

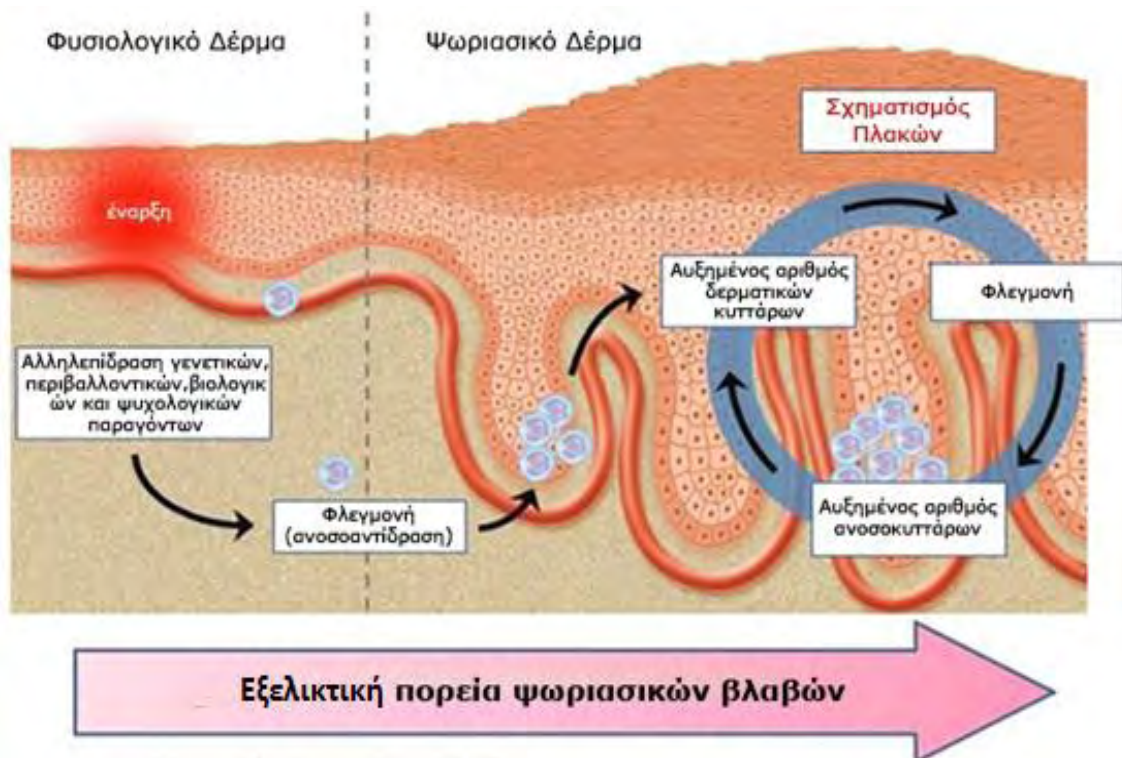


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ανάλυση συσχέτισης του γονιδίου *ABCB1* με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό

Ιωακείμ Φάσσοσ



ΛΑΡΙΣΑ 2013

Ανάλυση συσχέτισης του γονιδίου *ABCB1* με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό

Association study of *ABCB1* gene with psoriasis in the Greek population

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ζαφειρίου Ευτέρπη, Λέκτορας Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ρουσσάκη Αγγελική-Βικτωρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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 Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τον χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Ιωάννη Βασιλόπουλο για την συνεχή βοήθεια σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ρουσσάκη Αγγελική-Βικτωρία, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας και την Ζαφειρίου Ευτέρπη, Λέκτορας Δερματολογίας για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για την άψογη συνεργασία. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κωνσταντίνα Σαρρή για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την πειραματική εκτέλεση της διπλωματικής μου εργασίας, τις χρήσιμες συμβουλές της και την υπομονή της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τις συμφοιτήτριες μου Μαρία Μαρακαντώνη και την Πελαγία Κυριακίδου για την βοήθησαν όταν χρειάστηκε και δεν ήταν λίγες φορές, καθώς και για την άψογη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Ψωρίαση	6
1.1.1 Επιδημιολογία της ψωρίασης	6
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης	7
1.1.3 Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία	7
1.1.4 Ταξινόμηση με βάση την εντόπιση	11
1.1.5 Ιστολογικά χαρακτηριστικά	12
1.1.6 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση	13
1.1.7 Ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης.....	15
1.1.8 Νοσήματα που συνδυάζονται με την ψωρίαση.....	18
1.1.9 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης	18
1.2 Θεραπεία της ψωρίασης	18
1.2.1 Τοπική θεραπεία.....	19
1.2.2 Φωτοθεραπεία	20
1.2.3 Συστηματική θεραπεία	20
1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες.....	22
1.2.5 Νέα φάρμακα	24
1.3 Φαρμακογενετική	24
1.4 Σκοπός.....	27
2. Υλικά και μέθοδοι.....	28
2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	28
2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.....	29
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain reaction)..	30
2.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.....	32
2.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Frag- ment Length Polymorphism)	33
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	34
2.7 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	35
2.8 Στατιστική ανάλυση	36
3. Αποτελέσματα	37
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	37
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών	38
3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>ABCB1</i> με PCR	38
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP	39
3.5 Στατιστική ανάλυση	41
4. Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια φλεγμονώδης δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Είναι μια ασθένεια που επηρεάζει το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα. Υπάρχουν αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ψωρίασης. Η συστηματική θεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση σοβαρών μορφών ψωρίασης. Η θεραπεία με τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη, ή με συνδυασμό των δύο φαρμάκων αποτελεί την πιο συχνή μορφή θεραπείας. Ωστόσο, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν ετερογένεια στην απόκριση στην θεραπεία, η οποία να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού C3435T του γονιδίου *ABCB1*, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 58 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 έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού 3435C>T του γονιδίου *ABCB1* με την μη ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες ($p=0.039$). Το γονίδιο *ABCB1* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (P-gr). Ο πολυμορφισμός 3435C>T είναι μια σιωπηλή μετάλλαξη και δεν οδηγεί σε αλλαγή της αμινοξικής αλληλουχίας της Ρ-gr. Πιθανώς αυτός ο συνώνυμος πολυμορφισμός, 3435C>T, να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλο μη συνώνυμο πολυμορφισμό, ο οποίος τροποποιεί την έκφραση της Ρ-gr. Ωστόσο επειδή το δείγμα των ασθενών είναι σχετικά μικρό, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια αυτοάνοση ασθένεια του δέρματος που προκαλείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ψωρίαση είναι μια φλεγμονώδης δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η διέγερση της απόκρισης των κερατινοκυττάρων οφείλεται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα Τ-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, αρκετές κυτταροκίνες και κάποιες χημειοκίνες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου (Lowes et al, 2007).

1.1.1 Επιδημιολογία της ψωρίασης

Πίνακας 1.1: Η συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης σε διαφορές γεωγραφικές περιοχές, (Menter & Stoff, 2010)

Χώρα/περιοχή	Ο υπό εξέταση πληθυσμός	Συχνότητα εμφάνισης ψωρίασης (%)
Ηνωμένο Βασίλειο	7,500,000	1,5
Η.Π.Α (Καυκάσιοι)	21,921	2,5
Η.Π.Α (Αφροαμερικανοί)	2,443	1,3
Νορβηγία	10,576	1,4
Σουηδία	159,200	2,3
Ιταλία	3,660	3,1
Κροατία	8,416	1,5
Αυστραλία	10,037	2,3
Νησιά Φαρόε	10,984	2,8
Ινδία	20,000	0,8
Κίνα	670,000	0,3
Αρκτική	-	11,8
Νότια Αμερική – Ιθαγενείς	25,000	0
Σαμόα	12,569	0

Η ψωρίαση προσβάλλει το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά η συχνότητα εμφάνισής της ποικίλλει σημαντικά. Στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ η συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης στο γενικό πληθυσμό υπολογίζεται σε περίπου 2%, ενώ συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης είναι χαμηλή σε ορισμένες εθνικότητες, όπως στους Ιάπωνες, ενώ πολύ σπάνια εμφανίζεται στους αυτόχθονες Αυστραλούς και στους Ινδιάνους της Ν. Αμερικής. Προσβάλλει και τα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Αν και η ψωρίαση μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν για πρώτη φορά τις

χαρακτηριστικές ψωριασικές αλλοιώσεις στη 3^η δεκαετία της ζωής με το 75% των ασθενών πριν την ηλικία των 40 ετών (Farber & Nall 1974).

Οι Henseler και Christophers (1985) εξέτασαν 2.147 ασθενείς και με βάση την ηλικία των ασθενών κατά την πρώτη εκδήλωση της νόσου διέκριναν 2 κλινικούς τύπους ψωρίασης. Ο τύπος I, που είναι ο συχνότερος (ευθύνεται για περισσότερο από το 75% των περιπτώσεων), εμφανίζεται σε εφήβους και νέους ενήλικες (16-22 ετών), και σχετίζεται με υψηλές τιμές των δεικτών του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA ενώ παρουσιάζει έντονη τάση γενίκευσης των δερματικών αλλοιώσεων. Ο τύπος II, εμφανίζεται σε μεγαλύτερους ενήλικες (57-60 ετών) και συνδυάζεται με χαμηλές τιμές των δεικτών HLA.

1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια από την εμφάνιση λίγων εντοπισμένων βλαβών μέχρι την εκδήλωση εκτεταμένης και γενικευμένης νόσου. Η ψωρίαση εκδηλώνεται τυπικά με την εμφάνιση ερυθματολεπιδωδών βλατίδων, φλεγμονώδεις βλάβες διαμέτρου μικρότερης των 5 χλστ., οι οποίες αυξάνονται προοδευτικά σε μέγεθος και συρρέουν σε πλάκες διαφόρου σχήματος και μεγέθους. Οι ψωριασικές πλάκες διαφέρουν σαφώς από το υγιές δέρμα, καλύπτονται από παχιά, ξηρά και εύθρυπτα λέπια και μερικές φορές περιβάλλονται από λευκωπό δακτύλιο γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff. Η ψωρίαση μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Εκλεκτικές θέσεις εντόπισής της είναι οι αγκώνες, τα γόνατα, το τριχωτό της κεφαλής, η ιερά χώρα, ο ομφαλός, οι παλάμες, τα πέλματα και τα γεννητικά όργανα (Griffiths et al, 2007).

1.1.3 Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία

Με βάση τους κλινικούς μορφολογικούς χαρακτήρες των δερματικών αλλοιώσεων διακρίνονται οι ακόλουθες μορφές ψωρίασης:

1. Κοινή ή κατά πλάκας ψωρίαση



Εικόνα 1.1: Ψωρίαση κατά πλάκας, (Roberson & Bowcock, 2010)

Η συχνότερη μορφή της ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας ή ψωρίαση Vulgaris, (Εικόνα 1.1) που έχει παρατηρηθεί σε περισσότερο από το 80% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από σαφώς περιγεγραμμένες ερυθρές πλάκες που καλύπτονται από αργυρόχρωσα λέπια. Οι ψωριασικές βλάβες μπορούν αρχικά να ξεκινήσουν ως ερυθματώδεις πλάκες, με διάμετρο από 1-10εκ. ή και περισσότερο και ξεχωρίζουν σαφώς από το υγιές δέρμα. Οι ψωριασικές πλάκες καλύπτονται από παχιά, ξηρά και

εύθρυπτα λέπια και μερικές φορές περιβάλλονται από ένα λευκωπό δακτύλιο γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff.

Η ψωρίαση κατά πλάκας ενδέχεται να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος, ωστόσο τα γόνατα, οι αγκώνες, το τριχωτό της κεφαλής και ο κορμός αποτελούν εκλεκτικές εντοπίσεις της μορφής αυτής (Griffiths et al, 2007).

2. Σταγονοειδής ψωρίαση



Εικόνα 1.2: Σταγονοειδής ψωρίαση, (Roberson & Bowcock,

Η σταγονοειδής ψωρίαση (Εικόνα 1.2) είναι η δεύτερη συχνότερη μορφή, υπολογιζόμενη στο 18% των περιπτώσεων της νόσου. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ερυθματολεπιδωδών βλατίδων διαμέτρου λίγων χιλιοστών, οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του σώματος. Πιο συχνά προσβάλλεται ο κορμός, σπανιότερα οι παλάμες και τα πέλματα. Προσβάλλει κυρίως παιδιά και άτομα νεαρής ηλικίας. Σε πολλούς ασθενείς το εξάνθημα έπεται μιας εστιακής οξείας λοίμωξης, συχνότερα του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος, στρεπτοκοκκικής κυρίως αιτιολογίας (Baker et al, 1991).

3. Ανάστροφη ψωρίαση (ψωρίαση των πτυχών)



Εικόνα 1.3: Ανάστροφη ψωρίαση, (Roberson & Bowcock, 2010)

Η ανάστροφη ψωρίαση (Εικόνα 1.3) εμφανίζεται κυρίως στις παρακάτω περιοχές του σώματος: μηροβουβωνικές, μασχαιαίες, υπομαστικές, μεσογλουτιαία σχισμή, παλάμες και πέλματα. Ονομάζεται επίσης καμπτική ψωρίαση ή ψωρίαση των πτυχών και συχνά οι βλάβες επιμολύνονται. Προσβάλλονται συχνότερα οι μεσήλικες ή οι ηλικιωμένοι, ιδιαίτερα δε τα παχύσαρκα άτομα λόγω έντονης τριβής του δέρματος (φαινόμενο Koebner). Η ψωρίαση των πτυχών προκαλεί σημηματορροϊκή δερματίτιδα, παράτριμμα-σύγκαμα ή δερμοφυτίαση, η οποία οφείλεται σε μύκητες γνωστούς με

το όνομα δερματόφυτα, τα οποία προσβάλλουν την κεράτινη στοιβάδα της επιδερμίδα (Gelfand et al, 2007).

4. Φλυκταινώδης ψωρίαση

Υπάρχουν δύο τύποι φλυκταινώδους ψωρίασης: η εντοπισμένη φλυκταινώδης ψωρίαση παλαμών / πελμάτων και η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση (von Zumbusch).



Εικόνα 1.4: Εντοπισμένη φλυκταινώδης ψωρίαση παλαμών/ πελμάτων, (Hong et al, 2011)



Εικόνα 1.5: Γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση, (Roberson & Bowcock, 2010)

Η φλυκταινώδης ψωρίαση οφείλεται στην συνάθροιση πολυμορφοπύρηνων στην επιδερμίδα. Χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φλυκταινών και οφείλεται στην συνάθροιση πολυμορφοπύρηνων στην επιδερμίδα.

Η εντοπισμένη παλαμο-πελματιαία φλυκταίνωση (Εικόνα 1.4) χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση φλυκταινών, διαμέτρου 2 έως 8mm, που σχηματίζονται πάνω σε έντονα ερυθματώδεις συμμετρικές πλάκες στις παλάμες και στα πέλματα. Οι φλύκταινες περιέχουν άσηπτο πυώδες υγρό το οποίο με την πάροδο του χρόνου (7-10 ημέρες) αποξηραίνεται δημιουργώντας μία κιτρινόφαιη ή καφεοειδή βλατίδα. Ο τύπος αυτός προσβάλλει κυρίως ενήλικες και συχνότερα τις γυναίκες από τους άνδρες.

Η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση (Εικόνα 1.5) είναι μια πολύ σπάνια και βαριά νόσος και χαρακτηρίζεται από οξεία γενικευμένη φλυκταίνωση που συνδυάζεται με υψηλό πυρετό (39-40°) και εμφάνιση ερυθματωδών πλακών μεγάλης διαμέτρου, οι οποίες έχουν έντονα ερυθρά απόχρωση, είναι ελαφρά οιδηματώδεις, με ελάχιστη (ή καθόλου) απολέπιση και καλύπτονται από μικρές (1-3mm) φλύκταινες με στείρο κίτρινο περιεχόμενο. Σε ορισμένες περιοχές, οι φλύκταινες συνενώνονται σε μεγαλύτερους πυώδεις σχηματισμούς σχηματίζοντας πυώδεις “λίμνες”.

Συστηματικές επιπλοκές όπως αφυδάτωση και δευτεροπαθείς

βακτηριακές λοιμώξεις πρέπει να αντιμετωπίζονται έγκαιρα και σωστά καθώς η νόσος αυτή μπορεί να αποβεί θανατηφόρος (Roth et al 1991).

5. Ερυθροδερμική ψωρίαση



Εικόνα 1.6: Ερυθροδερμική ψωρίαση (Menter et al. 2008)

Η ερυθροδερμική ψωρίαση (Εικόνα 1.6) χαρακτηρίζεται κλινικά από την εμφάνιση πολλαπλών ερυθρηματολεπιδωδών ελάχιστα διηθημένων πλακών οι οποίες καλύπτουν ολόκληρη την επιφάνεια του σώματος. Η προσβολή του δέρματος μπορεί να είναι ολική. Το εξάνθημα εμφανίζει ένα βαθύ ερυθρό χρώμα με ποικίλου βαθμού απολέπιση. Η μορφή αυτή της νόσου μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Συνήθως όμως οφείλεται σε επιδείνωση των υπολοίπων μορφών, οι οποίες μεταπίπτουν σε αυτή την μορφή ψωρίασης μετά από λανθασμένη τοπική θεραπευτική αγωγή, έντονη και παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή ή

υπεριώδη ακτινοβολία ή επίδραση άλλων παραγόντων.

Στις συστηματικές διαταραχές που παρουσιάζουν οι περισσότεροι ασθενείς περιλαμβάνονται υπο- και υπερθερμία, απώλεια πρωτεϊνών και σιδήρου και ηλεκτρολυτικές διαταραχές. Αφυδάτωση, νεφρική και καρδιακή ανεπάρκεια δεν είναι ασυνήθεις, ενώ αναφέρονται και περιπτώσεις οξέος συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας και σήψης (Green et al 1996).

6. Η ψωριασική αρθρίτιδα (αρθροπαθητική ψωρίαση)



Εικόνα 1.7: Ψωριασική αρθρίτιδα, (Menter et al. 2008)

Η ψωριασική αρθρίτιδα (Εικόνα 1.7) είναι μια μορφή η οποία χαρακτηρίζεται από έντονα φλεγμονώδη αρθρίτιδα και προσβολή του δέρματος. Προσβολή των οστών και των αρθρώσεων παρατηρείται σε ποσοστό 7%-10% των ψωριασικών ασθενών και εμφανίζεται 6-10 χρόνια μετά τις πρώτες δερματικές αλλοιώσεις (75%), ή ταυτόχρονα με αυτές (15%). Τυπικά κλινικά ευρήματα της νόσου είναι οίδημα, ερύθημα, άλγος και περιορισμός της κινητικότητας των αρθρώσεων (Τσαμπάος 2004).

1.1.4 Ταξινόμηση με βάση την εντόπιση

Με βάση την εντόπιση της νόσου διακρίνονται οι ακόλουθες μορφές ψωρίασης:

1. Ψωρίαση τριχωτού της κεφαλής



Εικόνα 1.8: Ψωρίαση του τριχωτού κεφαλής, (Zeichner, 2010)

Το τριχωτό της κεφαλής (Εικόνα 1.8) αποτελεί μια από τις συχνότερες εντοπίσεις της ψωρίασης. Οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις μπορούν να είναι διάχυτες ή να περιορίζονται συνήθως στην πρόσθια περιοχή και οπισθοωτιαία χώρα. Συχνά η εντόπιση της νόσου στο τριχωτό συνοδεύεται από αλωπεκία τελογενούς τύπου, διακοπή της φυσιολογικής εξέλιξης του κύκλου ζωής των μαλλιών: τα μαλλιά, που βρίσκονται κατά 85% στην αναγεννητική φάση, εισέρχονται απότομα στην τελογενή φάση, που είναι το τελευταίο στάδιο στη διάρκεια ζωής της τρίχας, και σε περιπτώσεις σοβαρής και χρόνιας προσβολής μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και ουλωτική αλωπεκία (Van de Kerkhof & Chang 1999).



Εικόνα 1.9: Ψωρίαση του βλεννογόνου του στόματος, (Menter & Stoff, 2010)

2. Ψωρίαση των βλεννογόνων

Η ψωρίαση σπάνια προσβάλλει τους βλεννογόνους (Εικόνα 1.9) της στοματικής κοιλότητας με την μορφή στοματίτιδας και γλωσσίτιδας αλλά συχνά, ειδικά στους άνδρες, τους βλεννογόνους των γεννητικών οργάνων, με την μορφή ερυθματολεπιδωδών σαφώς περιγεγραμμένων πλακών (Farber & Nall 1992).



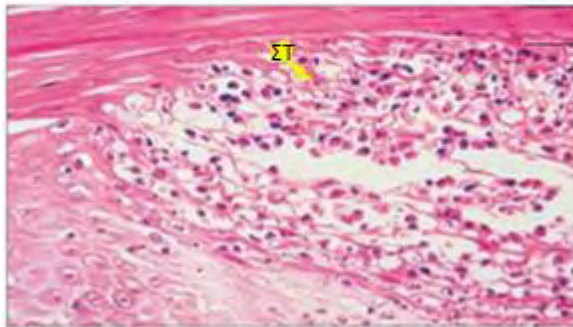
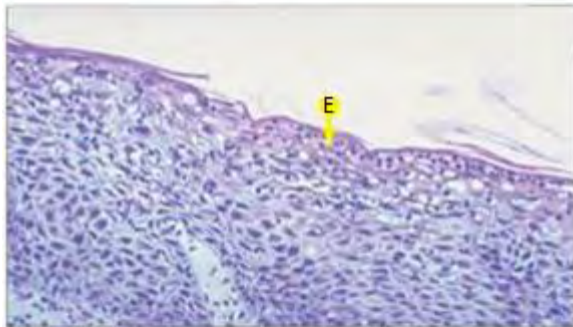
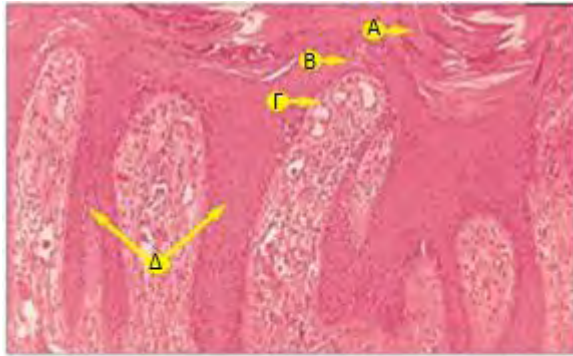
Εικόνα 1.10: Ψωρίαση πρόσωπου, (Menter & Stoff, 2010)

3. Ψωρίαση πρόσωπου

Οι ψωριασικές βλάβες στο πρόσωπο (Εικόνα 1.10) είναι σπάνιες, πιθανώς λόγω της συνεχούς έκθεσης στη θεραπευτική επίδραση του ήλιου και ειδικότερα στην υπεριώδη ακτινοβολία. Όταν η νόσος προσβάλλει το πρόσωπο, εμφανίζεται με τη μορφή σαφώς περιγεγραμμένων ερυθματολεπιδωδών πλακών που δημιουργούν έντονο αισθητικό πρόβλημα στους ασθενείς (Van de Kerkhof 1999).

1.1.5 Ιστολογικά χαρακτηριστικά

Η ιστολογική εικόνα μιας τυπικής ψωριασικής δερματικής βλάβης χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο. Η ιστοπαθολογική εικόνα της ψωρίασης ποικίλλει αναλόγως της μορφής, της ηλικίας και της εντόπισης της εξεταζόμενης βλάβης. Σε μια πλήρως ανεπτυγμένη ψωριασική πλάκα, και ειδικότερα στην περιφέρεια αυτής, παρατηρούνται οι εξής ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις:



Εικόνα 1.11: Α) παρακετάρωση Β) λέπτυνση της υπερθηλαίας μοίρας της επιδερμίδας Γ) Έντονη διαστολή και ελικοειδής διαμόρφωση των τριχοειδών Δ) επιμήκυνση των ραβδώσεων Rete Ε) μικροαποστήματα Munro ΣΤ) σπογγοειδή φλυκταινίδια του Kogoj, (Menter & Stoff, 2010)

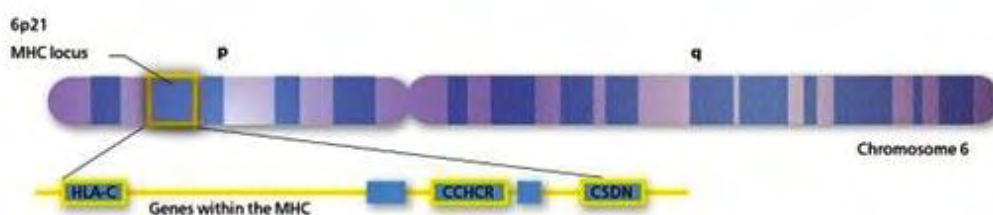
1) Στην κεράτινη στοιβάδα παρατηρείται υπερκεράτωση και παρακεράτωση, δηλαδή διατήρηση των πυρήνων στα κερατινοκύτταρα, (Εικόνα 1.11Α). 2) Λέπτυνση της υπερθηλαίας μοίρας της επιδερμίδας (Εικόνα 1.11Β) και δημιουργία μικρών σπογγοειδών φλυκταινιδίων, του Kogoj, (Εικόνα 1.11ΣΤ) λόγω συσσώρευσης πολυμορφοπυρήνων ουδετερόφιλων. 3) Στο θηλώδες χόριο παρατηρούνται διευρυμένα και ελικοειδή τριχοειδή (Εικόνα 1.11Γ) σε συνδυασμό με διάχυτη και περιαγγειακή φλεγμονώδη διήθηση που περιλαμβάνει κυρίως Τ λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα και μακροφάγα 4) Στην επιδερμίδα σημειώνεται έντονη ακάνθωση (πάχυνση της επιδερμίδας) και επιμήκυνση των ραβδώσεων Rete, των δερματικών πτυχώσεων, (Εικόνα 1.11Δ). 5) Τα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα δια μέσου των διευρυμένων αγγείων του χορίου εισέρχονται στην επιδερμίδα δημιουργώντας μικρά αποστήματα στην κεράτινη στοιβάδα, μικροαποστήματα Munro (Εικόνα 1.11Ε). 6) Πολλαπλές μιτώσεις όχι μόνο στην βασική στοιβάδα της επιδερμίδας, όπως στο φυσιολογικό δέρμα αλλά και στα κατώτερα κύτταρα της ακανθωτής στοιβάδας (Wagner et al, 2010).

1.1.6 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (π.χ. τραύμα, άγχος, λοιμώξεις και φάρμακα) συμβάλουν στην εκδήλωση της νόσου, σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η υπερβολική ενεργοποίηση και ο ανεπαρκής έλεγχος της ανοσο-φλεγμονώδους απόκρισης στο δέρμα, οδηγεί σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων.

Γενετικοί παράγοντες

Η γενετική βάση της ψωρίασης έχει τεκμηριωθεί από επιδημιολογικά δεδομένα. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν 2 μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες έχουν διεξαχθεί στα νησιά Φερόε και στη Σουηδία. Στην πρώτη αναφέρεται ότι ποσοστό 91% των ασθενών με ψωρίαση είχαν τουλάχιστον έναν πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενή με ψωρίαση (Lomholt 1963), ενώ στην δεύτερη υπολογίζεται ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σε συγγενή πρώτου βαθμού ψωριασικών ασθενών ανέρχεται σε 2,7. Υπέρ της κληρονομικής φύσης της ψωρίασης συνηγορεί επίσης και η ανίχνευση της νόσου σε ποσοστό 65-72% των μονοζυγωτικών διδύμων, ενώ στα δυζυγωτικά δίδυμα το αντίστοιχο ποσοστό υπολογίζεται σε 15-30% (Bhalerao & Bowcock 1998).



Εικόνα 1.12: Πολλαπλοί γενετικοί τόποι εντός του MHC στο χρωμόσωμα 6 έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *CCHCR1*, *CDSN* και *HLA*, (Menter & Stoff, 2010)

Ο γενετικός τόπος PSORS1 (psoriasis susceptibility 1) στην χρωμοσωματική περιοχή 6p21.3, ο οποίος εδράζεται στην περιοχή του MHC, θεωρείται ο σημαντικότερος και οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται στην ανίχνευση του γονιδίου (ή των γονιδίων) που σχετίζονται με την ψωρίαση στην περιοχή αυτή. Τρία γονίδια που υπάρχουν σε αυτήν την περιοχή είναι εκείνα που κωδικοποιούν το *HLA-C*, την κορνεοδεσμοσίνη (Corneodesmosin, *CDSN*) και το *CCHCR* (Εικόνα 1.12) (Lebwohl 2003). Το *HLA-Cw*0602*, μια παραλλαγή του *HLA-C*, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη MHC τάξης I και έχει συσχετιστεί με την πρώιμη έναρξη της χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας και με την σταγονοειδή ψωρίαση. Αυτή η παραλλαγή έχει προσδιοριστεί ως η υπεύθυνη για την ψωρίαση στο γενετικό τόπο PSORS1. Το γονίδιο *CCHCR1* κωδικοποιεί την (Coiled-Coil α -Helical Rod Protein 1), η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα, και ίσως είναι ένας ρυθμιστής του

πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Το γονίδιο *CDSN* κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και ίσως εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα (Nair et al, 2006). Ο γενετικός τόπος PSORS1 είναι υπεύθυνος για το 35-50% της γενετικής βάσης (Veal et al 2002), αλλά δεν εξηγεί το σύνολο της γενετικής προδιάθεσης.

Οι Tomhfohrde et al (1994) ταυτοποίησαν ένα γενετικό τόπο στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 του άνθρωπου, τον PSORS2, ο οποίος φαίνεται πως συμμετέχει στους μηχανισμούς εκδήλωσης της ψωριασικής προδιάθεσης. Άλλοι γενετικοί τόποι, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την ψωριασική προδιάθεση σε μελέτες διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων είναι οι εξής: ο PSORS4 στην χρωμοσωματική περιοχή 1q, ο PSORS5 στην 3q, ο PSORS7 στην 1p και ο PSORS8 στην 16q για την ψωριασική αρθρίτιδα (Lebwohl 2003).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την εκδήλωση των ψωριασικών αλλοιώσεων, την επιδείνωση των ήδη υπαρχουσών ή την μετάπτωση της μιας μορφής της νόσου σε άλλη σοβαρότερη.

Φαινόμενο Koebner: Το 1876 πρώτος ο Koebner παρατήρησε την εμφάνιση ψωριασικών αλλοιώσεων στις θέσεις τραυματισμού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνισή του 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).

Φάρμακα

Αρκετά χορηγούμενα φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν την εκδήλωση ή επιδείνωση της ψωρίασης:

- 1. Λίθιο:** Στους πιθανούς μηχανισμούς συγκαταλέγεται η επίδραση του λιθίου στο c-AMP, στην λειτουργική δραστηριότητα λεμφοκυττάρων και ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων και στην αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TGF α , IL-2 και IFN- γ (Ockenfels et al 1996).
- 2. β -blockers:** Μέσω αναστολής των β -αδρενεργικών υποδοχέων εμφανίζεται διαταραχή στα επίπεδα του c-AMP και ακόλουθη διέγερση της μιτωτικής δραστηριότητας των επιδερμικών κυττάρων (Abel et al 1986).
- 3. Κορτικοστεροειδή:** Η απότομη διακοπή τόσο των τοπικών όσο και των συστηματικώς χορηγούμενων κορτικοειδών μπορεί να επιδεινώσει τις ψωριασικές αλλοιώσεις ή να προκαλέσει μετάπτωση της νόσου στην φλυκταινώδη της μορφή.
- 4. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη:** Εξαιτίας της αναστολής της μεταβολικής οδού της κυκλοοξυγενάσης, υπάρχει συσσώρευση αραχιδονικού οξέος και καταβολισμός του μέσω της 5- λιπooξυγενάσης. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν ενεργοποιούν τη χημειοταξία των ουδετεροφίλων πολυμορφοπυρήνων και αυξάνουν την δραστηριότητα και την συγκέντρωση του κυκλικού GMP (Abel et al 1986).

Λοιμώξεις: Διάφορες λοιμώξεις προκαλούν ή επιδεινώνουν την νόσο. Η σχέση της της στρεπτοκοκκικής λοίμωξης με την εμφάνιση οξείας σταγονοειδούς ψωρίασης

οδηγεί σε αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κερατινοκυττάρων και προκαλεί την εκδήλωση ψωριασικών βλαβών. Σε αρκετούς ασθενείς με λοίμωξη από HIV η ψωρίαση εκδηλώνεται πέντε περίπου χρόνια μετά την μόλυνση (Wolfer et al 1998).

Αλκοόλ: Η κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί επιδείνωση της ψωρίασης. Ιδιαίτερη συσχέτιση υπάρχει μεταξύ αλκοολισμού και ψωρίασης παλαμών/πελμάτων λόγω αποβολής της αιθανόλης μέσω των ιδρωτοποιών αδένων. Η αιθανόλη στο ψωριασικό δέρμα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και προκαλεί αύξηση της χημειοταξίας των πολυμορφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή κυτταροκινών (Ockenfels et al 1996).

Κάπνισμα: Το κάπνισμα αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα, ιδιαίτερα στις γυναίκες, για την εκδήλωση ψωρίασης. Αναφέρεται ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και ψωρίασης παλαμών/πελμάτων. Η επίδραση του καπνίσματος στην ψωρίαση αποδίδεται στην αύξηση της κινητικότητας και χημειοταξίας των πολυμορφοκυττάρων και στην οξειδωτική βλάβη που προκαλεί ο καπνός (Higgins 2000).

Ψυχογενείς παράγοντες: Το έντονο ψυχικό στρες προκαλεί επιδείνωση της ψωρίασης σε ποσοστό 66-71% των ασθενών, ενώ σε ποσοστό 35% η νόσος εκδηλώνεται σε περιόδους ψυχικής φόρτισης.

Ενδοκρινικοί παράγοντες: Η μερική ή ολική υποχώρηση της νόσου κατά την εγκυμοσύνη καθώς και μετά την χορήγηση ανταγωνιστών της αυξητικής ορμόνης (σωματοστατίνης) αποτελούν σαφείς ενδείξεις συμμετοχής των ορμονών στην ψωρίαση (Camisa et al 1989).

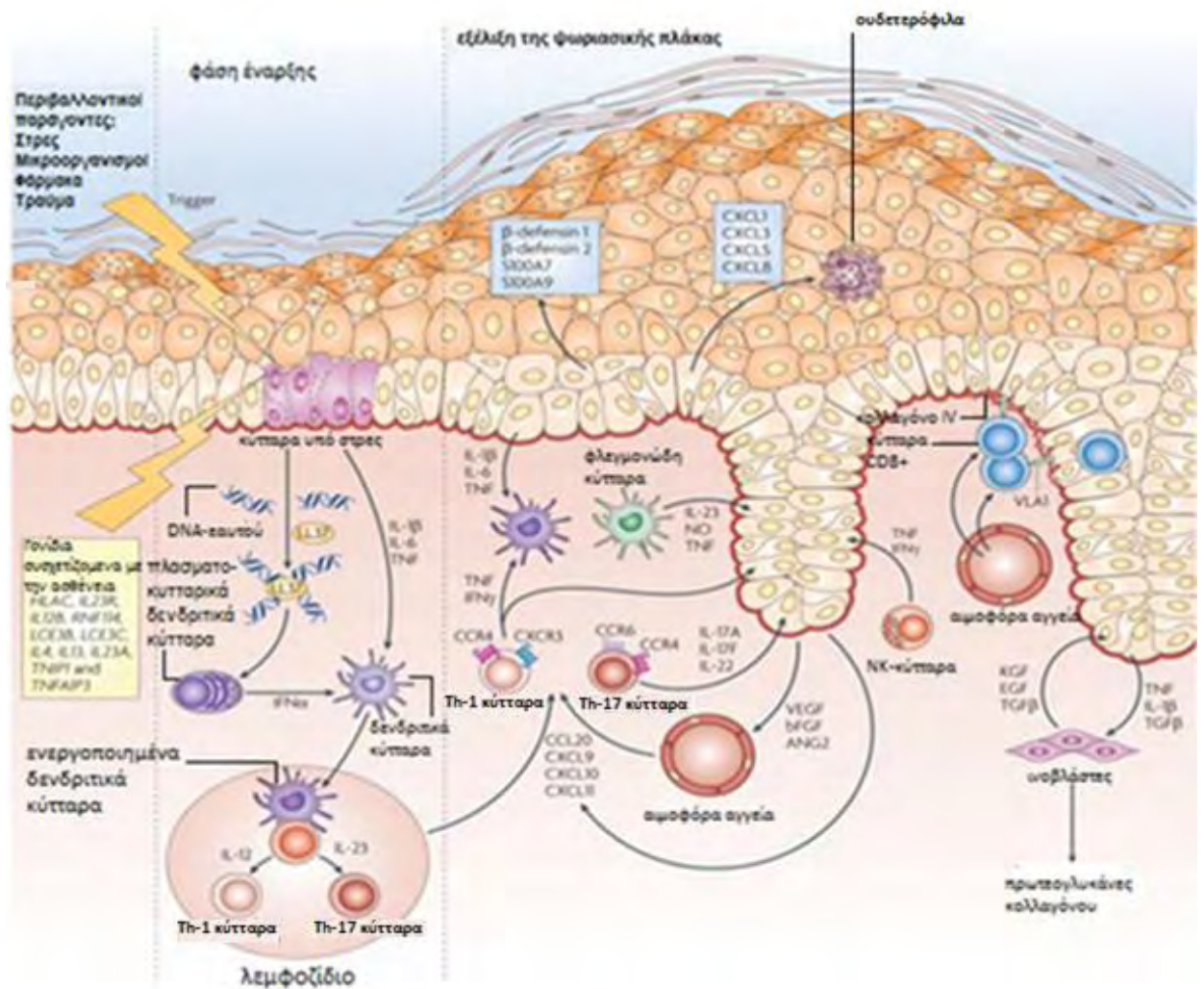
1.1.7 Ανοσοπαθγένεια της ψωρίασης

Το δέρμα αποτελείται από 3 στοιβάδες: την εξωτερική στοιβάδα ή επιδερμίδα, την ενδιάμεση στοιβάδα ή χόριο και την εσωτερική στοιβάδα ή υποδερμίδα. Η επιδερμίδα, με τη σειρά της, αποτελείται από 4 στοιβάδες: τη βασική, την ακανθωτή, την κοκκώδη και την κεράτινη στοιβάδα. Τα κύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας αποτελούν έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους και πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανθρώπινου οργανισμού. Στην ψωριασική επιδερμίδα παράγονται περίπου 35.000 επιθηλιακά κύτταρα/mm² ενώ στην φυσιολογική επιδερμίδα η αντίστοιχη τιμή ανέρχεται σε 1.246 κύτταρα/mm². Ενώ η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στην φυσιολογική επιδερμίδα είναι 311 ώρες ο κυτταρικός κύκλος στην ψωριασική επιδερμίδα διαρκεί μόλις 36 ώρες (Weinstein et al 1985). Ο αριθμός των μιτώσεων και η σύνθεση του DNA στα κύτταρα της βασικής στιβάδας αυξάνονται κατά 8 περίπου φορές στην ψωριασική σε σχέση με την φυσιολογική επιδερμίδα. Η χρονική διάρκεια επίσης της ωριμάνσης και απόπτωσης ενός κερατινοκυττάρου (μεταβάσης δηλαδή από την βασική στην κεράτινη στιβάδα) ανέρχεται στις 26 ημέρες στην φυσιολογική και μόλις 4 στην ψωριασική επιδερμίδα, δηλαδή τα κύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται πολύ εντονότερα από τον φυσιολογικό

ρυθμό (Ortonne 1996).

Η ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης είναι πολύπλοκη. Πρωταρχικό ρόλο στην έναρξη και διατήρηση των ψωριασικών αλλοιώσεων παίζουν τα Τ-λεμφοκύτταρα αφού η φλεγμονώδης διήθηση στο χόριο προηγείται των επιδερμικών βλαβών. Προκειμένου τα Τ λεμφοκύτταρα να ασκήσουν αυτές τις επιδράσεις στα κύτταρα της επιδερμίδας ενεργοποιούνται από τα κύτταρα Langerhans, APCs. Τα κύτταρα Langerhans είναι δενδριτικά κύτταρα που παράγουν κυτταροκίνες, TNF- α , IL-6, IL-8 και IL-12, (Εικόνα 1.13). Βρίσκονται στην επιδερμίδα και διεγείρονται με τη σειρά τους από άγνωστα αντιγόνα, μηχανικούς ερεθισμούς, εκκρινικές ουσίες των νευρικών απολήξεων στο δέρμα και άλλους παράγοντες υπό διερεύνηση και παρατηρείται μετανάστευσή τους στους επιχώριους λεμφαδένες. Εκεί το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (APC) αλληλεπιδρά με τα Τ λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους (Εικόνα 1.13). Η ενεργοποίηση αυτή προϋποθέτει την μεταγωγή δύο σημάτων από τα APC. 1ο σήμα: Παρουσίαση αντιγόνων (Ag) από τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα (APC) στα Τ λεμφοκύτταρα μέσω των αντιγόνων MHC (MHC τάξεως I για τα CD8 και τάξεως II για τα CD4) και του συμπλόκου CD3/TCR (υποδοχέας των Τ λεμφοκυττάρων). 2ο σήμα: Αλληλεπίδραση και διέγερση του μορίου CD2 των Τ λεμφοκυττάρων από το LFA-3 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, του CD28 από το B7 και του LFA-1 από το ICAM-1 (Gottlieb et al, 2005).

Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των ανώριμων Τ λεμφοκυττάρων (CD45RA⁺) μερικά από τα οποία αποκτούν χαρακτηριστικά κυττάρων μνήμης (CD45RO⁺), εισέρχονται στην συστηματική κυκλοφορία και εξέρχονται στα σημεία φλεγμονής μέσω αλληλεπίδρασης του μορίου LFA-1 με το μόριο προσκόλλησης ICAM-1 το οποίο εκφράζεται στο παθολογικό ενδοθήλιο των αγγείων καθώς και στα κερατινοκύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας (Εικόνα 1.13). Στην επιδερμίδα και το χόριο των ψωριασικών αλλοιώσεων τα Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν πληθώρα κυτταροκινών τύπου Th1 (κυρίως IFN- γ , IL-2 και TNF- α), οι οποίες είναι σε θέση να διεγείρουν τα γειτονικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα, κερατινοκύτταρα) και να εκκρίνουν και αυτά τις δικές τους κυτταροκίνες (Prinz 2003). Τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας, η μειωμένη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών αγγειακών διαταραχών. Στην επιδερμίδα των ψωριασικών βλαβών επικρατούν τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα, ενώ τα CD4⁺ απαντώνται συχνότερα στο ανώτερο τμήμα του χορίου (Gudjonsson et al 2004).



Εικόνα 1.13: Οι πληθυσμοί των κυττάρων και οι μεσολαβητές τους που εμπλέκονται στην ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης. Κατά τη φάση έναρξης, τα κερατινοκύτταρα υπό την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. λόγω στρες, μικροοργανισμών, φαρμάκων ή τράυματος) απελευθερώνουν DNA που σχηματίζει σύμπλοκα με το αντιμικροβιακό πεπτιδίο LL37. Τα σύμπλοκα αυτά ενεργοποιούν τα πλασματοκυτταρικά δερμικά κύτταρα (pDCs) που παράγουν ιντερφερόνη-α (IFNα). Τα κερατινοκύτταρα απελευθερώνοντας ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και τα pDC απελευθερώνοντας ιντερφερόνη-α (IFNα) ενεργοποιούν τα δερματικά DCs. Τα ενεργοποιημένα δερματικά DCs στην συνέχεια μεταναστεύουν προς τους επιχώριους λεμφαδένες για να παρουσιάσουν το άγνωστο αντιγόνο (είτε του εαυτού είτε μικροβιακής προέλευσης) στα ανώριμα T-κύτταρα και να προωθήσουν τη διαφοροποίησή τους σε T βοηθητικά 1 (TH1) ή / και Th17 κύτταρα. Τα Th1 και Th17 κύτταρα μεταναστεύουν μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων στο ψωριασικό χόριο, προελκυσόμενα από τις χημειοκίνες που απελευθερώνουν τα κερατινοκύτταρα και οδηγούν τελικά στο σχηματισμό της ψωριασικής πλάκας. Τα κύτταρα Th17 εκκρίνουν ιντερλευκίνη 17A (IL-17A), ιντερλευκίνη 17F (IL-17F) και ιντερλευκίνη 22 (IL-22), οι οποίες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και την απελευθέρωση των β-defensin 1, β-defensin 2 (αντιμικροβιακά πολυπεπτιδία), S100A7 και S100A9 και τις χημειοκίνες στρατολόγησης ουδετερόφιλων, CXCL1, CXCL3, CXCL5 και CXCL8. Στην δερμο-επιδερμική ένωση, τα κύτταρα μνήμης CD8 + που εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης VLA1, προσδένονται στο κολλαγόνο IV, επιτρέποντας την είσοδο των φλεγμονωδών κυττάρων μέσα στην επιδερμίδα και συμβάλλοντας στην παθογένεια της νόσου (Nestle et al. 2009).

κερατίνες που παράγονται στα πλαίσια της διαταραχής της πρωτεϊνοσυνθέσης στα κύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας παρουσιάζουν αντιγονικές ιδιότητες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αλυσίδας ανοσολογικών αντιδράσεων του χυμικού και κυτταρικού σκέλους της ανοσίας και άθροιση λευκοκυττάρων (κυρίως ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων) μέσα στην επιδερμίδα (Τσαμπάος 2004). Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η δράση των πρωτεασών που απελευθερώνονται από τα πολυμορφοπύρηνα ευθύνονται τουλάχιστον μερικά, για την έντονη μιτωτική δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας και για τη διείσδυση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων στην ψωριασική επιδερμίδα μέσω αποδόμησης του κολλαγόνου IV από την ελαστάση, πρωτεάση που απελευθερώνεται από τα τελευταία (Kuijpers et al 1996).

1.1.8 Νοσήματα που συνδυάζονται με την ψωρίαση

Παρά το γεγονός ότι η ψωρίαση είναι μια ασθένεια που επηρεάζει κατά κύριο λόγο μόνο το δέρμα και τις αρθρώσεις, μπορεί να συνυπάρχουν νοσήματα που να σχετίζονται με αυτή την ασθένεια (Gelfand et al 2007). Σακχαρώδης διαβήτης, καρδιακή ανεπάρκεια, παχυσαρκία και υπέρταση εμφανίζονται σε αυξημένη συχνότητα στους ψωριασικούς ασθενείς (Henseler & Christophers 1995). Θετική συσχέτιση έχει επίσης παρατηρηθεί με την ουρική αρθρίτιδα (Lundquist et al 1982).

1.1.9 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης

Η επίδραση της ψωρίασης στην ποιότητα ζωής του ασθενούς αξιολογείται με ερωτηματολόγια που συμπληρώνουν οι ασθενείς με τα οποία καταρτίζεται ο δείκτης ποιότητας ζωής DLQI (Dermatology Life Quality Index). Για παράδειγμα, μια μικρής έκτασης ψωρίαση που αφορά τις παλάμες, μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τη ζωή του ασθενούς (εργασία, κοινωνικές σχέσεις). Οι παράμετροι που συχνότερα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι ο BSA (Body Surface Area), το PASI (Psoriasis Area and Severity Index) και το PGA (Physicians Global Assessment). Το PASI, εκτός από την έκταση αξιολογεί και το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών. PASI 75 και PASI 90 σημαίνει μια 75% ή 90% αντίστοιχα βελτίωση του αρχικού PASI σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Έχει επικρατήσει ως μέθοδος αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου σε μελέτες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα φαρμάκων. Μια απόκριση σε θεραπεία θεωρείται ικανοποιητική όταν ο ασθενής έχει επιτύχει μια βελτίωση του αρχικού PASI τουλάχιστον 75 % (Mrowlerz et al. 2011).

1.2 Θεραπεία της ψωρίασης

Δεν υπάρχει καμία ριζική θεραπεία για την ψωρίαση. Υπάρχουν, όμως αποτελεσματικές κατασταλτικές θεραπείες που στοχεύουν στο να εξαφανίσουν τις βλάβες ή στο να περιορίσουν την έκταση και τη βαρύτητά τους, ώστε να είναι

ανεκτές από τον ασθενή. Η θεραπεία πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με την ανατομική εντόπιση, βαρύτητα, διάρκεια της νόσου, τις προηγούμενες θεραπείες και την ηλικία του ασθενούς. Η θεραπεία της ψωρίασης μπορεί να είναι αποκλειστικά τοπική, συστηματική ή συνδυασμός τοπικής και συστηματικής, καθώς και σε συνδυασμό με φωτοθεραπεία (Mrowlerz et al. 2011).

1.2.1 Τοπική θεραπεία

Λόγω του ευρέως φάσματος των κλινικών εκδηλώσεων και της χρόνιας φύσης της ψωρίασης, οι προσεγγίσεις στην θεραπεία για τους ασθενείς θα πρέπει να εξατομικεύονται λαμβάνοντας υπόψη την έκταση των βλαβών του δέρματος, την ύπαρξη άλλων νοσημάτων καθώς και τους παράγοντες που την προκαλούν, όπως το ψυχολογικό στρες ή οι λοιμώξεις. Σε γενικές γραμμές, η ψωρίαση μπορεί να αντιμετωπιστεί με τοπικά φάρμακα και φωτοθεραπεία (PUVA και UVB), ιδιαίτερα για εκείνους τους ασθενείς που έχουν περιορισμένη μορφή της νόσου (Menter & Griffiths, 2007).

Κερατολυτικά: Η τοπική εφαρμογή κερατολυτικών στις ψωριασικές βλάβες είναι απαραίτητη προκειμένου να απομακρυνθούν τα λέπια και να διευκολυνθεί η δράση άλλων τοπικών θεραπευτικών παραγόντων. Τα συνηθέστερα κερατολυτικά που χρησιμοποιούνται είναι η ουρία και το σαλικυλικό οξύ (Hagemann & Proksch 1996).

Τοπικά κορτικοστεροειδή: Αν και παρουσιάζουν αντιψωριασική δράση, προκαλούν παρενέργειες στο δέρμα όπως ατροφία, τηλαγγειεκτασίες, ραβδώσεις, ενώ η παρατεταμένη εφαρμογή ή η απότομη διακοπή τους μπορούν να οδηγήσουν σε μετάπτωση στην ερυθροδερμική ή φλυκταινώδη μορφή (Τσαμπάος 2004).

Ανθραλίνη: Η ανθραλίνη είναι ένα αντιψωριασικό φάρμακο που αλληλεπιδρά με τα νουκλεϊκά οξέα και αναστέλλει την σύνθεση του DNA και την ενσωμάτωση της ουρακίλης στο RNA. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί της θεραπευτικής της δράσης παραμένουν ασαφείς, πιστεύεται ωστόσο πως η δράση της σχετίζεται με την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες επιδρούν στα μόρια – στόχους (DNA, υδατάνθρακες, λιπίδια, ένζυμα, μεμβράνες, μιτοχόνδρια) (Fakas et al. 2001)

Παρασκευάσματα πίσσας: Κυριότερος εκπρόσωπος είναι η λιθανθρακόπισσα, η οποία ενσωματώνεται στο DNA των επιδερμικών κυττάρων αναστέλλοντας την σύνθεσή του. Η χρήση των σκευασμάτων αυτών καλό είναι να αποφεύγεται λόγω των κινδύνων που συνεπάγεται από την καρκινογενετική δράση τους (Lebwohl 2003).

Συνθετικά ανάλογα βιταμίνης D3: Υποδοχείς βιταμίνης D (VDRs) βρίσκονται στα κερατινοκύτταρα, στα μελανοκύτταρα, στα κύτταρα του Langerhans και στα T-λεμφοκύτταρα του φυσιολογικού δέρματος. Στην ψωρίαση παρατηρείται αυξημένη έκφραση των VDRs στις κατώτερες στιβάδες της επιδερμίδας όπως επίσης και σημαντική αύξηση των VDR στα ενδοεπιδερμικά και παραγγειακά T κύτταρα και μακροφάγα. Οι ιδιότητες των ανάλογων της βιταμίνης D είναι: 1) Αναστολή της

υπερπλασίας των Τ κυττάρων με διακοπή της μετάβασης των Τ κυττάρων από την αρχική στην τελική G φάση του κυτταρικού κύκλου. 2) Αναστολή της απελευθέρωσης διάφορων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών IL-2, IL-6, IL-8, ιντερφερόνης IFN- γ και του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- β . 3) Μείωση της συσσώρευσης ουδετερόφιλων στο ψωριασικό δέρμα. Κυριότερος εκπρόσωπος των ανάλογων της βιταμίνης D είναι η καλσιποτριόλη. Η καλσιποτριόλη προκύπτει από την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας της 1 α 24-διυδροξυβιταμίνης D₃. Η καλσιποτριόλη είναι αποτελεσματική και από μόνη της, αλλά έχει διαπιστωθεί επιπλέον δράση της όταν χρησιμοποιείται σε θεραπεία σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία, κυκλοσπορίνη, μεθοτρεξάτη και ρετινοειδή. (Page, et al 2000).

1.2.2 Φωτοθεραπεία

Φωτοθεραπεία με UVB

Η φωτοθεραπεία εφαρμόζεται στην θεραπεία της ψωρίασης, 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 υπεριώδους ακτινοβολίας κατά της ψωρίασης, 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).

Φωτοχημειοθεραπεία PUVA

Η PUVA (Psoralen+UVA) συνίσταται στον συνδυασμό μίας φωτοδυναμικής ουσίας (ψωραλενίου) με υπεριώδη ακτινοβολία τύπου A. Δύο ώρες περίπου μετά την χορήγηση του ψωραλενίου ακολουθεί ακτινοβολία με UVA σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις. Μέσω μιας φωτοχημικής αντίδρασης, η οποία δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου (τύπου I) τα ψωραλενία αντιδρούν με τις βάσεις πυριμιδίνης του DNA και ενσωματώνονται σε αυτό, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Παράλληλα μέσω φωτοχημικής αντίδρασης, η οποία απαιτεί την παρουσία οξυγόνου (τύπου II), σχηματίζονται ενεργοί μεταβολίτες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που προκαλούν οξειδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και την ακόλουθη καταστροφή τους. Οι παρενέργειες της θεραπείας αυτής περιλαμβάνουν κεφαλαλγία, ζάλη, ναυτία και κνησμό ενώ μακροπρόθεσμα παρατηρείται πρόωρη γήρανση, ξηρότητα, ρυτίδωση, διαταραχές χρώσης και καρκινογένεση του δέρματος (Ugano et al 1995).

1.2.3 Συστηματική θεραπεία

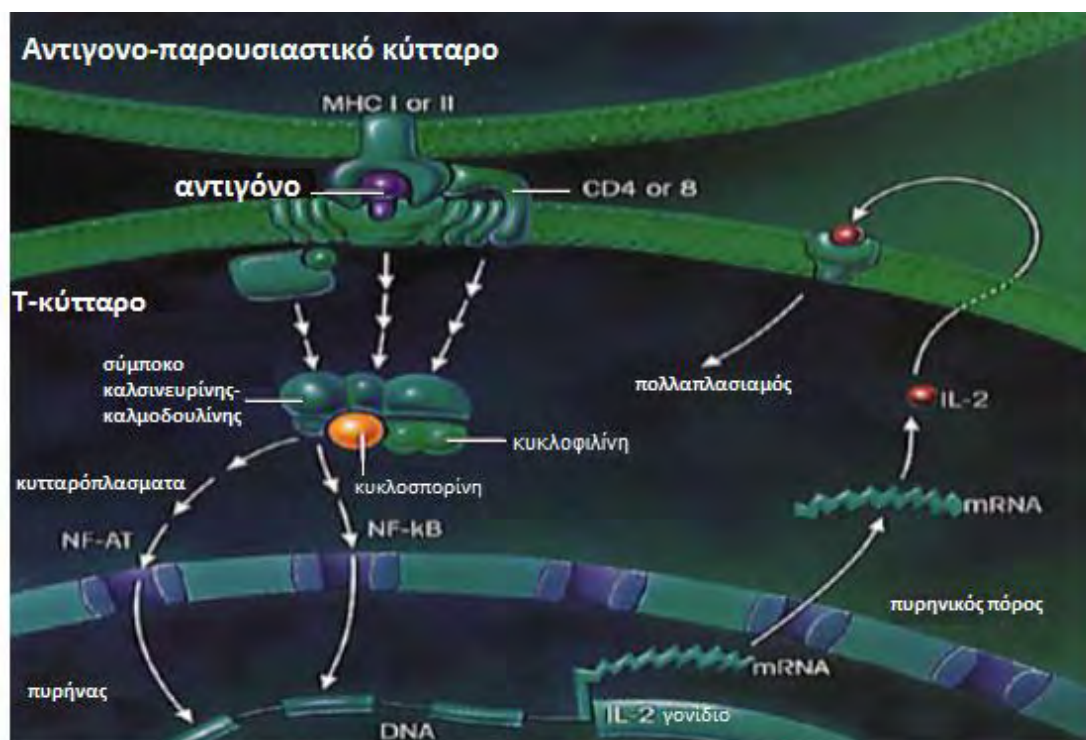
Η συστηματική θεραπεία αποτελεί την βάση για την θεραπεία ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (όταν η ψωριασική βλάβη καλύπτει περισσότερο από το 10% της επιφάνειας του σώματος), καθώς και για εκείνους που δεν ανταποκρίνονται στους τοπικούς παράγοντες και / ή στην φωτοθεραπεία. Οι ασθενείς αυτοί είναι κατάλληλοι για συστηματική θεραπεία, η οποία μπορεί να χορηγηθεί ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με βιολογικούς παράγοντες. Η ταυτόχρονη

παρουσία άλλων νόσων (π.χ. υπέρταση, νεφρική και / ή ηπατική λειτουργία, λοιμώξεις, ανοσοανεπάρκεια), είναι αντενδείξεις για την χορήγηση αυτών των φαρμάκων (Menter & Griffiths 2007).

Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη (CsA) ανακαλύφθηκε το 1972. Πρόκειται για ένα κυκλικό εντεκαπεπετίδιο, υδρόφοβο μόριο προερχόμενο από το μύκητα *Tolypocladium inflatum gams*. Η κυκλοσπορίνη παρουσιάζει εκλεκτική ανασταλτική δράση στα T-κύτταρα, αναστέλλοντας την οδό μεταγωγής σήματος, την μεσολαβούμενη από TCRs. Σε αντίθεση με την μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη είναι μη κυτταροτοξικό και μη μυελοτοξικό φάρμακο (Borel 2002). Οι κυριότερες παρενέργειες της κυκλοσπορίνης είναι η νεφροτοξικότητα, η ηπατοτοξικότητα, η υπέρταση, η ανοσοκαταστολή, η υπερτρίχωση, η υπερπλασία των ούλων, οι γαστρεντερικές και οι νευρολογικές ανωμαλίες και η καρκινογένεση (Faerber et al 2001).

Μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης



Εικόνα 1.14: Η κυκλοσπορίνη συνδέεται με την κυκλοφιλίνη, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο το οποίο οδηγεί στην αναστολή της δράσης της καλσινευρίνης (μιας Ca εξαρτώμενης φωσφατάσης) επί της πυρηνικής μεταφοράς και της συνακόλουθης ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-AT και NF-kB (Matsuda & Koyasu, 2003).

Κατά την διάρκεια της T-κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω του T-κυτταρικού υποδοχέα, η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη, αυξάνει το ενδοκυττάριο ασβέτιο $[Ca^{+2}]$. Η καλμοδουλίνη ενεργοποιείται ως απόκριση στην αύξηση του $[Ca^{+2}]$, η οποία

ενεργοποιεί με την σειρά της την καλσινευρίνη, μια φωσφατάση σερίνης-θρεονίνης. Η καλσινευρίνη ενεργοποιείται και αποφωσφορυλιώνει την κυτταροπλασματική υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα ενεργοποίησης των T-κυττάρων (NF-AT), ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και δεσμεύεται στην περιοχή του ενισχυτή του γονιδίου της ιντερλευκίνης (IL-2). Η κυκλοσπορίνη συνδέεται ειδικώς με την κυτταροπλασματική δεσμευτική πρωτεΐνη της, την κυκλοφιλίνη, και το σύμπλοκο που προκύπτει ενσωματώνεται κατόπιν στη καλσινευρίνη και έτσι αναστέλλει τη δραστηριότητά της ως φωσφατάση και άρα την ικανότητα της να τροποποιεί την κυτταροπλασματική υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα (NF-AT). Επομένως εμποδίζει την μετατόπιση του NF-AT εντός του πυρήνα, αναστέλλοντας κατά αυτό τον τρόπο την παράγωγή της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) από τα T-κύτταρα και κατ' έπекταση την ενεργοποίηση και τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων από την αυτοκρινή δράση της IL-2 (Εικόνα 1.14). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NF-κΒ, εμπλέκονται και αυτοί στη μεταγραφή του γονιδίου IL-2 (Page, et al 2000).

Ρετινοειδή

Τα ρετινοειδή επιδρούν στην μιτωτική δραστηριότητα και διαφοροποίηση των κυττάρων, φυσιολογικών και κακοήθων (Kivanova & Brtko 2002). Για την θεραπεία της ψωρίασης χορηγείται συστηματικά η ασιτρετίνη ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλους συστηματικούς και τοπικούς παράγοντες. Επειδή η ασιτρετίνη δεν προκαλεί ανοσοκαταστολή, αποτελεί άριστη επιλογή για ασθενείς με HIV, με ιστορικό κακοήθειας ή σε μεγάλες ηλικίες. Η συχνότερη παρενέργεια της ασιτρετίνης είναι η ξηρότητα δέρματος/βλεννογόνων και τριχόπτωση (Page, et al 2000).

1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες

Οι βιολογικοί παράγοντες στόχευσης μορίων που εμπλέκονται στην παθογένεια των ψωριασικών πλακών άλλαξε τον τρόπο προσέγγισης της θεραπείας αυτών των ασθενών. Έξι παράγοντες (infliximab, adalimumab, etanercept, ustekinumab, και alefacept) έχουν εγκριθεί για την θεραπεία της ψωρίασης και χωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

- 1.** Αυτούς που στοχεύουν τα T-λεμφοκύτταρα (efalizumab, alefacept) και
- 2.** Αυτούς που στοχεύουν τις πρωτεΐνες (κυτταροκίνες) που απελευθερώνονται από τα T-λεμφοκύτταρα (etanercept, infliximab, adalimumab, ustekinumab).

Αυτό που διαφοροποιεί τα βιολογικά φάρμακα από τις υπόλοιπες θεραπείες είναι ότι είναι πιο επιλεκτικά στη δράση τους. Έτσι, ενώ είναι αποτελεσματικά δεν προκαλούν τοξικότητα σε ζωτικά όργανα (ήπαρ/νεφρούς) όπως συμβαίνει με άλλες συστηματικές θεραπείες (Krueger et al 2002).

1. T- κυτταρικοί παράγοντες

Efalizumab: Το efalizumab (αντι-CD11a εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα) αναστέλλει την αλληλεπίδραση των LFA1-ICAM-1 αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση των T- κυττάρων από τα APCs και την προσκόλλησή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτρέποντας την είσοδο των κυκλοφορούντων T-κυττάρων στο δέρμα. Αποσύρθηκε επειδή έχει συσχετιστεί με την πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια (Krueger et al 2002).

Alefacept: Το Alefacept είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που προήλθε από την σύντηξη του ανθρωπίνου λεμφοκυτταρικού αντιγόνου-3 (LFA-3) με τμήματα Fc της IgG1 που στοχεύει το μόριο CD2 στην επιφάνεια των T-κυττάρων επάγοντας το θάνατο τους από τα κύτταρα NK. Το φάρμακο αυτό χορηγείται σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες όπως τοπικούς παράγοντες, μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη, ρετινοειδή ή UVB (Krueger et al 2002).

2. Αναστολείς TNFα

Infliximab: Το Infliximab είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που δεσμεύει τόσο τον κυκλοφορούντα TNFα όσο και τον δεσμευμένο TNFα με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα του και προκαλεί θανάτωση του κυττάρου, το οποίο παράγει TNFα μέσω καθήλωσης του συμπληρώματος και απόπτωσης (Kempner 2000).

Adalimumab: Το adalimumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που δεσμεύεται στον TNF-α. Το adalimumab είναι ειδικός ανταγωνιστής του TNFα, τον οποίο δεσμεύει με υψηλό βαθμό συγγένειας και ειδικότητας. Αναστέλλει τη βιολογική δράση τόσο του κυκλοφορούντος TNFα, όσο και του προσδεδεδμένου στην κυτταρική μεμβράνη, παρεμποδίζοντας τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς του p55 και p75 (Kempner 2000).

Etanercept: Το etanercept είναι αναστολέας του TNFα, παρεμποδίζοντας τη σύνδεσή του με τους φυσικούς υποδοχείς του. Το etanercept είναι μία χιμαιρική πρωτεΐνη που προκύπτει από τη σύντηξη δύο πρωτεϊνικών συστατικών. Το ένα είναι μια εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα TNF2α και το άλλο είναι το σταθερό (Fc) τμήμα της ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης. Η παρουσία της ανοσοσφαιρίνης, επιμηκύνει το χρόνο ημιζωής του πρώτου. Το etanercept σε αντίθεση με το infliximab δεν προκαλεί λύση των κυττάρων, τα οποία εκφράζουν στην κυτταρική τους επιφάνεια TNFα (Maini et al. 1998).

Ustekinumab: Το ustekinumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την υπομονάδα p40 της IL-12/IL-23 και εμποδίζει την αλληλεπίδραση τόσο της IL-12 όσο και της IL-23 με τον υποδοχέα IL-12Rβ1, αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση των ανώριμων T-κύτταρων σε Th1 και Th17 (Reich et al, 2009).

1.2.5 Νέα φάρμακα

Το golimumab, είναι ένα νέο αντίσωμα αντι-TNF-α και ήδη χρησιμοποιείται με επιτυχία σε ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα. Το ABT-874, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται στην υπομονάδα p40 των κυττάρων Th1, και είναι αποτελεσματικό σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας, ωστόσο σχετίζεται με ένα υψηλότερο ποσοστό παρενεργειών. Τα κύτταρα Th17 είναι στόχος για το AIN-457, ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει την IL-17. Κατά το σχεδιασμό τέτοιων θεραπευτικών παρεμβάσεων είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη όχι μόνο η αποτελέσματα αυτών των νέων θεραπειών, αλλά επίσης και ο πιθανός κίνδυνος σοβαρών παρενεργειών, διότι πολλές από τις παραπάνω οδούς παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και στην διατήρηση της ανοσίας έναντι παθογόνων και όγκων (Kimball et al 2008).

1.3 Φαρμακογενετική

Έχει αναγνωρισθεί ότι διαφορετικοί ασθενείς αποκρίνονται με διαφορετικούς τρόπους στο ίδιο φάρμακο. Αν και πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την φαρμακολογική απόκριση, όπως η ηλικία, η οργανική λειτουργία (ήπαρ/νεφροί), η συνυπάρχουσα θεραπεία, η αλληλεπίδραση φαρμάκων και η φύση της ασθένειας, εκτιμάται ότι η γενετική μπορεί να ευθύνεται για τη διακύμανση της απόκρισης στο φάρμακο. Όταν το φάρμακο χορηγείται, απορροφάται και κατανέμεται στην περιοχή δράσης του, όπου αλληλεπιδρά με τους στόχους (όπως υποδοχείς και ένζυμα), μεταβολίζεται και στην συνέχεια απεκκρίνεται. Διάφοροι πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένα γονίδια μπορούν να τροποποιήσουν κάθε μία από αυτές τις διαδικασίες με συνέπεια να επηρεάζεται η απόκριση στο φάρμακο (Kerb et al. 2001).

Η φαρμακογενετική, συσχετίζοντας τον πολυμορφισμό των γονιδίων με την ποικιλία των αποκρίσεων σε μια θεραπεία, προσπαθεί να εξηγήσει γιατί ένας αριθμός ατόμων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού που λαμβάνει ένα φάρμακο παρουσιάζει ελλιπή ή μερική ανταπόκριση στο φάρμακο. Ο πιο συχνός πολυμορφισμός στο γονιδίωμα του ανθρώπου οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP: single nucleotide polymorphism). Τα SNPs μπορεί να εμφανιστούν εντός της κωδικής ή της μη κωδικής περιοχής του γονιδίου. Τα SNPs μέσα στην κωδική περιοχή μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στο αμινοξύ που κωδικοποιείται. Τα SNPs στη μη κωδική περιοχή μπορεί να επηρεάζουν την μεταγραφή των γονιδίων ή την σταθερότητα του mRNA (Kim et al. 2001). Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα διαφορετικό πρότυπο SNPs.

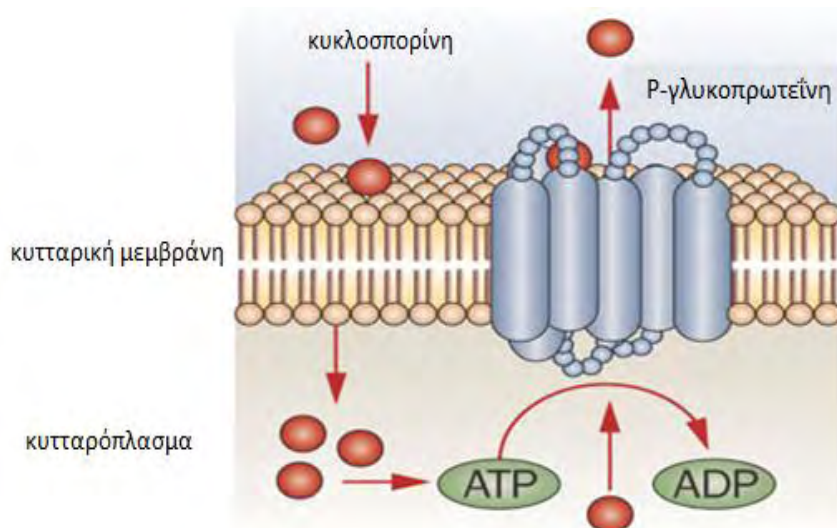
Ο βασικός σκοπός της φαρμακογενετικής είναι ο προσδιορισμός των γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με διαφορετική απόκριση των ασθενών σε μία συγκεκριμένη θεραπεία και η εξατομικευμένη θεραπεία (Kim et al. 2001).

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCB1* σχετίζονται με αλλαγές στην απόκριση πολλών φαρμάκων, όπως αναστολείς των διαύλων ασβεστίου (verapamil, diltiazem), καρδιακών γλυκοσιδών (διγοξίνης), ανοσοκατασταλτικών (κυκλοσπορίνη, tacrolimus), αναστολέων της πρωτεάσης (nelfinavir) (Kerb 2006).

ABCB1

Η P-γλυκοπρωτεΐνη P-gr κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1* (adenosine triphosphate binding cassette B1), το οποίο βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 7q21 και έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 100 kb. Το μήκος του cDNA είναι 4,7 kb και το μήκος της πρωτεΐνης είναι 1280 αμινοξέα.

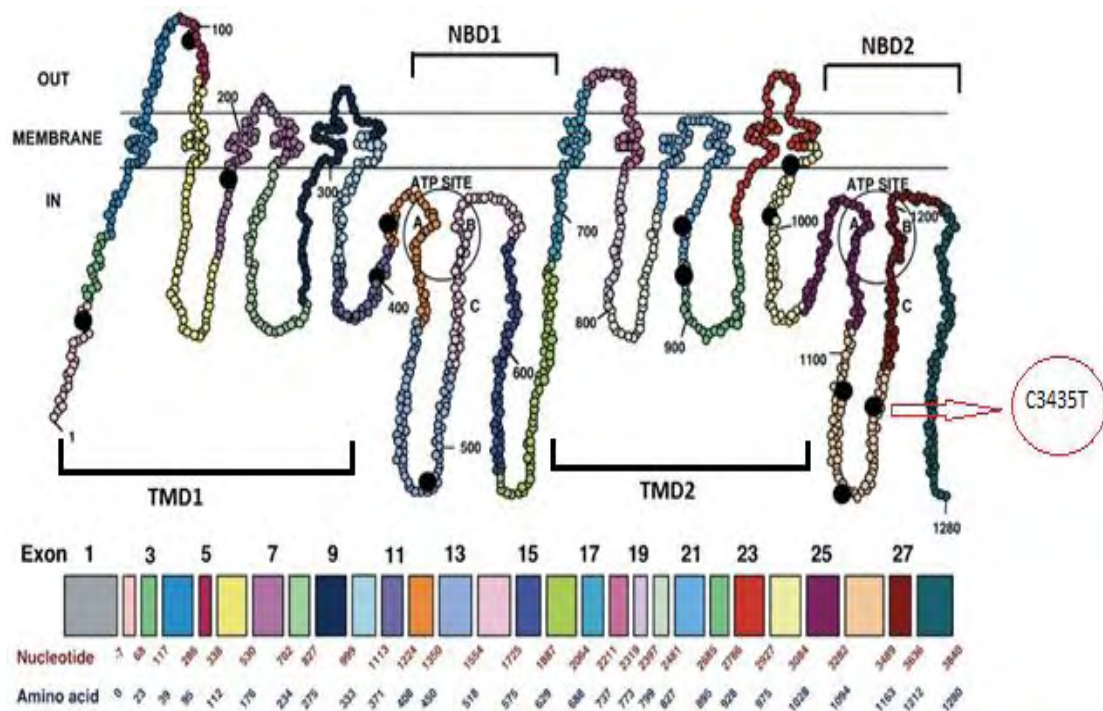
Η P-gr, γνωστή και ως multidrug resistance protein 1 (MDR1), είναι ο πιο καλά χαρακτηρισμένος μεταφορέας τύπου ABC (ATP-binding cassette), που λειτουργεί ως ένας βιολογικός φραγμός για την εξώθηση τοξινών και ξενοβιοτικών έξω από τα κύτταρα (Fischer et al. 2005). Η P-gr παίζει ρόλο στην απορρόφηση και στην κατανομή των φαρμάκων στον οργανισμό, ως μια διαμεμβρανική αντλία εκροής, συμμετέχοντας στην ATP-εξαρτώμενη εκροή των ξενοβιοτικών ουσιών από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, (Εικόνα 1.15) (Inui et al. 2000). Η P-gr αποτρέπει την είσοδο δυνητικά τοξικών συστατικών από το έντερο στο αίμα, προστατεύοντας έτσι συγκεκριμένα όργανα από ενώσεις που αποκτούν πρόσβαση στην κυκλοφορία, εμποδίζοντας τα φάρμακα να υπερβούν το ελάχιστο της αποτελεσματικής συγκέντρωσης τους (Fromm et al, 2004).



Εικόνα 1.15: Η δομή και η λειτουργία της P-γλυκοπρωτεΐνης, μίας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης εκροής, που υδρολύει ATP για να μεταφέρει φάρμακα έξω από το κύτταρο (Cattaneo et al. 2009).

Η P-gb εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, στα ηπατοκύτταρα, στα νεφρικά κύτταρα της επιφάνειας του αυλού των εγγύς σωληναρίων και στα κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου μεταβάλλοντας σημαντικά την απορρόφηση των ξενοβιοτικών ουσιών και προωθώντας την απέκκρισή τους στη χολή και στα ούρα. Επιπλέον, η P-gr εκφράζεται στα T και B λεμφοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (Fromm et al, 2004). Η P-gr διαθέτει 2 διαμεμβρανικές περιοχές, η κάθε μια με 6 διαμεμβρανικά τμήματα, και 2 περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (ATP). Η αναγνώριση του

υποστρώματος αρκετών φάρμακων γίνεται εντός των διαμεμβρανικών περιοχών σε πολλαπλές επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης, (Εικόνα 1. 16) (Ambudkar et al, 2003).



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει τα SNPs της P-gp (μαύροι κύκλοι), τα οποία επηρεάζουν την κωδική αλληλουχία της. Στο κάτω μέρος, φαίνονται τα 28 εξώνια του γονιδίου *ABCB1*, ενώ η κάθε περιοχή της P-gp που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο εξώνιο σημειώνεται με το ίδιο χρώμα. TMD1: διαμεμβανική περιοχή 1, TMD2: διαμεμβρανική περιοχή 2, NBD1 και NBD2: περιοχές δέσμευσης ATP (Ambudkar et al. 2003)

Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον, 105 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχουν ανακαλυφθεί στο γονίδιο *ABCB1*. Η πλειονότητα αυτών είναι στην μη-κωδική περιοχή (Dietrich et al, 2003), επομένως δεν αλλάζουν την αμινοξική αλληλουχία της Pgp. Στην κωδική περιοχή του γονιδίου *ABCB1* βρίσκονται 28 πολυμορφισμοί με 10 από αυτούς να οδηγούν σε αλλαγή ενός αμινοξέος, ενώ μόνο 4 SNPs από αυτούς εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%.

Το πρώτο SNP του *ABCB1* που αναφέρθηκε να σχετίζεται με την έκφραση και την *in vivo* δραστηριότητα της Pgp ήταν μια σιωπηλή μετάλλαξη του C σε T στην θέση 3435 στο εξώνιο 26 (Εικόνα 1.16) (Hoffmeyer et al., 2000). Μέχρι τώρα έχει πραγματοποιηθεί πλήθος μελετών συσχέτισης των SNPs του γονιδίου *ABCB1* με την έκφραση και την λειτουργία της Pgp. Οι έρευνες εστιάζονται κυρίως σε τρεις ως επί το πλείστον SNPs του γονιδίου *ABCB1*, την σιωπηλή μετάλλαξη 3435C>T και τους μη-συνώνυμους πολυμορφισμούς 2677G>T (Ala893Ser) και 2677G>A (Ala893Thr) (Kerb 2006).

Ο μηχανισμός με τον οποίο το αλληλόμορφο 3435T οδηγεί σε αλλαγή των επιπέδων της Pgr στον ορό είναι άγνωστος, διότι ο πολυμορφισμός 3435C>T είναι μια σιωπηλή μετάλλαξη και δεν οδηγεί σε αλλαγή της αμινοξικής αλληλουχίας της Pgr. Ωστόσο ο πολυμορφισμός 3435C>T ίσως οδηγεί σε μείωση της μεταφραστικής αποδοτικότητας, αύξηση της σταθερότητας, του ματίσματος, της επεξεργασίας ή του μεταφραστικού ελέγχου του mRNA της P-gr (Lindell et al 2003).

Εναλλακτικά, επειδή η συσχέτιση που ταυτοποιήθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού C3435T και των επιπέδων της P-gr στον ορό, δεν έχει επιβεβαιωθεί με λειτουργικά πειράματα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτός ο πολυμορφισμός δεν είναι ο πραγματικά λειτουργικός αλλά βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με κάποιον άλλο πολυμορφισμό, ο οποίος τροποποιεί την έκφραση της P-gr (Kerb 2006).

Στην πλειονότητα των ατόμων, ο συνώνυμος πολυμορφισμός 3435C>T βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον μη συνώνυμο πολυμορφισμό 2677G>T/A (Ala893Ser/Thr) στο εξώνιο 21. Αυτή η σύνδεση ταυτοποιήθηκε στο 60% των Καυκάσιων, στο 13% των Αφροαμερικανών και στο 94% των Ιαπώνων (Kim et al., 2001). Επομένως, υπάρχει η πιθανότητα ότι ορισμένες από τις παρατηρούμενες διαφορές στην δραστηριότητα της P-gr είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης του πολυμορφισμού 3435C>T στο εξώνιο 26 με τον πολυμορφισμό 2677G>T/A στο εξώνιο 21.

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού C3435T του γονιδίου *ABCB1*, με την απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη (βέλος Εικόνα 1.16).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση έγινε από κύτταρα περιφερικού αίματος 58 ασθενών με ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη, για τουλάχιστον 3 μήνες. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση, βάσει του δείκτη PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Τα δείγματα δόθηκαν με έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης.

Στόχος είναι ο διαχωρισμός του DNA, που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου, από τα άλλα κυτταρικά συστατικά, πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και κάποιες άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε γενωμικό DNA, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο επώασης με πρωτεΐνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Ο ρόλος των αντιδραστηρίων:

-**SSC (Standard Sodium Citrate)**: ρυθμιστικό διάλυμα για την επαναϊώρηση των ερυθροκυττάρων.

-**Οξικό νάτριο**: προκαλεί την καθίζηση των μεμβρανών και των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών.

- **SDS**: είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει την δομή των κυτταρικών μεμβρανών, συνεπώς γίνεται η λύση του κυττάρου.

- **Πρωτεΐνάση K**: είναι μια πρωτεάση σερίνης για να πέψει πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες και να απελευθερώσει το DNA. Επίσης, η πρωτεΐνάση K προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από τις νουκλεάσες (ένζυμα που διασπούν νουκλεϊκά οξέα).

- **Φαινόλη/ χλωροφόρμιο**: χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από την λύση των κυττάρων.

- **ισοπροπανόλη**: για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.

- **αιθανόλη 70%**: απομακρύνει τα προηγούμενα διαλύματα (όπως το SDS) που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, π.χ. πέψη με ένζυμα περιορισμού.

Διαλύματα:

- **20X SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0)**:
Για την παρασκευή του διαλύματος 1X SSC γίνεται αραιώση του πυκνού διαλύματος 20X SSC.
- **3 M Οξικό Νάτριο (CH₃COONa)**
40,81 gr οξικό νάτριο
σε 100 ml ddH₂O τελικό όγκο
Ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH₃COOH
Για την παρασκευή διαλύματος οξικού νατρίου 0,2 M γίνεται αραιώση του πυκνού διαλύματος 3 M
- **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**
10 gr SDS
σε 100 ml ddH₂O

Για την παρασκευή του διαλύματος 5 % SDS γίνεται αραιώση του διαλύματος 10% SDS

- **Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v):** 24 ml χλωροφόρμιο: 1 ml ισοαμυλική αλκοόλη

Διαδικασία:

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 0,5 ml δείγματος σε eppendorfs, όπου προστίθεται 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.
2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml 1X SSC, γίνεται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστίθεται 0,5ml οξικού νατρίου 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55⁰C για περίπου 1h υπό ανάδευση.
4. Προστίθεται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm στους 4⁰C.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs και προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm στους 4⁰C.
6. Στην συνέχεια γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs, όπου προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης και επώαση για τουλάχιστον 20 min στους -20⁰C. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 rpm, στους 4⁰C για να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 75 %. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm, στους 4⁰C.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε τα eppendorfs στους 55⁰C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
9. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προσθέτουμε 100 μl ddH₂O στο DNA
10. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20⁰C.

2.2 Έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA και για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA σε ζώνες ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωση που παρεμβάλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA με αποτέλεσμα όταν το

πήκτωμα φωτίζεται με υπεριώδες φως μπορούμε να παρατηρήσουμε αν ήταν επιτυχής ή όχι η απομόνωση του DNA.

Διαλύματα:

- **TAE 50X**
Tris Base 2 M
Οξικό οξύ (Acetic acid) 7,7 % w/v
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,5 M EDTA
ddH₂O έως τα 500ml
Η παρασκευή διαλύματος 1X TAE γίνεται αραιώνοντας το διάλυμα 50X TAE
- **Loading buffer 6X**
Bromophenol blue 0,1% w/v
1X TBE (90mM Tris Base, 90mM Boric acid, 2mM EDTA)
Γλυκερόλη 8,7%
ddH₂O έως τα 10ml

Διαδικασία:

Παρασκευή πηκτώματος:

- Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για την παρασκευή του πηκτώματος, τοποθετώντας τα χτενάκια
- Προσθήκη 40 ml TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA) και 0,3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη
- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει
- Προσθήκη 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου 1 mg / ml και καλή ανάδευση
- Στην συνέχεια το διάλυμα ρίχνεται στο ειδικό καλούπι με τα χτενάκια για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια του πηκτώματος
- Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται μέχρι να πήξει για περίπου 30 λεπτά
- Τα χτενάκια αφαιρούνται

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης:

- Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία έχουμε γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
- Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται αναμεμιγμένα 3μl DNA (από τα 100 μl της απομόνωσης DNA) μαζί με 3 μl loading buffer
- Εφαρμόζεται τάση 150 V για περίπου 20 min, μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση μέσα στο πήκτωμα.
- Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή UV
- Παρατήρηση των ζωνών και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA
- Φωτογράφιση του πηκτώματος

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε 3 στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- υβριδισμός των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου
- πολυμερισμός ξεκινώντας από τους εκκινητές

Στο πρώτο στάδιο γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί συνήθως μεταξύ 92-96⁰C, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Έπειτα είναι το δεύτερο στάδιο στο οποίο γίνεται μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50-65⁰C και έτσι τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) μήκους 15 – 30 βάσεων, συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου. Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός) σε θερμοκρασία 72⁰C με μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) και παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Κατά τον πολυμερισμό οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση του DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→ 3'.

Για την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους σταδίου. Στην PCR ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε 35 φορές. Στους Πίνακες 2.1, 2.2 και 2.3 φαίνονται οι συνθήκες, τα συστατικά και οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμού rs1045642 (3435C>T) του γονιδίου *ABCB1*, αντίστοιχα, που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR:

Πίνακας 2.1: Συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1*.

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία / Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 ⁰ C/4 min
Αποδιάταξη	95 ⁰ C /40 s
Υβριδοποίηση εκκινητών	58 ⁰ C /45 s
Επέκταση	72 ⁰ C /45 s
Τελική επέκταση	72 ⁰ C /10 min

Πίνακας 2.2: Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση.

Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
DNA εκμαγείο	100- 200 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X + Mg	5 μl
MgCl ₂ (100mM)	0,25 μl
dNTPs (10mM)	1 μl
Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	1 μl
Εκκινητής Reverse (50pmol/ml)	1 μl
Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,25 μl
ddH ₂ O	Έως τα 50 μl

Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *ABCB1*.

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος
rs1045642 (3435 C > T)	5'-TAG GCC AGA GAG GCT GCC-3' (Forward) 5' AGT GGC TCC GAG CAC ACC-3' (Reverse)	224bp

2.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Ο έλεγχος της επιτυχημένης ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας γίνεται με ηλεκτροφόρηση μέρους του προϊόντος PCR από το PCR προϊόν σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στην συγκέντρωση της αγαρόζης μέσα στο πήκτωμα. Για το μήκος των υπό μελέτη τμημάτων ενδείκνυται μια συγκέντρωση της τάξεως του 2 %.

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 rs1045642 (SNP) στο γονίδιο *ABCB1*. Το ένζυμο περιορισμού για την ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού βρέθηκε με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0. Το πρόγραμμα αυτό γνωρίζοντας 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

Mbo I, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία GATC. Επομένως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει C τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία GATC και κόβει στο C. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν δύο ίσα τμήματα 112 bp και 112 bp. Ενώ αν στην θέση πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία και το προϊόν της PCR παραμένει άκοπο (224bp).

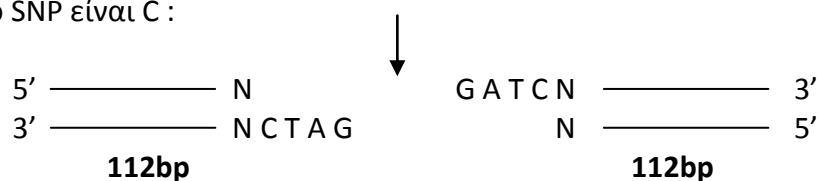
Το *Mbo*I και αναγνωρίζει την θέση:

5'... N/G A T C N ... 3'

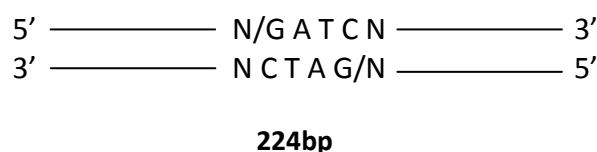
3'... N C T A G/N ... 5'

όπου N: οποιαδήποτε βάση.

- Αν το SNP είναι C :



- Αν το SNP είναι T :



Διαδικασία RFLP (Πίνακας 2.4) :

- Για την πέψη χρησιμοποιούνται περίπου 3μl από το PCR προϊόν από τα 50μl
- Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο *Mbo I* και μοιράζεται στα δείγματα DNA σε τελικό όγκο 10 μl
- Εφαρμόζεται στιγμιαία φυγοκέντρηση και τα δείγματα επωάζονται στους 37⁰ C ολονύκτια

Πίνακας 2.4: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση πέψης

Αντιδραστήρια	Πέψη με <i>Mbo I</i>
PCR προϊόν	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 1X NEB4 (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM Dithiothreitol)	1μl
Ένζυμο <i>Mbo I</i> (5u/μl)	0,6μl
ddH ₂ O	6μl
Τελικός Όγκος	10μl

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Τα ηλεκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι πιο αποτελεσματικά για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5 -500 bp). Η αναλυτική ισχύ τους είναι εξαιρετικά υψηλή, καθώς είναι δυνατόν τμήματα του DNA που διαφέρουν ως και ένα 1 bp να διαχωριστούν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο *Mbo I* όλων των PCR προϊόντων ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος κάθε ασθενή.

Παρασκευή ηλεκτώματος πολυακρυλαμίδης 10% :

Διαλύματα:

- **Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:**
29 gr ακρυλαμίδης
1 gr δις ακρυλαμίδης (N,N-Methylene-bis-acrylamide)
Εώς τα 100 ml ddH₂O
- **10x TBE (890mM Tris, 890mM Boric acid, 20mM EDTA) :**
121 gr Tris base
61,7 gr βορικό οξύ (Boric acid)
80 ml Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,5 M
έως τα 2 lt ddH₂O

- **APS 20% :**
2 gr υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)
10 ml ddH₂O

Διαδικασία:

- Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προστίθεται
-8 gr ουρία
-21 ml μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30%
-6 ml 10x TBE
- Στην συνέχεια γίνεται ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία
- Το διάλυμα διηθείται, σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος ρυθμίζεται με ddH₂O μέχρι τα 65 ml
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 65 μl TEMED και 400 μl APS
- Το διάλυμα περιχύνεται στην συσκευή όπου και πολυμερίζεται για περίπου 45 λεπτά
- Τοποθετείται το χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια.
- Αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται προσεχτικά τα πηγαδάκια από υπολείμματα του πηκτώματος.

Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

- Τοποθέτηση του πηκτώματος σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Γεμίζουμε με 1x TBE την συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τοποθετούμε τα προϊόντα της πέψης (10 μl) μαζί με 5 μl loading buffer στα πηγαδάκια
- Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3h με τάση 250 Volts.

2.7 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι τεχνική για την ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Η διακριτική ικανότητα είναι <1.0 ng DNA.

Διαλύματα

- **Διάλυμα 1 (400ml)**
10 ml αιθανόλη 100%
0,5 ml οξικό οξύ 99%
έως τα 400 ml ddH₂O
- **Διάλυμα 2 (200ml)**
Διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 1gr/lit
- **Διάλυμα 3 (200ml)**
3 gr υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
0,02 gr βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
1 ml φορμαλδεΐδη
έως τα 200 ml ddH₂O

Διαδικασία:

- Τα πηκτώματα επάγονται δύο φορές με το διάλυμα 1 για 3 min υπό ανάδευση. Στην συνέχεια γίνεται πλύση με απεσταγμένο νερό για 1 min.
- Γίνεται επώαση με το διάλυμα 2 υπό ανάδευση για 15 min. Ακολουθούν δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό (κάθε πλύση έχει διάρκεια 1 min).
- Τέλος γίνεται επώαση με το διάλυμα 3 υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA (περίπου 20 min)
- Παρατήρηση του πηκτώματος σε φως και καταγραφή των αποτελεσμάτων

2.8 Στατιστική ανάλυση

Η μεταβολή στον δείκτη PASI των ασθενών $\geq 75\%$ θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με Κυκλοσπορίνη. Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη PASI $\leq 50\%$ υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (Responders) και μη ανταποκριθέντες (Non-responders). Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για όλους τους πολυμορφισμούς οι πληθυσμοί των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 3 μήνες θεραπείας, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2×2 πίνακες συνάφειας. Κάθε πολυμορφισμός, ο οποίος πέρασε τα κριτήρια του Hardy-Weinberg, μελετήθηκε για συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, χρησιμοποιώντας το Cochran–Armitage trend τεστ καθώς και άλλα τέστ τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατής δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact τεστ και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA).

3. Αποτελέσματα

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 58 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Σε αυτούς πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού C3435T (rs1045642) του γονιδίου *ABCB1* ώστε να ελεγχθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτού και της απόκρισής τους στη συγκεκριμένη θεραπεία. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη.

Πίνακας 3.1: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη

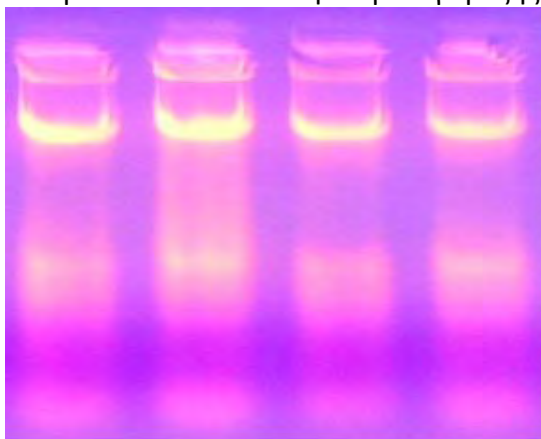
Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	43.14 \pm 11.47
Φύλο Α/Θ	27/31
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	5.4 \pm 2.2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος \pm ΤΑ*	39.8 \pm 11.3
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	25/58 (43%)
Αρχικό PASI, μέσος \pm ΤΑ*	19.78 \pm 5.44
PASI στους 3 μήνες, μέσος \pm ΤΑ*	9.66 \pm 4.78
Ανταποκριθέντες (PASI \geq 75%), ποσοστό	30 (51.8%)
Μη-ανταποκριθέντες (PASI<50%), ποσοστό	28 (48.2%)

ΤΑ: Τυπική απόκλιση

Από τον πίνακα 3.1 φαίνεται ότι από τους 58 ψωριασικούς ασθενείς, οι 27 είναι άντρες και οι 31 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 43 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 39 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 5 έτη. Το 43% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση και με άλλες ασθένειες, η επονομαζόμενη συν-νοσηρότητα. Η ανταπόκριση στην θεραπεία (51.8%) βρίσκεται μέσα στο γενικό εύρος ανταπόκρισης των ασθενών (50-70%) στην κυκλοσπορίνη όπως διαπιστώνεται μέσα από της επίσημες κλινικές μελέτες.

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

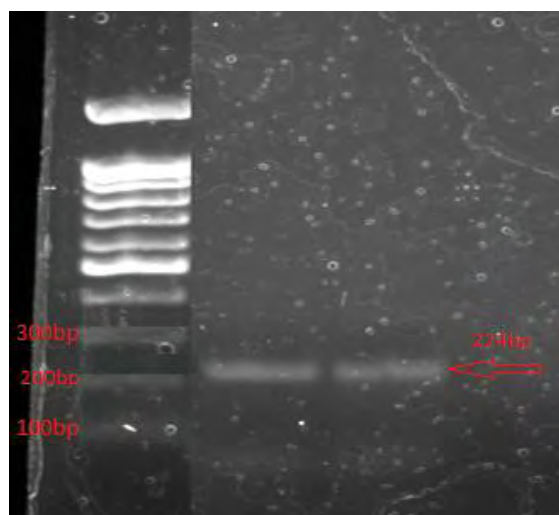
Από όλους τους ασθενείς απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ενδεικτικά, στην Εικόνα 3.2 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA τεσσάρων ασθενών σε πήκτωμα αγαρόζης 1%



Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε τεσσάρων ασθενών σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* με PCR

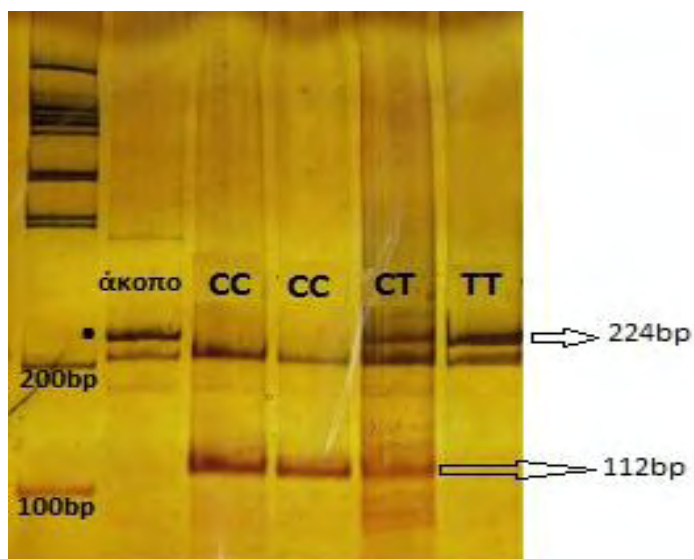
Το τμήμα (224bp) του γονιδίου *ABCB1*, το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό C3435T (rs1045642) ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR. Το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Διαχωρισμός των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης του τμήματος του γονιδίου *ABCB1* που ενισχύθηκε για τον πολυμορφισμό C3435T (rs1045642, 224 bp).

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 3.3. Στα PCR προϊόντα PCR έγινε πέψη με το ένζυμο *Mbo I*. Από αυτήν την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτουν δύο ίσα τμήματα των 112bp, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο T προκύπτει ένα τμήμα 224 bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (CC), ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (TT), και ετερόζυγων ατόμων (CT). Στο πήκτωμα τα άτομα με γονότυπο CC εμφανίζουν μια διπλή έντονη ζώνη μήκους 112 bp, τα άτομα με CT εμφανίζουν δύο ζώνες, μια μήκους 224 bp και μία 112 bp, ενώ τα άτομα με TT εμφανίζουν μια ζώνη μήκους 224 bp.



Εικόνα 3.3: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό C3435T του *ABCB1*.

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Γονότυποι των 58 ασθενών για τον πολυμορφισμό C3435T του γονιδίου *ABCB1* (rs1045642)

Κωδικός δείγματος DNA	Γονότυπος C3435T	Κωδικός δείγματος DNA	Γονότυπος C3435T
1	CT	16Θ	CT
2	TT	36	CT
3	CC	37	CC
4	CC	38	CC
5	CT	39	CT
6	TT	40	TT
7	CT	41	CT
8	CC	42	CC
9	CT	43	CC
32P	CT	44	CT
33P	TT	45	TT
35P	CC	46	CT
36P	CC	47	CT
38P	CC	49	CT
39P	CC	51	CT
40P	CC	52	CT
41P	TT	53	CC
42P	CC	55	TT
43P	CT	56	CT
2Θ	TT	57	CT
3Θ	CT	59	CT
4Θ	TT	62	CT
5Θ	CT	63	TT
6Θ	CC	64	TT
7Θ	CT	65	CC
9Θ	TT	66	CC
10Θ	TT	67	CT
11Θ	CT		
12Θ	CT		
13Θ	CC		
14Θ	CC		

3.5 Στατιστική ανάλυση

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για τον πολυμορφισμό rs1045642 του γονιδίου *ABCB1* ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Ο πολυμορφισμός C3435T του γονιδίου *ABCB1* βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg στον υπό μελέτη πληθυσμό ($p=0.4752$). Παρατηρείται αύξηση της συχνότητας του αλληλόμορφου 3435T στους μη ανταποκριθέντες (0.55) σε σχέση με τους ανταποκριθέντες (0.35) ασθενείς ($P=0.039$).

Πίνακας 3.3: Συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και αποτελεσμάτων θεραπείας με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες ($n=58$)

Γονίδιο Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- Ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
ABCB1 C3435T (rs1045642)	Genotypic [CC/CT/TT]	13/13/4	6/13/9	0.109
	Cochran- Armitage [C/T]	39/21	25/31	0.039
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	26/4	19/9	0.119
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	13/17	6/22	0.09

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης του γονότυπου για τον πολυμορφισμό C3435T του γονιδίου *ABCB1* στους ασθενείς. Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου 3435T του γονιδίου *ABCB1* αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη, σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ανταπόκριση στην θεραπεία ($P=0.039$). Από την στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C3435T του γονιδίου *ABCB1* με την μη ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

4. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού C3435T του γονιδίου *ABCB1*, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 58 ασθενών με ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ύστερα ακολούθησε γονοτυπική ανάλυση των ασθενών με την μέθοδο PCR-RFLP.

Απο τον πίνακα 3.1 φαίνεται ότι από τους 58 ψωριασικούς ασθενείς, οι 27 είναι άντρες και οι 31 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Ακόμα φαίνεται ότι παραπάνω από το 50% των ασθενών με ψωρίαση ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη επιβεβαιώνοντας έτσι, μελέτες που δείχνουν ότι το 50-70% των ασθενών αποκρίνονται στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ωστόσο είναι γνωστό ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταβολισμού, απορρόφησης και αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τους θεραπευτικούς στόχους τους, μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση των ασθενών στα φάρμακα. Έτσι διαφορετικοί ασθενείς ίσως να αποκρίνονται με διαφορετικούς τρόπους στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

Από τα στοιχεία του Πίνακα 3.3 φαίνεται ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου 3435T του γονιδίου *ABCB1* αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη, σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ανταπόκριση στην θεραπεία ($P=0.039$). Από την στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C3435T του γονιδίου *ABCB1* με την μη ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

Το γονίδιο *ABCB1* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της P-gr. Η P-gr παίζει ρόλο στην απορρόφηση και στην κατανομή των φαρμάκων στον οργανισμό συμμετέχοντας στην ATP-εξαρτώμενη εκροή των ξενοβιοτικών ουσιών από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης.

Επειδή ο συνώνυμος πολυμορφισμός C3453T δεν οδηγεί σε αλλαγή της αμινοξικής ακολουθίας της P-gr, πιθανώς να οδηγεί σε μείωση της μεταφραστικής αποδοτικότητας, αύξηση της σταθερότητας, του ματίσματος, της επεξεργασίας ή του μεταφραστικού ελέγχου του mRNA της P-gr (Lindell et al, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε παλιότερη μελέτη άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο 3453T έχουν την μισή δραστικότητα της P-gr στον ορό σε σχέση με αυτά που φέρουν το 3453C (Hoffmeyer et al., 2000). Η μειωμένη δραστικότητα της P-gr δύναται να επηρεάζει την απορρόφηση ή/και λειτουργία της κυκλοσπορίνης κάτι που αναμένεται να επιβεβαιωθεί και σε *in vitro* λειτουργικά πειράματα. Έτσι αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την συσχέτιση του 3453T με μη ανταπόκριση των ασθενών στην ψωρίαση και σε λειτουργικό επίπεδο. Έναλλακτικά θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν είναι πραγματικά λειτουργικός αλλά ότι βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με κάποιον άλλο μη συνωνυμο πολυμορφισμό του γονιδίου *ABCB1*, ο οποίος δύναται να τροποποιεί την έκφραση της P-gr (Kerb 2006).

Συμπερασματικά, η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη παγκοσμίως που πραγματοποιείται στον χώρο της φαρμακογενετικής της ψωρίασης και

κυκλοσπορίνης, η οποία αποκαλύπτει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C3453T του γονιδίου *ABCB1* με την μη ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ωστόσο η ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να γίνει με προσεκτική επιφύλαξη καθώς η στατιστική τιμή των αποτελεσμάτων της έρευνας αυτής βρίσκεται κόντα στο όριο της στατιστικής σημαντικότητας, ενώ και το δείγμα των ασθενών είναι σχετικά μικρό για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού απλοτύπου για την ανταπόκριση σε κυκλοσπορίνη στον ελληνικό πληθυσμό, με αναγκαία τη συνέχιση και επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με ψωρίαση από όλη την Ελλάδα, παρέχοντας έτσι ένα αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή της πιο αποτελεσματικής θεραπείας εξατομικευμένα για κάθε ασθενή με ψωρίαση.

Βιβλιογραφία:

1. Abel EA, DiCicco LM, Orenberg EK, Fraki JE, Farber EM. Drugs in exacerbation of psoriasis. (1986 *Journal of the American Academy of Dermatology* 15:1007-22.
2. Ambudkar V.S. , Kimchi-Sarfaty C., Zuben E. S. and Gottesman M.M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22,7468–7485.
3. Barker JN, Jones ML, Swenson CL, Sarma V, Mitra RS, Ward PA, Johnson KJ, Fantone JC, Dixit VM, Nickoloff BJ. (1991). Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *Journal of Immunology* 15,146(4):1192-7.
4. Bhalerao J. and Bowcock A. M. (1998). The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Human Molecular Genetics* 7, 1537–1545.
5. Borel JF. History of cyclosporine and of its early pharmacological development. (2002). *Wien Klin Wochenschr* 114(12):433-437.
6. Camisa C., Maceyko RF., O'Dorisio TM., Schacht GE., Mekhjian HS. (1989). Treatment of psoriasis with long-term administration of somatostatin analog 201-995. *Journal of the American Academy of Dermatology* 21(1):139-41.
7. Cattaneo D., Ruggenti P., Baldelli S., Motterlini N., Gotti E., Sandrini S., Salvadori M., Segoloni G., Rigotti P., Donati D., Perico N. and Remuzzi G. (2009). ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J Am Soc Nephrol* 20, 1404–1415.
8. Dietrich C.G., Geier A., Oude Elferink R.P. (2003). ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 52:1788–1795.
9. 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.
10. Farber EM, Nall L. Genital psoriasis. (1992). Oral lesions in patients with psoriasis: a controlled study. *Cutis* 50(4):263-6.
11. Fischer V., H.J. Einolf, D. Cohen. (2005). Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 5:183–195.
12. Fromm M.F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers, *Trends Pharmacology Sciences* 25:423–429.
13. Gelfand JM., Troxel AB., Lewis JD., Kurd SK., Shin DB., Wang X., Margolis DJ., Strom BL. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Archives of Dermatological* 143(12):1493-9.
14. Gottlieb A., Menter A., Mendelsohn A., Shen Y. K., Li S., Guzzo C., Fretzin S., Kunyetz R. and Kavanaugh A. (2009). Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 373, 633–640.
15. 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.
16. Griffiths C. E., Christophers E., Barker J. N., Chalmers R. J., Chimenti S., Krueger G. G., Leonardi C., Menter A., Ortonne J. P. and Fry L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology* 156, 258–262.

17. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. (2004). Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135(1):1-8.
18. Hagemann I., Proksch E. (1996). Topical treatment by urea reduces epidermal hyperproliferation and induces differentiation in psoriasis. *Acta Dermatovenereologica* 76: 353-356.
19. Henseler T, Christophers E. (1995). Disease concomitance in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 32(6):982-6.
20. Henseler T., Christophers E. (1985). Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* 13:450-6.
21. Higgins E. (2000). Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 25(2):107-10.
22. Hoffmeyer S., Burk O., Richter von O., Arnold H.P., Brockmoller J., John A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M. and Brinkmann U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:3473-3478.
23. Hong Song, Wen Yin, Qin Ma. (2011). Allergic palmoplantar pustulosis caused by cobalt in cast dental crowns: a case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 111:8-10.
24. Inui K.I, Masuda S., Saito H. (2000). Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International* 58:944-958.
25. Kempeni J. (2000). Update on D2E7: a fully human anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59(1):144-145.
26. Kerb R., Hoffmeyer S., Brinkmann U. (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2:51-64.
27. Kerb Reinhold. (2006). Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters* 234, 4-33.
28. Kim R.B , Leake B.F., Choo E.F., Dresser G.K., Kubba S.V., Schwarz U.I. (2001). Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 70: 189-199.
29. Kimball A. B., Gordon K. B., Langley R. G., Menter A., Chartash E. K. and Valdes J. (2008). Safety and efficacy of ABT-874, a fully human interleukin 12/23 monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a randomized, placebocontrolled, phase 2 trial. . *Archives of Dermatological* 144, 200-207.
30. Klvanova J, Brtko J. (2002). Selected retinoids: determination by isocratic normal-phase HPLC. *Endocr Regul.* 36(3):133-41.
31. Krueger G. G., Papp K. A., Stough D. B., Loven K. H., Gulliver W. P. and Ellis C. N. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study evaluating efficacy and tolerability of 2 courses of alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 47:821-833.

32. Kuijpers AL, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, van de Kerkhof PC, Alkemade HA, Schalkwijk J. (1996). Skinderived antileukoproteinase (SKALP) is decreased in pustular forms of psoriasis. A clue to the pathogenesis of pustule formation? *Archives of Dermatological* 288(11):641-7.
33. Lindell M., Karlsson M.O., Lennernas H., Pahlman L., Lang M.A. (2003). Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine, *European Journal of Clinical Investigation* 33:493–499.
34. Lomholt, G. Psoriasis, Prevalence, Spontaneous Course and Genetics. (G.E.C Gad, Copenhagen,1963).
35. Lowes MA., Bowcock AM., Krueger JG. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-73.
36. Matsuda S, Koyasu S. (2003). Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3(12):1358-67.
37. Meletiadis J., Chanock S. and Thomas J. (2006). Human pharmacogenomic Variations and Their Implications for Antifungal Efficacy *Clinical Microbiology Reviews* 19:763-787.
38. Menter Alan & Benjamin Stoff. (2010). Psoriasis ebook. Manson Publishing.
39. Menter A., Gottlieb A., Steven R., Feldman, Abby S., Van Voorhees, Kenneth B., Gordon, Lebwohl M., John Y.M. Koo, Craig A., Elmets, Neil J. Korman, jKarl R., Beutner, Reva Bhushan. (2008). 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. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58(5):826–850.
40. Moll JM, Wright V. (1973). Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 3(1):55
41. Monteleone G., Pallone F., Thomas T. MacDonald, Chimenti S. and Costanzo A.. (2011). Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clinical Science* 120 (1–11).
42. Mrowietz U., Kragballe K. Reich K., Spuls P., Griffiths C. E. M., Nast A., Franke J., Antoniou C., Arenberger P., Balieva F. (2011). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Archives of Dermatological Research* 303:1-10.
43. Nair R. P., Stuart P. E., Nistor I., Hiremagalore R., Chia N. V., Jenisch S., Weichenthal M., Abecasis G. R., Lim H. W., Christophers E. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet* 78, 827–851.
44. Nestle O. Frank, Paola Di Meglio, Jian-Zhong Qin and Brian J. Nickoloff. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9(10): 679–691.
45. Ockenfels HM, Wagner SN, Keim-Maas C, Funk R, Nussbaum G, Goos M.(1996). Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium. *Archives of Dermatological Research* 288(4):173-8.
46. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffaman.(2000). ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
47. 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.
48. 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.
 49. Reich K., Yasothan U. and Kirkpatrick, P. (2009). Ustekinumab. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 355–366.
 50. Roberson D.O. Elisha and Anne M. Bowcock. (2010). Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genetics*.2010 26(9): 415–423.
 51. Roth PE., Grosshans E., Bergoend H. (1991). Psoriasis: development and fatal complications. *Annals Dermatology Venereologica* 118(2):97-105.
 52. Stern R. S., Nijsten T., Feldman S. R., Margolis D. J. and Rolstad T. (2004). Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 9, 136–139.
 53. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez-Vina MA, Young M, Lory D, Morris L, Wuepper KD, Stastny P, Menter A. (1994). Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 20,264:1141-5.
 54. Tugwell P., Bombardier C., Gent M., Bennett K.J., Roberts R.S., Ludwin D., Bensen W.G., Carette S., Chalmers A., Klinkhoff A.V., Esdaile J.M., Kraag G.R. (1990). Low-dose cyclosporine versus placebo in patients with rheumatoid arthritis. *The Lancet* 335:1051-1055.
 55. Urano K, Matsuyama T, Urano R, Matsuo I, Habu S. (1995).PUVA suppresses the expression of cell adhesion molecules of lymphocytes. *Experimental Dermatology* 4(1):36-41.
 56. Van de Kerkhof PCM. (1999). Clinical Features. In *Textbook of Psoriasis*. Blacwell Science pp 2-29.
 57. Veal D. C., Capon, F., Allen M. H., Heath E. K., Evans J. C., Jones A., Patel S., Burden D., Tillman D., Barker J. N. and Trembath R. C. (2002). Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am. J. Hum. Genet* 71, 554–564.
 58. Wolfer LU., Djemadji-Oudjijel N., Hiletework M., Tebbe B., Husak R., Goerdts S., Orfanos CE. (1998). HIV-associated psoriasis. Clinical and histological observations in 36 patients. *Hautarzt* 49(3):197-202.
 59. Τσαμπάος Δ. (2004). Σημειώσεις Δερματολογίας. Πανεπιστήμιο Πατρών.