



Διπλωματική εργασία

**Θέμα: Μελέτη της ανοσοτροποποιητικής δράσης της
Ιντερλευκίνης-35 σε ασθενείς με αυτοάνοσα
νοσήματα**

Ρίγγα Βέρα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μπόγδανος Δημήτριος Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ
- Μαμούρης Ζήσης Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ, ΣΕΥ
- Ζαφειρίου Ευτέρπη Επίκουρος Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ,



University of Thessaly

School of Health Science

Faculty of Biochemistry and Biotechnology &

Faculty of Medicine, SHS, UTH

Larisa, 2020

Thesis

Study of immunomodulatory effect of Interleukin-35 in patients with autoimmune diseases

Ringa Vera

Tripartite committee:

- Bogdanos Dimitrios, Professor of Medicine and Autoimmune Diseases
- Mamouris Zisis, Professor of Animal Population Genetics
- Zafeiriou Efterpi, Assistant Professor of Dermatology

Περίληψη

Η Ιντερλευκίνη 35 (IL-35) είναι μια νέα αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από τα Β ρυθμιστικά κύτταρα (Bregs), τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και τα πρώιμα δένδριτικά κύτταρα. Ο ανοσορυθμιστικός ρόλος της IL-35 στα αυτοάνοσα νοσήματα και ειδικότερα στη ανοσοεπαγόμενη ψωριασική νόσο (ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα) δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της *in vitro* χορήγησης IL-35, στην ρύθμιση παραγωγής δύο βασικών φλεγμονωδών κυτοκινών της IFN- γ και της IL-17 που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου. Περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα (PBMCs) απομονώθηκαν από 5 ασθενείς με ψωριασική νόσο (3 ψωρίαση, 2 ψωριασική αρθρίτιδα) και 13 υγιείς μάρτυρες (HCs). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία ανασυνδυασμένης IL-35 σε τελικές συγκεντρώσεις 10 ng/ μ L ή 25 ng/ μ L 48 ώρες πριν από τη διέγερση με PMA/Iονομυκίνης (P/I). Οι υποπληθυσμοί κυττάρων ταυτοποιήθηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα έναντι των επιφανειακών επιτόπων CD56, CD3, CD4 και CD8. Η ενδοκυτταρική έκφραση των IFN- γ και IL-17 μετά από διέγερση 5 ωρών εξετάστηκε επίσης χρησιμοποιώντας τυπικά πρωτόκολλα διαπερατότητας κυττάρων. Έπειτα από την προσθήκη IL-35 στη καλλιέργεια PBMCs υγιών μαρτύρων πριν από τη διέγερση P/I, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στην παραγωγή IFN- γ και IL-17 από τους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς με εξαίρεση τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα όπου παρατηρήθηκε οριακή δοσοεπαγόμενη αύξηση της IFN- γ παρουσία της IL-35 48 ώρες πριν την διέγερση τους. Αντιθέτως, στα PBMC ασθενών με ψωριασική νόσο η χορήγηση IL-35 48 ώρες πριν την ενεργοποίηση με P/I ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή τόσο της IFN- γ και όσο και της IL-17. Η επαγόμενη μέσω της IL-35 αναστολή της IFN- γ ήταν μεγαλύτερη μεταξύ των CD8+ Τ κυττάρων και των NK κυττάρων. Ειδικότερα, τα μέσα ποσοστά αναστολής της IFN- γ ήταν 38,6% για τα NK και 27% για τα CD8+ Τ κύτταρα αντίστοιχα όταν η IL-35 χορηγήθηκε στην τελική συγκέντρωση των 10 ng/mL. Αντίστοιχα, τα μέσα ποσοστά αναστολής IFN- γ ήταν 55% για τα NK και 39% για τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα όταν η IL-35 προστέθηκε στην τελική συγκέντρωση των 25 ng / ml. Επίσης, η *in vitro* χορήγηση της IL-35 ελάττωσε σημαντικά τα NKT κύτταρα που παράγουν IL-17 όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση 25 ng / mL. Συμπερασματικά, η *in vitro* χορήγηση της IL-35 επάγει δοσοεξαρτώμενη αναστολή της παραγωγής IFN- γ και IL-17 εντός των CD8+ Τ και CD56+ υποπληθυσμών κυττάρων σε ασθενείς με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα.

Abstract

Interleukin 35 (IL-35) is a new anti-inflammatory cytokine produced primarily by B regulatory cells (Bregs), T regulatory cells (Tregs) and immature dendritic cells. The immunoregulatory role of IL-35 in autoimmune diseases and in particular in immune-induced psoriatic disease (psoriasis and psoriatic arthritis) has not been extensively studied. In the present dissertation, the effect of *in-vitro* administration of IL-35 on the regulation of the production of two major inflammatory cytokines, IFN- γ and IL-17, involved in the pathogenesis of psoriatic disease, was studied. Peripheral mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 5 patients with psoriatic disease (3 psoriasis, 2 psoriatic arthritis) and 10 healthy controls (HCs). Cells were cultured in the presence or absence of recombinant IL-35 at final concentrations of 10 ng/ μ L or 25 ng/ μ L 48 hours prior to PMA/Ionomycin (P/I) stimulation. Cell subpopulations were identified by flow cytometry using fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies against the surface epitopes CD56, CD3, CD4 and CD8. Intracellular expression of IFN- γ and IL-17 after stimulation for 5 hours was also examined using standard cell permeability protocols. After the addition of IL-35 to the culture of healthy control PBMCs prior to P / I stimulation, no statistically significant differentiation was observed in the production of IFN- γ and IL-17 with the exception of CD4 + T lymphocytes where a marginal dose-induced increase in IFN- γ was observed in the presence of IL-35 48 hours before stimulation. In contrast, in the PBMC of patients with psoriatic disease, administration of IL-35 48 hours prior to P / I activation significantly inhibited the production of both IFN- γ and IL-17. IL-35-induced inhibition of IFN- γ was greater among CD8 + T cells and NK cells. In particular, the mean IFN- γ inhibition rates were 38.6% for NK and 27% for CD8 + T cells respectively when IL-35 was administered at a final concentration of 10 ng / mL. Respectively, the mean IFN- γ inhibition rates were 55% for NK and 39% for CD8 + T lymphocytes when IL-35 was added to the final concentration of 25 ng/ml. Also, *in vitro* administration of IL-35 significantly reduced IL-17-producing NCT cells when added at a concentration of 25 ng/mL. In conclusion, *in vitro* administration of IL-35 induces dose-dependent inhibition of IFN- γ and IL-17 production within CD8 + T and CD56 + cell subpopulations in patients with psoriasis and psoriatic arthritis.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ps → Psoriasis

PsA → Psoriatic Arthritis

IFN- γ → Interferon- γ

IL-35 → Interleukin 35

IL-12 → Interleukin 12

IL-23 → Interleukin 23

IL-27 → Interleukin 27

PMA → Phorbol 12-myristate 13-acetate

IONO → Ionomycin

NK cells → Natural Killer cells

NKT cells → Natural Killer T cells

Th cells → T helper cells

T regs → T regulatory cells

EBi3 → Epstein Barr virus-induced gene 3 protein

TNF → Tumor Necrosis Factor

JAK → Janus Kinase

STAT → Signal Transducer Activator of Transcription

PBMCs → Peripheral Blood Mononuclear Cells

APCs → Αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα

Περιεχόμενα:

1. Εισαγωγή

1.1 Ιντερλευκίνη 35 - Γενικές πληροφορίες- Κυτταρική σηματοδότηση

1.1.2 Ανοσορυθμιστική δράση σε πειραματικά μοντέλα και ανθρώπινα αυτοάνοσα νοσήματα

1.1.3 Ανοσορυθμιστική δράση στην ψωριασική νόσο

1.2 Γενικά στοιχεία ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας

1.3 Επιδημιολογία της νόσου

1.4 Αιτιοπαθογένεια

1.5 Διάγνωση και θεραπεία

1.6 Κυτταρικοί πληθυσμοί

1.6.1 Th1

1.6.2 Th17

1.6.3 IFN- γ

1.6.4 IL-17

1.6.5 NK και NKT κύτταρα

1.7 Γενετικοί παράγοντες

1.8 Άλλοι παράγοντες

2. Πειραματικό μέρος (Υλικά και μέθοδοι)

2.1 Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

2.2 Απομόνωση και κρυοσυντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

2.3 Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue

2.4 Καλλιέργεια PBMCs

2.5 Κυτταρικοί διεγέρτες

2.6 Επώαση κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα και προετοιμασία κυττρομετρίας ροής

2.7 Κυτταρομετρία ροής

2.8 Στατιστική ανάλυση

3. Αποτελέσματα

4. Συζήτηση

5. Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

1.1 Ιντερλευκίνη-35 – Γενικές πληροφορίες

Η IL-35 είναι μια κυτοκίνη, η οποία ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των κυτοκινών της IL-12. Αυτή η οικογένεια αποτελείται από 4 μέλη και περιλαμβάνει τις IL-12, IL-23, IL-27 και IL-35. Η IL-12 και η IL-23 εμπλέκονται κυρίως στη προφλεγμονώδη ανοσιακή απόκριση, εν αντιθέσει με την IL-27 και την IL-35 που θεωρούνται επί το πλείστον αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες(1). Οι IL-12, IL-23 και IL-27 εκκρίνονται από ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) κατά τη διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης στα T λεμφοκύτταρα, ενώ η IL-35 εκκρίνεται από δενδριτικά, B λεμφοκύτταρα (tDCs και Bregs)(2) και από ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (T-regs)(3). Η IL-35 επάγεται επίσης σε ανθρώπινα κύτταρα που δεν είναι T λεμφοκύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μετά από διέγερση(stimulation) με τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF-α, IFN-γ και IL-1β(4).

Δομικά, τα μέλη της οικογένειας της IL-12 αποτελούνται από ένα ενιαίο ετεροδιμερές που δημιουργείται μετά από ένωση των α και β πρωτεϊνικών υπομονάδων μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Οι α υπομονάδες είναι οι IL-12p35, IL-23p19 και IL-27p28, ενώ οι β υπομονάδες είναι η IL-12p40 και η πρωτεΐνη Ebi3(Epstein Barr virus-induced gene 3 protein). Για την επιτυχή σύσταση και έκκριση της βιοενεργής κυτοκίνης απαιτείται η συν-έκφραση και των δυο αλυσίδων. Το διακριτό χαρακτηριστικό της αντιστοίχισης των αλυσίδων που διαθέτει αυτή η οικογένεια είναι σημαντικό αφού χάρη σε αυτό, οι κυτοκίνες της IL-12 οφείλουν, εν μέρει, την ικανότητά τους να εμπλέκονται σε πολλές πτυχές της ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, ο διμερισμός μιας α αλυσίδας με την IL-12p40 (IL-12 ή IL-23) παράγει κυτοκίνες που προάγουν τη φλεγμονή, καθώς και την ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, ενώ διμερισμός με την αλυσίδα Ebi3, προάγει μέλη της οικογένειας, όπως για παράδειγμα τις IL-27 και IL-35, οι οποίες καταστέλλουν τα φλεγμονώδη αυτοάνοσα νοσήματα(5, 6). Η δομή της IL-35 αποτελείται από ένα ετεροδιμερές το οποίο σχηματίζεται μέσω της ένωσης της α υπομονάδας της IL-12 (p35) και της β υπομονάδας της IL-27 (EBi3).

Η IL-35 ρυθμίζει την κυτταρική σηματοδότηση μέσω της πρόσδεσης της στον υποδοχέα της (IL-35 R) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων. Ο IL-35 R συντίθεται από την ένωση της υπομονάδας IL-12Rβ2 (συστατικό υποδοχέα της IL-12) και την gp130(συστατικό του υποδοχέα της IL-27). Μετά τη δέσμευση του υποδοχέα, η σηματοδότηση ξεκινά με ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας κινασών Janus (Janus

Kinase family-Jak) ακολουθούμενη από φωσφορυλίωση των μεταγωγέων σήματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής (Signal Transducers and Activators of Transcription-STAT) STAT1 και STAT4. Η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της IL-35 απαιτεί τους STAT1 και STAT4, οι οποίοι σχηματίζουν ένα μοναδικό ετεροδιμερές που δεσμεύεται σε χαρακτηριστικές θέσεις εντός των υποκινητών IL12a και Ebi3. Αυτός ο μη συμβατικός τρόπος σηματοδότησης, ο οποίος διακρίνεται από άλλα μέλη της οικογένειας της IL-12, μπορεί να διευρύνει το φάσμα αλλά και την εξειδίκευση της IL-35 μεσολαβούμενης ανοσοκαταστολής(7).

Χάρη στην προαναφερθείσα ικανότητα των κυτοκινών της οικογένειας της IL-12, που τους δίνει τη δυνατότητα να εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές της ανοσίας, η IL-35 έχει μελετηθεί σε μια αρκετά φλεγμονώδη νοσήματα, ωστόσο ο ρόλος της IL-35 στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου (ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα) δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

1.1.2 Ανοσορυθμιστική δράση σε αυτοάνοσα νοσήματα

Η IL-35 παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στα αυτοάνοσα νοσήματα(8), στις φλεγμονώδεις ασθένειες, στις μολυσματικές ασθένειες (βακτηριακές(9) και ιογενείς(10)) αλλά και στις νεοπλασίες(11). Ειδικά στα αυτοάνοσα νοσήματα και τις φλεγμονώδεις ασθένειες η δράση της είναι ανοσοκατασταλτική.

Την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε αξιοσημείωτη πρόοδος όσον αφορά την έρευνα για την IL-35. Μελέτες έχουν δείξει ότι έχει δύο μείζονες βιολογικές επιδράσεις α) την επαγωγή ρυθμιστικών κυτταρικών πληθυσμών και β) την αναστολή προ-φλεγμονοδών κυτταρικών πληθυσμών.

Σε πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων νοσημάτων όπως επίσης και κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων, έχει δειχθεί ότι η IL-35 συμβάλλει στην επαγωγή και τον πολλαπλασιασμό των Tregs και των ρυθμιστικών B κυττάρων (Bregs) και συνεπικουρεί στην κατασταλτική λειτουργία τους (12). Πιο συγκεκριμένα, η εισαγωγή της IL-35 επάγει κύτταρα Tregs που δεν εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3. Τα κύτταρα αυτά ωστόσο δρουν ανοσοκατασταλτικά μέσω της αυτοεπαγόμενης IL-35 εν αντιθέσει με άλλους τύπους Tregs που εκφράζουν την IL-10 και τον παράγοντα TGF-β (13).

Η παραγωγή της IL-35 από τα Tregs και τα Bregs οδηγεί στην την αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων και την αναστολή της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των Th17 κυττάρων. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η θεραπεία με ανασυνδυασμένη IL-35 βελτίωσε την πειραματική αυτοάνοση ραγοειδίτιδα (Experimental Autoimmune Uveitis-EAU) και μείωσε σημαντικά τα Th17 και Th1 κύτταρα και το πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών B κύττάρων(14) (5,

15). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η IL-35 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Μια έρευνα των Wang et al. απέδειξε ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη IL-35 αναστέλλει τη φλεγμονή του IBD (Inflammatory Bowel Disease) και της οξείας κολίτιδας μέσω επαγωγής και έκκρισης της IL-10 και αναστολή της έκφρασης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-6, παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), και IL-17 (16).

Παράλληλα, έχουν μετρηθεί τα επίπεδα IL-35 σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα που παραδόξως έχουν παρουσιάσει σημαντικές αποκλίσεις και ετερογένειες όπως για παράδειγμα το σύνδρομο Sjogren, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα της IL-35 στον ορό ασθενών στα αρχικά στάδια του συνδρόμου σε σύγκριση με τους υγιείς δότες. Συγκεκριμένα, στον ορό ασθενών με pSS (primary Sjogren's Syndrome) που νοσούσαν για λίγο καιρό, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα IL-35 σε σύγκριση με τους υγιείς δότες και στον ορό ασθενών που νοσούσαν για 1-2 χρόνια και περισσότερο καιρό (<2 χρόνια), τα επίπεδα της IL-35 ήταν υψηλότερα συγκριτικά με αυτά των υγιών δοτών (17). Σε μια άλλη έρευνα του 2019 των Su et al διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της IL-35 και των αλλοιώσεων (lesions) των στεφανιαίων αρτηριών στη νόσο Kawasaki (KD). Αυτή η μελέτη που διενεργήθηκε στον ορό παιδιών που έπασχαν από τη νόσο πριν τους χορηγηθεί θεραπεία με ενδοβλέβια ανοσοσφαιρίνη. Μετρήθηκαν τα επίπεδα IL-35 και άλλων παραγόντων στον ορό 4 ομάδων ατόμων: της ομάδας με KD και αλλοιώσεις στεφανιαίων αρτηριών, της ομάδας με KD χωρίς αλλοιώσεις στις στεφανιαίες αρτηρίες και δύο ομάδων υγιών δοτών, μια εκ των οποίων αποτελούνταν από εμπύρετα άτομα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα IL-35 στον ορό των ασθενών με νόσο Kawasaki ήταν μειωμένα σε σύγκριση με των υγιών δοτών. Το πόρισμα της έρευνας ήταν ότι ίσως η IL-35 να αναστέλλει τη φλεγμονή και επακόλουθα να προλαμβάνει τις αλλοιώσεις των στεφανιαίων αρτηριών στους ασθενείς με τη νόσο Kawasaki (18).

1.1.3 Ανοσορυθμιστική δράση στη ψωριασική νόσο

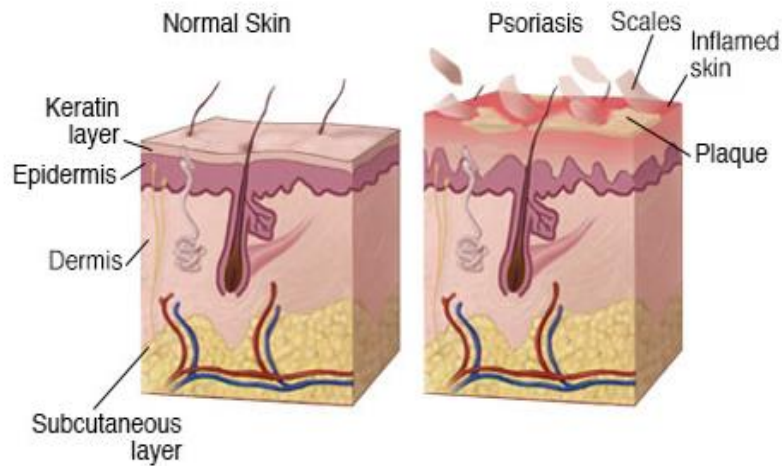
Όσον αφορά το ρόλο της IL-35 στη ψωριασική νόσο σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, η μελέτη των Zhang et al αξιολόγησε τη δράση της IL-35 σε τρία πειραματικά μοντέλα ψωρίασης, δύο εκ των οποίων αφορούσαν πειραματικά μοντέλα ποντικών (keratin 14 (K14)-vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)-transgenic (Tg) mouse model και imiquimod-induced psoriasis mouse model) και το ένα αφορούσε μια κυτταρική σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (human keratinocyte cell line-HaCaT). Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η IL-35 κατέστειλε την έκφραση παραγόντων των οποίων η έκφραση αυξάνεται στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων ενώ στα μοντέλα ψωρίασης που αφορούσαν πειραματικά μοντέλα ποντικών,

χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για την αλληλουχία της IL-35 και βρέθηκε ότι αυτή μπορεί να εμφανίσει ανοσοκατασταλτική δράση στα μοντέλα αυτά. Το πόρισμα της έρευνας αυτής ήταν ότι η IL-35 έχει ανοσοκατασταλτικό ρόλο στη νόσο της ψωρίασης(19).

Οι μελέτες που αφορούν το ρόλο της IL-35 σε ασθενείς με ψωριασική νόσο είναι εξίσου σημαντικές αλλά ελάχιστες. Σε μια από αυτές, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της IL-35 και άλλων κυτοκινών στον ορό ασθενών με ψωρίαση με σκοπό να μελετηθεί η συσχέτισή τους με τη σοβαρότητα της νόσου. Οι ομάδες ατόμων συμπεριλήφθησαν ασθενείς με ψωρίαση που έπαιρναν θεραπεία και υγιείς δότες. Τα επίπεδα της IL-35 αλλά και των άλλων κυτοκινών ανιχνεύθηκαν στον ορό των υγιών δοτών αλλά και των ασθενών με ψωρίαση, πριν και μετά τη θεραπεία, μέσω της βιοχημικής μεθόδου ανίχνευσης ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) και παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της IL-35 στον ορό ασθενών που δεν είχαν ακόμη λάβει θεραπεία ήταν μειωμένα συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης της IL-35 στους υγιείς δότες και τους ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία(20). Άλλη μια μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2018, αξιολόγησε την έκφραση της IL-35 και τη κλινική της σημασία στη ψωρίαση μετρώντας τα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA μέσω της μεθόδου ELISA και της μεθόδου πραγματικού χρόνου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction). Η συγκέντρωση της IL-35 στον ορό των ατόμων που έπασχαν από ψωρίαση ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτή των υγιών δοτών, γεγονός που ίσως να υποδηλώνει, σύμφωνα με τη μελέτη, ότι η IL-35 παίζει ρόλο στη παθογένεια της ψωρίασης επηρεάζοντας την έκφραση ορισμένων κυτοκινών και μπορεί να αποτελέσει εργαλείο για τη παρακολούθηση και τη θεραπεία της νόσου(21).

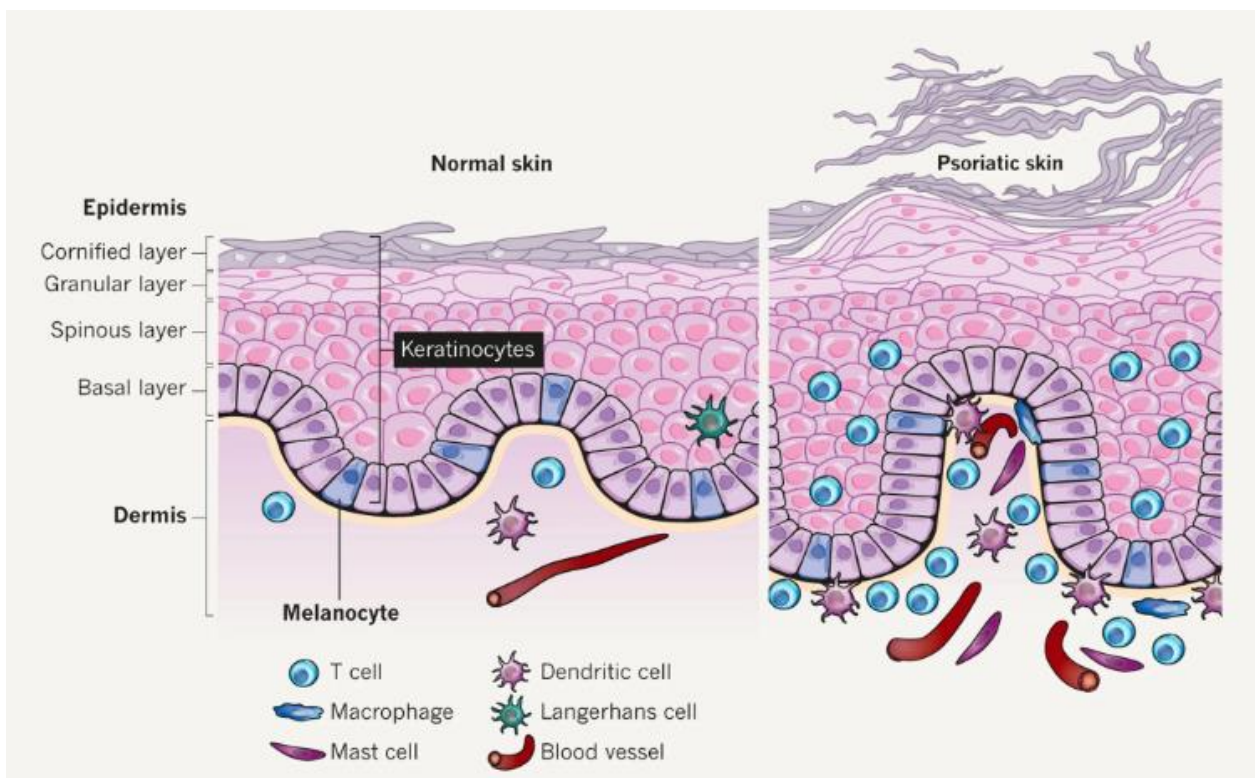
1.2 Γενικά στοιχεία ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα ως πρότυπα αυτοάνοσα νοσήματα και έτσι σε αυτή την υποενότητα θα αναφερθούν μερικά γενικά στοιχεία και πληροφορίες οι οποίες αφορούν τα νοσήματα αυτά.



Εικόνα 1. Διαφορά των στρωμάτων του δέρματος σε κανονικό ιστό δέρματος και σε παθολογικό ιστό με ψωρίαση. **Πηγή:** mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/symptoms-causes/syc-20355840

Η ψωρίαση είναι μια κοινή, υποτροπιάζουσα, χρόνια αυτοάνοση δερματοπάθεια. Η συγκεκριμένη νόσος πλήττει τα κύτταρα της επιδερμίδας και συγκεκριμένα προκαλεί επιτάχυνση του κύκλου ζωής τους με ποικίλα



αποτελέσματα και κλινικές συνέπειες. Κατά τη διάρκεια των εκρήξεων της νόσου, τα κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται έως και δέκα φορές το ρυθμό των υγιών δερματικών κυττάρων και αποτυγχάνουν να ωριμάσουν σωστά, με αποτέλεσμα να προκύπτουν φλεγμονώδεις, φολιδωτές ερυθρές δερματικές βλάβες γνωστές ως πλάκες, οι οποίες μπορεί προκαλούν φαγούρα και να είναι επώδυνες. **(Εικόνα 2.)**

Εικόνα 2. Διαφορές σε υγιή και σε πάσχοντα με ψωρίαση ιστό όπου διακρίνονται η υπέρμετρη στρατολόγηση T κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων στη βασική στοιβάδα. **Πηγή:** Psoriasis uncovered, J. Crow, Nature volume 492, pages S50–S51

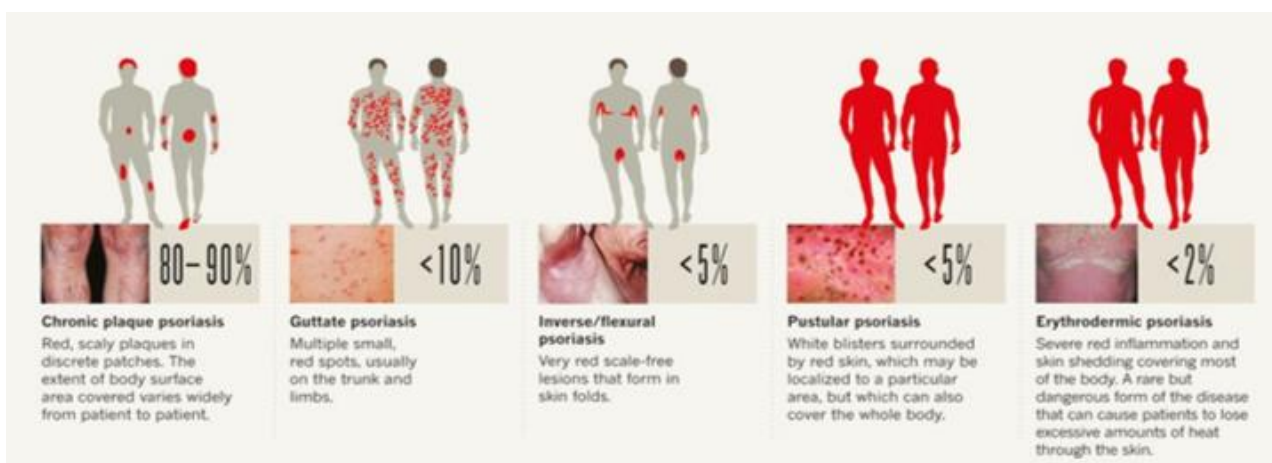
Η ψωρίαση επηρεάζει μέχρι και το 2% του συνολικού πληθυσμού και είναι πιθανό να αναπτυχθεί καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου. (22) Παρ' ότι η ηλικία των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο αυτή ποικίλλει, η ηλικία στην οποία η ψωρίαση έχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης διαιρείται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αποτελείται από έναν τύπο ψωρίασης που εμφανίζεται πριν τα 40 έτη και η δεύτερη φάση αποτελείται από ένα τύπο που εμφανίζεται μετά τα 40 έτη(23-25).

Υπάρχουν διάφορες μορφές ψωρίασης, οι κυριότερες από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω:

- **Ψωρίαση κατά πλάκας ή Ψωρίαση Vulgaris:** Η πιο συχνή μορφή ψωρίασης η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία φολιδωτών ερυθρών πλακών, ο αριθμός, η περιοχή εμφάνισης καθώς και η έκτασή τους ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στους ασθενείς. Η μορφή αυτή εμφανίζεται σε ένα εύρος ποσοστού 80-90% ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση.
- **Σταγονοειδής ψωρίαση:** Αυτή η μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από φολιδωτές βλάβες μικρού μεγέθους οι οποίες μοιάζουν με σταγόνες και καλύπτουν κατά κύριο λόγο το κορμό, τα άκρα (χέρια, πόδια) και το τριχωτό της κεφαλής. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ψωρίαση κατά πλάκας, οι βλάβες αυτές δεν είναι εκτεταμένες σε τόσο μεγάλο βαθμό. Από αυτή τη μορφή ψωρίασης πλήττονται κυρίως παιδιά και νεαροί, ενώ κύρια αιτία της μορφής αυτής αποτελεί η βακτηριακή μόλυνση όπως είναι για παράδειγμα η μόλυνση από στρεπτόκοκκο.
- **Φλυκταινώδης ψωρίαση:** Κύριο χαρακτηριστικό της αποτελούν οι φουσκάλες ή λευκές φλύκταινες οι οποίες περιβάλλονται από ερεθισμένο δέρμα και περιέχουν πύον. Οι φουσκάλες αυτές μπορούν να εξαφανίζονται και να επανεμφανίζονται γρήγορα είτε σε ολόκληρο το σώμα είτε εντοπισμένες μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή του σώματος. Αυτή η μορφή ψωρίασης είναι από τις σπανιότερες, καθώς

εμφανίζεται σε ένα ποσοστό μικρότερο του 5% των ασθενών με ψωρίαση.

- Ανάστροφη ψωρίαση: Ομοίως με τη φλυκταινώδη ψωρίαση, η ανάστροφη ψωρίαση πλήττει ένα ποσοστό μικρότερο του 5% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από λείες, ξηρές, ερυθρές και φλεγμονώδεις βλάβες οι οποίες όμως δε φέρουν φολίδες και αποτελούνται από ερεθισμένο ερυθρό δέρμα η εικόνα του οποίου χειροτερεύει με τον ιδρώτα και τη τριβή. Οι βλάβες αυτές εντοπίζονται συχνά στις πτυχές του δέρματος όπως στις μασχάλες, στη βουβωνική χώρα και κάτω από το στήθος.
- Ερυθροδερμική ψωρίαση: Σπάνιο είδος ψωρίασης το οποίο εμφανίζεται σε λιγότερο από το 2% των ασθενών. Ο τύπος αυτός θεωρείται ιδιαίτερα επικίνδυνη αφού χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός ερυθρού αλλά ερεθισμένου εξανθήματος το οποίο μπορεί να καλύπτει και ολόκληρο το σώμα. Εξαιτίας αυτού του εξανθήματος, μπορεί να υπάρξει μεγάλη απώλεια θερμότητας από το σώμα(26).



Εικόνα 3. Διαφορετικές μορφές ψωρίασης και η πιθανότητα εμφάνισής τους. Πηγή: Psoriasis uncovered, J. Crow, Nature volume 492, pages S50–S51

Ωστόσο, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί πως πέρα από τις φυσικές διαστάσεις της νόσου, η ψωρίαση έχει εκτεταμένη συναισθηματική και ψυχοκοινωνική επίδραση στους ασθενείς. Το γεγονός αυτό οδηγεί πολλές φορές στο στιγματισμό(εμφάνιση στιγματος), στη μείωση της αυτοεκτίμησης και στη ραγδαία αύξηση του στρες (άγχος), ενώ η νόσος συχνά σχετίζεται και με τη κατάθλιψη, επηρεάζοντας τη κοινωνική λειτουργικότητα και τις διαπροσωπικές σχέσεις του ατόμου που πάσχει. Η κατάθλιψη επηρεάζει ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ψωρίαση κυρίως εξαιτίας της φύσης των ευδιάκριτων βλαβών που η νόσος προκαλεί στο δέρμα του πάσχοντα. Ο κοινωνικός αποκλεισμός λόγω των δερματικών εξανθημάτων και των βλαβών που προκαλεί η νόσος έχουν τεράστιο αντίκτυπο στη ψυχοσύνθεση του

ατόμου το οποίο πάσχει οπότε αναπτύσσει έντονα συναισθήματα κοινωνικού αποκλεισμού και περιθωριοποίησης.

ΨΩΡΙΑΣΙΚΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ:

Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μια φλεγμονώδης μυοσκελετική ασθένεια η οποία σχετίζεται με τη δερματική ψωρίαση. Επηρεάζει γυναίκες και άντρες σχεδόν εξίσου με την ηλικία αιχμής της έναρξης της νόσου μεταξύ των ηλικιών 40 και 50 ετών. Πρόκειται για μια ασθένεια η οποία επηρεάζει πολλά συστήματα οργάνων συμπεριλαμβανομένων των περιφερικών αρθρώσεων και αυτών της σπονδυλικής στήλης, των ενθέσεων, του δέρματος και των ονύχων. Η PsA θεωρήθηκε αρχικά ως μια ήπια ασθένεια, αλλά στην τελευταία δεκαετία, το 40% -60% των ασθενών έχουν αναπτύξει διαβρωτικές και παραμορφωτικές επιπλοκές των αρθρώσεων. Αυτές οι βλάβες, δεν οδηγούν μόνο σε μειωμένη λειτουργία των αρθρώσεων και αυξημένη θνησιμότητα αλλά επηρεάζουν επίσης την ικανότητα εργασίας των ασθενών και τις κοινωνικές τους σχέσεις(27).

Η νόσος ωστόσο, παρατηρείται ότι εμφανίζει και διάφορες εξωαρθρικές εκδηλώσεις μια από τις οποίες, που θεωρείται και η σημαντικότερη, είναι η προσβολή των οφθαλμών. Η ταξινόμηση για την ψωριασική αρθρίτιδα σύμφωνα με τα κριτήρια CASPAR (Classification of Psoriatic Arthritis criteria) αναπτύχθηκε το 2006 η ειδικότητα και η ευαισθησία των οποίων είναι 98,7% και 91,4% αντιστοίχως.

Category	Description	Points
Current psoriasis or personal or family history of psoriasis	Current psoriasis: skin or plaque disease confirmed by rheumatologist or dermatologist. Personal history: obtained from patient, family physician, dermatologist, rheumatologist or other qualified health care provider. Family history: presence of psoriasis in 1° or 2° relative as reported by patient.	2 (current) OR 1 (history)
Psoriatic nail dystrophy on current examination	Onycholysis, pitting, hyperkeratosis.	1
Negative rheumatoid factor (RF)	Any method except latex, but preferably Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or nephelometry, using local laboratory reference range.	1
Dactylitis (current or on history as recorded by rheumatologist)	Swelling of an entire digit	1
Radiographic evidence of juxta-articular new-bone formation.	Ill-defined ossification near joint margins but excluding osteophyte formation on plain XRays of the hand or foot.	1

Εικόνα 4. Classification of Psoriatic Arthritis Criteria

Πηγή: rheumtutor.com/diseases/psoriatic-arthritis/

Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μια νόσος η οποία πλήττει άντρες και γυναίκες εξίσου και η ηλικία εμφάνισής της κυμαίνεται μεταξύ των 30 με 55 ετών αν και

έχουν παρατηρηθεί αρκετές περιπτώσεις ασθενών στις οποίες παρατηρήθηκε εμφάνιση της νόσου σε μεγαλύτερες ηλικίες. Η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα παρόλα τα κοινά στοιχεία τους που παρουσιάζουν, φαίνεται να παραμένει αδιευκρίνιστο μέχρι στιγμής το ερώτημα για το αν αποτελούν μια ενιαία ανοσολογική οντότητα. Στοιχεία ωστόσο, συνηγορούν και υποστηρίζουν την άποψη ότι η ψωριασική αρθρίτιδα οφείλει την παθογένειά της μερικώς ή και αποκλειστικώς στη ψωρίαση. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζεται από την εμφάνιση της νόσου της ψωριασικής αρθρίτιδας σε ασθενείς που ήδη έχουν ή αναπτύσσουν ψωρίαση, ενώ αξιοσημείωτο θεωρείται το ποσοστό των ασθενών με ψωρίαση οι οποίοι αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα το οποίο φτάνει το 70%.

Σε αυτό το πλαίσιο, η ψωριασική αρθρίτιδα εμφανίζεται μεν περί τα 7 έτη από την εμφάνιση της ψωρίασης, δεν είναι δε σπάνιο να εμφανιστεί και πριν αυτής αφού υπάρχουν περιπτώσεις καθώς και αναφορές οι οποίες υποστηρίζουν ότι 15-20% των ατόμων με ψωριασική αρθρίτιδα θα εμφανίσουν αυτή προτού της ψωρίασης.

1.3 Επιδημιολογία της νόσου

Η ψωρίαση αποτελεί μια νόσο με παγκόσμιο επιπολασμό, αφού επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού(28, 29). Τα δυο φύλα πλήττονται εξίσου από την ψωρίαση ενώ σε πιο ειδικό επίπεδο, όσον αφορά τη ψωρίαση κατά πλάκας, μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αφορά κυρίως δύο ηλικιακές ομάδες. Συμφωνα με μελέτες, προέκυψε ότι ο πρώτος τύπος σχετίζεται με το οικογενειακό ιστορικό ή τη μόλυνση από το βακτήριο του στρεπτόκκοκου και εμφανίζεται περίπου στα 17-35 έτη, ενώ ο δεύτερος τύπος εμφανίζεται μετά την ηλικία των 40, περίπου στα 55-60 έτη, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποιο οικογενειακό ιστορικό. Η χώρα με τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κάθε χρόνο όπως προκύπτει από μια παγκόσμια μελέτη φαίνεται να είναι η Ιταλία με ποσοστό εμφάνισης 2.90%. Ακολουθούν η Δανία με 2.84%, η Σουηδία με 2.00% και η Γερμανία με ποσοστό επίσης 2.00%(30). Σε μια πρόσφατη μελέτη που αφορά στον επιπολασμό της νόσου στο γενικό πληθυσμό, διακρίνεται ότι το ποσοστό αυτό κυμαίνεται σε ένα σχετικά μεγάλο εύρος από 2.7% στις ΗΠΑ έως και 8.5% στην Νορβηγία, με τα πιο χαμηλά ποσοστά να εμφανίζονται στην Ινδία, την Αφρική και την Ασία, ενώ τα πιο υψηλά φαίνεται να αφορούν την Ευρώπη(31, 32).

Αντιστοίχως, και όσον αφορά την PsA υπάρχουν ορισμένες αναφορές οι οποίες σχετίζονται τόσο με τον επιπολασμό όσο και με τις επιπτώσεις της νόσου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνότητα στον πληθυσμό ποικίλλει από 0.06 έως 0.25% στην Αμερική, 0.05-0.21% στις διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, ενώ για την Ασία, την Αφρική και την νότια Αμερική υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές που υποδεικνύουν ότι η συχνότητα σε αυτές είναι μικρότερη σε σχέση με τις προαναφερθέντες χώρες. Παρ' όλα αυτά, οι μελέτες που σχετίζονται με το ποσοστό των ατόμων που αναπτύσσουν PsA κάθε χρόνο, φαίνεται να είναι ελάχιστες. Ωστόσο, από ορισμένες εξ' αυτών που δημοσιεύτηκαν μεταξύ του 2009-2011 προκύπτει ότι κάθε χρόνο περίπου 4-7 στα 100.000 άτομα

αναπτύσουν την νόσο χωρίς όμως αυτό να είναι απολύτως βέβαιο, αφού ανάλογες μελέτες μεταξύ του 2001-2003 ανέφεραν ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος μεταξύ του 0.1-23.1%(27).

Καταδεικνύεται λοιπόν, ότι οι μελέτες που αφορούν τις νόσους της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας χρειάζονται βελτιστοποίηση καθώς οι υπάρχουσες μελέτες πάνω σε αυτές είναι λίγες και συχνά περιορίζονται σε γεωγραφικά κριτήρια και πολλές φορές χωρίς να είναι σωστά ενημερωμένες. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρξουν περισσότερες έρευνες ευρείας κλίμακας οι οποίες θα αναφέρουν το ποσοστό ατόμων που αναπτύσσουν Ps και PsA κάθε χρόνο, αλλά και την συχνότητα εμφάνισης τους στον γενικό πληθυσμό.

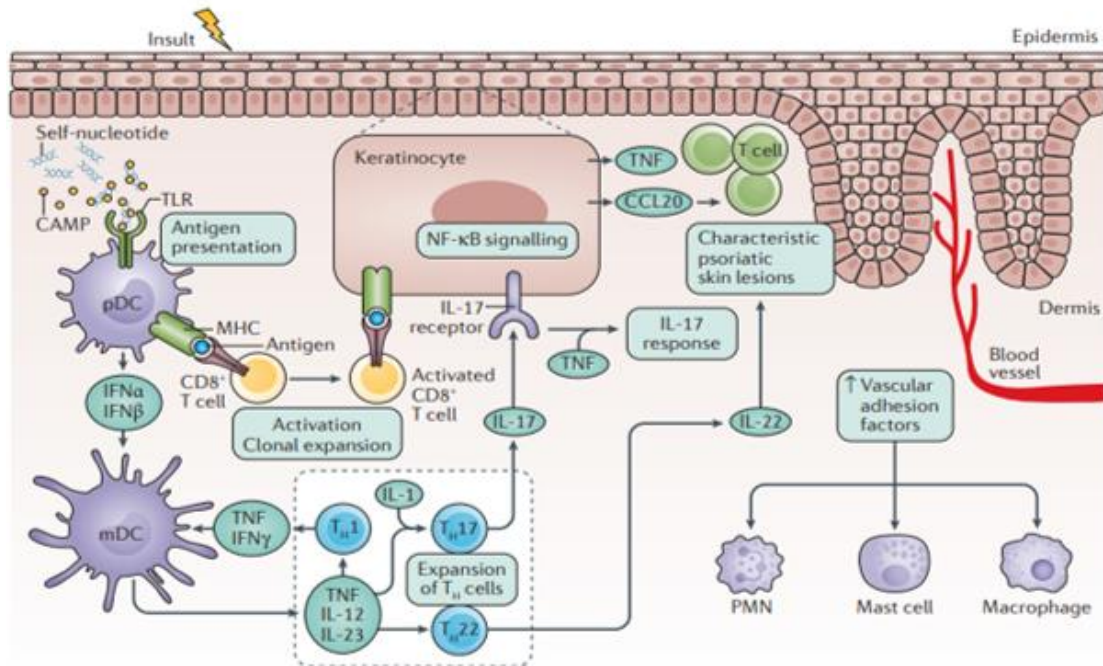


Εικόνα 5. Ποσοστό εμφάνισης της ψωρίασης στο γενικό πληθυσμό
Πηγή: Psoriasis, Gottlieb et al, NATURE REVIEWS, VOLUME 2 | 2016

1.4 Αιτιοπαθογένεια

Η ψωρίαση αποτελεί μια ασθένεια στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα καθώς και τα T λευκοκύτταρα. Ομοίως, με άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων οδηγώντας σε αυτοσυντηρούμενη και χρόνια ανοσοαπόκριση, φαίνεται να είναι κρίσιμη. Ο μηχανισμός της νόσου, περιλαμβάνει σε ένα πρώτο στάδιο, την έκθεση του ατόμου σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα (όπως τραύμα ή φαρμακευτική αγωγή), το οποίο προκαλεί απελευθέρωση νουκλειϊκών οξέων, τα οποία λειτουργούν ως αντιγόνα, ειδικότερα όταν τα άτομα υπόκεινται σε γενετική προδιάθεση υπέρ της νόσου. Αυτά τα νουκλειϊκά οξέα μπορούν να σχηματίσουν συμπλέγματα με τα αντιμικροβιακά πεπτιδία (AMP) που απελευθερώνονται από κερατινοκύτταρα όπως για παράδειγμα τα αντιμικροβιακά CAMPs (Cathelicidin Antimicrobial Peptides), των οποίων η λειτουργία είναι να

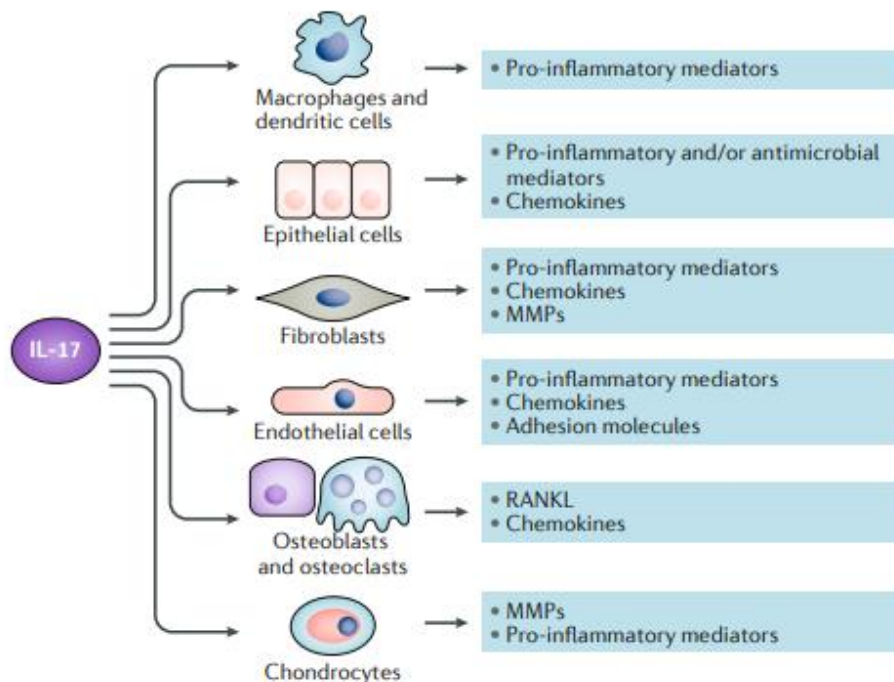
προσδένονται στους υποδοχείς των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων TLR7 και TLR9 οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια πλασμοκυτταρικών δενδριτικών κυττάρων (pDCs). Η σύνδεση αυτή οδηγεί στη παρουσίαση του αντιγόνου, το οποίο εν τέλει ενεργοποιεί τα CD8+ T κύτταρα. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα CD8+ T κύτταρα, μεταναστεύουν στην επιδερμίδα όπου και έρχονται σε επαφή με το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας MHC (Major histocompatibility Complex) τύπου I, υποδοχέα των κερατινοκυττάρων με τελικό αποτέλεσμα τη διέγερση της απελευθέρωσης διαλυτών παραγόντων όπως είναι για παράδειγμα κυτοκίνες, χημειοκίνες και μεσολαβητές της έμφυτης ανοσίας οι οποίοι θα οδηγήσουν τελικά σε φλεγμονή και θα διεγείρουν τον ασυνήθιστα υπερβολικό και ταχύ πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι εκτός από τις κυτοκίνες και τους μεσολαβητές της έμφυτης ανοσίας που παράγονται, σημαντική είναι και η παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών IL-12, IL-23 και TNF (Tumor Necrosis Factor), οι οποίες παράγονται από τα mDCs (myeloid Dendritic Cells), και θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση διάφορων T κυτταρικών πληθυσμών όπως των Th1, Th17 και Th22 προς περαιτέρω παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών. Ο πληθυσμός των Th17 κυττάρων, τα οποία αποτελούν μια υποκατηγορία προφλεγμονωδών βοηθητικών κυττάρων T, χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ιντερλευκίνης 17 (IL-17) και σχετίζεται με τα T ρυθμιστικά κύτταρα. Αυτός ο υποπληθυσμός T βοηθητικών κυττάρων ενεργοποιείται από την IL-23, ωστόσο φαίνεται η ενεργοποίησή της απόκρισής τους να ενισχύεται και από την IL-1. Η IL-17 δρα απευθείας στα κερατινοκύτταρα μέσω διέγερσης της έκκρισης TNF και μιας χημειοτακτικής ουσίας η οποία ονομάζεται CCL20 (Chemokine (C-C motif) ligand 20) και η λειτουργία της έγκειται στο να προσελκύει δενδριτικά αλλά και T κύτταρα. Υπερδραστικότητα του κυτταρικού υποπληθυσμού Th17 μπορεί να οδηγήσει στην επιδείνωση της ανοσολογικής απόκρισης του υποπληθυσμού Th1 και την ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων. Πολλές από τις παθολογικές λειτουργίες των Th17 κυττάρων έχουν αποδοθεί στην έκκριση της IL-17A, συμπεριλαμβανομένης της: στρατολόγησης ουδετερόφιλων, η ενεργοποίηση των κυττάρων της εγγενούς ανοσίας, ενίσχυσης των λειτουργιών των B κυττάρων και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως του TNF, του GM-CSF και της IL-1b.



Εικόνα 6. Μηχανισμός ψωρίασης

Πηγή: Psoriasis, Gottlieb et al, NATURE REVIEWS, VOLUME 2 | 2016

Η IL-17A δρα σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων σχετικούς με την παθογένεση των PsO και PsA, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών, των χονδροκυττάρων, των μονοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων όπως είναι τα κερατινοκύτταρα.



Εικόνα 7. Βιολογικές δράσεις της IL-17. **Πηγή:** Beringer, A., & Miossec, P. (2019). Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*.

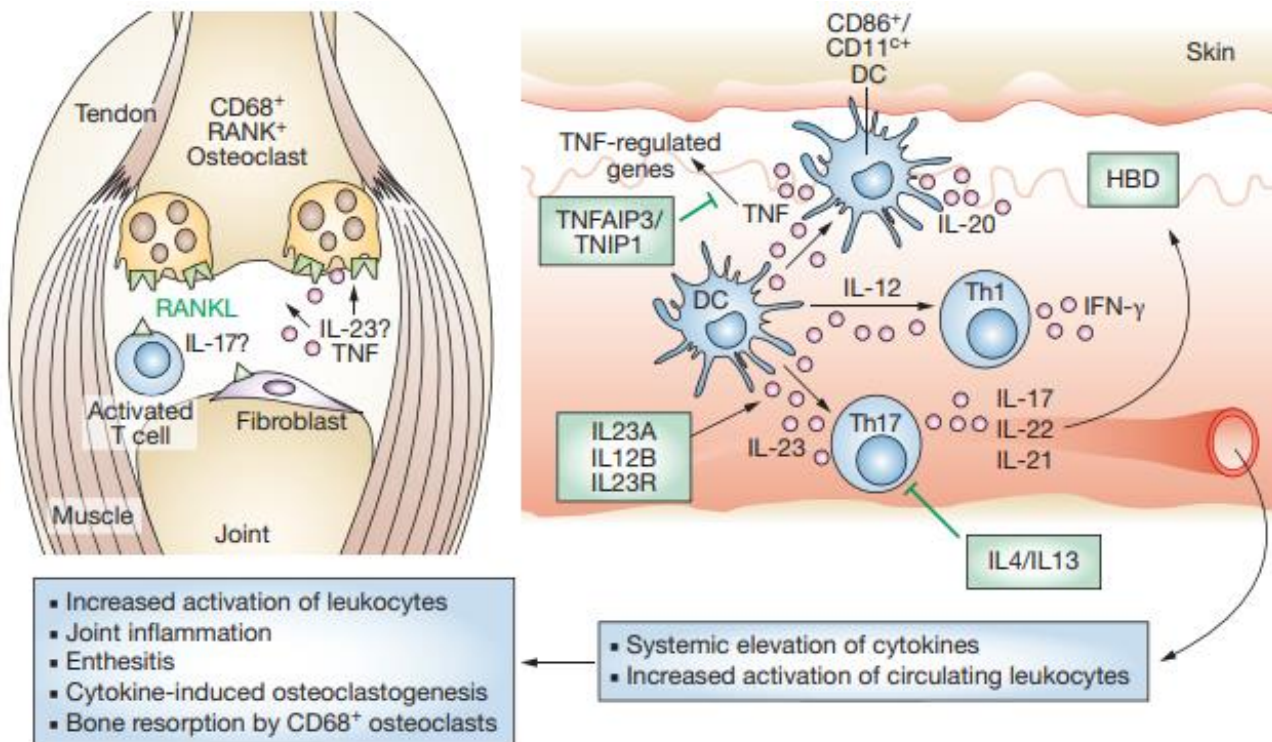
Άλλος ένας σημαντικός ρόλος της IL-17 είναι το γεγονός ότι έχει την ικανότητα να δρα σε συνδυασμό με άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες αλλά και με τον παράγοντα TNF για την παραγωγή χημειοκινών και defensins οι οποίες όχι μόνο θα ενισχύσουν την άμυνα του ατόμου αλλά θα επάγουν την στρατολόγηση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στα σημεία των βλαβών που προκλήθηκαν από τη ψωρίαση. Όσον αφορά στον χαρακτηριστικό φαινότυπο της νόσου, η IL-22 είναι μία κυτοκίνη που συνεισφέρει σημαντικά σε αυτόν αφού προκαλεί ανάπτυξη της επιδερμικής υπερπλασίας, ακάνθωση και παρακεράτωση.

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου αφορούν το cAMP (Cyclic adenosine monophosphate), οι JAK-STAT κινάσες (Janus kinases- signal transducer and activator of transcription proteins) καθώς και ο NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), αφού η ενεργοποίησή τους φαίνεται να οδηγεί σε παραγωγή των TNF και IL-17. Τέλος, η έκφραση του υποδοχέα του VEGF (Vascular endothelial growth factor) στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου και έκφραση προσκολλητικών μορίων που θα οδηγήσουν σε περαιτέρω στρατολόγηση φλεγμονωδών κυτταρικών πληθυσμών. Όλα αυτά τα γεγονότα μαζί εν τέλει θα οδηγήσουν σε μια συμπτωματική χρόνια φάση της ψωριασικής νόσου η οποία θα συνεχίσει μέχρι την χορήγηση κάποιας θεραπείας(31).

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου της ψωρίασης είναι η παρουσία φοιδωτών ερυθρών με ασημένια χροιά πλακών στην επιδερμίδα των ασθενών. Οι πλάκες είναι ένα αποτέλεσμα της υπερπλαστικής επιδερμίδας με πρόωρη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και ατελή κερατοποίηση με κατακράτηση πυρήνων της κεράτινης στιβάδας. Ο κύκλος

ζωής των βασικών κερατινοκυττάρων αυξάνεται σε σύγκριση με το κανονικό δέρμα και ως αποτέλεσμα παρατηρείται πάχυνση της επιδερμίδας που παρουσιάζει επιμήκεις ράχες. Σε συνδυασμό με το φλεγμονώδες διήθημα του δέρματος, αυτό συμβάλλει στην ολική πάχυνση των βλαβών, η οποία μπορεί να ποικίλλει σε από παχιές έως λεπτές σε πάχος ψωριασικές πλάκες. Το φλεγμονώδες διήθημα αποτελείται κυρίως από δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και T κύτταρα στη δερμίδα όπως και ουδετερόφιλα αλλά και ορισμένα T κύτταρα στην επιδερμίδα. Η ερυθρότητα των βλαβών οφείλονται στον αυξημένο αριθμό ελικοειδών τριχοειδών αγγείων τα οποία φθάνουν στην επιφάνεια του δέρματος μέσω ενός έντονα αραιωμένου επιθηλίου.

Περίπου η ίδια αλληλουχία γεγονότων λαμβάνει χώρα και στη νόσο της ψωριασικής αρθρίτιδας με τη διαφορά ότι προσθέτονται κάποια μόρια και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες αφορούν την προσβολή των αρθρώσεων που αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου αυτής. Πιο συγκεκριμένα, τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα τα οποία βρίσκονται υπό συνθήκες στρες, απελευθερώνουν DNA και αυτό με τη σειρά του συνδέεται με το αντιμικροβιακό πεπτιδίδιο LL-37, επάγοντας τη παραγωγή IFN-α από τα pDCs. Η IFN-α θα ενεργοποιήσει τα mDCs τα οποία θα μεταναστεύσουν στους λεμφαδένες όπου και θα επάγουν τη διαφοροποίηση των Th1 και Th17. Οι δυο κυτταρικοί υποπληθυσμοί, θα παράγουν εν τέλει IL-12, IL-17, IL-22 και TNF-α μαζί με άλλες κυτοκίνες και χημειοκίνες. Στο στρώμα της δερμίδας, τα κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή της IFN-γ είναι τα CD8+ T κύτταρα αλλά και τα έμφυτα λεμφικά κύτταρα. Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται στην δερμίδα είναι αυτές που ενεργοποιούν τα κερατινοκύτταρα έτσι ώστε να υπάρξει παραγωγή και άλλων κυτοκινών οι οποίες θα δράσουν παρακρινώς σε άλλα γειτονικά κύτταρα. Η διαφοροποίηση των Th1 και Th17 ταυτόχρονα με άλλους τύπους κυττάρων που παράγουν IL-17 και με τα OCPs (Osteoclast precursors) θα πραγματοποιηθεί στο μυελό των οστών(33).



Εικόνα 8. Μηχανισμός της ψωριασικής αρθρίτιδας. . **Πηγή:** Nograles, K. E., Brasington, R. D., & Bowcock, A. M. (2009). New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis. *Nature Clinical Practice*

Σε αυτό το πλαίσιο και όσον αφορά τους οστεοκλάστες κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούμε στη λειτουργία και το σχηματισμό τους αφού φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ψωριασικής αρθρίτιδας. Οι οστεοκλάστες αποτελούν ένα είδος κυττάρων των οστών των οποίων η λειτουργία είναι η καταστροφή του οστικού ιστού. Ο σχηματισμός των οστεοκλαστών απαιτεί την παρουσία του RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor κβ Ligand) και του M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Αυτές οι συνδεδεμένες με μεμβράνη πρωτεΐνες, παράγονται από γειτονικά στρωματικά κύτταρα αλλά και οστεοβλάστες, απαιτώντας έτσι άμεση επαφή μεταξύ αυτών των κυττάρων και των πρόδρομων οστεοκλαστών. Το M-CSF δρα μέσω του υποδοχέα του, c-fms (colony-stimulating factor 1 receptor) στον οστεοκλάστη, πυροδοτώντας έναν σηματοδοτικό καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί στην ενεργοποίηση δευτερογενούς αγγελιοφόρου. Τα δυο αυτά μόρια κρίνονται και τα δυο απαραίτητα για τη διαδικασία σχηματισμού των οστεοκλαστών και εμπλέκονται ευρέως στη διαφοροποίηση κυττάρων που προέρχονται από μονοκύτταρα / μακροφάγα. Το RANKL είναι μέλος της οικογένειας νέκρωσης όγκων (TNF) και είναι απαραίτητο για την οστεοκλαστογένεση. Το RANKL ενεργοποιεί τον NF-κβ και τον NFATc1 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) μέσω του RANK.

Τα διαφοροποιημένα στον μυελό των οστών λοιπόν Th17 κύτταρα, οι επίσης διαφοροποιημένοι OCPs και τα δενδριτικά κύτταρα φθάνουν στην άρθρωση

είτε μέσω κάποιας γειτονικής ένθεσης είτε μέσω της ροής του αίματος. Η αυξημένη έκφραση του RANKL του υποδοχέα του NF-κβ (RANK) από αρθρικά κύτταρα σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα TNF και IL-17 οδηγεί στη διαφοροποίηση των OCPs σε οστεοκλάστες έχοντας ως αποτέλεσμα την διάβρωση του οστού και τελικά τη δημιουργία παθολογικού φαινοτύπου.

1.5 Διάγνωση και θεραπεία

Η διάγνωση της ψωρίασης πραγματοποιείται μέσω κλινικής εξέτασης με φυσική εξέταση του δέρματος, των ονύχων και της κεφαλής, ενώ ορισμένες φορές η οριστική διάγνωση μπορεί να τεθεί με την λήψη μικρών τμημάτων δέρματος για τη διενέργεια βιοψίας, έτσι ώστε να διαπιστωθεί με την χρήση μικροσκοπίου το είδος της ψωρίασης.

Αντίστοιχα, και στην ψωριασική αρθρίτιδα μπορούν να γίνουν τα παραπάνω αλλά στη νόσο αυτή κρίνεται απαραίτητος και ο έλεγχος των αρθρώσεων για την διάγνωση της. Αυτό μπορεί να γίνει είτε φυσικά με ενδελεχή κλινική εξέταση ή αλλιώς μέσω δύο πολύ σημαντικών τεχνολογιών, με την χρήση ακτίνων X ή με MRI (Magnetic Resonance Imaging).



Εικόνα 9. X-ray χεριών με αλλοιώσεις ενδεικτικές ψωριασικής αρθρίτιδας, όπου διακρίνεται η χαρακτηριστική δυσμορφία pencil-in a cup. **Πηγή:** radiopaedia.org/articles/psoriatic-arthritis

Για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της νόσου υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία διαγνωστικών εργαλείων και “σκορ” που χρησιμοποιούνται. Όσον αφορά την ψωρίαση το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι το PASI (Psoriasis Area and Severity Index) αλλά υπάρχουν και άλλα χρήσιμα όπως το BSA (Body

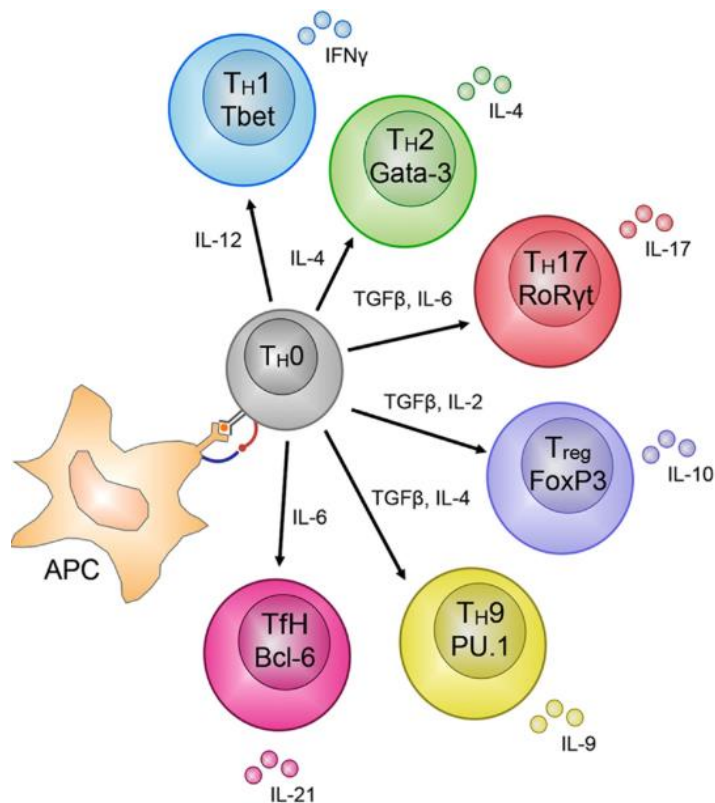
Surface Area), το DLQI (Dermatology Life Quality Index), το VAS (Visual Analogue Scale) τα οποία επίσης αξιοποιούνται και μπορούν να προσφέρουν μεγάλη βοήθεια. Παιρνώντας στην ψωριασική αρθρίτιδα και εκεί συναντώνται πολλά διαγνωστικά μέσα με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα να είναι το PsARC (PsA Response Criteria), και το DAS28 (Disease Activity Score 28). Από την στιγμή που θα τεθεί η διάγνωση ψωρίασης ή/και η ψωριασική αρθρίτιδας απαραίτητη κρίνεται η λήψη της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Για το λόγο αυτό υπάρχουν διάφορα φάρμακα που μπορεί να είναι κοινά μεταξύ των δύο νόσων. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου καθώς και άλλων παραγόντων (όπως είναι η συμμόρφωση και η ανταπόκριση του ασθενούς) η φαρμακευτική αγωγή ποικίλλει. Ειδικότερα, όσον αφορά τους ηπιότερους υπότυπους της την ψωρίασης, ενδείκνυται συνήθως τοπικοί παράγοντες όπως τα κορτικοστεροειδή, τα ανάλογα της βιταμίνης D, το ρετινοϊκό οξύ, η ανθραλίνη και άλλα, με τα κορτικοστεροειδή να καταλαμβάνουν τη θέση των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων θεραπευτικών παραγόντων. Οι ουσίες αυτές μπορεί να περιέχονται σε ενυδατικά προϊόντα, κρέμες ή σε μορφή γέλης αλλά και σε διάφορες άλλες μορφές. Όταν η ψωρίαση εκδηλώνεται με πιο βαρείς κλινικούς φαινοτύπους, τότε η στρατηγική αντιμετώπισης που ακολουθείται περιλαμβάνει συνήθως τη χρήση συστηματικών θεραπειών όπως είναι αυτή της μεθοτρεξάτης και της κυκλοσπορίνης ενώ σε περιπτώσεις όπου οι παραπάνω θεραπείες δεν αποδίδουν κάποιο αποτέλεσμα, υπάρχει η πιθανότητα η αγωγή να συνεχιστεί μέσω της χρήσης βιολογικών παραγόντων που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Μερικοί βιολογικοί παράγοντες αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι αναστολείς του TNF- α , οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4) καθώς και συγκεκριμένες κυτοκίνες όπως είναι οι αναστολείς της IL-17 και οι αναστολείς των IL-12/IL-23. Παράλληλα, τόσο για τις ηπιότερες μορφές όσο και στις περισσότερες επιδεινωμένες, αρκετές φορές γίνεται η χρήση ακτινοβολιών όπως είναι αυτή της UVA και της UVB. Τέλος, όσον αφορά τη ψωριασική αρθρίτιδα, οι ήπιες μορφές της αντιμετωπίζονται κυρίως με μη στεροΐδη αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAID) ή μέσω θεραπείας με κορτικοστεροΐδη . Όταν η θεραπεία αυτές δεν επαρκούν για την ανακούφιση των συμπτωμάτων ή όταν η νόσος εμφανίζεται με βαρύτερες κλινικές εκδηλώσεις, τότε χρησιμοποιούνται DMARDs (Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs) όπως είναι η μεθοτρεξάτη. Επίσης, όπως και στην ψωρίαση, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής αρκετές φορές αξιοποιούνται βιολογικοί παράγοντες όπως είναι οι αναστολείς του TNF- α , ενώ πιο πρόσφατα, ορισμένα νέα φάρμακα όπως είναι οι αναστολείς της IL-17 και οι αναστολείς της PDE4 που χρησιμοποιούνται στην ψωρίαση, έχουν δοκιμαστεί και στην ψωριασική αρθρίτιδα(34, 35).

1.6 Κυτταρικοί πληθυσμοί

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής ανοσολογικής απόκρισης ενάντια σε κάποιο ισχυρό παθογόνο, ενεργοποιούνται αντιγόνο-ειδικά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται, και εξαπλώνονται σε μεγάλο βαθμό. Σε αυτή τη φάση εξάπλωσης προκύπτει ως αποτέλεσμα να παραχθεί ένας μεγάλος πληθυσμός ανοσοδραστικών Τ-κυττάρων, φαινόμενο το οποίο συναντάται και στην ψωριασική νόσο. Για αρκετά χρόνια μέχρι περίπου τη δεκαετία του 1970, η ψωριασική νόσος θεωρούνταν μία ασθένεια που οφείλεται κυρίως στα «ελαττωματικά» κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στην επιδερμίδα παρ' όλα αυτά, διάφορα ερευνητικά ευρήματα μετατόπισαν το ενδιαφέρον προς την επίκτητη και την έμφυτη ανοσία και ειδικότερα στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, τα οποία όπως είναι πλέον γνωστό, παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ψωριασικής νόσου. Αυτό έχει γίνει αποδεκτό από τις αρχές του 20ου αιώνα καθώς όπως έχει αναφερθεί, ήδη από τότε τα ενεργοποιημένα CD4+ Τ κύτταρα είναι αυτά που μέσω της έκκρισης της IFN-γ έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στις ψωριασικές βλάβες. Αν και για πολλά χρόνια το ενδιαφέρον είχε εστιαστεί στα Th1 που αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές των ανοσολογικών αποκρίσεων στις ψωριασικές βλάβες, τα τελευταία χρόνια αρκετές έρευνες έχουν να κάνουν και με το ρόλο των Th17 κυττάρων. Στην συνέχεια, θα αναλυθούν ορισμένοι φλεγμονώδεις κυτταρικοί πληθυσμοί καθώς και οι μηχανισμοί δράσης τους για την καλύτερη κατανόηση της μελέτης αυτών στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

1.6.1 Th1

Τα Τ λεμφοκύτταρα, αφού ενεργοποιηθούν από κάποιο αντιγόνο και άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, διαφοροποιούνται σε υποπληθυσμούς με διαφορετικό προφίλ κυτοκινών και λειτουργικές δραστηριότητες. Τα CD4+ MHC τάξης II (Cluster of Differentiation) είναι τα κύτταρα αυτά τα οποία συνήθως αποκτούν τη λειτουργία των βοηθητικών Τ κυττάρων (Th cells). Υπάρχουν διάφοροι υποπληθυσμοί Th κυττάρων ανάλογα τους δείκτες επιφανείας, τους μεταγραφικούς παράγοντες, την λειτουργία που επιτελούν καθώς και τις κυτοκίνες που εκκρίνουν ενώ οι κυριότερες εξ' αυτών είναι οι Th1, Th2, Th17, Th9 και Tfh (T follicular helper cells). Ωστόσο, τα Τ κύτταρα μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν και σε κυτταροτοξικά CD8+ MHC τάξης I, τα οποία αποτελούν τα Τ κύτταρα τα οποία διαχωρίζονται και αυτά σε υποπληθυσμούς όπως Tc1 και Tc2.



Εικόνα 10. Διαφοροποίηση των T κυττάρων σε υποπληθυσμούς. Ξεκάθαρα διακρίνονται επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και τα μόρια που εκκρίνουν. **Πηγή:** T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation, Turner et al, Front. Genet., 12 November 2013

Χαρακτηριστικό του υποπληθυσμού Th1 αποτελεί η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Tbet, STAT1, STAT4 καθώς και η παραγωγή IFN- γ , η οποία προωθεί την ανοσία έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων(36, 37).

Στη ψωρίαση, φαίνεται να συμμετέχουν κυρίως Th1 και Tc1 υποπληθυσμοί. Επίσης, τόσο σε ψωριασικές πλάκες όσο και στο αίμα των ασθενών με ψωριασική νόσο έχουν βρεθεί αυξημένοι αριθμοί CD4⁺ Th1 και CD8⁺ Tc1 κύτταρα όπως έχουν επιπλέον βρεθεί και αυξημένα επίπεδα της IFN- γ , του TNF- α και της IL-12(38). Ωστόσο, είναι γνωστό όσων αφορά την ψωριασική αρθρίτιδα ότι υπάρχει αφθονία CD4⁺ T κυττάρων στον αρθρικό ιστό, ενώ στο αρθρικό υγρό υπάρχει πλεόνασμα CD8⁺ T κυττάρων(39).

1.6.2 Th17

Μία υποκατηγορία T βοηθητικών κυττάρων αποτελούν τα Th17 κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα και ο ρόλος τους έχει διερευνηθεί αρκετά. Οι κυτοκίνες που είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη των Th17 κυττάρων είναι οι IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 β καθώς και ο TGF- β πιθανώς

λόγω της ικανότητάς του να καταστέλλει την ανάπτυξη των Th1 κυτταρικών πληθυσμών. Αν και στην κατηγορία των Th17 εκκρινόμενων κυτοκινών ανήκουν 6 μέλη, οι πιο σημαντικές εξ' αυτών είναι οι εξής δύο: η IL-17A και η IL-17F(40).

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία συνηγορούν στο γεγονός ότι τα Th17 κύτταρα καθώς και οι κυτοκίνες που σχετίζονται με αυτά, όπως η IL-17A, η IL-17F, η IL-21, η IL-22, η IL-23 και η IL-26, παίζουν σημαντικό ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις στις οποίες βέβαια συμπεριλαμβάνονται η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα. Τόσο τα Th17 όσο και οι εκκρινόμενες από αυτά κυτοκίνες που προαναφέρθηκαν, φαίνεται να βρίσκονται αυξημένες, όσον αφορά τις τιμές τους, στο δέρμα αλλά και στη κυκλοφορία των ασθενών με ψωρίαση(41).

Μελέτες τόσο σε δείγματα PBMCs όσο και στο ψωριασικό δέρμα κατέδειξαν αυξημένη συχνότητα κυττάρων που παράγουν IL-17 και IL-22 σε άτομα που πάσχουν από ψωρίαση καθώς και σε άτομα που πάσχουν από ψωριασική αρθρίτιδα(41). Υποδεικνύεται λοιπόν ότι η ψωριασική νόσος δεν είναι μία ασθένεια η οποία εξαρτάται μόνο από την Th1 αλλά και από την Th17 απόκριση με την IFN- γ και IL-17 να αποτελούν δύο από τις σημαντικότερες κυτοκίνες επομένως για το λόγο αυτό είναι και οι δυο πιο συχνοί στόχοι θεραπείας.

1.6.3 IFN- γ

Η κυτοκίνη IFN- γ ανήκει στην οικογένεια των ιντερφερονών. Οι ιντερφερόνες είναι απαραίτητες για την προστασία των κυττάρων από ιικές λοιμώξεις και η οικογένειά τους διακρίνεται σε δύο κατηγορίες. Στη πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται τα μόρια IFN- α και IFN- β τα οποία εκκρίνονται σε περιπτώσεις ιικής λοίμωξης, ενώ η IFN- γ ανήκει στη δεύτερη κατηγορία ιντερφερονών που διαφέρουν σημαντικά από τις ιντερφερόνες τύπου I. Η IFN- γ εκκρίνεται κυρίως από τα T κύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK κύτταρα), αλλά εκκρίνονται επίσης και από τα B-λεμφοκύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και τα κύτταρα T φυσικούς φονείς (NKT κύτταρα). Αξίζει να σημειωθεί ότι η υποκατηγορία T βοηθητικών κυττάρων Th1 εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες IFN- γ και TNF- α . όσον αφορά τη λειτουργία της, η κύρια δράση της IFN- γ είναι η προαγωγή της διαφοροποίησης των T βοηθητικών (Th) κυττάρων προς Th1 αλλά και η αναχαίτηση της επέκτασης του Th2 υποπληθυσμού, με την δράση αυτή να διεκπεραιώνεται μέσω της αύξησης παραγωγής της IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα η οποία θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση του υποδοχέα των T κυττάρων(42). Μελέτες τόσο στον ορό όσο και σε PBMCs ασθενών με ψωρίαση έδειξαν ότι το ποσοστό της IFN- γ και στα δύο αυτά είναι σημαντικά αυξημένο από ότι στους υγιείς με το ποσοστό να αυξάνεται μέχρι και 2.5 φορές περισσότερο στους ασθενείς(43). Επίσης, χορήγηση ενός anti-IFN- γ φαρμάκου σε ασθενείς με ψωριασική νόσο φάνηκε να συμβάλλει στη βελτίωση της νόσου, σε ορισμένες περιπτώσεις, προκαλώντας πτώση του PASI score καθώς και μείωση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή όπως το CXCL9(44).

1.6.4 IL-17

Η IL-17 είναι υπεύθυνη κυρίως για την άμυνα έναντι εξωκυττάριων βακτηρίων και μυκήτων. Ωστόσο, αν και η κυτταρική απόκριση διαφέρει ανάλογα με το στόχο της, η IL-17 δρα συνεργατικά με άλλες κυτοκίνες αυξάνοντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, TNF-α), χημειοκινών (CXCL2, CXCL8) και πρωτεϊνών τελεστών (συμπλήρωμα). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-17 είναι σημαντικά αυξημένη στον ορό σε ασθενείς με ψωρίαση(45).

Επιπλέον, in vitro έρευνες σε PBMCs από ασθενείς με ψωριασική νόσο, έδειξαν αυξημένο αριθμό CD4+ T κυττάρων τα οποία παράγουν IL-17 καθώς και IL-22 μία άλλη κυτοκίνη που εκκρίνουν τα Th17 κύτταρα(46).

Οι κυτοκίνες που παράγονται από τα Th17 κύτταρα αναφέρεται ότι μπορούν να δράσουν στα κερατινοκύτταρα καθώς και σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα του δέρματος ενισχύοντας έτσι τη τοπική φλεγμονή και προκαλώντας εν τέλει υπερπλασία των κερατινοκυττάρων, που αποτελεί και το βασικό χαρακτηριστικό της ψωριασικής νόσου, επομένως η IL-17 αποτελεί το στόχο πολλών φαρμάκων. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί η συσχέτιση της IL-17 με την IFN-γ όπως αναφέρεται από τον Kryczek et al. καθώς η IFN-γ ενδεχομένως αποτελεί ένα προαγωγέα της μετακίνησης αλλά και της λειτουργίας της IL-17. Οι δύο αυτές κυτοκίνες μπορούν να δράσουν συνεργατικά στα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα προς παραγωγή της β-defensin 2, υποδεικνύοντας έτσι μία συνεργασία μεταξύ των κυττάρων Th1 και Th17 στην παθογένεια της νόσου(41). Η σημαντικότητα της κυτοκίνης αυτής επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και μέσω κλινικών δοκιμών με αναστολείς της IL-17 σε ασθενείς που έπασχαν από ψωριασική αρθρίτιδα, αφού τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναστολείς αυτοί συμβάλλουν στη βελτίωση της κλινικής σοβαρότητας της νόσου(47).

1.6.5 NK και NKT κύτταρα

Τα κύτταρα φυσικοί-φονείς (Natural killer cells-NK cells) είναι μεγάλα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα με ικανότητα να λύουν αυθόρμητα κύτταρα-στόχους. Αποτελούν το 10-15% των κυττάρων του περιφερικού αίματος, φυσιολογικά όμως βρίσκονται και σε διάφορα λεμφικά όργανα, όπως στο σπλήνα, σε λεμφαδένες καθώς και σε όργανα εκτός του λεμφικού ιστού, όπως είναι ο πλακούντας. Η λειτουργική τους σημαντικότητα έγκειται στην άμυνα του οργανισμού εναντίον ιογενών λοιμώξεων καθώς και στον έλεγχο νεοπλασιών. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν και ενεργοποιούνται από κυτταρικούς-στόχους που βρίσκονται σε κατάσταση κινδύνου, ανιχνεύοντας σε αυτά συνδέτες επαγόμενους από στρες μέσω φυσικών υποδοχέων κυτταροτοξικότητας. Τα κύτταρα NK εκφράζουν πολυάριθμους υποδοχείς οι οποίοι αναστέλλουν την ενεργοποίησή τους, συμπεριλαμβανομένης της

οικογένειας υποδοχέων KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) όταν αυτοί οι προσδέτες λείπουν, τα κύτταρα NK ενεργοποιούνται και «επιτίθενται» σε κύτταρα στόχους(48). Αν και ο ρόλος των NK κυττάρων δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις που υποστηρίζουν την εμπλοκή τους στη ψωρίαση. In vitro πειραματική μελέτη σε PBMCs αναφέρει ότι τα NK κύτταρα ασθενών με ψωριασική νόσο παρουσίαζαν μειωμένη κυτταροτοξικότητα καθώς και παραγωγή ορισμένων σημαντικών κυτοκινών. Αυτή η μειωμένη λειτουργικότητα των NK κυττάρων θα μπορούσε να έχει πολλές επιπλοκές καθώς τα NK κύτταρα είναι σημαντικά σε πολλές καταστάσεις όπως είναι η καταστροφή των υπερ-ενεργοποιημένων μακροφάγων και των T κυττάρων, η καταστολή της διαφοροποίησης σε Th17 κύτταρα και άλλες καταστάσεις(49). Τα κύτταρα αυτά έχουν βρεθεί στο φλεγμονώδες διήθημα δερματικών αλλοιώσεων που χαρακτηρίζουν τη ψωρίαση και μπορούν να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό φλεγμονωδών κυτοκινών πολλές από τις οποίες παίζουν ρόλο στη παθογένεση της ψωρίασης. Τα T-κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural killer T-cells NKT), αποτελούν μια υποκατηγορία των T λεμφοκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα λιπιδίων ή γλυκολιπιδίων που παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d που σχετίζεται με την τάξη MHC I. Διακρίνονται από τα NK κύτταρα τα οποία περιλαμβάνονται στη φυσική ανοσία και διαθέτουν υποδοχείς KIR, όπως τα NK, για την αναστολή της καταστροφής ίδιων αντιγόνων μέσω της αναγνώρισης MHC μορίων επιφανείας. Τα φυσιολογικά επίπεδα των NKT κυττάρων στο αίμα δεν είναι σταθερά και μπορεί να ποικίλλουν από άτομο σε άτομο(50).

1.7 Γενετικοί παράγοντες

Παρόλο που ο μηχανισμός ανάπτυξης της ψωρίασης αλλά και της ψωριασικής αρθρίτιδας δεν είναι ακόμη γνωστός, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται. Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο της νόσου, οι περισσότερες αναφορές κάνουν λόγο για ένα πολυπαραγοντικό τρόπο κληρονόμησης. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η πιθανότητα ανάπτυξης ψωρίασης φαίνεται να είναι υψηλότερη μεταξύ συγγενών πρώτου και δεύτερου βαθμού από ότι στο γενικότερο πληθυσμό. Σε μελέτες όπου είτε ο ένας είτε και οι δύο γονείς έπασχαν από ψωρίαση, βρέθηκε ότι το ρίσκο ανάπτυξης της νόσου στη περίπτωση που ο ένας γονιός έχει ψωρίαση είναι η ποσοστιαία πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου είναι της τάξης του 22% και στη περίπτωση και οι δυο γονείς να έχουν ψωρίαση τότε υπάρχει αύξηση του ποσοστού αυτού στο 65%. Τα προαναφερθέντα ποσοστά βέβαια, αυξάνονται όταν υπάρχει ήδη ένα παιδί στην οικογένεια το οποίο πάσχει ήδη από ψωρίαση και έτσι στην περίπτωση αυτή υπάρχει αύξηση σε 51% και 83% αντίστοιχα(51).

Επίσης, δεδομένα μελετών που έχουν διεξαχθεί σε διδύμους έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος ψωρίασης φαίνεται να είναι κατά τρεις φορές υψηλότερος σε μονοζυγωτικούς από ότι σε διζυγωτικούς διδύμους. Αυτό μεταφράζεται στο ότι περίπου το 15-30% των διζυγωτικών διδύμων αναπτύσει την νόσο ενώ όσον αφορά τους μονοζυγωτικούς, το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 65-75%. Όλα

αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η ψωρίαση αποτελεί μια ασθένεια που σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με γενετικούς παράγοντες αλλά δεν επηρεάζεται αποκλειστικά και μόνο από αυτούς, με την κληρονομικότητα της να μην φτάνει ποτέ στο 100%(52).

Σημαντική είναι επίσης η επίδραση τόσο περιβαλλοντικών παραγόντων (51) όσο και των επιγενετικών τροποποιήσεων(53).

Όσον αφορά συγκεκριμένους γενετικούς τόπους που φαίνεται να συσχετίζονται με τη ψωριασική νόσο, ξεχωρίζει ο γενετικός τόπος PSORS1C1 (PSORiasis Susceptibility 1 Candidate 1), ο οποίος εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 και θεωρείται υπεύθυνος για το 35%-50% περίπου της κληρονομικότητας της νόσου. Εκτός του γονιδίου PSORS1C1, ακόμα δύο σημαντικά γονίδια που αφορούν την ανάπτυξη της νόσου της ψωρίασης εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στη περιοχή HLA-C. Τα γονίδια αυτά είναι το HCR (Alpha-helix coiled-coil rod homologue) και το CDSN/C (corneodesmosin)(54).

Στη περιοχή αυτή έχουν βρεθεί συνολικά τουλάχιστον επτά διαφορετικοί μονονουκλεοτιδικοί σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs) με τους HLA-A και HLA-C να είναι οι πιο σημαντικοί, δηλαδή αυτοί που επιδρούν σε μεγαλύτερο βαθμό στην ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, ο HLA-Cw6 στη περιοχή PSOR1 έχει συσχετιστεί με τη ψωρίαση σε πολλές γεωγραφικές περιοχές και εθνικότητες(55).

Όστόσο, όσον αφορά στο ποιος παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τη ψωρίαση, οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί ποικίλουν, καθώς υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν τη θεωρία ότι ο HLA-A διαθέτει τη μεγαλύτερη συσχέτιση σχετικά με τις υπόλοιπες περιοχές(56). Η HLA-A περιοχή δεν είναι όμως η μόνη που σχετίζεται με την ψωρίαση. Είναι γνωστό και αποδεκτό εδώ και αρκετά χρόνια από την βιβλιογραφία ότι υπάρχουν διάφορες περιοχές που ενδεχομένως να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της ψωρίασης. Ορισμένες τέτοιες περιπτώσεις είναι οι PSORS2(17q25), PSORS3(4q34), PSORS4(1q), PSORS5(3q21), PSORS6(19q13), PSORS7(1p), PSORS8(16q12-13), PSORS11(5q31.1-q33.1), PSORS12(20q13), PSORS13(6q21) και CX3CL1(57-60).

Αντίστοιχα, και σε ο,τι έχει να κάνει με τη γενετική βάση της ψωριασικής αρθρίτιδας, έχει μελετηθεί ο ρόλος διαφόρων γενετικών τόπων, όπως είναι το HLA (Human Leukocytes Antigen) συμπλεγμα το οποίο φαίνεται να είναι ένα από τα περισσότερο μελετημένα. Τα γονίδια αυτά πιθανώς να διαφέρουν από άτομο σε άτομο και ορισμένοι πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων είναι δυνατό να σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου. Συμπερασματικά, οι πιο σημαντικοί γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη ψωριασική αρθρίτιδα είναι οι HLA-B, IL12B, TRAF3IP2, TNIP1, TYK2, καθώς και περιοχές κοντά στα γονίδια ATP10D, PTPRN2, CTNNA3, TNS1(56, 61, 62).

Οι περιοχές οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με τις ασθένειες αυτές συνεχώς πληθαίνουν, ωστόσο κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό να μελετηθεί η βιολογική σημασία των περιοχών αυτών καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους που μπορεί να οδηγήσει τελικώς στην εμφάνιση της ασθένειας.

1.8 Άλλοι παράγοντες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι γενετικοί παράγοντες φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη της νόσου της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας, αξίζει όμως να αναφερθούμε και στο ρόλο που παίζουν διάφοροι άλλοι παράγοντες σε αυτήν. Οι παράγοντες αυτοί ποικίλλουν και μπορεί να περιλαμβάνουν κάποιο φυσικό τραύμα, τη παχυσαρκία, το κάπνισμα, τη κατανάλωση αλκοόλ, διάφορα φάρμακα, το στρες και διάφορους άλλους(63). Πιο συγκεκριμένα, και όσον αφορά το φυσικό τραύμα, ο δερματολόγος Heinrich Koebner ήταν ο πρώτος που αναφέρθηκε στην ανάπτυξη της ψωρίασης έπειτα από κάποιον τραυματισμό. Κατά το φαινόμενο αυτό, πλάκες ψωρίασης κάνουν την εμφάνισή τους σε περιοχές όπου προηγουμένως υπήρξε κάποιος τραυματισμός. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε φαινόμενο Koebner και έχει τεκμηριωθεί ότι στο γενικό πληθυσμό αυτό είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη της νόσου σε ποσοστό 24%-51% των περιπτώσεων. Παρομοίως, και στην ψωριασική αρθρίτιδα έχει αναφερθεί ένα παρόμοιο φαινόμενο με βάση το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί και η βλάβη σε εν τω βάθει ιστούς όπως στη ψωριασική αρθρίτιδα.

Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας πέραν του τραυματισμού, θεωρείται πως αποτελεί η μόλυνση από διάφορα παθογόνα μικρόβια. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες η μόλυνση από *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* και άλλων παθογόνων οδηγεί στην ανάπτυξη ψωρίασης. Επίσης, η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της νόσου όπως καταγράφεται σε διάφορες μελέτες. Αντίστοιχα, στη ψωριασική αρθρίτιδα, η προσβολή τόσο της ανώτερης όσο και της κατώτερης αναπνευστικής οδού, καθώς και λοιμώξεις μαλακών μορίων, φαίνεται να συνδέονται με ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, και άλλοι παράγοντες κρίνονται καθοριστικοί για την ανάπτυξη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα. Όσον αφορά το ρόλο συγκεκριμένων φαρμάκων, τόσο κατά την ανάπτυξη ψωρίασης όσο και και ψωριασικής αρθρίτιδας, ορισμένες φαρμακευτικές αγωγές όπως είναι για παράδειγμα το λίθιο, οι β-αναστολείς, οι τετρακυκλίνες, οι μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις(ΜΣΑΦ) θεραπείες αλλά και πιο πρόσφατα φάρμακα όπως είναι οι TNF αναστολείς, IL-6R αναστολείς και άλλα φαίνεται ότι πυροδοτούν την έναρξη αυτών των ασθενειών. Η σχέση του αλκοόλ με την εμφάνιση της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας είναι πολύπλοκη και δεν έχει βρεθεί ακόμα κάποιος μηχανισμός δράσης. Ωστόσο, μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας, ενώ όσο αυξάνεται η καταναλούμενη ποσότητα μπορεί αναλογικά να αυξάνεται και η σοβαρότητα της νόσου. Ένας πιθανός τρόπος με βάση τον οποίο πιθανώς να δρα η αιθανόλη είναι ενεργοποιώντας τα T λεμφοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα και οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Τέλος, το κάπνισμα όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη της ψωρίασης αλλά και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί όσον αφορά τη ψωρίαση, έχει αναφερθεί ότι το ρίσκο ανάπτυξης της ασθένειας είναι υψηλότερο σε άτομα που καπνίζουν ή έχουν υπάρξει καπνιστές στο παρελθόν, σε σχέση με άτομα

που δεν είναι καπνιστές. Ωστόσο, για τη ψωριασική αρθρίτιδα, αυτό το εύρημα δεν έχει επιβεβαιωθεί, καθώς σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε δε παρατηρήθηκε η παραπάνω συσχέτιση μεταξύ της ασθένειας και του καπνίσματος.

Είναι αναγκαίο να τονιστεί, ότι αν και οι παραπάνω παράγοντες είναι είναι από τους πιο σημαντικούς που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη ή μη της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας, δεν είναι ωστόσο οι μόνοι παράγοντες που συμβάλλουν. Υπάρχουν πολλοί ακόμη υποψήφιοι πυροδοτικοί παράγοντες, όπως είναι για παράδειγμα το στρες, το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα άτομα, διάφορες ορμόνες, η παχυσαρκία καθώς και διάφοροι άλλοι, οι οποίοι μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα σημαντικοί για τον έλεγχο αλλά και τη διάγνωση της ασθένειας(62-65).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ηπαρινισμένου περιφερικού αίματος 5 ασθενών με ψωριασική νόσο (3 με ψωρίαση; 2 άνδρες και 1 γυναίκα, μέσος όρος ηλικίας 55.6, και 2 με ψωριασική αρθρίτιδα; 1 άνδρας και 1 γυναίκα, μέσος όρος ηλικίας 59.5 χρόνια) προερχόμενα από τα εξωτερικά Ιατρεία του Δερματολογικού Τμήματος και του τμήματος Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και δείγματα περιφερικού αίματος 13 υγιών δοτών(HCs).

2.2 Απομόνωση και κρυοσυντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells- PBMCs)

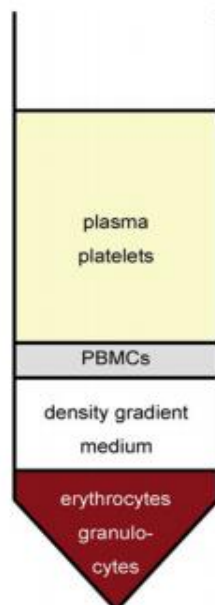
Αντιδραστήρια και υλικά:

- + Θρεπτικό μέσο RPMI-1640
- + Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum- FBS)

- + Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DiMethylSulfOxide- DMSO)
- + Μέσο βαθμίδωσης πυκνότητας Lymphoprep
- + Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής περιφερικού αίματος (20 mL ή/και άνω)
- + Falcon tubes 50 mL
- + Falcon tubes 15 mL
- + Στείρες πιπέττες Pasteur
- + Cryovials
- + Υγρό άζωτο

Περιγραφή μεθόδου:

- 1) Λήψη και συλλογή περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα χωρητικότητας 20 mL ή/και άνω.
- 2) Καταγραφή των προσωπικών και κλινικών πληροφοριών του ατόμου (ασθενούς ή υγιούς) και αποθήκευση τους σε αρχείο.
- 3) Προσεκτική επίστρωση του αίματος στο μέσο διαβάθμισης Lymphoprep (αναλογία 2:1) σε falcon tube των 50 mL.
- 4) Φυγοκέντρηση στα 1800-2000 rpm για 20 λεπτά με επιτάχυνση 5 και επιβράδυνση 3 προς αποφυγή διαταραχής της διαστρωμάτωσης.
*Πλέον έχουμε ένα falcon tube 50 mL το οποίο περιέχει τα διαχωρισμένα συστατικά του αίματος με βάση τη διαβάθμιση του βάρους τους.
- 5) Συλλογή της “νεφελώδους” ζώνης σε falcon tube των 15 mL, στην οποία περιέχονται τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος, και βρίσκεται ενδιάμεσα του ανώτατου στρώματος, στο οποίο περιέχονται αιμοπετάλια και πλάσμα, και του Lymphoprep.



Εικόνα 10: Διαστρωμάτωση περιφερικού αίματος έπειτα από φυγοκέντρηση(66).

Πηγή: Τροποποιημένο από: C.Riedhammer et al, Peripheral Blood Mononuclear Cells:Isolation, Freezing, Thawing and Culture

- 6) Προσθήκη μέσου RPMI-1640 στο falcon tube των 15 mL στο οποίο περιέχονται τα μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος, προς πλήση τους
- 7) Φυγοκέντρωση σε 2500 rpm για 5 λεπτά με επιτάχυνση και επιβράδυνση 9.
- 8) Απόρριψη του υπερκείμενου με στείρα πιπέττα Pasteur προσεκτικά (αφαίρεση υγρού μέχρι την καρπόλη του falcon tube) προκειμένου να μη διαταραχθεί το ίζημα που έχει δημιουργηθεί από τα κύτταρα από τη φυγοκέντρωση.
- 9) Προσθήκη RPMI-1640 εκ νέου προς επόμενη πλήση και φυγοκέντρωση ξανά στα 1800 rpm για 5 λεπτά για καλύτερη απομόνωση των λευκοκυττάρων.
- 10) Παρασκευή διαλύματος κρυοσυντήρησης αποτελούμενο από 60% FBS, 30% RPMI-1640 και 10% DMSO.
- 11) Αφαίρεση ξανά του υπερκείμενου από το falcon tube των 15 mL όπου βρίσκονται τα μονοπύρρηνα κύτταρα σε μορφή ιζήματος και προσθήκη 3 mL διαλύματος κρυοσυντήρησης με ταυτόχρονη επαναιώρηση των κυττάρων φροντίζοντας να διαλυθούν οποιαδήποτε συσσωματώματα.
- 12) Διαίρεση των κυττάρων σε 3 cryovials σημαίνοντάς τα κατάλληλα και περαιτέρω τοποθέτησή τους σε cryobox το οποίο περιέχει ισοπροπυλική αλκοόλη για την διατήρηση των κυττάρων σε καλή κατάσταση.
- 13) Αποθήκευση των κυττάρων σε κατάψυξη στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
- 14) Για τη μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων, πραγματοποιείται μεταφορά τους σε δεξαμενή η οποία περιέχει υγρό άζωτο.

2.3 Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue

Υλικά και αντιδραστήρια

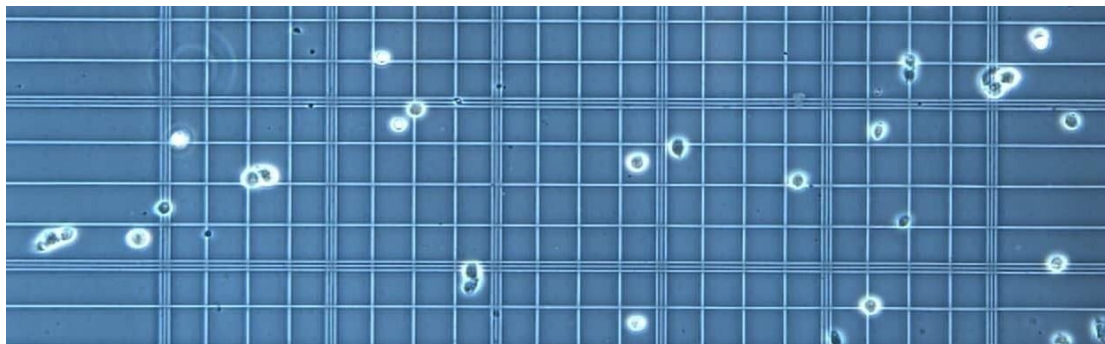
- ✚ Οπτικό μικροσκόπιο
- ✚ 0.4% χρώση Trypan Blue
- ✚ Πλάκα Neubauer

Περιγραφή μεθόδου:

1. Γίνεται λήψη 100μl κυττάρων σε Eppendorf tube και έπειτα προστίθεται 400μL 0.4% Trypan Blue, το οποίο είναι σε τελική συγκέντρωση 0.32%. Απαραίτητο κρίνεται να πραγματοποιηθεί καλή ανάδευση και να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων.
2. Γίνεται λήψη 100μl κυτταρικού εναιωρήματος που έχει υποστεί κατεργασία με Trypan Blue και στη συνέχεια εφαρμόζεται σε αιμοκυτταρόμετρο. Ακολουθεί η

πλήρωση των δύο θαλάμων κάτω από την καλύπτρα, επιτρέποντας έτσι την αφαίρεση του κυττάρου μέσω τριχοειδούς δράσης.

3. Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10X, γίνεται εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου.



Εικόνα 11: Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων εστιαζόμενοι στις γραμμές πλέγματος αιμοκυτταρομέτρου.

4. Υπολογισμός των ζωντανών, μη χρωματισμένων κυττάρων, καθώς μόνο τα αποπτωτικά και τα νεκρωτικά κύτταρα βάφονται με το Trypan Blue.
5. Πολλαπλασιασμός του αποτελέσματος $\times 10^4$ αφού η πλευρά του κάθε “τετραγώνου” είναι 1mm και η απόσταση μεταξύ του slide και του καλύμματος της είναι 0.1mm οπότε θα προκύψει 0.1mm^3 .
6. Λόγω της αρχικής αραίωσης 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue, γίνεται πολλαπλασιασμός με τον αριθμό 5.
7. Η τιμή που θα προκύψει είναι ο τελικός αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/mL στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.

2.4 Καλλιέργεια PBMCs

Αντιδραστήρια και υλικά:

- ✚ Θρεπτικό μέσο RPMI-1640
- ✚ Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum- FBS)
- ✚ Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (concentration:100x)
- ✚ Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων
- ✚ Μικροπιπέττα των 1000 μL (100-1000 μL)

Περιγραφή μεθόδου:

- 1) Παραλαβή των κυττάρων από τη δεξαμενή υγρού αζώτου και απόψυξη του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων στους 37°C.
- 2) Έπειτα από ανάδευση του υγρού του cryovial με RPMI-1640, μεταφέρονται σταγόνα-σταγόνα τα κύτταρα σε ένα falcon tube των 15 mL.
- 3) Πλύση των κυττάρων με RPMI-1640 με φυγοκέντρηση στα 2500 rpm για 5 λεπτά. Σκοπός αυτού του βήματος είναι η αραίωση του DMSO, το οποίο ανάλογα με το χρόνο που βρίσκεται σε επαφή με τα κύτταρα, πιθανόν να προκαλεί βλάβες σε αυτά καθώς κρίνεται τοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- 4) Μετά τη φυγοκέντρηση, γίνεται προσθήκη 200 µL από το complete medium (RPMI medium και 10% FCS) στο falcon tube (για κάθε point που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα) και με αυτή την ποσότητα πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος (pellet) το οποίο έχει σχηματιστεί από τα κύτταρα, προσέχοντας να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα.
- 5) Πραγματοποιείται ανάδευση του εναιωρήματος προκειμένου να υπάρχει κατά προσέγγιση ο ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε φρεάτιο.
- 6) Σε μια πλάκα καλλιέργειας κυττάρων 24 φρεατίων, προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 200 µL από το επαναιωρημένο πλέον πέλετ κυττάρων σε complete medium και 800 µL από το complete medium.
- 7) Στη συνέχεια, προστίθενται αντίδραστήρια ανάλογα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται για το πείραμα και ακολουθεί ελαφριά ανάδευση επί του πάγκου με κάθετες και οριζόντιες κινήσεις.
- 8) Εισαγωγή αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (25µL/mL)
- 9) Η πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας εισάγεται σε επωαστήρα σε κατάλληλες συνθήκες (37°C, 5% CO₂)

2.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ

Για να προκύψει επιτυχημένη διέγερση παραγωγής INF-γ από τα T λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικοί διεγέρτες, οι οποίοι αναγράφονται παρακάτω

PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) και Ionomycin (Sigma Aldrich):

Πρόκειται για συνδυασμό χημικών διεγερτών που οδηγεί στην μη ειδική ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων για την μέγιστη δυνατή παραγωγή κυτοκινών. Ειδικότερα το PMA χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να ενεργοποιεί κατευθείαν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) που αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους σηματοδοτικούς παράγοντες για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και παραγωγή κυτοκινών. Το PMA που είναι επίσης γνωστό

ως TPA, επιτελεί τις δράσεις του συνεργιστικά με την ιονομυκίνη. Η ιονομυκίνη(Sigma Aldrich) είναι μια ουσία που χαρακτηρίζεται ως ιοντοφόρο,δηλαδή ως μια ουσία που δεσμεύει ιόντα ασβεστίου. Χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα με σκοπό να αυξήσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου, διαδικασία μεγάλης σημαντικότητας για τη μετάδοση του σήματος στα T λεμφοκύτταρα και την ολοκλήρωση επιτυχώς του σηματοδοτικού μονοπατιού που θα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών. Στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων, η ιονομυκίνη δρα σε συνδυασμό με το PMA με στόχο την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων παρακάμπτοντας την ανάγκη της πρόσδεσής τους με τον υποδοχέα τους (T Cell Receptor) και την επακόλουθη παραγωγή κυτοκινών.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη η συγκέντρωση του PMA που χρησιμοποιήθηκε είναι 25 ng/mL για την βέλτιστη ανίχνευση των επιπέδων IFN- γ ενώ για την ανίχνευση των επιπέδων της IL-17 η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε είναι 50 ng/mL. Όσον αφορά την συγκέντρωση της ιονομυκίνης, χρησιμοποιήθηκε πάντα το 1 μ g/mL τόσο για την ανίχνευση των επιπέδων της IFN- γ όσο και για την ανίχνευση των επιπέδων της IL-17.

Brefeldin A (Cayman chemicals):

Είναι μια αντιϊκή λακτόνη, η οποία παράγεται από τον μύκητα *Penicillium brefeldianum*. Η ουσία αυτή είναι υπεύθυνη για την αναστολή της μεταφοράς πρωτεϊνών από το σύστημα Golgi στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων, όπου και παρατηρείται η συσσώρευσή τους. Ο κύριος στόχος της Brefeldin A, φαίνεται να είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης(Guanine Exchange Factor) που ονομάζεται GBF1. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει την Arf1p GTPάση μέσω αλληλεπίδρασής του με το σύμπλεγμα COP-I. Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας GBF1 καταλύει την αντίδραση μετατροπής της συνδεδεμένης με το GDP ανενεργής μορφής του Arf1p στην συνδεδεμένη με το GTP ενεργή μορφή του. Στο σημείο αυτό της μετατροπής, παρεμβαίνει η Brefeldin A η λειτουργία της οποίας είναι η μη ανταγωνιστική σύνδεσή της στο σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ της συνδεδεμένης με το GDP ανενεργής μορφής του Arf1p και του GBF1, έχοντας ως αποτέλεσμα τη σύντηξη του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Σε πειράματα *in vitro*, η brefeldin A χρησιμοποιείται για τη καλύτερη δυνατή ανίχνευση κυτοκινών οι οποίες χάρη στη λειτουργία της brefeldin A «παγιδεύονται» στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων και μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η συγκέντρωση της Brefeldin A που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν 10 μ g/mL.

2.6 ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ **ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ** **ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

Αντιδραστήρια και υλικά:

- + Διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline)
- + Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- + Διάλυμα PBS με 2% FBS
- + Fixing buffer (1:4 fix concentrate & fix diluent)
- + Permeabilization buffer 10X (Perm buffer)
- + Μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα
- + Μικροπιπέτες (0.5-10.0 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- + Eppendorf tubes σε αριθμό ανάλογο με τα points του εκάστοτε πειράματος

Περιγραφή μεθόδου:

- 1) Τα κύτταρα μεταφέρονται από τα wells της μικροπλάκας 24 φρεατίων, σε κωνικά Eppendorf tubes, έπειτα από ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 3 λεπτά στις 4000 στροφές.
- 2) Έπειτα, το υπερκείμενο αφαιρείται και πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με 700 μ L διάλυμα PBS 2% FBS, το οποίο θα αποτελέσει το staining buffer και χρησιμοποιείται έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων. Κατά τη πλύση πραγματοποιείται επαναιώρηση του κάθε δείγματος με το staining buffer, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου.
- 3) Πραγματοποιείται προσθήκη 100 μ L από το staining buffer προτού εισαχθούν τα αντισώματα.
- 4) Σε αυτό το βήμα, προστίθενται τα επιφανειακά αντισώματα στις κατάλληλες ποσότητες και πάνω ακριβώς από το πέλετ που έχουν σχηματιστεί από τα κύτταρα «λούζοντάς» τα.
- 5) Πραγματοποιείται εκτενής επαναιώρηση των δειγμάτων με 100 μ L από το staining buffer και επώασή τους στους 4°C για 40 λεπτά.
- 6) Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, πραγματοποιείται ξανά επαναιώρηση των δειγμάτων με 800 μ L από το staining buffer προκειμένου να απομακρυνθεί η επιπλέον ποσότητα αντισωμάτων. Ακολούθως, τα κύτταρα φυγοκεντρώνται για 3 λεπτά στις 4000 στροφές και αφαιρείται το υπερκείμενο.
- 7) Σε αυτό το σημείο προστίθενται 250 μ L από το fixing buffer το οποίο αποτελείται από τα fix concentrate και fix diluent (BioLegend) σε

αναλογία 1:4 ή PFA (Sigma) έτοιμα aliquots (4% PFA/PBS w/v) την οποία αραιώσαμε σε PFA/PBS 2% w/v και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με στόχο τη μονιμοποίηση των αντισώματων στα κύτταρα και την ακόλουθη ανίχνευσή τους μέσω κυτταρομετρίας ροής.

- 8) Με την ολοκλήρωση των 30 λεπτών, στα δείγματα προστίθενται 800 µL PBS προκειμένου να απομακρυνθεί όποια πιθανή περίσσεια από το fixing buffer. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 4000 στροφές για 3 λεπτά και στη συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο.
- 9) Πραγματοποιείται επαναιώρηση του πέλετ των κυττάρων με 200 µL PBS.
- 10) Τα κύτταρα εισάγονται στους 4°C και διατηρούνται εκεί overnight.
- 11) Τα δείγματα επαναιωρούνται σε 800 µL PBS, φυγοκεντρώνται για 3 λεπτά σε 4000 στροφές και στη συνέχεια το υπερκείμενο αφαιρείται.
- 12) Προσθήκη και επαναιώρηση του κάθε δείγματος με 200 µL permeabilization buffer το οποίο διευκολύνει την εισαγωγή των ενδοκυττάρων αντισωμάτων χάρη στην ικανότητά του να καθιστά τη μεμβράνη των κυττάρων πορώδη. Τα κύτταρα υπόκεινται σε ελαφρύ vortex προκειμένου να βοηθηθεί η δημιουργία πόρων στη μεμβράνη τους μέσω της εισαγωγής του permeabilization buffer. Ακολουθεί φυγοκέντρησή τους σε 4000 στροφές για 3 λεπτά και στη συνέχεια προσεκτική αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου.
- 13) Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά στους 4°C.
- 14) Πραγματοποιείται προσθήκη και επαναιώρηση του πέλετ των κυττάρων με 400 µL perm buffer, φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές για 3 λεπτά και μετέπειτα αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου.
- 15) Στη συνέχεια, προστίθενται 100 µL από το perm buffer και σε επόμενο βήμα πραγματοποιείται προσθήκη των ενδοκυττάρων αντισωμάτων σε κατάλληλες ποσότητες και ανάδευση.
- 16) Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 45 λεπτά.
- 17) Πραγματοποιείται προσθήκη 400 µL από το perm buffer ούτως ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε περίσσεια αντισωμάτων. Τα κύτταρα υπόκεινται σε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 4000 στροφές και ακολούθως προσεκτικά αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- 18) Προσθήκη και επαναιώρηση με 350 µL διάλυμα PBS έτσι ώστε ο συνολικός όγκος σε κάθε Eppendorf tube να ανέρχεται στα 500 µL.

<u>ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</u>	<u>ΚΛΩΝΟΙ</u>	<u>ΕΤΑΙΡΕΙΑ</u>	<u>QUANTITY(µL)</u>
Anti-CD4(human)	PE	EMD Millipore,USA	1
Mouse anti-human CD3	FITC	BD Pharmigen,BD Biosciences	4
Mouse anti-human CD56	PE-Cy7	BD Biosciences	2
AntiIFNG/Interferon gamma mouse IgG1	APC	Origene Tech, GmbH Germany	1,5
Anti-IL17A(human)	PE	EMD Millipore,USA	1,5

Πίνακας 1: Φθοριοχρώματα που αξιοποιήθηκαν για φαινοτύπηση κυττάρων.

INTERLEUKIN-35:

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η recombinant human IL-35 της PeproTech (Catalog# 200-37, Lot# 0416574).

2.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ορισμός:

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία κατά την οποία ανιχνεύει, μετρά και στη συνέχεια αναλύει πολλαπλά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων, συνήθως κυττάρων, όταν αυτά βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος και καθώς ρέουν σε ένα υγρό μέσα από μια δέσμη φωτός.

Συνεπώς μετράται:

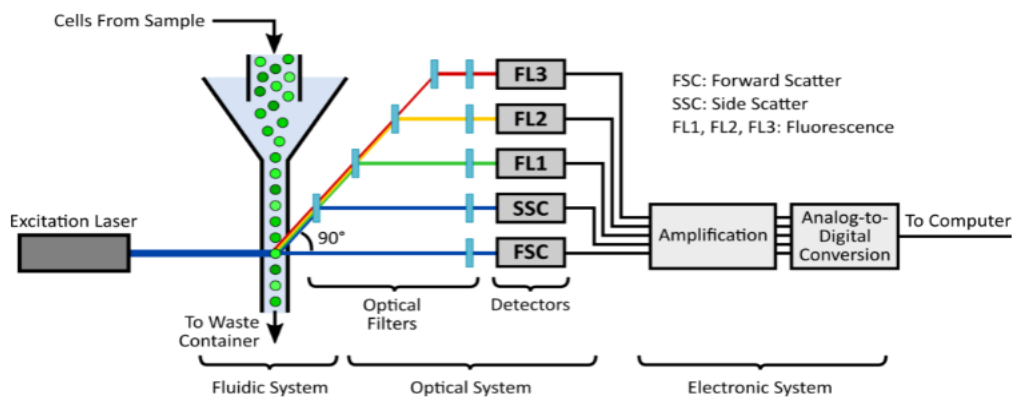
- Το σχετικό μέγεθος του σωματιδίου
- Τη σχετική κοκκιότητα ή εσωτερική πολυπλοκότητα αλλά και
- Τη σχετική ένταση φθορισμού

Εφαρμογές μεθόδου:

Η κυτταρομετρία ροής βρίσκει εφαρμογή στην έρευνα, στην κλινική πράξη αλλά και σε κλινικές δοκιμές.

Μερικές από αυτές αναφέρονται παρακάτω:

- Διαλογή κυττάρων
- Μέτρηση κυττάρων
- Καθορισμός των κυτταρικών χαρακτηριστικών και λειτουργιών
- Ανακάλυψη νέων βιοδεικτών
- Ανίχνευση μικροοργανισμών
- Διάγνωση ασθενειών



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση επιμέρους τμημάτων του κυτταρομέτρου ροής. Πηγή: Τροποποιημένο από: S.Castillo-Hair, FlowCal software for analysis and calibration of flow cytometry data

Αρχή μεθόδου:

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα οπτικού-ηλεκτρονικού συστήματος σύζευξης που καταγράφει τον τρόπο με τον οποίο το κύτταρο ή το σωματίδιο διασκορπίζει το προσπίπτον φως λείζερ και εκπέμπει φθορισμό.

Το κυτταρόμετρο ροής:

Κάθε κυτταρόμετρο ροής αποτελείται από 3 συστήματα

1. το σύστημα ροής υγρών ή αλλιώς υδροδυναμικό σύστημα,
2. το οπτικό σύστημα και
3. το ηλεκτρονικό (υπολογιστικό) σύστημα

Σημαντικό να αναφερθεί κρίνεται επίσης το γεγονός ότι τη σημερινή εποχή, οι αναλυτές έχουν εξελιχθεί ιδιαίτερα επιτρέποντας την ανάλυση μέχρι και 30 διαφορετικών παραμέτρων ταυτόχρονα.

Περιγραφή μεθόδου:

Αρχικά, το σύστημα ροής υγρών μεταφέρει το δείγμα (τα κύτταρα σε μορφή εναιωρήματος) από το σωλήνα δειγμάτων στον θάλαμο ροής. Στη συνέχεια, το οπτικό σύστημα στο οποίο περιλαμβάνονται πηγή φωτός, διάφορα φίλτρα και ανιχνευτές, είναι υπεύθυνο για την μεταφορά του φωτός και την ανίχνευση του. Στο τελικό στάδιο, το οπτικό σύστημα ενισχύει το σήμα που ανιχνεύεται μετατρέποντας το στην συνέχεια σε ψηφιακή μορφή η οποία καθίσταται διαχειρίσιμη για ανάλυσή της στο μέλλον. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες φωτοδιόδους οι οποίες παίζουν το

ρόλο φωτοανιχνευτών και καθίστανται αρκετά σημαντικές καθώς είναι αυτές που θα μετατρέψουν το φως σε ηλεκτρικούς παλμούς και τελικά σε ψηφιακή μορφή.

Συνεπώς, η ανάλυση των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω της σκέδασης του φωτός σε συνδυασμό με τον φθορισμό που υπάρχει λόγω της σήμανσης με φθορίζουσες ουσίες. Σκέδαση φωτός ονομάζεται το αποτέλεσμα του φαινομένου κατά το οποίο μια ή περισσότερες ακτίνες λείζερ προσπίπτουν σε μια επιφάνεια. Μοριακή σκέδαση συμβαίνει όταν αυτές οι ακτίνες λείζερ προσπίπτουν πάνω σε κύτταρα ή άλλα μόρια. Ειδικότερα, ένα είδος μοριακής σκέδασης, η σκέδαση Rayleigh είναι το είδος της σκέδασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας το οποίο οφείλεται στα μόρια του υλικού. Όσον αφορά τις φθορίζουσες ουσίες, όταν μια φθορίζουσα χρωστική είναι συζευγμένη με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου με βάση τους επιμέρους αντιγονικούς δείκτες επιφανείας του κυττάρου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εφαρμόστηκε τετραπλός ανοσοφθορισμός για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής των δειγμάτων.

Δηλαδή, έχοντας ένα μικτό πληθυσμό κυττάρων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά φθοροχρώματα για τη διάκριση και ταυτοποίηση ξεχωριστών υποπληθυσμών. Το πρότυπο χρώσης κάθε υποπληθυσμού, σε συνδυασμό με τα δεδομένα FSC και SSC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει ποια κύτταρα υπάρχουν σε ένα δείγμα και να μετρήσει τα σχετικά ποσοστά τους.

Η πρόσθια σκέδαση (FSC) είναι ανάλογη της επιφάνειας ή του μεγέθους της κυψελίδας. Η FSC είναι μια μέτρηση του διαθλασμένου φωτός και παρέχει μια κατάλληλη μέθοδο ανίχνευσης σωματιδίων μεγαλύτερων από ένα δεδομένο μέγεθος ανεξάρτητα από τον φθορισμό τους και συνεπώς χρησιμοποιείται συχνά σε ανοσοφαινοτυπικό προσδιορισμό για την ενεργοποίηση της επεξεργασίας σήματος. Η πλάγια σκέδαση του φωτός (SSC) είναι ανάλογη της κοκκιώτητας του κυττάρου ή της εσωτερικής του πολυπλοκότητας. Το SSC είναι μια μέτρηση του φωτός που αντανακλάται ή ανακλάται και που εμφανίζεται σε οποιαδήποτε διεπαφή εντός του κυττάρου όπου δηλαδή παρατηρείται αλλαγή στον δείκτη διάθλασης.

Προκειμένου να γίνει αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ της εταιρείας Millipore-Merck.

Εικόνα 13: Κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ Merck-Millipore.



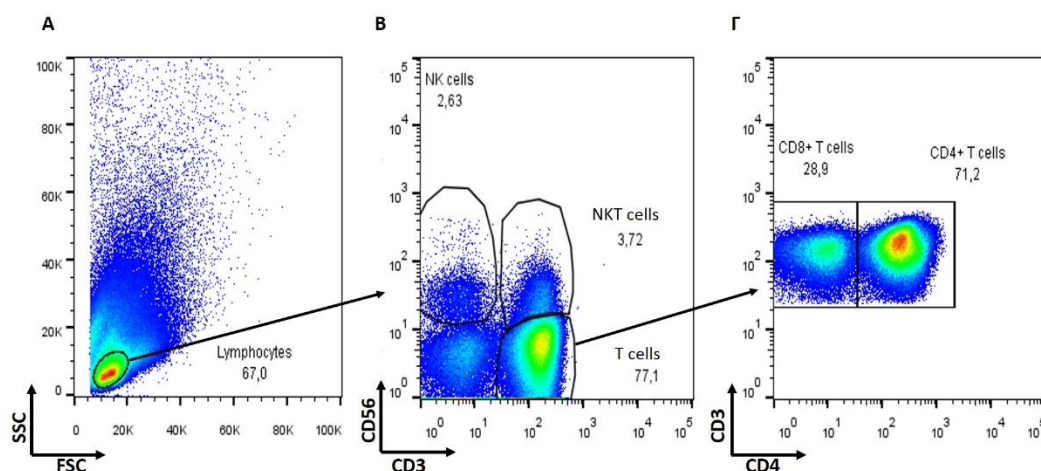
Για την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων που εξήχθησαν, χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά Guava InCyte και FlowJo. Σε κάθε ανάλυση, η εγκυρότητα της λειτουργικότητας ελεγχόταν με το guava easyCheck™ Kit. Αξιοσημείωτο κρίνεται το γεγονός ότι αφού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα περιφερικού αίματος, στα δείγματά μας υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί όπως για παράδειγμα ο πληθυσμός των ουδετερόφιλων, των μονοκύτταρων, αιμοπεταλίων αλλά και συσσωματωμάτων ερυθρών. Σημαντικό να αναφερθεί επίσης είναι ότι με σκοπό να επιλεγεί ο λεμφοκυτταρικός πληθυσμός, βασιστήκαμε στις παραμέτρους πρόσθιας (forward-scattered light/FSC) και πλάγιας (side-scattered light/SSC) σκέδασης(67, 68).

2.8 Στατιστική ανάλυση:

Στην ανάλυση των δεδομένων, το ποσοστό καθώς και το MFI (Mean Fluorescence Intensity) των κυττάρων του κάθε ατόμου θεωρήθηκε ως ο μέσος όρος ή η μέση τιμή του ατόμου σε κάθε ομάδα. Η τιμή MFI είναι η μέση τιμή της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός είναι η εκπομπή του φωτός από ένα μόριο (φθοροφόρο) το οποίο έχει διεγερθεί από το φως με μικρότερο μήκος κύματος από το εκπεμπόμενο. Η ανίχνευση έντασης φθορισμού είναι η μέτρηση αυτού του εκπεμπόμενου φωτός. Επιπλέον, η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD) ενώ το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης σφάλματος (Standard Error of the Mean, SEM). Διαφορές μεταξύ των ομάδων που περιελάμβανε τους ασθενείς και των ομάδων που περιελάμβανε τα υγιή άτομα, υπολογίστηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (Analysis Of Variance). Ταυτόχρονα, στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν οι τιμές με $p \leq 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

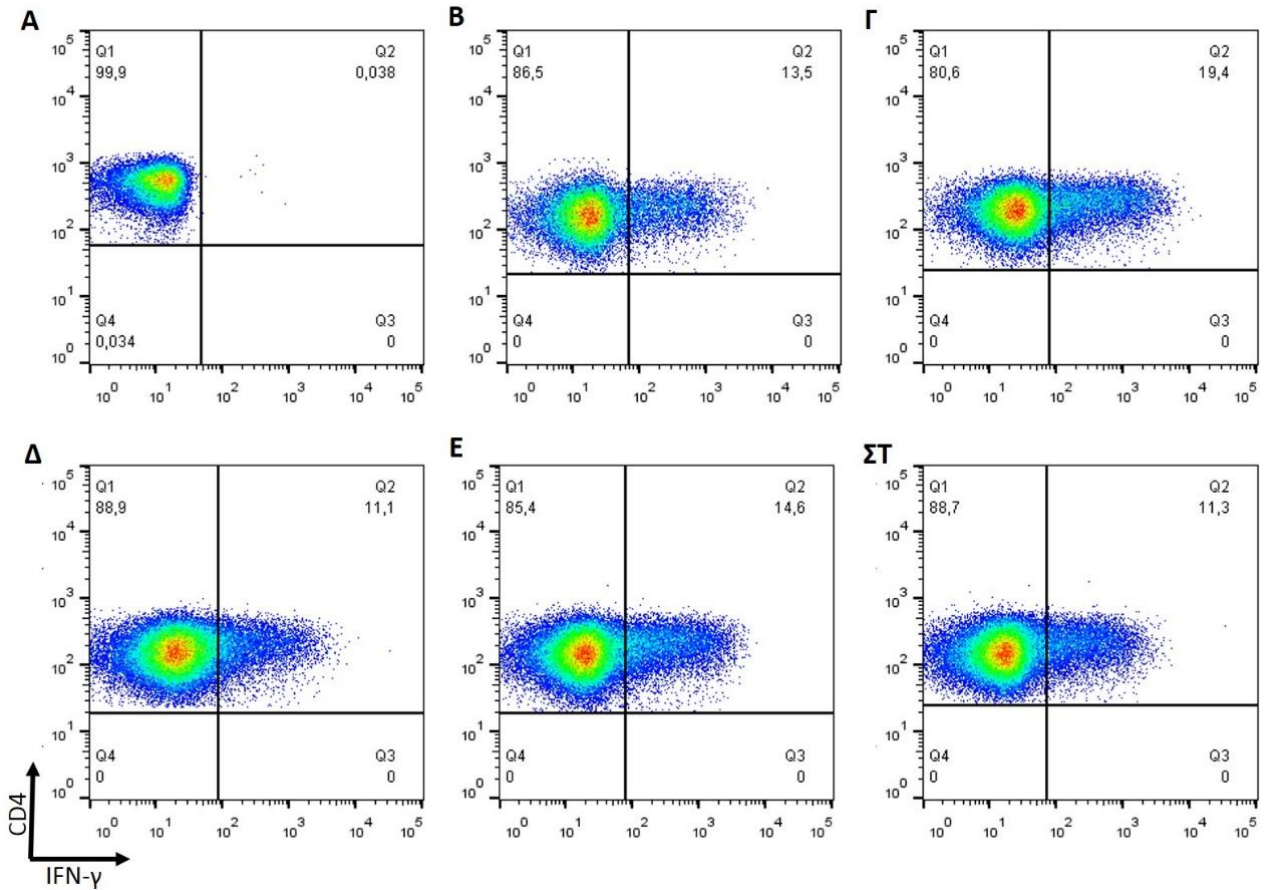
PBMCs από υγιείς δότες και ασθενείς με Ps ή/και με PsA επωάστηκαν παρουσία ειδικών, συζευγμένων με φθοριοχρώματα, μονοκλωνικών αντισωμάτων και έπειτα τα κύτταρα αυτά αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Μέσω των φαινοτυπικών επιτόπων τους έγινε ο προσδιορισμός των Τ βοηθητικών λευκοκυττάρων (CD3+CD4+), των Τ κυτταροτοξικών λευκοκυττάρων (CD3+CD8+), των φυσικών φονέων (NK) (CD56+CD3-) και των NKT (CD56+CD3+) λευκοκυττάρων. Ειδικότερα, βάση της πρόσθιας (FSC-Forward Scatter) και της πλάγιας (SSC-Side Scatter) σκέδασης πραγματοποιήθηκε η επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων (Lymphocyte gate) με στρατηγική "gating" (**Φιγούρα 1**). Τα λεμφοκύτταρα εν συνεχεία χαρακτηρίστηκαν με βάση τους φαινοτυπικούς τους επιτόπους. Μέσω της συνδυαστικής έκφρασης των επιτόπων CD56/CD3 καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός των NK κυττάρων (CD56+CD3-) και των NKT κυττάρων (CD56+CD3+), ενώ μέσω των επιτόπων CD4/CD3 είναι δυνατός ο προσδιορισμός των CD4+ Τ κυττάρων αλλά και των CD8+ Τ κυττάρων καθώς αυτά είναι CD4-CD3+. Επίσης, ο προσδιορισμός των CD4 και των CD8 πραγματοποιήθηκε και με χρήση του επιτόπου CD8.



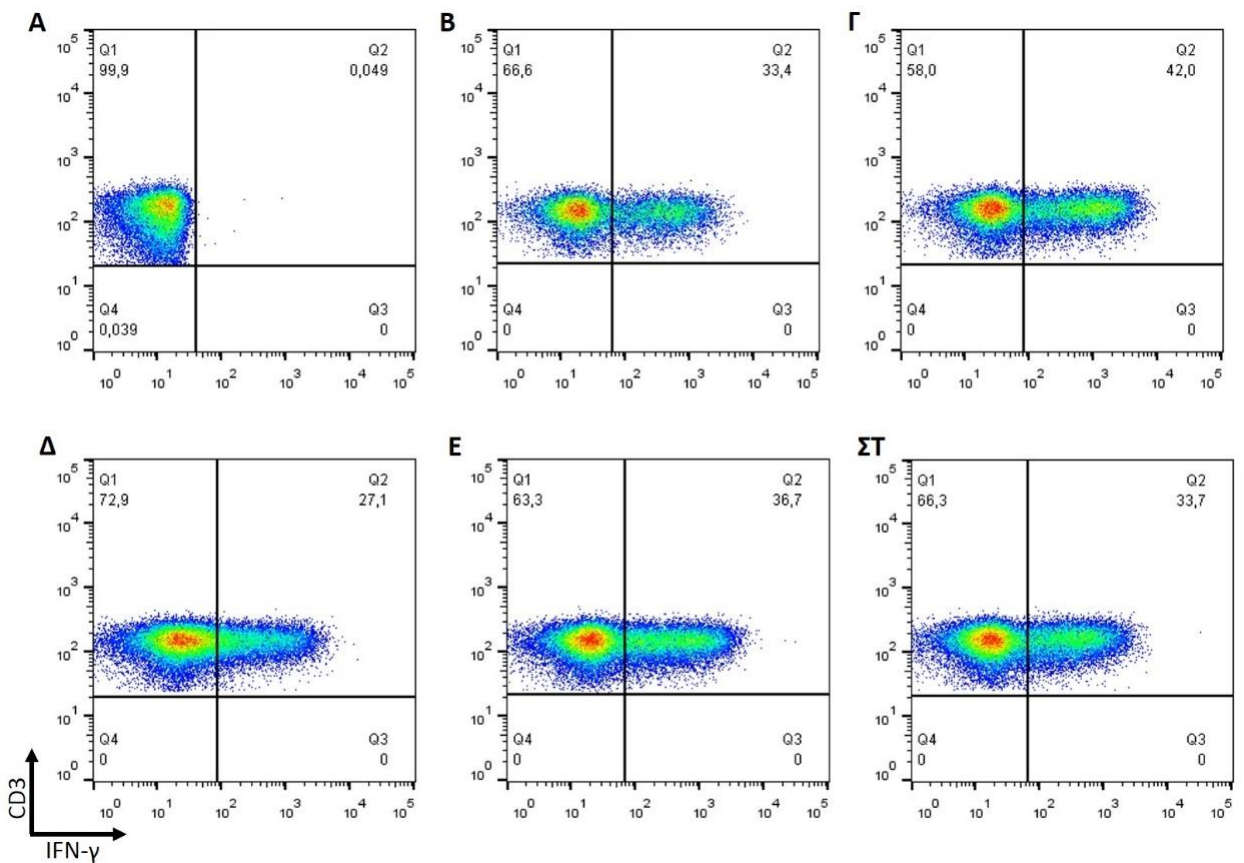
Φιγούρα 1: Αντιπροσωπευτική φαινοτυπική ανάλυση και υπο-ταξινόμηση (sub-gating) κυτταρικών πληθυσμών περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων. **(Α)** Επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων. **(Β)** Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό NK και NKT κυττάρων. **(Γ)** Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση CD+4 και CD+8 κυττάρων.

Δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της IL-35 στη παραγωγή IFN- γ σε υγιείς δότες σε συγκεντρώσεις 10,25,50,100 ng/mL με pre-treatment 30 λεπτά.

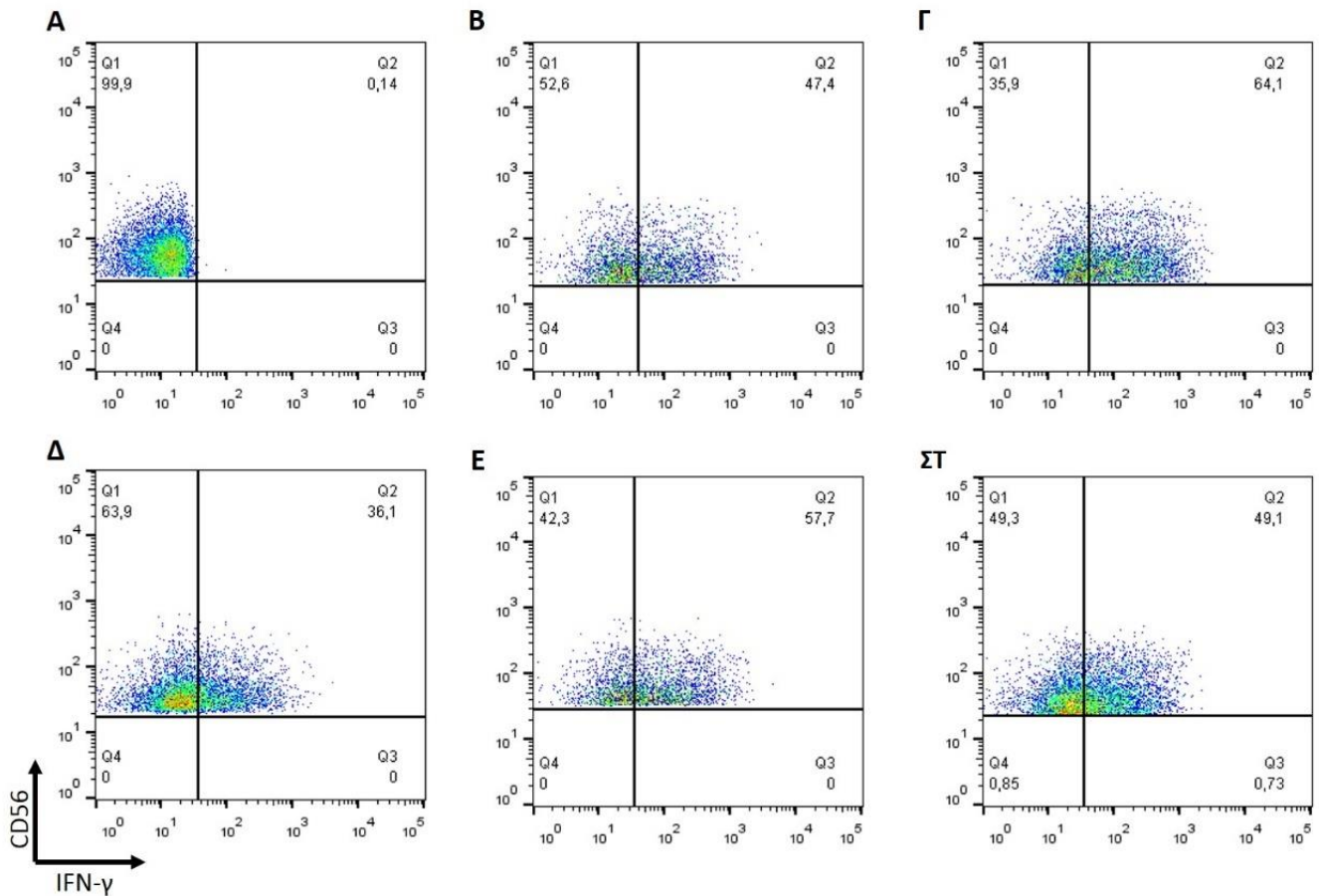
Ο πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν η εύρεση των βέλτιστων συγκεντρώσεων αλλά και του χρόνου επώασης των PBMCs υγιών και ασθενών μαζί με την IL-35 (pre-treatment) και πριν να εισαχθούν τα διεγερτικά (PMA/ION) για την παραγωγή της IFN- γ . Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων της IL-35 (dose response experiment) που περιλάμβανε τις εξής 4 συγκεντρώσεις: 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL και 100 ng/mL(69). Ο χρόνος από την εισαγωγή της IL-35 στην κυτταροκαλλιέργεια μέχρι την εισαγωγή των PMA/ION σε αυτή ήταν τα 30 λεπτά. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πρώτο πείραμα με τις 4 διαφορετικές και αυξανόμενες συγκεντρώσεις και τα 30 λεπτά pre-treatment, προερχόντουσαν από υγιή άτομα (n=2). Μετά την εισαγωγή και των PMA/ION ο χρόνος επώασης ήταν οι 5 ώρες (**Φιγούρες 2 & 3**).



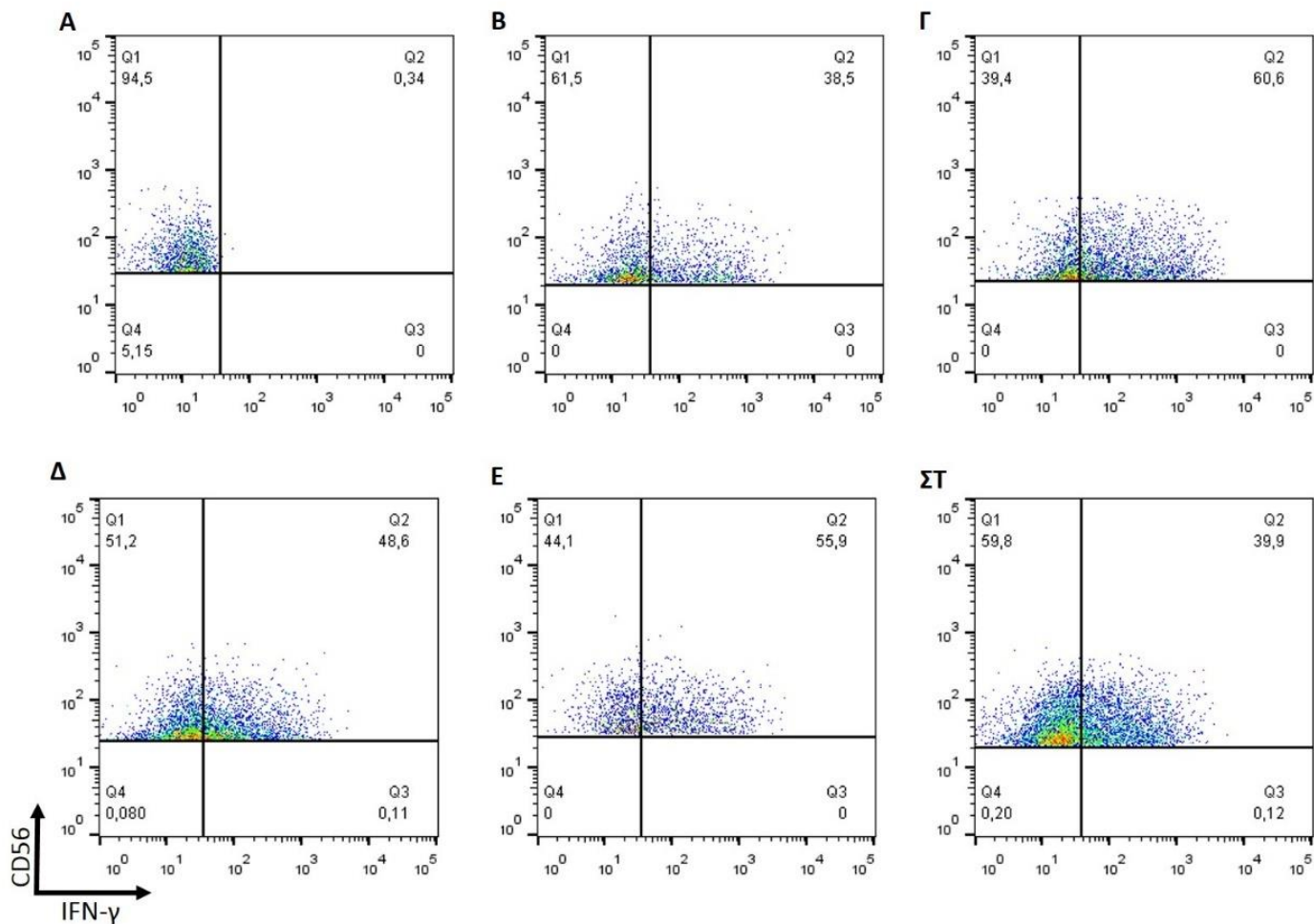
Φιγούρα 2: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD4⁺ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. (A) Ustimulated, (B) PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις (Γ) 10 ng/mL, (Δ) 25 ng/mL, (E) 50 ng/mL και (ΣΤ) 100 ng/mL.



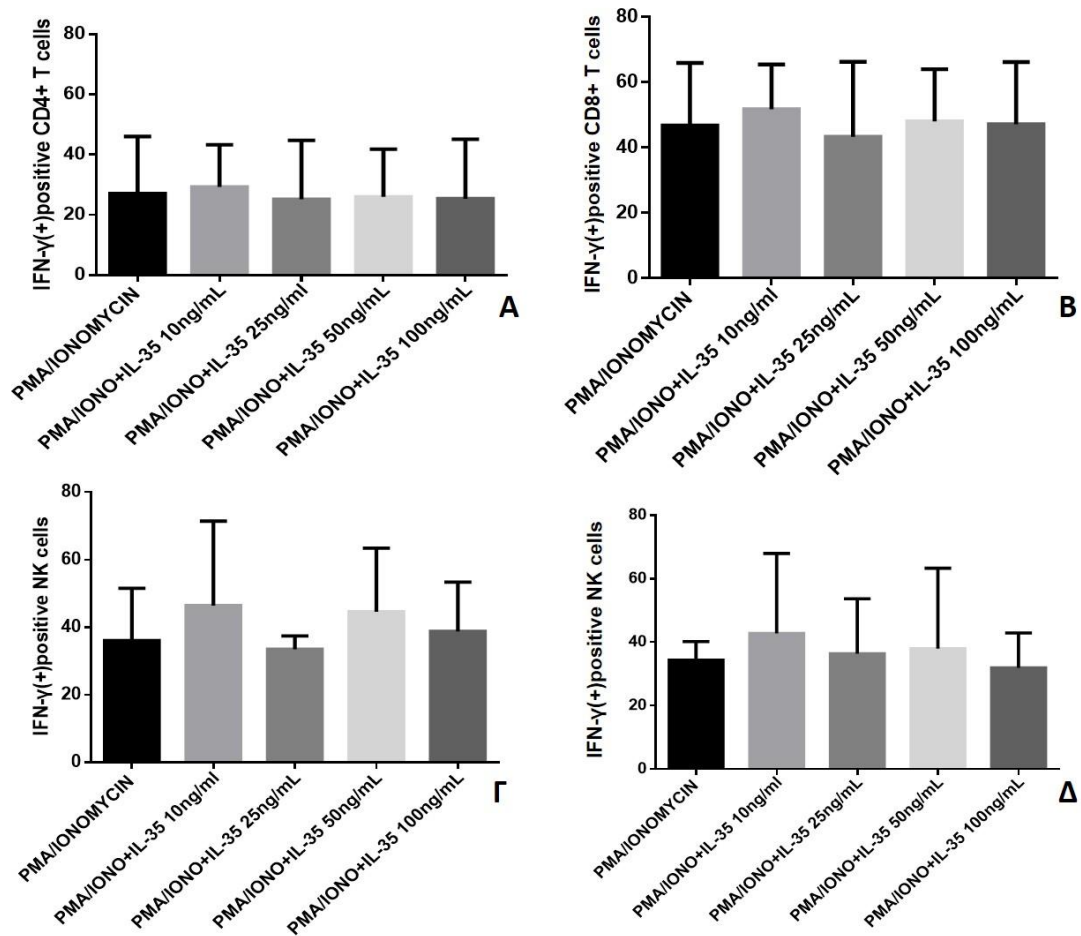
Φιγούρα 3: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(Α)** Unstimulated, **(Β)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL, **(Δ)** 25 ng/mL, **(Ε)** 50 ng/mL και **(ΣΤ)** 100 ng/mL.



Φιγούρα 4: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(Α)** Unstimulated, **(Β)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL, **(Δ)** 25 ng/mL, **(Ε)** 50 ng/mL και **(ΣΤ)** 100 ng/mL.



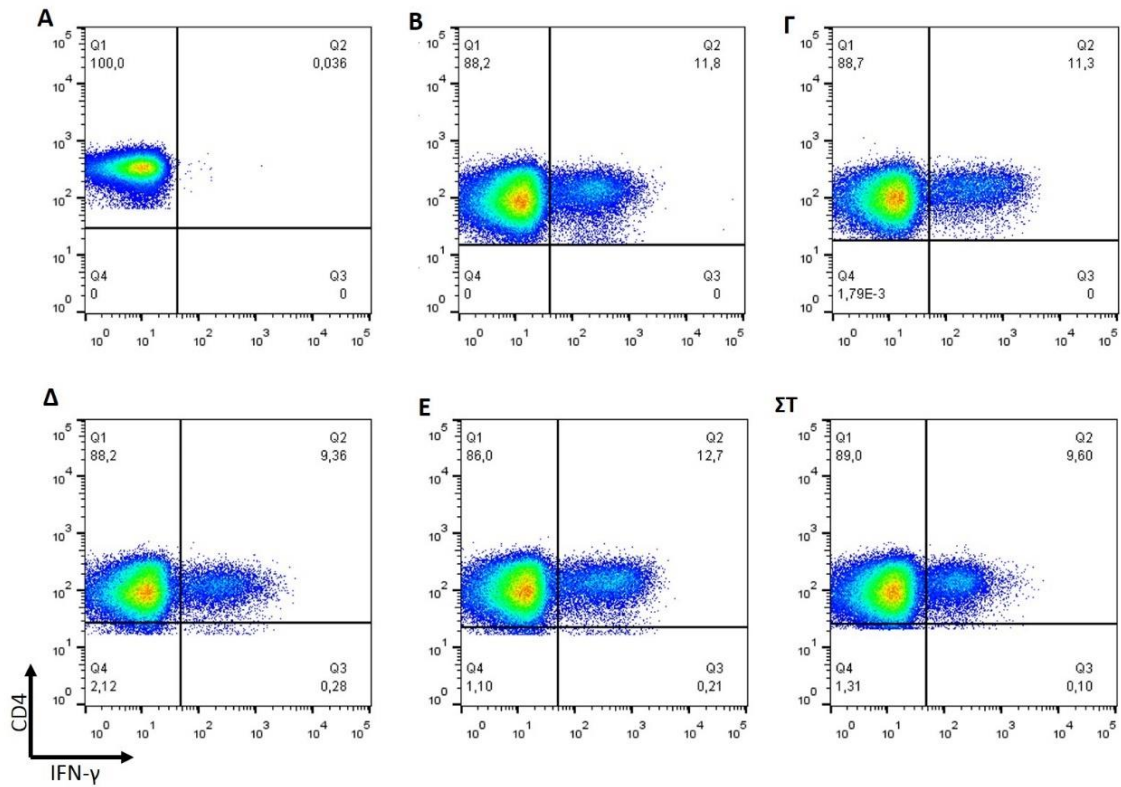
Φιγούρα 5: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(Α)** Unstimulated, **(Β)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL, **(Δ)** 25 ng/mL, **(Ε)** 50 ng/mL και **(ΣΤ)** 100 ng/mL.



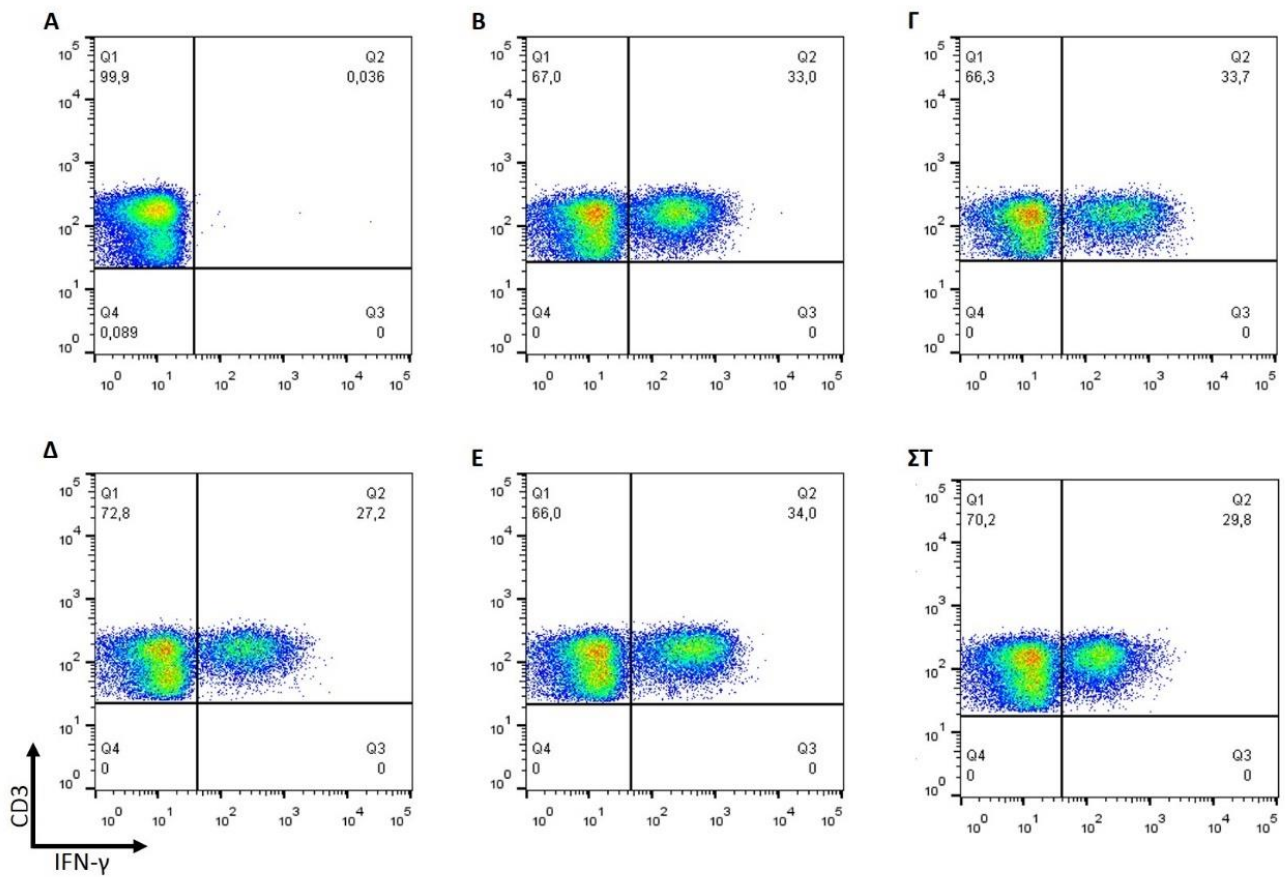
Φιγούρα 6: Συγκεντρωτικά διαγράμματα επίδρασης της IL-35, σε συγκεντρώσεις 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL και 100 ng/mL, στη παραγωγή IFN- γ σε υγιείς, με pre-treatment 30 λεπτών και έπειτα από ενεργοποίηση με PMA/IONOMYCIN στα (A) CD4+ T κύτταρα (B) CD8+ T κύτταρα (Γ) NK κύτταρα και (Δ) NKT κύτταρα

Χαμηλή δόσο-εξαρτώμενη επίδραση της IL-35 στη παραγωγή IFN- γ σε υγιείς δότες σε συγκεντρώσεις 1,5,10,25 ng/mL με pre-treatment στις 48 ώρες.

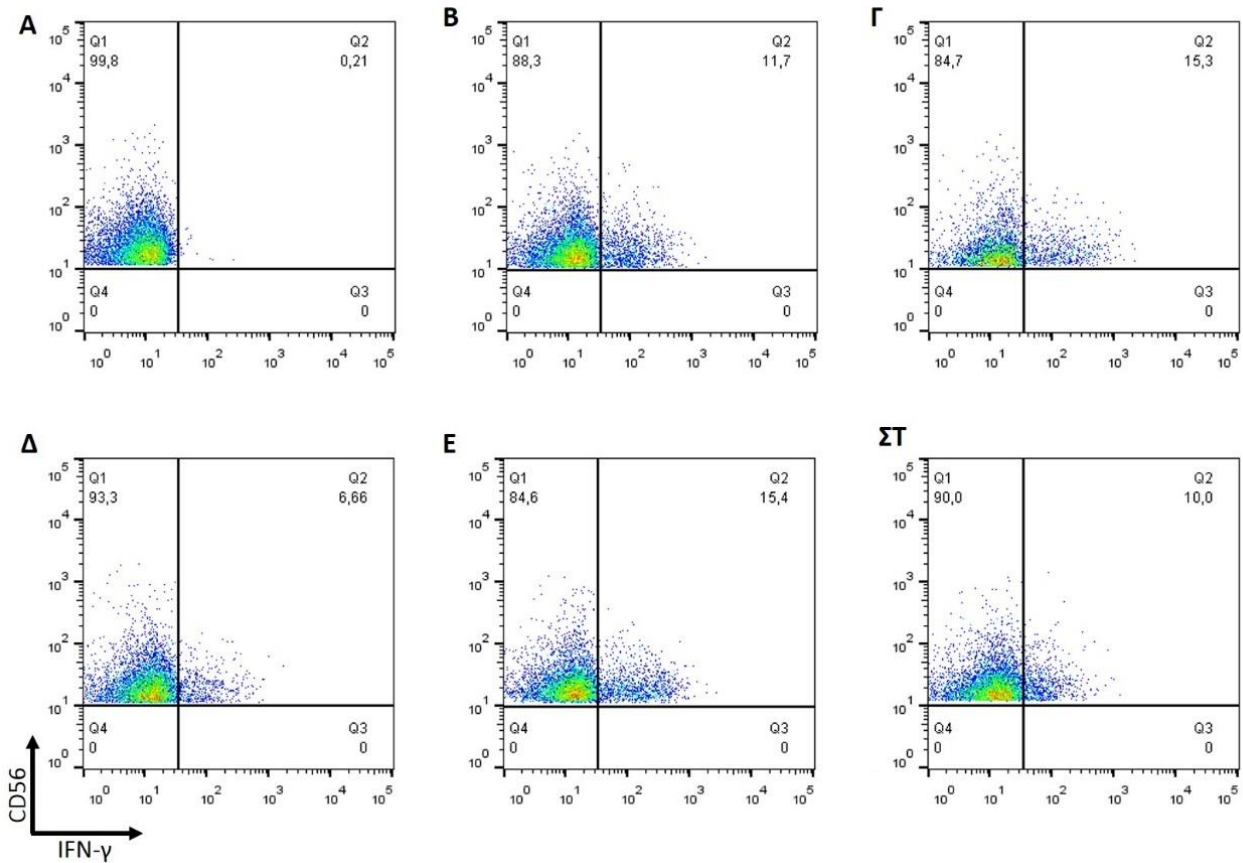
Σε δεύτερη φάση, πραγματοποιήθηκε πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα διαφορετικών από τα προηγούμενα πειράματα υγιών ατόμων (n=2) σε συγκεντρώσεις IL-35 1ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL και 25 ng/mL και σε χρόνο επώασης (pre-treatment) 48 ώρες.



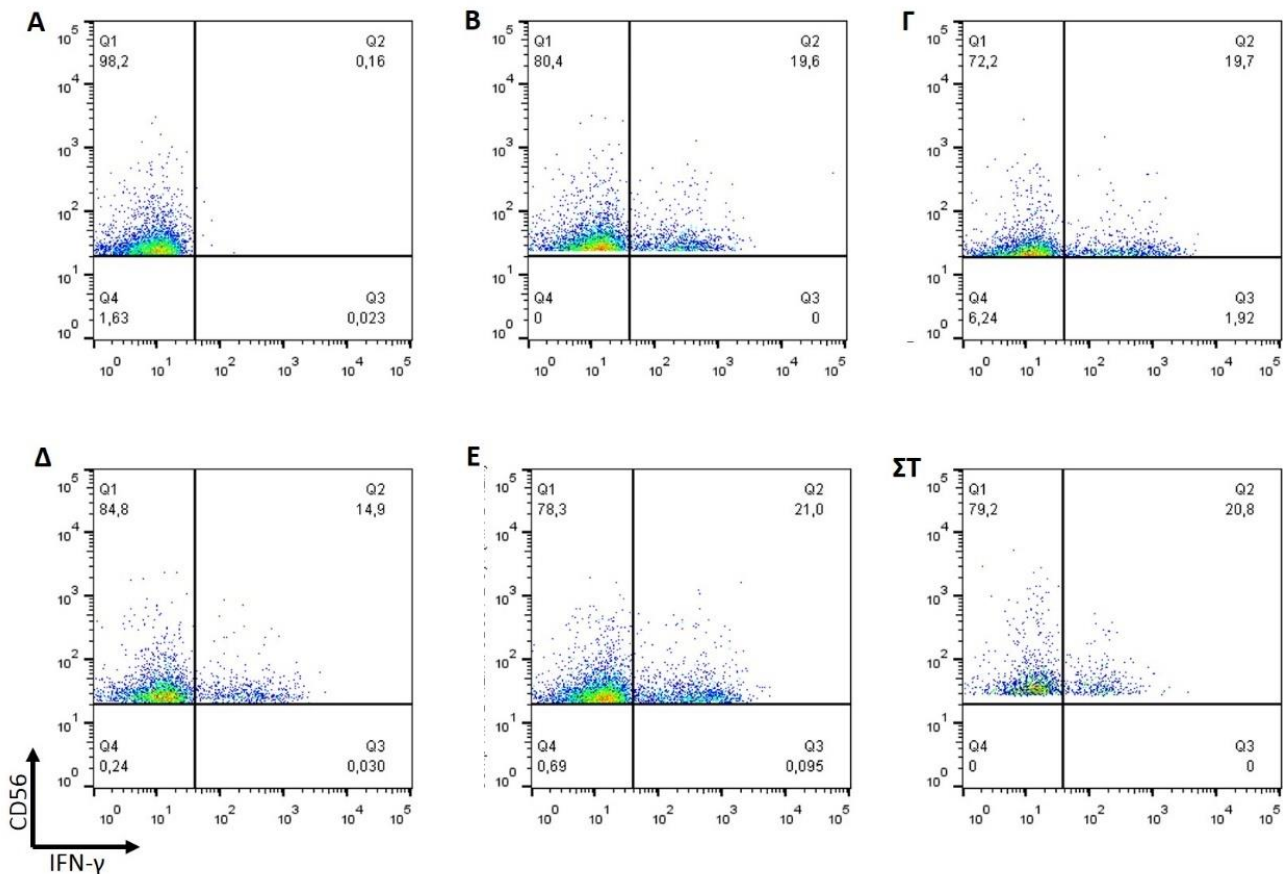
Φιγούρα 7: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD4⁺ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 1 ng/mL, **(Δ)** 5 ng/mL, **(E)** 10 ng/mL και **(ΣΤ)** 25 ng/mL.



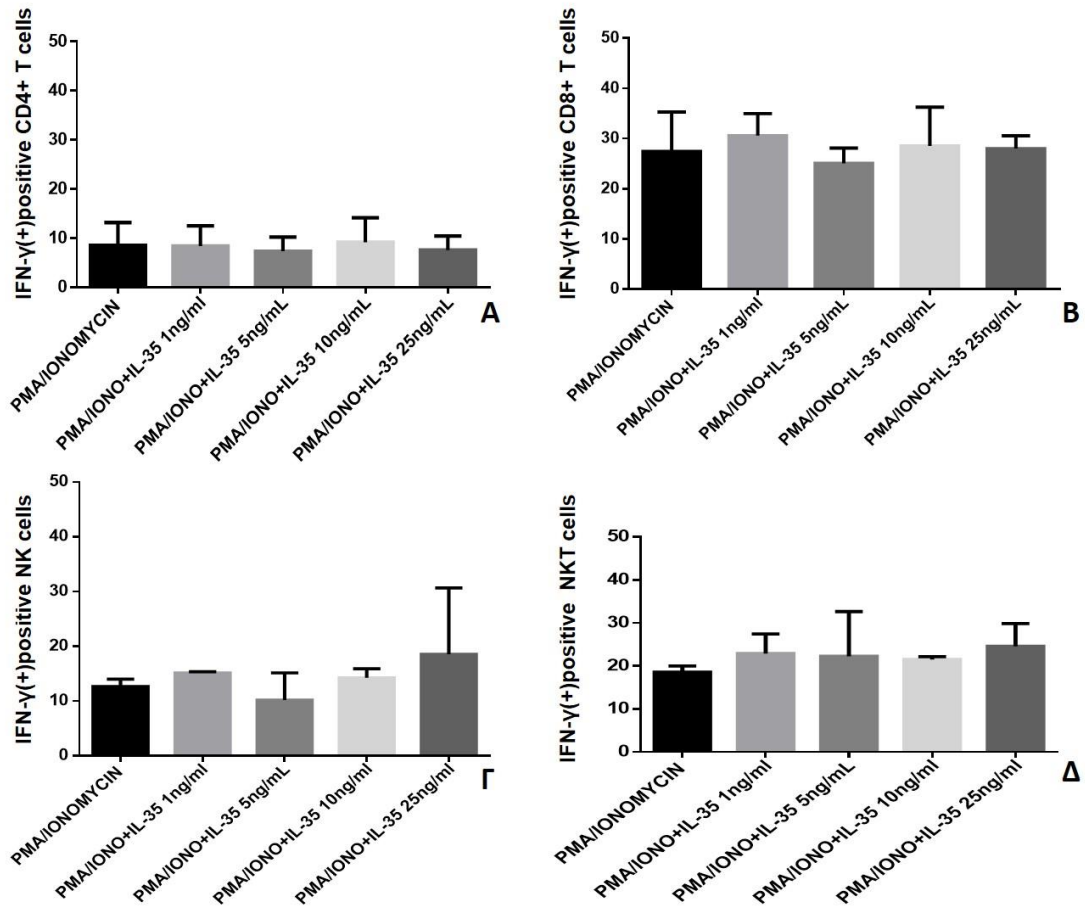
Φιγούρα 8: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 1 ng/mL, **(Δ)** 5 ng/mL, **(E)** 10 ng/mL και **(ΣΤ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 9: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγρή δότη στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 1 ng/mL, **(Δ)** 5 ng/mL, **(E)** 10 ng/mL και **(ΣΤ)** 25 ng/mL.



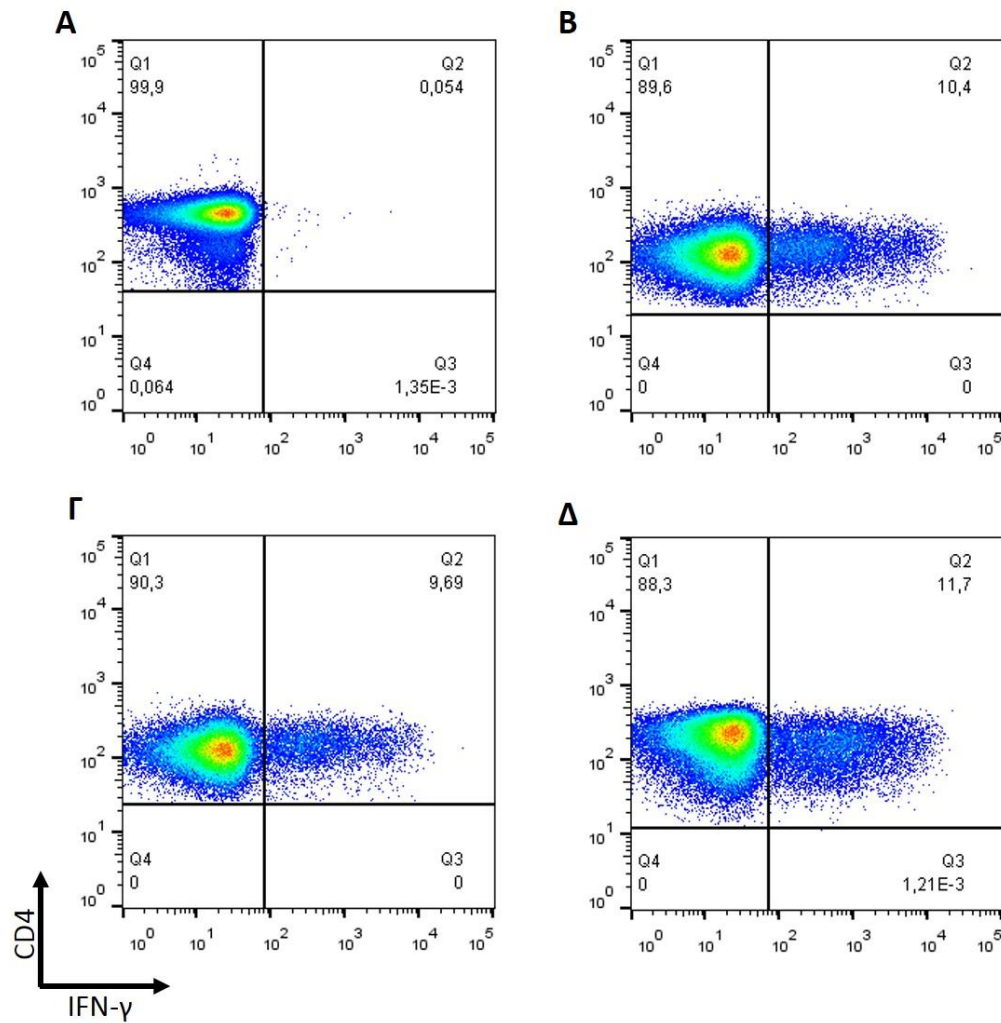
Φιγούρα 10: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(Α)** Unstimulated, **(Β)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 1 ng/mL, **(Δ)** 5 ng/mL, **(Ε)** 10 ng/mL και **(ΣΤ)** 25 ng/mL.



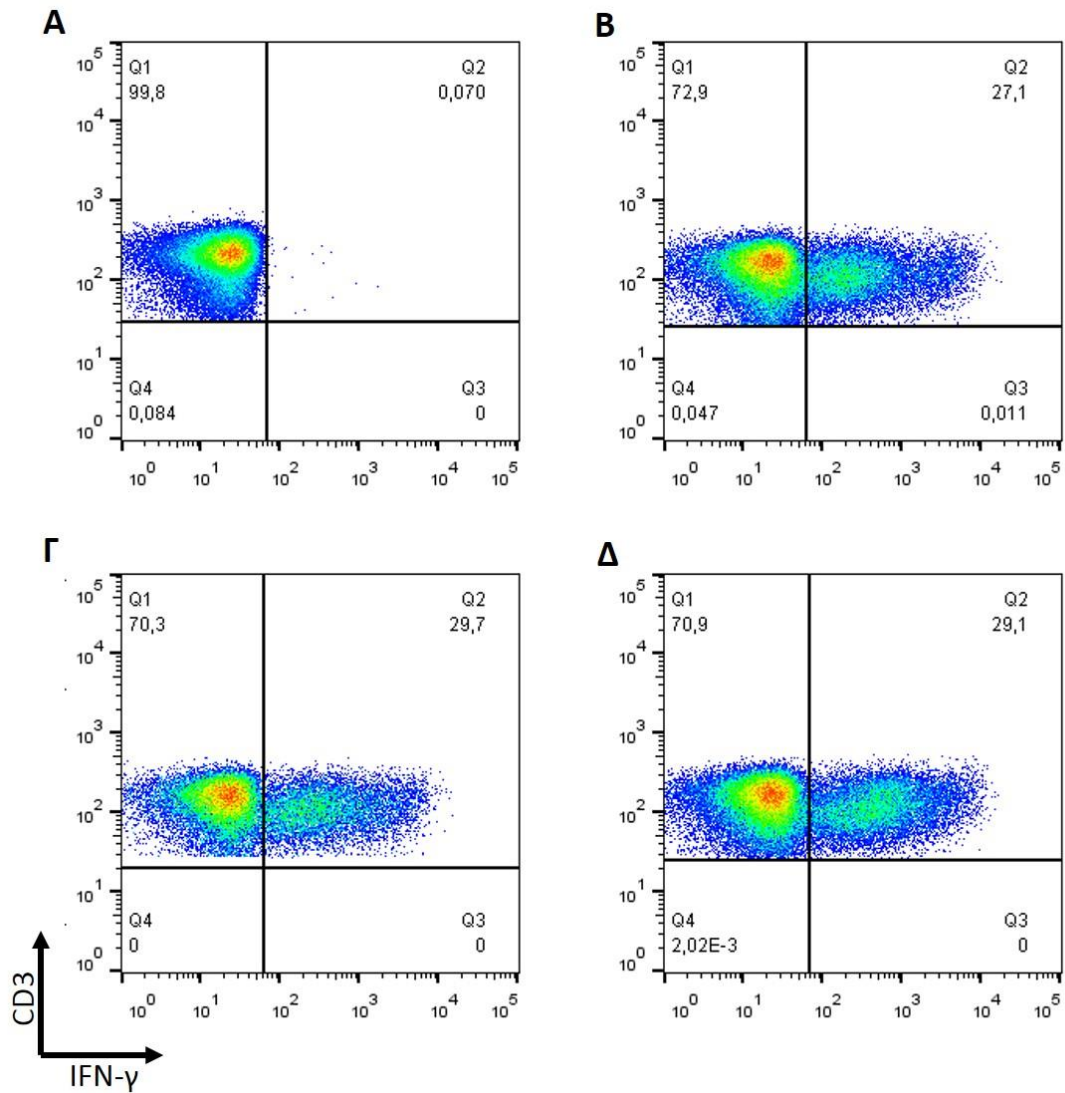
Φιγούρα 11: Συγκεντρωτικά διαγράμματα επίδρασης της IL-35, σε συγκεντρώσεις 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL και 25 ng/mL στη παραγωγή IFN-γ σε υγιείς, με pre-treatment 48 ωρών και έπειτα από ενεργοποίηση με PMA/IONOMYCIN στα (A) CD4+ T κύτταρα (B) CD8+ T κύτταρα (Γ) NK κύτταρα και (Δ) NKT κύτταρα

Επίδραση της IL-35 στη παραγωγή IFN-γ σε υγιείς δότες σε συγκεντρώσεις 10 και 25 ng/mL με pre-treatment στις 48 ώρες.

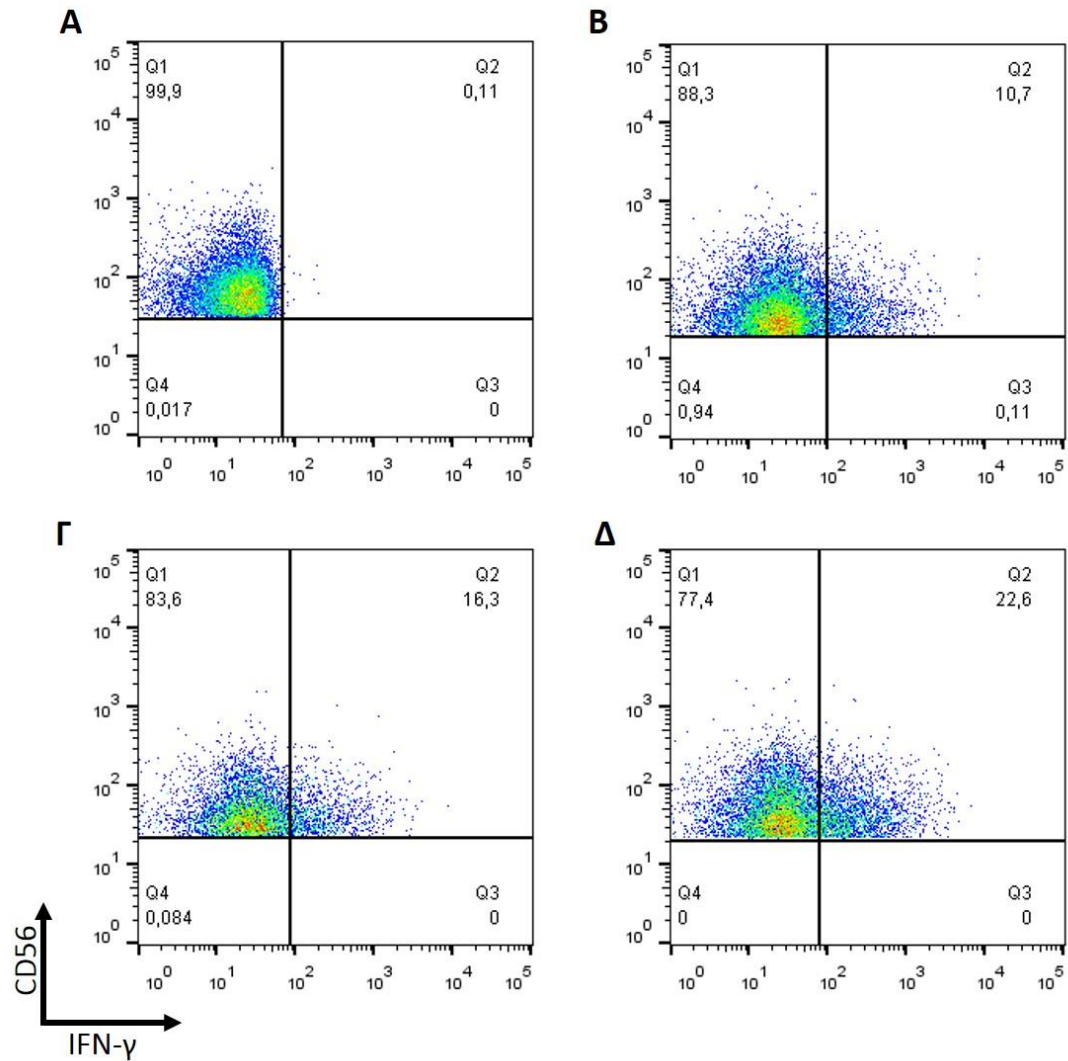
Σε επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα υγιών δοτών διαφορετικών με τα προηγούμενα πειράματα (n=2) σε συγκεντρώσεις IL-35 10 ng/mL και 25 ng/mL. Όσον αφορά το χρόνο επώασης (pre-treatment), παρέμεινε στις 48 ώρες.



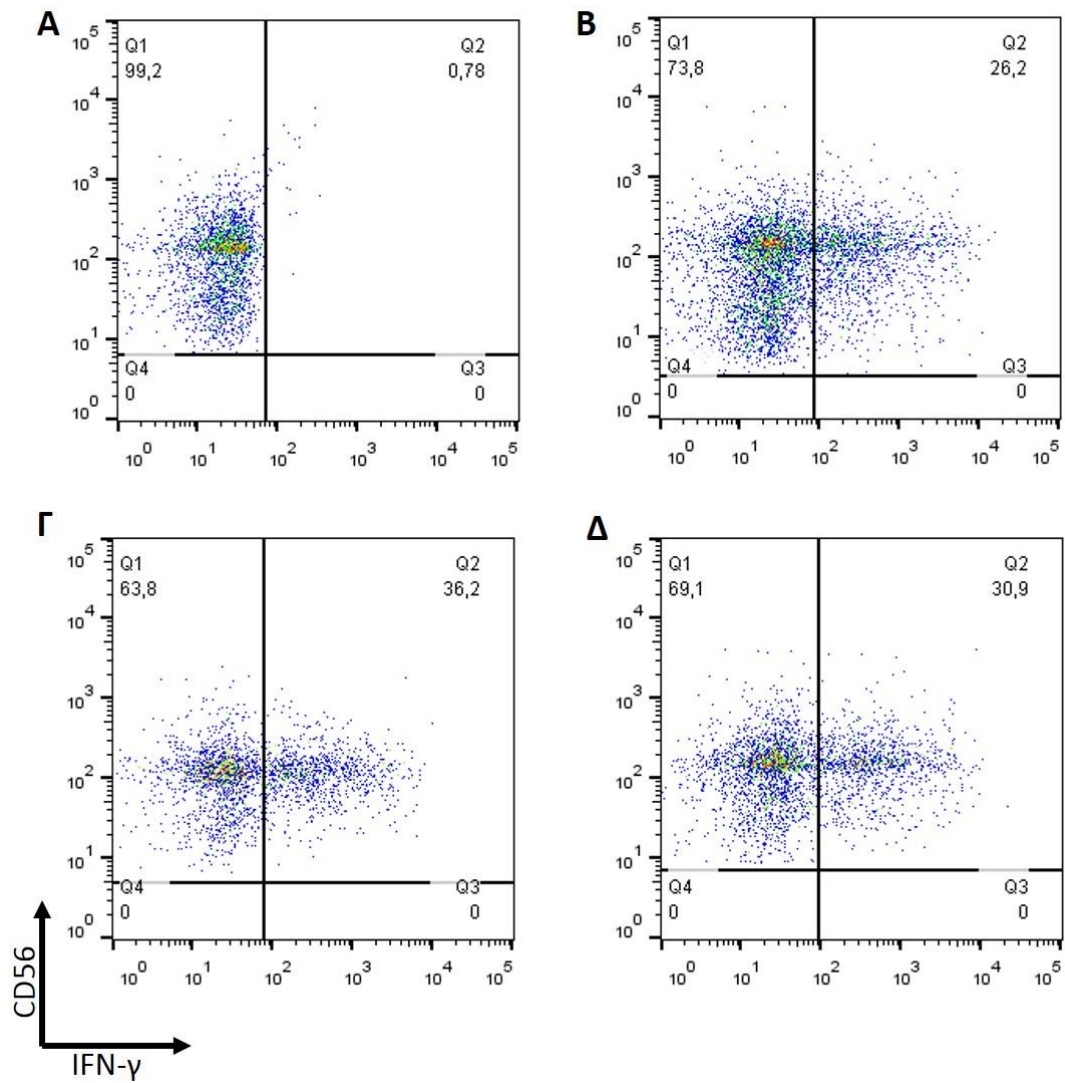
Φιγούρα 12: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD4⁺ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 13: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



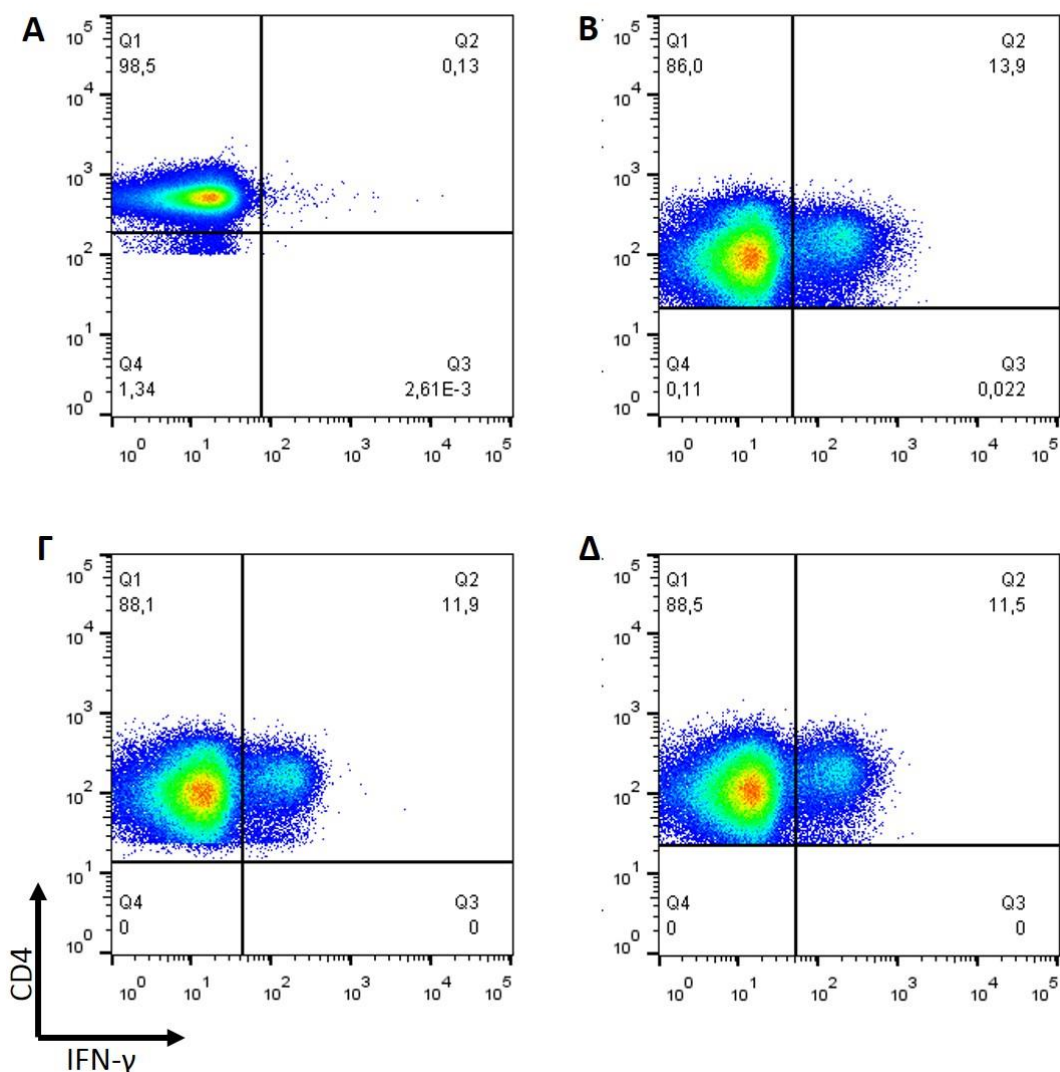
Φιγούρα 14: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



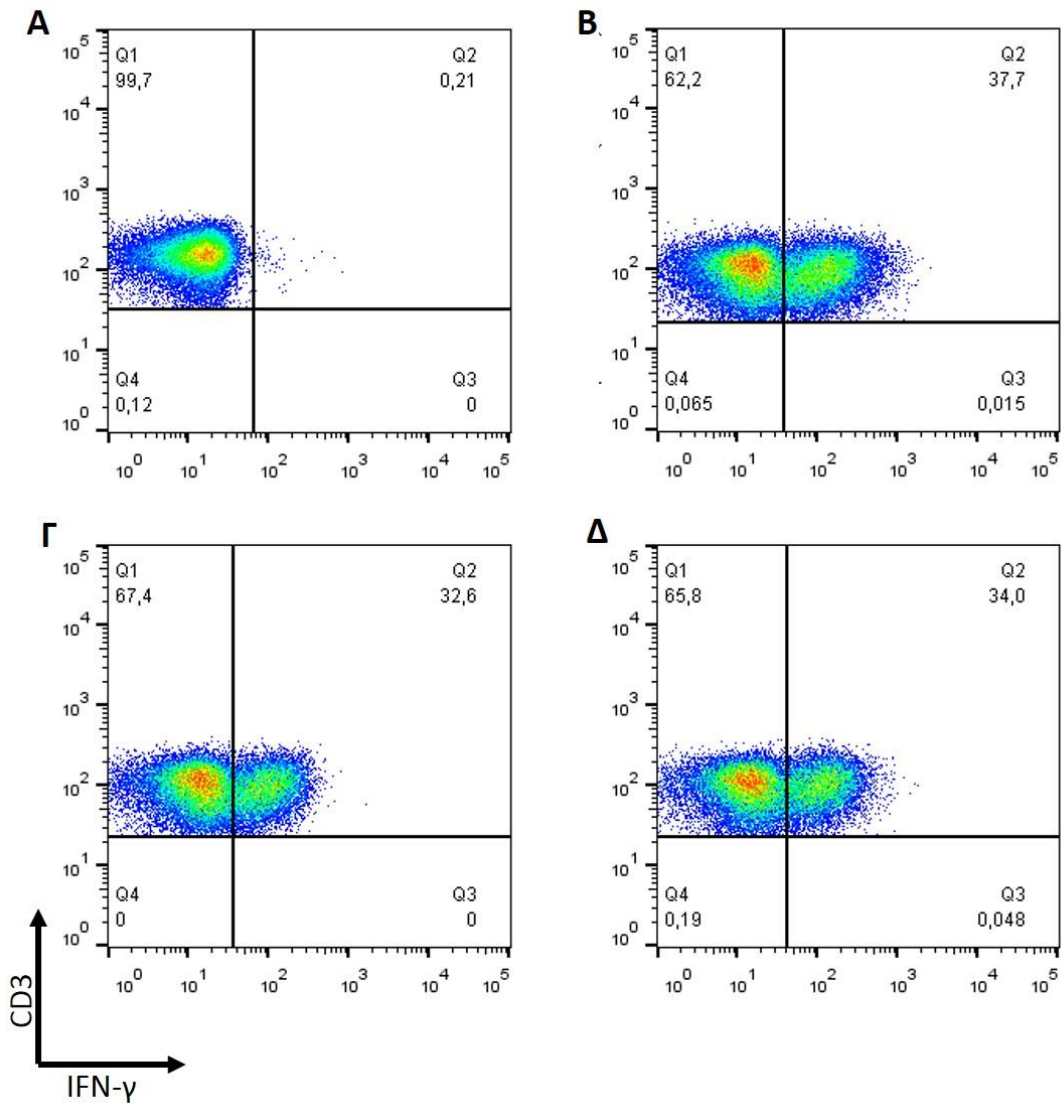
Φιγούρα 15: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35 σε ενδεικτικό υγρή δότη στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.

Σύγκριση της επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IFN- γ στον ίδιο δότη για 24 και 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 10 ng/ml και 25 ng/mL.

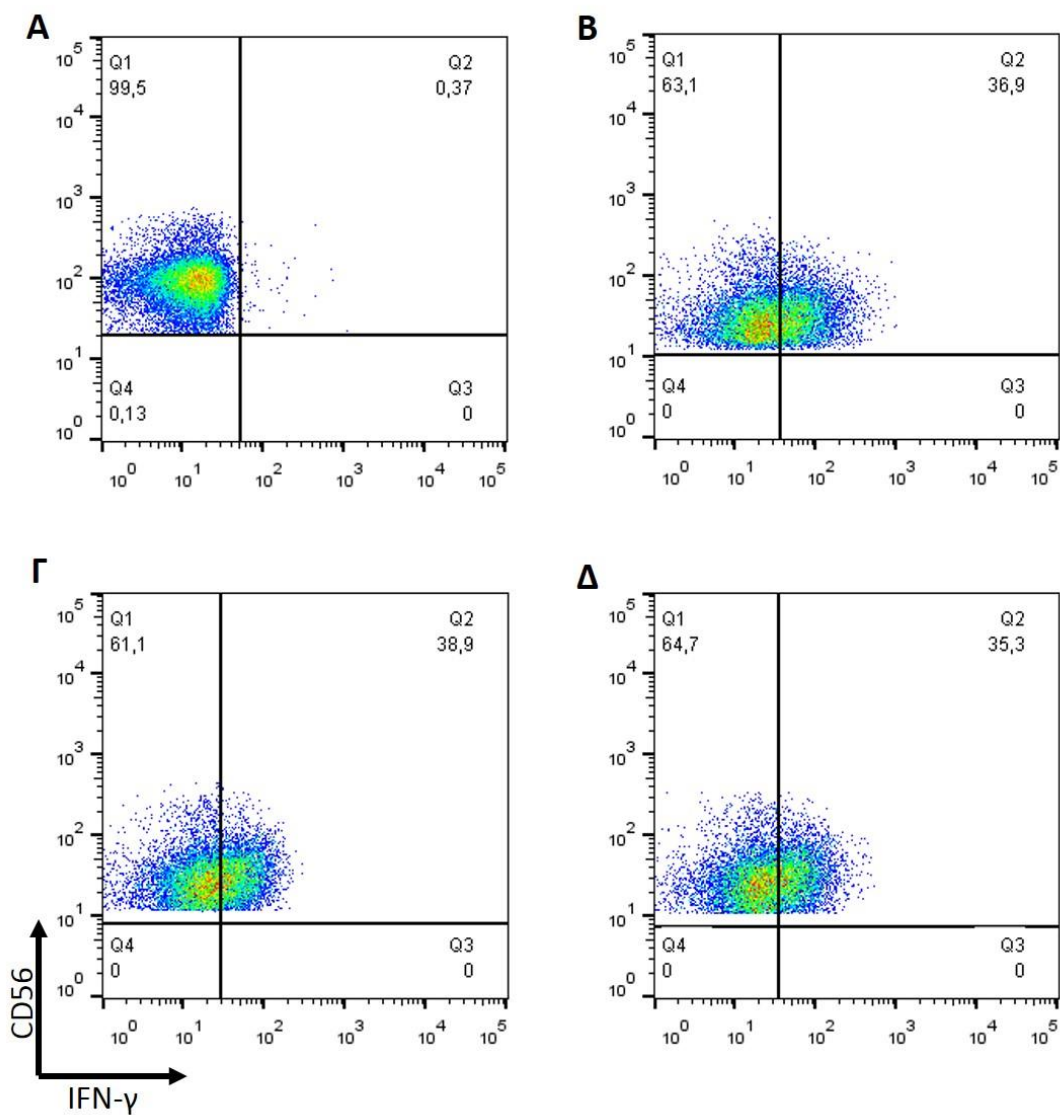
Σε μια επόμενη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα υγιών δοτών ($n=3$), τα οποία επωάστηκαν με τις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και σε προηγούμενα πειράματα και ήταν τα 10 ng/ mL και τα 25 ng/mL ενώ ο χρόνος επώασης ήταν οι 24 και οι 48 ώρες.



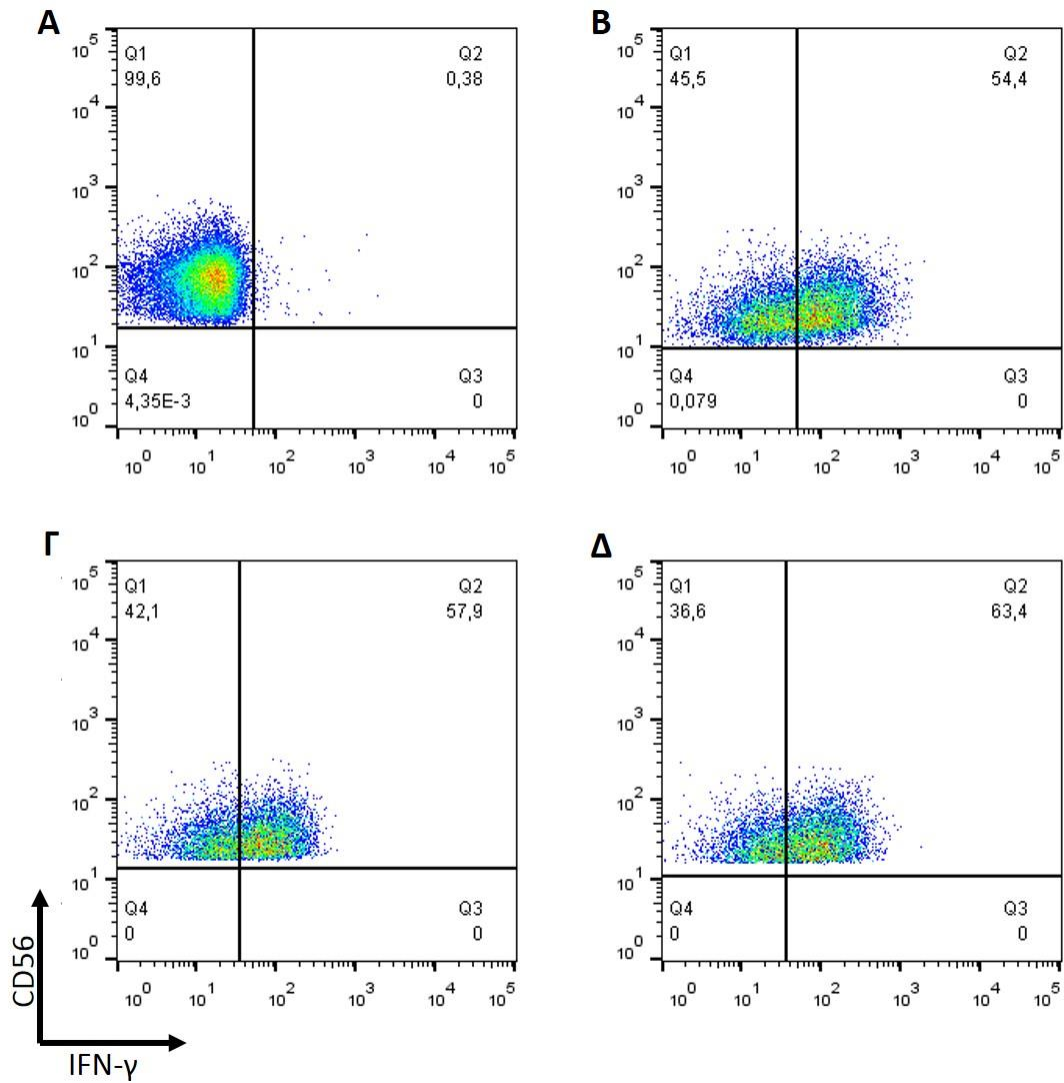
Φιγούρα 16: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 24 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD4⁺ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. (A) Unstimulated, (B) PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις (Γ) 10 ng/mL και (Δ) 25 ng/mL.



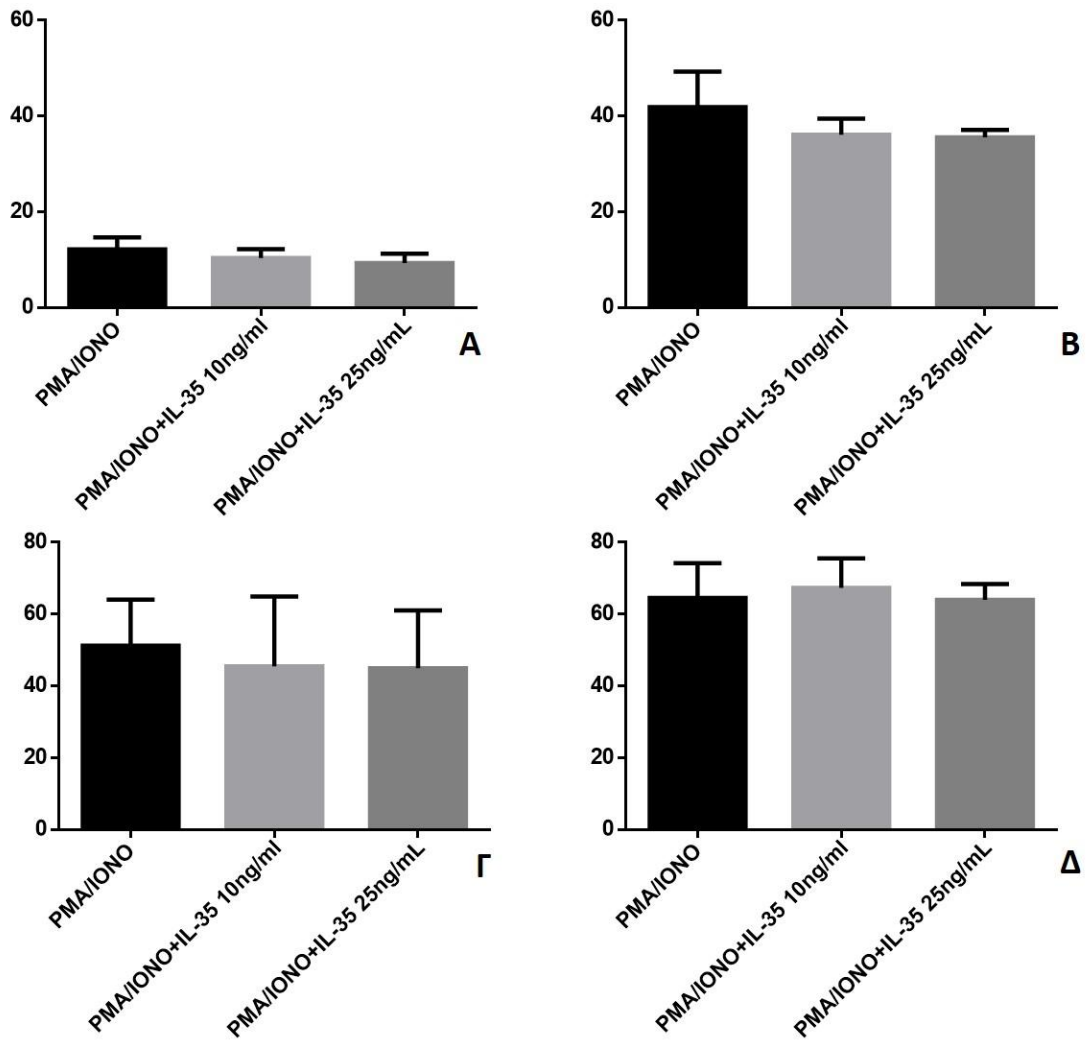
Φιγούρα 17: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 24 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



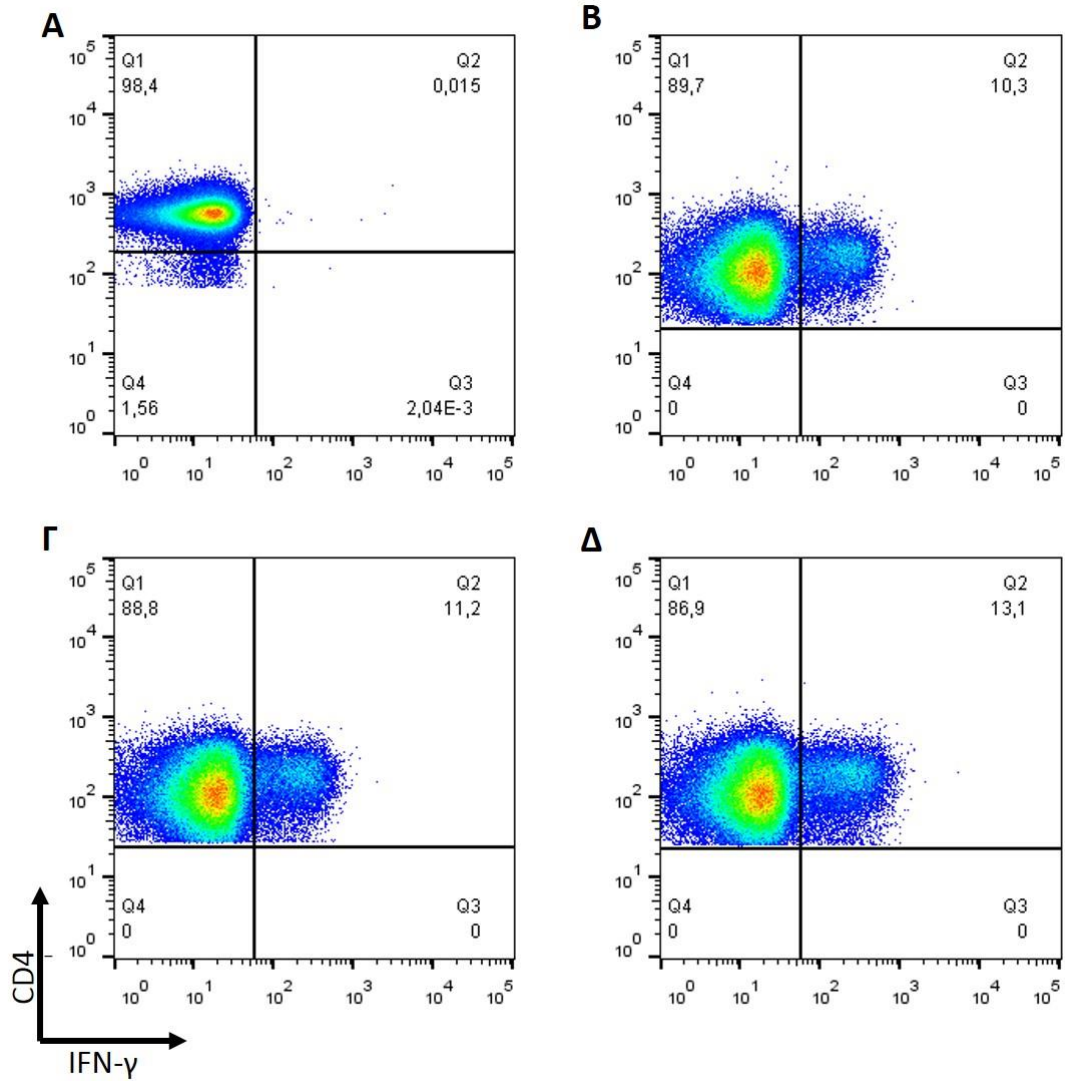
Φιγούρα 18: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 24 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



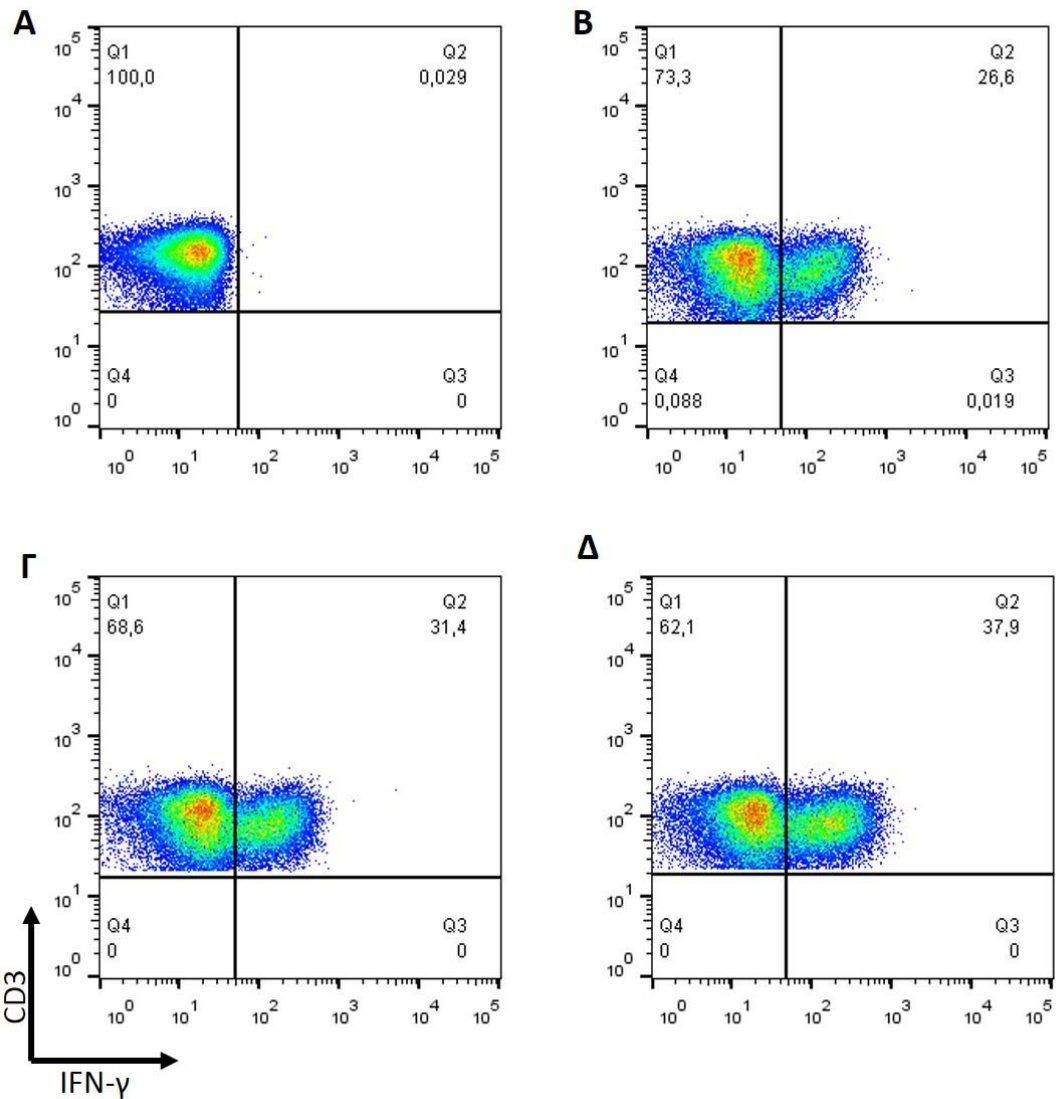
Φιγούρα 19: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 24 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



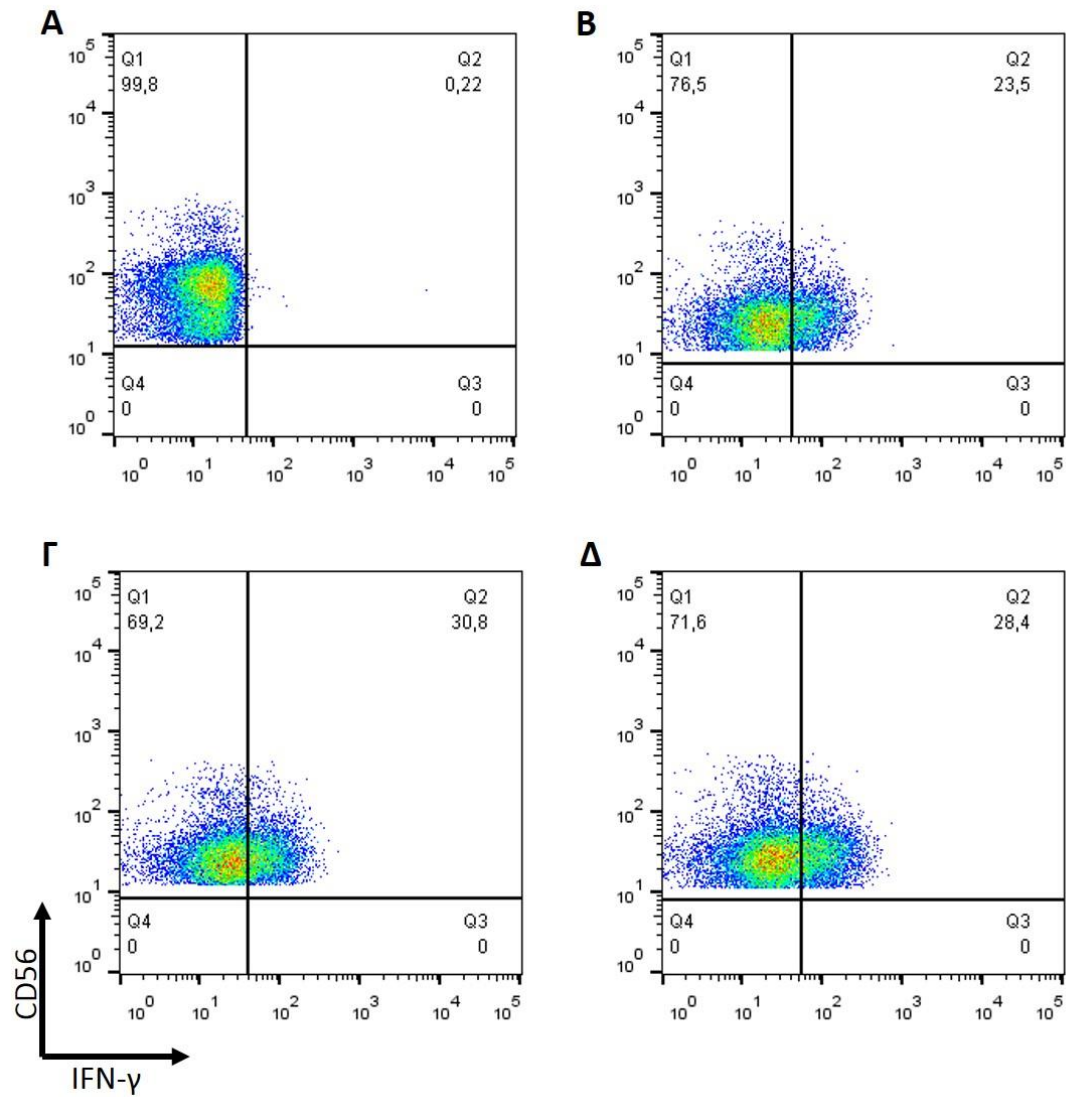
Φιγούρα 20: Συγκεντρωτικά διαγράμματα επίδρασης της IL-35, σε συγκεντρώσεις 10 ng/mL και 25 ng/mL, στη παραγωγή IFN-γ σε υγιείς, με pre-treatment 24 ωρών και έπειτα από ενεργοποίηση με PMA/IONOMYCIN στα **(A)** CD4+ T κύτταρα **(B)** CD8+ T κύτταρα **(Γ)** NK κύτταρα και **(Δ)** NKT κύτταρα



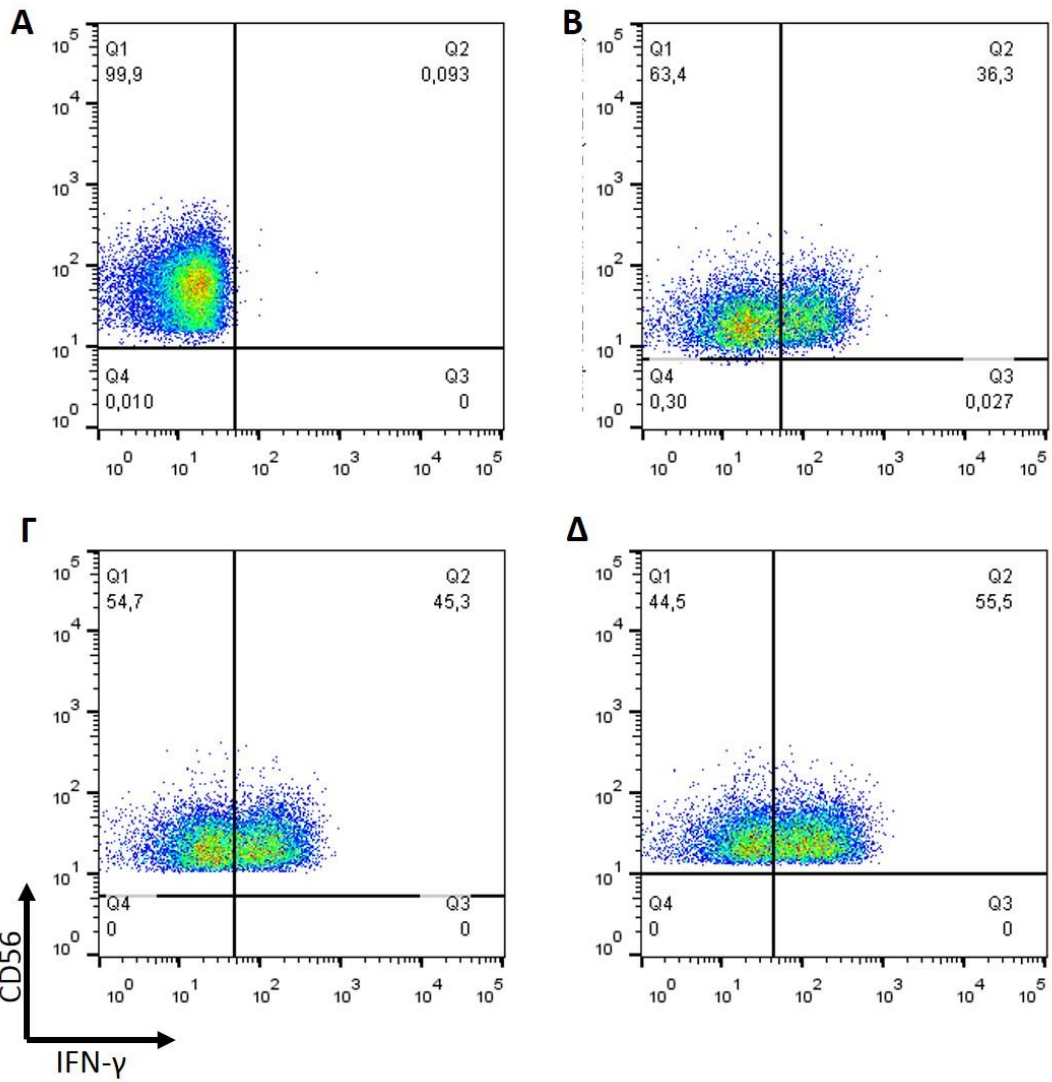
Φιγούρα 21: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD4+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



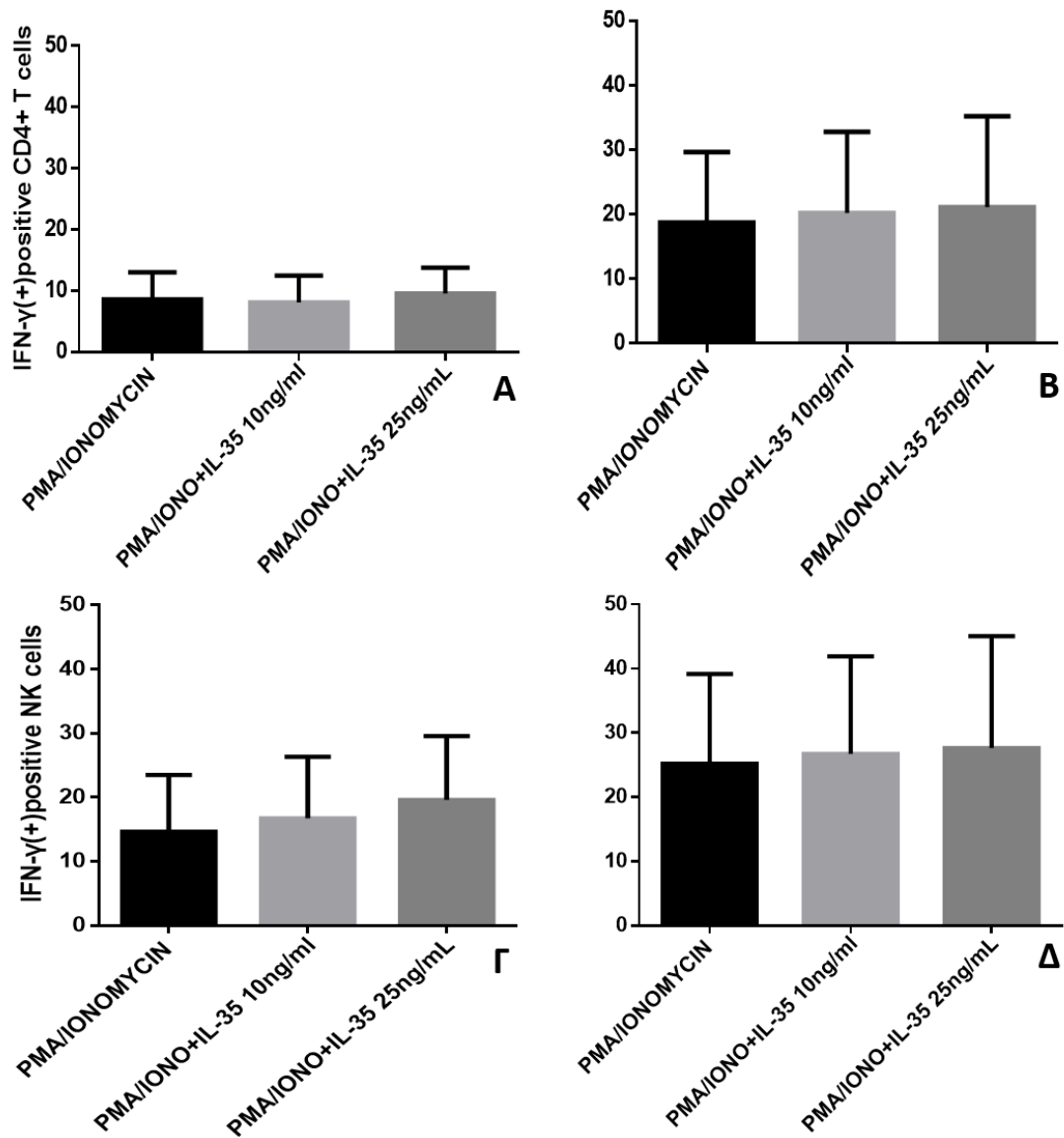
Φιγούρα 22: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 23: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



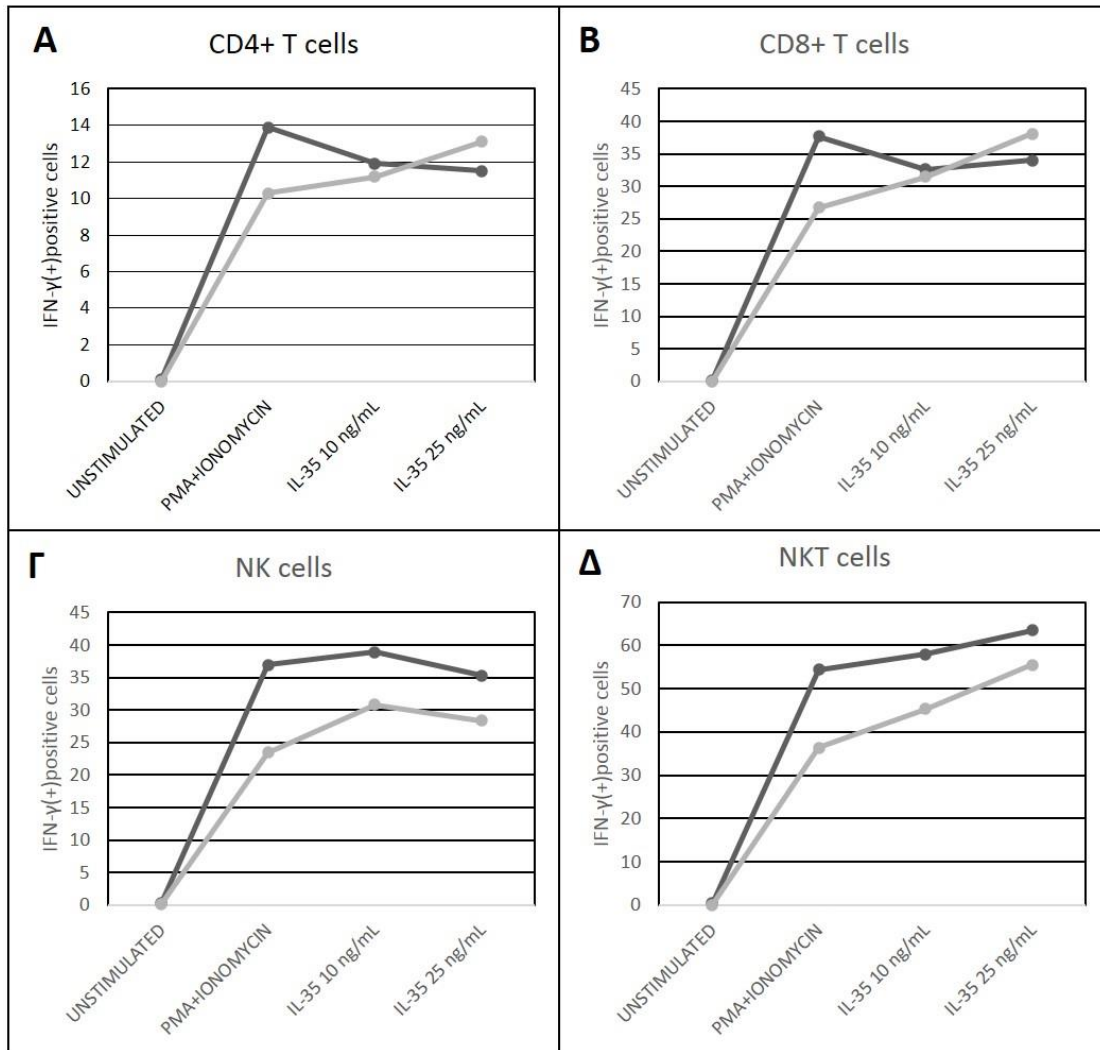
Φιγούρα 24: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ενδεικτικό υγιή δότη στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN και συγκεντρώσεις **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 25: Συγκεντρωτικά διαγράμματα επίδρασης της IL-35, σε συγκεντρώσεις 10 ng/mL και 25 ng/mL, στη παραγωγή IFN-γ σε υγιείς δότες, με pre-treatment 48 ωρών και έπειτα από ενεργοποίηση με PMA/IONOMYCIN στα **(A)** CD4+ T κύτταρα **(B)** CD8+ T κύτταρα **(Γ)** NK κύτταρα και **(Δ)** NKT κύτταρα.

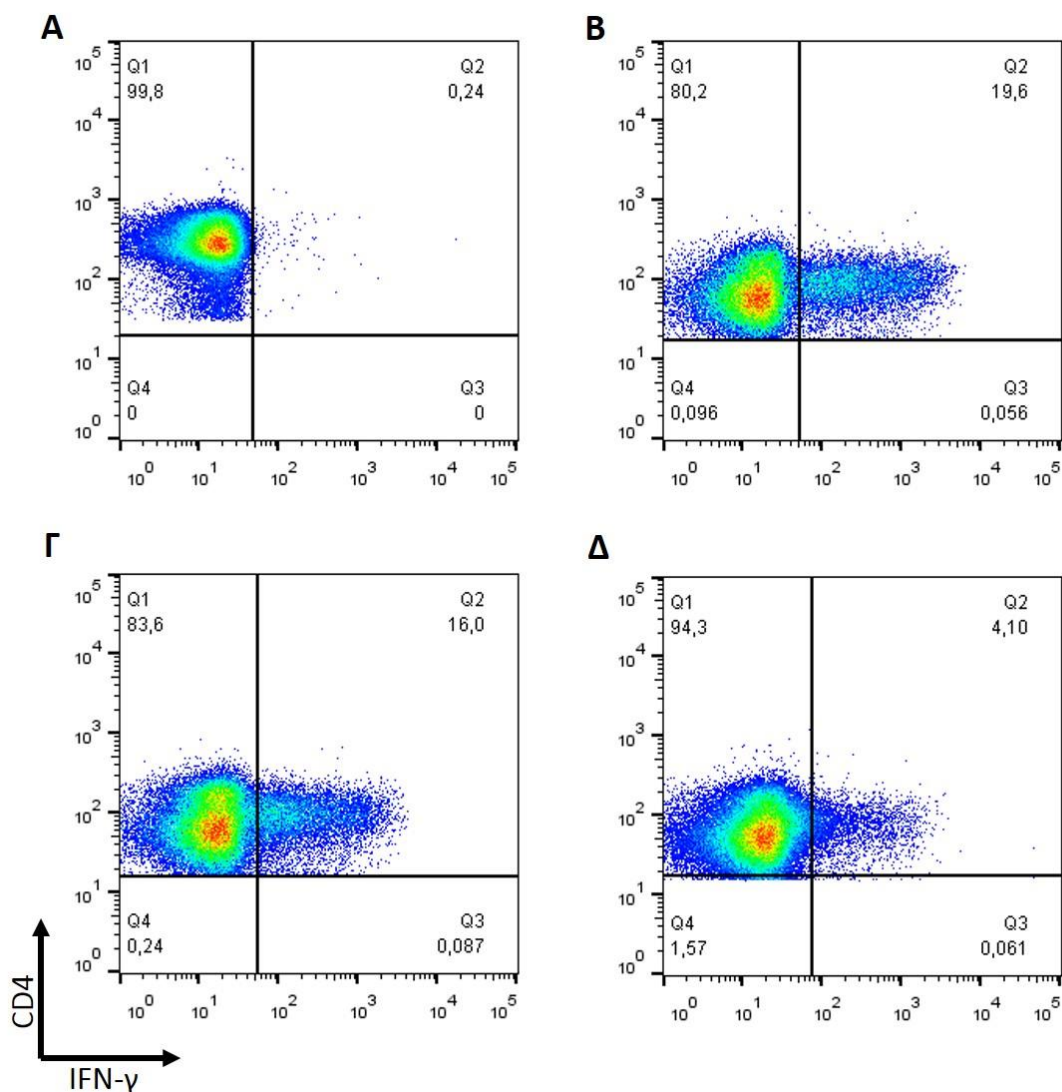
(Στον υποπληθυσμό των CD4+ T κυττάρων παρατηρήθηκε, κατά τη στατιστική ανάλυση, οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 και 25 ng/mL η οποία ήταν * = $p < 0,05$)

Σύγκριση 24h and 48h

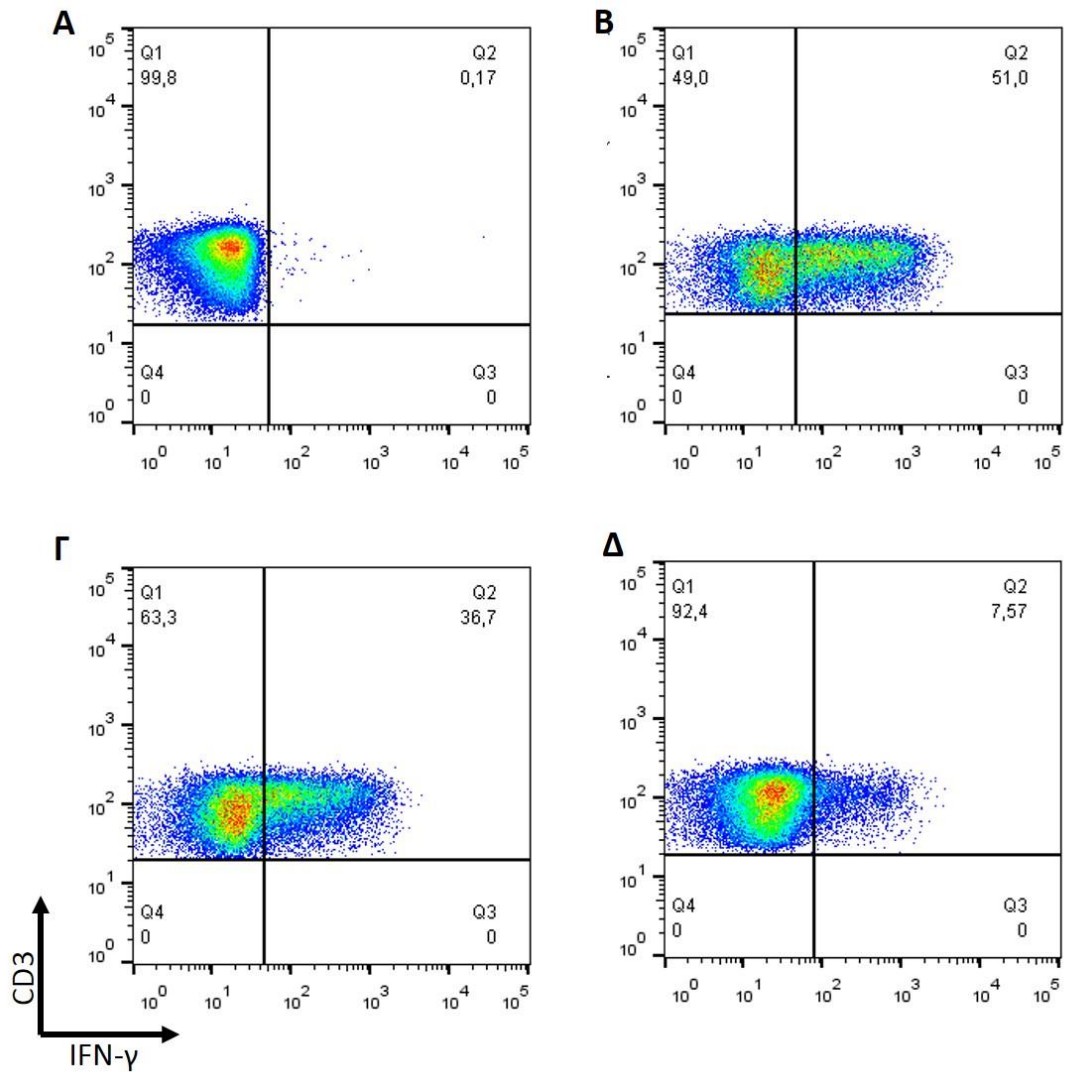


Φιγούρα 26: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης 10 ng/mL και 25 ng/mL IL-35 σε ενδεικτικό υγιή δότη τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. Σύγκριση 24 ωρών (μαύρη γραμμή) και 48 ωρών (γκρι γραμμή) pre-treatment στους υποπληθυσμούς (A) CD4+ T κύτταρα (B) CD8+ T κύτταρα (Γ) NK κύτταρα (Δ) NKT κύτταρα.

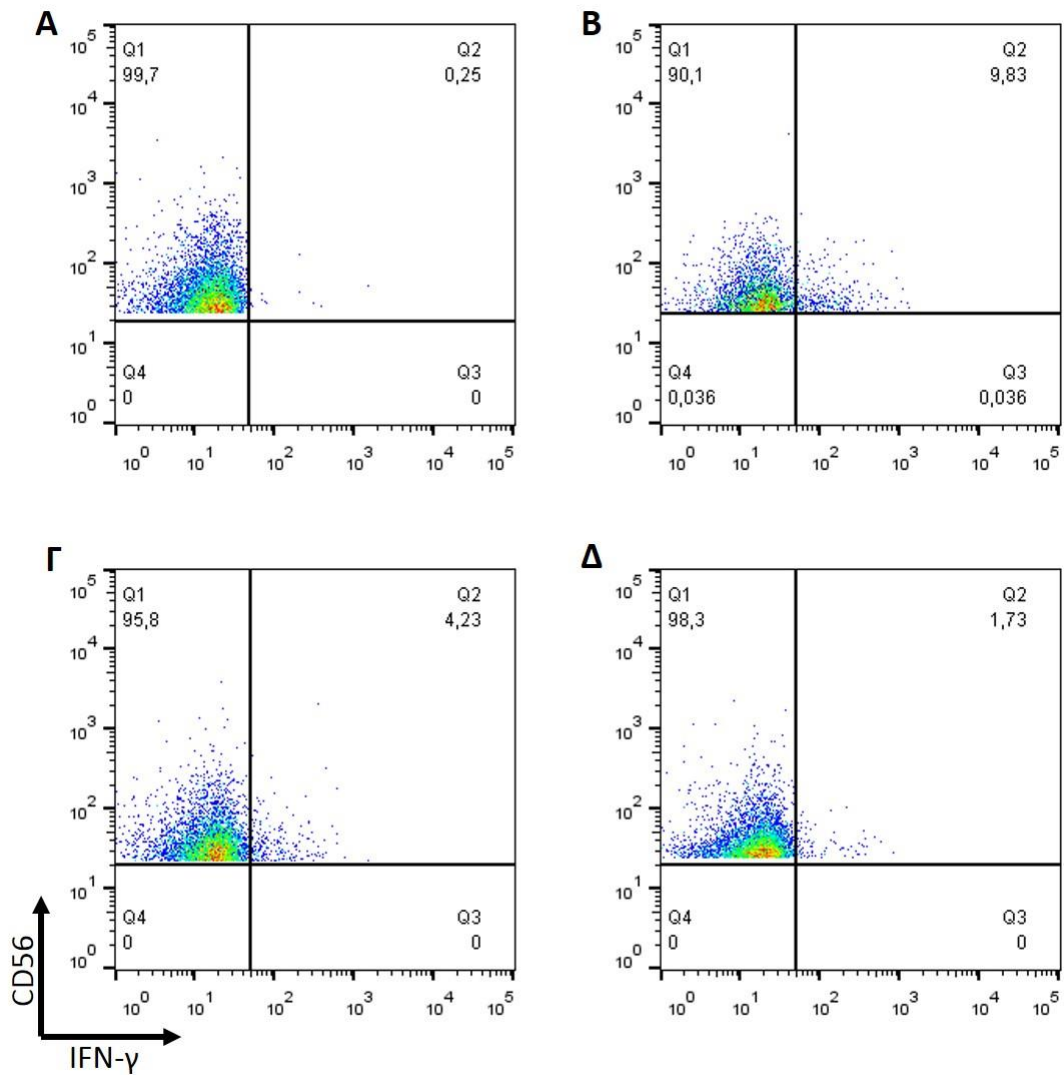
Επομένως κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η επίδραση της IL-35 και σε δείγματα κυττάρων ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα με σκοπό να εξεταστεί το ενδεχόμενο να παρουσιάζονται στατικώς σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της IFN- γ . Οι συνθήκες των πειραμάτων αυτών παρέμειναν ίδιες με των προηγούμενων πειραμάτων που παραγματοποιήθηκαν σε πειράματα υγιών δοτών και ήταν οι συγκεντρώσεις IL-35 να είναι στα 10 και 25 ng/mL και ο χρόνος επώασης των κυτταρικών πληθυσμών με την IL-35 να είναι οι 48 ώρες.



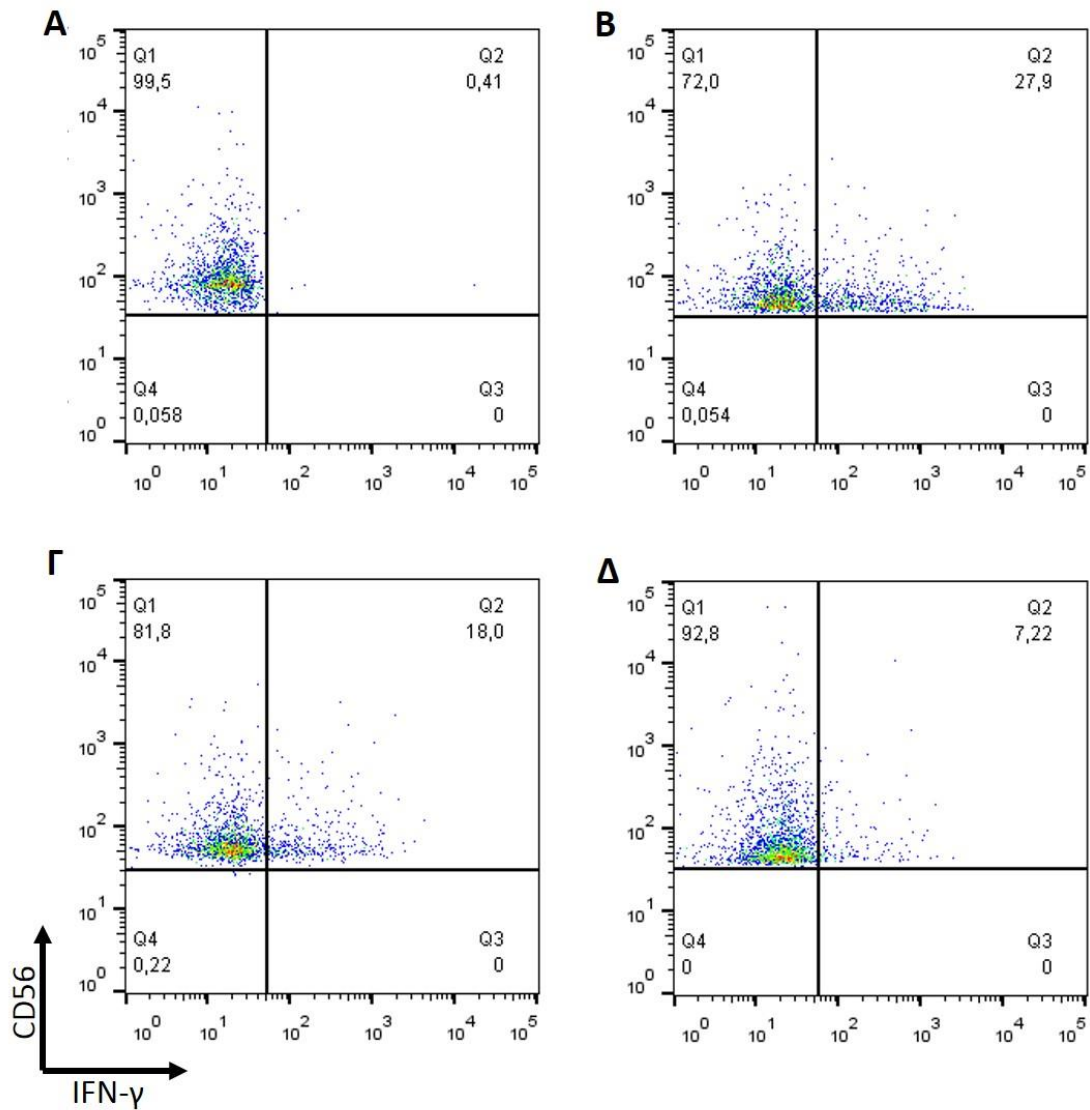
Φιγούρα 27: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ασθενή με ψωρίαση στα CD4+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



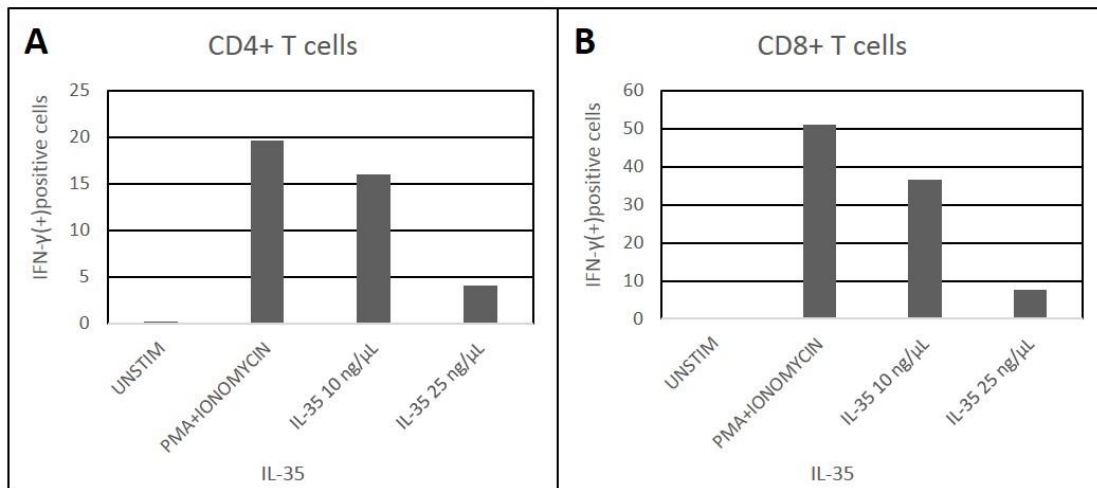
Φιγούρα 28: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ασθενή με ψωρίαση στα CD8⁺ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



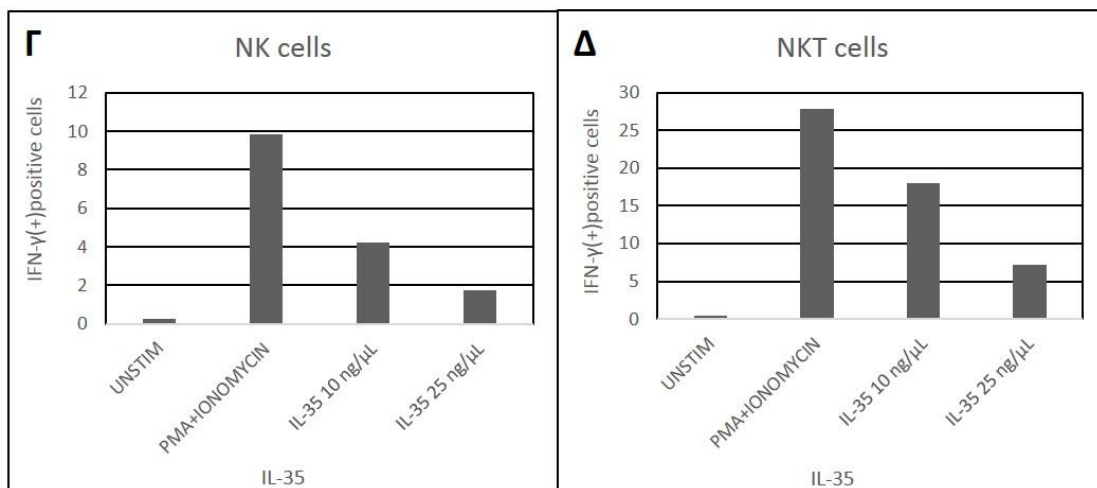
Φιγούρα 29: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ασθενή με ψωρίαση στα NK κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 30: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-35, με pre-treatment 48 ωρών, σε ασθενή με ψωρίαση στα NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated, **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL και **(Δ)** 25 ng/mL.

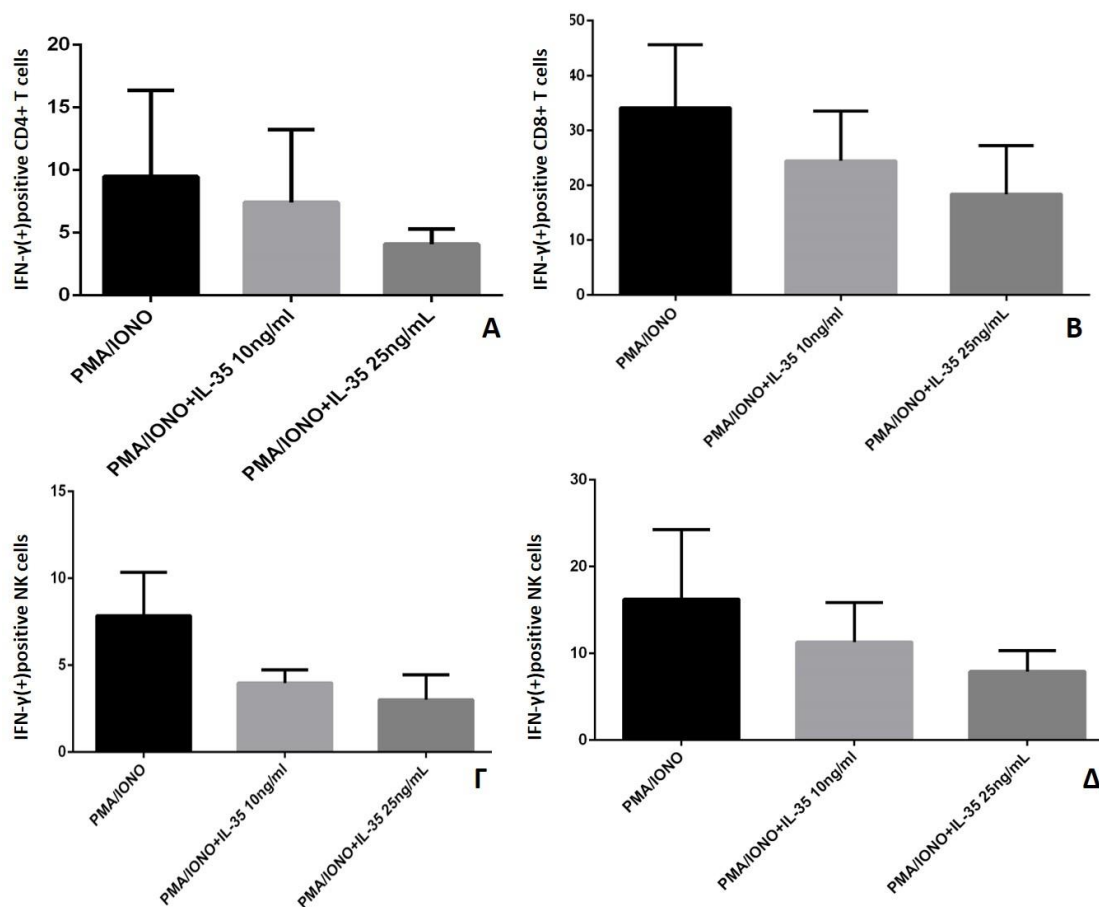


Φιγούρα 31: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 σε συγκεντρώσεις 10 ng/mL και 25ng/mL σε ασθενή με ψωρίαση **(Α)** στα CD4+ και **(Β)** CD8+ T κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN.



Φιγούρα 32: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 σε συγκεντρώσεις 10 ng/mL και 25ng/mL σε ασθενή με ψωρίαση **(Γ)** στα NK και **(Δ)** NKT κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN.

Επίδραση της IL-35 στη παραγωγή της IFN- γ σε PBMCs σε ασθενείς με ψωριασική νόσο.

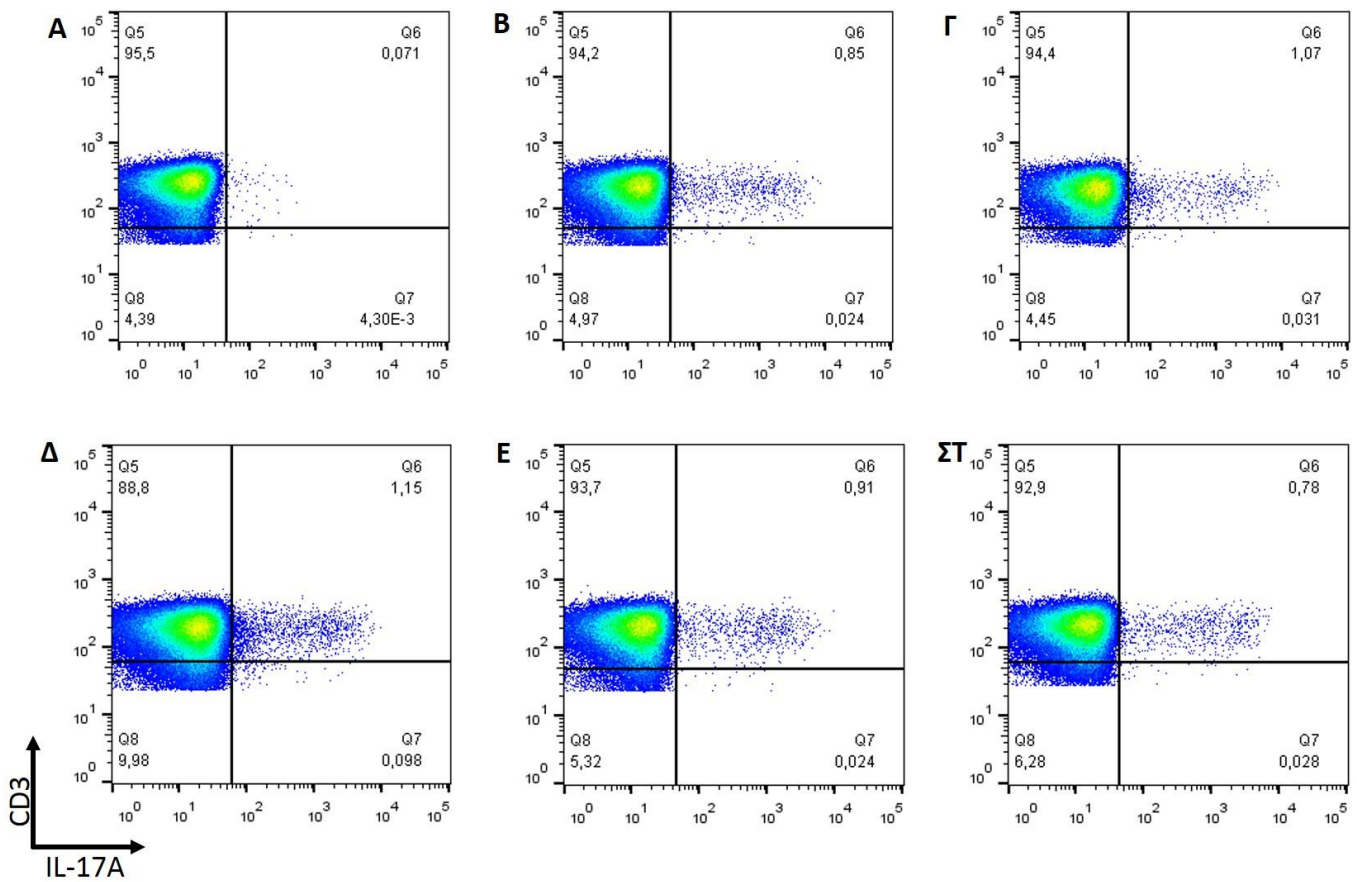


Φιγούρα 33: Συγκεντρωτικά διαγράμματα επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IFN- γ σε ασθενείς με ψωριασική νόσο, με pre-treatment 48 ωρών και έπειτα από ενεργοποίηση με PMA/IONOMYCIN στα (A) CD4+ T κύτταρα (B) CD8+ T κύτταρα (Γ) NK κύτταρα και (Δ) NKT κύτταρα

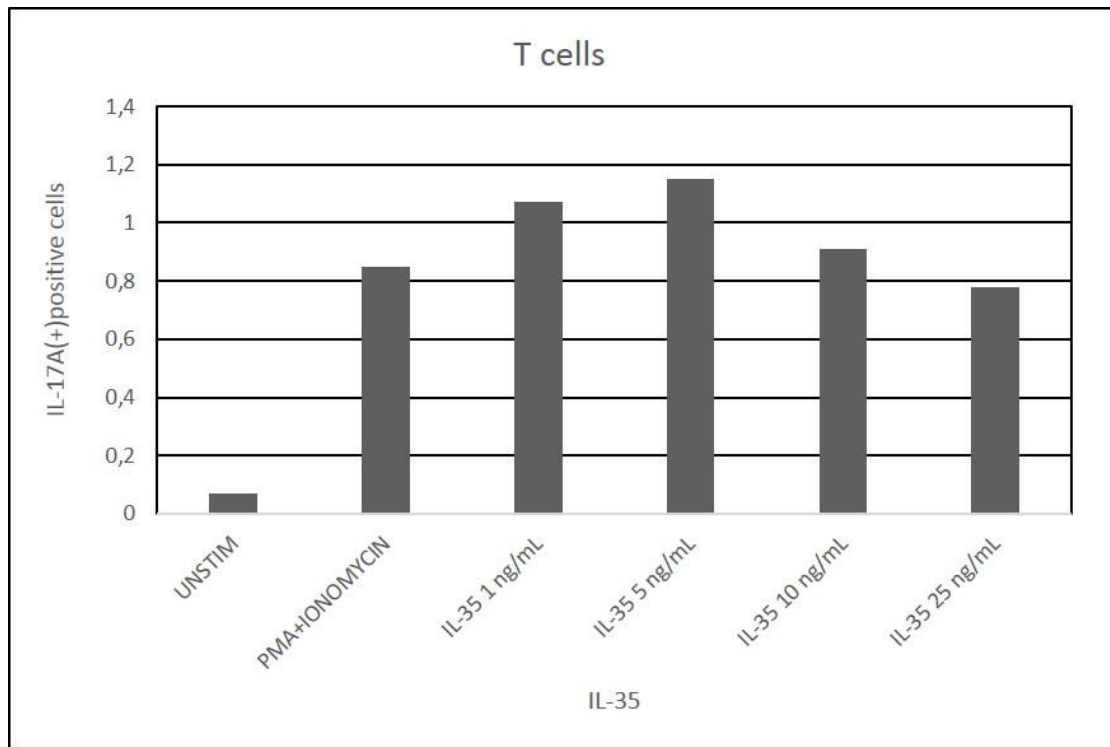
Επίδραση της IL-35 στη παραγωγή IL-17A

Όσον αφορά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να παρατηρηθεί η επίδραση της IL-35 στη παραγωγή IL-17A, τόσο σε δείγματα υγιών δοτών όσο και σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα, οι συνθήκες τους ήταν ίδιες με τα προαναφερθέντα πειράματα που αφορούσαν στην επίδραση της IL-35 στη παραγωγή της IFN- γ . Αυτό σημαίνει ότι τα πειράματα, ομοίως με την IFN- γ , αρχικά πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς δότες ($n=3$) με χρόνο επώασης της IL-35 με τα κύτταρα, τις 48 ώρες και σε συγκεντρώσεις IL-35

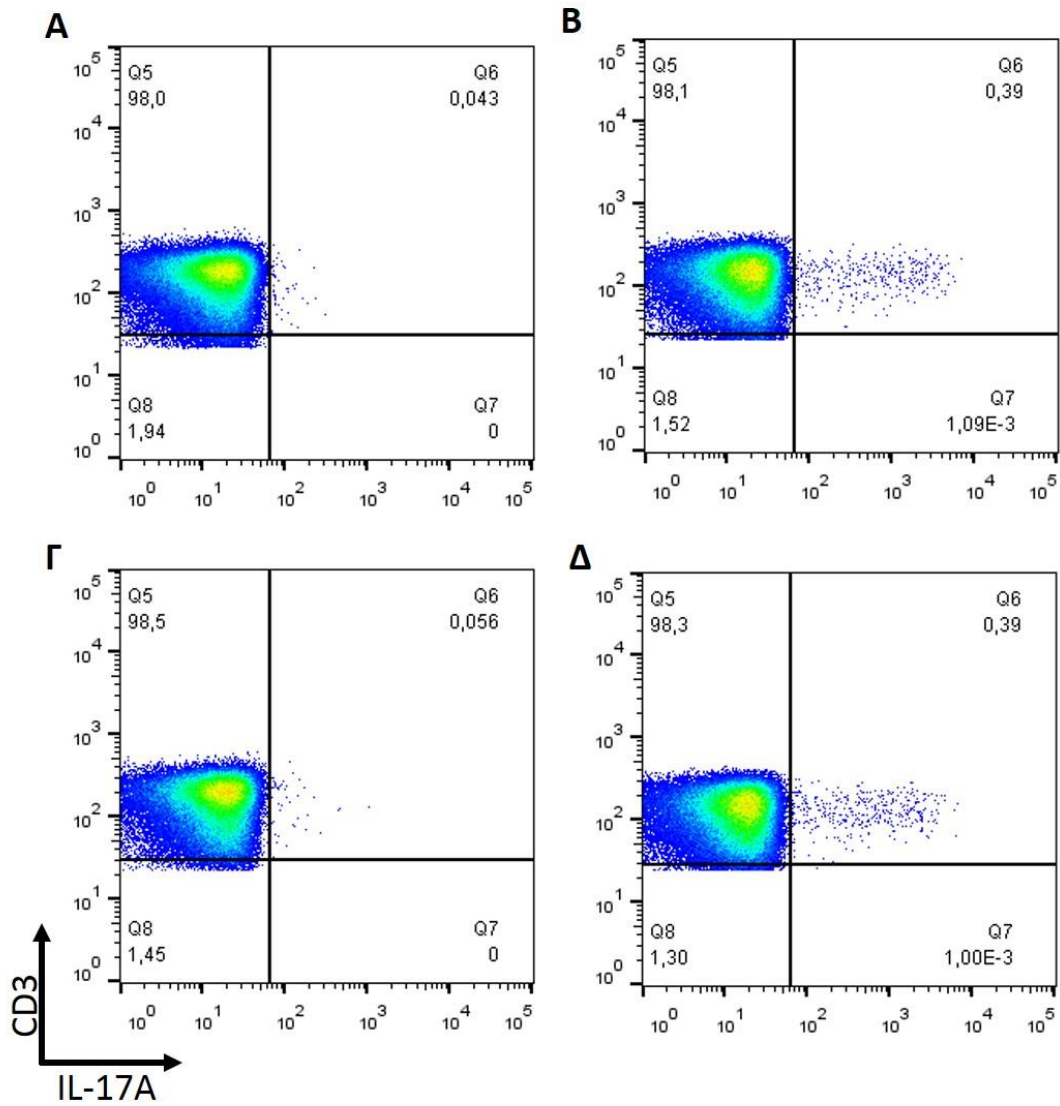
αρχικά 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL και 25 ng/mL προκειμένου να υπάρξει ένα εύρος συγκεντρώσεων με σκοπό να παρατηρηθεί σε ποια συγκέντρωση παρουσιάζεται μεγαλύτερη επίδραση της IL-35 στα επίπεδα της IL-17A.



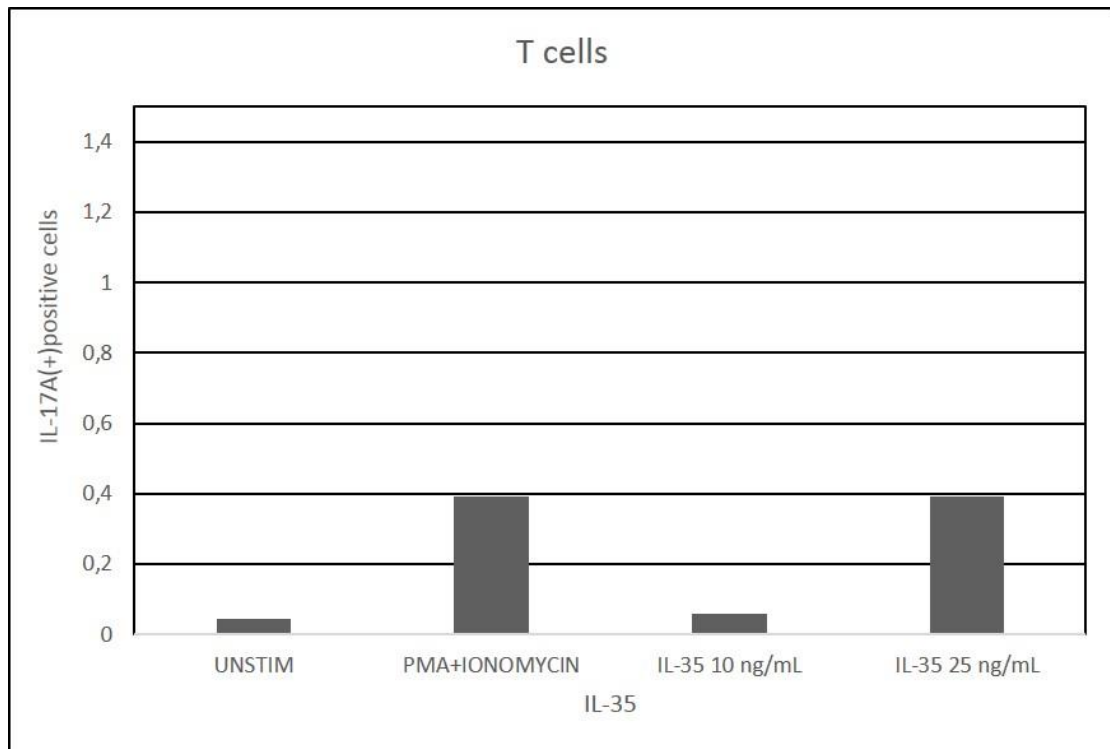
Φιγούρα 34: Ενδεικτική γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IL-17A σε T κύτταρα υγιούς δότη τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. (A) Unstimulated (B) PMA/IONOMYCIN (Γ) 1 ng/mL (Δ) 10 ng/mL (E) 25 ng/mL (ΣΤ) 50 ng/mL.



Φιγούρα 35: Ενδεικτική γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IL-17A σε T κύτταρα υγιούς δότη τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN.



Φιγούρα 36: Ενδεικτική γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IL-17A σε T κύτταρα ασθενούς με ψωρίαση τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL **(Δ)** 25 ng/mL.



Φιγούρα 37: Ενδεικτική γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης της IL-35 στη παραγωγή IL-17A σε T κύτταρα ασθενούς με ψωρίαση τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με PMA/IONOMYCIN. **(A)** Unstimulated **(B)** PMA/IONOMYCIN **(Γ)** 10 ng/mL **(Δ)** 25 ng/mL.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ψωρίαση αποτελεί μία χρόνια πάθηση του δέρματος η οποία πλήττει μέχρι και το 2% του πληθυσμού. Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μία αυτοάνοση νόσος που συνήθως ακολουθεί την ψωρίαση καθώς το 70% των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση αναπτύσσουν κάποια στιγμή και ψωριασική αρθρίτιδα. Κύριο ρόλο στη ψωριασική νόσο διαδραματίζουν τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα καθώς και τα NK κύτταρα. Τόσο τα T λεμφοκύτταρα όσο και τα NK κύτταρα παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες οι οποίες συμμετέχουν στην νόσο όπως η IFN-γ και η IL-17.

Η IL-35 είναι μια εκ των κυτοκινών που απαρτίζουν την οικογένεια κυτοκινών της IL-12 και ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της είναι η ανοσοτροποποιητική της δράση την οποία αναφέρουν αρκετές έρευνες πάνω σε διάφορα νοσήματα στη βιβλιογραφία.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της IL-35 στα επίπεδα της IFN-γ αλλά και της IL-17 στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων αλλά και στα NK και NKT κύτταρα, σε ασθενείς που έπασχαν τόσο από ψωρίαση όσο και από ψωριασική αρθρίτιδα καθώς και σε υγιείς μάρτυρες.

Η ερευνητική υπόθεση της μελέτης περιείχε τρία βασικά ερωτήματα α) εάν η *in-vitro* χορήγηση της IL-35 οδηγεί στην πτώση των επιπέδων της IFN-γ και IL-17 έπειτα από διέγερση, β) εάν ναι από ποιο λευκοκυτταρικό υποπληθυσμό και ποια η επίδραση της IL-35 στην κάθε μια από της IL-17 και IFN-γ, και γ) εάν η χορήγηση της IL-35 είχε την ίδια επίδραση στα κύτταρα τόσο ασθενών με ψωριασική νόσο όσο και υγιών μαρτύρων.

Η μελέτη αυτή αποτέλεσε, με βάση την βιβλιογραφία μία από τις ελάχιστες προσεγγίσεις που έχουν γίνει μέχρι στιγμής όσον αφορά την επίδραση της IL-35 σε ασθενείς με ψωρίαση αλλά και τη ψωριασική αρθρίτιδα. Για πρώτη φορά μελετήθηκε η χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-35 ως pre-treatment σε καλλιέργεια. Στα πλαίσια της μελέτης, απομονώθηκαν μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία της IL-35 ενώ είχαν ενεργοποιηθεί με τους χημικούς διεγέρτες PMA/Ionomycin ώστε να αποσαφηνιστεί επίδραση της IL-35 στα επίπεδα της IFN-γ με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Αυτό έγινε με δεδομένο την διχογνωμία και τα ασαφή επίπεδα IL-35 που έχουν μετρηθεί μέχρι τώρα στον ορό ασθενών με ψωριασική νόσο.

Ένα από τα κύρια ευρήματα της μελέτης, παρόλο που ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν δεν ήταν μεγάλος είναι ότι η *in vitro* χορήγηση της IL-35 οδηγεί σε ελάττωση των επιπέδων τόσο της IFN-γ όσο και της IL-17. Αυτή η μείωση παρατηρήθηκε μόνο στους ασθενείς με ψωριασική νόσο σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες στους οποίους η χορήγηση της IL-35 γενικά δεν είχε κάποια επίδραση στα επίπεδα παραγωγής IFN-γ και IL-17.

Παραδόξως η IL-35 στα CD4+ T λεμφοκύτταρα υγιών μαρτύρων αύξησε οριακά την παραγωγή IFN-γ.

Ένας από τους κύριους περιορισμούς της μελέτης ήταν ο μικρός αριθμός ασθενών. Ωστόσο ανάμεσα σε αυτούς που συμπεριλήφθηκαν ένας ασθενής ο οποίος δεν είχε λάβει προηγούμενη θεραπεία (naïve). Η *in vitro* χορήγηση της IL-35 οδήγησε σε ελάττωση της IFN-γ με τα ποσοστά μείωσης για τα CD4+ T λεμφοκύτταρα σε συγκέντρωση 10 ng/mL να είναι 34,4% και για τα CD8+ T λεμφοκύτταρα στα 10 ng/mL παρατηρήθηκε μείωση 53,48%. Όσον αφορά, τους κυτταρικούς πληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων σε συγκέντρωση IL-35 10 ng/mL, παρατηρήθηκε αντίστοιχα μείωση 59,7% στα NK κύτταρα και 18,22% στα NKT κύτταρα.

Στον συγκεκριμένο ασθενή η χορήγηση IL-35 στην σχετικά χαμηλή συγκέντρωση των 10ng/ml οδήγησε στην μείωση της IFN-γ, ενώ η χορήγηση μεγαλύτερης δόσης της IL-35 οδήγησε σε μικρότερη επίδραση όσον αφορά της μείωση των επιπέδων της IFN-γ. Συγκεκριμένα, στους υποπληθυσμούς των CD4+ T λεμφοκυττάρων και CD8+ T λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε ποσοστιαία μείωση της τάξης του 7,69% και 9,17% αντιστοίχως. Για τους υποπληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων η μείωση των επιπέδων της IFN-γ ήταν 52,5% για τα NK κύτταρα και 7,38% για τα NKT κύτταρα.

Όσον αφορά τους υπόλοιπους ασθενείς που βρίσκονταν υπό θεραπεία με συνθετικά αντι-ρευματικά φάρμακα (sDMARDs) και βιολογικούς παράγοντες, η επίδραση της χορήγησης IL-35 στην παραγωγή IFN-γ ήταν παρόμοια και οδήγησε σε ποσοστιαία μείωση των IFN-γ+ λεμφοκυττάρων της τάξης του 50% κατά μέσο όρο.

Επιπρόσθετα, υπήρξε ένας ασθενής μεταξύ αυτών, ο οποίος παρουσίασε τη μικρότερη μείωση στην παραγωγή IFN-γ όταν στα κύτταρα του προστέθηκε η IL-35. Ο συγκεκριμένος ασθενής είχε προηγουμένως λάβει χρονικά βιολογικούς παράγοντες έναντι και του TNF και της IL-17 χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει βελτίωση όσον αφορά τον δείκτη σοβαρότητα νόσου (PASI score). Σε αυτόν τον ασθενή, η προσθήκη της IL-35 παρουσίασε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση όσον αφορά τα IFN-γ+ κύτταρα.

Όσον αφορά την ανάλυση της παραγωγής IFN-γ από τους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς στους ασθενείς, η μεγαλύτερη επίδραση της IL-35 παρατηρήθηκε στα NK κύτταρα με μέγιστο όριο 38,6% σε συγκέντρωση 10 ng/mL και 55% σε συγκέντρωση 25 ng/mL και στα CD8+ T λεμφοκύτταρα όπου παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 27% σε συγκέντρωση IL-35 10 ng/mL και 39% σε συγκέντρωση IL-35 25 ng/mL.

Εκτός της παραγωγής της IFN-γ ανάλογη μείωση παρατηρήθηκε και στα ποσοστά των IL-17+ CD4+ κυττάρων (Th17) όταν η IL-35 χορηγήθηκε στην συγκέντρωση των 10ng/ml). Αντίθετα στην συγκέντρωση των 25ng/ml δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση.

Τα αποτελέσματα αυτά συγκεντρωτικά συγκλίνουν στην εκτίμηση ότι η IL-35 χορηγούμενη στα 10ng/ml οδηγεί σε μείωση των κυτοκινών IFN- γ και IL-17 ενώ χορηγούμενη στα 25ng/ml δεν δείχνει να έχει κάποια επίδραση.

Σίγουρα ο αριθμός των ασθενών είναι πολύ μικρός και αποτελεί επιτακτική ανάγκη η αύξηση του αριθμού των υπό εξέταση δειγμάτων. Αυτό ιδανικά θα περιλαμβάνει τουλάχιστον 5-10 ασθενείς που δεν έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία (naïve), 5-10 ασθενείς υπό θεραπεία διαφορετική των βιολογικών παραγόντων. Αυτά τα πειράματα, θα μας βοηθήσουν να επαληθεύσουμε την αρχική μας εκτίμηση που προκύπτει από τη μελέτη και τα αποτελέσματα των ασθενών που παρουσιάζονται στη παρούσα μελέτη τα οποία δείχνουν ότι η IL-35 συμβάλλει στη μείωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, ιδιαίτερα στους naïve ασθενείς όπως επίσης και στους υπό θεραπεία.

Αυτό, είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία και τις μετρήσεις της IL-35 στον ορό μεγάλων ομάδων ασθενών όπου εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη. Τα αποτελέσματά μας, αν και λίγα, αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της IL-35 και της επαγωγής κυττάρων που παράγουν IL-35 (Bregs, Tregs) και την ανοσορυθμιστική τους δράση στη ψωριασική νόσο.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία επίσης, μελετήθηκαν εκτενώς μεγαλύτερος αριθμός υγιών μαρτύρων σύμφωνα με το σχεδιασμό της κατά τον οποίο η IL-35 θα προστίθονταν σε καλλιέργειες λευκοκυττάρων υγιών και ασθενών. Κατά τη διάρκεια των αρχικών πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ως επί το πλείστον, δείγματα υγιών μαρτύρων για τους εξής λόγους: α) εκπαίδευση και αξιολόγηση της καλλιέργειας επαγωγής (διέγερσης) παραγωγής κυτοκινών και κυτταρομετρική ανάλυση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών, β) στα πλαίσια της αξιολόγησης της IL-35 και της πιθανολογούμενης επίδρασής της στους κυτταρικούς πληθυσμούς, διερευνήθηκαν τόσο οι βέλτιστες συγκεντρώσεις της IL-35 όπως επίσης και ο ιδανικός χρόνος προσθήκης της IL-35 (pre-treatment) πριν από τη διέγερση λευκοκυττάρων για παραγωγή κυτοκινών.

Διερευνήθηκαν τόσο χαμηλές όσο και υψηλές συγκεντρώσεις της IL-35 σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε πειράματα dose-response. Επίσης διερευνήθηκε η επίδραση της IL-35 έπειτα από σύντομη (30 λεπτά) και μεγαλύτερη σε διάρκεια επώαση (pre-treatment) (24 ώρες-48 ώρες). Ανεξαρτήτως δοσολογίας και επώασης όσον αφορά τους υγιείς μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε ανάλογη μείωση των IFN- γ και IL-17 όπως στους ασθενείς με ψωριασική νόσο.

Ειδικότερα στο pre-treatment των 48 ωρών δε παρατηρήθηκε γενικότερη διαφοροποίηση ως προς την επίδραση της IL-35 στα επίπεδα της IFN- γ όσον αφορά τους υγιείς μάρτυρες. Ωστόσο, συγκεκριμένα στον υποπληθυσμό των CD4+ T κυττάρων, κατά τη στατιστική ανάλυση για την επίδραση της IL-35 στα επίπεδα της IFN- γ , παρατηρήθηκε οριακά στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 και 25 ng/mL.

Τα ευρήματά μας συγκεντρωτικά τόσο στους ασθενείς όσο και στους υγιείς μάρτυρες, δείχνουν ότι υπάρχει δοσο-εξαρτώμενη διαφοροποίηση της υπο διερεύνησης επίδρασης της IL-35 στην παραγωγή των κυτοκινών IFN- γ και IL-17. Όσον αφορά τους υγιείς μάρτυρες η IL-35 διαφέρει από τις υπόλοιπες

αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-10, TGF-β) οι οποίες έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση και οδηγούν στη δόσο-εξαρτώμενη μείωση των φλεγμονωδών κυτοκινών σε υγιείς μάρτυρες (70).

Μετά από ενδεδειγμένη μελέτη τουλάχιστον πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων και τριών χρονικών διαστημάτων, επιλέξαμε μια χαμηλή συγκέντρωση (10 ng/mL) και μια υψηλή συγκέντρωση (25 ng/mL), 48 ώρες πριν τη διέγερση επειδή παρουσίασαν μεγαλύτερη διαφοροποίηση ως προς τα αποτελέσματά μας.

Σε καμία από τις συγκεντρώσεις και τους χρόνους που μελετήθηκαν, η IL-35 δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Υποθέτουμε ότι στους υγιείς μάρτυρες η IL-35 δεν οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της IFN-γ και IL-17 λόγω του υψηλού ποσοστού ρυθμιστικών T και B κυττάρων στους υγιείς αυτούς και συνεπώς αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης της IL-35 στον ορό του αίματός τους(71).

Αυτό συμφωνεί μερικώς με βιβλιογραφικές αναφορές όσον αφορά τα πειραματικά μοντέλα στα οποία έχει γίνει γενετική τροποποίηση ώστε να μην εκφράζουν συστατικά(components) της IL-35, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές όπως την θνητότητα και την ανοσολογική απόκριση σε σχέση με τα μοντέλα με γενετική τροποποίηση του TGF-β ή της IL-10 (72).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(1):1-25.
2. Dixon KO, van der Kooij SW, Vignali DA, van Kooten C. Human tolerogenic dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members. *Eur J Immunol*. 2015;45(6):1736-47.
3. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
4. Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PloS one*. 2012;7(3):e33628.
5. Espes D, Singh K, Sandler S, Carlsson PO. Increased Interleukin-35 Levels in Patients With Type 1 Diabetes With Remaining C-Peptide. *Diabetes care*. 2017;40(8):1090-5.
6. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*. 2015;75(2):249-55.
7. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 2012;13(8):722-8.
8. Li Y, Yao L, Liu S, Wu J, Xia L, Shen H, et al. Elevated serum IL-35 levels in rheumatoid arthritis are associated with disease activity. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2019;67(3):707-10.
9. Chen Y, Wang CJ, Lin SH, Zhang M, Li SY, Xu F. Interleukin-35 is upregulated in response to influenza virus infection and secondary bacterial pneumonia. *Cytokine*. 2016;81:23-7.
10. Hu Y, Dong C, Yue Y, Xiong S. In vivo delivery of interleukin-35 relieves coxsackievirus-B3-induced viral myocarditis by inhibiting Th17 cells. *Archives of virology*. 2014;159(9):2411-9.
11. Turnis ME, Sawant DV, Szymczak-Workman AL, Andrews LP, Delgoffe GM, Yano H, et al. Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. *Immunity*. 2016;44(2):316-29.
12. Teymouri M, Pirro M, Fallarino F, Gargaro M, Sahebkar A. IL-35, a hallmark of immune-regulation in cancer progression, chronic infections and inflammatory diseases. *International journal of cancer*. 2018;143(9):2105-15.
13. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology*. 2010;11(12):1093-101.
14. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature medicine*. 2014;20(6):633-41.

15. Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(10):6121-8.
16. Wang Y, Mao Y, Zhang J, Shi G, Cheng L, Lin Y, et al. IL-35 recombinant protein reverses inflammatory bowel disease and psoriasis through regulation of inflammatory cytokines and immune cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2018;22(2):1014-25.
17. Han M, Li Y, Liu S, Jiang S, Yuan L, Xia L, et al. Elevation of Serum IL-35 in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2018;38(10):452-6.
18. Su Y, Feng S, Luo L, Liu R, Yi Q. Association between IL-35 and coronary arterial lesions in children with Kawasaki disease. *Clinical and experimental medicine*. 2019;19(1):87-92.
19. Zhang J, Lin Y, Li C, Zhang X, Cheng L, Dai L, et al. IL-35 Decelerates the Inflammatory Process by Regulating Inflammatory Cytokine Secretion and M1/M2 Macrophage Ratio in Psoriasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2016;197(6):2131-44.
20. Chen J, Du J, Han Y, Wei Z. Correlation analysis between IL-35, IL-36γ, CCL27 and psoriasis vulgaris. *The Journal of dermatological treatment*. 2019;1-4.
21. Li T, Gu M, Liu P, Liu Y, Guo J, Zhang W, et al. Clinical Significance of Decreased Interleukin-35 Expression in Patients with Psoriasis. *Microbiology and immunology*. 2018.
22. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(5):496-509.
23. Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, et al. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124(1):103-6.
24. Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlström J, Enerbäck C, Enlund F, et al. Age at onset and different types of psoriasis. *The British journal of dermatology*. 1995;133(5):768-73.
25. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13(3):450-6.
26. Kim WB, Jerome D, Yeung J. Diagnosis and management of psoriasis. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2017;63(4):278-85.
27. Liu JT, Yeh HM, Liu SY, Chen KT. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World journal of orthopedics*. 2014;5(4):537-43.
28. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64 Suppl 2(Suppl 2):ii18-23; discussion ii4-5.
29. Myers W, Opeola M, Gottlieb AB. Common clinical features and disease mechanisms of psoriasis and psoriatic arthritis. *Current rheumatology reports*. 2004;6(4):306-13.
30. Crow JM. Psoriasis uncovered. *Nature*. 2012;492(7429):S50-1.
31. Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebwohl MG, Gladman DD, Wu JJ, et al. Psoriasis. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16082.
32. Ogdie A, Weiss P. The Epidemiology of Psoriatic Arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2015;41(4):545-68.
33. Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. Psoriatic Arthritis. *The New England journal of medicine*. 2017;376(10):957-70.
34. Schadler ED, Ortel B, Mehlis SL. Biologics for the primary care physician: Review and treatment of psoriasis. *Disease-a-month : DM*. 2019;65(3):51-90.

35. Papoutsaki M, Costanzo A. Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2013;27 Suppl 1:3-12.
36. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ (Clinical research ed)*. 2000;321(7258):424.
37. Murphy KM, Ouyang W, Szabo SJ, Jacobson NG, Guler ML, Gorham JD, et al. T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent and Stat4-independent phases. *Current topics in microbiology and immunology*. 1999;238:13-26.
38. Karczewski J, Dobrowolska A, Rychlewska-Hańczewska A, Adamski Z. New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity*. 2016;49(7):435-50.
39. Diani M, Altomare G, Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2015;14(4):286-92.
40. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, Toh ZQ, Marimla R, Balloch A, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and immunology*. 2017;61(2):49-56.
41. Cai Y, Fleming C, Yan J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(4):302-9.
42. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology*. 1993;11:571-611.
43. Mehta NN, Teague HL, Swindell WR, Baumer Y, Ward NL, Xing X, et al. IFN- γ and TNF- α synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis. *Scientific reports*. 2017;7(1):13831.
44. Harden JL, Johnson-Huang LM, Chamian MF, Lee E, Pearce T, Leonardi CL, et al. Humanized anti-IFN- γ (HuZAF) in the treatment of psoriasis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(2):553-6.
45. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311-21.
46. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(5):1373-83.
47. Naik GS, Ming WK, Magodoro IM, Akinwunmi B, Dar S, Poulsen HE, et al. Th17 Inhibitors in Active Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2017;233(5):366-77.
48. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;9(5):503-10.
49. Dunphy SE, Sweeney CM, Kelly G, Tobin AM, Kirby B, Gardiner CM. Natural killer cells from psoriasis vulgaris patients have reduced levels of cytotoxicity associated degranulation and cytokine production. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2017;177:43-9.
50. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annual review of immunology*. 2007;25:297-336.
51. Alshobaili HA, Shahzad M, Al-Marshood A, Khalil A, Settin A, Barrimah I. Genetic background of psoriasis. *International journal of health sciences*. 2010;4(1):23-9.
52. Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik KO, Pedersen OB, Thomsen SF. Heritability of psoriasis in a large twin sample. *The British journal of dermatology*. 2013;169(2):412-6.
53. Gervin K, Vigeland MD, Mattingsdal M, Hammerø M, Nygård H, Olsen AO, et al. DNA methylation and gene expression changes in monozygotic twins discordant for psoriasis: identification of epigenetically dysregulated genes. *PLoS genetics*. 2012;8(1):e1002454.

54. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes and immunity*. 2007;8(1):1-12.
55. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. HLA-CW*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *The Journal of investigative dermatology*. 1997;109(2):183-6.
56. Hirata J, Hirota T, Ozeki T, Kanai M, Sudo T, Tanaka T, et al. Variants at HLA-A, HLA-C, and HLA-DQB1 Confer Risk of Psoriasis Vulgaris in Japanese. *The Journal of investigative dermatology*. 2018;138(3):542-8.
57. Capon F, Bijlmakers MJ, Wolf N, Quaranta M, Huffmeier U, Allen M, et al. Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene. *Human molecular genetics*. 2008;17(13):1938-45.
58. Plant D, Young HS, Watson RE, Worthington J, Griffiths CE. The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis. *Experimental dermatology*. 2006;15(11):900-3.
59. Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B, et al. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *Journal of medical genetics*. 2001;38(1):7-13.
60. Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, Novelli G. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *American journal of human genetics*. 1999;65(6):1798-800.
61. Hüffmeier U, Uebe S, Ekici AB, Bowes J, Giardina E, Korendowych E, et al. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nature genetics*. 2010;42(11):996-9.
62. Stuart PE, Nair RP, Tsoi LC, Tejasvi T, Das S, Kang HM, et al. Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture. *American journal of human genetics*. 2015;97(6):816-36.
63. Ayala-Fontáñez N, Soler DC, McCormick TS. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis (Auckland, NZ)*. 2016;6:7-32.
64. Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pità O, Girolomoni G, Cavani A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2006;36(1):118-28.
65. Hsieh J, Kadavath S, Efthimiou P. Can traumatic injury trigger psoriatic arthritis? A review of the literature. *Clinical rheumatology*. 2014;33(5):601-8.
66. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1304:53-61.
67. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2017;37(2):163-76.
68. McCoy JP, Jr. Basic principles of flow cytometry. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2002;16(2):229-43.
69. Li X, Tian L, Dong Y, Zhu Q, Wang Y, Han W, et al. IL-35 inhibits HBV antigen-specific IFN- γ -producing CTLs in vitro. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2015;129(5):395-404.
70. Yu J, Becknell B, Trotta R, Liu S, Wei M, Bhatt D, et al. Human natural killer cell IFN-gamma production: Inhibition by TGF-beta involves SMAD-mediated downregulation of T-BET expression. 2005;65(9 Supplement):570-.
71. Li T, Gu M, Liu P, Liu Y, Guo J, Zhang W, et al. Clinical significance of weak interleukin-35 expression in patients with psoriasis. 2018;62(7):454-61.
72. Sawant DV, Hamilton K, Vignali DA. Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2015;35(7):499-512.