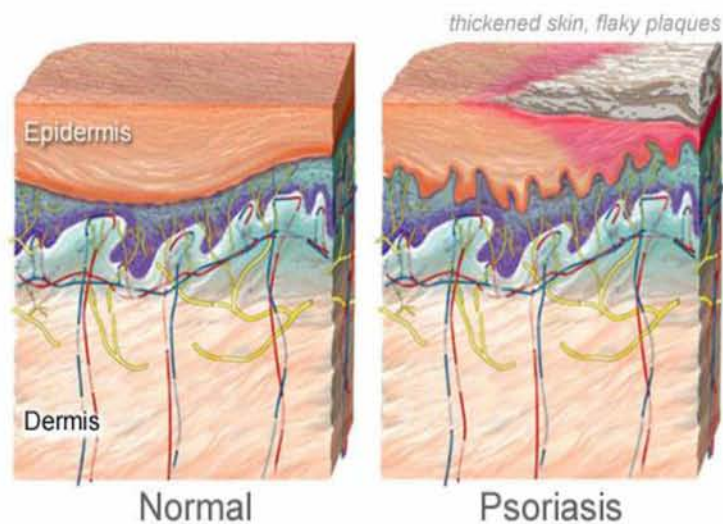




ΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΣΕ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗ



Κουκούλης Χρήστος

Λάρισα 2015

**Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης του γονιδίου
της κυκλοφιλίνης με ανταπόκριση των ασθενών με
ψωρίαση σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη**

Pharmacogenetic study of cyclophilin gene in psoriasis
patients treated with cyclosporine

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Θεολογία Σαραφίδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
(επιβλέπουσα)

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αγγελική Ρουσσάκη-Σούλτσε, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τομέας
Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τον χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ευχαριστώ ιδιαίτερω τον κ. Δρ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών για την άμογη συνεργασία. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ Ρουσάκη-Σούλτσε Αγγελική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τους υποψήφιους διδάκτορες Κωνσταντίνα Σαρρή και Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την υπομονή τους και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Περιεχόμενα	
Περίληψη.....	6
Summary	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Ψωρίαση.....	8
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	8
1.1.2 Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία.....	8
1.1.3 Συνοδά νοσήματα που σχετίζονται με την ψωρίαση.....	10
1.1.4 Παθογένεια.....	10
1.1.5 Ανοσοπαθολογία της ψωρίασης.....	12
1.1.6 Θεραπεία.....	17
1.2 Κυκλοσπορίνη.....	19
1.2.1 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της κυκλοσπορίνης.....	20
1.2.2 Μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης.....	20
1.3. Φαρμακογενετική.....	22
1.4. Κυκλοφιλίνη A (PPIA).....	24
1.5. Σκοπός.....	26
2. Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα.....	27
2.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	27
2.2.2 Υλικά.....	27
2.2.3 Πειραματική διαδικασία.....	28
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	28
2.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	28
2.3.2 Επιλογή εκκινητών για PCR.....	29
2.3.3 Υλικά.....	30
2.3.4 Πειραματική διαδικασία.....	30
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
2.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	31
2.4.2 Υλικά.....	32
2.4.3 Πειραματική διαδικασία.....	32
2.4.3.1 Παρασκευή πηκτώματος 1,3% w/v αγαρόζης.....	32
2.4.3.2 Πορεία ηλεκτροφόρησης.....	33
2.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism).....	33
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v.....	34

3. Αποτελέσματα.....	35
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	35
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών	36
3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου PPIA με PCR.....	36
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP	37
3.5 Στατιστική ανάλυση	39
4. Συζήτηση	40
Βιβλιογραφία	42

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που αφορά περίπου το 2% του πληθυσμού. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει υπερπολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιδερμίδας. Μελέτη των ψωριασικών αλλοιώσεων έχει καταδείξει την παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτές, γεγονός που δείχνει την συμμετοχή του ανοσοποιητικού στην εμφάνιση αλλά και την διατήρηση της νόσου. Για τον λόγο αυτό τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη, ή συνδυασμός και των δυο φαρμάκων, αποτελεί την πιο συχνή μορφή θεραπείας. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν ετερογένεια στην απόκριση στην θεραπεία κυρίως λόγω γενετικών παραγόντων. Ο ρόλος της φαρμακογενετικής είναι η μελέτη των γενετικών παραγόντων για το σχεδιασμό της καταλληλότερης θεραπείας για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά.

Σκοπός της εργασίας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs8177826 του γονιδίου *PPIA*, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία της κυκλοσπορίνης.

Το γονίδιο *PPIA* εκφράζει την πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη Α η οποία συνδέεται με την κυκλοσπορίνη και καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων του ανοσοποιητικού και ουσιαστικά καταστέλλουν την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκαν 56 ασθενείς με ψωρίαση, από την Ελλάδα. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση βάσει του δείκτη PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η απόκριση στην θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του PASI. Η γονοτύπηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών με την μέθοδο PCR-RFLP. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs8177826 του γονιδίου *PPIA* με την εμφάνιση της ψωρίασης.

Summary

Psoriasis is a multifactorial disease affecting approximately 2% of the population. The clinical picture is the extensive proliferation of epidermic cells. Study of psoriatic lesions has demonstrated the presence of immune cells, indicating the involvement of immune system in the appearance and maintenance of the disease. This is why the use of immunosuppressive drugs, cyclosporine or methotrexate, or a combination of them, is considered to be first-line systemic therapies in the treatment of psoriasis. Patients may have heterogeneity in the response in the treatment mostly due to genetic factors. The role of pharmacogenomics is the study of the genetic factors for the development of more suitable treatments for each patient separately.

The purpose of this study is to test the association of *PPIA* gene rs8177826 polymorphism with the clinical response of patients with psoriasis in cyclosporine treatment.

PPIA gene encodes the protein cyclophilin A which binds cyclosporine and downregulates the expression of immune system genes and leading to the inactivation of T cells.

In this study 56 patients with psoriasis from Greece were included. Patients have been diagnosed with psoriasis based on the disease activity score PASI, upon the initiation of treatment. Response to treatment was evaluated according to the clinical protocols and the change in PASI. The genotyping of the patients has been performed using the PCR-RFLP method in DNA isolated from peripheral blood cells. Analysis of results showed no statistically significant association for the polymorphism rs8177826 of the *PPIA* gene and the response to treatment of psoriasis.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

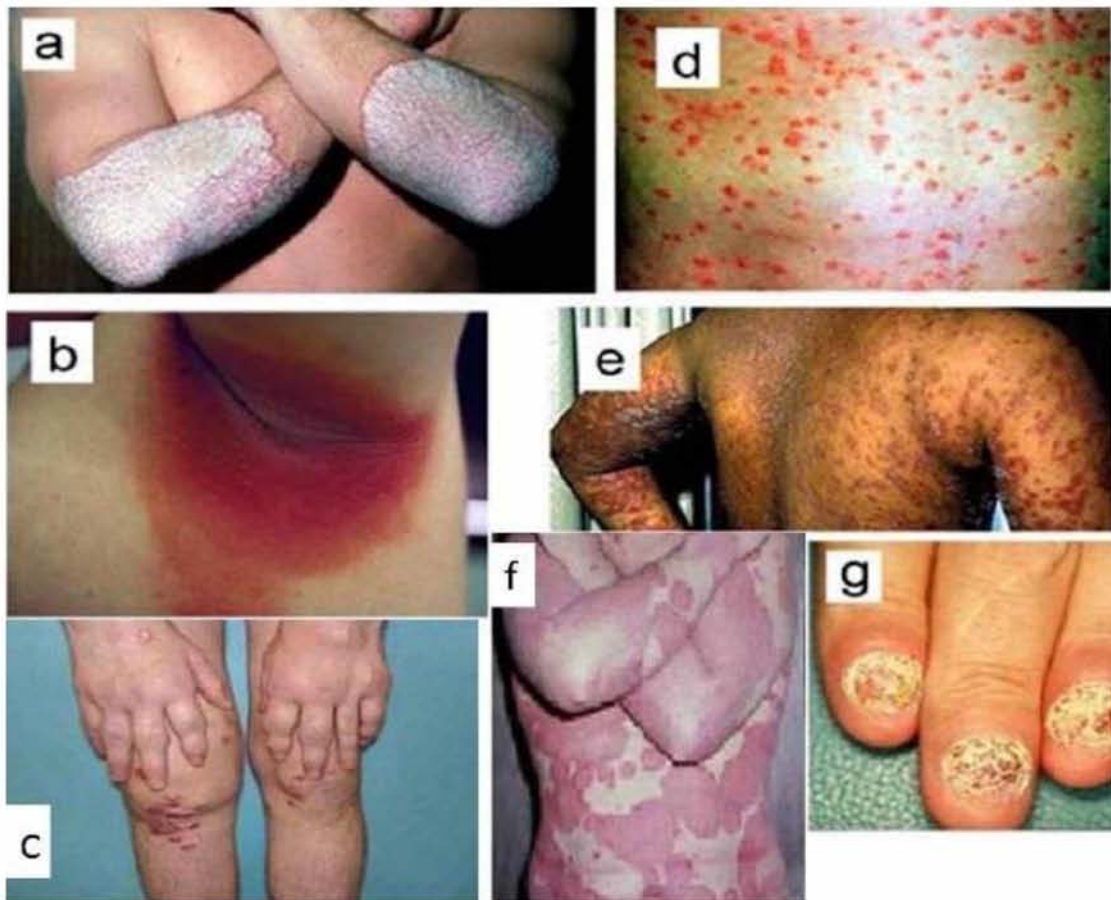
Η ψωρίαση είναι μια συχνή, χρόνια, φλεγμονώδης, πολυσυστημική νόσος που εκδηλώνεται κατά κύριο λόγο στο δέρμα και σε μικρότερη συχνότητα και στις αρθρώσεις (ψωριασική αρθρίτιδα). Η νόσος αφορά περίπου το 2% του πληθυσμού. Η κύρια εκδήλωση της ψωρίασης είναι η χρόνια φλεγμονή του δέρματος (Emoke R. and Errol P. P., 2009). Χαρακτηρίζεται φαινοτυπικά από παραμορφωτικές, απολεπισμένες, και ερυθριματώδεις πλάκες που μπορεί να είναι επώδυνες ή συχνά σοβαρά κνησμώδεις και μπορεί να προκαλέσει σημαντικά ζητήματα για την ποιότητα ζωής (Menter A. et al., 2008). Ιστολογικά, οι πλάκες προσδιορίζονται από επιδερμική υπερπλασία, επιδερμική και δερματική διείσδυση από λευκοκύτταρα και αλλαγές στα δερματικά μικροαγγεία. Στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα παρατηρούνται διαταραχές στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίησή τους. Οι διαταραχές αυτές συνοδεύονται από αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Emoke R. and Errol P. P., 2009). Η ψωρίαση είναι μια χρόνια νόσος που έχει εναλλαγές έξαρσης και εξασθένησης κατά τη διάρκεια ζωής του ασθενούς, συχνά τροποποιείται με την έναρξη της θεραπείας και την παύση αυτής και έχει λίγες αυθόρμητες υφέσεις (Menter A. et al., 2008). Το επίπεδο σοβαρότητας μπορεί να εξαρτάται από την ηλικία του ασθενούς και την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και ανοσολογικών παραγόντων. Η επικοινωνία μεταξύ των κερατινοκυττάρων και των λευκοκυττάρων μέσω των προφλεγμονωδών κυτταροκινών δημιουργεί έναν φαύλο κύκλο χρόνιας φλεγμονής. Αυτό υποδηλώνει ότι η βέλτιστη θεραπεία για την ψωρίαση πρέπει να στοχεύσει παθογόνους οδούς σε αμφότερα λευκοκύτταρα και κερατινοκύτταρα (Emoke R. and Errol P. P., 2009).

1.1.2 Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία

Η κατηγοριοποίηση της ψωρίασης βασίζεται σε διαφορές στην φαινοτυπική μορφολογία του δέρματος.

Οι κύριες κατηγορίες ψωρίασης είναι:

1. πλακώδης ψωρίαση [Εικόνα 1a]
2. ανάστροφη ψωρίαση [Εικόνα 1b]
3. ψωριασική αρθρίτιδα [Εικόνα 1c]
4. σταγονοειδής ψωρίαση [Εικόνα 1d]
5. φλυκταινώδης ψωρίαση [Εικόνα 1e]
6. ερυθροδερμική ψωρίαση [Εικόνα 1f]
7. ψωριασική ονυχοδυστροφία [Εικόνα 1g]



Εικόνα 1: Οι διάφοροι τύποι ψωρίασης (Roberson & Bowcock, 2010, Menter A. et al., 2008, Green et al., 1996).

Εξαιτίας της ύπαρξης διαφορετικών τύπων της ασθένειας, οι οποίοι έχουν διαφορετική βαρύτητα, είναι αναγκαία η ύπαρξη βιοδεικτών. Οι παράμετροι που συχνότερα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι ο BSA (Body Surface Area), το PGA (Physicians Global Assessment) και ο PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Ο βιοδείκτης PASI εκτός από την έκταση, αξιολογεί το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών και μπορεί να έχει τιμές από 1 ως 72. PASI 75 και PASI 90 σημαίνει μια 75% ή 90% αντίστοιχα βελτίωση του αρχικού PASI σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ο PASI έχει επικρατήσει, ως μέθοδος αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου, σε κλινικές μελέτες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα φαρμάκων (Κοσμαδάκη και συν., 2007).

1.1.3 Συνοδά νοσήματα που σχετίζονται με την ψωρίαση

Παρά το γεγονός ότι η ψωρίαση παλαιότερα θεωρούνταν να είναι μια ασθένεια που αποκλειστικά επηρεάζει κυρίως το δέρμα και τις αρθρώσεις η κατανόηση των συνοδών νοσημάτων που σχετίζονται με την ασθένεια αυτή έχει βελτιωθεί σημαντικά. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ακόμη και αυξημένο συνολικό κίνδυνο θνησιμότητας σε ασθενείς με σοβαρή ψωρίαση (Menter A. et al., 2008).

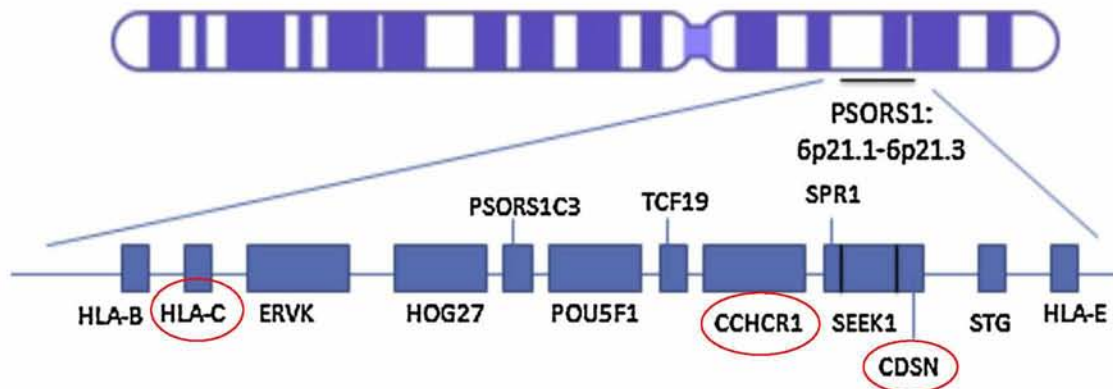
Τα συνοδά νοσήματα που σχετίζονται με την ψωρίαση είναι:

- Αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. νόσος του Crohn)
- Καρδιαγγειακή νόσος
- Μεταβολικά σύνδρομα (πχ παχυσαρκία)
- Λέμφωμα, μελάνωμα, και μη μελανωματικός καρκίνος του δέρματος

1.1.4 Παθογένεια

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια (Menter A. et al., 2008). Πληθυσμιακές μελέτες δείχνουν σαφώς ότι η συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης είναι μεγαλύτερη μεταξύ των συγγενών πρώτου βαθμού και δεύτερου βαθμού των ασθενών, από ότι στο γενικό πληθυσμό. Η γενετική βάση της νόσου ενισχύεται από μελέτες διδύμων που φανερώνουν δύο έως τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο για ψωρίαση μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, σε σχέση με τους διζυγωτικούς δίδυμους (Nestle F.O. et al., 2009).

Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 36 χρωμοσωμικοί τόποι έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση. Πιθανότατα αυτοί οι τόποι ευθύνονται για το 35 έως 50% της κληρονομικότητας της νόσου (Nestle F.O. et al., 2009). Ο γενετικός τόπος *PSORS1* που βρίσκεται στην χρωμοσωματική περιοχή 6p21.3, και εδράζεται στην περιοχή του MHC (Major Histocompatibility Complex), θεωρείται ο σημαντικότερος και οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται στην ταυτοποίηση του γονιδίου (ή των γονιδίων) που σχετίζονται με την ψωρίαση στην περιοχή αυτή (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Γονιδιακός χάρτης στην περιοχή του τόπου *PSORS1* στην περιοχή MHC και τα υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με την ψωρίαση (M. Ammar et al., 2014).

Το MHC είναι ένα μεγάλο σύμπλεγμα γονιδίων, τα οποία διακρίνονται βάσει των διαφορών στη δομή και στη λειτουργία τους, σε τρεις τάξεις (I, II και III). Δύο από αυτές τις τάξεις, η τάξη I και η τάξη II, αντιστοιχούν στα γονίδια των λευκοκυτταρικών αντιγόνων του ανθρώπου (Human Leukocyte Antigen, HLA). Συγκεκριμένα αλληλόμορφα του HLA έχουν δείξει ισχυρή συσχέτιση με ορισμένα νοσήματα. Από μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ψωρίασης και του αλληλομόρφου HLA-Cw6. Το HLA-Cw6 έχει συσχετιστεί με την πρόωμη έναρξη της χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας και με τη σταγονοειδή ψωρίαση. Αυτή η παραλλαγή έχει προσδιοριστεί ως η κύρια υπεύθυνη για την ψωρίαση στο γενετικό τόπο *PSORS1*. Ένα άλλο γονίδιο που συσχετίζεται με την ψωρίαση σε αυτήν την περιοχή του MHC είναι, το γονίδιο *CCHCR1* το οποίο κωδικοποιεί την Coiled-Coil α -Helical Rod Protein 1 (Rajan et al., 2000). Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα, και ίσως είναι ένας ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Επιπλέον με την ψωρίαση έχει συσχετιστεί και το γονίδιο *CDSN*, το οποίο κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη (CDSN). Η CDSN είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και φαίνεται πως συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα (Rajan et al., 2000).

Εκτός από τον *PSORS1* υπάρχουν και άλλοι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση, σε μελέτες διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων, όπως ο *PSORS2*, στην χρωμοσωματική περιοχή 17q25, όπου εντοπίζονται τα γονίδια *SLC9A3R1* και *NAT9*, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στους μηχανισμούς εκδήλωσης της ψωριασικής προδιάθεσης. Ακόμη ο *PSORS3* στην χρωμοσωματική περιοχή 4q35, ο *PSORS4* στην 1q, ο *PSORS5* στην 3q και ο *PSORS7* στην 1p. Αρκετοί από τους γενετικούς τόπους που συσχετίζονται με την ψωρίαση συμπίπτουν με περιοχές του γονιδιώματος που έχουν συσχετιστεί με άλλες ασθένειες, όπως ο

γενετικός τόπος στην χρωμοσωματική περιοχή 16q που χαρτογραφείται κοντά στον γενετικό τόπο που σχετίζεται με τη νόσο Crohn. Αρκετά άτομα που έπασχαν μάλιστα από τη νόσο Crohn είχαν εμφανίσει ψωρίαση (Bhalerao & Bowcock 1998, Rajan et al. 2000).

Επιπλέον, ένας αριθμός από περιβαλλοντικούς παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης:

Η κατάχρηση αλκοόλ συμβάλει στην αύξηση της έκφρασης προφλεγμονωδών παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωρίασης (TNFα) (Treloar V., 2010).

Το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα ποσοστά βελτίωσης της νόσου. Για καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ο λόγος πιθανοτήτων για την ψωρίαση ήταν 1,49 για τους άνδρες και 1,48 για τις γυναίκες. Κάπνισμα πάνω από 20 τσιγάρων ημερησίως σε σύγκριση με 10 ή λιγότερα τσιγάρα συσχετίστηκε με διπλάσια αυξημένο κίνδυνο σοβαρής ψωρίασης (Treloar V., 2010).

Το 1876 πρώτος ο Koebner παρατήρησε την εμφάνιση ψωριασικών αλλοιώσεων στις θέσεις τραυματισμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνισή τους είναι η λύση τόσο της επιδερμίδας όσο και του χορίου, που οδηγεί στην αύξηση της σύνθεσης και της απελευθέρωσης κυτταροκινών και στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Powles et al. 1990).

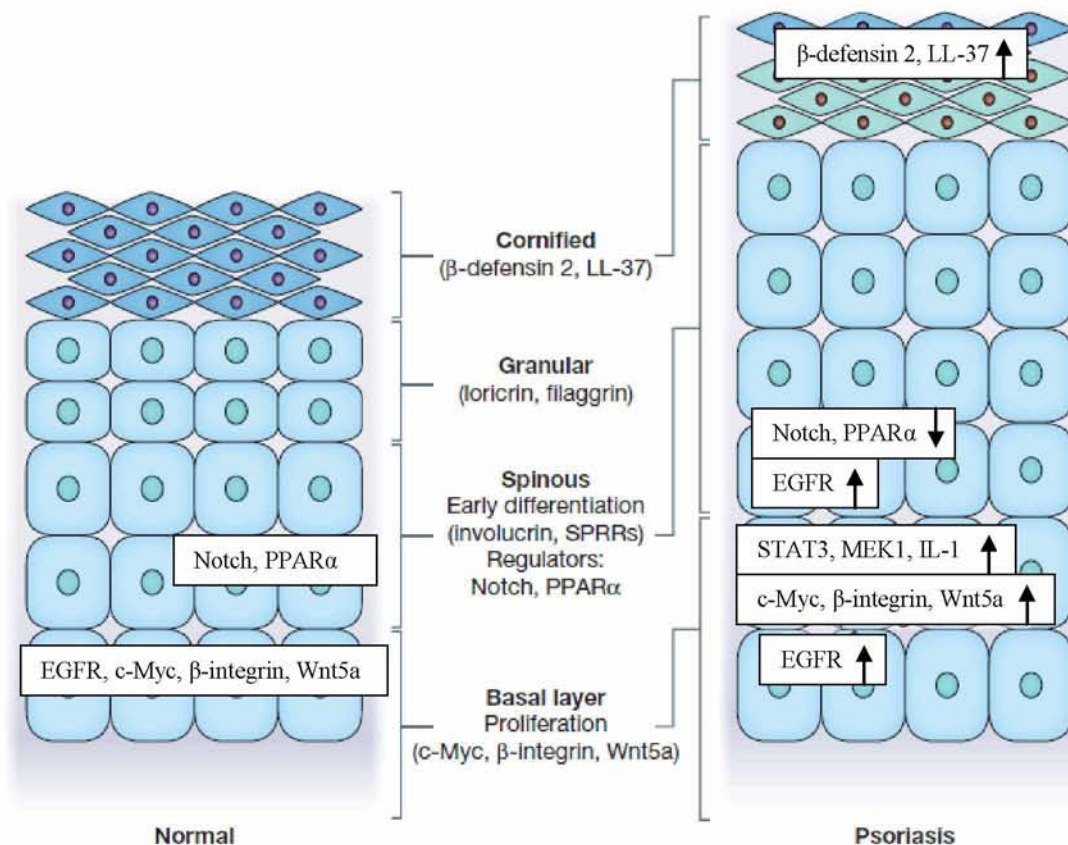
Τέλος το άγχος, η παχυσαρκία, ορισμένα φάρμακα και μολυσματικές ασθένειες μπορούν επίσης να θεωρηθούν παράγοντες επιδείνωσης της ψωρίασης (Higgins, 2000).

1.1.5 Ανοσοπαθοφυσιολογία της ψωρίασης

Το δέρμα αποτελείται από 3 στοιβάδες: την εξωτερική στοιβάδα ή επιδερμίδα, την ενδιάμεση στοιβάδα ή χόριο και την εσωτερική στοιβάδα ή υποδερμίδα. Η επιδερμίδα είναι ένα διαστρωματικό πλακώδες επιθήλιο που αποτελείται από κερατινοκύτταρα, τα οποία υποβάλλονται σε αυστηρές ρυθμίσεις προγραμματισμού και διαφοροποίησης ώστε να σχηματίσουν ένα μηχανικό, διαπερατό και αντιμικροβιακό εμπόδιο στο εξωτερικό περιβάλλον. Η σημασία ενός αέριου δερματικού φραγμού υποστηρίζεται από στοιχεία που δείχνουν ότι γενετική ανεπάρκεια της λειτουργίας φραγμού του δέρματος σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο φλεγμονώδους νόσου του δέρματος. Η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης στα κύτταρα της επιδερμίδας διαταράσσεται στην ψωρίαση (Fuchs E. and Horsley V., 2008).

Τα κερατινοκύτταρα έχουν ένα ενεργοποιημένο φαινότυπο στην ψωρίαση που είναι παρόμοιος με την κατάσταση τους κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος

(Εικόνα 3). Τα κερατινοκύτταρα παράγουν μεσολαβητές που ενεργοποιούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και των ενδοθηλιακών κυττάρων στο χόριο. Ωστόσο, κυτταροκίνες που προέρχονται από λευκοκύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κερατινοκύτταρα (Emoke R. and Errol P. P., 2009).



Εικόνα 3: Επιδερμικές αλλαγές στην ψωρίαση. Στην ψωρίαση (δεξιά) οι οδοί σηματοδότησης που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, όπως η σηματοδότηση μέσω του Notch και PPAK-α, καταστέλλονται, ενώ επάγονται οι οδοί σηματοδότησης και τα γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, όπως το Myc, η β-ιντεγκρίνη και το Wnt5a. Τα μονοπάτια σηματοδότησης STAT3, MEK1 και IL-1 είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση της επιδερμίδας, προκαλώντας αυξημένη έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως β-αμυντίνης 2 και LL-37 (Emoke R. and Errol P. P., 2009).

Το ανοσοποιητικό σύστημα εμπλέκεται έντονα στην παθογένεση της ψωρίασης, επάγοντας τόσο την επίκτητη ανοσία μέσω T-κυττάρων όσο και την έμφυτη ανοσία, που περιλαμβάνει αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cell ή APCs), ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα και κερατινοκύτταρα. Σε αλλοιώσεις ψωρίασης, ο αριθμός των T-κυττάρων και CD11c⁺ DCs (dendritic cells) είναι σημαντικά αυξημένος. Τα T-κύτταρα, ειδικά τα CD8⁺ T κύτταρα, μεταναστεύουν σε όλα τα στρώματα της επιδερμίδας. Τα CD11c⁺ DCs διεισδύουν επίσης στην επιδερμίδα, αλλά παραμένουν περιορισμένα στα χαμηλότερα στρώματα των κυττάρων (Bos J. et al., 1983). Τα ουδετερόφιλα (Dendritic cells, DC) συσσωρεύονται σε μικρά συσσωματώματα που ονομάζονται αποστήματα Munro

κάτω από τα στρώματα του κερατοειδούς χιτώνα. Ως συνέπεια της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων, τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-23, IL-22 και IL-17 είναι υψηλά σε ψωριασικές αλλοιώσεις (Nickoloff B.J., 1999)

Σε ανθρώπινο δέρμα χωρίς φλεγμονή, υπάρχουν τρεις βασικοί πληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων (DCs):

- επιδερμικά κύτταρα Langerhans,
- (ώριμα) μυελοειδή δερματικά (CD11c⁺) DCs, και σποραδικά,
- δερματικά πλασματοκυτταροειδή DCs (τα pDCs).

Μολονότι τα pDCs έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνο, χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες της τύπου I IFN (type I interferon) κατά τη διάρκεια της ιικής μόλυνσης, καθώς και στις αυτοάνοσες νόσους. Ένα από τα πρώτα συμβάντα οδήγησης της φλεγμονώδους έκρηξη στην ψωρίαση είναι η έκκριση της IFN- α , μιας τύπου I IFN από τα pDCs (Εικόνα 4) (Nestle F.O. et al., 2005). Τα μυελώδη δερματικά DCs στην ψωρίαση εμφανίζονται σε μια μορφή (CD11c⁺ BDCA-1⁻) που μοιάζει φαινοτυπικά με τα ανώριμα DCs, που υπάρχουν σε φυσιολογικό δέρμα, και παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι πληθυσμοί τους αυξάνονται δραματικά (περίπου ίσος αριθμός με αυτόν των T κυττάρων). Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται και 'φλεγμονώδη' DCs. (Zaba, Krueger and Lowes, 2009) Επιπλέον, αυτά τα 'φλεγμονώδη' DCs παράγουν IL-20, μια κυτταροκίνη που επάγει τον φαινότυπο της επιδερμικής αναγέννησης που παρατηρείται στην ψωρίαση, και IL-23, η οποία είναι σημαντική για την επαγωγή της IL-17 και IL-22 σε T-κύτταρα. Τα μυελοειδή δερματικά DCs επάγουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και επάγουν την μετατροπή των T κυττάρων σε τύπου 1 T βοηθητικά κύτταρα (Th1) και τύπου 17 βοηθητικά κύτταρα T (Th17) (Zaba L.C. et al., 2009). Σε φυσιολογικό δέρμα ένας σημαντικός αριθμός των T κυττάρων βρίσκονται στο χόριο $\sim 2 \times 10^6$ κύτταρα/cm², το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει περίπου διπλάσιος αριθμός T κυττάρων στο δέρμα από ό, τι στην κυκλοφορία, αλλά δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου T κύτταρα στην επιδερμίδα. Στις ψωριασικές δερματικές αλλοιώσεις, και τα CD4⁺ και CD8⁺ υποσύνολα των T κυττάρων είναι παρόντα, με τα CD8⁺ κύτταρα να επικρατούν στην επιδερμίδα (Clark et al., 2006, Albanesi et al., 2007).

Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IFN- γ , IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α , IL-4 ή IL-13, ανάλογα με το φαινότυπό τους. Τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα στην ψωρίαση παράγουν κοκκία με κυτταροτοξικά συστατικά Tia-1 (TIA1), granzyme B (GZMB) και περιφορίνη (PRF1), αν και η παθογόνος δράση τους ως επί το πλείστον σχετίζεται με την έκκριση κυτταροκινών. Ακόμη, τα ρυθμιστικά T κύτταρα είναι ανεπαρκή στην ψωρίαση, με αποτέλεσμα να μην είναι ικανά να καταστείλουν την φλεγμονώδη διαδικασία.

Τα διηθούμενα μακροφάγα σε ψωριασικές πλάκες συσσωρεύονται κατά μήκος της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας.

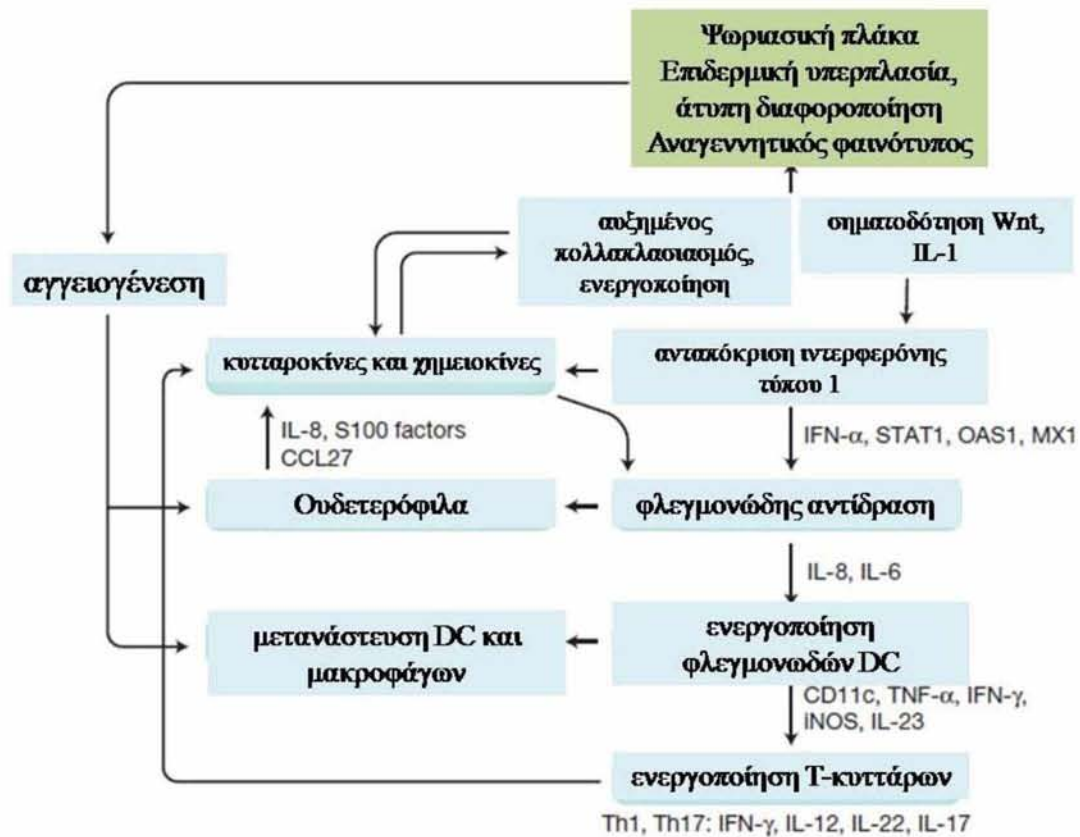
Τα λευκοκύτταρα στρατολογούνται στο δέρμα με μετανάστευση μέσω ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, λευκοκύτταρα του δέρματος μπορεί επίσης να επεκταθούν και να δημιουργηθούν έτσι τα πυκνά διηθήματα που παρατηρούνται σε ψωριασικές βλάβες. Υπό την επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που παράγουν τα Τ-κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα από διαμεσολαβητές ενισχύοντας έτσι τη φλεγμονώδη απόκριση (Lowes et al., 2007).

Διάφορες **χημειοκίνες** έχουν βασικό ρόλο στην προσέλκυση των κυττάρων της φλεγμονής. Τέτοιες χημειοκίνες και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους συνδέονται με τον ψωριασικό φαινότυπο και θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την στρατολόγηση λευκοκυττάρων. Η χημειοκίνη CCL27 παράγεται αποκλειστικά από επιδερμικά κερατινοκύτταρα, και δεσμεύεται στον υποδοχέα CCR10. Περισσότερο από το 90% των δερματικών διηθητικών λεμφοκυττάρων στην ψωρίαση και στην ατοπική δερματίτιδα εκφράζουν τον CCR10, υποδηλώνοντας έναν κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του CCR10 με την CCL27 κατά την παθογένεση της φλεγμονής που προκαλείται από τα Τ-κύτταρα. Χημειοκίνες που διαφοροποιούν την ψωρίαση από την ατοπική δερματίτιδα είναι οι CCL4, CCL20, CXCL2 και CXCL8 / IL-8. Τα ουδετερόφιλα που είναι άλλο ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό της ψωρίασης αποτελούν σημαντική πηγή IL-8, CXCL10 και των πρωτεϊνών S100, S100A8 και S100A9 (Homey and Meller, 2008).

Κυτταροκίνες που προέρχονται από λευκοκύτταρα και μπορούν να προκαλέσουν τις επιδερμικές αλλαγές που παρατηρούνται σε ψωριασικές πλάκες είναι οι IL-21, IL-22 και IFN-g. Η κυτταροκίνη IL-22 που παράγεται από Th17 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Ως εκ τούτου, είναι μια βασική κυτταροκίνη τελεστής στην παθογένεση της ψωρίασης. Αυξημένα επίπεδα της IL-22 βρίσκονται στο αίμα των ασθενών με ψωρίαση. Επιπλέον, η IL-22 αναστέλλει την τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, προκαλεί αύξηση του STAT3, και προκαλεί όμοιες με ψωρίαση μορφολογικές αλλαγές σε ανθρώπινα μοντέλα δέρματος. Η έκκριση της IL-22 επάγεται από την IL-23, η οποία έχει αναδειχτεί πρόσφατα ως βασική κυτταροκίνη στην παθογένεση της ψωρίασης. Η IL-23 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σε βλάβες της ψωρίασης στα δενδριτικά και τα κερατινοκύτταρα και διεγείρει τα κύτταρα Th17 να παράγουν κυτταροκίνες Th17. Η σημασία αυτής της ανοσολογικής οδού υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα IL23 και την υπομονάδα IL-12 / IL-23p40 (κοινή υπομονάδα των 12 και 23) συσχετίζονται με ευαισθησία σε ψωρίαση. (Wolk et al. 2006, Blauvelt A., 2008).

Πρόσφατα, αρκετές νέες γενετικές περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί που επιβεβαιώνουν την συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεση της ψωρίασης:

- Το γονίδιο IL 23 A (Interleukin 23 subunit alpha) , το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα p19 της IL-23,
- Τα γονίδια TNFAIP3(tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3) και TNIP1 (TNFAIP3-interacting protein 1), που είναι ρυθμιστές της σηματοδότησης μέσω TNF-α
- Τα γονίδια IL-4 και IL13 - γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμβάλουν στην ανάπτυξη των κυττάρων Th2 (Chang et al. 2008, Nair et al. 2009),



Εικόνα 4: Κύκλος της χρόνιας ψωριασικής φλεγμονής του δέρματος. Η ενεργοποιημένη επιδερμίδα παράγει χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες. Στο χόριο, πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs) παράγουν IFN-α, η οποία πυροδοτεί μια προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση. Φλεγμονώδη μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούν τα T κύτταρα να παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-22 και IFN-g, η οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν τον αναγεννητικό φαινότυπο των επιδερμικών κερατινοκυττάρων. Τα ουδετερόφιλα προσελκύνονται στην επιδερμίδα από χημειοκίνες που προέρχονται από κερατινοκύτταρα και είναι και τα ίδια μια πηγή χημειοελκτικών μορίων (προσαρμοσμένο από Emoke R. and Errol P. P., 2009).

Η Εικόνα 4 δείχνει σχηματικά όλα τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται σε ψωριασικό δέρμα.

Ένα από τα πρώτα γεγονότα είναι η παραγωγή της IFN-α από τα pDCs, το οποίο ενεργοποιεί τα κερατινοκύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Δερματικά DCs αποκτούν φλεγμονώδη φαινότυπο και παράγουν IL-23, TNF-α και iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυττάρων Th1 και Th17. Τα ενεργά κύτταρα Th1 και Th17 συνθέτουν IFN-γ και IL-22, αντίστοιχα, και αυτές οι κυτταροκίνες διεγείρουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κερατινοκυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στον φαύλο κύκλο της ψωριασικής φλεγμονής του δέρματος.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της ψωριασικής επιδερμίδας είναι ο μετασχηματισμός του τοπικού μικροαγγειακού συστήματος. Στον μετασχηματισμό αυτό μεγάλο ρόλο παίζει η αυξημένη έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular endothelial growth factor, VEGF). Σε αντίθεση με την μικροαγγείωση του φυσιολογικού δέρματος, η ψωριασική μικροαγγείωση χαρακτηρίζεται από ελικοειδή και διαπερατά αιμοφόρα αγγεία που διευκολύνουν τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής του δέρματος με ψωρίαση. Ο VEGF και οι αγγειοποιητίνες είναι μερικοί από τους παράγοντες που θεωρείται ότι είναι υπεύθυνοι για αυτές τις αγγειακές αλλαγές στην ψωρίαση (Nestle F.O. et al., 2009).

Ακόμη, απόδειξη ότι η ψωρίαση σχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί η θεραπευτική δράση των φαρμάκων που στοχεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα η αποτελεσματικότητα των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων όπως η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη (CsA), οι ανοσοτοξίνες (denileukin diftitox) και οι βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν στον TNF, φαίνεται από το γεγονός ότι επιδείνωση της ψωρίασης μπορεί να προκληθεί από ορισμένες θεραπείες κυτταροκινών όπως ιντερφερόνες άλφα, βήτα, και γάμα, ιντερλευκίνη (IL) 2, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και βακτηριακών υπεραντιγόνων όπως του στρεπτόκοκκου αντιγόνου (Menter A. et al., 2008).

1.1.6 Θεραπεία

Οι βιολογικές θεραπείες στην ψωρίαση είναι πολύ αποτελεσματικές και μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους. Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι οι βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν σε T κύτταρα και οι βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν σε κυτταροκίνες. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις είναι μονοκλωνικά αντισώματα, αντι-κυτταροκίνες ή πρωτεΐνες σύντηξης που εμποδίζουν τη μετανάστευση των T κυττάρων και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, ή ανταγωνίζονται ή εξουδετερώνουν τις δράσεις των κυτταροκινών (Emoke R. and Egrol P. P., 2009). Ο πρώτος βιολογικός παράγοντας που αναπτύχθηκε ειδικά για μια δερματολογική ασθένεια ήταν η αλεφασέπτη, για την αντιμετώπιση της ψωρίασης (Nestle F.O. et al, 2009).

Οι αντι-κυτταροκινικές θεραπείες έχουν αναπτυχθεί μέσω της προόδου που έχει γίνει στην μελέτη της θεραπείας με αντι-TNF παράγοντες σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως η ψωρίαση. Ωστόσο, ένα πλήθος θεμάτων, συμπεριλαμβανομένης της μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας, υποτροπών μετά τη διακοπή του φαρμάκου, της ασφάλειας, και του κόστους, οδηγούν στην αναζήτηση νέων και καλύτερων θεραπειών. Η τελευταία προσθήκη στα αντι-κυτταροκινικά φάρμακα είναι αντισώματα που στοχεύουν στην οικογένεια ετεροδιμερικών κυτταροκινών της ιντερλευκίνης-12 και ιντερλευκίνης-23 που μοιράζονται μια κοινή αλυσίδα p40. Τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των αντισωμάτων αντι-p40 στην ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα (Nestle F.O. et al., 2009).

Στην πλειοψηφία των ασθενών με ψωρίαση (περίπου 60%), η νόσος διαχειρίζεται με τοπική θεραπεία. Τα κορτικοστεροειδή και η βιταμίνη D3 είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τοπικές θεραπείες και μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικά στον έλεγχο ήπιων έως μέτριων αλλοιώσεων της ψωρίασης. Μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με τις επιδράσεις των κορτικοστεροειδών επί κερατινοκυττάρων έδειξαν ότι εκτός από την ρύθμιση των προφλεγμονωδών γονιδίων, τα κορτικοστεροειδή ρυθμίζουν την κινητικότητα των κερατινοκυττάρων και τον μεταβολισμό τους, καταστέλλουν την έκφραση όλων των IFN- γ ρυθμιζόμενων γονιδίων, περιλαμβανομένων του υποδοχέα της ιντερφερόνης- γ IFNGR1 (Interferon Gamma Receptor 1) και του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 1), επάγουν τον τερματισμό της επιδερμικής διαφοροποίησης, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την διαφοροποίηση σε πρώιμο στάδιο. Λόγω των παρενεργειών τους, κατά την παρατεταμένη χρήση, τα κορτικοστεροειδή συνδυάζονται με άλλες τοπικές θεραπείες στην ψωρίαση (Stojadinovic O. et al., 2007). Ανάλογα βιταμίνης D3 (καλσιποτριόλη και καλσιτόλη) και το τοπικό ρετινοειδές ταζαροτένης, τα οποία επηρεάζουν τις λειτουργίες των κερατινοκυττάρων και την ανοσολογική απόκριση, χρησιμοποιούνται τώρα ευρύτερα από ό, τι η ανθραλίνη ή λιθανθρακόπισσα. Μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση μπορεί να αντιμετωπιστεί με φωτοθεραπεία UV ή συστημικά φάρμακα. Ο τρόπος δράσης των συστηματικών θεραπειών δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Ορισμένες από αυτές, όπως η κυκλοσπορίνη A (CsA) και τα φουμαρικά, αναστέλλουν λειτουργίες του ανοσοποιητικού, ενώ άλλες, όπως τα ρετινοειδή και η μεθοτρεξάτη, επίσης στοχεύουν τις λειτουργίες των κερατινοκυττάρων (Schon & Boehncke, 2005).

Συνολικά υπάρχουν 6 προσεγγίσεις θεραπείας για την ψωρίαση:

1. Φωτοθεραπεία με UVB Η φωτοθεραπεία εφαρμόζεται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμένη αγωγή. Η μέθοδος της φωτοθεραπείας περιλαμβάνει την εκπομπή UVB (φάσμα 290-320 nm) σε ελεγχόμενες δόσεις με τη χρήση ειδικών λυχνιών. Ο μηχανισμός δράσης της οφείλεται ίσως στο ότι η παροδική ελάττωση της σύνθεσης

του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών που προκαλεί η UVB οδηγεί σε ομαλοποίηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κερατινοκυττάρων (Piskin et al 2003).

2. Φωτοχημειοθεραπεία PUVA Αυτή είναι πολύ αποτελεσματική στην πλειοψηφία των ασθενών, με δυνατότητες μεγάλης ύφεσης. Ωστόσο, η μακροχρόνια θεραπεία PUVA έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκινώματος πλακωδών κυττάρων (squamous epithelium) και πιθανώς κακοήθες μελάνωμα στους Καυκάσιους (Menter A. et al., 2008).

3. Η μεθοτρεξάτη αν και είναι αποτελεσματική στην πλειονότητα των ασθενών, προκαλεί ηπατοτοξικότητα. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα φάρμακα είναι συνήθεις. Η μεθοτρεξάτη είναι ανοσοκατασταλτικός παράγοντας.

4. Η Ασιτρετίνη είναι ένας αποτελεσματικός μη ανοσοκατασταλτικός συστημικός παράγοντας ο οποίος χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με θεραπεία με UVB ή PUVA.

5. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που μπορούν να εξαχθούν από ζωικό ιστό ή παράγονται με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και έχουν φαρμακολογική δραστηριότητα. Πέντε βιολογικοί παράγοντες είναι επί του παρόντος εγκεκριμένοι από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την ψωρίαση (Menter A. et al., 2008).

6. Η κυκλοσπορίνη (CsA) λειτουργεί γρήγορα και είναι αποτελεσματική στην πλειοψηφία των ασθενών. Ωστόσο, στις γνωστές ανεπιθύμητες παρενέργειες μετά από μακροχρόνια αγωγή περιλαμβάνονται η διαταραγμένη νεφρική λειτουργία, η υπέρταση, και πιθανή αύξηση των κακοηθειών του δέρματος. Έτσι είναι καλύτερα να χρησιμοποιείται για μικρή διάρκεια από 3 έως 4 μήνες. Επίσης εμφανίζει πολλές πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα. Σε ασθενείς που αναπτύσσουν υπέρταση ή αυξήσεις της κρεατινίνης υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές για τη μείωση της δόσης της.

1.2 Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη απομονώθηκε το 1970, από τον Jean Francois Borel από το μύκητα του εδάφους *Tolypocladium inflatum*. Πρόκειται για ένα κυκλικό εντεκαπεπετίδιο και η ένωση ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένας πιθανός αντιμυκητιακός παράγων αλλά στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι έχει περιορισμένη αντιμυκητιακή δραστηριότητα. Παρουσιάζει εκλεκτική ανασταλτική δράση στα T- κύτταρα, αναστέλλοντας την μεταγωγή σήματος που μεσολαβείται από υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα T-λεμφοκύτταρα (T cell receptors, TCRs). Σε αντίθεση με την

μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη είναι μη κυτταροτοξικό και μη μυελοτοξικό φάρμακο (Borel, 2002).

1.2.1 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της κυκλοσπορίνης

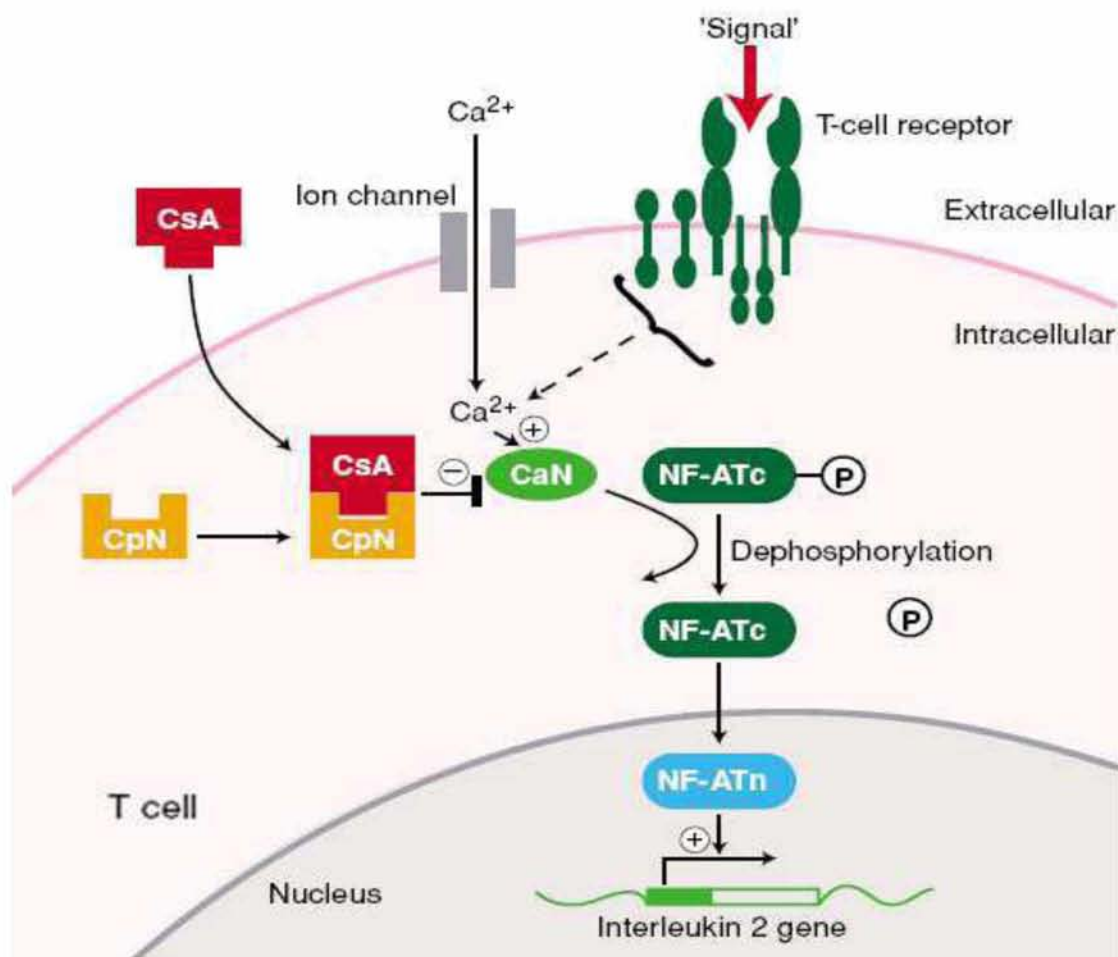
Η κυκλοσπορίνη είναι ένα λιπόφιλο μόριο που απορροφάται ελάχιστα από τα «συμβατικά» από του στόματος χορηγούμενα σκευάσματα, με σημαντικές μεταβολές της βιοδιαθεσιμότητας (D. Colombo and A. DiPietro, 2012). Κατανέμεται ευρέως σε όλο το σώμα, στο πλάσμα (33-47% μιας χορηγούμενης δόσης), τα λεμφοκύτταρα (4-9%), τα κοκκιοκύτταρα (5-12%) και ερυθροκύτταρα (41-58%). Στο πλάσμα, η κυκλοσπορίνη δεσμεύεται με πρωτεΐνες (~ 90%). Μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 (CYP), κυρίως από τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 στο ήπαρ και το λεπτό έντερο. Η p-γλυκοπρωτεΐνη η οποία είναι μια αντλία εκροής σχετίζεται επίσης με τη βιοδιαθεσιμότητα και την απέκκριση της κυκλοσπορίνης. Η κυκλοσπορίνη αποβάλλεται κυρίως μέσω της χολής. Η τελική ημίσεια ζωής της κυκλοσπορίνης στο πλάσμα κυμαίνεται από 6-24 ώρες σε διάφορους πληθυσμούς, αλλά σε ασθενείς με ψωρίαση, η τιμή είναι μάλλον πιο κοντά στο κατώτερο όριο αυτής της κλίμακας (D. Colombo and A. DiPietro, 2012).

1.2.2 Μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης

Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την μεταγραφή της ιντερλευκίνης (IL)-1, IL-2, ιντερφερόνης γάμμα (IFN-γ), IL-3, IL-4, IL-6, και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)-α σε T λεμφοκύτταρα, καθώς και την έκφραση των υποδοχέων IL-2 (IL-2R), IL-4R, και IL-5R. Επίσης αναστέλλεται η αντιγονοπαρουσιαστική και διεγερτική ικανότητα των κυττάρων Langerhans για τα T λεμφοκύτταρα. Η κυκλοσπορίνη εμποδίζει την πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων στο ψωριασικό δέρμα μέσω μείωσης της έκφρασης του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης (ICAM) -1, και της Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10 ή αλλιώς χημειοκίνη 10) σε ψωριασικά κερατινοκύτταρα, και της ICAM-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Prens et al., 1995).

Μετά την είσοδο της στα T κύτταρα, η CsA συνδέεται με υψηλή συγγένεια σε κυκλοφιλίνες, και ιδίως στην κυτταροπλασματική κυκλοφιλίνη A (17 kDa) η οποία είναι η πιο άφθονη κυκλοφιλίνη στα T κύτταρα (Handschumacher et al, 1984; Schreiber 1991). Οι κυκλοφιλίνες είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που έχουν δράση πεπτιδυλ-προλίνο-cis-trans-ισομεράσης (PPIάσης) (Schmid, 1995). Αν και η CsA αναστέλλει την δραστηριότητα της PPIάσης των κυκλοφιλίνων, η αναστολή αυτή δεν εμπλέκεται στον μηχανισμό της ανοσοκαταστολής επειδή ορισμένα από τα ανάλογα κυκλοσπορίνης A που αποτυγχάνουν να απενεργοποιήσουν τα T κύτταρα είναι ακόμη σε θέση να αναστέλλουν την δραστηριότητα PPIάσης. Το σύμπλοκο κυκλοφιλίνη-CsA, αλλά όχι η κυκλοφιλίνη από μόνη της, μπορεί να συνδεθεί με μια

άλλη κυταροπλασματική πρωτεΐνη, την καλσινευρίνη (CnA ή PP2B). Η καλσινευρίνη ανήκει σε μία υπεροικογένεια πρωτεϊνών φωσφατασών σερίνης-θρεονίνη και η δράση της ρυθμίζεται στενά από το σύστημα Ca^{2+} / καλμοδουλίνη (Klee et al. 1988, Cohen 1989, Shenolikar 1994) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματικό μοντέλο μηχανισμού δράσης της κυκλοσπορίνης. Η σύνδεση της κυκλοσπορίνης με την κυκλοφιλίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (D. Colombo and A. DiPietro, 2012).

Με την είσοδο της κυκλοσπορίνης (CsA) στο T κύτταρο έχουμε σύνδεσή της με την κυκλοφιλίνη (CpN) και το σύμπλοκό τους εμποδίζει την δράση της καλσινευρίνης (CaN). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορεί η καλσινευρίνη να αποφωσφορυλιώσει την κυταροπλασματική υπομονάδα του πυρηνικού παράγοντα ενεργοποίησης των T κυττάρων (NFATc) και έτσι αυτή δεν μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα και να συνδεθεί με την πυρηνική υπομονάδα του (NFATn). Το σύμπλοκο αυτών των δυο ενεργοποιητικών παραγόντων αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα για το γονίδιο της ιντερλευκίνης 2. Έτσι ουσιαστικά η δράση της κυκλοσπορίνης καταστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (D. Colombo and A. DiPietro, 2012).

Δέσμευση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) με τον προσδέτη του προκαλεί την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκεντρώσεως ασβεστίου και την επακόλουθη ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης. Η ενεργοποιημένη καλμοδουλίνη, τότε, αλληλεπιδρά με την CnA και απελευθερώνει την ανενεργή περιοχή της CnA, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης. Το σύμπλοκο κυκλοφιλίνη-CsA δεσμεύεται απευθείας στην CnA και αναστέλλει τη δράση φωσφατάσης. Σε αντίθεση με την TCR-επαγόμενη ενεργοποίηση των κυττάρων T, η CsA δεν αναστέλλει ορισμένους τύπους Ca^{2+} -ανεξάρτητων οδών ενεργοποίησης των κυττάρων T, όπως η διέγερση μέσω CD28 παρουσία PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate).

Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλώνει τα μέλη της οικογένειας NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) επιτρέποντάς τα να μεταφέρονται στον πυρήνα και να επάγουν την έκφραση γονιδίων. Η ενεργοποιημένη καλσινευρίνη μετατοπίζεται επίσης εντός του πυρήνα μαζί με τα μέλη της οικογένειας NFAT, και μπορεί να διατηρήσει την παρατεταμένη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών NFAT. Μεταξύ των μελών της οικογένειας του NFAT οι NFAT1, NFAT2 και NFAT4 εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένων των IL-2 IL-4 και CD40L. Προλαμβάνοντας την δράση φωσφατάσης της καλσινευρίνης η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την μετατόπιση στον πυρήνα των μεταγραφικών παραγόντων NFAT και την επακόλουθη έκφραση των γονιδίων στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Αυτή η μεσολοβούμενη από την κυκλοσπορίνη αναστολή του μονοπατιού της καλσινευρίνης/NFAT είναι ένας τρόπος ανοσοκαταστολής (S. Matsuda, S. Koyasu, 2000).

Τα αποτελέσματα της δράσης της κυκλοσπορίνης περιλαμβάνουν (S. Matsuda, S. Koyasu, 2000):

- Απομάκρυνση των λεμφοκυττάρων και μακροφάγων από την επιδερμίδα και την δερμίδα
- Μείωση της έκφρασης του μορίου κυτταρικής προσκόλλησης στο δερματικό τριχοειδές ενδοθήλιο
- Περιορισμένη ενεργοποίηση των αντιγονοπαραρυσιαστικών κυττάρων, των κυττάρων NK (φυσικά φονικά κύτταρα), και των T κυττάρων
- Αναστολή του υπερπολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων
- Περιορισμένη απελευθέρωση της ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα.

1.3. Φαρμακογενετική

Η Φαρμακογενετική είναι ο κλάδος της Φαρμακολογίας που ασχολείται με τους γενετικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις φαρμακολογικές παραμέτρους κάθε φαρμάκου. Ο σκοπός της φαρμακογενετικής είναι να μελετήσει και να εξηγήσει τις φαρμακολογικές και τοξικολογικές επιδράσεις των ατομικών γενετικών διαφορών μέσα από τον λεπτομερή χαρακτηρισμό της βιοχημικής και μοριακής τους βάσης σύμφωνα με τις βασικές αρχές της φαρμακολογίας και της γενετικής. Ο θεραπευτικός

στόχος της φαρμακογενετικής είναι με ανάλυση του γενετικού προφίλ κάθε ασθενούς να διαπιστωθεί κατά πόσον ένα φάρμακο θα είναι αποτελεσματικό στον ασθενή ή/και θα του προκαλέσει επικίνδυνες παρενέργειες. Οι ασθενείς με διαφορετικούς πολυμορφισμούς για ένα γονίδιο μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά στη χορήγηση ενός φαρμάκου. Μια παραλλαγή θεωρείται πολυμορφισμός όταν το αλληλόμορφο εμφανίζεται σε ποσοστό 1% ή μεγαλύτερο στο γενικό πληθυσμό. Ο πιο συχνός τύπος πολυμορφισμού είναι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP), που προκύπτει από τη αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Οι πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν φάρμακα, μεταφορείς και στόχους φαρμάκων, μπορεί να ευθύνονται για μέχρι και το 95% της υφιστάμενης ποικιλότητας μεταξύ ασθενών στην απόκριση στη θεραπεία. (Ryan et al., 2011). Με βάση αυτό, για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και τη μείωση του κόστους της θεραπείας αναγκαία είναι η εξατομίκευση της θεραπείας για κάθε ασθενή, με βάση κοινούς μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι θα επιτρέψουν την χρήση επιλεκτικών θεραπευτικών παραγόντων σε γενετικά διακριτές ομάδες ασθενών.

Η κυκλοσπορίνη είναι ένας ανταγωνιστής της καλσινευρίνης που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης και άλλων δερματοπαθειών. Η βιοδιαθεσιμότητα και η συστηματική κάθαρση της κυκλοσπορίνης ελέγχονται από τα ισόενζυμα CYP3A4 και CYP3A5 του κυτοχρώματος P450 (CYP) και από την αντλία εκροής P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), έναν διαμεμβρανικό μεταφορέα. Η P-gp εκφράζεται στην γαστρεντερική οδό και το ήπαρ, περιορίζοντας την εντερική απορρόφηση και διευκολύνοντας τη χολική απέκκριση των λιπόφιλων φαρμάκων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1* επίσης γνωστό ως *MDR1* (Ryan et al., 2011).

Διάφορα SNPs στα γονίδια *CYP3A4*, *CYP3A5* και *ABCB1* έχουν εντοπιστεί και θεωρείται, εν μέρει, ότι ευθύνονται για τη μεταβλητότητα στη φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του *ABCB1* έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στη φαρμακοκινητική του φαρμάκου και με τη μεταβολή της βιολογικής απόκρισης στη θεραπεία με το φάρμακο. Η συχνότητα εμφάνισης των παραλλαγών και των απλοτύπων διαφέρουν ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα. Έτσι, ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες μπορεί να διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο αναποτελεσματικότητας στη θεραπεία (Garrigues A., 2002).

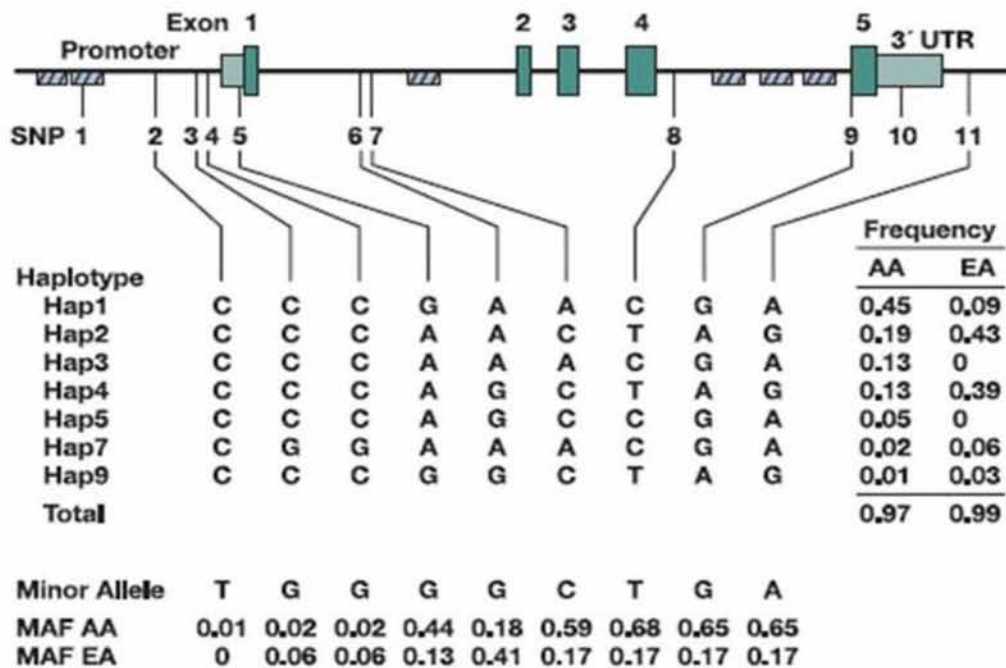
Για τον πολυμορφισμό C3435T του *ABCB1* έχει πραγματοποιηθεί συσχέτιση με αρνητική απόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη σε ασθενείς με ψωριασική σε μελέτη 84 ασθενών (Vasilopoulos, et al., 2014). Συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλόμορφου T αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία (P=0.0015). Σε αυτή την μελέτη ελέγχθηκαν 5 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *ABCB1* (T129C, G1199A, C1236T, G2677T, C3435T) αλλά για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

Για να μπορέσει η θεραπεία της ψωρίασης να είναι εξατομικευμένη, θα πρέπει να διενεργηθούν περισσότερες μελέτες και σε άλλους πολυμορφισμούς και γονίδια που εμφανίζουν πιθανή συσχέτιση με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης.

1.4. Κυκλοφιλίνη A (PPIA)

Ένας ακόμα παράγοντας που σχετίζεται με την δράση της κυκλοσπορίνης είναι η κυκλοφιλίνη. Οι κυκλοφιλίνες (Cyclophilins ή Cyps) είναι μια οικογένεια εξελικτικά συντηρημένων ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Βρίσκονται σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Έχουν δραστηριότητα πεπτιδύλο-προλυλλο-ισομεράσης, η οποία καταλύει την ισομερίωση των πεπτιδικών δεσμών από trans σε cis μορφή σε παράγωγα προλίνης και διευκολύνει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Οι ανθρώπινες Cyps αποτελούνται από 16 μέλη που είναι δομικά διαφορετικά. Μεταξύ αυτών, το πλέον άφθονο μέλος είναι κυκλοφιλίνη A (Cyclophilin A ή CypA), η οποία αποτελεί περίπου 0,1-0,6% του συνόλου των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η CypA απομονώθηκε αρχικά από θυμοκύτταρα βοοειδών και ταυτοποιήθηκε ως η πρωτογενής κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δέσμευσης του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου κυκλοσπορίνη A (Cyclosporine A ή CsA). Η CypA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων της αναδίπλωσης πρωτεϊνών και της διακίνησης και ενεργοποίησης των T-κυττάρων. Μολονότι η CypA βρίσκεται ενδοκυτταρικά, μπορεί ακόμη και να εκκρίνεται από τα κύτταρα σε απόκριση προς φλεγμονώδεις διεγέρτες, όπως η υποξία, η μόλυνση, και το οξειδωτικό στρες (P. Nigro et al., 2013)

Η ανθρώπινη κυκλοφιλίνη A, κωδικοποιείται από το γονίδιο πεπτιδύλ-προλυλλο-ισομεράση A (*PPIA*). Το γονίδιο *PPIA* έχει μέγεθος περίπου 7 kb, και περιλαμβάνει πέντε εξόνια. Στο γονίδιο αυτό έχουν βρεθεί αρκετά SNPs, 11 από τα οποία επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Γενωμική οργάνωση, SNPs και απλότυποι του ανθρώπινου γονιδίου *PPIA* που εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 7p13. Τα εξόνια σημειώνονται με τα πράσινα ορθογώνια κουτάκια. Τα μαύρα σκιασμένα κουτάκια συμβολίζουν τις επαναλήψεις Alu. Η αλληλουχία και η συχνότητα των απλοτύπων φαίνεται στο μέσον της εικόνας (An P. et al., 2007).

Πολυμορφισμοί που μεταβάλλουν την αλληλουχία του υποκινητή μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα και στον ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου. Ένας από αυτούς, το SNP4 (rs8177826) αφορά την αντικατάσταση C/G στην θέση -11 του υποκινητή με αποτέλεσμα την καλύτερη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και αύξηση της έκφρασης του γονιδίου (M. Palacín et al., 2008). Άλλοι πολυμορφισμοί που βρίσκονται ανοδικά του γονιδίου *PPIA* και φαίνεται να επηρεάζουν την έκφρασή του είναι ο 1575 C/G ο οποίος είναι 10 νουκλεοτίδια ανοδικά από την περιοχή TATA του υποκινητή (TATA box). Ακόμη ο πολυμορφισμός 1167 C/T βρίσκεται και αυτός στον υποκινητή του γονιδίου αλλά δεν εξετάζεται ερευνητικά λόγω της σπανιότητάς του (An P. et al., 2007). Τέλος ο πολυμορφισμός rs6850 ο οποίος βρίσκεται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' untranslated region, 5' UTR) του γονιδίου, και συγκεκριμένα 9 νουκλεοτίδια ανοδικά από την θέση έναρξης της μετάφρασης, δήχθηκε ότι επηρεάζει και αυτός την έκφραση της κυκλοφιλίνης (M. Palacín et al., 2008).

Άλλοι πολυμορφισμοί βρίσκονται στις περιοχές των ιντρονίων, όπως οι rs6970925 και rs3735481 στο ιντρόνιο 1 και οι rs6463247 και rs10249442 στο ιντρόνιο 4, καθώς επίσης και στην 3' UTR όπως οι rs8177830 και rs6904 (An P. et al., 2007).

1.5. Σκοπός

Βάσει της λειτουργίας της κυκλοφιλίνης, που είναι η μοναδική πρωτεΐνη που συνδέεται με την κυκλοσπορίνη, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που επηρεάζουν την έκφρασή του είναι στόχοι έρευνας για την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη των ασθενών με ψωρίαση. Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs8177826 του γονιδίου *PPIA*, με την ανταπόκριση των ασθενών αυτών σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Το αίμα των ασθενών, μετά την αιμοληψία στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, στα οποία πραγματοποιήθηκε η θεραπεία, τοποθετήθηκε σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA). Η διατήρησή των δειγμάτων έγινε στους -80°C ως την χρήση τους.

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τους πυρήνες των λευκοκυττάρων του ολικού αίματος. Αρχικά, γίνεται λύση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και λαμβάνονται οι πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων. Ακολουθεί λύση της πυρηνικής μεμβράνης με απορρυπαντικά, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA στο διάλυμα και επώαση του διαλύματος με διάλυμα πρωτεΐνάσης, για τον καθαρισμό του DNA από τις ιστόνες και αδρανοποίηση των νουκλεασών που μπορούν να καταστρέψουν τα μόρια του DNA κατά την απομόνωση. Στην συνέχεια, απομακρύνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών τα υπολείμματα κυττάρων, τα θραύσματα των μεμβρανών και οι πρωτεΐνες.

Ως οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα φαινόλης και χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Στην φαινόλη οφείλεται ο διαχωρισμός των φάσεων και η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται αφενός για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης από την υδατική φάση, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα σε περαιτέρω χρήση του γονιδιωματικού DNA σε ενζυμικές αντιδράσεις και αφετέρου για την εκχύλιση των λιπιδίων. Η ισοαμυλική αλκοόλη χρησιμοποιείται για την διατήρηση της σταθερότητας του.

Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή, μετά από κατακρήμνιση σε δύο βήματα με ισοπροπανόλη και αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH₂O.

2.2.2 Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα SSC (saline-sodium citrate) 1x (από αρραίωση διαλύματος 20x [3 M sodium chloride, 300 mM sodium citrate, pH 7.0])
- 5% w/v SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- Διάλυμα φαινόλης
- Διάλυμα χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης
- Διάλυμα ισοπροπανόλης
- Proteinase K (10mg/ml)
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,2M
- 70% v/v αιθανόλη

2.2.3 Πειραματική διαδικασία

1. Σε 0,5 ml αίματος προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x SSC.
2. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 min.
3. Απόχυση του υπερκείμενου με αναστροφή.
4. Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x SSC και ανάδευση.
5. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 (καθαρισμός του ιζήματος).
6. Προσθήκη 600 μl CH₃COONa 0,2M και ανάδευση.
7. Προσθήκη 50 μl 5% w/v SDS και 10 μl διαλύματος proteinase K.
8. Ανάδευση και επώαση στους 55°C για 1 h.
9. Προσθήκη 0,5 ml διαλύματος φαινόλης και 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min στους 4 °C.
11. Λήψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης και μεταφορά σε καθαρό σωληνάριο.
12. Προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και ανάδευση.
13. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4 °C.
14. Προσθήκη 1 ml ψυχρής ισοπροπανόλης και ανάδευση (κατακρήμνιση του γονιδιωματικού DNA).
15. Επώαση για 20 min στους -20 °C.
16. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4 °C.
17. Αφαίρεση υπερκείμενου με πιπέτα.
18. Προσθήκη 1 ml ψυχρής 70% v/v αιθανόλης και ανάδευση.
19. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min στους 4 °C.
20. Απόχυση του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος στους 55°C.
21. Επαναδιάλυση σε 100 μl ddH₂O.
22. Αποθήκευση στους -20 °C

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kary Mullis (Mullis, et al., 1986). Η PCR βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των μορίων DNA από μια θερμοσταθερή πολυμεράση, όπως αυτή του *Thermus aquaticus* (Taq). Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται σε έναν κλώνο ενός δίκλωνου μορίου DNA. Το ζεύγος των εκκινήτων οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι υβριδοποιημένοι εκκινήτες απαιτούνται για την έναρξη της DNA πολυμεράσης κι έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, μέσω της διαδοχικής προσθήκης ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων.

Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τρία βήματα που επαναλαμβάνονται για n κύκλους:

1. **Αποδιάταξη** της μήτρας DNA στους 94 ή 95 °C.
2. **Υβριδοποίηση των εκκινητών** με το συμπληρωματικό τους DNA-στόχο, σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους.
3. **Επιμήκυνση** των συνδεδεμένων εκκινητών με σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' στους 72 °C.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για n κύκλους (συνήθως 30-40 κύκλοι αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης), με αποτέλεσμα τα μόρια που παρήχθησαν στον προηγούμενο κύκλο να χρησιμεύουν ως μήτρα για κάθε επόμενο κύκλο. Η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων-κλώνων είναι εκθετική και θεωρητικά ισούται με $2n$.

2.3.2 Επιλογή εκκινητών για PCR

Τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν οι εκκινητές είναι:

- **Μοναδικότητα:** Για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει αποκλειστικά ένας στόχος στη μήτρα του DNA.
- **Μήκος:** το μήκος των εκκινητών επιδρά τόσο στη μοναδικότητα τους όσο και στη θερμοκρασία υβριδοποίησης τους. Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υβριδοποιεί μόνο με το στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Συνήθως οι εκκινητές έχουν μήκος 17 με 35 βάσεις.
- **Σταθερότητα:** εξαρτάται από την αναλογία C/G στο 3' άκρο και στο 5' άκρο. Προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δύο βάσεις G/C, και 3' άκρα με μία ή και καμία βάση G/C.
- **Σύσταση βάσεων:** επηρεάζει την υβριδοποίηση και τη σταθερότητα. Προτιμώνται οι αλληλουχίες τυχαίας σύστασης, ενώ αποφεύγονται οι περιοχές πλούσιες σε A+T είτε σε G+C (μέση περιεκτικότητα σε G+C ~50-60%).
- **Θερμοκρασία Τήξης (Tm):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA σχηματίζουν δίκλιωνα μόρια. Εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε G+C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου άρα υψηλότερο Tm. Εμπειρική μέθοδος υπολογισμού του Tm για ≤ 20 βάσεις :

$$Tm=(A+T)x2^{\circ}C+(G+C)x4^{\circ}C$$

- **Θερμοκρασία υβριδοποίησης (Ta):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στη μήτρα του DNA.
- **Εσωτερικές δομές:** η απόδοση της PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.
- **Συμπληρωματικότητα:** Ο εμπρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες.

2.3.3 Υλικά

- Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs, 10mM)
- Kapa Taq DNA Polymerase
- 10x Kapa Taq Reaction Buffer (με 1,5 mM MgCl₂)
- Γονιδιωματικό DNA
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές
- Εμπρόσθιος εκκινητής: GTCACTCTGGCGAAGTCGC 50pmole
- Ανάστροφος εκκινητής: CGCTCGCCCCTCAAGCAG 50pmole

2.3.4 Πειραματική διαδικασία

Για την κάθε αντίδραση αναμειγνύονται σε eppendorf των 200μl τα υλικά στις παρακάτω ποσότητες:

Συγκέντρωση/Ποσότητα DNA ~100ng (1μl)
 10x Kapa Taq Reaction Buffer (με 1,5 mM Mg Cl₂) 2,5μl
 MgCl₂ (25mM) 0,8μl
 Forward Primer 0,5μl
 Reverse Primer 0,5μl
 dNTPs 0,5μl
 5 U/μl Kapa Taq DNA Polymerase 1U 0,12μl
 ddH₂O 19,08μl
 Σύνολο 25μl

Σημαντικό βήμα είναι η προσθήκη της πολυμεράσης αμέσως πριν την έναρξη της αντίδρασης, ώστε να μην αρχίσει μη ειδικός πολυμερισμός με αποτέλεσμα παρουσία παραπροϊόντων.

Μετά από ανάδευση τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα:

Συνθήκες PCR

- Στάδιο Θερμοκρασία Χρόνος
- Προ-αποδιάταξη 95°C 4 min
- 35 κύκλοι
- Αποδιάταξη του DNA 95°C 40 sec
- Υβριδοποίηση εκκινητών-μήτρας DNA 62 °C 40 sec
- Επιμήκυνση των εκκινητών 72°C 30sec
- Τελική επέκταση 72°C 10 min

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,3% w/v πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, σε μια από τις θέσεις προστέθηκε δείκτης μοριακών βαρών (ladder), ώστε να γίνει εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR.

Το προϊόν της PCR αποθηκεύεται στους -20°C.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Τα δίκλιωνα γραμμικά μόρια DNA κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και διανύουν απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογης του μοριακού τους βάρους.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση και τον διαχωρισμό των μορίων είναι:

1. **Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα:** Ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους μετακινείται με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, μπορούμε να διαχωρίσουμε μόρια DNA με ένα ευρύ φάσμα μεγεθών.
2. **Η στερεοδιαμόρφωση του DNA:** Μόρια DNA ίδιου μοριακού βάρους αλλά με διαφορετική στερεοδιαμόρφωση (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα), κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα και σε μικρότερο βαθμό από την εφαρμοζόμενη τάση του ρεύματος, το βαθμό ιονισμού του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και την πυκνότητα των ελίκων του μορίου DNA.

3. **Η εφαρμοζόμενη τάση:** Υπό χαμηλή διαφορά δυναμικού, ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης. Το εύρος διαχωρισμού σε πηκτώματα αγαρόζης μειώνεται όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού.

4. **Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης:** Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στην διατήρηση σταθερού pH και παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.

Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές στο πήκτωμα χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο, λόγω της επίπεδης διαμόρφωσής του, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων, και να δεσμεύεται με αυτόν τον τρόπο στο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία και να φθορίζει, με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA να γίνονται ορατές.

2.4.2 Υλικά

- Διάλυμα 1xTAE (40mM Tris, 20mM acetic acid και 1mM EDTA).
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε αναλογία 1 μl/ 10 ml πηκτώματος
- Αγαρόζη
- Διάλυμα χρωστικής bromophenol blue

2.4.3 Πειραματική διαδικασία

2.4.3.1 Παρασκευή πηκτώματος 1,3% w/v αγαρόζης

1. Διάλυση 0,6 gr αγαρόζης σε 40 ml διάλυμα TAE.
 2. Ανάδευση με θερμότητα ως την πλήρη διάλυση της αγαρόζης.
 3. Ψύξη του διαλύματος ως περίπου 40-50 °C.
 4. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε αναλογία 1 μl/ 10 ml πηκτώματος.
 5. Στερεοποίηση του πηκτώματος σε διάφανη (στην UV ακτινοβολία) πλαστική θήκη συγκεκριμένων διαστάσεων, τη μήτρα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών “χτενών” που τοποθετούνται στη συσκευή πριν από την πήξη του πηκτώματος.

2.4.3.2 Πορεία ηλεκτροφόρησης

1. Προσθήκη στα δείγματα DNA διάλυμα της χρωστικής bromophenol blue σε αναλογία 3 μl χρωστικής/ 5 μl δείγματος DNA.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων DNA σε ειδικές θέσεις του πηκτώματος με τη βοήθεια μικροπιπέτας.
3. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή ένταση ρεύματος 100 Volt σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE.
4. Παρατήρηση αποτελέσματος σε σκοτεινό θάλαμο με επιφάνεια ακτινοβολίας UV.

2.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η μέθοδος RFLP βασίζεται στη χρήση ειδικών ενζύμων, των ενδονουκλασών περιορισμού. Το ένζυμο αυτά έχουν απομονωθεί από βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν και να κόβουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Έτσι κάθε ένζυμο περιορισμού εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης σε ένα τμήμα DNA. Μετάλλαξη σε μια θέση θα οδηγήσει σε απώλεια ή δημιουργία μια θέσης κοπής. Στη μέθοδο RFLP γίνεται σύγκριση, μεταξύ ατόμων, των περιοριστικών προτύπων που λαμβάνονται από διάφορα ένζυμα περιορισμού. Με την PCR, ενισχύονται επιλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και έτσι δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης RFLP στα ενισχυμένα τμήματα των υπό μελέτη γονιδίων. Στην παρούσα έρευνα, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs177826 (SNP) στο γονίδιο *PPIA*.

Το ένζυμο περιορισμού για την ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού βρέθηκε με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0. Το πρόγραμμα με βάση την αλληλουχία που περιέχει το σημείο πολυμορφισμού επιλέγει το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που να έχει θέση αναγνώρισης το σημείο του πολυμορφισμού.

Έτσι, επιλέχθηκε το ένζυμο *BstNI* το οποίο αναγνωρίζει την θέση CCWG (όπου W: A ή T) (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου *BstNI*

Όταν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει C τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει στο C. Σε αυτήν την περίπτωση το προϊόν PCR μεγέθους 334bp τεμαχίζεται σε δύο τμήματα 114bp, και 220bp. Αντιθέτως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει G τότε το ένζυμο δεν κόβει.

Διαδικασία RFLP :

1. Για την πέψη χρησιμοποιούνται 100-200ng από το προϊόν PCR
2. Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο *BstNI* και μοιράζεται στα δείγματα DNA
3. Γίνεται ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους 60 °C ολονύχτια

Πίνακας 2

Αντιδραστήρια	Πέψη με BstNI
Προϊόν PCR	χμl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X NEBuffer3.1 (100 mMNaCl, 50 mMTris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 μg/mlBSA)	1μl
Ένζυμο BstNI (10units/μl)	0,1μl
ddH ₂ O	ως τα 10μl

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v

Η αρχή, τα υλικά και η πειραματική διαδικασία της μεθόδου έχουν αναφερθεί και πιο πριν. Η μόνη αλλαγή στην πειραματική διαδικασία είναι ότι χρησιμοποιούμε πήκτωμα συγκέντρωσης 2% σε αγαρόζη.

3. Αποτελέσματα

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 56 ασθενείς με ψωρίαση από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και από το Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Σε αυτούς πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού rs8177826 του γονιδίου *PPIA* ώστε να ελεγχθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτού και της απόκρισής τους στη συγκεκριμένη θεραπεία. Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη.

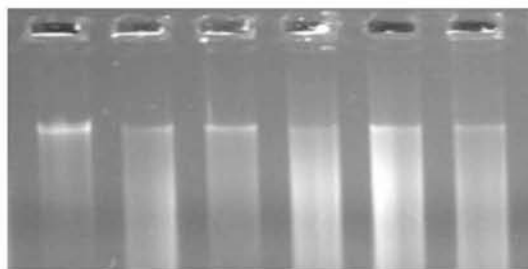
Πίνακας 3: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	43.85 \pm 12.65
Φύλο Α/Θ	26/30
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	2.8 \pm 1.6
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	39.9 \pm 9.80
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	24/56 (43%)
Αρχικό PASI, μέσος \pm ΤΑ*	11.90 \pm 4.8
PASI (3 months) \pm ΤΑ*	3.80 \pm 3.56
Ανταποκριθέντες (Δ PASI \geq 75%)	33 (59%)
Μη ανταποκριθέντες (Δ PASI<50%)	23 (41%)

*ΤΑ: Τυπική απόκλιση

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

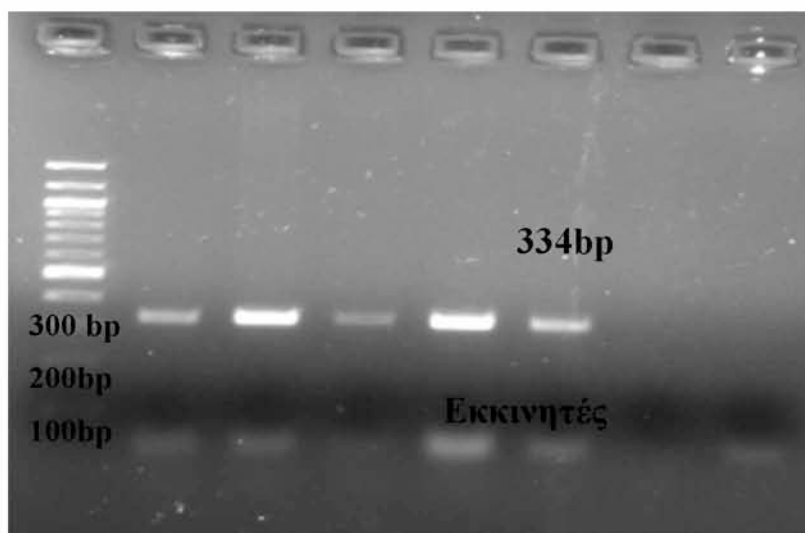
Από όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας. Ενδεικτικά, φαίνονται τα αποτελέσματα απομόνωσης DNA 6 ασθενών σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA 6 ατόμων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου PPIA με PCR

Το τμήμα του γονιδίου *PPIA* το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό rs8177826 ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR (334bp). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,3% και το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Εικόνα 9).

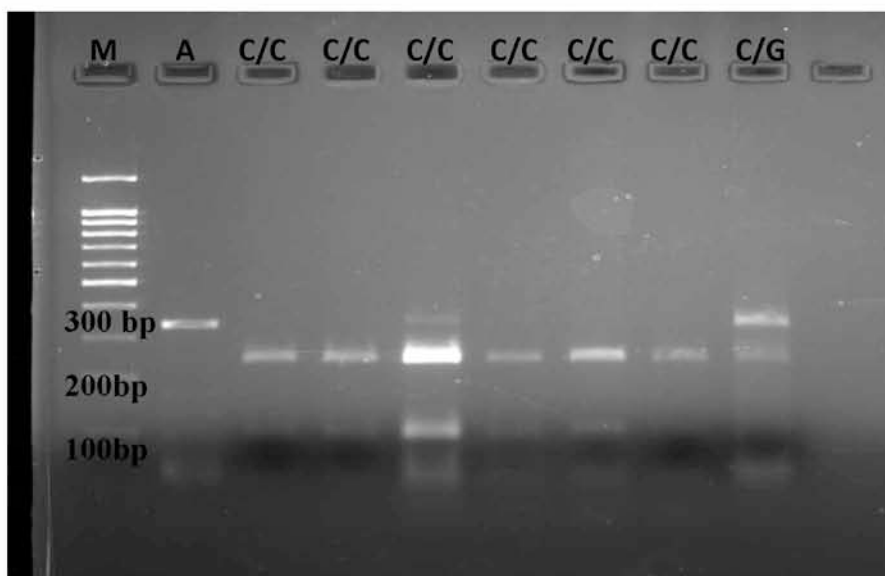


Εικόνα 9: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,3%. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται ο δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών.

3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP

Ο προσδιορισμός των γονότυπων των ασθενών έγινε με την μέθοδο RFLP. Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP φαίνονται στην Εικόνα 10. Στα προϊόντα PCR έγινε πέψη με το ένζυμο *Bst*NI. Από αυτήν την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτουν δύο τμήματα 220bp και 114bp, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο G δεν κόβεται το τμήμα και προκύπτει το αρχικό τμήμα των 334bp. Στα ετερόζυγα άτομα εμφανίζεται ένα άκοπο τμήμα 334bp και τα δύο τμήματα που προκύπτουν από την πέψη 220bp και 114bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (CC) και ετερόζυγων ατόμων (CG). Άτομα ομόζυγα ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (GG) δεν παρατηρήθηκαν.

Ενδεικτικά στην Εικόνα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα της RFLP.



Εικόνα 10: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό rs8177826 του γονιδίου *PPIA*.

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Γονότυποι των 56 ασθενών για τον πολυμορφισμό C1575G (rs8177826) του γονιδίου *PPIA*.

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
2	C/C	47	C/C
3	C/C	52	C/C
4	C/C	53	C/C
5	C/C	56	C/C
6	C/C	57	C/C
7	C/C	58	C/G
8	C/C	59	C/C
9	C/C	62	C/G
11	C/C	63	C/C
12	C/G	64	C/C
13	C/C	69	C/C
14	C/C	72	C/C
15	C/C	73	C/C
17	C/C	74	C/C
18	C/G	76	C/G
19	C/C	77	C/C
21	C/C	79	C/C
22	C/C	81	C/G
23	C/C	85	C/C
24	C/C	30	C/C
26	C/C	40	C/C
32	C/C	50	C/C
35	C/C	60	C/C
36	C/C	90	C/C
39	C/C	100	C/C
40	C/C	180	C/C
42	C/G	260	C/G
43	C/C	290	C/C

3.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του γονοτύπου ή ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου με την ανταπόκριση στην θεραπεία της ψωρίασης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανάλυσης συσχέτισης βάσει των γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων των ασθενών.

Γονίδιο/ Πολυμορφισμός	test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
PPIA/ C1535G (rs8177826)	Genotypic [CC/CG/GG]	26/7/0	22/1/0	0,58
	Cochran- Armitage [C/G]	59/7 (0,89)	45/1 (0,98)	0,18
	Επικρατές [(CC+CG)/GG]	33/0	23/0	0,8
	Υπολειπόμενο [CC/(CG+GG)]	26/1	22/1	0,165

Όσον αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη, η γονοτύπηση έδειξε ότι 26 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C και 7 ήταν οι ετεροζυγώτες. Ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G δεν υπήρχαν. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού rs8177826 είναι 0,89.

Όσο αφορά τους μη ανταποκριθέντες, η γονοτύπηση έδειξε ότι 22 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο C και 1 ετεροζυγώτης. Η συχνότητα του αλληλομόρφου C υπολογίστηκε στο 0,98.

Το αλληλόμορφο C εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς απ' ότι σε αυτούς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p=0,18$), ως προς τη συσχέτιση του αλληλομόρφου C και την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου C, ο οποίος επίσης δεν έδειξε σημαντικά στατιστικό αποτέλεσμα.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την ανάλυση για το σύνολο των ασθενών, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού με την απόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

Ο πληθυσμός είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

4. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του μονοκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs8177826 που εδράζεται στον υποκινητή του γονιδίου *PPIA*, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Το προϊόν του *PPIA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη που συνδέεται με την κυκλοσπορίνη και καταστέλλει την ωρίμανση των T-κυττάρων. Το ποσοστό των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη (59% των ασθενών) συμφωνεί με το ποσοστό ανταποκριθέντων ασθενών στην κυκλοσπορίνη που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (50-70% των ασθενών).

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (rs8177826) επάγει την υπερέκφραση του γονιδίου όταν υπάρχει το υπολειπόμενο αλληλόμορφο (G) (M. Palacín et al., 2008). Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην υπόθεση της ικανότερης σύνδεσης κυκλοσπορίνης-κυκλοφιλίνης όταν χορηγείται στους ασθενείς κυκλοσπορίνη, καθώς και την ικανότερη σύνδεση μικρότερης ποσότητας κυκλοσπορίνης σε ασθενείς ετερόζυγους (CG) και ακόμη λιγότερης ποσότητας σε ασθενείς ομόζυγους για τον υπολειπόμενο πολυμορφισμό (GG). Άρα με βάση αυτήν την υπόθεση άτομα ετερόζυγα ή ομόζυγα υπολυπόμενα θα μπορούσαν πιθανώς να ανταποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη και μακροπρόθεσμα θα μπορούσε να μειωθεί η ποσότητα της χορηγούμενης δόσης για την αποφυγή παρενεργειών.

Η κυκλοφιλίνη είναι μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη του ανοσοποιητικού συστήματος και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με πάρα πολλές ασθένειες, με πολλές από τις οποίες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η καρδιοαγγειακή νόσος, να αποτελούν συνοδά νοσήματα της ψωρίασης (P. Nigro et al., 2013). Επίσης η δράση της σχετίζεται και με πολλές ιικές λοιμώξεις ενώ πολυμορφισμοί της έχουν συσχετιστεί με επιτάχυνση της εξέλιξης του AIDS (An P. et al., 2007). Ακόμη η κυκλοφιλίνη A είναι η κυρίαρχη, αν όχι και μοναδική, πρωτεΐνη με την οποία συνδέεται η κυκλοσπορίνη και προάγει την ανοσοκαταστολή (Colgan et al., 2005). Όλοι αυτοί οι λόγοι συντέλεσαν στην εκτέλεση της συγκεκριμένης εργασίας ώστε να δηχθεί μια πιθανή συσχέτιση με την ψωρίαση.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης σε 56 ψωριασικούς ασθενείς για τον πολυμορφισμό rs8177826 δεν έδειξαν συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ($P=0,18$). Παρόλα αυτά ο αριθμός των ασθενών που συμπεριελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη είναι σχετικά μικρός για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη συσχέτισή του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός των ασθενών ώστε και να επιτευχθεί αύξηση του συνόλου των ασθενών αλλά και να συμπεριληφθούν ασθενείς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων που θα αφορούν πλέον τη συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού στον ελλαδικό χώρο.

Η μελέτη του πολυμορφισμού rs8177826 σε σχέση με την ανταπόκριση στην κυκλοσπορίνη σε ψωριασικούς ασθενείς συμπεριλαμβάνεται σε μία μεγαλύτερη μελέτη φαρμακογενετικής ανάλυσης πολυμορφισμών γονιδίων και της θεραπείας με κυκλοσπορίνη. Οι πολυμορφισμοί του *PPIA* σε συνδυασμό με μελέτες γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της κυκλοσπορίνης έχουν ως σκοπό μια πιθανή συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία της ψωρίασης και την ανάδειξη έτσι ενός θεραπευτικού σχήματος, για κάθε ασθενή με ψωρίαση, μειώνοντας το κόστος της θεραπείας αλλά και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Μελέτη άλλων πολυμορφισμών για την κυκλοφιλίνη μπορεί να δώσει ικανοποιητικές πληροφορίες για την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Για παράδειγμα ο πολυμορφισμός 1575 C/G ο οποίος βρίσκεται και αυτός στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλοφιλίνης και μάλιστα δίπλα στην περιοχή σύνδεσης της RNA πολυμεράσης (TATAbox) είναι ένας επόμενος θελκτικός στόχος για περαιτέρω μελέτη.

Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για αυτόν τον σκοπό, καθιστώντας αναγκαία τη συνέχιση και την επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με ψωρίαση από όλες τις περιοχές της Ελλάδας.

Βιβλιογραφία

1. Emoke R. and Errol P. P., Molecular pathophysiology of psoriasis and molecular targets of antipsoriatic therapy, Cambridge University Press , Vol. 11; e38; December 2009, :1-18
2. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(5): 826–50
3. Elisha D.O. Roberson and Anne M. Bowcock, ‘‘Psoriasis genetics: breaking the barrier’’, *Trends Genet.* Sep 2010; 26(9): 415–423.
4. Green MS, Prystowsky JH, Cohen SR, Cohen JI, Lebwohl MG. Infectious complications of erythrodermic psoriasis. (1996). *Journal of the American Academy of Dermatology* 34(5 Pt 2):911-4.
5. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. «Psoriasis». *N Engl J Med.* 2009;361(5):496–509.
6. M. Ammar et al, ‘‘Le psoriasis: physiopathologie et immunogenetique’’, *Pathologie Biologie* 62 (2014) 10–23
7. Rajan P. Nair, Philip Stuart, Tilo Henseler, Stefan Jenisch, Nicholas V.C. Chia, Eckhard Westphal, Nicholas J. Schork, Jane Kim, Henry W. Lim, Enno Christophers, John J. Voorhees, James T. Elder, (2000), Localization of Psoriasis-Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric to HLA-C. *ScienceDirect. Journal of American Science* 66:374-380.
8. Bhalerao J. and Bowcock A., (1998), The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system, *Hum. Mol. Genet.* 7:1537–1545.
9. Κοσμαδάκη Μ., Αντωνίου Χ., Αυγερινού Γ., Στρατηγός Α.Ι., Σταυρόπουλος Π., Ποτουρίδου Ε., Πολυδώρου Α., Στεφανάκη Ε., Κατσάμπας Α., (2007). Ψωρίαση 2008: θεραπευτικός οδηγός. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 18:2 161-173.
10. Valori Treloar MD, ‘‘Integrative dermatology for psoriasis: facts and controversies’’, *Clinics in Dermatology* (2010) 28, 93–99

11. Powles AV., Baker BS., Rutman AJ., McFadden JP., Valdimarsson H., Fry L. (1990). Epidermal rupture is the initiating factor for the Koebner response in psoriasis. *Acta Dermato Venereologica* 70(1):35-8.
12. Higgins E. (2000). Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.*25(2):107-10.
13. Fuchs, E. and Horsley, V. (2008) "More than one way to skin." *Genes and Development* 22, 976-985
14. Bos, J. et al. (1983) Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Archives of Dermatological Research* 275, 181-189
15. Nickoloff BJ. "The immunologic and genetic basis of psoriasis." *Arch Dermatol* 1999; 135:1104-1110.
16. Nestle, F.O. et al. (2005) Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *Journal of Experimental Medicine* 202,135-143
17. Zaba, L.C., Krueger, J.G. and Lowes, M.A. (2009) Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 302-308
18. Eedy, D.J. et al. (1990) Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *British Medical Journal* 300, 908
19. Zaba, L.C. et al. (2009) Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells.
20. Clark, R. et al. (2006) The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *Journal of Immunology* 176, 4431-4439

21. Albanesi, C., De Pita, O. and Girolomoni, G. (2007) Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clinics in Dermatology* 25, 581-588
22. Lowes, M.A., Bowcock, A.M. and Krueger, J.G. (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873
23. Homey, B. and Meller, S. (2008) Chemokines and other mediators as therapeutic targets in psoriasis vulgaris. *Clinics in Dermatology* 26, 539-545
24. Wolk, K. et al. (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology* 36, 1309-1323
25. Blauvelt, A. (2008) T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 1064-1067
26. Nair, R.P. et al. (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nature Genetics* 41, 199-204
27. Chang, M. et al. (2008) Variants in the 5q31 cytokine gene cluster are associated with psoriasis. *Genes and Immunity* 9, 176-181
28. Stojadinovic, O. et al. (2007) Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with
29. Schon, M.P. and Boehncke, W.H. (2005) Psoriasis. *New England Journal of Medicine* 352, 1899-1912
30. Borel JF. History of cyclosporine and of its early pharmacological development. (2002). *Wien Klin Wochenschr* 114(12):433-437.
31. Faerber L, Braeutigam M, Weidinger G, Mrowietz U, Christophers E, Schulze HJ, Mahrle G, Meffert H., Drechsler S. (2001). *Am J Clin Dermatol* 2(1):41-7.
32. Piskin G., Koomen CW., Picavet D., Bos JD., Teunissen MB. (2003). Ultraviolet-B irradiation decreases IFN-gamma and increases IL-4 expression

- in psoriatic lesional skin in situ and in cultured dermal T cells derived from these lesions. *Exp Dermatol* 12(2):172-80.
33. Delia Colombo and Antonino Di Pietro (2012). Systemic Cyclosporin in the Treatment of Psoriasis, Psoriasis, Dr. Jennifer Soung (Ed.), ISBN: 978-953-307-878-6.
 34. Prens et al., «Effects of cyclosporine on cytokines and cytokine receptors in psoriasis», *Journal of the American Academy of Dermatology*, December 1995, 947-953
 35. Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544–547.
 36. Schreiber, S.L., 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes. *Cell*66, 807–815.
 37. Schmid, F.X., 1995. Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr. Biol.* 5, 993–994.
 38. Klee, C.B., Draetta, G.F., Hubbard, M.J., 1988. Calcineurin. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 61, 149–209.
 39. S. Matsuda, S. Koyasu, ‘Mechanisms of action of cyclosporine’, *Immunopharmacology* 47, 2000, 119–125.
 40. Yiannis Vasilopoulos, Constantina Sarri1, Efterpi Zafiriou, Aikaterini Patsatsi, Costas Stamatis, Eleni Ntoumou, Ioakim Fassos, Aliko Tsalta, Aikaterini Karra, Angeliki Roussaki-Schulze, Dimitris Sotiriadis, Zissis Mamuris, Theologia Sarafidou, «A multi-center pharmacogenetic study of *ABCBI* polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population », 2014.
 41. Garrigues A., Escargueil A.E., Orłowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(2002) 99 10347–10352
 42. P Nigro et al, Cyclophilin A: a key player for human disease, Citation: *Cell Death and Disease* (2013)
 43. An P. et al. ‘Regulatory Polymorphisms in the Cyclophilin A Gene, PPIA, Accelerate Progression to AIDS’ *PLoS Pathog* 3(6): e88. doi:10.1371/journal.ppat.0030088, 2007

44. M. Palacín et al., A search for cyclophilin-A gene (*PPIA*) variation and its contribution to the risk of atherosclerosis and myocardial infarction, *International Journal of Immunogenetics* 35, 159–164, 2008
45. John Colgan, Mohammed Asmal, Bin Yu, and Jeremy Luban, « Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Cyclosporine », *The Journal of Immunology*, 2005, 174:6030-6038
46. Κοσμάδακη Μ., Αντωνίου Χ., Αυγερινού Γ., Στρατηγός Α.Ι., Σταυρόπουλος Π., Ποτουρίδου Ε., Πολυδώρου Α., Στεφανάκη Ε., Κατσάμπας Α., (2007). Ψωρίαση 2008: θεραπευτικός οδηγός. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 18:2 161-173.