ασθενών και συστήματα καταγραφής και ελέγχου, δημιουργήθηκαν μεγάλες βάσεις δεδομένων για ενίσχυση της ερευνητικής προσπάθειας και για επαναξιολόγηση των θεραπευτικών κατευθυντήριων οδηγιών και βρέθηκαν 21 αντιρετροϊκά φάρμακα, που περιόρισαν σημαντικά τη νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών.

Ωστόσο τα επιτεύγματα αυτά αφορούν κυρίως τις χώρες του ανεπτυγμένου κόσμου, ενώ η προσπάθεια για εύρεση εμβολίου, που θα άλλαζε την τροπή της επιδημίας, δεν έχει καρποφορήσει ακόμα. Επιπλέον τα φάρμακα που ανακαλύφθηκαν

χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλό κόστος και δεν επιφέρουν την ίαση, αφού δεν μπορούν να εκριζώσουν τον ιό από το γενετικό υλικό λυσιγονικών κυττάρων, όπου βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση. Συνεπώς η επιδημία του HIV αποτελεί ακόμα μια σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία με σοβαρές κοινωνικές προεκτάσεις και για το λόγο αυτό αντλεί το ερευνητικό ενδιαφέρον ενός μεγάλου τμήματος του επιστημονικού κόσμου παγκοσμίως.

Α2. Ιολογικά χαρακτηριστικά του HIV-1

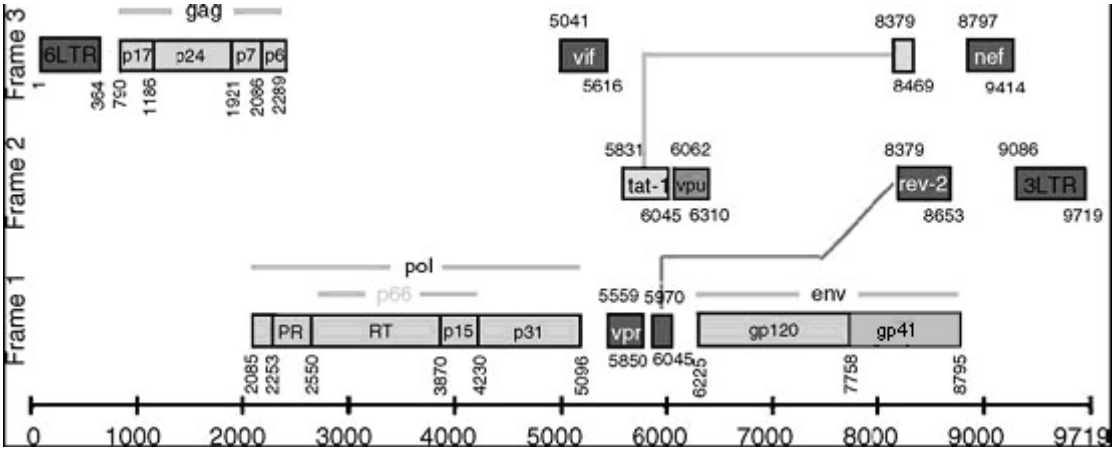
Ο ιός του HIV είναι ρετροϊός και ανήκει στην υποοικογένεια των Lentivirinae. Τα ώριμα σωματίδια του ιού είναι σφαιρικά, διαμέτρου 100-120nm (Σχήμα 1). Εξωτερικά περιβάλλεται από μια διπλή φωσφολιπιδική μεμβράνη προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Στην επιφάνειά της φέρει τη μεμβρανική πρωτεΐνη env που δομείται από τις γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp 41. Η gp120 συνδέεται με την gp41 και σχηματίζει διμερή. Τρία τέτοια διμερή σχηματίζουν ένα σύμπλοκο. Στο εξαμερές σύμπλοκο αυτό η gp120 διατάσσεται περιφερικά και η gp41 στο κέντρο. Εκτός από τη πρωτεΐνη env εξωτερικά, η μεμβράνη επενδύεται εσωτερικά από τη στρωματική πρωτεΐνη p17 (MA=matrix protein). Στο κέντρο βρίσκεται το κυλινδρικό καψίδιο, που αποτελείται από εξαμερή της καψικής πρωτεΐνης p24 (CA=capsid protein). Το καψίδιο περιέχει την αντίστροφη μεταγραφάση (RT), την ιική ιντεγκράση και τα διμερή του ιικού RNA επενδυμένα με την νουκλεοκαψική πρωτεΐνη p7 (NC: nucleocapsid protein)[1].



Σχήμα 1: Μορφολογία ιικού σωματιδίου HIV[1]

Στο σχήμα 2 φαίνεται η δομή του γενετικού υλικού του ιού. Το γένωμα του HIV-1 αρχίζει και τελειώνει με τα τμήματα LTR (Long Terminal Repeats), που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων και περιέχουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων του κυττάρου και του ιού. Το γονίδιο gag κωδικοποιεί πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου. Το γονίδιο pol κωδικοποιεί δομικές

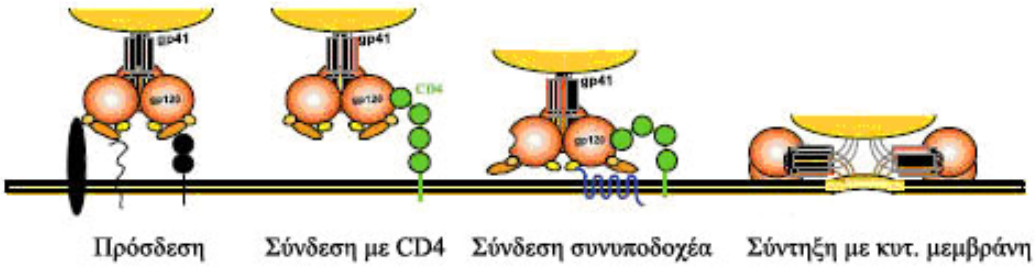
πρωτεΐνες καθώς και την αντίστροφη μεταγραφάση (RT), την πρωτεάση (PR) και την ιντεγκράση του ιού. Το γονίδιο env κωδικοποιεί την πρωτεΐνη gp160, από την οποία προκύπτουν οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41. Επίσης φαίνονται τα γονίδια tat, rev, nef, vif, vpr και vpu[1].



Σχήμα 2: Γονίδια του HIV-1[1].

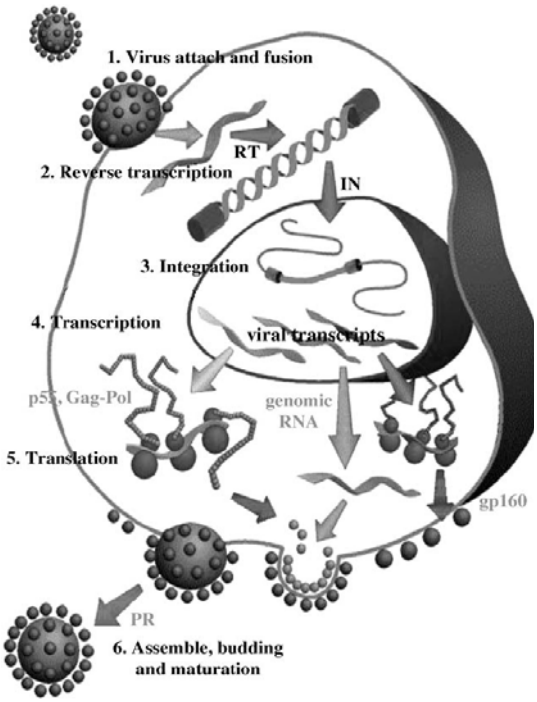
Α3. Προσβολή κυττάρου ξενιστή

Η μόλυνση του κυττάρου ξενιστή ξεκινά με την προσκόλληση της γλυκοπρωτεΐνης gp120 σε κατάλληλους υποδοχείς του κυττάρου (Σχήμα 3). Ο υποδοχέας CD4 είναι ο βασικός υποδοχέας που χρησιμοποιεί ο ιός και ο οποίος του επιτρέπει να προσκολληθεί στα T-helper λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Για την είσοδό του όμως στα κύτταρα αυτά χρειάζεται και την παρουσία ενός δεύτερου υποδοχέα («συνυποδοχέα»). Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στο σύστημα των χημειοκινών και οι πιο αντιπροσωπευτικοί στην παθογένεια του HIV-1 είναι ο CCR5 και ο CXCR4. Με τη σύνδεση της gp120 στον CD4 και τον υποδοχέα χημειοκινών αλλάζει η στερεοδιάταξη του συμπλόκου gp120-gp41. Οι πρωτεΐνες gp41 προβάλλουν από το κέντρο του συμπλόκου και εισέρχονται στην κυτταρική μεμβράνη οδηγώντας σε σύντηξη του μεμβρανικού περιβλήματος του ιού με την κυτταρική μεμβράνη.



Σχήμα 3: Πρόσδεση gp120-gp41 του ιού με CD4 και συνυποδοχέα χημειοκινών για την σύντηξη της μεμβράνης του ιικού σωματιδίου με την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή[1].

Ακολουθεί η είσοδος του καψιδίου στο κυτταρόπλασμα όπου η αντίστροφη μεταγραφάση (RT=reverse transcriptase) δημιουργεί διπλές έλικες DNA με μήτρα το ιικό RNA. Το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου με τη βοήθεια της ιικής ιντεγκράσης ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA. Η κυτταρική RNA πολυμεράση ΙΙ μεταγράφει το ενσωματωμένο ιικό DNA. Η μετάφραση του DNA παράγει αρχικά τις πρωτεΐνες Tat, Nef, Rev. Η Tat και η Rev δίνουν τη δυνατότητα παραγωγής και των υπόλοιπων ιικών πρωτεϊνών μέσω εναλλακτικού τεμαχισμού του mRNA και μεταφοράς του στο κυτταρόπλασμα.. Οι πρωτεΐνες και το ιικό RNA συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου σχηματίζονται νέα ιικά σωματίδια και αποκολλώνται από την κυτταρική μεμβράνη (Σχήμα 4)[1].



Σχήμα 4: Στάδια κυτταρικής μόλυνσης από τον HIV
1. Πρόσδεση ιού και σύντηξη. 2.Αντίστροφη μεταγραφή-δημιουργία ιικού DNA. 3. Ενσωμάτωση στο κυτταρικό DNA. 4. Μεταγραφή ιικού DNA. 5. Μετάφραση mRNA. 6. Συναρμολόγηση ιικών σωματιδίων και ωρίμανση[1]

Α4. Παθογένεια της λοίμωξης από HIV-1

Η λοίμωξη από HIV-1 που δεν υπόκειται σε αντιρετροϊκή θεραπεία ακολουθεί μια πορεία 10 χρόνων περίπου. Η λοίμωξη μεταδίδεται είτε με σεξουαλική επαφή είτε αιματογενώς. Τα στάδια περιλαμβάνουν την μόλυνση, την πρωτογενή λοίμωξη, την ορομετατροπή, τη λανθάνουσα ασυμπτωματική λοίμωξη, την πρώιμη συμπτωματική, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome) και την προχωρημένη λοίμωξη με CD4<50/mm^3.

ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗ: Μετά τη μόλυνση αρχίζει ο πολλαπλασιασμός του ιού που τον καθιστά εργαστηριακά ανιχνεύσιμο σε 4-10 εβδομάδες. Ο ιός διασπείρεται στον εγκέφαλο, το σπλήνα, τους λεμφαδένες, τον εξωλεμφαδενικό λεμφικό ιστό. Η πρωτογενής λοίμωξη μπορεί να εκδηλωθεί με σύνδρομο λοιμώδους μονοπυρήνωσης, με πυρετό, φαρυγγαλγία, κηλιδοβλατιδώδες

εξάνθημα, λεμφαδενοπάθεια, μυαλγίες, αρθραλγίες, διάρροια, ναυτία, εμετό, νευροπάθεια ή εγκεφαλοπάθεια. Τα πρώιμα αυτά συμπτώματα συνήθως διαρκούν 1-2 εβδομάδες. Στο διάστημα αυτό το ιικό φορτίο (VL=viral load) αυξάνει δραματικά ενώ κατακρημνίζεται ο αριθμός των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων. Παράλληλα αναπτύσσεται ειδική κυτταροτοξική Τ-λεμφοκυτταρική ανοσολογική απάντηση που προκαλεί σταδιακά πτώση των επιπέδων του ιού στο αίμα, ενώ τα CD4 Τ-λεμφοκύτταρα ανέρχονται πάλι σε αριθμό [4-7].

ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ: Ακολουθεί η λανθάνουσα περίοδος, στην αρχή της οποίας το VL έχει πέσει σε ένα βασικό επίπεδο λόγω της Τ-κυτταροτοξικής απάντησης. Το επίπεδο αυτό έχει προγνωστική αξία για την πορεία της λοίμωξης. Όσο χαμηλότερο το VL, τόσο καλύτερη η πρόγνωση. Επίσης κατά την υποχώρηση της πρωτολοίμωξης και την απαρχή της λανθάνουσας περιόδου τα επίπεδα CD4 Τ-λεμφοκύτταρων έχουν επανέλθει, ωστόσο παραμένουν σε επίπεδα χαμηλότερα συγκριτικά με την περίοδο πριν την ορομετατροπή. Επίσης στο τέλος της πρωτολοίμωξης εμφανίζεται χυμική απάντηση με παραγωγή αντισωμάτων έναντι της μεμβρανικής πρωτεΐνης του ιού Env. Η λανθάνουσα περίοδος χωρίς θεραπεία κυμαίνεται ανάλογα τον ασθενή. Υπάρχουν ασθενείς που διατηρούν υψηλές τιμές CD4 λεμφοκυττάρων για περισσότερο από 8 χρόνια και άλλοι που έχουν ταχείς ρυθμούς πτώσης των CD4 λεμφοκυττάρων. Ωστόσο οι περισσότεροι, με αρχική τιμή CD4 λεμφοκυττάρων >1000cells/mm^3 πριν την ορομετατροπή, εμφανίζουν νέα τιμή CD4 περίπου 670cells/mm^3 στο τέλος του 1^{ου} έτους και στη συνέχεια πτώση των CD4 κατά 30-90cells/mm^3 ανά έτος. Στο διάστημα αυτό οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί ή μπορεί να εμφανίζουν γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια. Στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων ανευρίσκονται πολυάριθμα ιικά σωματίδια γύρω από δενδροκύτταρα, όπου έρχονται σε επαφή με Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία μολύνουν. Η ευρεία διασπορά του ιού σε όλο το σώμα οδηγεί σε λυσιγονική ενσωμάτωση του ιικού γενετικού υλικού στο DNA κυττάρων ξενιστών, όπως είναι τα μακροφάγα, τα μνημονικά CD4 λεμφοκύτταρα και τα CD4 λεμφοκύτταρα χωρίς αντιγονική εμπειρία (naïve). Το VL είναι σταθερό ή εμφανίζει σταδιακά μικρή αύξηση, ενώ τα CD4 Τ-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος εμφανίζουν σταδιακά μικρή πτώση. Ο πολλαπλασιασμός του ιού και η καταστροφή των μολυσμένων Τ-λεμφοκυττάρων συνεχίζεται στους λεμφικούς ιστούς σε όλη τη λανθάνουσα περίοδο σε υψηλούς

ρυθμούς. Τα λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται επίσης ταχύτατα, ενώ συγχρόνως μολύνονται από τον ιό και καταστρέφονται είτε με λύση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων, είτε με επαγωγή της απόπτωσης από τον ιό. Υπολογίζεται ότι κατά την ασυμπτωματική περίοδο καταστρέφονται καθημερινά 10^9 CD4 λεμφοκύτταρα στο λεμφικό ιστό[8-18].

ΠΡΩΙΜΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ: Η πρώιμη συμπτωματική περίοδος ξεκινά με την εμφάνιση νοσημάτων μη ειδικών για την HIV-1 λοίμωξη, τα οποία όμως παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με HIV λοίμωξη. Για το λόγο αυτό η διάγνωσή τους επιβάλλει τον έλεγχο του ασθενούς για πιθανή HIV-1 λοίμωξη. Οι καταστάσεις αυτές είναι οι ακόλουθες:

1. Βακτηριακή αγγειωμάτωση
2. Καντιντίαση στόματος, φάρυγγα
3. Καντιντίαση κόλπου ανθεκτική σε θεραπεία, συχνή, επίμονη
4. Δυσπλασία τραχήλου μήτρας, καρκίνωμα *in situ*
5. Συστηματικά συμπτώματα όπως πυρετός (38,5^{o}C) ή διάρροια διάρκειας μεγαλύτερης από ένα μήνα
6. Τριχωτή λευκοπλακία στόματος
7. Έρπης ζωστήρας σε δύο τουλάχιστον διαφορετικά επεισόδια ή σε περισσότερα από ένα δερμοτόμια
8. Ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα
9. Λοίμωξη με λιστέρια
10. Πυελική φλεγμονή, ιδιαίτερα όταν είναι επιπλεγμένη με σαλπιγγικό ή ωοθηκικό απόστημα
11. Περιφερική νευροπάθεια

ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (AIDS): Το στάδιο αυτό της λοίμωξης εκδηλώνεται με νοσηρές καταστάσεις που δεν παρατηρούνται στο γενικό πληθυσμό, παρά μόνο σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια. Αυτές περιλαμβάνουν τις ακόλουθες κλινικές καταστάσεις:

1 Καντιντίαση οισοφάγου, βρόγχων, τραχείας, πνευμόνων
2 Διηθητικό καρκίνωμα τραχήλου
3 Κοκκιδιοειδομυκητίαση γενικευμένη ή εξωπνευμονική

4 Εξωπνευμονική κρυπτοκοκκίωση
5 Χρόνια εντερική κρυπτοσποριδίαση (>1μήνα)
6 Λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό (εκτός ήπατος, σπληνός ή λεμφαδένων)
7 Αμφιβληστροειδίτιδα από κυτταρομεγαλοϊό
8 HIV-1 σχετιζόμενη εγκεφαλοπάθεια
9 HSV: έλκος που παραμένει περισσότερο από ένα μήνα, βρογχίτιδα, πνευμονίτιδα, οισοφαγίτιδα
10 Γενικευμένη ή εξωπνευμονική ιστοπλάσμωση
11 Χρόνια εντερική ισοσπορίαση (διάρκεια περισσότερο από 1μήνα)
12 Σάρκωμα Kaposi
13 Burkitt λέμφωμα
14 Ανοσοβλαστικό λέμφωμα
15 Πρωτοπαθές λέμφωμα εγκεφάλου
16 Γενικευμένη ή εξωπνευμονική λοίμωξη από Mycobacterium avium ή M. kansasii
17 Λοίμωξη από M. tuberculosis
18 Πνευμονία από Pneumocystis carinii
19 Υποτροπιάζουσες πνευμονίες
20 Προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια
21 Υποτροπιάζουσα σηψαιμία από Salmonella
22 Τοξοπλάσμωση εγκεφάλου
23 Σύνδρομο καχεξίας εξαιτίας του HIV-1

Ανεξάρτητα από τις κλινικές εκδηλώσεις του AIDS, υπάρχουν και τρία στάδια κατάταξης με κριτήριο τις τιμές CD4 Τ-λεμφοκυττάρων. Κατηγορία 1: όσοι ασθενείς έχουν CD4≥500/mm^3, κατηγορία 2: οι ασθενείς με CD4 μεταξύ 200-499/mm^3, κατηγορία 3: οι ασθενείς με CD4<200mm^3. Η τελευταία κατηγορία (CD4<200mm^3) θεωρείται στάδιο AIDS αφού ο μέσος χρόνος εμφάνισης κλινικής εκδήλωσης AIDS μετά την πτώση των CD4 στα επίπεδα αυτά δεν ξεπερνά τους 12-18 μήνες.

ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΜΕ CD4<50/mm^3: Στο στάδιο αυτό η επιβίωση χωρίς θεραπεία συνήθως δεν ξεπερνά τους 12-18 μήνες[19].

Α5. Αντιρετροϊκή αγωγή

Με την ανακάλυψη των αντιρετροϊκών φαρμάκων έχει αλλάξει ριζικά η πορεία της λοίμωξης από HIV-1. Το πρώτο αντιρετροϊκό φάρμακο που εγκρίθηκε στις ΗΠΑ για τη θεραπεία της λοίμωξης από HIV-1 ήταν το AZT (zidovudine) το 1987. Το AZT ανήκει στην κατηγορία των νουκλεοσιδικών αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης (NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors). Δυστυχώς όμως η εμφάνιση ανθεκτικών μεταλλαγμένων στελεχών του ιού σε σχήματα μονοθεραπείας με AZT περιόρισε την αποτελεσματικότητά του. Ακολούθησε η σύνθεση νέων NRTI και η χορήγηση διπλών θεραπευτικών σχημάτων με δύο NRTI για μεγαλύτερη δραστικότητα. Όμως η ανθεκτικότητα σε ένα NRTI συχνά συνοδευόταν από διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε άλλα NRTI.

Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στα θεραπευτικά σχήματα επιτεύχθηκε μετά το 1996 με την κυκλοφορία των αναστολέων της πρωτεάσης του HIV-1 (PI: Protease Inhibitors) και τη χρήση τριπλής αγωγής με 2NRTI και ένα PI ή 2NRTI και ένα NNRTI (Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor). Οι συνδυασμοί αυτοί ονομάστηκαν αντιρετροϊκή αγωγή υψηλής δραστικότητας (HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy) και πολύ σύντομα φάνηκε η υπεροχή της HAART έναντι προηγούμενων θεραπειών στην παράταση της επιβίωσης των ασθενών και τη μείωση της νοσηρότητάς τους[20,21 22 23]. Αυτό απεικονίζεται παραστατικά στα διαγράμματα 1 και 2. Ωστόσο η εξέλιξη δεν σταμάτησε εκεί. Από το 1996 έχει αποτυπωθεί στην βιβλιογραφία εκτεταμένη κλινική εμπειρία και οργανωμένες μελέτες που οδήγησαν σε βέλτιστους συνδυασμούς φαρμάκων, μείωση της συχνότητας των παρενεργειών και πιο απλοποιημένα σχήματα. Επιπλέον οι φαρμακευτικές επιλογές της HAART έχουν αυξηθεί πολύ λόγω ανακάλυψης καινούργιων δραστικών ουσιών. Αυτό φαίνεται στον πίνακα 1, όπου τα αντιρετροϊκά φάρμακα προς το παρόν κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: NRTI, NNRTI, PI και FI (Fusion Inhibitors: αναστολείς πρόσδεσης του ιού στο κύτταρο).

NRTI	NNRTI	PI	FI
Abacavir	Delavirdine	Amprenavir	Enfuvirtide
Didanosine	Efavirenz	Atazanavir	
Emtricitabine	Nevirapine	Fosamprenavir	
Lamivudine		Indinavir	
Stavudine		Lopinavir/Ritonavir	
Tenofovir		Nelfinavir	
Zalcitabine		Ritonavir	
Zidovudine		Saquinavir	
		Tipranavir	

Πίνακας 1: Κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων:
NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI: non nucleoside reverse transcriptase inhibitor, PI: protease inhibitor, FI: fusion inhibitor

Η αποτελεσματικότητα της HAART πλέον περιορίζεται από τις παρενέργειες των φαρμάκων, τις δυσκολίες συμμόρφωσης των ασθενών στην χρόνια και πολλαπλή αγωγή και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού. Επίσης το υψηλό της κόστος δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην διάδοσή της στις αναπτυσσόμενες χώρες αλλά και σε κοινωνικές ομάδες των ανεπτυγμένων κρατών που δεν έχουν πλήρη υγειονομική κάλυψη. Το πιο σημαντικό όμως πρόβλημα της HAART βρίσκεται στο γεγονός ότι δεν επιφέρει την ίαση από τη λοίμωξη, αφού δεν μπορεί να εξαλείψει τα μολυσμένα κύτταρα που φέρουν το γενετικό υλικό του ιού ενσωματωμένο στο DNA τους σε λανθάνουσα κατάσταση, όπως τα μνημονικά Τ-λεμφοκύτταρα σε ηρεμία (resting), τα Τ-λεμφοκυττάρα χωρίς αντιγονική εμπειρία (naïve) και τα μακροφάγα. Χαρακτηριστικά εκτιμάται πως ο χρόνος ημίσειας ζωής μολυσμένων Τ-λεμφοκυττάρων σε ηρεμία (resting) είναι 44 μήνες. Συνεπώς για την εξάντληση αυτών των δεξαμενών (reservoir) του ιού χρειάζονται πολλές δεκαετίες πλήρους καταστολής του VL με HAART[24].

Η εποχή της HAART συνεπώς χαρακτηρίζεται από σημαντική παράταση της επιβίωσης των ασθενών και μείωση των νοσηρών εκδηλώσεων της νόσου. Από την άλλη μεριά χαρακτηρίζεται από καινούργια θεραπευτικά διλήμματα λόγω παρενεργειών των φαρμάκων, καινούργιων θεραπευτικών ουσιών, ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών του ιού, ερωτημάτων σχετικά με το βέλτιστο χρόνο έναρξης θεραπείας και τη διάρκεια χορήγησής της σε μακροχρόνια σταθεροποιημένους ασθενείς. Για την επεξεργασία των παραπάνω ερωτημάτων και την επαναξιολόγηση των θεραπευτικών στρατηγικών έχει δημιουργηθεί από το υπουργείο Υγείας των ΗΠΑ ένα συμβουλευτικό σώμα από ειδικούς για την HIV-1 λοίμωξη που διαμορφώνουν και ανανεώνουν σε τακτά διαστήματα τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπεία της λοίμωξης (Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services DHHS, http://aidsinfo.nih.gov/guidelines). Στις οδηγίες αυτές περιγράφονται οι καλύτεροι συνδυασμοί HAART, εναλλακτικές θεραπείες σε μειωμένη απόκριση ή αναζωπύρωση της λοίμωξης, παρενέργειες και αλληλεπιδράσεις φαρμάκων, προφυλακτική θεραπεία ευκαιριακών λοιμώξεων, προσαρμοσμένη θεραπεία κατά τη διάρκεια της κύησης κ.α. Για την αξιολόγηση όμως της αποτελεσματικότητας των οδηγιών αυτών ήταν επιτακτική η ανάγκη εύρεσης αξιόπιστων δεικτών παρακολούθησης της πορείας της λοίμωξης.

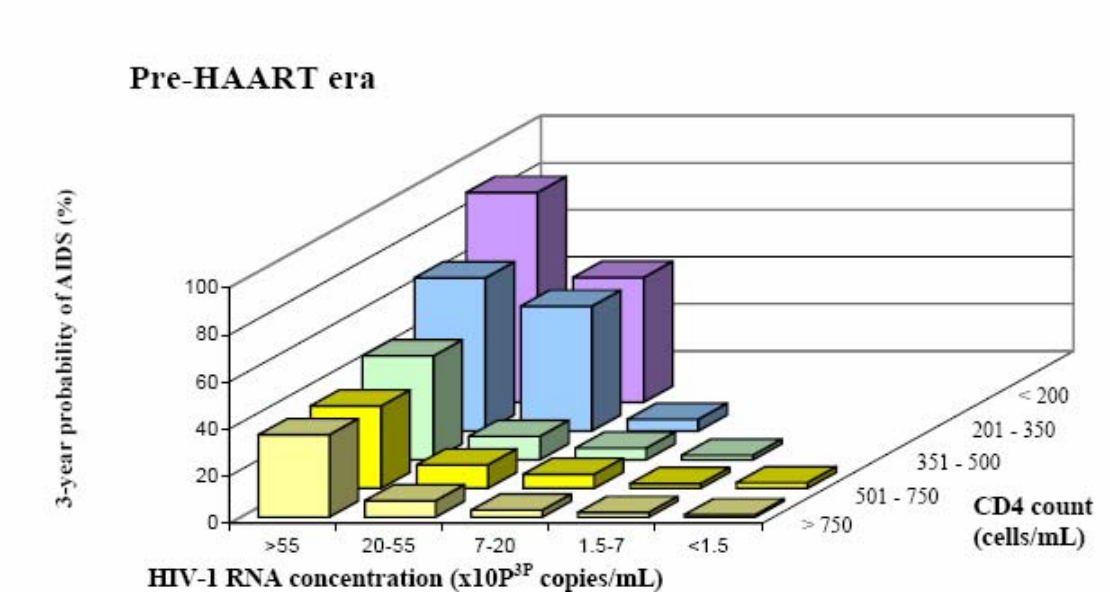
Α6. Δείκτες παρακολούθησης: CD4 και VL

Καθοριστικοί δείκτες παρακολούθησης της πορείας της λοίμωξης είναι ο αριθμός των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων, το ιικό φορτίο (VL: viral load) του ιού και η εμφάνιση νοσημάτων σχετιζομένων με στάδιο AIDS. Οι δείκτες αυτοί δίνουν την ένδειξη για έναρξη θεραπείας (βλ πίνακα) και χρησιμοποιούνται προγνωστικά (βλ Διάγραμμα 1 και 2) για την έκβαση της λοίμωξης. Εξίσου σημαντικό είναι ότι τα CD4 και ιδιαίτερα το VL χρησιμοποιούνται για εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της HAART. Το VL πρέπει να μετράται πριν την έναρξη της θεραπείας και τη $2^{η}$ και $8^{η}$ εβδομάδα μετά την έναρξη ή τροποποίηση της HAART. Για να θεωρηθεί ότι ο ασθενής ανταποκρίθηκε στο σχήμα της HAART, οφείλει το VL να μειωθεί τουλάχιστον κατά 1.0 log10 μέχρι την $8^{η}$ εβδομάδα και να καταστεί μη ανιχνεύσιμο (<50 copies/mL) μέχρι τον $4^{ο}$-$6^{ο}$ μήνα από την έναρξη της αγωγής. Αντίστοιχα σε

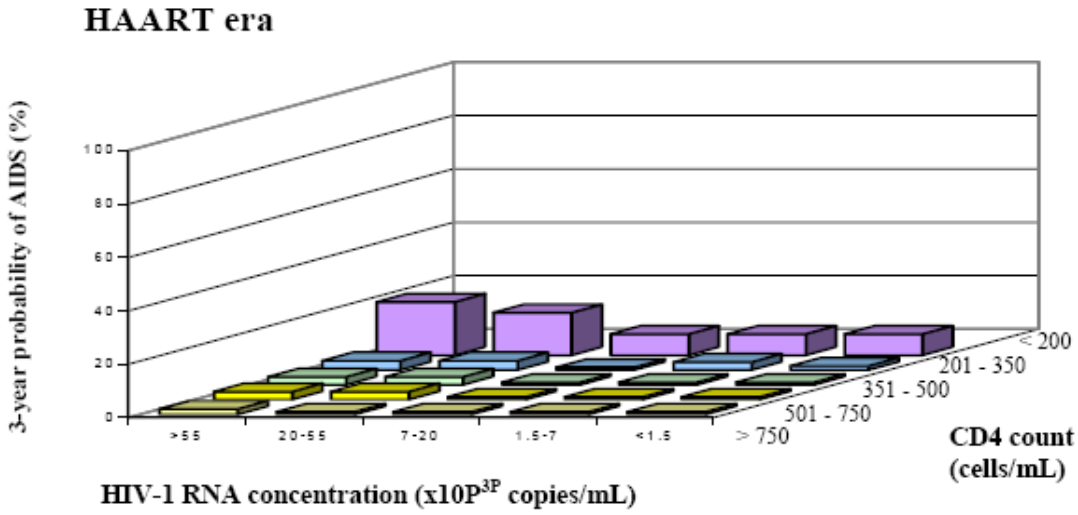
επιτυχή καταστολή του ιού παρατηρείται αύξηση των CD4 κατά 100-150 cells/mm^3 ανά έτος. Στόχος της θεραπείας είναι η συνεχής και όσο το δυνατό πιο μακρόχρονη καταστολή του ιού σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα VL[25].

- Ισχυρή ένδειξη η έναρξη σε όλους τους ασθενείς που εμφανίζουν νόσημα σχετιζόμενο με AIDS ανεξαρτήτως CD4 ή VL.
- Ισχυρή ένδειξη η έναρξη σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με CD4 Τ-λεμφοκύτταρα<200cells/mm^3.
- Έναρξη στους ασυμπτωματικούς ασθενείς με CD4 Τ-λεμφοκύτταρα 201-350 cells/mm^3 μετά από ενημέρωσή τους για τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της μακροχρόνιας αγωγής και τη συγκατάθεσή τους.
- Στους ασυμπτωματικούς ασθενείς με CD4 Τ-λεμφοκύτταρα >350cells/mm^3 και VL≥100.000cps/ml οι περισσότεροι κλινικοί δεν ξεκινούν θεραπεία.
- Στους ασυμπτωματικούς ασθενείς με CD4 Τ-λεμφοκύτταρα >350cells/mm^3 και VL<100.000cps/ml δεν ενδείκνυται έναρξη θεραπείας με HAART.

Πίνακας 2: Ενδείξεις έναρξης θεραπείας με HAART [25]



Διάγραμμα 1: Πιθανότητα εξέλιξης της HIV-1 λοίμωξης σε AIDS εντός τριετίας ανάλογα με το CD4 και το VL την εποχή πριν την καθιέρωση της HAART [2]



Διάγραμμα 2: Πιθανότητα εξέλιξης της HIV-1 λοίμωξης σε AIDS εντός τριετίας ανάλογα με το CD4 και το VL στην εποχή της HAART [2]

Β. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ

Β1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι χημειοκίνες είναι χημειοτακτικές κυτοκίνες που δρουν μέσω μιας μεγάλης ομάδας υποδοχέων, των λεγόμενων εφτά-διαμεμβρανικών G πρωτεΐνοσύνδετων υποδοχέων (seven transmembrane G protein receptors). Το πρώτο μέλος της οικογένειας των χημειοκινών που ανακαλύφθηκε είναι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (platelet factor 4) ή CXCL4. Ωστόσο οι χημειοκίνες αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά ως χημειοτακτικοί παράγοντες με την ανακάλυψη της ιντερλευκίνης 8 (IL-8 ή CXCL8) το 1987[26]. Ακολούθησε η κλωνοποίηση του υποδοχέα της IL-8, του πρώτου υποδοχέα χημειοκινών. Έκτοτε έχουν βρεθεί περισσότερες από 40 νέες χημειοκίνες και 20 υποδοχείς και ο αριθμός τους αυξάνει διαρκώς. Οι χημειοκίνες κατατάσσονται ανάλογα με τα δομικά τους χαρακτηριστικά (την παρουσία και τον αριθμό αμινοξέων [X] ανάμεσα στα δύο μόρια κυστεΐνης [CC] στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης) σε 4 κατηγορίες, που συμβολίζονται CC (χωρίς παρεμβολή αμινοξέος), CXC (παρεμβάλλεται ένα αμινοξύ), C (μόνο ένα μόριο κυστεΐνης) και CX_3C (παρεμβάλλονται τρία αμινοξέα)[27]. Οι βιολογικές δράσεις των χημειοκινών αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας. Το μεγαλύτερο μέρος των επιδράσεών τους μένει ακόμα να ανακαλυφθεί (βλ. Πίνακα 3). Ακολουθεί μια αναφορά σε μερικές κεντρικές διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου οι χημειοκίνες φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο (κεφάλαιο Β2), σε μερικά νοσήματα όπου φαίνεται οι χημειοκίνες να εμπλέκονται παθογενετικά (κεφάλαιο Β3) και στην σχέση των χημειοκινών με την λοίμωξη από HIV-1 (κεφάλαιο Β4).

Όνομα	Κύριοι αγωνιστές	Κύρια λειτουργία
CXCR1	CXCL8	Μετανάστευση πολυμορφοπύρηνων, φυσική ανοσία, οξεία φλεγμονή
CXCR2	CXCL1-3 CXCL5-8	Μετανάστευση πολυμορφοπύρηνων, φυσική ανοσία, οξεία φλεγμονή, αγγειογένεση
CXCR3	CXCL9-11	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων, επίκτητη ανοσία, Th1 φλεγμονή
CXCR4	CXCL12	Β-λεμφοκυτταρική λεμφοποίηση, μυελοποίηση, ανάπτυξη ΚΝΣ και κυκλοφορικού συστήματος, λοίμωξη από HIV
CXCR5	CXCL13	Κυκλοφορία Β-λεμφοκυττάρων, ανάπτυξη λεμφικού συστήματος
CXCR6	CXCL16	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων
CCR1	CCL3 CCL5 CCL7 CCL8 CCL13-16 CCL23	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, εγγενής και επίκτητη ανοσία, φλεγμονή
CCR2	CCL2 CCL7 CCL8 CCL13	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, φυσική και επίκτητη ανοσία, Th1 φλεγμονή
CCR3	CCL5 CCL7 CCL8 CCL11 CCL13 CCL15 CCL24 CCL26	Μετανάστευση ηωσινόφιλων, βασεόφιλων και Τ-λεμφοκυττάρων, αλλεργική φλεγμονή
CCR4	CCL17 CCL22	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, αλλεργική φλεγμονή
CCR5	CCL3 CCL4 CCL5 CCL8 CCL14	Μετανάστευση μονοκυττάρων, φυσική και επίκτητη ανοσία, HIV λοίμωξη
CCR6	CCL20	Μετανάστευση δενδριτικών κυττάρων
CCR7	CCL19 CCL21	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, ανάπτυξη λεμφικού συστήματος, πρωτογενής ανοσολογική απάντηση
CCR8	CCL1 CCL4 CCL17	Μετανάστευση Τ-λεμφοκυττάρων
CCR9	CCL25	Εντόπιση (homing) Τ-λεμφοκυττάρων στο έντερο
CCR10	CCL26-28	Εντόπιση (homing) Τ-λεμφοκυττάρων στο δέρμα
CX3CR1	CX3CL1	Κυκλοφορία και προσκόλληση Τ-λεμφοκυττάρων και NK λεμφοκυττάρων, φυσική και επίκτητη ανοσία, Th1 φλεγμονή
XCR1	XCL1-2	Κυκλοφορία Τ-λεμφοκυττάρων

Πίνακας 3: Χημειοκίνες, συγγενείς υποδοχείς και γνωστές δράσεις[28].

Β2. Χημειοκίνες και ανοσολογικό σύστημα

ΟΙ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΩΝ:

Το σύστημα των χημειοκινών συντελεί στην ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων και τη διακίνησή τους μέσα στο θύμο αδένα. Συγκεκριμένες χημειοκίνες παράγονται στο θύμο αδένα με μεγάλη ειδικότητα σε μικροπεριβάλλοντα του αδένα προκειμένου να προσελκύσουν τις κατάλληλες υποομάδες θυμοκυττάρων[29]. Για το λόγο αυτό τα θυμοκύτταρα εκφράζουν σε διαφορετικά στάδια της ωρίμανσής τους διαφορετικούς υποδοχείς χημειοκινών που καθοδηγούν τη σταδιακή μετανάστευσή τους από το φλοιό στη μυελώδη μοίρα του οργάνου. Ενδεικτικά τα μυελώδη θυμοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CCR7 και αποκρίνονται στις χημειοκίνες CCL19 και CCL21 που παράγονται στη μυελώδη μοίρα του οργάνου, ενώ τα περισσότερα ανώριμα θυμοκύτταρα μεταναστεύουν σε απάντηση του CCL25, ιδιότητα την οποία χάνουν στα τελικά στάδια της ωρίμανσής τους, όταν πρέπει να εξέλθουν του θύμου αδένα και να περάσουν στην περιφερική κυκλοφορία[30].

ΟΙ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΣΤΟΥΣ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ:

Στους λεμφαδένες η σωστή χωροδιάταξη και αλληλεπίδραση των Τ και Β λεμφοκυττάρων καθορίζεται από τις χημειοκίνες. Αυτό έχει αποδειχθεί από πειράματα σε ποντικούς με εκλεκτικές ανεπάρκειες σε χημειοκίνες και τους αντίστοιχους υποδοχείς με αποτέλεσμα να είναι σοβαρά διαταραγμένη η αρχιτεκτονική των λεμφαδένων και οι πρώιμες ανοσολογικές απαντήσεις των λεμφοκυττάρων[31,32]. Ενδεικτικά, Τ-λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται με αντιγονική έκθεση εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR5 και μεταναστεύουν στα λεμφοζίδια όπου παράγεται η συγγενής χημειοκίνη CXCL13. Στη θέση αυτή μπορούν να αλληλεπιδράσουν με Β-λεμφοκύτταρα και να τα ενεργοποιήσουν για να παράγουν αντισώματα[33]. Επίσης στα φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (HEV: high endothelial venules) παράγονται χημειοκίνες όπως οι CCL19, CCL21, που δρουν χημειοτακτικά στα Β και Τ λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μέσω του υποδοχέα CCR7. Με αυτό τον τρόπο τα λεμφοκύτταρα μεταφέρουν στους λεμφαδένες πληροφορίες για αντιγόνα της περιφέρειας και μετέχουν στην έναρξη κατάλληλων ανοσολογικών απαντήσεων[34].

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ :

Στην περιφέρεια η ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων χωρίς αντιγονική εμπειρία (naïve), η διαφοροποίηση δραστικών (effector) Τ-λεμφοκυττάρων και η ωρίμανση μνημονικών Τ-λεμφοκυττάρων συνοδεύεται από την έκφραση ειδικών υποδοχέων χημειοκινών για κάθε περίσταση. Αυτό επιτρέπει στα Τ-λεμφοκύτταρα την πραγματοποίηση των κατάλληλων αλληλεπιδράσεων με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τη χημειοτακτική κίνησή τους ανάμεσα στα όργανα του λεμφικού ιστού ή τη μετανάστευσή τους στους περιφερικούς ιστούς για διαφορετικές αποστολές. Ενδεικτικά τα Τ-λεμφοκύτταρα χωρίς αντιγονική εμπειρία εκφράζουν τους υποδοχείς CXCR4, CCR7, ενώ υποομάδες των δραστικών και μνημονικών Τ-λεμφοκυττάρων εκφράζουν του υποδοχείς CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CCR9 και CXCR5. Επιπλέον ο CCR7 υποδιαιρεί τα δραστικά και μνημονικά Τ-λεμφοκύτταρα σε ομάδες με συγκεκριμένη εντόπιση στον οργανισμό[35].

Κατά παρόμοιο τρόπο τα μονοκύτταρα και τα «ανώριμα» δενδριτικά κύτταρα εξέρχονται του αίματος στους περιφερικούς ιστούς όπου ανιχνεύουν παθογόνα. Η μετακίνηση αυτή καθοδηγείται από την έκφραση «φλεγμονωδών» υποδοχέων χημειοκινών όπως CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2 και CCR6 και υποδοχέων για κλασσικούς χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως C5a και φορμυλ-πεπτίδια που εκκρίνονται στους ιστούς με φλεγμονή. Ωστόσο τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα κατά την επαφή με τοπικούς φλεγμονώδεις παράγοντες όπως TNFa, IL-1, LPS και την επεξεργασία των υπεύθυνων αντιγόνων μετατρέπονται σε κύτταρα ικανά να ενεργοποιήσουν Τ-λεμφοκύτταρα. Έτσι μειώνουν την έκφραση των «φλεγμονωδών» υποδοχέων, που τους προσανατόλισαν στους περιφερικούς ιστούς, και αυξάνουν την έκφραση «λεμφικών» υποδοχέων όπως ο CCR7. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες, όπου εκκρίνονται οι αντίστοιχες χημειοκίνες, και την αλληλεπίδραση με Τ-λεμφοκύτταρα των λεμφαδένων για την εκκίνηση ανάλογων ανοσολογικών απαντήσεων για τα αντιγόνα που επεξεργάστηκαν τα μονοκύτταρα στην περιφέρεια[36,37].

Κατά τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων από το αίμα στους τόπους φλεγμονής χρειάζεται να αναγνωρίσουν τη φλεγμονώδη εστία και να διέλθουν του τοιχώματος των αγγείων για να φτάσουν στον προορισμό τους. Αυτό επιτυγχάνεται

μέσω ειδικών μορίων προσκόλλησης που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αγγεία που αρδεύουν τη φλεγμονώδη περιοχή. Τα μόρια αυτά ονομάζονται σελεκτίνες και ιντεγκρίνες. Οι χημειοκίνες ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες προκειμένου να αλλάξουν τη στερεοδιάταξή τους και να προσδέσουν σταθερά τα λευκοκύτταρα. Με τον τρόπο αυτό η έκφραση συγκεκριμένης χημειοκίνης σε κάποιον ιστό μπορεί να προσελκύσει με χημειοταξία τα λευκοκύτταρα με τον αντίστοιχο υποδοχέα χημειοκινών και να επιτρέψει την προσκόλληση και διαπίδυσή τους εκατέρωθεν του τοιχώματος του αγγείου στον τόπο παραγωγής της χημειοκίνης[38-41].

Β3. Χημειοκίνες και νοσήματα

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ:

Πρόκειται για μια επίκτητη, χρόνια απομυελινωτική νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος με εξάρσεις και υφέσεις. Στην εξέλιξη της βλάβης φαίνεται να εμπλέκεται τόσο η κυτταρική όσο και η χυμική ανοσία. Η αιτία είναι άγνωστη, ωστόσο η επικρατέστερη άποψη είναι ότι ένας εξωγενής παράγοντας προκαλεί σε γενετικά και ανοσολογικά προδιατεθειμένα άτομα μια παθολογική ανοσολογική αντίδραση ενάντια σε αυτοαντιγόνα της μυελίνης. Ιστολογικά σε μια ενεργό βλάβη (απομυελινωτική πλάκα) εμφανίζεται περιαγγειακή διήθηση από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Όπως σε κάθε φλεγμονώδη διεργασία με προσέλκυση και άθροιση κυττάρων του ανοσοποιητικού στο σημείο της βλάβης, έτσι και στη πολλαπλή σκλήρυνση οι χημειοκίνες μετέχουν στη παθογένεια της νόσου. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με υποτροπές της πολλαπλής σκλήρυνσης έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα MIP-1a (CCL3), IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9), RANTES (CCL5) [42]. Επιπλέον οι χημειοκίνες MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9) έχουν βρεθεί σε αυξημένη συγκέντρωση στο κέντρο ενεργών βλαβών και στο τοίχωμα αγγείων με διήθηση από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα[43,44]. Οι αντίστοιχοι συγγενείς υποδοχείς χημειοκινών CCR2, CCR5, CXCR3 εκφράζονται σε μακροφάγα, ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα και Τ-λεμφοκύτταρα. Μάλιστα ο CXCR3 έχει βρεθεί να εκφράζεται από όλα τα περιαγγειακά Τ-λεμφοκύτταρα και αστροκύτταρα σε θέσεις ενεργών βλαβών[43,45]. Η

IFN-β, που χορηγείται θεραπευτικά στη πολλαπλή σκλήρυνση, οδηγεί σε πτώση των επιπέδων RANTES (CCL5) στο περιφερικό αίμα[46]. Έτσι φαίνεται ότι οι προαναφερόμενες χημειοκίνες προκαλούν συγκέντρωση συγκεκριμένων ομάδων λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στον τόπο της ιστικής βλάβης και πιθανότατα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου.

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΟΡΓΑΝΩΝ:

Έχουν αναπτυχθεί πειραματικά μοντέλα για τη διερεύνηση του ρόλου των χημειοκινών στις μεταμοσχεύσεις. Οι χημειοκίνες εκτιμάται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο μόσχευμα α) άμεσα μετά την επαναιμάτωση, β) κατά την εξέλιξη της οξείας και χρόνιας απόρριψης και γ) στις λοιμώξεις υπό ανοσοκατασταλτική αντιαπορριπτική αγωγή. Στα πειραματόζωα έχει βρεθεί διαφορετική έκφραση χημειοκινών στην κάθε διεργασία. Ενδεικτικά στη φάση της επαναιμάτωσης έχει παρατηρηθεί αύξηση του MIP-2 σε παρόμοιο βαθμό τόσο στα αλλογενή όσο στα συγγενή μοσχεύματα, εξαιτίας της φλεγμονής του μοσχεύματος μετά από την προεγχειρητική ισχαιμία. Ωστόσο στα αλλογενή μοσχεύματα, μερικές μέρες μετά την μεταμόσχευση αυξάνει η έκφραση αφενός IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9), I-TAC (CXCL11), αφετέρου RANTES (CCL5), MIP-1β (CCL4), που είναι όλες συγγενείς χημειοκίνες για τους υποδοχείς CXCR3 και CCR5 αντίστοιχα. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται σε CD4, CD8 Τ-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) που διακινούνται μεταξύ του μοσχεύματος και επιχωρίων λεμφαδένων και καθορίζουν την πορεία της απόρριψης. Ανάλυση γενετικά τροποποιημένων πειραματόζωων με γονιδιακή απαλοιφή των συγκεκριμένων χημειοκινών και των υποδοχέων τους έχουν δείξει μεγαλύτερη επιβίωση μοσχεύματος χωρίς κυκλοσπορίνη και μόνιμη επιβίωση με μικρές δόσεις κυκλοσπορίνης σε πειραματόζωα που δεν εκφράζουν τους υποδοχείς CCR2, CCR5, CCR1 και τη χημειοκίνη IP-10 (CXCL10). Η μεγαλύτερη επιβίωση μοσχεύματος παρατηρήθηκε σε ποντικούς με απαλοιφή του CXCR3[47-54].

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ:

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια συστηματική φλεγμονώδης νόσος που προσβάλλει κυρίως τις αρθρώσεις οδηγώντας σε παραμόρφωσή τους από

καταστροφή των αρθρικών χόνδρων. Στην αρθρική κοιλότητα είναι έντονη η παρουσία Τ-λεμφοκυττάρων και σε λιγότερο βαθμό Β-λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων. Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από Th1 (T-helper 1) δραστηριότητα (αυξημένη έκφραση IL-2, IL-12, IFNγ και TNF-a). Κλινικά σημαντικό ρόλο παίζει ο TNF-a, αφού η θεραπεία με anti-TNF και ανταγωνιστές του υποδοχέα του TNF-a επιβραδύνουν την εξέλιξη της αρθρίτιδας. Το αρθρικό υγρό πασχόντων αρθρώσεων περιέχει χημειοκίνες όπως MCP-1 (CCL2), MIP-1a (CCL3), IL-8 (CXCL8), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10) που παράγονται τόσο από τον αρθρικό θύλακο όσο και από συρρέοντα λευκοκύτταρα. Επιπλέον λευκοκύτταρα του αρθρικού υγρού έχουν αυξημένη έκφραση υποδοχέων όπως οι CCR2, CCR5, CXCR2 και CXCR3[55-57]. Μάλιστα η μειωμένη έκφραση CCR5 σε άτομα με τη μετάλλαξη CCR5Δ32 έχει συσχετισθεί με ηπιότερη εκδήλωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και συχνότερη απουσία του ρευματοειδούς παράγοντα[58]. Αν και δεν είναι εξακριβωμένος ο ρόλος των χημειοκινών στην πάθηση αυτή, υπάρχει η ελπίδα ότι η κατανόησή τους θα προσφέρει καλύτερες θεραπευτικές επιλογές για τον περιορισμό της φλεγμονώδους αντίδρασης.

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ:

Υπάρχουν ενδείξεις για ποικίλες επιδράσεις των χημειοκινών στα νεοπλάσματα. Αφενός έχει παρατηρηθεί αγγειογενετική δράση των χημειοκινών σε ορισμένα νεοπλάσματα, όπως του μαστού και των μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα, αφετέρου συμμετέχουν στη κυτταροτοξική απάντηση του οργανισμού έναντι του καρκίνου[59-61]. Πιθανή συμμετοχή έχουν και στους μεταστατικούς μηχανισμούς, αφού σε ορισμένες μορφές νεοπλασιών παράγονται στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων υποδοχείς χημειοκινών, που πιθανά κατευθύνουν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στους ιστούς προέλευσης των αντίστοιχων χημειοκινών[62,63]. Χαρακτηριστικά σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού εκφράζεται ο υποδοχέας CXCR4, που δεν προϋπάρχει στα φυσιολογικά κύτταρα. Ο συνδέτης του CXCR4 είναι ο CXCL12 και προκαλεί πολυμερισμό της F-ακτίνης, δημιουργία ψευδοποδίων και χημειοτακτική κίνηση των καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Μάλιστα η χορήγηση ανταγωνιστών του CXCR4 σε πειραματόζωα στα οποία έχουν ενεθεί καρκινικά κύτταρα μαστού μειώνει σημαντικά την εμφάνιση μεταστάσεων[64]. Ωστόσο τα περισσότερα δεδομένα που αναφέρθηκαν προέρχονται

από πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα και δεν είναι προς το παρόν επαρκή για να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των χημειοκινών στις νεοπλασματικές νόσους στον άνθρωπο.

ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ:

Σημαντικά στοιχεία προκύπτουν από πειραματικά μοντέλα σχετικά με το ρόλο των χημειοκινών στην αθηροσκλήρυνση και ιδιαίτερα της χημειοκίνης MCP-1 και του υποδοχέα CCR2. Φαίνεται πως παράγονται χημειοκίνες από ενδοθηλιακά και λεία μυικά κύτταρα σε θέσεις του αρτηριακού τοιχώματος που υφίστανται βλάβη λόγω εναπόθεσης χοληστερόλης ή αυξημένης αρτηριακής πίεσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στο εγγύς ενδοθήλιο και την προσέλκυση μονοκυττάρων και άλλων ανοσολογικών κυττάρων. Τα μονοκύτταρα εισέρχονται στο τοίχωμα του αγγείου, όπου φαγοκυτταρώνουν την οξειδωμένη LDL χοληστερόλη και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα συμμετέχοντας στη φλεγμονώδη διεργασία που καταλήγει στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας[65]. Σε πειραματικά μοντέλα υπερχοληστεριναιμίας ποντικών με γενετική απαλοιφή του MCP-1 αλλά με υπερέκφραση της apoB λιποπρωτεΐνης ή με απουσία του LDL υποδοχέα, φάνηκε μειωμένη εναπόθεση χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα κατά 65-85% σε ποντικούς MCP-1$^{-/-}$ συγκριτικά με ποντικούς MCP-1$^{+/+}$ [66,67]. Σε ένα ανάλογο πείραμα με ποντικούς με ανεπάρκεια της apoE λιποπρωτεΐνης και απουσία του CCR2 υποδοχέα βρέθηκε μειωμένη εναπόθεση χοληστερόλης στο τοίχωμα ποντικών με CCR2$^{-/-}$ συγκριτικά με CCR2$^{+/+}$ ποντικούς[68]. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η ηπιότερη εκδήλωση της αθηρωματικής νόσου συσχετίζεται με μικρότερη παρουσία μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα, αναδεικνύοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης των τοπικά παραγόμενων χημειοκινών με τα ανοσολογικά κύτταρα που φέρουν τους συγγενείς υποδοχείς για τη δημιουργία της αθηρωματογόνου φλεγμονής.

Β4. Οι χημειοκίνες στη λοίμωξη από HIV-1

Το σύστημα των χημειοκινών παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια και πορεία της λοίμωξης από HIV-1. Η διασπορά του ιού ιδιαίτερα στο λεμφοκυτταρικό

πληθυσμό και τα μακροφάγα κατευθύνεται από τους υποδοχείς χημειοκινών. Κατά την πρόοδο της λοίμωξης εμφανίζονται στελέχη του HIV-1 με διαφορετική εκλεκτικότητα πρόσδεσης σε υποδοχείς χημοκινών. Αδρά, τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται R5 όταν έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα CCR5 και X4 όταν έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στον CXCR4. Η μεταβολή αυτή στην εκλεκτικότητα μπορεί να προκύψει με την αλλαγή ενός μόνο αμινοξέως στη V3 αγκύλη της μεμβρανικής πρωτεΐνης gp120 του ιού[69]. Η σημασία αυτού του φαινομένου είναι μεγάλη στη παθοφυσιολογία της νόσου. Ο υποδοχέας CCR5 εκφράζεται σε μακροφάγα στους βλεννογόνους και ενοχοποιείται για την αρχική μόλυνση από τον ιό μέσω σεξουαλικής επαφής. Παράλληλα τα στελέχη του ιού R5 αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό του ιού στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, όταν ακόμα ο φορέας είναι ασυμπτωματικός ή μερικώς μόνο ανοσοκατασταλμένος, επιτρέποντας την ευκολότερη μετάδοση του ιού σε άλλους ξενιστές. Αντίθετα τα στελέχη X4 κυριαρχούν στα τελικά στάδια της λοίμωξης. Η εμφάνισή τους συνοδεύεται από ταχεία πτώση των CD4 T-λεμφοκυττάρων, αφού ο μεγαλύτερος πληθυσμός των T-λεμφοκυττάρων στο αίμα και τους λεμφαδένες εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR4[70,71].

Μάλιστα φαίνεται να υπάρχουν μηχανισμοί μέσω των υποδοχέων χημειοκινών που περιορίζουν την πρώιμη ανάπτυξη και διάδοση των στελεχών X4. Εκτιμάται πως η πρωτεΐνη tat του ιού, που εκκρίνεται από μολυσμένα κύτταρα, μιμείται ιδιότητες χημειοκινών. Λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας των ουδετερόφιλων, βασεόφιλων και μαστοκυττάρων μέσω του υποδοχέα χημειοκινών CCR3 και των μονοκυττάρων μέσω του CCR2. Επίσης εμφανίζει συγγένεια για τον υποδοχέα CXCR4, εμποδίζοντας την σύνδεσή του με άλλους συνδέτες. Συμβατό με αυτό είναι και το γεγονός ότι ο tat ευνοεί την ανάπτυξη R5 στελεχών από X4 πληθυσμούς *in vitro*. Πιθανά ο tat να περιορίζει την ανάπτυξη των X4 στελεχών *in vivo* μέσω ανταγωνισμού με τον υποδοχέα CXCR4 των T-λεμφοκυττάρων, ενώ αφήνει συγχρόνως ελεύθερους τους υποδοχείς CCR5 ευνοώντας την επικράτηση R5 στελεχών. Με τον τρόπο αυτό ο HIV-1 φαίνεται να εκμεταλλεύεται τους υποδοχείς χημειοκινών ώστε α) να διασφαλίσει μακροχρόνια φορεία και μετάδοση της λοίμωξης σε άλλους ανθρώπους μέσω των στελεχών R5 και β) να αυτοπεριορίσει την εμφάνιση των X4 στελεχών που θα οδηγούσαν σε ταχεία καταστροφή των T-λεμφοκυττάρων, στην πρώιμη ανάπτυξη του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας και το θάνατο του ξενιστή[72-75]

Β5. Επίδραση γενετικών πολυμορφισμών των χημειοκινών στη λοίμωξη από HIV-1

Τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των επιδράσεων των χημειοκινών. Το σύστημα των χημειοκινών αποτελεί ένα πεδίο εντατικής έρευνας στο οποίο προστίθενται διαρκώς στοιχεία για τη συμβολή τους στην παθογένεια των νοσημάτων. Λόγω της πολυπλοκότητας των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, συνήθως είναι δύσκολο να καθοριστεί αν μια συγκεκριμένη χημειοκίνη δρα ωφέλιμα συνεισφέροντας στην ίαση ή συντελεί στην παθογένεια και επιδείνωση της νόσου. Στην περίπτωση της HIV-1 λοίμωξης, σε αυτή την προσπάθεια διάκρισης των ρόλων βοήθησε σημαντικά η ανεύρεση πολυμορφισμών που επηρεάζουν την κλινική πορεία ασθενών. Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση μεγάλων πληθυσμών ασθενών για πολλούς πολυμορφισμούς και ακολούθησε στατιστική συσχέτιση των γενετικών αλληλομόρφων με δείκτες επιβίωσης. Από τις στατιστικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν οι χημειοκίνες με τη μεγαλύτερη επιρροή στην κλινική πορεία της λοίμωξης. Έτσι η βασική έρευνα μπόρεσε να εστιάσει στις «πρωταγωνιστικές» χημειοκίνες προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος τους στην παθογένεια της λοίμωξης και να βρεθούν αποτελεσματικότεροι φαρμακευτικοί στόχοι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη αναστολέων πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα CCR5, όπως ο Enfuvirtide, που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την HAART στη θεραπεία της λοίμωξης.

Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των γενετικών πολυμορφισμών των χημειοκινών που αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής:

1. CCR5Δ32:

Ο πιο χαρακτηριστικός πολυμορφισμός που διευκόλυνε την κατανόηση του ρόλου των χημειοκινών είναι ο CCR5Δ32. Στη μετάλλαξη αυτή ο υποδοχέας χημειοκινών CCR5 δεν εκφράζεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, εξαιτίας της απαλοιφής 32 βάσεων από το γονίδιό του. Ο CCR5 παίζει καθοριστικό ρόλο στην προσκόλληση και είσοδο του HIV-1 στο κύτταρο στόχο (ιδιαίτερα τα μακροφάγα) κατά την μόλυνση του ασθενούς από τη σεξουαλική επαφή και τα

αρχικά στάδια της λοίμωξης, που τα στελέχη του ιού εμφανίζουν εκλεκτική πρόσδεση στον CCR5 (R5 στελέχη). Το αλληλόμορφο γονίδιο CCR5Δ32 συνεπώς προσδίδει ανοσία στη μόλυνση μέσω σεξουαλικής επαφής σε ομοζυγώτες και βραδεία εξέλιξη της νόσου σε μολυσμένους ετεροζυγώτες. Η συχνότητά του έχει αναφερθεί 0,09% σε ασθενείς με λοίμωξη από HIV-1 Ευρωπαϊκής καταγωγής [76-81].

2. CXCL12-3A:

Η χημειοκίνη CXCL12 (γνωστή και ως SDF1) είναι συνδέτης του υποδοχέα CXCR4. Ο CXCR4 χρησιμοποιείται από τον HIV-1 για πρόσδεση και μόλυνση των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα στα όψιμα στάδια της λοίμωξης όταν εμφανίζονται τα Χ4 στελέχη του ιού, που εμφανίζουν εκλεκτικότητα για τον υποδοχέα αυτό. Ο συνδέτης CXCL12 επάγει την ενδοκυττάρωση του CXCR4 και ανταγωνίζεται την πρόσδεση του HIV-1 προστατεύοντας τα κύτταρα από μόλυνση με τον ιό. Μια μετάλλαξη στην 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου του CXCL12 (αλλαγή από γουανίνη σε αδενίνη στη θέση 801 του UTR) ονομάστηκε CXCL12-3A και βρέθηκε να σχετίζεται με επιβράδυνση της επέλευσης του AIDS σε πληθυσμούς ασθενών χωρίς θεραπεία, ιδίως σε άτομα με μακροχρόνια λοίμωξη. Αυτό πιθανά να επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της έκφρασης του CXCL12 και ισχυρότερη αναστολή της πρόσδεσης του ιού στους υποδοχείς CXCR4. Η συχνότητα του αλληλομόρφου έχει βρεθεί να είναι 21% στους Καυκάσιους, 16% στους Λατίνους και 5,7% στους Αφροαμερικανούς[82].

3. CCR2-64I:

Ο υποδοχέας CCR2 δεν εμπλέκεται στην κυτταρική είσοδο του ιού και δεν εμφανίζει συγγένεια με ιικά σωματίδια. Το υπεύθυνο γονίδιο παράγει δύο ισομορφές του υποδοχέα από εναλλακτικό μάτισμα, τον CCR2A, που παραμένει στο κυτταρόπλασμα, και τον CCR2B, που μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη. Μια μετάλλαξη στο 64^{ο} αμινοξύ της 1^{ης} διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα (CCR2-64I) έχει συσχετιστεί με βραδύτερη πρόοδο σε AIDS κατά 2-4 χρόνια συγκριτικά με το μη μεταλλαγμένο υποδοχέα CCR2 σε ασθενείς χωρίς θεραπεία. Η μετάλλαξη αυτή παρατηρείται στο πρωτεϊνικό μόριο και των δύο ισομορφών CCR2A και CCR2B. Φαίνεται πως ο κυτταροπλασματικός CCR2-64I σχηματίζει σύμπλοκα με πρόδρομα μόρια του CCR5 εμποδίζοντας την ολοκληρωμένη επεξεργασία του και μεταφορά

στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη διαθεσιμότητα του CCR5 για πρόσδεση ιικών σωματιδίων στην αρχή της λοίμωξης. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η προστατευτική επίδραση του CCR2-64I στην πρόοδο της λοίμωξης χάνεται όταν αναπτύσσονται X4 στελέχη του ιού, που δεν χρησιμοποιούν τον CCR5 για μόλυνση των κυττάρων, αλλά τον CXCR4. Η συχνότητα του CCR2-64I έχει βρεθεί 10-15% στους Καυκάσιους και Αφροαμερικανούς και βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με το αλληλόμορφο CCR5Δ32[81,83,84].

4. 59029G/A:

Πρόκειται για ένα πολυμορφισμό του εκκινητή του γονιδίου του CCR5 που διαφέρει μόνο στη βάση 59029. Το αλληλόμορφο 59029G περιέχει γουανίνη στη θέση 59029 ενώ το αλληλόμορφο 59029A περιέχει αδενίνη. Το 59029G ανευρίσκεται σε μια συχνότητα 43-68%, αναλόγως τον πληθυσμό. Το 59029A αλληλόμορφο εμφανίζει 50% μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου CCR5 *in vitro* και συσχετίζεται με ταχύτερη επιδείνωση της λοίμωξης από HIV-1 συγκριτικά με το 59029G σε ασθενείς χωρίς θεραπεία. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τους πολυμορφισμούς CCR5Δ32 και CCR264I[85].

5. CXCR6-3E/K:

Ο υποδοχέας CXCR6 θεωρείται επίσης συνυποδοχέας πρόσδεσης του HIV-1 και ιδίως των R5 και διπλά εκλεκτικών R5/X4 στελεχών του ιού. Ανευρίσκεται σε λεμφικούς ιστούς, στην κυτταρική μεμβράνη ενεργοποιημένων Th1, Tc1 και NK λεμφοκυττάρων, καθιστώντας τα πιθανούς στόχους μόλυνσης. Ο συνδέτης του είναι ο CXCL16, ο οποίος αφενός εκκρίνεται από μακροφάγα σε καταστάσεις φλεγμονής, αφετέρου εκφράζεται στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα στις T ζώνες των λεμφαδένων) και κυττάρων του ερυθρού πολφού του σπλήνα. Το σύμπλεγμα CXCR6-CXCL16 φαίνεται λοιπόν να παίζει ρόλο στην μετανάστευση ενεργοποιημένων Th1, Tc1 και NK λεμφοκυττάρων υπό καθεστώς φλεγμονής, στην επαγωγή κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και στην διακίνηση των T-λεμφοκυττάρων στον σπλήνα[28]. Ο πολυμορφισμός CXCR6-3E/K αφορά μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 3 του πρώτου εξωκυττάριου τμήματος του αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα. Το αλληλόμορφο CXCR6-3K έχει συσχετισθεί κλινικά με αυξημένη επιβίωση HIV-1

ασθενών σε πνευμονία από Pneumocystis carinii (PCP) συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμοροφο CXCR6-3E. Ο μηχανισμός είναι άγνωστος, ωστόσο εκτιμάται ότι επηρεάζει την ιστική ανοσολογική απάντηση στο μικροοργανισμό. Η συχνότητα του αλληλομόρφου έχει βρεθεί <1% σε Ευρωπαίους-Αμερικανούς και 44% σε Αφροαμερικανούς[86].

6. In1.1-T/C:

Πρόκειται για πολυμορφισμό με αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου στο 1^{ο} ιντρόνιο του γονιδίου της χημειοκίνης CCL5. Η CCL5 (γνωστή και ως RANTES) είναι συνδέτης του CCR5 και αναστέλλει την μόλυνση CCR5 κυττάρων από R5 στελέχη του ιού καθώς και την HIV-1 επαγόμενη ενεργοποίηση και κυτταρικό θάνατο των λεμφοκυττάρων[87-89]. Το αλληλόμορφο In1.1C μειώνει την μεταγραφή του γονιδίου της CCL5 εξαιτίας ισχυρότερης πρόσδεσης του ιντρονίου με πρωτεΐνες του πυρήνα (ιστόνες). Κλινικά αυτό έχει συσχετισθεί με επιτάχυνση της προόδου της λοίμωξης σε AIDS. Η συχνότητα με την οποία έχει ανευρεθεί είναι 14% σε Ευρωπαίους-Αμερικανούς, 20% σε Αφροαμερικανούς και 34% σε Ασιάτες[90].

7. Απλότυπος H7:

Οι χημειοκίνες MCP-1, MCP3 και eotaxin έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της λοίμωξης από HIV-1 λόγω των χημειοτακτικών τους ιδιοτήτων και των δράσεων κυτταρικής ενεργοποίησης. Ο MCP-1 έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον πολλαπλασιασμό του ιού μέσα στα περιφερικά μονοκύτταρα και έχει συσχετισθεί με βλάβες στο νευρικό σύστημα[91-94]. Επιπλέον ο MCP-3 είναι φυσικός ανταγωνιστής του CCR5 και έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του HIV-1[95,96]. Τα γονίδιά τους εντοπίζονται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17, σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Έτσι πολυμορφισμοί σε διαφορετικά γονίδια συγκληρονομούνται και γίνεται δυσδιάκριτη η επίδραση καθενός αλληλομόρφου ξεχωριστά σε επίπεδο κλινικών μελετών. Πράγματι, η επίδραση των πολυμορφισμών των παραπάνω χημειοκινών έχει μελετηθεί με τη μορφή απλοτύπων, δηλαδή συγκεκριμένων συνδυασμών αλληλομόρφων που κληρονομούνται μαζί. Ένας τέτοιος απλότυπος είναι ο H7 που περιλαμβάνει το μοναδικό συνδυασμό τριών αλληλομόρφων στα κωδικόνια 2136, 767 και 1385 (2136T στον εκκινητή του MCP-1, 767G στο γονίδιο του MCP-1, 1385A στον εκκινητή του eotaxin). Η συχνότητα του απλοτύπου H7 έχει βρεθεί

σημαντικά αυξημένη σε άτομα με πολλαπλή έκθεση στον HIV-1 (19,2%), που δεν έχουν κάνει ορομετατροπή και θεωρούνται ανθεκτικά στη μόλυνση. Επειδή το αλληλόμορφο promEotaxin1385A εμφανίζεται μόνο στον απλότυπο H7, αναζητήσαμε πειραματικά την παρουσία του promEotaxin1385A για να διαπιστώσουμε την ύπαρξη του απλότυπου H7, χωρίς να χρειαστεί να ανιχεύσουμε και τους τρεις πολυμορφισμούς μαζί[97].

8. CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M:

Το σύμπλεγμα CX_3CR1-CX_3CL1 έχει προκαλέσει αυξημένο ενδιαφέρον στην HIV-1 λοίμωξη. Η χημειοκίνη CX_3CL1 (γνωστή παλαιότερα ως fraktalkine) παράγεται και εκκρίνεται ως ελεύθερο μόριο ή παραμένει δεσμευμένη στην επιφάνεια κυττάρων που την εκφράζουν. Το ελεύθερο κλάσμα της CX_3CL1 δρα χημειοτακτικά για μονοκύτταρα και Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ το δεσμευμένο κλάσμα δημιουργεί ισχυρές κυτταρικές συνδέσεις με μονοκύτταρα ή λεμφοκύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα CX_3CR1. Οι συνδέσεις αυτές δεν επηρεάζονται από την τοξίνη της αλλαντίασης και δεν χρειάζονται σελεκτίνες ή ιντεγκρίνες. Σε υγιή άτομα η CX_3CL1 παράγεται από νευρικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και HEV (High Endothelial Venules) και λίγους μη λεμφικούς ιστούς. Επίσης σε υγιή άτομα ο CX_3CR1 εκφράζεται σε μονοκύταρα, μικρογλοιακά, NK λεμφοκύτταρα και υποπληθυσμούς Τ-λεμφοκυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι ο υποδοχέας CX_3CR1 εκφράζεται από σημαντικούς εκπροσώπους του ανοσοποιητικού συστήματος και τους καθιστά ευαίσθητους σε σήματα από το συνδέτη CX_3CL1. Συνεπώς, αν μεταβληθεί ο τόπος παραγωγής του CX_3CL1, μπορεί να αλλάξει η χωριοθέτηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που φέρουν τον υποδοχέα CX_3CR1. Παρομοίως ανοσολογικά κύτταρα που δεν εκφράζουν φυσιολογικά τον υποδοχέα CX_3CR1 μπορεί να αλλάξουν την εντόπιση και τη λειτουργία τους, αν αναγκαστούν να εκφράσουν τον υποδοχέα μετά από επαγωγή. Στην HIV-1 λοίμωξη παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στην έκφραση του CX_3CR1 και του CX_3CL1, συγκριτικά με υγιή άτομα. Είναι πιθανόν οι αλλαγές αυτές να επάγονται από τον ίδιο τον ιό με σκοπό την αποδιοργάνωση της ανοσολογικής απάντησης. Επιπλέον ο CX_3CR1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συνυποδοχέας για κυτταρική πρόσδεση και μόλυνση από τον ιό.

Ενδεικτικά, στη λοίμωξη από HIV-1 ορισμένοι πληθυσμοί CD4 λεμφοκυττάρων χωρίς αντιγονική εμπειρία και μνημονικών CD4 λεμφοκυττάρων

εκφράζουν τον υποδοχέα CX_3CR1, γεγονός που δεν συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες. Μάλιστα η έκφραση αυτή είναι ανάλογη του ρυθμού ιικού πολλαπλασιασμού. Παράλληλα παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του CX_3CL1 στο ενδοθήλιο λεμφικών και εξωλεμφικών ιστών. Πιθανολογείται ότι με αυτό τον τρόπο αναγκάζονται οι πληθυσμοί αυτών των λεμφοκυττάρων να κινηθούν χημειοτακτικά σε περιβάλλοντα όπου δεν ευνοείται η επιβίωσή τους, αφού σήματα επιβίωσης λαμβάνουν κυρίως στα λεμφικά όργανα.

Επιπλέον, στους ασθενείς με HIV-1 παρατηρείται μετακίνηση πλασματοκυττάρων και πλασματοειδών δενδροκυττάρων $CD123^+$ από το αίμα στη φλοιώδη μοίρα των λεμφαδένων και υπερέκφραση του CX_3CL1. Αύξηση της έκφρασης CX_3CL1 παρατηρείται και από ώριμα δενδριτικά κύτταρα ($CD83^+$) στις ίδιες θέσεις. Θεωρείται ότι αυτό συνεπάγεται την στενή αλληλεπίδραση naïve CX_3CR1^+ λεμφοκυττάρων με CX_3CL1^+ δενδροκύτταρα. Το αποτέλεσμα δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί. Σε πειραματόζωα η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των Th naïve λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την επαφή τους με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II, όπως στα δενδριτικά κύτταρα. Επίσης τα πλασματοειδή δενδροκύτταρα παράγουν αυξημένες ποσότητες IFNa, που έχει πολλές αντιικές ιδιότητες. Από την αντίθετη πλευρά έχει βρεθεί ότι τα δενδροκύτταρα διευκολύνουν την μόλυνση των CD4 T-λεμφοκυττάρων με ιικά σωματίδια που φέρουν προσκολλημένα στην επιφάνειά τους. Επιπρόσθετα έχει διαπιστωθεί ότι τα πλασματοειδή δενδροκύτταρα ευνοούν την ανάπτυξη Th2 αντί Th1 ανοσολογικών απαντήσεων και σε ορισμένα πειράματα ενεργοποιούν CD8 T-λεμφοκύτταρα με τρόπο που εμφανίζουν μικρή κυτταροτοξική ισχύ.

Συμπληρωματικά, μετά από την έναρξη αντιρετροϊκής θεραπείας έχει βρεθεί πως μειώνεται η έκφραση CX_3CR1 στα Th-λεμφοκύτταρα. Εκτιμάται πως αυτό ευθύνεται για την ταχεία επανεμφάνιση CD4 T-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα μετά την έναρξη της HAART αφού με την απομάκρυνση του CX_3CR1 από την κυτταρική τους μεμβράνη απελευθερώνονται από τους περιφερικούς ιστούς, όπου εκφράζεται ο CX_3CL1, και βγαίνουν στην αιματική κυκλοφορία.

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου των CX_3CL1-CX_3CR1 έχει μελετηθεί και η επίδραση των πολυμορφισμών CX_3CR1-V249I και CX_3CR1-T28OM στην κλινική πορεία της λοίμωξης από HIV-1. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι σημειακές μεταλλάξεις του υποδοχέα. Στην πρώτη μετάλλαξη η βαλίνη (V) έχει αντικατασταθεί από ισολευκίνη (I) στη θέση 249 και στη δεύτερη η θρεονίνη (T) από μεθειονίνη (M)

στη θέση 280. Έχει βρεθεί πως τα αλληλόμορφα 249I και 280M μειώνουν τη συγγένεια του υποδοχέα για τη χημειοκίνη CX_3CL1 και συσχετίζονται με ταχύτερη πρόοδο σε AIDS και θάνατο από HIV-1, ενώ άλλοι ερευνητές δεν βρίσκουν συσχέτιση ή διαπιστώνουν προστατευτική δράση των αλληλομόρφων αυτών. Οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης. Το αλληλόμορφο 249I μπορεί να εμφανιστεί με 280T ή 280M στο ίδιο χρωμόσωμα, το αλληλόμορφο 280M όμως ανευρίσκεται μόνο με 249I και όχι με 249V[98-105].

ΙΙ. Ειδικό Μέρος

Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διατριβής αυτής είναι η μελέτη της επίδρασης γονιδιακών πολυμορφισμών του συστήματος των χημειοκινών στην απόκριση των HIV-1 ασθενών στην θεραπεία με HAART. Οι πολυμορφισμοί που επιλέχθηκαν ήταν οι CCR5Δ32, 59029G/A, CCR2-64I, CXCL12-3A, In1.1-T/C, CXCR6-3E/K, απλότυπος H7, CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T28OM. Η επίδρασή τους στην κλινική πορεία της λοίμωξης έχει διερευνηθεί κυρίως σε πληθυσμούς ασθενών πριν την καθιέρωση της HAART, στους οποίους μελετήθηκαν συσχετίσεις των γονιδίων με βραδύτερη ή ταχύτερη εξέλιξη σε AIDS και θάνατο. Μετά την καθιέρωση της HAART δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την εξέλιξη της λοίμωξης σε ασθενείς υπό αγωγή, ενώ στην αντίστοιχη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες με αντικρουόμενα συμπεράσματα. Η HAART από μόνη της τροποποιεί τη φυσική πορεία της λοίμωξης δραματικά, επηρεάζοντας τόσο την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή όσο και την κινητική πολλαπλασιασμού του ιού. Το σπουδαιότερο είναι η αύξηση της επιβίωσης των ασθενών χάρη στη HAART και η μείωση των νοσηρών εκδηλώσεων από τη βαριά ανοσοκαταστολή. Ο ρόλος των πολυμορφισμών σε αυτές τις καινούργιες συνθήκες δεν είναι εύκολο να προσδιορισθεί με στατιστικές συσχετίσεις βασιζόμενες στην επιβίωση και στο χρόνο μέχρι την ανάπτυξη του AIDS, αφού αυτά τα τελικά σημεία (end-points) αργούν πολύ να προκύψουν. Για το λόγο αυτό στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιούνται οι μεταβολές στο ιικό φορτίο του ιού και ο αριθμός των CD4 T-λεμφοκυττάρων ως δείκτες απόκρισης στη HAART, σύμφωνα με τις καθιερωμένες κατευθυντήριες οδηγίες, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών στην απόκριση των ασθενών στη HAART[25].

Δ. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δ1. Δείγμα Ασθενών

Στο Νοσοκομείο Ανδρέας Συγγρός βρίσκεται μία από τις μεγαλύτερες θεραπευτικές μονάδες για ασθενείς του HIV της χώρας μας. Η παρούσα εργασία περιέλαβε 166 ασθενείς σε διάφορα στάδια της νόσου που παρακολουθήθηκαν μέχρι τον Οκτώβριο του 2005 με μέση διάρκεια παρακολούθησης (follow-up) τους 68.8 μήνες (εύρος 11-109 μήνες). Ανάμεσά τους οι 141 ήταν άνδρες και οι 25 γυναίκες. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 35,5 (19-71) χρόνια. Στο διάστημα της παρακολούθησης 149 ασθενείς έλαβαν θεραπεία με HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ενώ οι 17 δεν χρειάστηκαν να ξεκινήσουν HAART με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες (Πίνακας 2). Ανάμεσα στους ασθενείς υπό θεραπεία, 97 δεν είχαν λάβει άλλη θεραπεία προ της έναρξης της HAART. Αντίθετα 52 ασθενείς είχαν λάβει προ της HAART αντιρετροϊκά σχήματα με ένα ή δύο NRTI (nucleoside reverse transcriptase inhibitors) με μέση διάρκεια θεραπείας 25,96 μήνες (εύρος 1-68 μήνες). Οι ασθενείς αυτοί με προηγούμενη χρήση NRTI εντάχθηκαν σε σχήματα HAART που περιείχαν τουλάχιστον ένα επιπλέον καινούργιο NRTI σε συνδυασμό με PI (protein inhibitor) ή NNRTI (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor). Συνολικά 113 ασθενείς έλαβαν σχήμα 2NRTI+PI, 33 ασθενείς έλαβαν σχήμα 2NRTI+NNRTI και 3 έλαβαν 2NRTI+2PI. Για την αξιολόγηση της απόκρισης στην HAART χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες ο αριθμός των CD4 T-λεμφοκυττάρων (CD4) και το ιικό φορτίο (VL). Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σύμφωνα με οδηγίες του κέντρου ελέγχου λοιμώξεων των ΗΠΑ (CDC) σε τρεις κατηγορίες με βάση τα CD4 πριν την έναρξη της HAART (baseline CD4):

Κατηγορία 1: ασθενείς με CD4≥500cells/mm^3

Κατηγορία 2: ασθενείς με CD4=200-499cells/mm^3

Κατηγορία 3: ασθενείς με CD4<200cells/mm^3 (κριτήριο AIDS)

Η μέση τιμή του ιικού φορτίου ήταν 157.313cps/ml. Στην κατηγορία 1, 2 και 3 των ασθενών οι μέσες τιμές του ιικού φορτίου ήταν αντίστοιχα 221.037cps/ml, 77.426cps/ml και 342.243 cps/ml. Στο χρονικό διάστημα της μελέτης απεβίωσαν 6 ασθενείς, από τους οποίους οι 5 από νοσήματα AIDS (4 με λέμφωμα, 1 με λοίμωξη

από Mycobacterium avium). Για τους πολυμορφισμούς CCR5Δ32, CXCRL12-3A, CCR5-59029G/A, CCR2-64I έγινε γονοτυπική ανάλυση σε 149 ασθενείς υπό HAART, ενώ για τους πολυμορφισμούς CXCR6-E3K, promCCL5-In1.1, απλότυπος H7, CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M έγινε γονοτυπική ανάλυση σε 143 ασθενείς υπό HAART (είχαν ήδη αποβιώσει οι 6 ασθενείς).

Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στους στη μελέτη.

Δ2. Μέτρηση των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων και του ιικού φορτίου HIV-1 (VL)

Ο αριθμός των CD4 Τ-λεμφοκυττάρων και το VL του HIV-1 μετρήθηκαν σε περιφερικό αίμα ασθενών που συλλέχθηκε σε σωληνάρια με αντιπηκτικό αιθυλενο-διαμινο-τετραοξεικό οξύ (EDTA). Για τη μέτρηση των CD4 χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με μονοκλωνικά αντισώματα (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Για τον προσδιορισμό του VL χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές πολλαπλασιασμού του ιικού RNA (Nuclisens-NASBA Diagnostics) σε ορό από φυγοκεντρημένο δείγμα αίματος.

Δ3. Απομόνωση DNA ασθενών, χρήση PCR για ανίχνευση γονιδιακών πολυμορφισμών του συστήματος χημειοκινών

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΣΘΕΝΩΝ:

Από κάθε ασθενή λαμβάνονται περίπου 5ml περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4^oC μέχρι τη μεταφορά στο εργαστήριο. Αρχικά για την απομόνωση του DNA χρειάζεται να προκληθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αναμειγνύοντας το δείγμα του αίματος με διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris HCl pH 8.0, 320 mM σουκρόζη, 5 mM $MgCl_2$ και 1% Triton-X-100. Μετά από φυγοκέντρηση του μείγματος στις 2500rpm για 10min απορρίπτεται το υπερκείμενο και συλλέγεται το κυτταρικό ίζημα που περιέχει τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος. Για να λυθούν τα λευκά αιμοσφαίρια, το κυτταρικό ίζημα διαλύεται σε 500μl διαλύματος που περιέχει 400mM Tris pH 8.0, 60mM EDTA, 150mM NaCl και 1% SDS και επωάζεται στους 37^oC για 30min. Ακολουθεί προσθήκη 1/20 όγκου 5μM NaOCl, ανάδευση και επώαση στους 65^oC για 25min. Στη συνέχεια προστίθενται 500μl χλωροφορμίου, αναδεύεται το μείγμα και φυγοκεντρείται στις 13000rpm. Αυτή τη φορά λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο αναμειγνύεται με αιθανόλη (100%). Το δείγμα πλέον περιέχει το απομονωμένο DNA και φυλάσσεται στους -20^oC για ένα 24ωρο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, απόρριψη του υπερκείμενου και διαλυτοποίηση της λεπτής πλέον πελέτας του DNA σε αιθανόλη (70%). Στη συνέχεια φυγοκεντρείται ξανά, απορρίπτεται το υπερκείμενο και διαλύεται το DNA σε αποσταγμένο H_2O. Η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε και η καθαρότητά του μπορεί να εκτιμηθεί με φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280nm.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (PCR):

Η PCR (polymerase chain reaction) επινοήθηκε το 1987 από τον Mullis και τους συνεργάτες του (Mullis & Faloona 1987). Η μέθοδος επιτυγχάνει σε 2-3 ώρες τον ειδικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Η μεγάλη απόδοση της αντίδρασης

έχει ως αποτέλεσμα την λήψη μεγάλου αριθμού αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας DNA, έστω και αν αυτή αρχικά βρίσκεται στο δείγμα σε ελάχιστη ποσότητα. Το δείγμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει α) μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση προερχόμενη από θερμόφιλα βακτηρίδια (Taq: Thermus aquaticus), β) μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, γ) το ζευγάρι των εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί, οπότε προσδένονται σε αυτές καθορίζοντας τη θέση δράσης της πολυμεράσης. Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C για 1min, ώστε να διαχωριστεί η διπλή έλικα. Αυτό θα επιτρέψει τον υβριδισμό των ελίκων με ομόλογα δεσοξυριβονουκλεοτίδια του διαλύματος και τη δημιουργία των θυγατρικών αλύσων υπό τη δράση της DNA πολυμεράσης. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία βήματα, την αποδιάταξη του DNA, την πρόσδεση των εκκινητών και τον πολυμερισμό του DNA. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N=n(1+e)^{c}$, όπου N= τελική ποσότητα του προϊόντος, n= αρχική ποσότητα υποστρώματος, e= απόδοση της αντίδρασης και c= αριθμός των κύκλων της PCR[106].

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ PCR:

Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της PCR πρέπει να δίνεται προσοχή σε ορισμένες παραμέτρους της αντίδρασης. Μεγάλη σημασία έχει η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών. Αυτοί καθορίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης και περιορίζουν τη δράση της πολυμεράσης στην επιθυμητή αλληλουχία. Για το λόγο αυτό οι εκκινητές περιέχουν συνήθως 20 νουκλεοτίδια, ώστε να είναι πολύ μικρή η πιθανότητα να εμφανίσουν σημαντική ομολογία με μη επιθυμητές αλληλουχίες του DNA, που θα κατέληγε στη δημιουργία πολλών παραπροϊόντων. Ωστόσο προσοχή χρειάζεται και στην επιλογή της θερμοκρασίας των διαφόρων βημάτων της PCR, ιδιαίτερα της θερμοκρασίας υβριδισμού. Υψηλές θερμοκρασίες συνεπάγονται μικρότερη παραγωγή DNA προϊόντος αλλά και λιγότερα παραπροϊόντα, γιατί οι εκκινητές προσδένονται μεν σε λιγότερες θέσεις του DNA, αλλά προτιμούν θέσεις πρόσδεσης με ισχυρή συγγένεια, όπως η επιθυμητή αλληλουχία για την οποία επελέγησαν. Αντίθετα χαμηλότερες θερμοκρασίες συνεπάγονται την πρόσδεση

περισσότερων εκκινητών στο DNA υπόστρωμα, αυξάνοντας την απόδοση της αντίδρασης, αλλά η πρόσδεση αυτή αφορά και ανεπιθύμητες αλληλουχίες του μητρικών ελίκων, οδηγώντας σε περισσότερα παραπροϊόντα. Κατά παρόμοιο τρόπο επηρεάζεται η αντίδραση από τη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (Mg) στο διάλυμα. Υψηλές συγκεντρώσεις Mg συνεπάγονται υψηλή δραστικότητα της πολυμεράσης, αλλά περισσότερα παραπροϊόντα, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις συνεπάγονται καθαρότερο PCR προϊόν, σε μικρότερη όμως ποσότητα.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR:

Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της PCR έγινε αρχικά σειρά πειραμάτων για την εύρεση της ιδανικής θερμοκρασίας και συγκέντρωσης ιόντων Mg για τις αντιδράσεις. Έτσι, στην παρούσα διατριβή, μετά από τροποποιήσεις των πειραματικών συνθηκών, επελέγησαν οι ακόλουθες συνθήκες ως βέλτιστες:

1) Συγκεντρώσεις συστατικών του PCR διαλύματος: 1,5mM $MgCl_2$, 0,2mM από κάθε dNTP (δεσοξυριβονουκλεοτίδια: αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη), 0,5mM από κάθε εκκινητή και 1,2 μονάδες Taq DNA πολυμεράση / αντίδραση (Invitrogen).

2) Θερμοκρασίες και χρόνοι επώασης: βλ Πίνακα 4.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 5. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε προγραμματιζόμενος θερμικός κυκλοποιητής PTC-200 (MJ Research Inc. USA).

	Αρχική αποδιάταξη DNA	Αποδιάταξη DNA	Υβριδισμός	Πολυμερισμός	Τελικός Πολυμερισμός
		35 κύκλοι			
CCR5-Δ32	94°C, 3min	92°C, 30sec	55°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CXCL12-3A	94°C, 3min	92°C, 30sec	58°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CCR2-64I	94°C, 3min	92°C, 30sec	52°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CCR5-59029G/A	94°C, 3min	92°C, 30sec	60°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CXCR6-E3K	94°C, 3min	92°C, 30sec	51°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CCL5-In1.1T/C	94°C, 3min	92°C, 30sec	54°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
promEotaxin-1385A (H7)	94°C, 3min	92°C, 30sec	51°C, 30sec	72°C, 30sec	72°C, 10min
CX3CR1-V249I/T280M	94°C, 3min	94°C, 30sec	50°C, 40sec	72°C, 55sec	72°C, 10min

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR για τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν.

CCR5-Δ32 F	5'-GTGGTGACAAGTGTGATCAC-3'
CCR5-Δ32 R	5'-TTGTAGGGAGCCCAGAAGAG-3'
CXCL12-3A F	5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3'
CXCL12-3A R	5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3'
CCR2-64I F	5'-TTGTGGGCAACATGATGG-3'
CCR2-64I R	5'-CTGTGAATAATTTGCACATTGC-3'
CCR5-59029G/A F	5'-CCCGTGAGCCCATAGTTAAAACTC-3'
CCR5-59029G/A R	5'-TCACAGGGCTTTTCAACAGTAAGG-3'
CXCR6-E3KF	5'-CTATTTGCCCCCTAAATGT-3'
CXCR6-E3KR	5'-CATAGTCTTCATGGTAATCAAGC-3'
CCL5-In1.1T/C F	5'-CCTGGTCTTGACCACCACA-3'
CCL5-In1.1T/C R	5'-GCTGACAGGCATGAGTCAGA-3'
promEotaxin-1385F (H7)	5'-TATCCTGCTCTTACCCTAGC-3'
promEotaxin-1385R (H7)	5'-GGCACAGGATTAGAGACAGC-3'
CX3CR1-V249I/T280M F	5'-CCGAGGTCCTTCAGGAAATCT-3'
CX3CR1-V249I/T280M R	5'-TCAGCATCAGGTTCAGGAACTC-3'

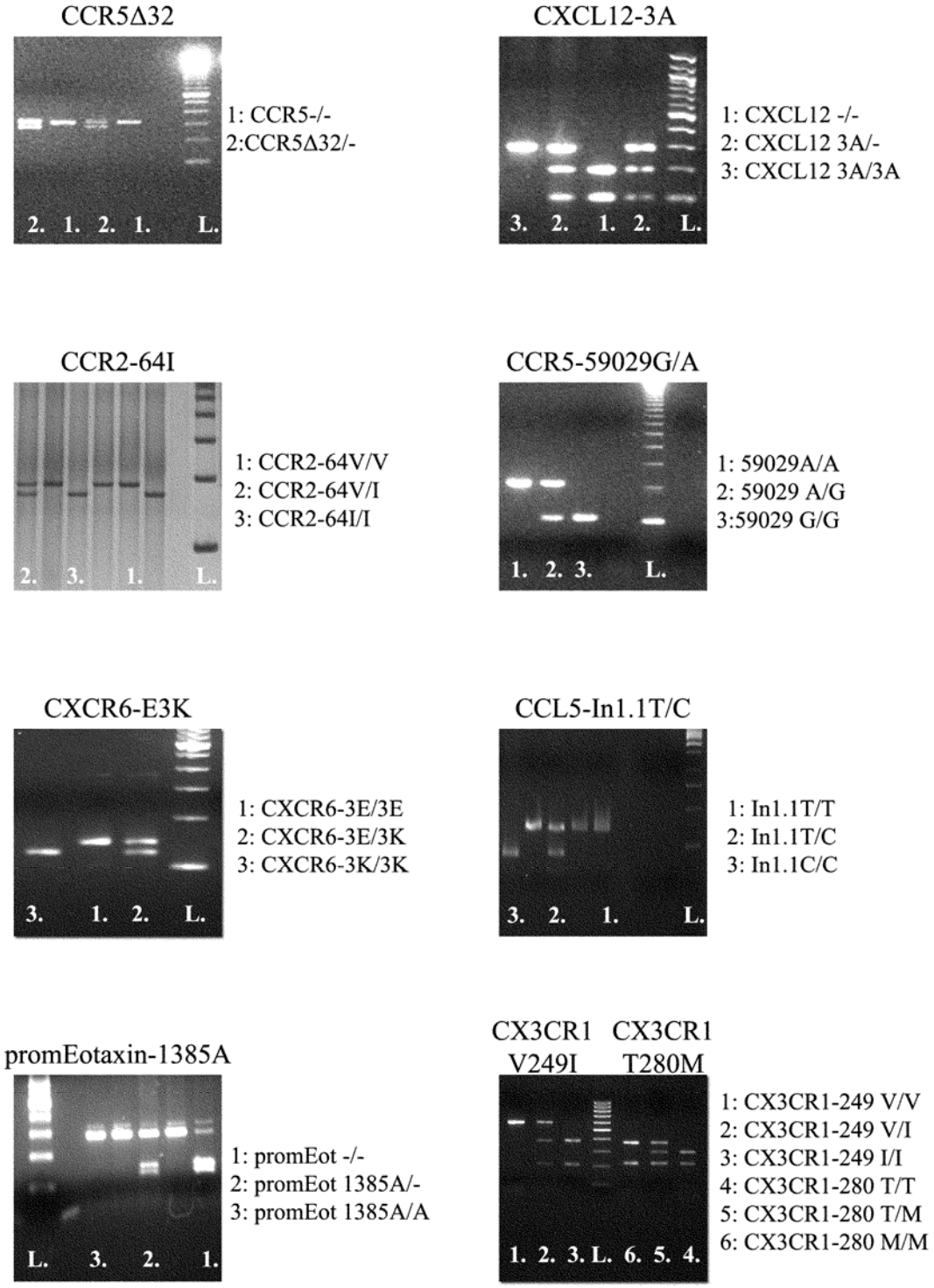
Πίνακας 5: Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στους υπό μελέτη πολυμορφισμούς (Invitrogen Custom Primers).

	PCR προϊόν	Περιοριστικό ένζυμο	Συνθήκες πέψης	Προϊόντα πέψης	
CXCL12-3A	302bp	MspI	37°C, 4 h	CXCL12-3A: 302bp	CXCL12: 201+101bp
CCR2-64I	183bp	BsaBI	60°C, 4 h	CCR2-64V: 183bp	CCR2-64I: 165+18bp
CCR5-59029G/A	268bp	Bsp1286I	37°C, 5 h	59029A 268bp	59029G 137+130bp
CXCR6-E3K	145bp	HindIII	37°C, 3h	CXCR6-3E 145bp	CXCR6-3K 121+24bp
CX3CR1-V249I	588bp	ACLI	37°C, 3h	CX_3CR1-249V 588bp	CX_3CR1-249I 205+383bp
CX3CR1-T280M	588bp	BsmBI	55°C, 3h	CX_3CR1-280T 75+216+297bp	CX_3CR1-280M 216+372bp
CCL5-In1.1T/C	342bp	MboII	37°C, 1 h	In1.1T 342bp	In1.1C 219+123bp
promEotaxin-1385A	279bp	MspI	37°C, 4h	promEot-1385A 279bp	promEot-1385G 153+126bp
CCR5-Δ32	CCR5: 189bp CCR5-Δ32: 157bp	CCR5-Δ32: Χωρίς αντίδραση RFLP			

Πίνακας 6: PCR προϊόντα των υπό μελέτη πολυμορφισμών, περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στις πέψεις (RFLP) και τα αντίστοιχα προϊόντα πέψης.

Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR με ειδικά περιοριστικά ένζυμα για κάθε πολυμορφισμό (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism). Το μέγεθος κάθε PCR προϊόντος και το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο με τις συνθήκες και τα προϊόντα πέψης φαίνονται στον πίνακα 6. Ο πολυμορφισμός CCR5Δ32 είναι ο μόνος που δεν χρειάστηκε πέψη με περιοριστικό ένζυμο, αφού δεν αφορά σημειακή μετάλλαξη σε θέση δράσης κάποιου περιοριστικού ενζύμου, αλλά απαλοιφή 32 νουκλεοτιδίων από το γονίδιο του CCR5. Η απαλοιφή αυτή είναι αρκετά μεγάλη για να φανεί απευθείας στην ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος. Στις αντιδράσεις πέψης

που δεν υπήρξαν κομμένα προϊόντα επαναλήφθηκε η διαδικασία πέψης με διπλάσια ποσότητα περιοριστικού ενζύμου, για αποκλεισμό σφάλματος από μειωμένη δραστικότητα του περιοριστικού ενζύμου. Τα προϊόντα της PCR και της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (για τον πολυμορφισμό CXCR6-E3K πήκτωμα αγαρόζης 3%). Το πήκτωμα περιείχε βρωμιούχο αιθύδιο που συνδέεται με τις έλικες του DNA και τις καθιστά ορατές σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας. Ο πολυμορφισμός CCR2-64I ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου με ακόλουθη χρώση αργύρου που καθιστά ορατά τα προϊόντα της πέψης (βλ. Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ηλεκτροφορήσεις πολυμορφισμών

Δ4. Στατιστική Ανάλυση

Στην εργασία αυτή μελετήσαμε την επίδραση των αναφερόμενων πολυμορφισμών στη απόκριση των ασθενών στην έναρξη θεραπείας με HAART. Αυτό έγινε με τη στατιστική ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους τις τιμές των CD4 και VL, που θεωρούνται ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες για την πορεία της νόσου και της θεραπείας[2]. Για το λόγο αυτό ορίστηκαν ως τιμές βάσης τα επίπεδα CD και VL πριν την έναρξη της θεραπείας (χρονικό εύρος αιμοληψίας: 0-4 μήνες πριν την έναρξη της HAART) και χρόνος=0 η ημερομηνία έναρξης της HAART. Ως τελικά σημεία (end-points) στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ο χρόνος που χρειάστηκε ώστε οι τιμές του CD4 να ανέλθουν και να ξεπεράσουν την επόμενη κατηγορία με βάση τη σταδιοποίηση κατά CDC (Centers for Disease Control). Επομένως για τους ασθενείς με βάση CD4<200cells/mm^3, ο χρόνος αυτός είναι οι μήνες από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη μέτρηση CD4 που ισούται ή ξεπερνά τα 200cells/mm^3. Για τους ασθενείς με βάση CD4 μεταξύ 200cells/mm^3 και 499cells/mm^3 είναι οι μήνες μέχρι την πρώτη μέτρηση CD4 που ισούται ή υπερβαίνει τα 500cells/mm^3. Κατά συνέπεια στις στατιστικές αναλύσεις με αυτό το τελικό σημείο δεν μετείχαν όσοι ασθενείς είχαν ως βάση CD4≥500cells/mm^3 (κυρίως ασθενείς που είχαν λάβει πριν την καθιέρωση της HAART μονή ή διπλή αντιρετροϊκή αγωγή με αποτέλεσμα να έχουν καλές τιμές CD4 κατά την μετάβαση στη HAART). Το τελικό αυτό σημείο χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο επιτυχούς ανοσολογικής απόκρισης, διότι κάθε κατηγορία CD4 συσχετίζεται με διαφορετική πρόγνωση εξέλιξης της νόσου σε AIDS.
2. Ο χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις CD4 (με μεσοδιάστημα 3μήνου) κάτω από τη βασική τιμή CD4 που είχε ο ασθενής όταν ξεκινούσε τη HAART. Το σημείο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο αποτυχίας της θεραπείας, αφού η πτώση των CD4 κάτω από τα βασικά επίπεδα παρά τη θεραπεία με HAART σηματοδοτεί την αδυναμία ελέγχου του ιικού πολλαπλασιασμού και την σύντομη επέλευση του AIDS.

3. Ο χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml, εφόσον αυτή ακολουθείται και από δεύτερη μέτρηση<50cps/ml σε διάστημα 3μηνών. Το σημείο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικός προγνωστικός δείκτης και ως κριτήριο επιτυχούς ανταπόκρισης στη θεραπεία.
4. Ο χρόνος από την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις VL>50cps/ml. Το σημείο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός προγνωστικός δείκτης, αφού η υποτροπή της ιιαμίας αποτελεί κριτήριο θεραπευτικής αποτυχίας και ένδειξη επαναξιολόγησης του θεραπευτικού σχήματος και ελέγχου συμμόρφωσης του ασθενούς στην αγωγή.

Επίσης στη μελέτη αυτή υπολογίστηκαν οι συχνότητες κάθε αλληλομόρφου, και εξετάστηκε αν ο αριθμός των ετερόζυγων και ομόζυγων ατόμων για κάθε αλληλόμορφο κατανέμονταν σύμφωνα με το ισοζύγιο κατά Hardy-Weinberg. Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (v.11.0)

Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ε1. Επίδραση των πολυμορφισμών CCR5Δ32, CCR4-59029G/A, CCR2-64I, CXCL12-3A στην ανταπόκριση ασθενών στην έναρξη της HAART

Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση σε 166 άτομα για τους πολυμορφισμούς CCR5Δ32, CCR5-59029G/A, CCR2-64I και CXCL12-3A. Ανάμεσά τους 17 άτομα δεν χρειάστηκε να ξεκινήσουν HAART με βάση τα κριτήρια των κατευθυντήριων οδηγιών (Πίνακας 7) ενώ 149 άτομα έλαβαν θεραπεία με HAART (Πίνακας 8).

Η διασπορά της συχνότητας των γονοτύπων βρέθηκε σε συμφωνία με την ισορροπία (equilibrium) κατά Hardy–Weinberg σε όλους τους πολυμορφισμούς που αναλύθηκαν. Στη συνέχεια έγινε μελέτη επιβίωσης κατά Kaplan–Meier για κάθε μια από τις ακόλουθες τρεις κατηγορίες ασθενών βάσει του CD4 τη χρονική στιγμή έναρξης της HAART: (1) ≥500 cells/mm^3, (2) 200–499 cells/mm^3 και (3) <200cells/mm^3. Στόχος της ομαδοποίησης αυτής ήταν να κατατάσσονται μαζί οι ασθενείς με όμοια ανοσολογική επάρκεια κατά την έναρξη της HAART.

Γονοτυπική ανάλυση ασθενών που δεν έλαβαν HAART							
CCR5Δ32	**n(%)**	**CXCL12-3A**	**n(%)**	**CCR2-64I**	**n(%)**	**CCR5-59029A/G**	**n(%)**
+/+	11(65)	+/+	10(59)	+/+	13(76)	AA	5(29)
+/Δ32	6(35)	+/3A	4(23)	+/64I	4(24)	A/G	9(53)
Δ32/Δ32	0	3A/3A	3(18)	64I/64I	0	G/G	3(18)
Σύνολο: 17 ασθενείς							

Πίνακας 7: Αποτελέσματα γονοτυπικής ανάλυσης ασθενών με HIV-1 που δεν έλαβαν θεραπεία με HAART για τους πολυμορφισμούς CCR5Δ32, CXCL12-3A, CCR2-64I, CCR5-59029A/G

	Κατηγορίες ασθενών βάση του CD4 (cells/mm^3) κατά την έναρξη της HAART			
	Cat1: ≥500 n/(%)	Cat2: 200-499 n/(%)	Cat3: 0-199 n/(%)	Σύνολο n/(%)
CCR5Δ32				
+/+	29 (93)	65 (91)	42 (89)	136 (91)
+/Δ32	2 (7)	6 (9)	5 (11)	13 (9)
Δ32/Δ32	0	0	0	0
Σύνολο	31	71	47	149
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-\Delta 32)}$=0,043			
CXCL12-3A				
+/+	16 (51)	38 (54)	25 (53)	79 (53)
+/3A	13 (42)	29 (41)	20 (43)	62 (41)
3A/3A	2 (7)	4 (5)	2 (4)	8 (6)
Σύνολο	31	71	47	149
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-3A)}$=0,261			
CCR2-64I				
+/+	22 (71)	58 (81)	35 (74)	115 (78)
+/64I	8 (26)	12 (17)	12 (26)	32 (21)
64I/64I	1 (3)	1 (2)	0	2 (1)
Σύνολο	31	71	47	149
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-64I)}$=0,12			
CCR5-59029A/G				
AA	8 (26)	17 (24)	11 (24)	36 (24)
A/G	13 (42)	36 (51)	18 (38)	67 (45)
G/G	10 (32)	18 (25)	18 (38)	46 (31)
Σύνολο	31	71	47	149
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-59029G)}$=0,533			

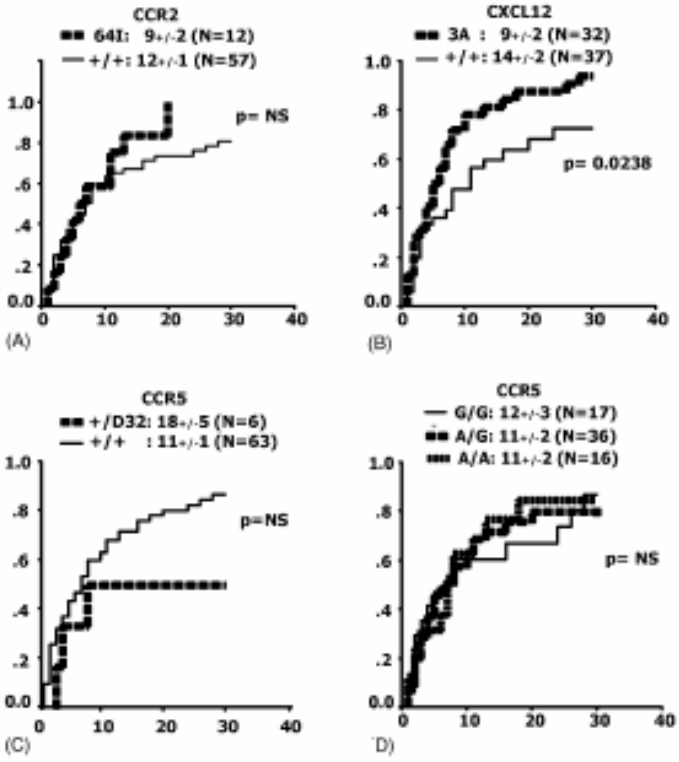
Πίνακας 8: Αποτελέσματα γονοτυπικής ανάλυσης ασθενών με HIV-1 για τους πολυμορφισμούς CCR5Δ32, CXCL12-3A, CCR2-64I, CCR5-59029A/G

1ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 πάνω από 500cells/mm^3, για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4: 200-499cells/mm^3, και πάνω από 200 για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3: Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών CCR5-59029G και CCR2-64I και του ρυθμού αύξησης των CD4 μετά την έναρξη της HAART (στοιχεία δεν παρουσιάζονται). Αντίθετα σε ασθενείς με βασική τιμή CD4:200–499 cells/mm^3 ο χρόνος για να αυξηθούν τα CD4≥500cells/mm^3 ήταν μικρότερος σε άτομα με το αλληλόμορφο CXCL12-3A, συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμορφο (wild-type) (Μ.Ο. 9±2 και 14±2 μήνες αντίστοιχα, p = 0.0238, n = 69). Επίσης στους ασθενείς με το αλληλόμορφο CCR5Δ32 παρατηρήθηκε μια τάση να αυξήσουν βραδύτερα τα CD4 συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμορφο (Μ.Ο. 18±5 και 11±1 μήνες αντίστοιχα), αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p = 0.1324, n = 69) (Διάγραμμα 3).

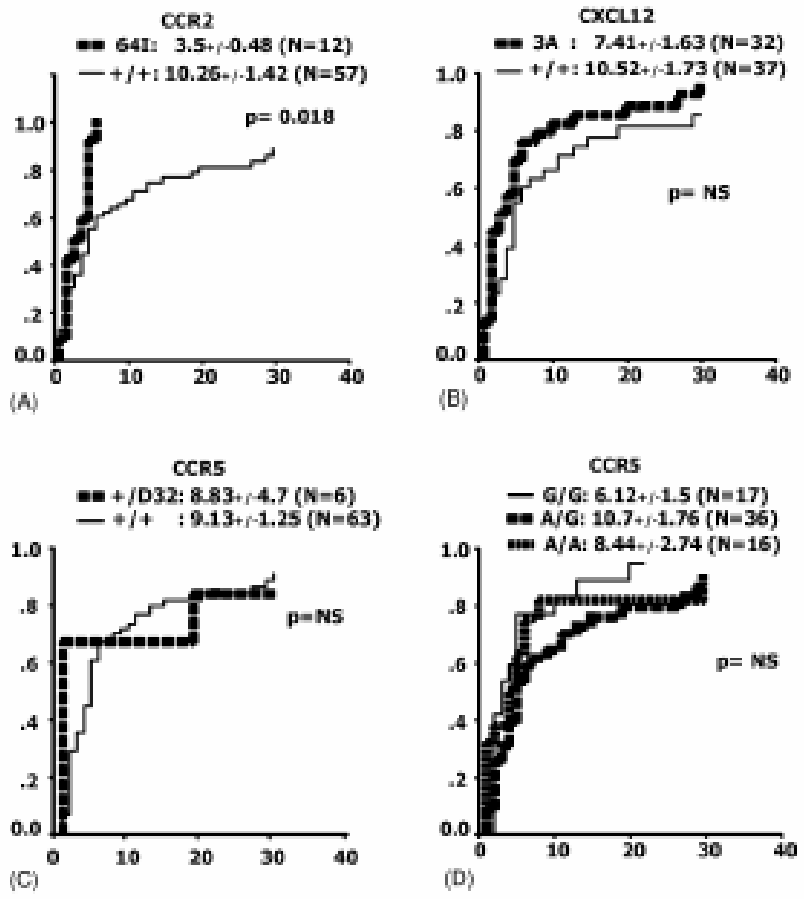
2ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πτώση των CD4 κάτω από την αρχική τους τιμή, εφόσον η πτώση επαναλαμβάνεται σε δύο διαδοχικές μετρήσεις με μεσοδιάστημα 3 μηνών: Αυτό το τελικό σημείο, που χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο αποτυχίας της θεραπείας δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αλληλομόρφων σε καμία κατηγορία ασθενών ανεξαρτήτως αρχικής τιμής CD4 (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).

3ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml, εφόσον αυτή ακολουθείται και από δεύτερη μέτρηση<50cps/ml σε διάστημα 3μηνών: Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών CCR5Δ32 και CCR5-59029G/A και του τελικού αυτού σημείου. Αντίθετα, σε ασθενείς με αρχική τιμή CD4:200-499cells/mm^3 η παρουσία του CCR2-64I σχετίστηκε με ταχύτερη πτώση του ιικού φορτίου συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμορφο (Μ.Ο. 3.5±0.4 και 10.2±1.4 μήνες αντίστοιχα, p=0.0183, n=69). Η παρουσία του αλληλομόρφου CXCL12-3A επίσης συσχετίστηκε με ταχύτερη μείωση του ιϊκού φορτίου συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμορφο (7.4±1.6 και 10.5±1.7 μήνες αντίστοιχα), αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p=0.1035, n=69)(Διάγραμμα 4).

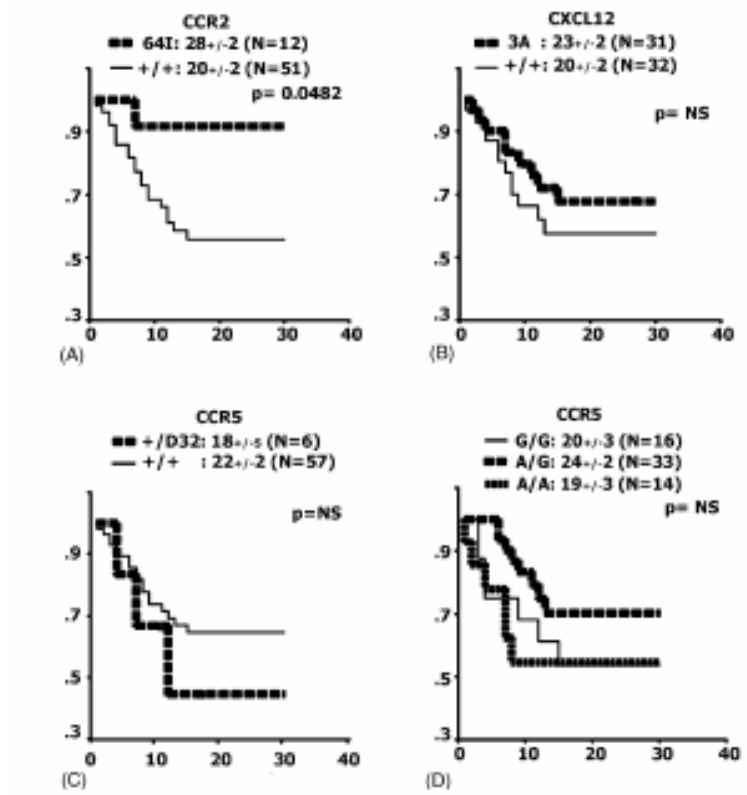
4ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις VL>50cps/ml με μεσοδιάστημα 3 μηνών μεταξύ τους: Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση των πολυμορφισμών CCR5Δ32, CCR5-59029G/A, CXCL12-3A στη διάρκεια καταστολής του ιϊκού φορτίου, ενώ άτομα με αρχική τιμή CD4:200-499cells/mm^3 που έφεραν το αλληλόμορφο CCR2-64I παρουσίασαν σημαντική καθυστέρηση στην υποτροπή της ιαιμίας συγκριτικά με το φυσικό αλληλόμορφο (Μ.Ο. 28±2 και 20±2 μήνες αντίστοιχα, p=0.0482, n=63)(Διάγραμμα 5). Έξι ασθενείς δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση αυτή διότι δεν κατάφεραν ποτέ να καταστείλουν τον ιό κάτω από τα ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά την έναρξη της HAART.



Διάγραμμα 3: Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan-Meier ανάλυσης σε ασθενείς με αρχική τιμή CD4:200-499cells/mm^3, που αναδεικνύουν την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο που χρειάστηκε από την έναρξη της HAART μέχρι να ανεβούν τα CD4 πάνω από 500cells/mm^3 (1° τελικό σημείο). (A) CCR2-64I; (B) CXCL12-3A; (C) CCR5-Δ32 και (D) CCR5-59029G/A. (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, N: αριθμός ασθενών και NS: p>0.05).



Διάγραμμα 4: Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan-Meier ανάλυσης σε ασθενείς με αρχική τιμή CD4 200-499cells/mm^3, που αναδεικνύουν την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο που χρειάστηκε από την έναρξη της HAART μέχρι να πέσει το VL κάτω από το όριο ανίχνευσης (<50cps/ml)(3° τελικό σημείο). (A) CCR2-64I, (B) CXCL12-3A, (C) CCR5-Δ32 και (D) CCR5-59029G/A. (*p*: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, *N*: αριθμός ασθενών και NS: *p*>0.05).



Διάγραμμα 5: Καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης σε ασθενείς με αρχική τιμή CD4 200-499cells/mm^3, που αναδεικνύουν την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο από την καταστολή του ιού κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50cps/ml) μέχρι την επανεμφάνισή του στο αίμα (>50cps/ml) (4° τελικό σημείο). Έξι ασθενείς από την προηγούμενη ανάλυση εξαιρέθηκαν από την ανάλυση αυτή διότι το ιϊκό φορτίο ποτέ δεν κατέστη μη ανιχεύσιμο. (A) CCR2-64I, (B) CXCL12-3A, (C) CCR5Δ32 και (D) CCR5-59029G/A. (*p*: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, *N*: αριθμός ασθενών και NS: *p*>0,05).

Ε2. Επίδραση των πολυμορφισμών CXCR6-E3K, In1.1T/C, promEotaxin-1385G/A, CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M στην ανταπόκριση ασθενών στην έναρξη της HAART

Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς In1.1T/C, CXCR6-E3K, promEotaxin-1385G/A, CX_3CR-V249I, και T280M. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Όλοι οι πολυμορφισμοί ήταν σε συμφωνία με το ισοζύγιο κατά Hardy-Weinberg με εξαίρεση το CXCR6-E3K (βρέθηκαν CXCR6-3E/3E= 136 ασθενείς, CXCR6-3E/3K= 4ασθενείς CXCR6-3K/3K= 2ασθενείς, με αναμενόμενη κατανομή περίπου 3E/3K=8 και 3K/3K=1 για τήρηση ισοζυγίου) *(p*= 0.001). Ακολούθησε στατιστική ανάλυση κατά Kaplan-Meier με τα 4 τελικά σημεία που προαναφέρθηκαν. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι στον πολυμορφισμό CXCR6-3K μελετήθηκε η παρουσία του αλληλομόρφου CXCR6-3K (σε ασθενείς ομόζυγους ή ετερόζυγους μαζί) συγκριτικά με ομόζυγους CXCR6-3E, εξαιτίας της μικρής συχνότητας του αλληλομόρφου. Επίσης οι πολυμορφισμοί CX_3CR1-V249I και CX_3CR1-T280M βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης αφού αφορούν πολυμορφισμούς του ίδιου γονιδίου σε εγγύτητα μεταξύ τους. Το αλληλόμορφο CX_3CR1-280M δεν βρέθηκε ποτέ στον ίδιο απλότυπο με το αλληλόμορφο CX_3CR1-249V, ενώ το αλληλόμορφο CX_3CR1-249I εμφανίστηκε τόσο με το CX_3CR1-280T όσο με το CX_3CR1-280M.

	Κατηγορίες ασθενών βάση του CD4 κατά την έναρξη της HAART			
	Cat1: ≥500 n/(%)	Cat2: 200-499 n/(%)	Cat3: 0-199 n/(%)	Σύνολο n/(%)
CXCR6-E3K				
E/E	28 (100)	69 (97)	39 (90)	136 (96)
E/K		2 (3)	2 (5)	4 (3)
K/K			2 (5)	2 (1)
Σύνολο	28	71	43	142
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(3K)}$=0,028			
In1.1				
TT	22 (82)	56 (78)	33 (77)	111 (78)
TC	3 (11)	14 (19)	9 (21)	26 (18)
CC	2 (7)	2 (3)	1 (2)	5 (4)
Σύνολο	27	72	43	142
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(In1.1C)}$=0,127			
promEotaxin-1385G/A (H7 Haplotype)				
GG	19 (68)	47 (65)	29 (67)	95 (66)
AG	7 (25)	21 (29)	12 (28)	40 (28)
AA	2 (7)	4 (6)	2 (5)	8 (6)
Σύνολο	28	72	43	143
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-1385A)}$=0,196			
CX_3CR1-V249I				
VV	17 (61)	37 (51)	22 (51)	76 (53)
VI	9 (32)	33 (46)	18 (42)	60 (42)
II	2 (7)	2 (3)	3 (7)	7 (5)
Σύνολο	28	72	43	143
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-249I)}$=0,258			
CX_3CR1-T280M				
TT	21 (75)	49 (68)	31 (72)	101 (71)
TM	7 (25)	21 (29)	11 (27)	39 (27)
MM		2 (3)	1 (1)	3 (2)
Σύνολο	28 (%)	72 (%)	43 (%)	143 (%)
Συχνότητα αλληλομόρφου	$f_{(-280M)}$=0,157			

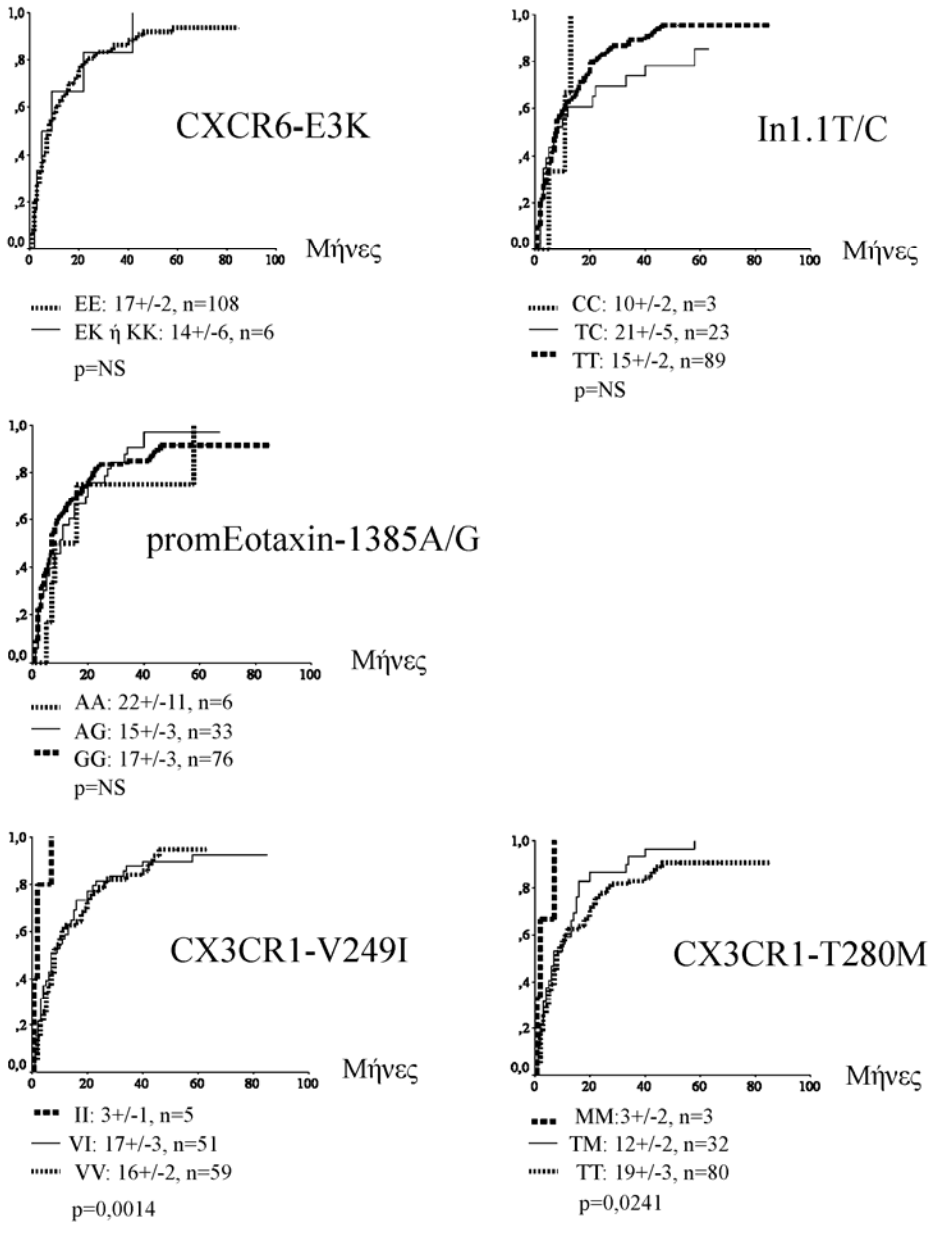
Πίνακας 9: Αποτελέσματα γονοτυπικής ανάλυσης ασθενών με HIV-1 για τους πολυμορφισμούς CXCR6-E3K, In1.1T/C, PromEotaxin-1385G/A (απλότυπος H7), CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M

1ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 πάνω από 500cells/mm^3, για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4: 200-499cells/mm^3, και πάνω από 200 για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3: Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πολυμορφισμών CXCR6-E3K, In1.1T/C, PromEotaxin-1385G/A και του ρυθμού αύξησης των CD4 μετά από έναρξη της HAART. Αντίθετα ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-249I εμφάνισαν ταχύτερη αποκατάσταση των CD4 στις υψηλότερες κλίμακες. Αυτή η επίδραση ήταν ιδιαίτερα εμφανής συγκρίνοντας ομόζυγους CX_3CR1-249I με ομόζυγους CX_3CR1-249V (Μ.Ο. 3±1 και 16±2 μήνες αντίστοιχα, p=0.001, n=115) (Διάγραμμα 6). Παρομοίως, το αλληλόμορφο CX_3CR1-280M σε ομόζυγη κατάσταση συσχετίστηκε με ταχύτερη άνοδο των CD4 λεμφοκυττάρων συγκριτικά με το CX_3CR1-280T (Μ.Ο. 3±2 και 19±3 μήνες αντίστοιχα, p =0.024, n =115) (Διάγραμμα 6).

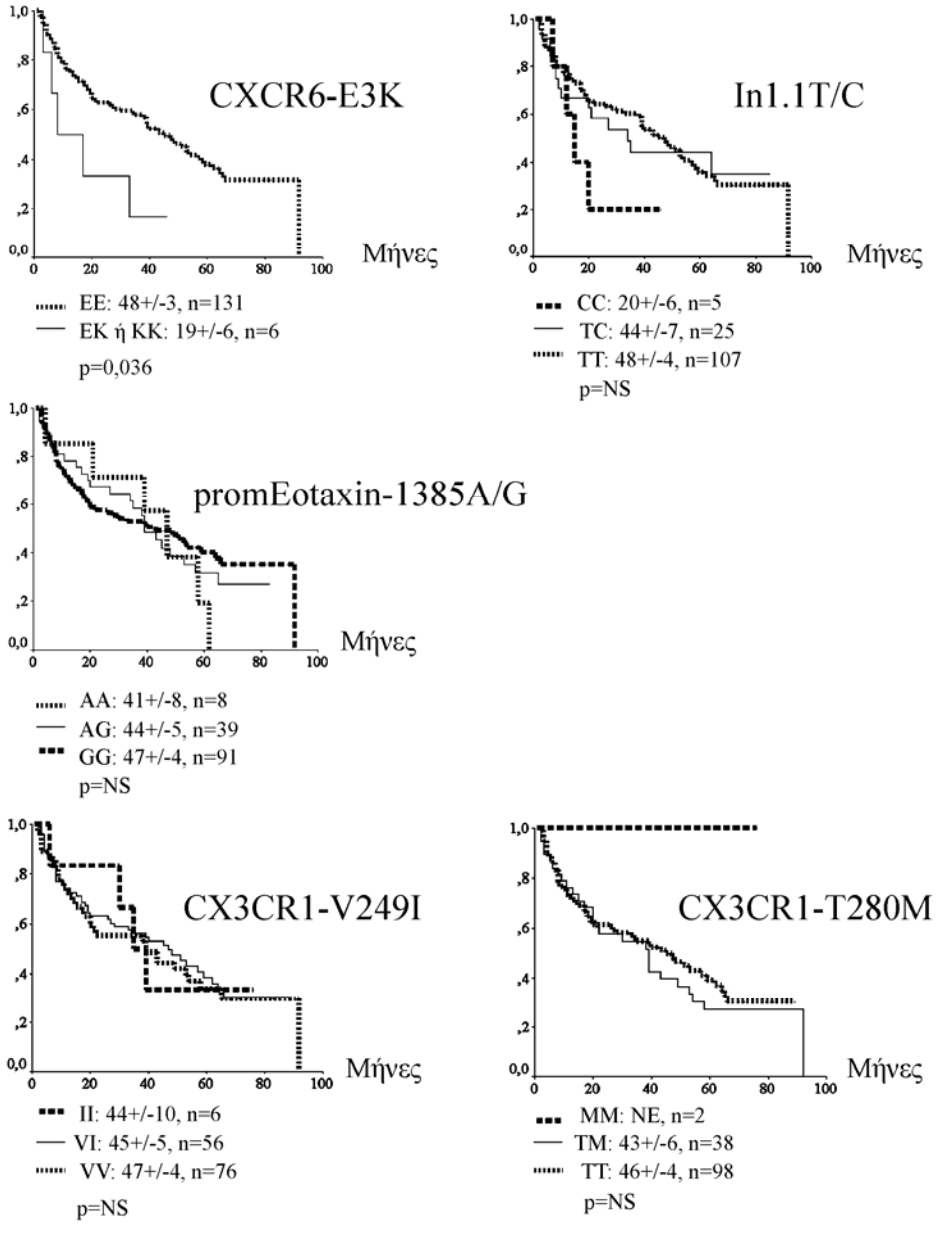
2ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πτώση των CD4 κάτω από την αρχική τους τιμή, εφόσον η πτώση επαναλαμβάνεται σε δύο διαδοχικές μετρήσεις με μεσοδιάστημα 3 μηνών: Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και του τελικού αυτού σημείου (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).

3ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml, εφόσον αυτή ακολουθείται και από δεύτερη μέτρηση<50cps/ml σε διάστημα 3μηνών: Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και του ρυθμού πτώσης του VL (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).

4ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις VL>50cps/ml με μεσοδιάστημα 3 μηνών μεταξύ τους: Δεν βρέθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών In1.1T/C, PromEotaxin-1385G/A (απλότυπος H7), CX_3CR1-V249I, CX_3CR1-T280M και της διάρκειας καταστολής του VL κάτω από 50cps/ml. Αντίθετα, σε ασθενείς ομόζυγους ή ετερόζυγους για το CXCR6-3K η επανεμφάνιση του ιού έγινε ταχύτερα συγκριτικά με τους ομόζυγους για το κοινό αλληλόμορφο CXCR6-3E (Μ.Ο. 19±6 και 48±3 μήνες αντίστοιχα, p=0,036, n=137)(Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 6: Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan-Meier ανάλυσης που αναδεικνύουν την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο (σε μήνες) από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 στην επόμενη κλίμακα (άνοδος πάνω από 500cells/mm^3, για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4: 200-499cells/mm^3, και πάνω από 200 για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3) (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, n: αριθμός ασθενών και NS: p>0,05).

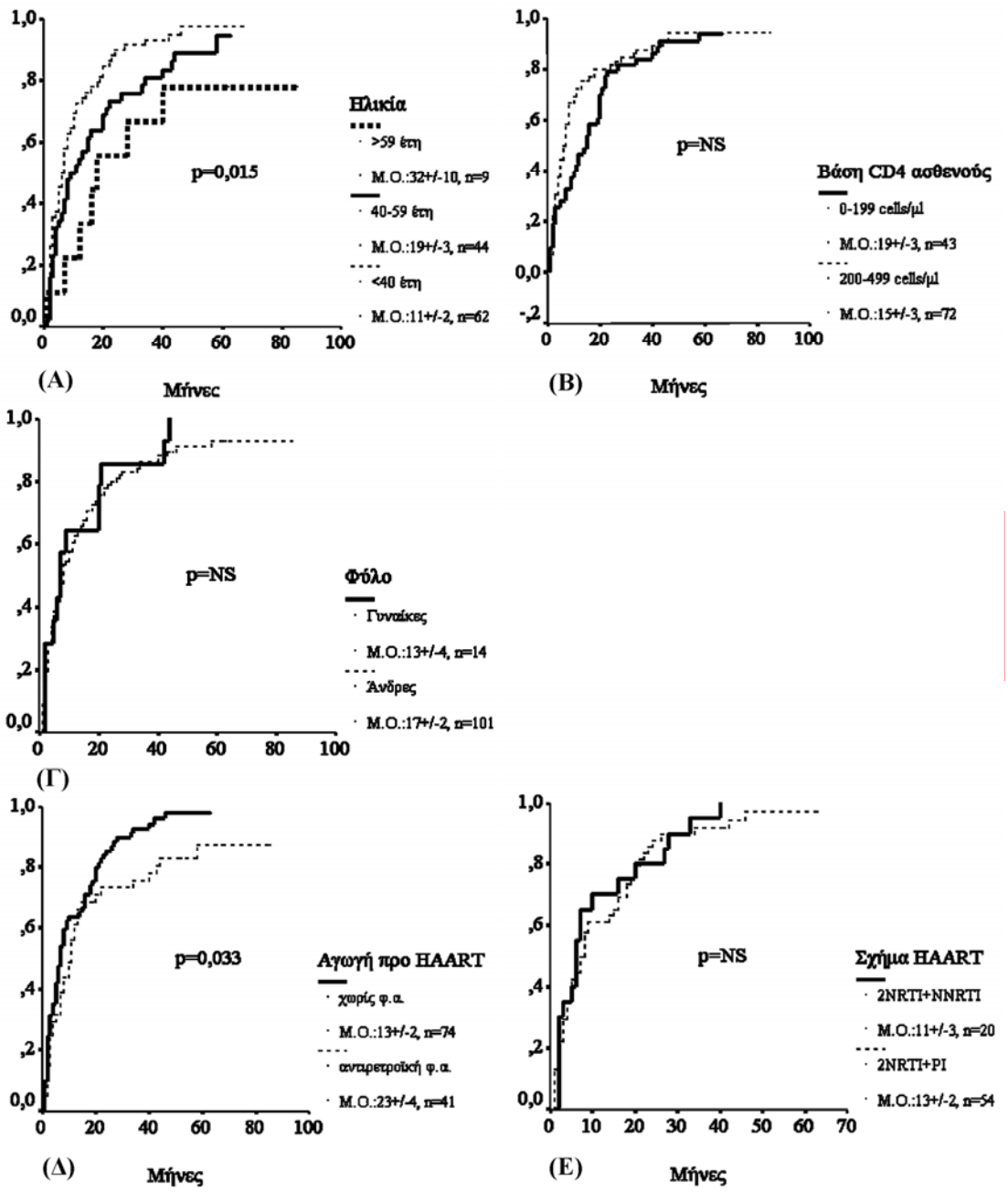


Διάγραμμα 7: Καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης σε ασθενείς υπό αγωγή με HAART, που αναδεικνύουν την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο από την καταστολή του ιού κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50cps/ml) μέχρι την επανεμφάνισή του στο αίμα (4° τελικό σημείο).

Ε3. Επίδραση κοινών μεταβλητών στην ανταπόκριση των ασθενών στην έναρξη της HAART

Εκτός από την επίδραση των πολυμορφισμών του συστήματος των χημειοκινών, αναζητήθηκαν και συσχετίσεις μεταξύ κοινών μεταβλητών και της αποτελεσματικότητας της HAART. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κατά Kaplan Meier με τα ίδια τελικά σημεία για να διερευνηθεί αν η αποτελεσματικότητα της HAART διέφερε μεταξύ ασθενών που δέχτηκαν τη θεραπεία αυτή για πρώτη φορά (therapy-naïve) και αυτών που είχαν λάβει στο παρελθόν αντιρετροϊκά φάρμακα (NRTI) σε μονά ή διπλά σχήματα (therapy-experienced) πριν ξεκινήσουν τη HAART:

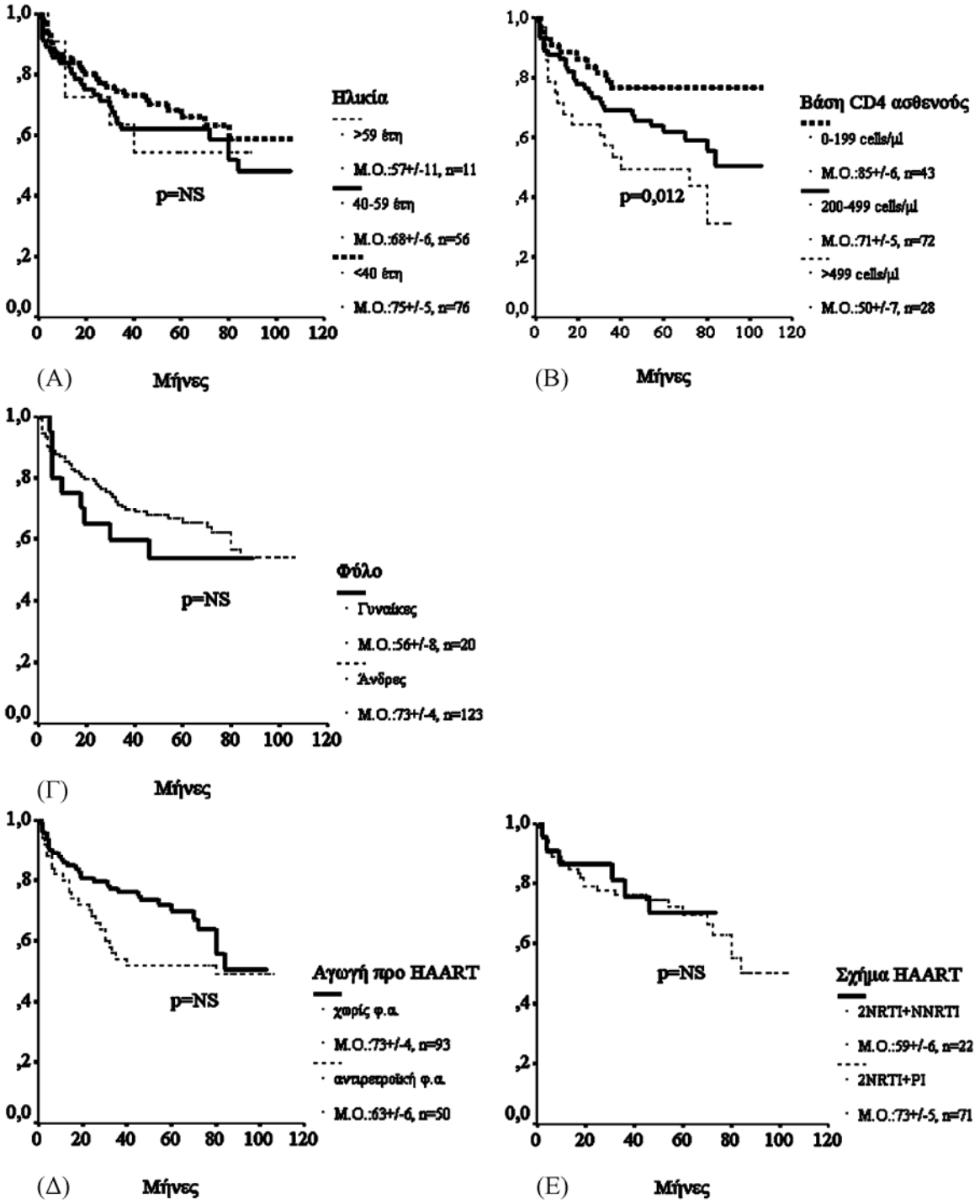
1ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 πάνω από 500cells/mm^3, για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4: 200-499cells/mm^3, και πάνω από 200 για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3: Από την ανάλυση φαίνεται ότι η ηλικία και η λήψη αντιρετροϊκής αγωγής πριν την έναρξη της HAART επηρεάζουν το ρυθμό αύξησης των CD4. Συγκεκριμένα ασθενείς με ηλικία >59ετών, μεταξύ 40-59 ετών και <40 ετών αυξάνουν τα CD4 στην επόμενη κλίμακα σε 32±10, 15±3 και 11±2 μήνες αντίστοιχα (p=0,015, n=115). Η νεότερη ηλικία δηλαδή συσχετίζεται με ταχύτερη αποκατάσταση των CD4 μετά την έναρξη της HAART. Επιπλέον οι ασθενείς που έλαβαν ως πρώτη θεραπεία τη HAART εμφάνισαν ταχύτερη άνοδο των CD4 συγκριτικά με αυτούς που είχαν λάβει πριν την HAART άλλα αντιρετροϊκά σχήματα με ένα ή δύο NRTI (Μ.Ο: 13±2 και 23±4 μήνες αντίστοιχα, *p*=0.033, n=115). Αντίθετα δεν φάνηκε να επηρεάζεται ο ρυθμός αύξησης των CD4 από το φύλο, το σχήμα της HAART (2NRTI+PI έναντι 2NRTI+NNRTI) ή τη βάση των CD4 (την τιμή CD4 κατά την έναρξη της HAART) (Διάγραμμα 8).



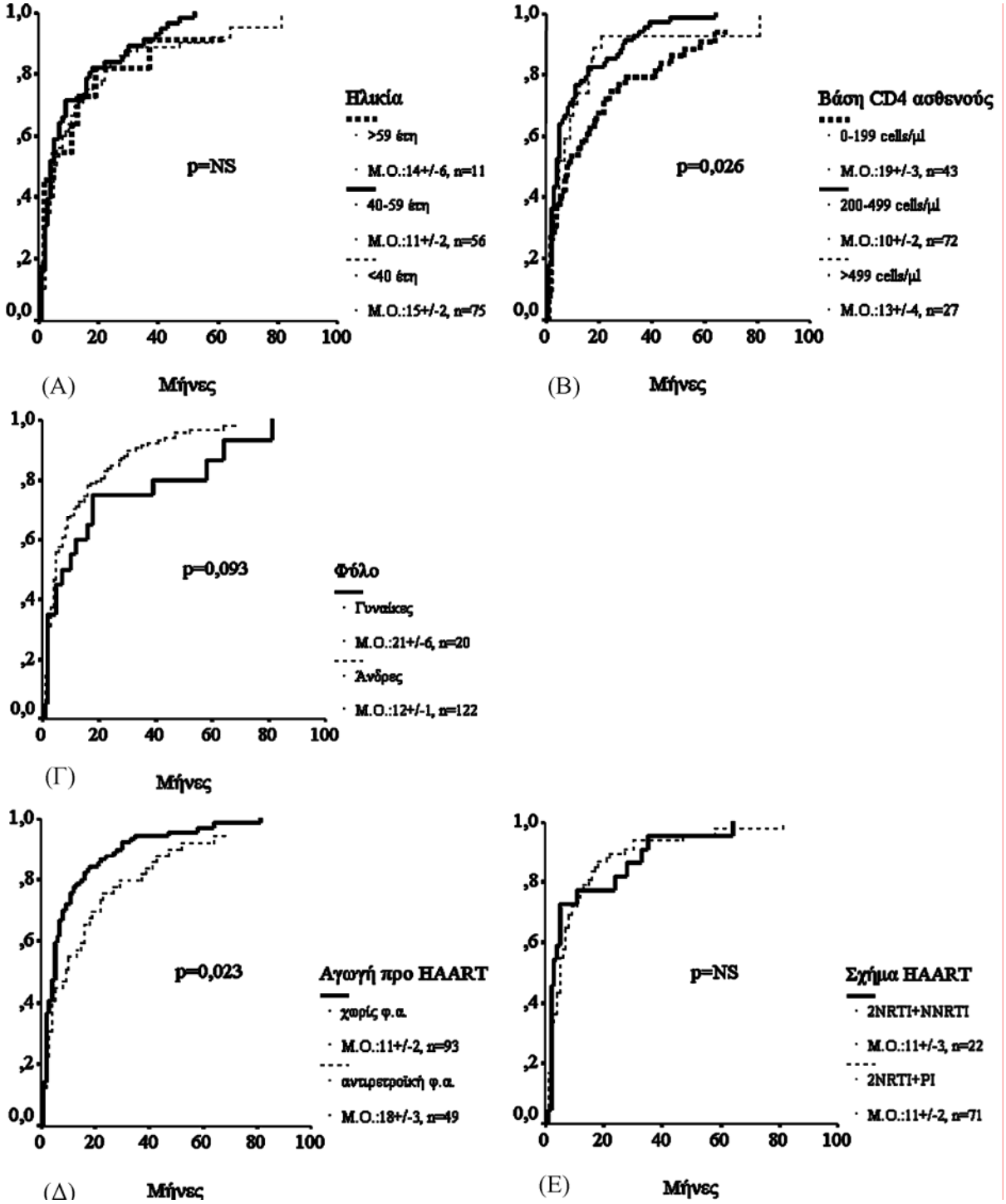
Διάγραμμα 8: Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης που αναδεικνύουν την επίδραση (Α) της ηλικίας, (Β) της βάσης CD4 (baseline CD4) κατά την έναρξη της HAART, (Γ) του φύλου, (Δ) της χρήσης προηγούμενης αντιρετροϊκής αγωγής πριν τη HAART, (Ε) του σχήματος HAART στο χρόνο (σε μήνες) από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 στην επόμενη κλίμακα (άνοδος πάνω από 500cells/mm^3, για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4: 200-499cells/mm^3, και πάνω από 200 για τους ασθενείς με αρχική τιμή CD4<200cells/mm^3) (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, n: αριθμός ασθενών και NS: p>0,05)

2ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πτώση των CD4 κάτω από την αρχική τους τιμή, εφόσον η πτώση επαναλαμβάνεται σε δύο διαδοχικές μετρήσεις με μεσοδιάστημα 3 μηνών: Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας, του φύλου, της λήψης αντιρετροϊκών φαρμάκων πριν τη HAART και του σχήματος HAART στο ρυθμό πτώσης των CD4 κάτω από την βασική τους τιμή. Αντίθετα όσοι ξεκίνησαν τη HAART έχοντας υψηλά CD4 φαίνεται πως έριξαν πιο γρήγορα τα CD4 κάτω από τη βασική τιμή συγκριτικά με όσους τα είχαν ήδη χαμηλά (ΜΟ: 85±4, 71±5, 50±7 μήνες για όσους είχαν βάση CD4 <200cells/mm^3, 200-499 cells/mm^3 και ≥500cells/mm^3 αντίστοιχα, p=0,012, n=143) (Διάγραμμα 9).

3ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml, εφόσον αυτή ακολουθείται και από δεύτερη μέτρηση<50cps/ml σε διάστημα 3μηνών: Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και του σχήματος HAART με το χρόνο που απαιτήθηκε για την καταστολή του ιού σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αντίθετα οι ασθενείς με αρχική CD4≥500cells/mm^3 εμφάνισαν ταχύτερη απόκριση στη HAART με πτώση του VL συγκριτικά με όσους ασθενείς είχαν αρχικό CD4<200cells/mm^3 (Μ.Ο: 13±4 και19±3 μήνες αντίστοιχα, p=0,026, n=142). Παρομοίως όσοι έλαβαν ως πρώτη θεραπεία τη HAART απομάκρυναν τον ιό ταχύτερα από την κυκλοφορία τους συγκριτικά με όσους είχαν λάβει αντιρετροϊκή αγωγή πριν την HAART (Μ.Ο: 11±2 και 18±3 μήνες αντίστοιχα, p=0,023, n=142). Μια τάση βραδύτερης καταστολής του ιού εμφάνισαν οι γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες (Μ.Ο: 21±6 και 12±1 μήνες αντίστοιχα, p=0,093, n=142) (Διάγραμμα 10).

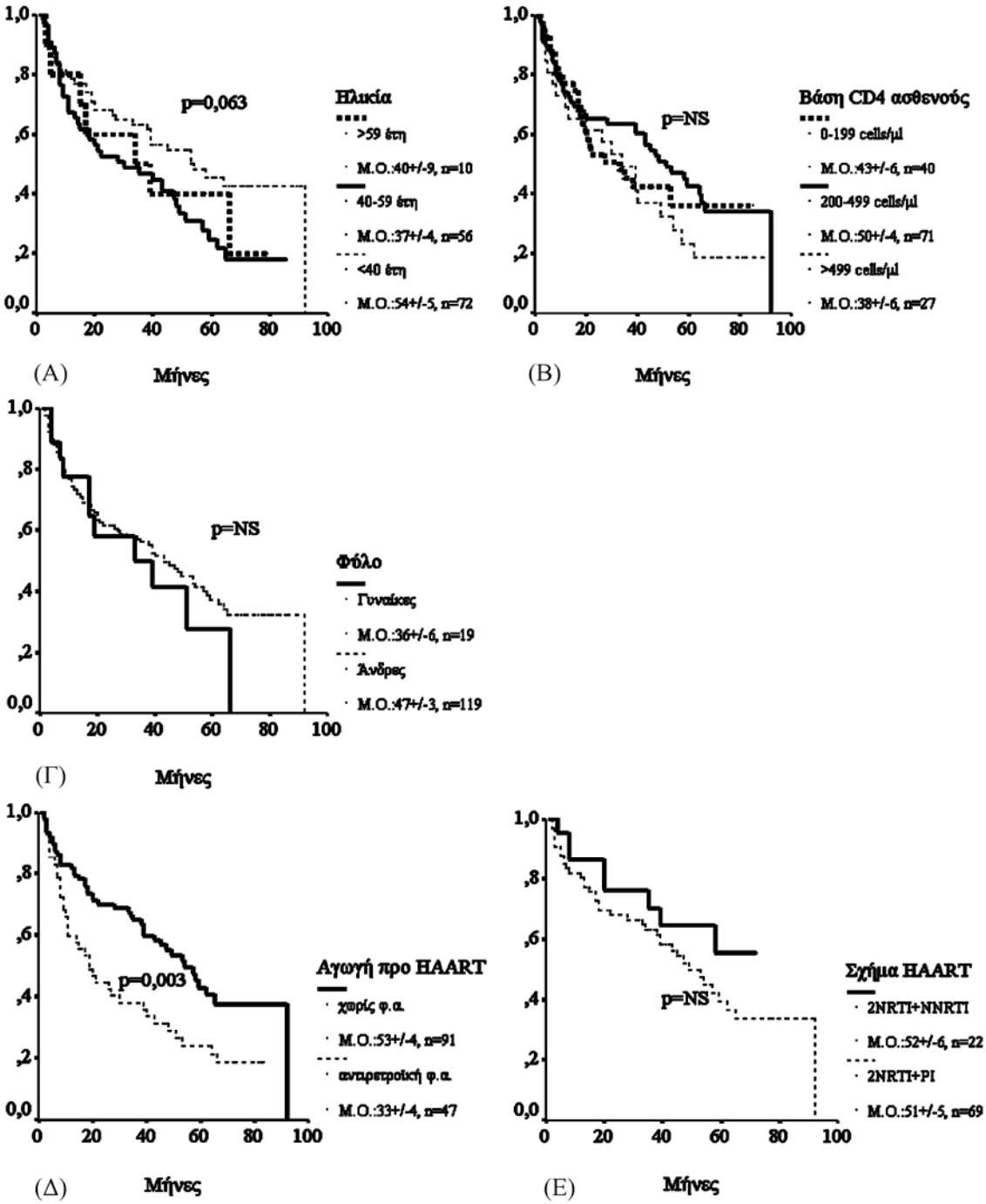


Διάγραμμα 9: Καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης που αναδεικνύουν την επίδραση (Α) της ηλικίας, (Β) της βάσης CD4 (baseline CD4), (Γ) του φύλου, (Δ) της χρήσης αντιρετροϊκής αγωγής πριν τη HAART και (Ε) του σχήματος HAART στο χρόνο (σε μήνες) από την έναρξη της HAART μέχρι την πτώση των CD4 κάτω από την αρχική τιμή στην έναρξη της θεραπείας (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, n: αριθμός ασθενών και NS: p>0,05)



Διάγραμμα 10: Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης που αναδεικνύουν την επίδραση (Α) της ηλικίας, (Β) της βάσης CD4 (baseline CD4), (Γ) του φύλου, (Δ) της χρήσης αντιρετροϊκής αγωγής πριν τη HAART και (Ε) του σχήματος HAART στο χρόνο (σε μήνες) από την έναρξη της HAART έως ότου το VL καταστεί μη ανιχνεύσιμο (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, n: αριθμός ασθενών και NS: p>0,05)

4ο τελικό σημείο (end-point): χρόνος από την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις VL>50cps/ml με μεσοδιάστημα 3 μηνών μεταξύ τους: Δεν βρέθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της βάσης CD4 κατά την έναρξη της HAART, του φύλου και του σχήματος HAART με το χρόνο μέχρι την υποτροπή της ιαιμίας. Ωστόσο οι νεότεροι ασθενείς είχαν μια τάση καθυστερημένης επανεμφάνισης του ιού στην κυκλοφορία συγκριτικά με τους μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς (Μ.Ο. 54±5, 37±4 και 40±9 μήνες για τις ηλικίες <40, 40-59 και ≥60 ετών αντίστοιχα, p= 0,063, n= 138). Επίσης στους ασθενείς που είχαν λάβει αντιρετροϊκή αγωγή πριν την έναρξη της HAART εμφανιζόταν ταχύτερη υποτροπή της ιαιμίας συγκριτικά με όσους ασθενείς έλαβαν τη HAART ως πρώτη αγωγή (Μ.Ο: 33±4 και 53±4 μήνες αντίστοιχα, p=0,003, n=138) (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Καμπύλες επιβίωσης της Kaplan-Meier ανάλυσης που αναδεικνύουν την επίδραση (Α) της ηλικίας, (Β) της βάσης CD4 (baseline CD4), (Γ) του φύλου, (Δ) της χρήσης αντιρετροϊκής αγωγής πριν τη HAART και (Ε) του σχήματος HAART στο χρόνο (σε μήνες) από την πρώτη μέτρηση VL<50cps/ml μετά την έναρξη της HAART μέχρι την πρώτη από δύο διαδοχικές μετρήσεις VL>50cps/ml, δηλαδή το χρόνο μέχρι την υποτροπή της ιαιμίας (p: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, n: αριθμός ασθενών και NS: p>0,05).

ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΤ1. Η επίδραση κοινών μεταβλητών στην έκβαση της HAART

Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν αποτελέσματα συμβατά με τη βιβλιογραφία[25]. Η μικρότερη ηλικία φάνηκε να έχει ευνοϊκή επίδραση στην έκβαση της HAART, όπως εκφράστηκε από την ταχύτερη άνοδο των CD4 μετά την έναρξη της HAART και τη διατήρηση του VL κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα για μεγαλύτερο διάστημα, παρόλο που ο ρυθμός πτώσης του VL δεν επηρεάστηκε. Επίσης ευνοϊκότερη έκβαση είχαν όσοι ασθενείς ξεκίνησαν με πρώτο θεραπευτικό σχήμα τη HAART και δεν είχαν λάβει απλή αντιρετροϊκή αγωγή στο παρελθόν. Οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν ταχύτερη άνοδο των CD4, ταχύτερη πτώση του VL και παρατεταμένη ιική καταστολή συγκριτικά με ασθενείς που είχαν λάβει στο παρελθόν απλή αντιρετροϊκή αγωγή. Αντίθετα το φύλο, η χρήση NNRTI ή PI στο σχήμα της HAART δεν εμφάνισαν διαφοροποιήσεις σχετικά με την έκβαση της HAART, με την εξαίρεση ότι στις γυναίκες η καταστολή του ιού επιτυγχάνεται σχετικά βραδύτερα συγκριτικά με τους άνδρες. Οι ασθενείς με αρχική τιμή CD4 <200cells/mm^3 δεν διέφεραν από τους ασθενείς με αρχική CD4 200-499cells/mm^3 στο ρυθμό αύξησης των CD4. Αντίθετα το VL εμφάνισε ταχύτερη καταστολή κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα στους ασθενείς με υψηλότερο CD4.

ΣΤ2. Η επίδραση του αλληλομόρφου CCR2-64I

Τα κυριότερα αποτελέσματα προήλθαν από την υποομάδα ασθενών με αρχική τιμή CD4 μεταξύ 200–499cells/mm^3, στους οποίους παρατηρήθηκε σημαντική προστατευτική επίδραση του αλληλομόρφου CCR2-64I με τη μείωση του χρόνου που απαιτείται για το ιϊκό φορτίο να πέσει σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο (VL<50 cps/ml) ($p < 0{,}018$, $n = 69$) και την αύξηση του χρονικού διαστήματος μέχρι την επαναφορά της ιαιμίας ($p<0{,}0482$, $n=63$).

Παρόμοια συμπεράσματα ανακοινώθηκαν σε μια άλλη μελέτη 25 ασθενών που έλαβαν HAART. Καλή ανταπόκριση στην HAART παρατηρήθηκε μόνο στην ομάδα ατόμων με το αλληλόμορφο CCR2-64I [107]. Παρόμοια προστατευτική επίδραση του CCR2-64I σε συνδυασμό με τα αλληλόμορφα CCR5Δ32 και CCR5-59029G

περιέγραψαν οι O'Brien *et al*[108]. Αντίθετα οι Wit *et al* δεν βρήκαν καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου CCR2-64I και του ρυθμού πτώσης του ιϊκού φορτίου σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο, της διάρκειας καταστολής του ιού και το ρυθμό αύξησης των CD4 κυττάρων 96 εβδομάδες μετά την HAART[109].

Έχει βρεθεί πως ο CCR2 εμφανίζεται με δύο ισομορφές, τον CCR2A, που παραμένει στο κυτταρόπλασμα, και τον CCR2B, που μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη CCR2-64I φαίνεται να δημιουργεί σύμπλοκο με τον υποδοχέα CCR5 στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντάς τον να μεταφερθεί στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται οι διαθέσιμες μονάδες του CCR5 για προσκόλληση του HIV και πιθανόν τα αντίστοιχα λεμφοκύτταρα να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη μόλυνση, περιορίζοντας το διαμέρισμα των μολυσμένων κυττάρων για ενεργό αναπαραγωγή του ιού[81,83,84]. Μια τέτοια περίπτωση θα μπορούσε να δικαιολογήσει την ταχύτερη πτώση του VL μετά από έναρξη της HAART στους ασθενείς με CCR2-64I συγκριτικά με τους ασθενείς με το φυσικό αλληλόμορφο CCR2. Ωστόσο θα περιμέναμε στους φορείς του CCR2-64I να παρατηρείται ηπιότερη ιιαμία συγκριτικά με τους ομόζυγους για το φυσικό αλληλόμορφο. Στην ομάδα μελέτης μας ο μέσος όρος VL πριν την έναρξη της HAART (baseline VL) στους ασθενείς CCR2-/- ήταν 185.648cps/ml (n=96), στους CCR2-64I/-ήταν 203.851cps/ml (n=24) και στους CCR2 64I/64I ήταν 81.500cps/ml (n=2). Φαίνεται ότι το μέσο VL των ομόζυγων CCR2-64I ήταν πολύ χαμηλότερο συγκριτικά με το μέσο VL των ετερόζυγων ή ομόζυγων για το φυσικό αλληλόμορφο CCR2. Εξαιτίας όμως του πολύ μικρού αριθμού των ομόζυγων ατόμων για CCR2-64I δεν μπορεί αυτή η παρατήρηση να χαρακτηριστεί στατιστικά ισχυρή.

ΣΤ3. Η επίδραση του αλληλομόρφου CXCL12-3A

Η προστατευτική επίδραση του CXCL12-3A αναδείχθηκε στην υποομάδα των ασθενών με αρχική CD4 μεταξύ 200 και 499cells/mm^3, στους οποίους υπήρξε ταχύτερη άνοδος των CD4 μετά την έναρξη της θεραπείας. Η επίδραση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.024$, $n = 69$) και ήταν η πρώτη φορά που ανακοινώθηκε σε ασθενείς υπό θεραπεία με HAART.

Αν και ήταν γνωστό ότι το CXCL12-3A συσχετιζόταν με επιβράδυνση της προόδου σε AIDS σε μεγάλους πληθυσμούς ασθενών που δεν είχαν λάβει θεραπεία[82],

δεν ήταν ξεκάθαρο αν παίζει κάποιο ρόλο στην κλινική πορεία των ασθενών όταν λαμβάνουν HAART. Οι Lathey *et al* ανέφεραν ταχύτερη επέλευση του AIDS σε ασθενείς ομόζυγους για CXCL12-3A, που λάμβαναν αντιρετροϊκή αγωγή (όχι HAART) με ένα μόνο NRTI[110]. Επιπρόσθετα σε μια ομάδα 272 ασθενών η παρουσία του CXCL12-3A συσχετίστηκε με μια τάση ταχύτερης υποτροπής της ιαιμίας μετά τη θεραπεία με HAART [108].

Έχει προαναφερθεί ότι το CXCL12 συναγωνίζεται την πρόσδεση του υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων CXCR4 με στελέχη X4 του HIV. Τα στελέχη X4 όμως εμφανίζονται σε όψιμα στάδια της λοίμωξης του HIV. Συνεπώς πολυμορφισμοί του CXCL12 αναμένεται να επηρεάσουν την κλινική πορεία σε όψιμα στάδια της λοίμωξης σε ασθενείς με μεγάλο χρόνο παρακολούθησης. Αυτό πιθανά ευθύνεται για τα συμπεράσματα του O'Brien *et al*, όπου ο χρόνος παρακολούθησης ήταν μικρός. Στη μελέτη μας ο χρόνος παρακολούθησης ήταν μεγαλύτερος (μέσος χρόνος παρακολούθησης 68,8 μήνες μέχρι την ολοκλήρωση της γονοτύπισης των πολυμορφισμών CCR5Δ32, CCR2-64I, CXCL12-3A, CCR5-59029G/A). Οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία CD4 μεταξύ 200-499cells/mm^3 πιθανότατα συμπίπτουν χρονικά με την εμφάνιση των X4 στελεχών. Στο στάδιο αυτό οι φορείς του προστατευτικού αλληλόμορφου CXCL12-3A θα μπορούσαν να εμφανίζουν συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι άλλων ασθενών που δεν το φέρουν, παρεμποδίζοντας την ταχεία διάδοση του ιού στα Τ-λεμφοκύτταρα που φέρουν το CXCR4 και μειώνοντας το συνολικό φορτίο μολυσμένων Τ-λεμφοκυττάρων και το συνολικό ρυθμό ιικού πολλαπλασιασμού.

ΣΤ4. Η επίδραση του αλληλομόρφου CCR5Δ32

Το αλληλόμορφο CCR5Δ32 είναι το πιο καλά τεκμηριωμένο βιβλιογραφικά παράδειγμα προστατευτικής επίδρασης γενετικού πολυμορφισμού στην HIV λοίμωξη. Η παρατήρηση αυτή έχει αποδειχθεί σε παλαιότερες, μεγάλες σειρές ασθενών που δεν λάμβαναν θεραπεία, γιατί δεν είχαν ακόμα κυκλοφορήσει τα αντιρετροϊκά φάρμακα. Με την εισαγωγή της HAART άλλαξε ριζικά η φυσική πορεία της λοίμωξης. Ο ρόλος του CCR5Δ32 στις νέες συνθήκες της HAART δεν είναι εξίσου ξεκάθαρος. Στην αρχή της παρούσας μελέτης αναμενόταν η εμφάνιση μιας ευεργετικής επίδρασης του CCR5Δ32 στην αποτελεσματικότητα της HAART, γεγονός που δεν επαληθεύτηκε. Παρότι δεν βρέθηκε ομόζυγος ασθενής για

CCR5Δ32, (όπως αναφέρεται και από άλλες μελέτες), δεν βρέθηκε καμία ευεργετική συσχέτιση των ετερόζυγων CCR5Δ32 με την ταχύτητα και τη διάρκεια καταστολής του ιού σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αντίθετα στους ετερόζυγους ασθενείς παρατηρήθηκε μια στατιστικά μη σημαντική τάση καθυστερημένης αύξησης των CD4 λεμφοκυττάρων μετά την έναρξη της HAART, συγκριτικά με ασθενείς που δεν έφεραν το αλληλόμορφο CCR5Δ32. (p = 0.132, n = 69) και είχαν μια βασική τιμή του CD4 μεταξύ 200–499cells/mm^3.

Διφορούμενα αποτελέσματα υπάρχουν και στη βιβλιογραφία. Σε ορισμένες μελέτες παρατηρήθηκε καλύτερη ανοσολογική και ιολογική ανταπόκριση στη HAART σε ασθενείς ετερόζυγους για CCR5Δ32 [111-114]. Από την άλλη πλευρά οι Bratt *et al*. δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου CCR5Δ32 και του ιϊκού φορτίου κατά τη διάρκεια 12 μηνών από την έναρξη της HAART, ενώ οι Brumme *et al* δεν βρήκαν διαφοροποιήσεις στη διάρκεια καταστολής του VL σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από HAART και οι Wit *et al* δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου CCR5Δ32 και την ανοσολογική και ιολογική ανταπόκριση στη HAART[109, 115, 116].

Αν και στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του CCR5Δ32 με καλύτερη έκβαση της HAART, στους ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία παρατηρήθηκε μια ευεργετική επίδραση του CCR5Δ32 στην πορεία τους μέχρι την έναρξη της HAART. Όπως προαναφέρθηκε, από τα 166 άτομα που εισήλθαν στη μελέτη, οι 17 δεν χρειάστηκε να ξεκινήσουν HAART με βάση τις ενδείξεις των κατευθυντήριων οδηγιών. Ανάμεσά τους οι 6 ήταν ετερόζυγοι για τον CCR5Δ32 και οι 11 αρνητικοί για τον CCR5Δ32. Φαίνεται λοιπόν ότι από το σύνολο των 19 ετερόζυγων της μελέτης δεν χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία οι 6, ενώ από το σύνολο των 147 αρνητικών για CCR5Δ32, μόνο οι 11 μπόρεσαν να μείνουν χωρίς θεραπεία για το διάστημα της παρακολούθησης (p = 0.005, $X2$ Fisher exact test, μέση διάρκεια παρακολούθησης για τους ετερόζυγους και αρνητικούς CCR5Δ32 ασθενείς χωρίς θεραπεία: 59 και 34 μήνες αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική και επιβεβαιώνει την προστατευτική επίδραση του CCR5Δ32 στην πορεία της λοίμωξης πριν την έναρξη της HAART στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης. Συνεπώς μπορεί να υποτεθεί ότι η τεκμηριωμένη από τη βιβλιογραφία ικανότητα των CCR5Δ32 ετερόζυγων ασθενών να διατηρούν υψηλότερο αριθμό CD4 κυττάρων και χαμηλότερο ιϊκό φορτίο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τους αρνητικούς για CCR5Δ32, τους καθιστά ικανούς να διατηρούνται χωρίς HAART για

μεγαλύτερη διάρκεια, αφού δεν εκπληρώνουν τις ενδείξεις έναρξης θεραπείας. Αυτό πιθανά να έχει αποτέλεσμα πιο μακροχρόνια έκθεση στον ιό χωρίς θεραπεία, ώστε όταν τελικά πέσουν τα CD4, αυξηθεί το VL και ξεκινήσει η HAART, να έχουν προκύψει πια X4 στελέχη του ιού, που δεν εξαρτώνται από τον υποδοχέα CCR5. Στη φάση αυτή δεν θα μπορούσε να αναδειχθεί η προστατευτική επίδραση του CCR5Δ32 στην αποτελεσματικότητα της HAART, αφού ο κυρίαρχος συνυποδοχέας μετάδοσης του ιού σε αυτό το στάδιο είναι ο CXCR4. Τέλος θα μπορούσε να μελετηθεί στους ασθενείς αυτούς το ενδεχόμενο έναρξης HAART νωρίτερα από την εκπλήρωση των κλασσικών κριτηρίων ένταξης, προκειμένου να κατασταλεί στο ελάχιστο το ιικό φορτίο, μειώνοντας την πιθανότητα ανάδειξης των μεταλλαγμένων X4 στελεχών. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα να παραταθεί η χρονική περίοδος επικράτησης των R5 στελεχών του ιού, στην οποία οι ετερόζυγοι CCR5Δ32 ασθενείς πιθανά να επωφελούνται από την ευεργετική επίδραση του αλληλομόρφου.

ΣΤ5. Η επίδραση του πολυμορφισμού CCR5-59029G/A

Το αλληλόμορφο CCR5-59029A σχετίζεται με υπερέκφραση του CCR5 και θα αναμενόταν η συσχέτισή του με χειρότερη κλινική πορεία των ασθενών. Στη μελέτη των O'Brien *et al*. (2000) οι ασθενείς με γονότυπο CCR5+/+, CCR2+/+ και CCR5-59029A/A που ξεκίνησαν HAART μείωσαν το VL κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 24 εβδομάδες θεραπείας και το διατήρησαν μη ανιχνεύσιμο για 6 μήνες σε μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με ασθενείς που έφεραν κάποιο «προστατευτικό» αλληλόμορφο CCR5Δ32, CCR2-64I ή CCR5-59029G[108]. Οι Brumme *et al.* (2001) δεν βρήκαν προστατευτική επίδραση του αλληλομόρφου CCR5-59029G, ενώ στην παρούσα μελέτη η παρουσία του αλληλομόρφου CCR5-59029G δεν σχετίστηκε με διαφορετική έκβαση της HAART.

ΣΤ6. Η επίδραση του πολυμορφισμού CXCR6-E3K

Η παρουσία του αλληλομόρφου CXCR6-3K σχετίστηκε με μειωμένη διάρκειας καταστολής του ιού μετά από έναρξη της HAART. Ο μέσος χρόνος παραμονής του VL<50cps/ml ήταν 48±3 μήνες σε ασθενείς ομόζυγους για το CXCR6-3E (n= 131) έναντι 19±6 μηνών σε ασθενείς ετερόζυγους ή ομόζυγους για το αλληλόμορφο CXCR6-3K (n= 6). Σύμφωνα με μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας η δυσμενής αυτή επίδραση του CXCR6-3K, που ήταν στατιστικά σημαντική (p=

0.036), διατυπώθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Σε αντίθεση οι Duggal *et al*. (2003) ανακοίνωσαν μια προστατευτική επίδραση του αλληλομόρφου CXCR6-3K επιμηκύνοντας το χρονικό διάστημα από την εκδήλωση PCP μέχρι το θάνατο σε μια ομάδα 60 ασθενών HIV-1 χωρίς θεραπεία με HAART[86].

Πιθανολογείται ότι η σημειακή αλλαγή στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα από γλυκίνη σε λυσίνη επηρεάζει τη συγγένεια του CXCR6 για τον HIV-1 επιτρέποντας τη μόλυνση των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό. Επειδή ο CXCR6 εκφράζεται από σημαντικούς εκπροσώπους της επίκτητης ανοσίας, τα Th1, Tc1 και NK λεμφοκύτταρα, πιθανόν η μετάλλαξη CXCR6-3K του υποδοχέα να τροποποιεί τα μηνύματα που μεταβιβάζονται σε αυτά από την πρόσδεση του φυσικού συνδέτη CXCL16 μεταβάλλοντας την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στη HIV-1 λοίμωξη ή άλλες λοιμώξεις όπως η PCP.

Στη δική μας ομάδα ασθενών η συχνότητα του αλληλομόρφου CXCR6-3K ήταν 2.8% και παρουσίασε μια απόκλιση από το ισοζύγιο κατά Hardy–Weinberg equilibrium (p= 0.001, λιγότεροι ετερόζυγοι από το αναμενόμενο). Οι Duggal *et al*. (2003) βρήκαν 44% τη συχνότητα του αλληλομόρφου CXCR6-3K σε μια μεγάλη ομάδα 805 Αφροαμερικανών ασθενών και ήταν σε ισοζύγιο με την κατανομή κατά Hardy-Weinberg. Βρήκαν ωστόσο τη συχνότητα του CXCR6-3K<1% σε Ευρωαμερικανούς ασθενείς, χωρίς να αναφέρουν δοκιμές κατά Hardy-Weinberg [86]. Παρά τη συμφωνία της συχνότητας αλληλομόρφου του πληθυσμού μελέτης μας με αυτή των Ευρωαμερικανών στη μελέτη των Duggal *et al*, η απόκλιση από το ισοζύγιο κατά Hardy-Weinberg μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό των ασθενών που βρέθηκαν με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Σε αντίθετη περίπτωση ο μικρός αριθμός των ετεροζυγωτών, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της Kaplan-Meier ανάλυσης, πιθανά να αντανακλά την αρνητική επίδραση του αλληλομόρφου CXCR6-3K στην επιβίωση των ασθενών.

ΣΤ7. Η επίδραση των πολυμορφισμών CX_3CR1-249I και CX_3CR1-T280M

Τα αλληλόμορφα CX_3CR1-249I και CX_3CR1-280M συσχετίστηκαν με καλύτερη έκβαση της HAART, ιδίως σε ομόζυγη κατάσταση. Συγκεκριμένα, ο μέσος χρόνος από την έναρξη της HAART μέχρι την άνοδο των CD4 πάνω από την επόμενη κατηγορία ήταν 3±1 μήνες και 16±2 μήνες για τους ομόζυγους CX_3CR1-249I/I και

CX_3CR1-249V/V αντίστοιχα (*p*=0.001, n=115). Παρομοίως στους γονότυπους CX_3CR1-280M/M και CX_3CR1-280T/T ο χρόνος ήταν 3±2 μήνες και 19±3 μήνες αντίστοιχα (*p*=0,024, n=115).

Ωστόσο ο ρόλος των πολυμορφισμών αυτών αμφισβητείται. Οι Faure *et al*. (2000) και Combadiere *et al*. (2003) ανακοίνωσαν σε ομάδες ασθενών χωρίς θεραπεία μια δυσμενέστερη πρόγνωση των ομοζυγωτών CX_3CR1-280M/M, οι οποίοι κατέληγαν νωρίτερα σε AIDS [99, 103]. Σε μια μελέτη 461 ασθενών που ξεκίνησαν HAART, οι Brumme *et al* (2003) βρήκαν υψηλότερο βαθμό ανοσολογικής αποτυχίας σε ομόζυγους CX_3CR1-249I/I συγκριτικά με τους ετερόζυγους ή ομόζυγους CX_3CR1-249V, όπως αυτή εκφράστηκε από τη πτώση των CD4 κάτω από τη βασική τους τιμή [102]. Σε άλλη μελέτη οι Singh *et al*. (2005) βρήκαν πιο ραγδαία εξέλιξη σε AIDS σε μια ομάδα παιδιών που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-249I και υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή αγωγή (όχι HAART) [104]. Αντίθετα, οι McDermott *et al*. (2000) ανέφεραν επιβράδυνση της εξέλιξης σε AIDS και επερχόμενο θάνατο σε ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-280M και δεν είχαν λάβει θεραπευτική αγωγή. Σύμφωνα με την ομάδα του McDermott το αποτέλεσμα αυτό σχετιζόταν με μειωμένη δραστηριότητα του μεταλλαγμένου υποδοχέα CX_3CR1-280M συγκριτικά με τον CX_3CR1-280T, όπως αυτό διαπιστώθηκε από δοκιμές σύντηξης σωματιδίων HIV με τους υποδοχείς αυτούς [117]. Ενώ οι Kwa *et al*. (2003) δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του απλότυπου CX_3CR1-249I280M και της εξέλιξης σε AIDS ή θάνατο, οι Vidal *et al*.(2005) ανέφεραν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου CX_3CR1-249I σε άτομα με βραδεία πορεία νόσου (long term non progressors), υποδηλώνοντας έτσι μια προστατευτική επίδραση του αλληλομόρφου CX_3CR1-249I [105,118].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην ομάδα ασθενών της παρούσας διατριβής η ταχύτητα επαναφοράς των CD4 σε άτομα που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-249I είχε μεγαλύτερο βαθμό στατιστικής σημαντικότητας (*p*= 0.0014) συγκριτικά με άτομα που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-280M (*p*=0,0241). Ταχεία αύξηση των CD4 παρατηρήθηκε ακόμη σε ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο CX_3CR1-249I χωρίς να είναι παρόν το CX_3CR1-280M. Ωστόσο δεν ήταν δυνατόν να μελετηθεί η επίδραση του αλληλομόρφου CX_3CR1-280M χωριστά από το CX_3CR1-249I, αφού το CX_3CR1-280M συγκληρονομείται πάντα με το CX_3CR1-249I, σε αντίθεση με το CX_3CR1-280T, που συγκληρονομείται και με τα δύο αλληλόμορφα CX_3CR1-249I και CX_3CR1-249V. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η προστατευτική επίδραση

του στενά συνδεδεμένου απλότυπου CX_3CR1-249I280M πιθανά να οφείλεται κυρίως στην επίδραση του αλληλομόρφου CX_3CR1-249I και λιγότερο του CX_3CR1-280M.

ΣΤ8. Η επίδραση του αλληλομόρφου promEotaxin-1385A ή απλοτύπου H7

Ο απλότυπος H7 περιλαμβάνει το μοναδικό συνδυασμό τριών αλληλομόρφων στα κωδικόνια 2136, 767 και 1385 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (2136T στον εκκινητή του MCP-1, 767G στο γονίδιο του MCP-1, 1385A στον εκκινητή του eotaxin). Το αλληλόμορφο promEotaxin-1385A αποτελεί ένα μόνο από τα τρία αλληλόμορφα (1385A, 2136T και 767G) του απλοτύπου, ωστόσο η παρουσία του είναι χαρακτηριστική για τον απλότυπο, αφού δεν εμφανίζεται σε άλλο συνδυασμό των τριών αλληλομόρφων. Έτσι η συχνότητα του έχει βρεθεί να ταυτίζεται με τη συχνότητα του απλοτύπου H7 (f=0.193 για τον promEotaxin-1385A και f=0.192 για τον H7)[97]. Στη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση τυχόν επιδράσεων του promEotaxin-1385A στην έκβαση της HAART, δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού promEotaxin-1385G/A και των τελικών σημείων που είχαν επιλεχθεί. Κατά επέκταση δεν φαίνεται ο απλότυπος H7 να έχει επίδραση στους ανοσολογικούς και ιολογικούς δείχτες επιτυχίας της HAART στον πληθυσμό της μελέτης μας. Στην βιβλιογραφία μέχρι στιγμής δεν αναφέρεται επίδραση του απλοτύπου στην κλινική πορεία της λοίμωξης μετά από έναρξη της HAART. Οι Modi *et al*. (2003) ανέφεραν μια αυξημένη εμφάνιση του H7 σε άτομα με πολλαπλή έκθεση στον HIV που παρέμεναν μη μολυσμένα, υποδηλώνοντας έτσι κάποια επίδραση του απλοτύπου στην ανθεκτικότητα έναντι της μόλυνσης[97].

ΣΤ9. Η επίδραση του πολυμορφισμού In1.1T/C

Στην παρούσα μελέτη ο πολυμορφισμός In1.1T/C δεν εκδήλωσε σημαντική συσχέτιση με την έκβαση της HAART, όσον αφορά τα τέσσερα τελικά σημεία που χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση. Σύμφωνα με τους An *et al*. (2002), το αλληλόμορφο In1.1C εντοπίζεται σε ιντρόνιο του γονιδίου CCL5 σε μια θέση που επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου μέσω μεταβολής της συγγένειας σύνδεσης των πρωτεϊνών του πυρήνα με το DNA. Έτσι το In1.1C καταλήγει σε μειωμένη μεταγραφή του CCL5, που είναι ο φυσικός συνδέτης του CCR5, ανταγωνίζοντας την

πρόσδεση του HIV στον υποδοχέα αυτό. Με αυτό το μηχανισμό προσπάθησαν οι Modi *et al* (2002) να ερμηνεύσουν την παρατήρηση ότι σε ομάδες ασθενών, που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπευτική αγωγή, η παρουσία του In1.1C συσχετίσθηκε με ταχύτερη πρόοδο της λοίμωξης σε AIDS[97]. Στην παρούσα μελέτη όμως δεν βρέθηκαν όμοιες επιδράσεις του In1.1C στην ανταπόκριση ασθενών στην έναρξη της HAART. Σημειώνεται όμως ότι η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που διερευνά την επίδραση του In1.1C/T πολυμορφισμού στην αποτελεσματικότητα της αγωγής για HIV-1 και τα αποτελέσματα περιμένουν επιβεβαίωση από μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερες ομάδες ασθενών.

ΣΤ10. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, το σύστημα των χημειοκινών φαίνεται να αποτελεί ένα εκτεταμένο σύστημα ανοσορυθμιστικών ουσιών και υποδοχέων με κεντρικό ρόλο στην διατήρηση της οργάνωσης και λειτουργίας του ανοσοποιητικού, την παθογένεια των λοιμώξεων, των αυτοάνοσων παθήσεων και γενικότερα των διεργασιών που εμπλέκουν φλεγμονή. Οι γνώσεις μας για το σύστημα αυτό είναι σχετικά πρόσφατες και περιορισμένες. Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύπτονται καινούργιες χημειοκίνες και αντίστοιχοι υποδοχείς. Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις έχουν μελετηθεί σε μικρό βαθμό, ενώ προσπάθεια καταβάλλεται να διακριθούν συγκεκριμένα πρότυπα παραγωγής χημειοκινών και συνεργασίας κυττάρων μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων που να συσχετίζονται με συγκεκριμένες φυσιολογικές ή παθολογικές διεργασίες. Ειδικότερα στην HIV-1 λοίμωξη το σύστημα των χημειοκινών προσέλκυσε έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον, ιδιαίτερα μετά την ανακάλυψη της προστατευτικής επίδρασης του μεταλλαγμένου υποδοχέα CCR5Δ32 στη μόλυνση και την πορεία της λοίμωξης. Το αποτέλεσμα είναι ήδη να χρησιμοποιείται θεραπευτικά το Enfuvirtide, που είναι αναστολέας της πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα CCR5.

Στη διατριβή αυτή διερευνήθηκε η επίδραση εννέα πολυμορφισμών του συστήματος των χημειοκινών στην θεραπευτική απόκριση ασθενών με HIV λοίμωξη μετά από έναρξη θεραπείας με HAART. Η θεραπευτική απόκριση αξιολογήθηκε με τη χρήση της τιμής των CD4 T-λεμφοκυττάρων και του ιικού φορτίου VL ως δεικτών παρακολούθησης, όπως περιγράφεται από καθιερωμένες οδηγίες[25]. Από τα

αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει ότι η παρουσία των αλληλομόρφων CXCL12-3A, CCR2-64I, CX_3CR1-249I και CX_3CR1-280M σχετίζεται με καλύτερη έκβαση της θεραπείας με HAART. Τα παραπάνω αλληλόμορφα σχετίζονται με ταχύτερο ρυθμό αποκατάστασης των CD4 λεμφοκυττάρων ή ισχυρότερη καταστολή του ιού κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αντίθετα η παρουσία του αλληλομόρφου CXCR6-3K συνοδεύεται από ταχύτερη υποτροπή της ιαιμίας και θεραπευτική αποτυχία, ενώ οι πολυμορφισμοί CCR5Δ32, CCR5-59029G/A, In1.1T/C και promEotaxin-1385G/A (απλότυπος H7) δεν ανέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με καλύτερη ή χειρότερη έκβαση της θεραπείας. Προσδοκούμε ώστε τα αποτελέσματα της μελέτης να συνεισφέρουν στη διευκρίνιση του ρόλου των πολυμορφισμών των χημειοκινών στην πορεία της λοίμωξης των ασθενών που λαμβάνουν HAART.

Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. J Clin Virol 34, 233-44 (2005).
2. Egger, M. et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. Lancet 360, 119-29 (2002).
3. Sepkowitz, K. A. AIDS--the first 20 years. N Engl J Med 344, 1764-72 (2001).
4. Quinn, T. C. Acute primary HIV infection. Jama 278, 58-62 (1997).
5. Daar, E. S. et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. Ann Intern Med 134, 25-9 (2001).
6. Schacker, T., Collier, A. C., Hughes, J., Shea, T. & Corey, L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. Ann Intern Med 125, 257-64 (1996).
7. Niu, M. T., Stein, D. S. & Schnittman, S. M. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. J Infect Dis 168, 1490-501 (1993).
8. Galai, N. et al. Changes in markers of disease progression in HIV-1 seroconverters: a comparison between cohorts of injecting drug users and homosexual men. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 8, 66-74 (1995).
9. Ho, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 373, 123-6 (1995).
10. Hughes, M. D. et al. Within-subject variation in CD4 lymphocyte count in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: implications for patient monitoring. J Infect Dis 169, 28-36 (1994).
11. Lang, W. et al. Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. J Acquir Immune Defic Syndr 2, 63-9 (1989).

12. Margolick, J. B. et al. Changes in T-lymphocyte subsets in intravenous drug users with HIV-1 infection. Jama 267, 1631-6 (1992).
13. Mellors, J. W. et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science 272, 1167-70 (1996).
14. Pantaleo, G. et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature 362, 355-8 (1993).
15. Schacker, T. W., Hughes, J. P., Shea, T., Coombs, R. W. & Corey, L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. Ann Intern Med 128, 613-20 (1998).
16. Stein, D. S., Korvick, J. A. & Vermund, S. H. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. J Infect Dis 165, 352-63 (1992).
17. Wei, X. et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 373, 117-22 (1995).
18. Giorgi, J. V. et al. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr 29, 346-55 (2002).
19. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Recomm Rep 41, 1-19 (1992).
20. Tassie, J. M. et al. Time to AIDS from 1992 to 1999 in HIV-1-infected subjects with known date of infection. J Acquir Immune Defic Syndr 30, 81-7 (2002).
21. Detels, R. et al. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. Aids 15, 347-55 (2001).
22. Lee, L. M., Karon, J. M., Selik, R., Neal, J. J. & Fleming, P. L. Survival after AIDS diagnosis in adolescents and adults during the treatment era, United States, 1984-1997. Jama 285, 1308-15 (2001).
23. Centers for Disease Control and Prevention. HIV-AIDS Surveillance Report 1985-2002, United States. HIV Clin Trials (2002).
24. Siliciano, J. D. et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. Nat Med 9, 727-8 (2003).

25. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents, October 6, 2005 by the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection

HIV Clin Trials (2005).

26. Yoshimura, T. et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 9233-7 (1987).

27. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12, 121-7 (2000).

28. Murphy, P. M. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. Pharmacol Rev 54, 227-9 (2002).

29. Bleul, C. C., Schultze, J. L. & Springer, T. A. B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. J Exp Med 187, 753-62 (1998).

30. Campbell, J. J., Pan, J. & Butcher, E. C. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. J Immunol 163, 2353-7 (1999).

31. Yoshie, O., Imai, T. & Nomiyama, H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. J Leukoc Biol 62, 634-44 (1997).

32. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. Immunol Today 19, 568-74 (1998).

33. Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G. & Cyster, J. G. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. J Exp Med 190, 1123-34 (1999).

34. Gunn, M. D. et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 258-63 (1998).

35. Mackay, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. Nat Immunol 2, 95-101 (2001).

36. Sallusto, F. et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. Eur J Immunol 28, 2760-9 (1998).

37. Sozzani, S. et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. J Immunol 161, 1083-6 (1998).
38. Campbell, J. J. et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 279, 381-4 (1998).
39. Gerszten, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature 398, 718-23 (1999).
40. Kitayama, J., Mackay, C. R., Ponath, P. D. & Springer, T. A. The C-C chemokine receptor CCR3 participates in stimulation of eosinophil arrest on inflammatory endothelium in shear flow. J Clin Invest 101, 2017-24 (1998).
41. Tanaka, Y. et al. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. Nature 361, 79-82 (1993).
42. Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukazawa, T. & Tashiro, K. Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. J Neurol Sci 129, 223-7 (1995).
43. Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L. & Hancock, W. W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6873-8 (1999).
44. McManus, C. et al. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J Neuroimmunol 86, 20-9 (1998).
45. Simpson, J. et al. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. J Neuroimmunol 108, 192-200 (2000).
46. Iarlori, C. et al. RANTES production and expression is reduced in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b. J Neuroimmunol 107, 100-7 (2000).
47. Yun, J. J. et al. Early and late chemokine production correlates with cellular recruitment in cardiac allograft vasculopathy. Transplantation 69, 2515-24 (2000).
48. Belperio, J. A. et al. The role of the CC chemokine, RANTES, in acute lung allograft rejection. J Immunol 165, 461-72 (2000).

49. Gao, W. et al. Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. J Clin Invest 105, 35-44 (2000).
50. Hancock, W. W. et al. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. J Exp Med 192, 1515-20 (2000).
51. Kapoor, A. et al. Early expression of interferon-gamma inducible protein 10 and monokine induced by interferon-gamma in cardiac allografts is mediated by CD8+ T cells. Transplantation 69, 1147-55 (2000).
52. Kapoor, A. et al. Intragraft expression of chemokine gene occurs early during acute rejection of allogeneic cardiac grafts. Transplant Proc 32, 793-5 (2000).
53. Kondo, T. et al. Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells. Transplantation 69, 969-77 (2000).
54. Watarai, Y. et al. Intraallograft chemokine RNA and protein during rejection of MHC-matched/multiple minor histocompatibility-disparate skin grafts. J Immunol 164, 6027-33 (2000).
55. al-Mughales, J., Blyth, T. H., Hunter, J. A. & Wilkinson, P. C. The chemoattractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines. Clin Exp Immunol 106, 230-6 (1996).
56. Qin, S. et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. J Clin Invest 101, 746-54 (1998).
57. Taylor, P. C. et al. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43, 38-47 (2000).
58. Garred, P. et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 25, 1462-5 (1998).
59. Leek, R. D. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. Cancer Res 56, 4625-9 (1996).
60. Smith, D. R. et al. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. J Exp Med 179, 1409-15 (1994).
61. Ueno, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. Clin Cancer Res 6, 3282-9 (2000).

62. Jordan, N. J. et al. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. J Clin Invest 104, 1061-9 (1999).
63. Oyamada, H. et al. CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation. Int Arch Allergy Immunol 120 Suppl 1, 45-7 (1999).
64. Muller, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410, 50-6 (2001).
65. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 340, 115-26 (1999).
66. Gosling, J. et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. J Clin Invest 103, 773-8 (1999).
67. Gu, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. Mol Cell 2, 275-81 (1998).
68. Dawson, T. C., Kuziel, W. A., Osahar, T. A. & Maeda, N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis 143, 205-11 (1999).
69. Speck, R. F. et al. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. J Virol 71, 7136-9 (1997).
70. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. J Exp Med 185, 621-8 (1997).
71. Grivel, J. C. & Margolis, L. B. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. Nat Med 5, 344-6 (1999).
72. Albini, A. et al. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 13153-8 (1998).
73. Benelli, R. et al. Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes: implications for Tat-mediated pathogenesis. J Infect Dis 182, 1643-51 (2000).

74. de Paulis, A. et al. Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. J Immunol 165, 7171-9 (2000).
75. Xiao, H. et al. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 11466-71 (2000).
76. Dean, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science 273, 1856-62 (1996).
77. Huang, Y. et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med 2, 1240-3 (1996).
78. Ioannidis, J. P. et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. Ann Intern Med 135, 782-95 (2001).
79. Liu, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell 86, 367-77 (1996).
80. Stewart, G. J. et al. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. Aids 11, 1833-8 (1997).
81. Mulherin, S. A. et al. Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. Aids 17, 377-87 (2003).
82. Winkler, C. et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). Science 279, 389-93 (1998).
83. Smith, M. W. et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS),

Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. Science 277, 959-65 (1997).

84. Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. & Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. Aids 18, 729-38 (2004).

85. McDermott, D. H. et al. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Lancet 352, 866-70 (1998).

86. Duggal, P. et al. Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans. Genes Immun 4, 245-50 (2003).

87. Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol 17, 657-700 (1999).

88. Krambovitis, E. & Spandidos, D. A. HIV-1 infection: is it time to reconsider our concepts? Int J Mol Med 18, 3-8 (2006).

89. Zafiropoulos, A., Baritaki, S., Vlata, Z., Spandidos, D. A. & Krambovitis, E. Dys-regulation of effector CD4+ T cell function by the V3 domain of the HIV-1 gp120 during antigen presentation. Biochem Biophys Res Commun 284, 875-9 (2001).

90. An, P. et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 10002-7 (2002).

91. Cinque, P. et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. Aids 12, 1327-32 (1998).

92. Conant, K. et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 3117-21 (1998).

93. Monteiro de Almeida, S. et al. Dynamics of monocyte chemoattractant protein type one (MCP-1) and HIV viral load in human cerebrospinal fluid and plasma. J Neuroimmunol 169, 144-52 (2005).

94. Vicenzi, E. et al. Divergent regulation of HIV-1 replication in PBMC of infected individuals by CC chemokines: suppression by RANTES, MIP-

1alpha, and MCP-3, and enhancement by MCP-1. J Leukoc Biol 68, 405-12 (2000).

95. Blanpain, C. et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. Blood 94, 1899-905 (1999).

96. Schols, D., Proost, P., Van Damme, J. & De Clercq, E. RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). J Virol 71, 7300-4 (1997).

97. Modi, W. S. et al. MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. Aids 17, 2357-65 (2003).

98. Foussat, A. et al. Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. Blood 98, 1678-86 (2001).

99. Combadiere, B., Faure, S., Autran, B., Debre, P. & Combadiere, C. The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients. Aids 17, 1279-90 (2003).

100. Cotter, R. et al. Fractalkine (CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia. J Neurovirol 8, 585-98 (2002).

101. Garin, A. et al. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. J Immunol 171, 5305-12 (2003).

102. Brumme, Z. L. et al. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. Aids 17, 201-8 (2003).

103. Faure, S. et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. Science 287, 2274-7 (2000).

104. Singh, K. K., Hughes, M. D., Chen, J. & Spector, S. A. Genetic polymorphisms in CX3CR1 predict HIV-1 disease progression in children independently of CD4+ lymphocyte count and HIV-1 RNA load. J Infect Dis 191, 1971-80 (2005).

105. Vidal, F. et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1 249I variant allele. J Acquir Immune Defic Syndr 40, 527-31 (2005).

106. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-50 (1987).

107. Van Vaerenbergh, K. et al. Initiation of HAART in drug-naive HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35.5 months in 60% of the patients. AIDS Res Hum Retroviruses 18, 419-26 (2002).
108. O'Brien, T. R. et al. Effect of chemokine receptor gene polymorphisms on the response to potent antiretroviral therapy. Aids 14, 821-6 (2000).
109. Wit, F. W., van Rij, R. P., Weverling, G. J., Lange, J. M. & Schuitemaker, H. CC chemokine receptor 5 delta32 and CC chemokine receptor 2 64I polymorphisms do not influence the virologic and immunologic response to antiretroviral combination therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. J Infect Dis 186, 1726-32 (2002).
110. Lathey, J. L. et al. Associations of CCR5, CCR2, and stromal cell-derived factor 1 genotypes with human immunodeficiency virus disease progression in patients receiving nucleoside therapy. J Infect Dis 184, 1402-11 (2001).
111. Guerin, S. et al. CCR5 delta32 deletion and response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. Aids 14, 2788-90 (2000).
112. Kasten, S. et al. Positive influence of the Delta32CCR5 allele on response to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-1 infected patients. Eur J Med Res 5, 323-8 (2000).
113. Valdez, H., Purvis, S. F., Lederman, M. M., Fillingame, M. & Zimmerman, P. A. Association of the CCR5delta32 mutation with improved response to antiretroviral therapy. Jama 282, 734 (1999).
114. Yamashita, T. E. et al. Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study. Aids 15, 735-46 (2001).
115. Bratt, G. et al. Treatment history and baseline viral load, but not viral tropism or CCR-5 genotype, influence prolonged antiviral efficacy of highly active antiretroviral treatment. Aids 12, 2193-202 (1998).
116. Brumme, Z. L. et al. CCR5Delta32 and promoter polymorphisms are not correlated with initial virological or immunological treatment response. Aids 15, 2259-66 (2001).
117. McDermott, D. H. et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. Science 290, 2031 (2000).

118. Kwa, D., Boeser-Nunnink, B. & Schuitemaker, H. Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. Aids 17, 759-61 (2003).

Θ. ΑΝΑΤΥΠΑ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Journal of Clinical Virology 34 (2005) 302–309

JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY

www.elsevier.com/locate/jcv

CCR2-64I and CXCL12 3′A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy

Andrew M. Passam [a], Alexandros Zafiropoulos [a], Spiros Miyakis [a], Ioannis Zagoreos [b], Nikolaos G. Stavrianeas [b], Elias Krambovitis [c], Demetrios A. Spandidos [a,*]

[a] *Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, P.O. Box 1393, Heraklion 71100, Crete, Greece*
[b] *Department of Dermatology, University of Athens, A. Syngros Hospital, Athens, Greece*
[c] *Department of Applied Biochemistry and Immunology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion, Greece*

Received 6 February 2004; accepted 1 May 2004

Abstract

Background: The chemokine receptor polymorphisms CCR5Δ32, CXCL12 3′A, CCR2-64I and CCR5-59029 G/A have been demonstrated to affect HIV-1 infection and progression.
Objective: We studied the impact of the above polymorphisms on the effectiveness of a 30-month treatment with highly active antiretroviral therapy (HAART) in 149 HIV-1 patients.
Study design: We stratified the patients according to CD4 CDC criteria and applied Kaplan–Meier analysis using the following end-point criteria: (a) the time from HAART initiation to undetectable viral load (VL) counts (VL < 50 copies/ml), (b) the duration of undetectable VL status and (c) the time required for CD4+ T-cell counts to pass over the 500 cells/ml threshold.
Results: Our results in the second group (CD4 201–500) revealed that patients with the CCR2-64I allele achieved undetectable VL counts at 3.5 ± 0.48 months as compared to 10.26 ± 1.42 months in the control group ($p = 0.018$). The VL remained undetectable for 28 ± 2 months, in contrast to 20 ± 2 months in the control group ($p = 0.048$). Patients carrying CXCL12 3′A restored the CD4 population faster than the control group (9 ± 2 and 14 ± 2 months, respectively, $p = 0.023$). The CCR5Δ32 and CCR5-59029 G/A alleles did not appear to affect the parameters studied.
Conclusions: Our results suggest that patients carrying either CCR2-64I or CXCL12 3′A have a more favorable prognosis during HAART treatment.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Antiretroviral therapy; Chemokines; HIV-1; CCR5; CXCL12; CCR2

1. Introduction

HIV-1 gains entry into macrophages and T-lymphocytes via the CD4 receptor and specific coreceptors. The main coreceptors identified to date are CCR5 on macrophages and CD4+ T-lymphocytes, and CXCR4 on naïve and resting memory CD4+ T-lymphocytes (Moser and Loetscher, 2001).

Several recent reports provide evidence that mutations in chemokine receptor genes affect the progress of HIV infection in untreated patients. A 32-bp deletion in the CCR5 gene (CCR5Δ32) confers resistance to infection in homozygous individuals and delayed disease progression in infected heterozygous patients (Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996; Stewart et al., 1997; Ioannidis et al., 2001). 59029G/A is an A versus G single nucleotide variant at base pair 59029G in the promoter region of the CCR5 gene. Both alleles are common, with a frequency range of 43%–68% for the G allele, depending on the population. The A allele exhibits a 50% higher expression of CCR5 in vitro, and confers faster disease progression than the G allele (3.8 years faster progression comparing both homozygous conditions). The G allele is in complete linkage disequilibrium with CCR5Δ32 and CCR2-64I

* Corresponding author. Tel.: +30 810 394633; fax: +30 810 394633.
E-mail address: spandidos@spandidos.gr (D.A. Spandidos).

1386-6532/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jcv.2004.05.021

(McDermott et al., 1998). CCR2 is a minor coreceptor for HIV infection. Although the virus does not use directly CCR2 for cell entry, it has been shown that disease progression is delayed in patients with the CCR2-64I single amino acid mutant (Mulherin et al., 2003). CCR2-64I is in linkage disequilibrium with CCR5Δ32 (Smith et al., 1997). CXCL12 is a ligand for CXCR4. CXCL12 3′A is a single base variant in the 3′ untranslated region of the CXCL12 gene, which was initially reported to delay progression to death in late stages of infection (Winkler et al., 1998), but recent reports provide evidence that it may accelerate the actual disease progression (Mummidi et al., 1998; van Rij et al., 1998; Brambilla et al., 2000; Ioannidis et al., 2001).

The effect of the above polymorphisms (CCR5Δ32, CCR2-64I, CXCL12-3A and CCR5-59029G/A) on clinical progression has been demonstrated more clearly in untreated patients. In patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) there have been studies which reveal improved immunological and virological responses in association with the referred genes (Valdez et al., 1999; Guerin et al., 2000; Kasten et al., 2000; O'Brien et al., 2000; Yamashita et al., 2001; Van Vaerenbergh et al., 2002), in contrast to others which find no such correlation (Bratt et al., 1998; Brumme et al., 2001; Wit et al., 2002). In the present study, we investigated the potential influence of these polymorphisms on the immunological and virological response to HAART in a group of our patients at "A. Syngros" Hospital. We report here that in a subgroup of patients with baseline CD4 201–500 cells/ml, CCR2-64I affected viral load suppression and CXCL12 3′A accelerated CD4+ T-lymphocyte restoration significantly, whereas the CCR5Δ32 and CCR5-59029 G/A alleles had no statistically significant effect on the response to HAART initiation.

2. Material and methods

2.1. Patients

"A. Syngros" Hospital is one of the major AIDS treating hospitals in Greece. The study included 166 patients followed-up in the HIV clinic of this hospital during a 30-month period (October 2000–April 2003). The patient group consisted of 141 males and 25 females; the mean age at time of diagnosis was 35.5 (19–71) years. The patients were divided in three groups according to CDC criteria (Anon, 1993) based on CD4 cell count. The mean baseline viral load (VL) of the total group at HAART initiation was 157,313 cps/ml (range <50–2,100,000 cps/ml). In the first CD4 group (CD4: 0–200 cells/ml) the median baseline VL at HAART initiation was 342,243.7 cps/ml (range 2100–2,100,000 cps/ml); in the second CD4 group (CD4: 201–500 cells/ml) the median baseline VL was 77,426.38 cps/ml (range <50–600,000 cps/ml) and in the third group (CD4: >500 cells/ml) the median VL was 221,037.6 cps/ml (range 50–2,300,000 cps/ml). Until October 2002, 17 patients remained without therapy due to asymptomatic status and satisfactory CD4 and VL counts according to guidelines (Anon, 2002). Among the 149 treated patients, 97 were treatment naïve when initiating HAART and 52 had been given antiretroviral medication prior to HAART administration. The patients given therapy had all received a dual nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) regimen for a mean time of 25.96 months (range 1–68 months) before HAART. They switched their therapy to HAART by changing at least one NRTI and adding a PI or an NNRTI. On starting HAART, 113 patients were taking 2NRTIs plus 1PI, 33 were taking 2NRTIs and 1NNRTI and 3 patients were taking 2NRTIs plus 2PIs. Monitoring of CD4 and VL counts of patients was performed according to standard guidelines for HAART (Anon, 2002). During the study period six patients died, of which five due to AIDS related illness (four with lymphomas and one with mycobacterium avium infection). Ethical approval was obtained from the local ethics board of Syngros Hospital and all participants gave written informed consent. The medical records and the genotyping results had anonymous codes.

2.2. Blood collection and processing

Peripheral blood was collected in EDTA anticoagulated tubes. Cell-free plasma was obtained by centrifugation (1000^3 g for 20 min) and stored at −70 °C until tested. The remaining blood cells were used for extraction of genomic DNA.

2.3. CD4 T-cell count and viral load estimation

HIV-1 RNA levels were measured in blood plasma using RNA amplification assays (Nuclisens-NASBA Diagnostics). CD4+ T-cell count was determined by four-color flow cytometry using monoclonal antibodies from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

2.4. DNA extraction and genotyping

DNA extraction was carried out according to previously published methods (Saridaki et al., 2003). All specimens were examined for the presence of amplifiable DNA. In each PCR reaction two negative controls were employed to make sure that no contaminants were introduced in the initial PCR.

The primers used in the study were

CCR5-Δ32F: 5′-GTGGTGACAAGTGTGATCAC-3′
CCR5-Δ32R: 5′-TTGTAGGGAGCCCAGAAGAG-3′
CXCL12F: 5′-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3′
CXCL12R: 5′-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3′
CCR2F: 5′-TTGTGGGCAACATGATGG-3′
CCR2R: 5′-CTGTGAATAATTTGCACATTGC-3′
CCR5-59029F: 5′-CCCGTGAGCCCATAGTTAA AACTC-3′
CCR5-59029R: 5′-TCACAGGGCTTTTCAACAGT AAGG-3′.

The reaction mix consisted of PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 mM of each primer and 1.2 units/reaction Taq DNA polymerase (Invitrogen). The reaction conditions were (a) for CCR5Δ32 an initial denaturation at 94 °C for 3 min, and then 35 cycles at 92 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and finally extension 72 °C for 10 min (Huang et al., 1996), (b) for CXCL12-3A PCR conditions as above with annealing temperature at 58 °C. PCR products were digested by 10 units MspI/reaction (NEBS) at 37 °C for 4 h (Winkler et al., 1998), (c) for CCR2-64I 3A PCR conditions as above with annealing temperature at 52 °C. The products were digested with 10 units/reaction BSaBI (NEBS) at 60 °C for 4 h (Shieh et al., 2000) and (d) for CCR5-59029G/A PCR conditions as above with annealing temperature at 60 °C. The reaction product was digested with 10 units/reaction BSp1286I (NEBS) at 37 °C for 5 h (McDermott et al., 1998). All PCR samples with an undigested result were submitted to redigestion with 20 units/reaction of enzyme and overnight incubation. The products of the digestion (CCR5-Δ32, CCR5-59029G/A and CXCL12-3A) were visualized by agarose gel electrophoresis (2%) and ethidium bromide staining. The CCR2-64I digest was visualized in acrylamide gel electrophoresis and silver staining.

2.5. Statistical analysis

We defined baseline CD4 (time = 0) and baseline VL (time = 0) from the most recent measurement prior to HAART initiation (range: 1–4 months prior to therapy). Kaplan–Meier analysis was performed using three different end-points: (i) time from baseline CD4 to the first CD4 count that exceeded the next CD4 category according to the CD4 categorization adopted in the CDC revised classification system 1993 (if baseline CD4 ≤200 the time to first CD4 count >200, if 200 < baseline CD4 <500 the time to first CD4 count ≥500) We defined this end-point as a criteria of therapy success, because a patient who changes CD4 category has a better prognosis according to the CDC classification system. If the patient never reached this end-point, he was censored at the date of the last CD4 measurement, (ii) time to the first undetectable VL count (VL <50 cps/mm^3). If the patient never reached this end-point, he was censored at the date of the last VL measurement and (iii) time from first undetectable VL to the first following VL count >50. Patients that never reached VL <50 in the previous analysis were excluded from this end-point (six patients). If a patient reached the cut-off point without elevating the VL, he was censored at the date of the last VL count. For all three end-points we defined the cut-off point as 30 months after HAART initiation. Additionally, in all three end-points patients who died were censored at the time of the last CD4 or VL count. For the VL end-points, we stratified the analysis according to baseline CD4 counts (category 1 = baseline CD4 ≤200, category 2 = baseline CD4 >200 and ≤500 and category 3 = baseline CD4 >500). Because of the small number of CCR2-64I and CXCL12-3A homozygotes, we examined the effect that the presence of the allele conferred on patients versus the effect of the homozygous wild-type state.

3. Results

We performed genotyping for CCR5Δ32, CCR5-59029G/A, CCR2-64I and CXCL12-3A in 166 individuals. A summary of the genotyping results is shown in Table 1. The distribution of genotype frequency was in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium in all the polymorphisms that were analyzed.

We performed a separate Kaplan–Meier analysis for each of the three patient categories of baseline CD4 at the time of HAART initiation (first group ≤200 cells/ml, second group = 201–500 cells/ml and third group >500 cells/ml), in order to examine the effect of the polymorphisms on HAART response in patients with similar start points.

Regarding the end-point defined by the time for the baseline CD4 to increase to the next CD4 category (Fig. 1), we found that patients with a baseline CD4 ≤200 and those with a baseline CD4 >500 showed no statistically significant difference in the presence or absence of the CCR5Δ32, CCR2-64I, CXCL12-3A or CCR5-59029G variants. In patients with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml, we found no difference in the time for CD4 to increase to over 500 cells/ml in the presence or absence of the CCR5-59029G and CCR2-64I variants. However, in the same category of patients, we observed a significant ($p = 0.0238$, $n = 69$) acceleration of CD4 escalation above 500 cells/ml, in the presence of the CXCL12-3A allele compared to the wild-type (mean 9 ± 2 and 14 ± 2, respectively). In addition, we observed a trend of

Table 1
Summary of the genotyping results in the HIV patient groups receiving HAART

N	CD4 count stratification according to CDC			
	>500 31 (%)	201–500 71 (%)	0–200 47 (%)	Total 149 (%)
CCR5-Δ32				
+/+	29 (93)	65 (91)	42 (89)	136 (91)
+/D32	2 (7)	6 (9)	5 (11)	13 (9)
D32/D32	0	0	0	0
CXCL12				
+/+	16 (51)	38 (54)	25 (53)	79 (53)
+/3A	13 (42)	29 (41)	20 (43)	62 (41)
3A/3A	2 (7)	4 (5)	2 (4)	8 (6)
CCR2				
+/+	22 (71)	58 (81)	35 (74)	115 (78)
+/64I	8 (26)	12 (17)	12 (26)	32 (21)
64I/64I	1 (3)	1 (2)	0	2 (1)
CCR5 59029				
A/A	8 (26)	17 (24)	11 (24)	36 (24)
A/G	13 (42)	36 (51)	18 (38)	67 (45)
G/G	10 (32)	18 (25)	18 (38)	46 (31)

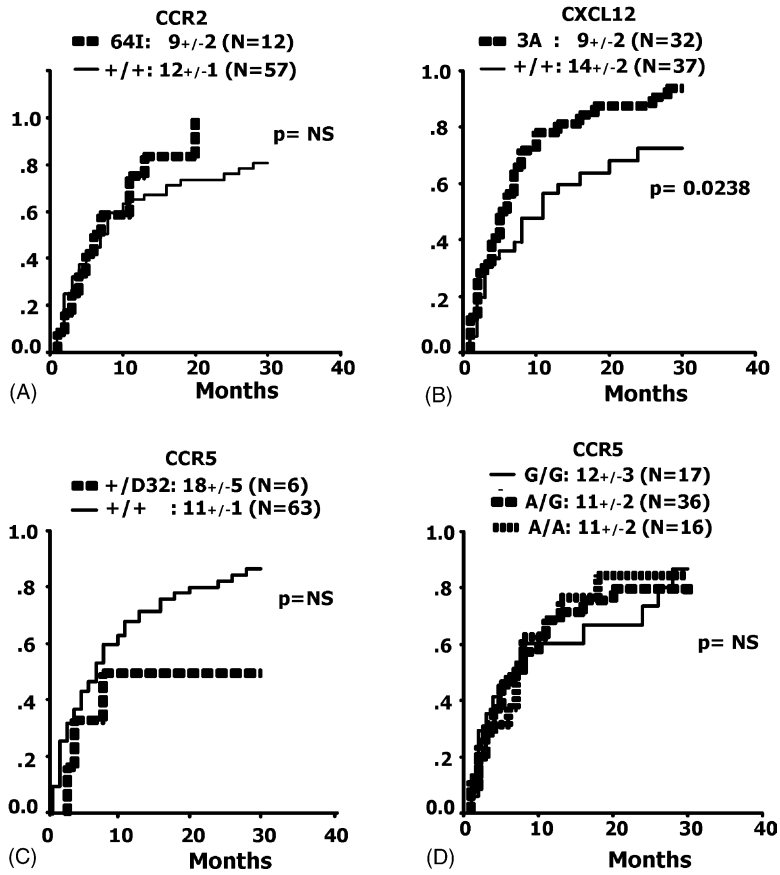


Fig. 1. One minus survival plots of Kaplan–Meier analysis from patients with CD4 count 201–500, demonstrating the genotype effect on the end-point which was defined as the time from baseline CD4 to the first CD4 count that exceeded the 500 cell/ml mark (according to the CD4 categorization adopted in the CDC revised classification system 1993). (A) CCR2-64I; (B) CXCL12-3A; (C) CCR5-5Δ32 and (D) CCR5-59029G/A. *p*: Probability of the LogRank test, *N*: number of patients and NS: $p < 0.05$.

the CCR5Δ32 allele to delay CD4 elevation compared to the wild-type (mean 18 ± 5 and 11 ± 1, respectively), which nevertheless was not statistically significant ($p = 0.1324$, $n = 69$).

Regarding the end-point defined by the time from HAART initiation until the first VL count below the detection limit (<50 cps/ml) (Fig. 2), we found no significant differences between the chemokine variants and the wild-type in patients with a baseline CD4 of <200 cells/ml or >500 cells/ml. In patients with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml, we found no effect of the CCR5Δ32 and CCR5-59029G variants on viral suppression. However, in the same category of patients we demonstrated that the presence of a CCR2-64I allele conferred a significantly more rapid VL reduction than the homozygous wild-type condition (mean 3.5 ± 0.4 and 10.2 ± 1.4 months, respectively, $p = 0.0183$, $n = 69$). The presence of the CXCL12-3A allele also tended to accelerate VL reduction compared to the wild-type (7.4 ± 1.6 and 10.5 ± 1.7, respectively), but the result was not statistically significant ($p = 0.1035$, $n = 69$).

Regarding the end-point defined by the time from the first VL count under detectable limit until viraemia recurrence (Fig. 3), we found no significant effect of the CCR5Δ32, CCR5-59029G, CXCL12-3A and CCR2-64I variants in patients with a baseline CD4 <200 cps/ml or >500 cps/ml. In patients with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml, we found no effect of the CCR5Δ32, CCR5-59029G or CXCL12-3A alleles on the duration of viral suppression. On the other hand, in the same category of patients, CCR2-64I carriers manifested a significant delay in viraemia recurrence compared to the wild-type (mean 28 ± 2 and 20 ± 2, respectively, $p = 0.0482$, $n = 63$). Six patients were not included in this analysis because they never achieved undetectable VL during their follow-up.

4. Discussion

We investigated four polymorphisms previously reported to affect clinical progression in HIV-1 patients. We report here that in a subgroup of patients CXCL12-3A and CCR2-64I alleles continue to have a positive influence on clinical progression after HAART initiation through more rapid CD4 restoration and stronger viral suppression, respectively. By contrast, no significant protective effect was demonstrated by the CCR5Δ32 or CCR5-59029G polymorphisms.

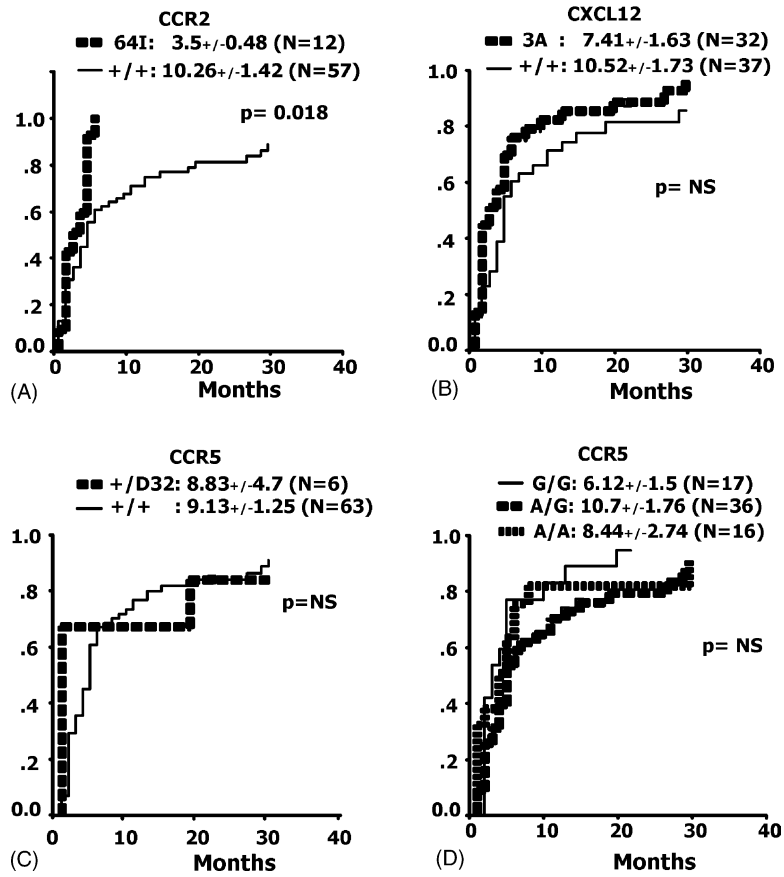


Fig. 2. One minus survival plots of Kaplan–Meier analysis from patients with CD4 count 201–500, demonstrating the genotype effect on the end-point which was defined as the time to the first undetectable VL count (VL <50 cps/mm^3). (A) CCR2-64I; (B) CXCL12-3A; (C) CCR5-5Δ32 and (D) CCR5-59029G/A. *p*: Probability of the LogRank test, *N*: number of patients and NS: $p < 0.05$.

To rule out the potential influence of medication prior to HAART on our results, we performed separate Kaplan–Meier analysis for therapy-naïve patients and therapy-experienced patients. There was no significant difference observed between the two groups (hence the data are not presented), although stratification of the data according to the CD4 baseline resulted in groups of patients too small for an accurate analysis. The fact that patients were analyzed in different groups depending on the baseline CD4 levels also reduces possible bias, as all members of each group had a similar immunological starting point. Moreover, all therapy-experienced patients started HAART regimens containing at least two new antiretroviral agents. However, in our results, we must take under consideration possible complications from linkage disequilibrium, cohort effects, different viral strains, regimen alterations due to side effects and subsequent compliance problems.

4.1. Effect of CCR2-64I

The most profound observations were obtained in the group of patients with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml. A significant protective effect of CCR2-64I was noted, manifested by faster VL reduction to undetectable levels (VL <50 cps/ml) ($p < 0.0183$, $n = 69$) and a prolonged period of time until viraemia recurrence ($p < 0.0482$, $n = 63$). The significance of this effect on sustaining undetectable VL levels increased by increasing the cut-off point, because the remaining patients were carriers of a CCR2-64I ($p < 0.0286$ with no cut-off point). However, due to different follow-up durations and subsequent increased censorship after the 30-month limit, we elected to retain the cut-off point at 30 months. This effect has also been reported in a study of 25 HAART treated patients in which it was found that CCR2-64I was present only in the group of patients with a good response to HAART, but not in the group with virological failure (Van Vaerenbergh et al., 2002). Also, O'Brien et al. (2000) has reported a similar effect of CCR2-64I in combination with the CCR5Δ32 and 59029G variants. On the contrary, Wit et al. (2002) found no protective effect by the 64I allele in achieving faster VL clearance, in preventing viraemia recurrence or in the extent of CD4 escalation after 96 weeks of HAART.

4.2. Effect of CXCL12-3A′

We also observed that CXCL12-3A exerted a protective role in HAART-treated patients with a baseline CD4 between 201 and 500 cells/ml by accelerating the restoration of CD4

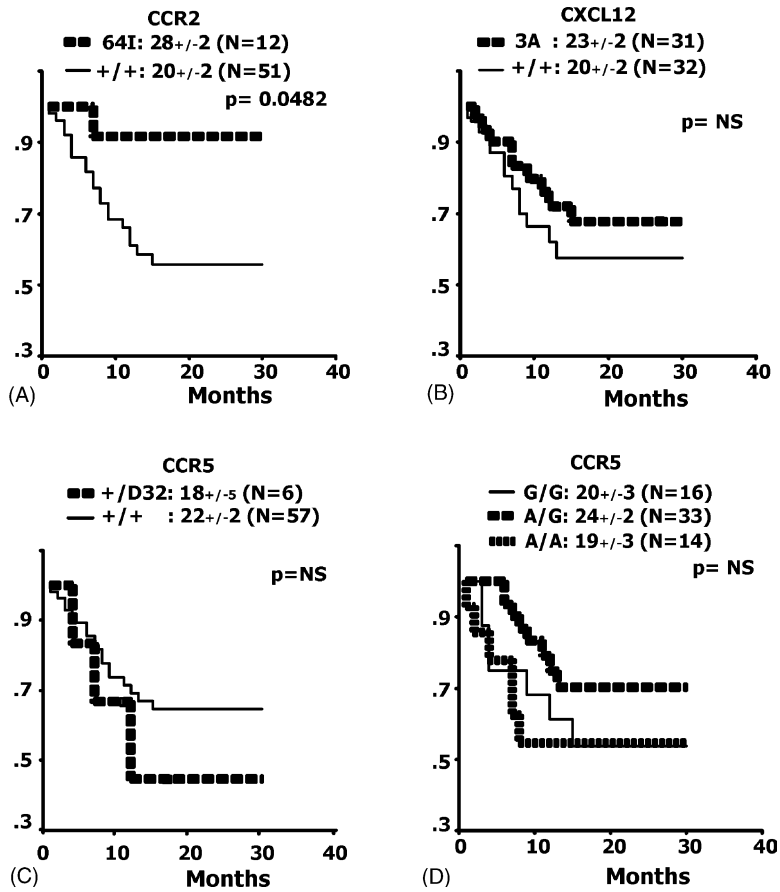


Fig. 3. Survival plots of Kaplan–Meier analysis from patients with CD4 count 201–500, demonstrating the genotype effect on the end-point which was defined as the time from first undetectable VL to the first following VL count >50 cps/mm^3. Six patients from the previous analysis were excluded from this end-point because their VL never became undetectable. (A) CCR2-64I; (B) CXCL12-3A; (C) CCR5-5Δ32 and (D) CCR5-59029G/A. *p*: Probability of the LogRank test, *N*: number of patients and NS: $p < 0.05$.

counts above the level of 500 cells/ml. This effect was significant ($p < 0.0238$, $n = 69$), and it is the first time, to our knowledge, that it has been reported in relation to HAART. Lathey et al. (2001) reported a significant increase in the rate of AIDS progression in homozygous patients receiving one NRTI (non-HAART regimen). Also in a group of 272 patients CXCL12-3A did not improve the rate of VL clearance. Instead it correlated with a slightly higher suppression failure (O'Brien et al., 2000). In our study, CXCL12-3′A also revealed a trend for more rapid VL decline ($p < 0.1035$, $n = 69$). In view of the fact that this polymorphism involves CXCR4 receptors and affects X4 rather than R5 HIV-1 strains, the precise role of the allele in relation to treatment and CD4 counts is of great interest and merits further investigation.

4.3. Effect of CCR5Δ32

Although CCR5Δ32 had been expected to reveal a protective effect on the CD4-VL response, as in untreated patients, our results indicated a trend ($p = 0.1324$, $n = 69$) of delayed CD4 elevation in CCR5Δ32 carriers with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml. Indeed, the role of CCR5Δ32 is not as profound in HAART treated patients as it is in untreated individuals. In other studies with heterozygous CCR5Δ32 patients a higher immunological and virological response to HAART has been reported (Valdez et al., 1999; Guerin et al., 2000; Kasten et al., 2000; Yamashita et al., 2001). On the contrary, Bratt et al. (1998) found no correlation between CCR5Δ32 and VL during the first 12 months of HAART. Similarly, Brumme et al. (2001) found that CCR5Δ32 and CCR5 promoter polymorphisms had no effect on viral suppression and retention after HAART, whereas Wit et al. (2002) found no correlation between CCR5Δ32 and virological or immunological response to HAART. Although in our study the small number of treated patients with the CCR5+/Δ32 genotype (13 patients) does not allow us to conclude that CCR5Δ32 has no effect on the CD4-VL response, it is interesting that in this group of 166 patients, 6 out of 19 CCR5Δ32 heterozygotes did not need HAART according to the American Department of Health and Human Services therapy guidelines (Anon, 2002) (median follow-up duration = 59

months), whereas only 11 out of 147 CCR5Δ32 negative patients could remain without therapy (median follow-up duration = 34 months) ($p = 0.005$, X^2 Fisher exact test). It is possible that the ability of CCR5Δ32 heterozygotes to retain satisfactory CD4 and VL counts, compared with wild-type patients, keeps them therapy-naïve, but virus-prevalent for longer periods of time, thus affecting their primary response to HAART when it is finally initiated. Studies with a larger number of patients will be needed to provide further data on the putative role of CCR5Δ32 during treatment.

4.4. Effect of CCR5-59029G/A

Similarly, the effect of CCR5 promoter polymorphism 59029G/A on the clinical progression of HAART treated patients is not clear. O'Brien et al. (2000) found that HAART treated patients with CCR5+/+, CCR2+/+ and 59029A/A genotype achieved smaller VL reductions in 24 weeks and were less likely to sustain undetectable VL levels for more than 6 months in comparison to patients with a CCR5Δ32, CCR2-64I or 59029G allele, whereas Brumme et al. (2001) found no protective effect as referred previously. In our study, the 59029G variant did not correlate with improved HAART response in either category of patients.

In the present study, all significant genotype associations with improved HAART effectiveness were observed in the patient group with baseline CD4 count of 201–500 prior to HAART initiation, according to CDC classification. No statistically significant associations were recorded for the remaining two patient groups (CD4 <200 and CD4 >500, respectively). This is likely to be attributed to the small number of patients with each polymorphism. Given that HAART currently constitutes the mainstay of HIV therapy, future larger studies are expected to clarify whether results of the present analysis simply represent lack of statistical power due to sample size, or imply for differences in the response to HAART, determined by the patients' immune system status prior to treatment.

In conclusion, we studied 166 HIV-positive subjects from one of the HIV-referral hospitals in Greece. Among them 149 patients were treated with HAART. We performed genotyping for four polymorphisms reported to affect progression to disease and followed up these subjects prospectively for their clinical progress including HAART treatment and standard laboratory analyses for over 30 months. The most interesting patient group was that with a baseline CD4 of 201–500 cells/ml. There was a significant correlation between CXCL12-3A and CCR2-64I and the endpoints, whereas the other variants showed no significant effect on CD4 or VL response. The presence of the CXCL12-3A allele was correlated with a more rapid elevation of CD4 >500 cells/ml threshold after HAART. The presence of the CCR2-64I allele was correlated with a faster VL decline to undetectable levels (<50 cps/mm^3) and a greater period of time until viraemia recurrence. CXCL12-3A also showed a trend for faster VL decline in the same category of patients.

References

Anon. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Recomm Rep 1992;41:1–19.

Anon. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Developed by the panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS) and the Henry J. Kaiser Family Foundation; 2002.

Brambilla A, Villa C, Rizzardi G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, et al. Shorter survival of SDF1-3′A/3′A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. J Infect Dis 2000;182:311–5.

Bratt G, Karlsson A, Leandersson AC, Albert J, Wahren B, Sandstrom E. Treatment history and baseline viral load, but not viral tropism or CCR-5 genotype, influence prolonged antiviral efficacy of highly active antiretroviral treatment. AIDS 1998;12:2193–202.

Brumme ZL, Chan KJ, Dong W, Hogg R, O'Shaughnessy MV, Montaner JS, et al. CCR5 delta32 and promoter polymorphisms are not correlated with initial virological or immunological treatment response. AIDS 2001;15:2259–66.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science 1996;273:1856–62.

Guerin S, Meyer L, Theodorou I, Boufassa F, Magierowska M, Goujard C, et al. CCR5 delta32 deletion and response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. AIDS 2000;14:2788–90.

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med 1996;2:1240–3.

Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, et al. Effects of CCR5-delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3′A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. Ann Intern Med 2001;135:782–95.

Kasten S, Goldwich A, Schmitt M, Rascu A, Grunke M, Dechant C, et al. Positive influence of the CCR5 delta32 allele on response to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-1 infected patients. Eur J Med Res 2000;5:323–8.

Lathey JL, Tierney C, Chang SY, D'Aquila RT, Bettendorf DM, Alexander HC, et al. Associations of CCR5, CCR2, and stromal cell-derived factor 1 genotypes with human immunodeficiency virus disease progression in patients receiving nucleoside therapy. J Infect Dis 2001;184:1402–11.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. Cell 1996;86:367–77.

McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Lancet 1998;352:866–70.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. Nat Immunol 2001;2:123–8.

Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, Goedert JJ, Buchbinder SP, Coutinho RA, et al. Effects of CCR5-delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. AIDS 2003;17:377–87.

Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. Nat Med 1998;4:786–93.

O'Brien TR, McDermott DH, Ioannidis JP, Carrington M, Murphy PM, Havlir DV, et al. Effect of chemokine receptor gene polymorphisms on the response to potent antiretroviral therapy. AIDS 2000;14:821–6.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature 1996;382:722–5.

Saridaki Z, Liloglou T, Zafiropoulos A, Koumantaki E, Zoras O, Spandidos DA. Mutational analysis of CDKN2A genes in patients with squamous cell carcinoma of the skin. Br J Dermatol 2003;148:638–48.

Shieh B, Liau YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. Int Immunol 2000;12:1311–8.

Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. Science 1997;277:959–65.

Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, Ffrench RA, Bennetts BH, Newcombe NR, et al. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. AIDS 1997;11:1833–8.

Valdez H, Purvis SF, Lederman MM, Fillingame M, Zimmerman PA. Association of the CCR5 delta32 mutation with improved response to antiretroviral therapy. JAMA 1999;282:734.

van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. AIDS 1998;12:F85–90.

Van Vaerenbergh K, Harrer T, Schmit JC, Carbonez A, Fontaine E, Kurowski M, et al. Initiation of HAART in drug-naive HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35.5 months in 60% of the patients. AIDS Res Hum Retroviruses 2002;18:419–26.

Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). Science 1998;279:389–93.

Wit FW, van Rij RP, Weverling GJ, Lange JM, Schuitemaker H. CC chemokine receptor 5 delta32 and CC chemokine receptor 2 64I polymorphisms do not influence the virologic and immunologic response to antiretroviral combination therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. J Infect Dis 2002;186:1726–32.

Yamashita TE, Phair JP, Munoz A, Margolick JB, Detels R, O'Brien SJ, et al. Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study. AIDS 2001;15:735–46.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 23, Number 8, 2007, pp. 000–000
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2006.0248

Polymorphisms of Cx_3CR1 and CXCR6 Receptors in Relation to Haart Therapy of HIV Type 1 Patients

A.M. PASSAM,[1] G. SOURVINOS,[1] E. KRAMBOVITIS,[2,3] S. MIYAKIS,[4]
N. STAVRIANEAS,[5] I. ZAGOREOS,[5] and D.A. SPANDIDOS[1]

ABSTRACT

The chemokine polymorphisms CXCR6-3E/K, In1.1T/C, H7 haplotype, CX_3CR1-V249I, and CX_3CR1-T280M have been shown to affect the course of HIV infection. We studied their influence on immunologic and virologic response to HAART in a group of 143 HIV-1 patients. We performed Kaplan–Meier analysis using the following end-point criteria: (1) time from HAART initiation to undetectable viral load (VL $<$ 50 copies/ml), (2) maximum duration of viral suppression, (3) time from HAART administration until CD4 elevation above 200 cells/μl for patients with baseline CD4 below 200 cells/μl and above 500 cells/μl for patients with baseline CD4 between 200 and 500 cells/μl, respectively, and (4) time from HAART initiation until CD4 reduction below baseline values. Our results revealed an improved immunologic response to HAART in patients with the CX_3CR1-249I or CX_3CR1-280M allele. On the contrary, patients with initial VL suppression due to HAART showed a faster virologic failure in the presence of the CXCR6-3K allele. The In1.1T/C polymorphism and H7 haplotype did not reveal any specific effect on HAART response.

INTRODUCTION

Many advances have been made in the understanding of HIV infection and treatment. Highly active antiretroviral treatment (HAART) has prolonged survival considerably and reduced the overall HIV-related illnesses. The increasing knowledge of HIV pathogenesis at the molecular level has provided new options for effective treatment.[1] The chemokine network is one of the major investigation areas because of its implication in virus-cell entry and immune response mechanisms. The best example to date is the chemokine receptor CCR5, which is the main coreceptor in CD4-mediated cell invasion, particularly in the primary and asymptomatic stage of the infection.[2] The chemokine receptor mutant allele CCR5Δ32 generates nonfunctional coreceptor conferring resistance to HIV-1 infection in homozygous individuals and delayed disease progression in heterozygous HIV-1-infected patients.[3–8] Genetic variants in the chemokine network that may influence HIV infection are being actively pursued. CXCR6-E3K, In 1.1 T/C (RANTES promoter), haplotype H7 (MCP-1, MCP-3, and eotaxin genes), CX_3CR1-V249I, and CX_3CR1-T280M are chemokine-associated polymorphisms that have been reported to affect aspects of HIV infection.

RANTES, a ligand for CCR5, competes with HIV-1 in coreceptor usage and may inhibit both cell entry of R5 virus strains[9] and viral-mediated activation-induced cell death.[10,11] In1.1-T/C is a single nucleotide polymorphism (SNP) in the first intron of the RANTES gene and affects gene transcription through differential binding of nuclear proteins. The In1.1C allele has been associated with rapid progression to AIDS by down-regulating RANTES expression.[12]

CXCR6 is considered a secondary coreceptor used by all HIV strains. It is expressed in lymphoid tissues, by Th1 and Tc1 lymphocytes and subsets of NK cells, thus making those subpopulations potential targets for HIV-1 infection.[13–16] CXCL16, its natural ligand, is produced at various sites,

[1]Department of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.
[2]Department of Applied Biochemistry and Immunology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Crete, Greece.
[3]Department of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Thessaly, Greece.
[4]Department of Immunology, Allergy and Infectious Diseases, St. George Hospital, University of New South Wales, Sydney, NSW 2217, Australia.
[5]Department of Dermatology, University of Athens, A. Syngros Hospital, Athens, Greece.

particularly during inflammation, rendering the complex CXCR6-CXCL16 important for Th1-Tc1 and NK homing in extralymphoid tissues and sites of inflammation.[17–19] An SNP designated CXCR6-E3K results in a nonconservative change in codon 3 of the N-terminus of the coreceptor (CXCR6-3K). The CXCR6-3K allele has been related to increased survival from *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) to death, thereby suggesting reduced susceptibility to *Pneumocystis carinii*.[20]

The chemokines MCP-1, MCP-3, and eotaxin have been implicated in HIV-1 pathogenesis through chemotaxis and cell activation. MCP-1 has been shown to enhance viral replication in peripheral mononuclear cells[21] and has been associated with neuronal impairment.[22–24] On the other hand, MCP-3 is a physical antagonist of CCR5[25] and has been shown to inhibit HIV-1 replication.[26] Their genes are adjacent and located on the long arm of chromosome 17, including nine known SNPs, which present specific haplotypes. Among these haplotypes, H7 is defined by the combination of three alleles, at codons 2136, 767, and 1385 (MCP-1 promoter-2136T, MCP-1 767G, and eotaxin promoter 1385A), and occurs at a significantly higher frequency in multiply exposed, noninfected individuals in comparison with seroconverters, suggesting a protective role of this haplotype on HIV-1 infection.[27]

CX_3CR1 is a receptor for the chemokine fractalkine and is expressed on monocytes, lymphocytes, and neutrophils and abundantly on glial cells and astrocytes. Fractalkine and CX_3CR1seem to play an important role in HIV-1-associated dementia, immune cell recruitment, and possibly in infection expansion by acting as coreceptors in viral entry.[28–30] CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M are SNPs of the receptor. Their role in HIV infection is not clear. It has been argued that they exhibit a deleterious effect on the progression to AIDS,[28,31–33] although protective or insignificant effects on HIV progression have also been reported.[31,34]

All the above polymorphism effects have been studied principally in established cohorts of untreated patients. Furthermore, their influence has been evaluated mostly by using survival analysis in relation to clinical progression or death end-points. After the introduction of HAART, the clinical course of HIV-1 patients has changed dramatically by increasing survival and reducing HIV-1-related illnesses, making death and illness-defined staging less suitable for polymorphism evaluation. Additionally, HAART alters viral activity and affects immune processes. The contribution of chemokine polymorphisms in response to HAART probably differs from that in untreated patients. We have previously applied immunologic and virologic markers [$CD4^+$ T cells, viral load (VL)] to assess the impact of four chemokine-associated polymorphisms on the effectiveness of HAART.[35] We established a significantly protective effect of CXCL12-3A′ and CCR2-64I on immunologic and virologic responses, respectively, whereas the CCR5Δ32 and promoter CCR5-59029G/A polymorphisms had no effect. In the present study, we investigated the contribution of five chemokine polymorphisms, CXCR6-E3K, In 1.1 T/C, promEotaxin-1385G/A (haplotype H7), CX_3CR1-V249I, and CX_3CR1-T280M, in relation to immunologic and virologic responses to HAART.

MATERIALS AND METHODS

Patients

"A. Syngros" Hospital is one the major HIV treatment centers in Greece. We studied retrospectively a group of 143 patients (123 males and 20 females) treated with HAART and followed up by the HIV department of this hospital. The mean age at the time of diagnosis was 41.2 (range 23–77) years. Fifty patients were therapy experienced, with regimens consisted of one or two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI). On HAART initiation, 44 experienced patients were switched to a 2 NRTI + PI regimen (PI: protease inhibitor) and 6 patients were switched to a 2 NRTI + NNRTI regimen (NNRTI: nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor). All new drug combinations included at least one NRTI agent the patient had not been previously exposed to in combination with a PI or an NNRTI. Among the therapy-naive patients, 71 started HAART with a 2 NRTI + PI regimen and 22 with a 2 NRTI + NNRTI regimen. The mean follow-up duration after HAART initiation was 68.8 (11–109) months. Monitoring of patients' CD4 and HIV VL was performed according to standard guidelines.[36] Ethical approval was obtained from the local ethics board of the "Syngros" Hospital. The medical records and the genotyping results had anonymous codes.

CD4 T cell count and viral load estimation

HIV-1 RNA levels were measured in blood plasma using RNA amplification assays (Nuclisens-NASBA Diagnostics). CD4 T cell counts were performed by four-color flow cytometry using monoclonal antibodies from Becton Dickinson (San Jose, CA).

Blood collection, DNA extraction, and genotyping

Peripheral blood was collected from patients, stored, and processed for DNA extraction as previously described.[35] The presence of amplifiable DNA was confirmed in all specimens. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Two negative controls were used for each PCR reaction to exclude contamination. The primers used for the genetic analysis are presented in Table 1.

The PCR and RFLP conditions for each SNP were the following: (1) For RANTES-In1.1T/C: denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 92°C, annealing at 54°C, extension at 72°C for 30 sec each, and final extension at 72°C for 10 min. The PCR product (342 bp) was incubated for 1 h at 37°C by *Mbo*II and in the presence of In1.1C cut into two fragments (219 bp + 123 bp). (2) For CXCR6-E3K the same conditions were used apart from the annealing temperature (51°C). The PCR product (145 bp) was incubated at 37°C for 3 h by *Hin*dIII and produced two fragments (121 bp + 24 bp) when the 3K variant was present. (3) For haplotype H7 we detected the variant 1385A in the promoter of eotaxin. According to Modi *et al.*,[27] haplotype H7 is defined by the unique combination of three variants, 2136T (MCP-1 promoter), 767T (MCP-1 coding region), and 1385A (eotaxin promoter). In this combination, the frequency of promEotaxin-1385A (0.193) corresponds closely to the frequency of the H7 haplotype

TABLE 1. GENOTYPING RESULTS IN HIV-1 PATIENTS RECEIVING HAART

	CD4 categories according to CDC			
	Cat1: ≥500 n/*(%)*	*Cat2: 200–499* n/*(%)*	*Cat3: 0–199* n/*(%)*	*Total* n/*(%)*
CXCR6-E3K				
E/E	28 (100)	69 (97)	39 (90)	136 (96)
E/K		2 (3)	2 (5)	4 (3)
K/K			2 (5)	2 (1)
Total	28	71	43	142
Allele frequency	$f_{(-1385A)} = 0.028$			
In1.1				
TT	22 (82)	56 (78)	33 (77)	111 (78)
TC	3 (11)	14 (19)	9 (21)	26 (18)
CC	2 (7)	2 (3)	1 (2)	5 (4)
Total	27	72	43	142
Allele frequency	$f_{(-1385A)} = 0.127$			
promEotaxin-1385G/A (H7 haplotype)				
GG	19 (68)	47 (65)	29 (67)	95 (66)
AG	7 (25)	21 (29)	12 (28)	40 (28)
AA	2 (7)	4 (6)	2 (5)	8 (6)
Total	28	72	43	143
Allele frequency	$f_{(-1385A)} = 0.196$			
CX3CR1-V249I				
VV	17 (61)	37 (51)	22 (51)	76 (53)
VI	9 (32)	33 (46)	18 (42)	60 (42)
II	2 (7)	2 (3)	3 (7)	7 (5)
Total	28	72	43	143
Allele frequency	$f_{(-1385A)} = 0.258$			
CX3CR1-T280M				
TT	21 (75)	49 (68)	31 (72)	101 (71)
TM	7 (25)	21 (29)	11 (27)	39 (27)
MM		2 (3)	1 (1)	3 (2)
Total	28 (%)	72 (%)	43 (%)	143 (%)
Allele frequency	$f_{(-1385A)} = 0.157$			

(0.192) in European Americans (EA). Therefore by genotyping the patients for promEotaxin-1385A, we obtained an accurate estimate of haplotype H7 presence. The PCR conditions for promEotaxin-1385A were the same as for CXCR6-E3K, and the PCR product was 279 bp. The 1385G variant creates an *Msp*I restriction site, and two fragments (153 bp + 126 bp) are produced after incubation at 37°C for 4 h. (4) For CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M, the PCR conditions were denaturation 3 min at 94°C and 35 cycles of 30 sec denaturation at 94°C, 40 sec annealing at 50°C and 55 sec extension at 72°C, followed by 10 min final extension at 72°C. After digestion by ACLI (37°C, 3 h) the 249V variant splits into two fragments (205 bp + 383 bp), whereas the 249I variant remains undigested (588 bp). Additionally, after digestion by *Bsm*BI (55°C, 3 h), the 280T and 280M alleles are cut into three fragments (75, 216, and 297 bp), and two fragments (216 and 372 bp), respectively. All products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis (with the exception of CXCR6-E3K polymorphism products, for which a 3% agarose gel was used) after ethidium bromide staining. To confirm the digestive efficiency of each restrictive enzyme, we used plasmid DNA containing the equivalent restriction site as a positive control in each digestion.

Statistical analysis

We defined baseline CD4 and baseline VL (time = 0) from the most recent measurements prior to HAART initiation (range: 1–4 months prior to therapy). Using baseline CD4 we

defined three groups according to CDC criteria for CD4 staging. The first, second, and third category included patients with baseline CD4 ≥500, 200–499, and <200 cells/mm^3, respectively. We performed Kaplan–Meier analysis using four end-points: (1) Virologic success, defined as the time from HAART initiation to the first VL count below the detectable threshold (50 cps/mm^3). (2) Virologic failure, defined as the time from the first undetectable VL to the second consecutive VL count above 50 cps/mm^3. We used two consecutive VL counts above 50 cps/mm^3 in a 1–3 month interval as a definition for virologic failure in order to avoid bias from viral blibs. (3) Immunologic success, defined as the time from HAART to the first CD4 measurement that exceeds the next CD4 category (if baseline CD4 <200, time until first CD4 >200; if baseline CD4 is 200–499, time until first CD4 ≥500). (4) Immunologic failure, defined as time from HAART initiation until the second continuous CD4 measurement, which fell below baseline level.

Patients who did not manage to reach the end-point were censored on the date of last CD or VL measurement. Five patients who did not suppress VL to undetectable levels were excluded from the virologic failure analysis (second end-point). One therapy experienced patient had baseline VL <50 and was excluded from analysis of VL success (first end-point). The patients who had baseline CD4 ≥500 (see Table 1) were excluded from the analysis of immunologic success (third end-point). Statistical significance was estimated by the log rank test. Analysis was performed using SPSS software (edition 11.0 for Windows).

RESULTS

Genotyping analysis was performed on 143 patients for the variants RANTES-In1.1T/C, CXCR6-E3K, promEotaxin-1385G/A, CX_3CR-V249I, and T280M. The results are presented in Table 1. The allele frequency for each polymorphism was 0.028 for CXCR6-3K, 0.127 for In1.1C, 0.196 for promEotaxin-1385A, 0.258 for CX_3CR1-249I, and 0.157 for CX_3CR1-280M. The CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M polymorphisms were in linkage disequilibrium and CX_3CR1-280M was never found on the same haplotype with CX_3CR1-249V, although CX_3CR1-249I was found with CX_3CR1-280T. Because of the small allele frequency of CXCR6-3K, we examined the effect on HAART response associated with the presence of the -3K allele versus the homozygous wild type.

Regarding the end-point, defined as the time from HAART initiation until CD4 exceeds the next category (if CD4 <200, the time until CD4 ≥200 but <500, if CD4 200–499 the time until CD4 ≥500), we found that the presence of the 249I and 280M allele was associated with a rapid CD4 elevation, predominantly in homozygous states (mean 3 ± 1, 3 ± 2 for 249I/I and 280M/M versus 16 ± 2, 19 ± 3 in homozygous wild types, respectively). This association was statistically significant (p = 0.0014 for V249I and p = 0.0241 for T280M) (Fig. 1A and B, respectively). The remaining polymorphisms showed no such effect on immunologic response to HAART initiation.

Regarding the end-point, defined as the time from the first VL <50 cps/mm^3 until the second VL >50 cps/mm^3, we found a significant association between the CXCR6-3K and faster VL recurrence. Patients bearing the CXCR6-3K allele showed faster detectable viremia than those homozygous for the common CXCR6-3E allele (mean 19 ± 6 and 48 ± 3 months, respectively, p = 0.0359, n = 137) (Fig. 1C). On the contrary, In1.1T/C, promEotaxin-1385G/A, CX_3CR1-V249I, and CX_3CR1–T280M polymorphisms showed no such correlation.

Regarding the two end-points, defined as the time from HAART initiation until the first VL below 50 cps/mm^3, and the time from HAART initiation until CD4 fell under baseline, we found no significant correlation between the polymorphism genotypes and virologic success or immunologic failure, respectively.

Additionally we used the same end-points to compare HAART response between therapy-naive and therapy-experienced patients. We found that therapy-naive patients reached undetectable VL levels faster (p = 0.023, mean time for naive and experienced patients was 11 ± 2 and 18 ± 3 months respectively), sustained undetectable VL longer (p = 0.003, mean time for naive and experienced patients 53 ± 4 and 33 ± 4 months, respectively), and increased CD4 counts faster (p = 0.033, mean time for naive 13 ± 2 and for experienced patients 23 ± 4 months) than therapy-experienced patients. On the contrary, we compared patients receiving 2 NRTI + PI with patients receiving 2 NRTI + NNRTI regimens using the same end-points and found no significant difference in HAART response (data not shown). Unfortunately, performing Kaplan–Meier analysis for the chemokine polymorphisms using the patient subgroups as strata (therapy naive vs. experienced or 2 NRTI + PI vs. 2 NRTI + NNRTI) resulted in small subgroups with small statistical power due to the small initial sample size.

DISCUSSION

In the present study, we retrospectively investigated the impact of five chemokine polymorphisms on the immunologic and virologic response to HAART of a group of 143 patients. We observed that patients bearing the CXCR6-3K variant could not sustain undetectable VL as long as the common variant, whereas CX_3CR1-249I and CX_3CR1-280M correlated with faster CD4 escalation. Additionally, the In1.1 and promoter eotaxin 1385G/A polymorphisms were not found to affect CD4 or VL response to HAART.

The presence of the CXCR6-3K allele was associated with impaired viral suppression after HAART in our study. The mean duration of undetectable VL was 48 ± 3 in CXCR6-3E homozygous patients (n = 131) and only 19 ± 6 in patients heterozygous or homozygous for the CXCR6-3K allele (n = 6). This effect was significant (p = 0.0359), and it is the first time, to our knowledge, that it has been reported in relation to HAART. The remaining three end-points were not affected by the CXCR6-3K allele. Duggal *et al.*,[20] on the contrary, reported a protective effect of the CXCR6-3K allele on the time from PCP to death in a group of 60 African-American (AA) HIV-1 patients who died from PCP and did not receive HAART. The nonconservative Glu-to-Lys change in the extracellular domain of the receptor may well affect CXCR6 function as coreceptor for HIV-1 (permitting expansion of HIV-1-infected cells) or affect the CXCR6-related response of Th1, Tc1, and NK cells to signaling pathways induced by CXCL16, thus altering immune

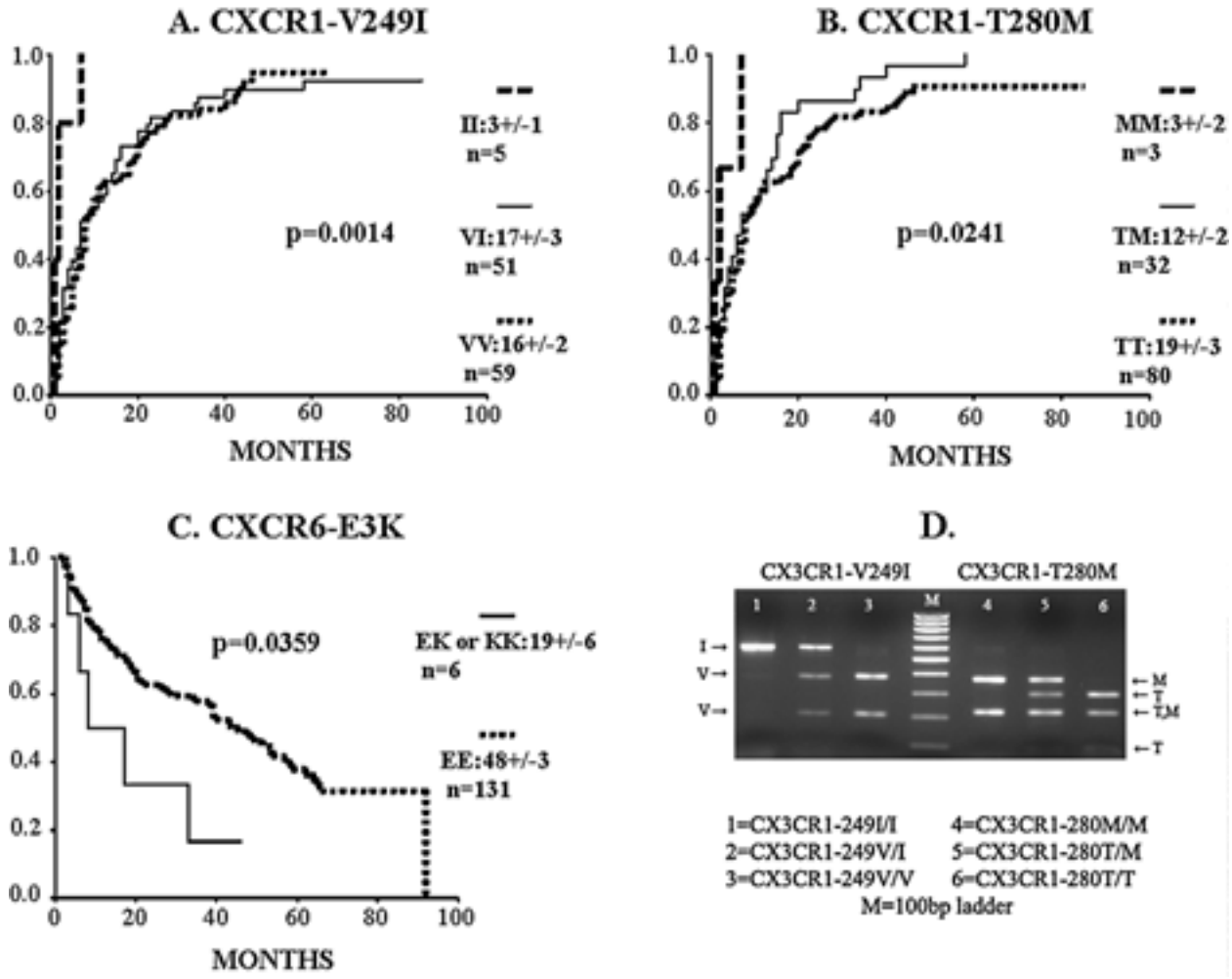


FIG. 1. (**A,B**) One minus survival plots of Kaplan–Meier analysis demonstrating the effect of CX_3CR1-V249I (**A**) and CX_3CR1-T280M (**B**) on the end-point defined as the time from HAART initiation until the CD4 count exceeded 200 cells/μl, if baseline CD4 had been 0–199 cells/μl, or until CD4 exceeded 500 cells/μl, if baseline CD4 had been between 200 and 499 cells/μl. (**C**) Survival plot of Kaplan–Meier analysis demonstrating the effect of CXCR6-E3K on the end-point defined as the time from the first undetectable VL count (<50 cps/mm^3) after HAART initiation until the second continuous VL count exceeding 50 cps/mm^3. (**D**) Agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide for the CX_3CR1-V249I and CX_3CR1-T280M polymorphisms.

reactions to HIV-1 infection. In our group of patients, the frequency of CXCR6-3K was found to be 2.8% and demonstrated a deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium ($p < 0.001$, expected E/K = 8, expected KK = 1). In contrast with our study, Duggal *et al.*[20] found the allelic frequency of CXCR6-3K to be 44% in a cohort of 805 AA, with no HW disequilibrium deviation, and less than 1% in EA, without mentioning HW tests in EA. The deviation observed could be attributed to the small allele frequency and random selection. Alternatively, the small number of heterozygotes may reflect the negative impact of the -3K allele on the course of infection.

The CX_3CR1-249I and CX_3CR1-280M variants, in our study were associated with a favorable effect on HAART response in comparison to the CX_3CR1-249V and CX_3CR1-280T alleles, respectively. The effect was more profound in the homozygous states. The mean time from HAART initiation to CD4 escalation above the next CDC category was 3 ± 1 months for CX_3CR1-249I/I and 3 ± 2 months for CX_3CR1-280M/M (or homozygous 280M haplotype) versus 16 ± 2 for CX_3CR1-249V/V and 19 ± 3 for CX_3CR1-280T/T ($p = 0.0014$, $p = 0.0241$, respectively). In contrast, no correlation was observed between the allele genotypes and virologic success or virologic and immunologic failure. Additionally, our findings on allele frequencies ($f_{(249I)} = 0.258$, $f_{(280M)} = 0.157$) and linkage disequilibrium between the CX_3CR1-249I and CX_3CR1-280M variants are in agreement with previous reports.[31,37] The role of these polymorphisms is still under debate. Faure *et al.*[28,31] repeatedly reported a deleterious effect of the homozygous CX_3CR1-280M state on disease progression to AIDS in cohorts of untreated patients. Brumme *et al.*[33] studied the immunologic and virologic response to HAART in a group of 461 treatment-naive patients showing a higher rate of immunologic failure (defined as CD4 reduction below baseline levels) in the homozygous CX_3CR1-249I patients. A faster progression to AIDS

in association with the CX_3CR1-249I allele was also reported by Singh *et al.*[32] in a cohort of HIV-1-infected children receiving non-HAART regimens. On the contrary, McDermott *et al.*[38] reported a slightly delayed progression to AIDS and all cause death in untreated patients bearing the CX_3CR1-280M haplotype. This was considered to be consistent with reduced activity of the mutant receptor in comparison with the wild-type receptor, as demonstrated in HIV fusion assays. Although Kwa *et al.*[39] found no correlation between the CX_3CR1-249I280M haplotype and progression to AIDS or death, Vidal *et al.*[34] found an increased frequency of CX_3CR1 249I in long-term nonprogressors, suggesting a protective effect by the -249I variant. Interestingly, in our group of patients, the correlation between 249I and improved CD4 restoration exhibited a higher significance ($p = 0.0014$) than 280M ($p = 0.0241$). Indeed, rapid CD4 escalation was observed even in patients with 249I and without 280M. On the contrary, the effect of 280M alone could not be demonstrated because all 280M haplotypes contain 249I. This suggests that the protective effect of the tightly linked CX_3CR1-249I280M haplotype is mainly attributed to the 249I variant.

We genotyped our patients for the 1385G/A polymorphism in the eotaxin promoter region and found a frequency of 19.6% for the 1385A allele, which is in agreement with a previously reported frequency.[27] Although 1385A is one of three variants characteristic of H7 (the other two being 2136T and 767G), we considered it alone to represent the frequency of H7 accurately, because among the eight haplotypes (H1–H8) described, 1385A is found only on H7 with an almost identical allele and haplotype frequency (0.193 for 1385A and 0.192 for H7).[27] In the statistical analysis that followed, no significant correlation was established between the promEotaxin-1385G/A polymorphism and any of the selected end-points, and therefore haplotype H7 was not shown to have any profound effect on the immunologic and virologic markers of HAART success. In contrast, Modi *et al.*[27] reported the increased presence of H7 in highly exposed uninfected individuals, implicating it in resistance to infection. Similarly, we found In1.1C at a frequency of 12.7%, in agreement with the frequency reported previously.[12] Additionally, the In1.1T/C polymorphism did not exhibit any significant correlation with HAART response with respect to the four end-points employed. According to An *et al.*[12] the In1.1C variant is located in an expression-regulating element (intron 1) of the RANTES gene and results in down-regulation of RANTES transcription through differential binding of nuclear proteins. This resulted in accelerated progress to AIDS in cohorts of untreated patients. We did not find similar effects in relation to HAART. However, our study is only the first report on the impact of H7 haplotype and In1.1C/T on the treatment of HIV-1 infection and our findings await confirmation from larger cohorts.

The present study was performed exclusively in white patients and our observations may be restricted to equivalent populations. It must be noted, also, that certain limitations apply to our results. All treatments applied were in accordance with recommended guidelines for maximal viral suppression.[36] We examined the possibility of bias due to different antiviral treatment and compared patients treated with 2 NRTI + PI versus patients with 2 NRTI + NNRTI using the same end-points applied above but found no significant difference between the two groups. Still, bias due to different regimen components and suboptimal patient compliance with therapy cannot be excluded. Additionally, therapy-naive patients revealed improved outcomes in comparison to therapy-experienced patients. Unfortunately, separate Kaplan–Meier analysis of the two patient groups (therapy naive–experienced) for the chemokine polymorphisms resulted in small subgroups with small statistical power due to the smallADDIN initial sample size. Studies with larger patient samples are needed to confirm our findings.

In conclusion, we studied the effect of five chemokine polymorphisms previously reported to affect HIV-1 disease progression on the response to HAART initiation in a group of 143 patients with prolonged follow-up. Using Kaplan–Meier analysis, we found that the CXCR6-3K allele correlated with a shorter duration of viral suppression. The CX_3CR1-280M and CX_3CR1-249I variants were shown to confer improved immunologic response, in terms of faster initial CD4 elevation. No correlations were observed between HAART response and the In1.1T/C or the eotaxin promoter 1385G/A (haplotype H7) polymorphisms. Our results may provide useful information on the role of polymorphisms in the chemokine network and their implications in HIV pathogenesis, particularly during HAART treatment.

REFERENCES

1. Krambovitis E, Porichis F, and Spandidos DA: HIV entry inhibitors: A new generation of antiretroviral drugs. Acta Pharmacol Sin 2005;26:1165–1173.
2. Moser B and Loetscher P: Lymphocyte traffic control by chemokines. Nat Immunol 2001;2:123–128.
3. Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.*: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science 1996;273:1856–1862.
4. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, *et al.*: The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med 1996;2:1240–1243.
5. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, *et al.*: Effects of CCR5-delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3′A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. Ann Intern Med 2001;135:782–795.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.*: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell 1996;86:367–377.
7. Samson M, Libert F, Doranz BJ, *et al.*: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature 1996;382:722–725.
8. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, *et al.*: Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. AIDS 1997;11:1833–1838.
9. Berger EA, Murphy PM, and Farber JM: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol 1999;17:657–700.
10. Zafiropoulos A, Baritaki S, Sioumpara M, Spandidos DA, and Krambovitis E: V3 induces in human normal cell populations an accelerated macrophage-mediated proliferation—apoptosis phenomenon of effector T cells when they respond to their cognate antigen. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:63–70.

11. Krambovitis E and Spandidos DA: HIV-1 infection: Is it time to reconsider our concepts? Int J Mol Med 2006;18:3–8.
12. An P, Nelson GW, Wang L, *et al*.: Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:10002–10007.
13. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, *et al*.: CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. J Exp Med 2002;195:869–879.
14. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, *et al*.: STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. J Exp Med 1997;185:2015–2023.
15. Begaud E, Feindirongai G, Versmisse P, *et al*.: Broad spectrum of coreceptor usage and rapid disease progression in HIV-1-infected individuals from Central African Republic. AIDS Res Hum Retroviruses 2003;19:551–560.
16. Sharron M, Pohlmann S, Price K, *et al*.: Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes. Blood 2000;96:41–49.
17. Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, and Butcher EC: Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. J Immunol 2003;171:2960–2969.
18. Kim CH, Johnston B, and Butcher EC: Trafficking machinery of NKT cells: Shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. Blood 2002;100:11–16.
19. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, *et al*.: Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. J Clin Invest 2001;107:595–601.
20. Duggal P, An P, Beaty TH, *et al*.: Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans. Genes Immun 2003;4:245–250.
21. Vicenzi E, Alfano M, Ghezzi S, *et al*.: Divergent regulation of HIV-1 replication in PBMC of infected individuals by CC chemokines: Suppression by RANTES, MIP-1alpha, and MCP-3, and enhancement by MCP-1. J Leukoc Biol 2000;68:405–412.
22. Cinque P, Vago L, Mengozzi M, *et al*.: Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. AIDS 1998;12:1327–1332.
23. Conant K, Garzino-Demo A, Nath A, *et al*.: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:3117–3121.
24. Monteiro de Almeida S, Letendre S, Zimmerman J, *et al*.: Dynamics of monocyte chemoattractant protein type one (MCP-1) and HIV viral load in human cerebrospinal fluid and plasma. J Neuroimmunol 2005;169:144–152.
25. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, *et al*.: CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. Blood 1999;94: 1899–1905.
26. Schols D, Proost P, Van Damme J, and De Clercq E: RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). J Virol 1997;71:7300–7304.
27. Modi WS, Goedert JJ, Strathdee S, *et al*.: MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. AIDS 2003;17:2357–2365.
28. Combadiere B, Faure S, Autran B, Debre P, and Combadiere C: The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients. AIDS 2003;17:1279–1290.
29. Cotter R, Williams C, Ryan L, *et al*.: Fractalkine (CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia. J Neurovirol 2002;8:585–598.
30. Garin A, Tarantino N, Faure S, *et al*.: Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. J Immunol 2003;171:5305–5312.
31. Faure S, Meyer L, Costagliola D, *et al*.: Rapid progression to AIDS in HIV + individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. Science 2000;287:2274–2277.
32. Singh KK, Hughes MD, Chen J, and Spector SA: Genetic polymorphisms in CX3CR1 predict HIV-1 disease progression in children independently of CD4+ lymphocyte count and HIV-1 RNA load. J Infect Dis 2005;191:1971–1980.
33. Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, *et al*.: Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. AIDS 2003;17:201–208.
34. Vidal F, Vilades C, Domingo P, *et al*.: Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1 249I variant allele. J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:527–531.
35. Passam AM, Zafiropoulos A, Miyakis S, *et al*.: CCR2-64I and CXCL12 3′A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy. J Clin Virol 2005;34:302–309.
36. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. February 5, 2001. HIV Clin Trials 2001;2: 227–306.
37. Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, *et al*.: Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. Thromb Res 2007;119:63–71.
38. McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, *et al*.: Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. Science 2000;290: 2031.
39. Kwa D, Boeser-Nunnink B, and Schuitemaker H: Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. AIDS 2003;17:759–761.

Address reprint requests to:
G. Sourvinos
Department of Virology
Medical School
University of Crete
Heraklion, Crete, Greece

E-mail: sorvino@med.uoc.gr