

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**Αγγέλου Λήδα-Ξένια**

# Φαρμακογενετική Μελέτη Συσχέτισης Πολυμορφισμών στον Υποδοχέα *FcγRIIA* με την Απόκριση Ψωριασικών Ασθενών στη Θεραπεία με Βιολογικούς Παράγοντες TNFα



2014

Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης  
πολυμορφισμών στον υποδοχέα *FcγRIIA* με την  
απόκριση ψωριασικών ασθενών στη θεραπεία με  
βιολογικούς παράγοντες TNFα.

Pharmacogenetic association study of *FcγRIIA* in  
psoriasis patients under biological therapy with  
anti-TNFα antibodies.

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Σαραφίδου Θεολογία**

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μαμούρης Ζήσης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Λιαδάκη Καλλιόπη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους, των οποίων η συνεισφορά και η υποστήριξη ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σαραφίδου, Λέκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, επιβλέπουσα καθηγήτρια σε αυτή την εργασία. Στη συνεργασία μας ήταν πάντα πρόθυμη να με συμβουλέψει και να με καθοδηγήσει. Οι γνώσεις που αποκόμισα από αυτή τη συνεργασία ήταν πολλές και πολύτιμες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Γιάννη Βασιλόπουλο, διδάκτορα, και την Κωνσταντίνα Σαρρή, υποψήφια διδάκτορα, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Η συνεργασία μαζί τους ήταν καθοριστική στην κατανόηση εννοιών και μεθόδων.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή, και την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια, για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή.

Ευχαριστώ επίσης την οικογένειά μου για τη στήριξη που μου προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
1 Εισαγωγή .....	5
1.1 Ψωρίαση, γενικά χαρακτηριστικά.....	5
1.1.1 Ανοσοπαθολογία της ψωρίασης.....	6
1.1.2 Γενετικοί παράγοντες.....	8
1.1.3 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης .....	12
1.2 Οι υποδοχείς Fc .....	17
1.2.1 Ο υποδοχέας FcγRIIA.....	19
1.2.2 Πολυμορφισμοί των υποδοχέων Fcγ .....	20
1.3 Φαρμακογενετική μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση .....	21
2 Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.1 Ασθενείς .....	23
2.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα .....	23
2.2.1 Αρχή της μεθόδου .....	23
2.2.2 Υλικά.....	23
2.2.3 Πειραματική διαδικασία .....	24
2.3 Σχεδίαση εκκινητών .....	24
2.3.1 Διαδικασία σχεδιασμού εκκινητών .....	25
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
2.4.1 Αρχή της μεθόδου .....	26
2.4.2 Υλικά.....	27
2.4.3 Πειραματική διαδικασία .....	27
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	28
2.5.1 Αρχή της μεθόδου .....	28
2.5.2 Υλικά.....	29
2.5.3 Πειραματική διαδικασία .....	29
2.6 Αλληλούχηση (Sequencing).....	29
2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης .....	29
3 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	30
3.1 Ασθενείς .....	30
3.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα .....	31
3.3 Σχεδίαση εκκινητών .....	31
3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31

3.5	Γονοτύπηση .....	32
3.6	Ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 στο <i>FcγRIIA</i> με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία .....	32
4	Συμπεράσματα .....	36
5	Βιβλιογραφία.....	37

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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.

Οι βιολογικοί παράγοντες αντι-TNF αποτελούν θεραπευτική στρατηγική για τους ψωριασικούς ασθενείς. Είναι μονοκλωνικά αντισώματα που δεσμεύουν την κυτταροκίνη TNF-α και διαθέτουν το τμήμα Fc των αντισωμάτων που προσδένεται στους υποδοχείς Fcγ. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζουν την μεταγωγή σήματος που ενεργοποιεί ο TNF-α, ο οποίος αποτελεί βασική κυτταροκίνη των ανοσοαποκρίσεων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού rs1801274 (519G>A) του γονιδίου του λευκοκυτταρικού υποδοχέα *FcγRIIA* και της ανταπόκρισης ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με αντι-TNF. Ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί σε αμινοξική υποκατάσταση στο αμινοξύ 131 από αργινίνη (R) σε ιστιδίνη (H). Η υποκατάσταση αυτή βρίσκεται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, η οποία δεσμεύει το τμήμα Fc των αντισωμάτων IgG και έχει λειτουργικό αντίκτυπο καθώς η παρουσία ιστιδίνης οδηγεί σε μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τα IgG.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ψωριασικούς ασθενείς (n=60) που έλαβαν θεραπεία αντι-TNF στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης. Η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν Etanercept (n=27) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου A και της μη ανταπόκρισης στο φάρμακο, ενώ η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν Infliximab (n=20) έδειξε ότι υπήρξε τάση συσχέτισης για το ίδιο αλληλόμορφο. Για το Adalimumab δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων (n=13).

## ABSTRACT

Psoriasis is a multifactorial disease affecting approximately 2% of the population. The clinical picture is extensive proliferation of skin cells. Study of psoriatic lesions have demonstrated the presence of immune cells, indicating the involvement of immune system in appearance and maintenance of the disease.

Anti-TNF therapeutic strategy for psoriasis includes monoclonal antibodies that bind to TNF- $\alpha$  and to Fc $\gamma$  receptors with their Fc region.

In this study, we performed an association analysis between SNP rs1801274 (519G >A) of *FcgRIIA* gene, which leads to an amino acid substitution at position 131 from arginine (R) to histidine (H). This substitution has functional impact as it is located in the extracellular region of the receptor that binds the Fc region of IgG, with the H131 allotype forming a strong and effective interaction with IgG. In addition in a recent study it was shown that the R131 allotype is associated with a poor response to Infliximab in a rheumatoid arthritis international collaboration study.

Our analysis was performed on psoriatic patients (n=60) who received anti-TNF therapy and samples were obtained from the University Hospital of Larissa and the Papageorgiou Hospital of Thessaloniki. The association analysis for patients who received Etanercept (n=27) showed that there was significant association between the 'A' allele and non-responders, while the analysis for patients who received Infliximab (n=20) showed that a possible trend for association for the same allele. For Adalimumab, there was no statistically significant association, probably due to the small number of samples (n=13).

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Ψωρίαση, γενικά χαρακτηριστικά

Η ψωρίαση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, δηλαδή ένα νόσημα το οποίο έχει γενετικό υπόβαθρο, αλλά η εμφάνιση και η έντασή του εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αποτελεί μία χρόνια δερματική πάθηση που επηρεάζει περίπου το 2% του πληθυσμού (Christophers, 2001). Τα άτομα με ψωρίαση, κατά την εμφάνιση των ψωριασικών αλλοιώσεων παρουσιάζουν ανισορροπία του ανοσολογικού συστήματος, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση των κερατινοκυττάρων με ενδεχόμενο υπερπολλαπλασιασμό της επιδερμίδας (Julia, et al., 2013).

Υπάρχουν έξι, κυρίως, διαφορετικές μορφές της ψωρίασης:

1. Η «κοινή» ψωρίαση, ή ψωρίαση κατά πλάκας,
2. Η σταγονοειδής ψωρίαση,
3. Η ανάστροφη ψωρίαση,
4. Η φλυκταινώδης ψωρίαση,
5. Η ερυθροδερμική ψωρίαση, και η
6. Η ψωριασική αρθρίτιδα (αρθροπαθητική ψωρίαση)

Η συχνότερη μορφή ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας, καθώς περίπου το 80% των ψωριασικών ασθενών πάσχει από τη μορφή αυτή (Ιωαννίδης, 2007). Οι ασθενείς εμφανίζουν προεξέχουσες ερυθρές οβάλ πλάκες με αργυρόχροα λέπια προσκολλημένα επάνω τους. Τα λέπια είναι αποτέλεσμα του υπερπολλαπλασιασμού της επιδερμίδας. Ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η μίτωση των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας αυξάνεται με αποτέλεσμα την πρόωρη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και την ελλιπή κερατινοποίηση τους με διατήρηση των πυρήνων στην κεράτινη στιβάδα (παρακεράτωση). Ως αποτέλεσμα παρατηρείται πάχυνση της επιδερμίδας (ακάνθωση) με επιμήκεις επιδερμικές ραβδώσεις σε συνδυασμό με φλεγμονώδη διήθηση, γεγονός που συμβάλλει περαιτέρω στην πάχυνση των αλλοιώσεων (Christensen, et al., 2006 ). Η φλεγμονώδης διήθηση που παρατηρείται στο χόριο αποτελείται κυρίως από δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και T-κύτταρα, ενώ στο τμήμα της επιδερμίδας παρατηρούνται κύρια ουδετερόφιλα και λίγα T κύτταρα. Η ερυθρότητα των αλλοιώσεων οφείλεται σε αύξηση του αριθμού των τριχοειδών αγγείων που προσεγγίζουν την επιφάνεια του δέρματος μέσω ενός σημαντικά λεπτού επιθηλίου (Nestle, et al., 2009).

Το 10-30% των ασθενών με ψωρίαση, ανεξάρτητα από το μέγεθος της προσβεβλημένης επιφάνειας, αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα σε διάστημα 1-10 ετών μετά την εμφάνιση της δερματικής βλάβης. Γενικά, φαίνεται ότι το 65% των ασθενών παρουσιάζουν ήπια νόσο (προσβολή σε λιγότερο από 2% του σώματος), το 25% των ασθενών παρουσιάζουν μέτρια νόσο (προσβολή 2-10% του σώματος), και το 10% των ασθενών παρουσιάζουν σοβαρή νόσο (προσβολή μεγαλύτερη από το 10% του σώματος) (Ιωαννίδης, 2007).

Δεν υπάρχουν σαφείς ορισμοί σχετικά με τους χαρακτηρισμούς βαρύτητας της νόσου. Γενικά, ήπια θεωρείται η ψωρίαση που αφορά επιφάνεια μικρότερη του 5-10% του σώματος, και μέτρια όταν αφορά επιφάνεια τουλάχιστον 10% του σώματος. Οι δείκτες που συχνότερα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι το 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 αλλοιώσεων και

μπορεί έχει τιμές από 1 ως 72. Διαφορά στο δείκτη PASI 75 και 90 σημαίνει μία 75% ή 90% αντίστοιχα βελτίωση του αρχικού PASI σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Έχει επικρατήσει, ως μέθοδος αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου, σε κλινικές μελέτες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα φαρμάκων (Κοσμάδου, et al., 2007).

#### 1.1.1 Ανοσοπαθολογία της ψωρίασης

Η εμφάνιση της ψωρίασης έχει δείχθει ότι αφορά την απορρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος προκαλώντας αυτοανοσία, δηλαδή την ενεργοποίηση των μηχανισμών της επίκτητης ανοσίας (B ή/και T λεμφοκυττάρων), απουσία ενεργού λοίμωξης ή άλλης διακριτής αιτίας. Τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος επιτίθενται στα κύτταρα της επιδερμίδας προκαλώντας τις αλλοιώσεις. Η διαπίστωση αυτή στηρίζεται σε πολλές μελέτες οι οποίες έχουν δείξει την έντονη παρουσία κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος (όπως δενδριτικών κυττάρων και T-κυττάρων) στις ψωριασικές αλλοιώσεις (Bos, et al., 1983; Nestle & Nickoloff, 1994) καθώς και την θετική επίδραση που έχουν φάρμακα με στόχο τις ανοσολογικές αντιδράσεις στους ασθενείς (Griffiths, et al., 1986; Prinz, et al., 1991).

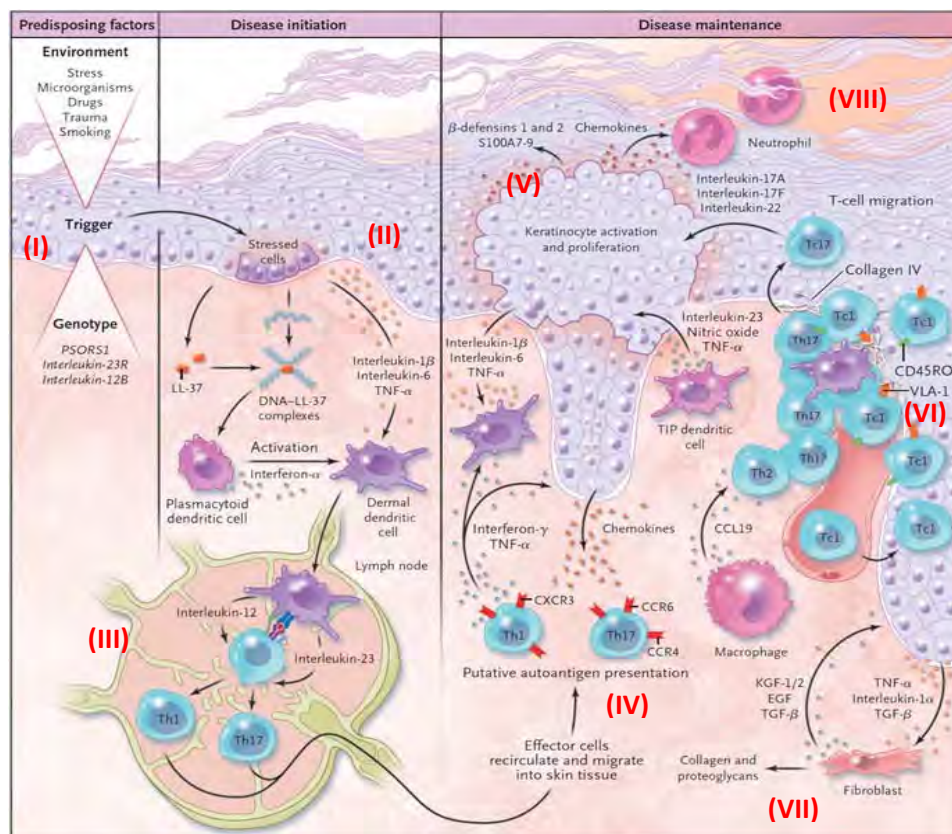
Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) αποτελούν βασικούς φρουρούς του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτελούν την σύνδεση μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Κατά την έναρξη της ψωρίασης, η απορρύθμιση της φυσικής ανοσίας οδηγεί στην αύξηση των πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs) και την ενεργοποίησή τους μέσω της πρόσδεσης του συμπλόκου του αντιμικροβιακού πεπτιδίου LL-37 και DNA του ξενιστή στον TLR-9, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιντερφερόνης- $\alpha$  (Εικόνα 1) (Lande, et al., 2007). Τα κερατινοκύτταρα των ψωριασικών αλλοιώσεων βρίθουν από αντιμικροβιακά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων των LL-37,  $\beta$ -αμυντίνες (defensins) και S100A7 (psoriasin), τα οποία έχουν και χημειοτακτική λειτουργία και διαμορφώνουν την δραστηριότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως των δενδριτικών και των T-κυττάρων (Εικόνα 1) (Büchau & Gallo, 2007). Τα κερατινοκύτταρα έχουν επίσης ένα δυναμικό βοηθητικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις της επιδερμίδας, καθώς αποκρίνονται σε κυτταροκίνες των δενδριτικών και των T-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ιντερφερονών, του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), της ιντερλευκίνης-17 και κυτταροκινών της οικογένειας της ιντερλευκίνης-20, και με τη σειρά τους παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-6, και TNF- $\alpha$ ) και χημειοκινών (π.χ. ιντερλευκίνη-8 [CXCL8], CXCL10 και CCL20) (Εικόνα 2) (Nestle, et al., 2009).

Τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα της επιδερμίδας είναι αυξημένα στις ψωριασικές αλλοιώσεις και προκαλούν πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και παραγωγή κυτταροκινών των βοηθητικών T-κυττάρων τύπου 1 (Th1) (Nestle, et al., 1994). Κατά τις προ-φλεγμονώδεις αντιδράσεις εξειδικευμένες υποομάδες δενδριτικών κυττάρων (T1P δενδριτικά κύτταρα) παράγουν TNF- $\alpha$  και επαγωγίμη συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (iNOS) (Εικόνα 1) (Lowes, et al., 2005).

Βασικό γεγονός στην εξέλιξη της ψωρίασης είναι η μετανάστευση των T-κυττάρων από τη δερμίδα στην επιδερμίδα, γεγονός που ελέγχεται από την αλληλεπίδραση  $\alpha_1\beta_1$  ιντεγκρίνης (πολύ όψιμο αντιγόνο-1 [very late antigen 1, VLA-1]) των T-κυττάρων με το κολλαγόνο IV της βασική μεμβράνης της ψωριασικής επιδερμίδας. Τα T-κύτταρα στην ψωρίαση εκκρίνουν κυρίως ιντερφερόνη- $\gamma$  και ιντερλευκίνη-17. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιντερλευκίνη-17-A που εκκρίνεται από τα τύπου 17 βοηθητικά T-κύτταρα (Th17), καθώς αυτός ο κυτταρικός τύπος ειδικεύεται στην ανοσοεπιτήρηση του επιθηλίου, και εκκρίνει ιντερλευκίνη-22. Η ιντερλευκίνη-22 είναι μία κομβική κυτταροκίνη στην εξέλιξη της ψωρίασης, καθώς συνδέεται με την απορρύθμιση της λειτουργίας του επιθηλίου

προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων και χημειοκινών (Εικόνα 2) (Nestle, et al., 2009).

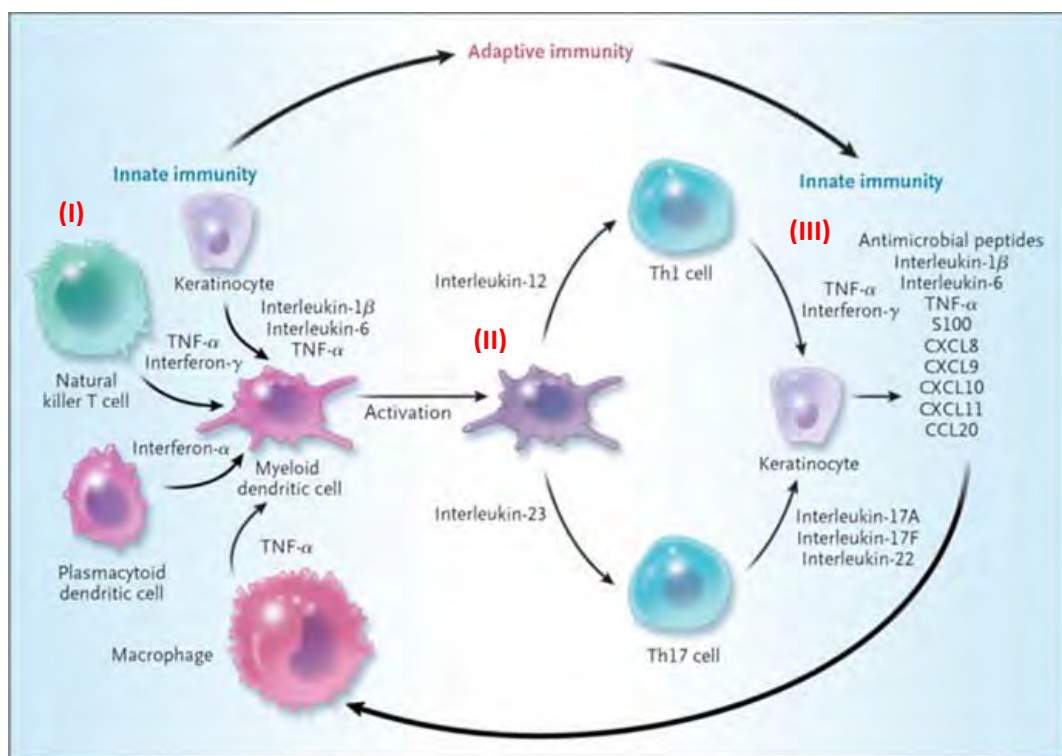
Στην ψωρίαση, στο δίκτυο κυτταροκινών που λαμβάνει χώρα, τρεις κυτταροκίνες φαίνεται να έχουν κυρίαρχο ρόλο: οι ιντερφερόνες τύπου I, η ιντερφερόνη-γ και ο TNF-α. Τόσο ο TNF-α όσο και η ιντερφερόνη-γ έχουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης των ψωριασικών αλλοιώσεων από την έναρξή ως την διατήρηση της νόσου.

(I) Η έναρξη της νόσου επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Το έναυσμα μπορεί να δώσει ένα τραύμα ή μια βακτηριακή λοίμωξη, ξεκινώντας ένα καταρράκτη γεγονότων που περιλαμβάνουν (II) τον σχηματισμό του συμπλόκου DNA/LL-37, την ενεργοποίηση των πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων και την έκκριση ιντερφερόνης-α. (III) Τα ενεργά μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και επάγουν την διαφοροποίηση των ανώριμων T-κυττάρων σε δραστικά κύτταρα (Th17, Tc17, Th1 και Tc1), τα οποία επιστρέφουν στην κυκλοφορία. (IV) Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εκφράζουν τους υποδοχείς των χημειοκινών CCR6, CCR4 και CXCR3 μεταναστεύουν στο δέρμα κατά μήκος της κλίσης των χημειοκινών. Βασικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της συντήρησης της νόσου είναι: ① η παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στα T-κύτταρα και η απελευθέρωση ιντερλευκίνης-23 από δενδριτικά κύτταρα του δέρματος, ② η παραγωγή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) και νιτρικού οξειδίου, από τα δενδριτικά κύτταρα TIP (TNF-α and inducible nitric oxide synthase-producing) και ③ η παραγωγή των IL-17A, IL-17F και IL-22 από τα κύτταρα Th17 και Tc17 και INF-γ και TNF-α από τα κύτταρα Th1 και Tc1. (V) Οι μεσολαβητές αυτοί επιδρούν στα κερατινοκύτταρα προκαλώντας την ενεργοποίησή τους, τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (π.χ. LL-37 και β-αμυντίνες), χημειοκινών (π.χ. CXCL1, CXCL9 μέσω CXCL11 και CCL20) και πρωτεϊνών S100 (π.χ. S100A7-9) από αυτά. (VI) Τα δενδριτικά και τα T-κύτταρα σχηματίζουν περιαγγειακά συμπλέγματα και λεμφοειδών δομών δομές γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία λόγω των χημειοκινών που παράγονται από τα μακροφάγα (π.χ. CCL19). Ένα βασικό σημείο ελέγχου είναι η μετανάστευση των T-κυττάρων από το χόριο στην επιδερμίδα που ελέγχεται μέσω της αλληλεπίδρασης της ιντεγκρίνης α1β1 (πολύ όψιμο αντιγόνο 1 [VLA-1]) των T-κυττάρων και του κολλαγόνου IV της βασικής μεμβράνης. Τα κύτταρα NK συνεισφέρουν στην εξέλιξη της νόσου. (VII) Βρόχοι ανάδρασης που αφορούν τα κερατινοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση του ιστού με ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και πολλαπλασιασμό και εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. (VIII) Τα ουδετερόφιλα της επιδερμίδας προσελκύονται από χημειοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-8 (CXCL8) και CXCL1. CD45RO: cluster designation 45RO, EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, KGF-1/2: αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρου τύπος 1 και 2, TGF-β: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Nestle, et al., 2009).

χρησιμοποιούνται στη θεραπεία. Επιπλέον, η ιντερλευκίνη-23 των δένδριτικών κυττάρων και η ιντερλευκίνη-17A και ιντερλευκίνη-22 των βοηθητικών T-κυττάρων είναι μεγάλης σημασίας (Εικόνα 2). Οι κύριες κυτταροκίνες στην ψωρίαση ενεργούν μέσω δύο σηματοδοτικών μονοπατιών: του JAK-STAT (Janus kinases and signal transducers and activators of transcription) στην περίπτωση των ιντερφερονών τύπου I, της ιντερφερόνης- $\gamma$ , της ιντερλευκίνης-23, της ιντερλευκίνης-12 και της ιντερλευκίνης-22, και του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF- $\kappa$ B στην περίπτωση του TNF- $\alpha$ . Έτσι, οι σχετικές με τη ψωρίαση κυτταροκίνες συγκλίνουν σε βασικά ενδοκυτταρικά σημεία ελέγχου, που είναι κοινά για πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις (Nestle, et al., 2009).



Εικόνα 2: Κύτταρα και μεσολαβητές που γεφυρώνουν την φυσική και την επίκτητη ανοσία στην ψωρίαση.

(I) Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας παράγουν κυτταροκίνες (παράγοντας νέκρωσης όγκου  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , και IL-6) που ενεργοποιούν τα μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα. (II) Τα ενεργοποιημένα δένδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν αντιγόνα και εκκρίνουν μεσολαβητές, όπως η IL-12 και η IL-23, που επάγουν την διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε βοηθητικά τύπου 17 και 1 (Th17 και Th1). (III) Τα T-κύτταρα, με τη σειρά τους, εκκρίνουν μεσολαβητές (π.χ. IL-17A, IL-17F και IL-22), που ενεργοποιούν τα κερατινοκύτταρα και επάγουν την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (π.χ., LL-37 και  $\beta$ -αμυντίνες), προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6), χημειοκινών (CXCL8 μέσω CXCL11 και CCL20) και πρωτεϊνών S100. Οι μεσολαβητές αυτοί ανατροφοδοτούν τις προ-φλεγμονώδεις αντιδράσεις και σχηματίζουν το φλεγμονώδες διήθημα (Nestle, et al., 2009).

### 1.1.2 Γενετικοί παράγοντες

Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι η πιθανότητα εμφάνισης ψωρίασης είναι αυξημένη μεταξύ συγγενών πρώτου και δευτέρου βαθμού σε σχέση με την εμφάνισή της στο γενικό πληθυσμό. Επίσης μελέτες διδύμων συνηγορούν στην γενετική βάση της ασθένειας, καθώς έδειξαν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ψωρίασης είναι δύο με τρεις φορές μεγαλύτερος για τα μονοζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με τα διζυγωτικά (Farber & Nall, 1974).

Η εμφάνιση της ψωρίασης έχει συσχετιστεί με γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση (TNF- $\alpha$ , IL-12B, και IL-23R) (Prieto-Perez, et al., 2013) αλλά και με γονίδια που εμπλέκονται στην οργάνωση των επιδερμικών κυττάρων και υπερεκφράζονται στην ψωρίαση (Iizuka, et al., 2004; Kulski, et al., 2005). Στον Πίνακα 1 εμφανίζονται

συγκεντρωτικά τα γονίδια και οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) αυτών, οι οποίοι εμφανίζουν συσχέτιση με την ψωρίαση (Prieto-Pérez, et al., 2013). Μελέτες επικεντρωμένες στους πολυμορφισμούς αυτούς δείχνουν διαφορές στην συσχέτισή τους με την εμφάνιση της ψωρίασης σε ασθενείς διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων (Prieto-Pérez, et al., 2013).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη TNF-α επιτελεί βασικό ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης, καθώς εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του *TNF-α* μπορεί να αλλάξουν ποσοτικά την απελευθέρωση της κυτταροκίνης, αλλά μέσα στα φυσιολογικά όρια, χωρίς να αποτελεί υπόβαθρο για την εμφάνιση ασθένειας (Louis, et al., 1998). Μελέτες έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί rs1800629 και rs361525 του *TNF-α* (Πίνακας 1) εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την πρώιμη εμφανιζόμενη ψωρίαση (Hohler, et al., 1997). Συγκεκριμένα, μελέτη που διενεργήθηκε σε ασθενείς με ψωρίαση τύπου I (έναρξη πριν την ηλικία των 40 ετών), ασθενείς με ψωρίαση τύπου II (έναρξη μετά την ηλικία των 40 ετών) και μη προσβεβλημένα άτομα (controls) έδειξε ότι το αλληλόμορφο rs361525\*A εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ψωρίαση τύπου I ενώ το αλληλόμορφο rs1800629\*A με μικρότερη συχνότητα (Reich, et al., 1999). Δηλαδή, ο γονότυπος GG για τον πολυμορφισμό rs361525 συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης ψωρίασης τύπου I (Arias, et al., 1997).

Η φλεγμονώδης απόκριση στην ψωρίαση χαρακτηρίζεται από παραγωγή του TNF-α και της IL-1β (Εικόνα 2). Μια μελέτη *in vitro* σε μονοκύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξε συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου CC του πολυμορφισμού rs16944 της *IL-1β* με αυξημένη παραγωγή του IL-1RA, που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 και αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, και την εμφάνιση ψωρίασης τύπου II (Πίνακας 1) (Reich, et al., 2002).

Οι ιντερλευκίνες IL-23 και IL-12 γεφυρώνουν την φυσική με την επίκτητη ανοσία ενεργοποιώντας τα λεμφοκύτταρα Th17 και τα Th1 αντίστοιχα (Εικόνα 2). Η IL-23 ρυθμίζει και διεγείρει την ενεργοποίηση, την διαφοροποίηση και την επιβίωση των λεμφοκυττάρων Th17 (Toussiro, 2012; Kurzeja, et al., 2011) και η IL-12 διεγείρει τα Th1 προς την παραγωγή IFN-γ (Li & Begovich, 2009). Και οι δύο αποτελούν στόχο βιολογικών φαρμάκων (ustekinumab), γεγονός που συνηγορεί στον σημαντικό ρόλο που παίζουν στην ψωρίαση (Kurzeja, et al., 2011). Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος έχουν καταδείξει συσχέτιση πολυμορφισμών στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-23 (*IL-23R*) και το γονίδιο της ιντερλευκίνης-12B (*IL-12B*) με την εμφάνιση της ψωρίασης, αλλά και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Cargill, et al., 2007; Caron, et al., 2007). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι απλότυποι που περιλαμβάνουν συνδυασμό πολυμορφισμών σε κάθε ένα από τα δύο γονίδια αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ψωρίασης (Prieto-Pérez, et al., 2013).

Άλλα γονίδια που εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την ψωρίαση είναι (Nair et al. 2009):

- η *IL-13*, η οποία συμμετέχει στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων Th2 (rs20541)
- η πρωτεΐνη 3 που αλληλεπιδρά με τον TNFα (*TNFAIP3*) [rs610604, rs6920220, rs10499194 και rs5029939 (Musone, et al., 2011; Lodolce, et al., 2010)] και η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την TNFAIP3 (*TNIP1*), οι οποίες ρυθμίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB (Li & Begovich, 2009)
- το *IL-1RN*, το οποίο αναστέλλει τη δραστηριότητα της IL-1 και
- το *HLA-C* (rs12191877), το οποίο εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Nair, et al., 2009) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στα γονίδια που σχετίζονται με την ψωρίαση.

Γονίδιο	SNP	Γονίδιο	SNP	Γονίδιο	SNP	Γονίδιο	SNP
IL-23R	rs7530511	TNFAIP3	rs610604	IL-15	rs2857261	ERAP1	rs151823
	rs2201841		rs6920220		rs10519613		rs27524
	rs11209026		rs10499194		rs1057972	IL-1B	rs16944
	rs11465817		rs5029939	TNFRSF1B	rs1061622	TRAF3IP2	rs13210247
	rs1343152		rs2230926	MCP1	rs1024611		rs33980500
	rs2066808	TNIP1	rs17728338	CTLA4	rs3087243		rs13196377
IL-10	rs1800896	IL-1RN	rs397211		rs231775		rs13190932
TNFα	rs1800629	HLA-C	rs12191877	DEFB4	rs2740091		rs240993
	rs361525		rs10484554		rs2737532	IL-28RA	rs4649203
	rs1799724		rs1265181	STAT4	rs7574865	TYK2	rs12720356
IL-12B	rs6887695		rs3134792	IL-18	rs187238	IFIH1	rs17716942
	rs3212227	NF-κBIA	rs2145623	IL-19	rs2243188	LCE	rs4085613
	rs2082412		rs8016947		rs2243158		rs4845454
	rs2546890	APOE	rs429358	IL-20	rs1713239		rs1886734
GBP6	rs928655		rs7412		rs2981572		rs4112788
IL-6	rs1800795	VDR	rs4516035	IL-20RA	rs1342642		rs6701216
IL-13	rs20541	IFNγ	rs2430561		rs1184860		rs4112788
	rs848	IL-2	rs2069762		rs1167846	ZNF313	rs2235617
	rs1800925	IL-4	rs2243250		rs1167849		rs495337

IL: ιντερλευκίνη, R: υποδοχέας, STAT: μετατροπέας σημάτων και ενεργοποιητής της μεταγραφής, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων, GBP: γουανυλική πρωτεΐνη σύνδεσης, TNFAIP: πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με τον α-TNF, TNIP1: πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με τον TNFAIP3, IL-1RN: ανταγωνιστικός υποδοχέας της ιντερλευκίνης 1, HLA: λευκοκυτταρικό αντιγόνο του ανθρώπου; NF-κBIA: αναστολέας άλφα του NF-κB, APOE: απολιποπρωτεΐνη E; VDR: υποδοχέας βιταμίνης D, IFN: ιντερφερόνη, TNFRSF1: υπεροικογένεια υποδοχέων TNF, MCP: χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων, CTLA4: πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα, DEFB4: ντεφενσίνη (αμυντίνη) B4, STAT4: μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 4, ERAP: αμινοπεπτιδάση ενδοπλασματικού δικτύου; TRAF3IP: πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με τον TRAF3 (παράγοντας 3 σχετιζόμενος με τον υποδοχέα TNF), IFIH1: περιοχή 1 με ελικάση C επαγόμενη από ιντερφερόνη, LCE: βραδεία κερατινοποίηση ελύτρου, ZNF313 (ή RNF114): πρωτεΐνη με δακτύλο ψευδαργύρου 114.

Οι Ellinghaus et al. (2010) μελέτησαν το γονίδιο *TRAF3IP2*, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο NF-κB/REL και ρυθμίζει το μονοπάτι της IL-17, και ταυτοποίησαν τη συσχέτιση μεταξύ 2 SNPs (rs13210247 και rs33980500) και της ψωρίασης (Πίνακας 1) (Ellinghaus, et al., 2010). Σε μια άλλη μελέτη ο πολυμορφισμός rs240993 του *TRAF3IP2* συσχετίστηκε επίσης με την ψωρίαση (Strange, et al., 2010).

Σε μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Ellinghaus, et al., 2010; Strange, et al., 2010; Feng, et al., 2009) ταυτοποιήθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια *HLA-C*, *NF-κBIA*, *IL-28RA* και *TYK2* που σχετίζονται με τη νόσο (Πίνακας 1). Οι Strange et al. (2010) εντόπισαν αλληλεπίδραση μεταξύ του *HLA-C* και του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης του ενδοπλασματικού δικτύου (*ERAP1*)(rs27524). Η αλληλεπίδραση αυτή αφορά τον τρόπο με τον οποίο η αμινοπεπτιδάση *ERAP1* πέπτει το προϊόν του πολυμορφισμού του γονιδίου *HLA-C*, αλλάζοντας τον τρόπο της αντιγονοπαρουσίασης. Σε μελέτη στον κινέζικο πληθυσμό ο πολυμορφισμός rs151823 του *ERAP1* φαίνεται να συσχετίζεται με την ψωρίαση τύπου I (Sun, et al., 2010). Τα SNPs rs8016947 (*NF-κBIA*), rs4649203 (*IL-28RA*), rs12720356 (*TYR2*), και rs27524 (*ERAP1*)

συσχετίστηκαν με την ψωρίαση από τους Strange et al. (2010), αλλά μετέπειτα μελέτη δεν επιβεβαίωσε την συσχέτιση αυτή (Julia, et al., 2012).

Η ενεργοποίηση των κυττάρων Th1 συνδέεται με την παραγωγή κυτταροκινών (π.χ. IL-2 και INF-γ) (Εικόνα 2). Μελέτες έχουν δείξει συσχέτισμό του πολυμορφισμού rs2069762 (αλληλόμορφο G) του *IL-2* (Kim, et al., 2007) και του rs2430561 του *INF-γ* (Baran, et al., 2008) (Πίνακας 1) με την εμφάνιση της ψωρίασης. Επιπλέον, η παραγωγή της INF-γ αυξάνεται ως απάντηση στην παρουσία της DEFB4 (ντιφενσίνη B4A), ένα μικροβιοκτόνο και κυτταροτοξικό πεπτίδιο (Kanda, et al., 2011) και παρουσία της IL-18 (NCBI). Συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών rs2740091 και rs2737532 στο *DEFB4* (Hollox, et al., 2008) καθώς και rs187238 στο *IL-18* (Kato, et al., 2009) και την προδιάθεση για την εμφάνιση ψωρίασης (Πίνακας 1).

Τα κύτταρα Th2 απελευθερώνουν IL-4, IL-6, IL-10 και IL-13 (Schafer, 2012). Οι κυτταροκίνες IL-6 και IL-10 φαίνεται να συσχετίζονται με την εμφάνιση της ψωρίασης και συγκεκριμένα τα SNPs rs1800795 (γονότυπος CC) για το γονίδιο της *IL-6* και rs1800896 (γονότυπος GG) για το γονίδιο της *IL-10* (Πίνακας 1) (Settin, et al., 2009; Baran, et al., 2008; Craven, et al., 2001). Η IL-13 συμμετέχει στην διαφοροποίηση και την ωρίμανση των B-κυττάρων και στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των κυττάρων Th17 (Li & Begovich, 2009) και ο πολυμορφισμός rs20541 του γονιδίου της έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου (Πίνακας 1) (Julia, et al., 2012). Επιπλέον, ο απλότυπος CCG των rs1800925-rs20541-rs848 στο γονίδιο της *IL-13* συνδέθηκε με την προδιάθεση στην ψωρίαση (Πίνακας 1) (Chang, et al., 2008).

Άλλα γονίδια κυτταροκινών και χημειοκινών που έχουν συσχετιστεί με ψωρίαση είναι τα *IL-19*, *IL-20*, *IL-15* και το *MCP1* (που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μονοκυττάρων).

Ειδικότερα, τα SNPs rs2243188 και rs2243158 του *IL-19* έχουν προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης της νόσου (Πίνακας 1) (Koks, et al., 2004). Εκτός από τους πολυμορφισμούς που εντοπίζονται στο γονίδιο της *IL-20* (Πίνακας 1), πολυμορφισμοί και στο γονίδιο του υποδοχέα της IL-20 (*IL-20RA*) έχουν επίσης συσχετιστεί με ψωρίαση (Πίνακας 1). Από τους πολυμορφισμούς της *IL-15* (rs2857261, rs10519613 και rs1057972) έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση οι rs1057972 και rs10519613 σε Κινέζους και Καυκάσιους (Πίνακας 1) (Prieto-Pérez, et al., 2013). Η MCP1 είναι μια χημειοκίνη που συμμετέχει στην στρατολόγηση μονοκυττάρων και T-κυττάρων στη φλεγμονή, ενώ υψηλά επίπεδά της εμφανίζονται στον ορό των ασθενών. Ο πολυμορφισμός rs10224611 (γονότυπος GG ή AG) στο γονίδιο της *MCP1* αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ψωρίασης (Wang, et al., 2008).

Άλλα γονίδια που συσχετίζονται με την ψωρίαση περιλαμβάνουν το μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 4 (*STAT4*), την απολιποπρωτεΐνη E (*APOE*), τον υποδοχέα της βιταμίνης D (*VDR*) και την πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα (*CTLA4*) (Πίνακας 1). Η APOE μπορεί να επηρεάζει την εξέλιξη της ψωρίασης με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων και τα SNPs του γονιδίου της rs429358 και rs7412 έχουν συσχετιστεί με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας και σταγονοειδή ψωρίαση (Campalani, et al., 2006). Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *VDR* φαίνεται να επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα ποικιλοτρόπως. Ο πολυμορφισμός TaqI (αλληλόμορφο T) του *VDR* συσχετίστηκε με την οικογενή ψωρίαση, ενώ το αλληλόμορφο A του rs451635 φαίνεται να προφυλάσσει έναντι της μη οικογενούς ψωρίασης (Prieto-Pérez, et al., 2013). Ο απλότυπος GG των rs3087243-rs231775 στο γονίδιο *CTLA4* έχει συσχετισθεί με την ψωρίαση, αλλά η ανάλυση αυτών των SNPs μεμονωμένα δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 1) (Luszczek, et al., 2008).

Επιπλέον, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, έχουν αναφερθεί και άλλα SNPs σε γονίδια που εμπλέκονται στις ανοσοαποκρίσεις και σχετίζονται με την ψωρίαση: *IFIH1* (rs17716942), *LCE* (rs4085613, rs4845454, rs1886734, rs4112788, rs6701216, και rs4112788) και *RNF114* (rs2235617 και rs495337) (Hebert, et al., 2012).

Η γνώση των γονιδίων προδιάθεσης για την ψωρίαση μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βήμα για την κατανόηση της μοριακής βάσης της νόσου και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με αυτή τη νόσο.

### 1.1.3 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης

Η θεραπεία της ψωρίασης αφορά κατά κύριο λόγο την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στο επίπεδο της επιδερμίδας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατατάσσονται κύρια σε τοπικές, στη φωτοθεραπεία, σε συστηματικές και στους βιολογικούς παράγοντες.

Οι βιολογικοί παράγοντες αποτελούν την πιο σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης της ψωρίασης, καθώς και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. ρευματοειδούς αρθρίτιδας). Επικεντρώνονται στις ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη της νόσου με λήψη αναστολέων των αντιδράσεων.

Πολλές φορές η θεραπεία της ψωρίασης δεν γίνεται με μόνο ένα σκεύασμα ή διαδικασία, αλλά απαιτεί συνδυασμό αυτών για καλύτερα αποτελέσματα. Η στρατηγική αυτή οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι είναι συχνή η εμφάνιση αντοχής στη θεραπεία (ταχυφυλαξία) που λαμβάνεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για τις βιολογικές θεραπείες συγκεκριμένα, παρατηρείται η ανάπτυξη ανοσολογικών αντιδράσεων προς τα τροποποιημένα αντισώματα που λαμβάνονται.

#### 1.1.3.1 Τοπικές Θεραπείες

Είναι κατάλληλες για περιορισμένη σε έκταση εμφάνιση της νόσου, σε ασθενείς που δε μπορούν να λάβουν συστηματικά φάρμακα και σε παιδιά. Πολλές είναι οι επιλογές για τις ουσίες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν.

#### I. Ανθραλίνη

Πρόκειται για αποτελεσματικό φάρμακο για την ψωρίαση, η χρήση του όμως έχει περιοριστεί γιατί προκαλεί συχνά δερματικό ερεθισμό και καφέ χρωματισμό δέρματος και ρούχων και δε γίνεται καλά ανεκτή από τους ασθενείς. Θεωρείται λιγότερο αποτελεσματική από τα τοπικά στεροειδή και τα ανάλογα της βιταμίνης D. Η εφαρμογή της σε συνδυασμό με UVB (σχήμα Ingram) αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα (Kurian & Barankin, 2011 ).

#### II. Ανάλογα βιταμίνης D3

Τρεις ουσίες έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ψωρίασης: η *καλσιποτριόλη*, η *καλσιτριόλη* και η *τακαλσιτόλη*. Τα ανάλογα της βιταμίνης D δρουν κυρίως στη διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων της επιδερμίδας, μειώνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού. Η κλινική ανταπόκριση με τα σκευάσματα αυτά αργεί σε σχέση με τα τοπικά στεροειδή, αλλά θεωρούνται πολύ πιο ασφαλή και είναι πολύτιμα είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυαστική θεραπεία. Η μακροχρόνια χορήγησή τους δεν συνδέεται με ταχυφυλαξία. Η *καλσιποτριόλη* είναι το πιο καλά μελετημένο ανάλογο της βιταμίνης D<sub>3</sub> για τη θεραπεία της ψωρίασης και ίσως το πιο αποτελεσματικό (Kurian & Barankin, 2011 ).

### III. Ρετινοειδή (Ταζαροτένη)

Η ταζαροτένη είναι συνθετικό ρετινοειδές και αποτελεί ένα καλό φάρμακο σε ήπια ως μέτρια ψωρίαση κατά πλάκας. Ελαττώνει κυρίως την απολέπιση και τη διήθηση των ψωριασικών πλακών ενώ έχει μικρότερη επίδραση στο ερύθημα.

Η θεραπευτική επιτυχία ενισχύεται με εφαρμογή τοπικών στεροειδών (μέτρια ως ισχυρά), τα οποία εκτός από το ότι τα ίδια βελτιώνουν τις αλλοιώσεις, ελαττώνουν και τον ερεθισμό του δέρματος που συχνά παρατηρείται με την ταζαροτένη. Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου ενισχύεται, επίσης, από συνδυαστική φωτοθεραπεία (Kurian & Barankin, 2011 ).

### IV. Πίσσα

Αν και πολύ παλιό φάρμακο για την ψωρίαση υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που να αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητά της και να τη συγκρίνουν με άλλες θεραπείες. Σε συνδυασμό με UVB έχει καλύτερα αποτελέσματα από ότι η ακτινοβολία UVB μόνη της (σχήμα Goeckerman) (Kurian & Barankin, 2011 ).

### V. Τοπικά κορτικοστεροειδή

Τα τοπικά στεροειδή είναι πολύ αποτελεσματικά για την ήπια ως μέτρια ψωρίαση. Πολύ ισχυρά στεροειδή οδηγούν σε βελτίωση των αλλοιώσεων στο 68-89% των ασθενών ενώ τα ισχυρά στο 46-56% των ασθενών. Η μακροχρόνια χρήση τους συνδέεται με ταχυφυλαξία, καθώς επίσης και με τοπικές ανεπιθύμητες ενέργειες (ατροφία, τηλαγγειεκτασίες, ραγάδες) και συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες (ιατρογενές σύνδρομο Cushing, καταστολή του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια). Τα τοπικά στεροειδή συνδυάζονται άριστα με άλλες τοπικές και συστηματικές θεραπείες (Kurian & Barankin, 2011 ).

### VI. Μαλακτικοί παράγοντες

Τα ενυδατικά και τα μαλακτικά σκευάσματα καθώς και οι κερατολυτικοί παράγοντες αποτελούν συμπληρωματική αγωγή στην ψωρίαση. Η εφαρμογή τους αντιμετωπίζει την ξηρότητα, την απολέπιση και βοηθά στην καταπολέμηση του κνησμού (Νοσ.Α.Συγγρός).

#### 1.1.3.2 Φωτοθεραπεία

Η έκθεση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός (φωτοθεραπεία) έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική για τις δερματικές εκδηλώσεις της ψωρίασης χωρίς να επιδρά στις αρθρώσεις. Η φωτοθεραπεία χρησιμοποιείται συνδυαστικά και με άλλα φάρμακα, κυρίως ασιτρετίνη και μεθοτρεξάτη καθώς και τοπικά σκευάσματα. Οι στόχοι της συνδυαστικής θεραπείας είναι η υψηλότερη αποτελεσματικότητα, η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών από τη φωτοθεραπεία και η ελάττωση της συνολικής δόσης ακτινοβολίας που απαιτείται για να επιτευχθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα.

#### I. PUVA-BATH PUVA, Θαλασσοθεραπεία

Η φωτοχημειοθεραπεία (PUVA) συνδυάζει τη λήψη μιας φωτοευαίσθητης ουσίας 5- ή 8-μεθοξυ-ψωραλένιο (5-MOP ή 8-MOP) με την ακόλουθη έκθεση σε ακτινοβολία UVA (320-400 nm) (Naldi & Griffiths, 2005).

#### II. Στενό φάσμα υπεριώδους ακτινοβολίας B, excimer laser

Η ακτινοβολία UVB είναι πιο αποτελεσματική και χρησιμοποιείται χωρίς τη χορήγηση ψωραλενίων. Μπορεί να αφορά σε όλο το φάσμα της UVB (UVB ευρέος φάσματος, 290-320 nm) ή μόνο στο πιο θεραπευτικό τμήμα της (UVB στενού φάσματος, 311 nm) (Naldi & Griffiths, 2005).

### 1.1.3.3 Συστημικές Θεραπείες

#### I. Μεθοτρεξάτη

Είναι αποτελεσματικό φάρμακο για μέτρια και σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας, για την ερυθροδερμική ψωρίαση, τη φλυκταινώδη ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως βραχυπρόθεσμη επιλογή για να ελεγχθεί μία ασταθής ψωρίαση όπως η φλυκταινώδης ή η ερυθροδερμική είτε, συχνότερα, ως μακροπρόθεσμη θεραπεία συντήρησης (Roenigk, et al., 1998).

Η μεθοτρεξάτη συγχορηγείται για μεγάλα χρονικά διαστήματα με τα αντι-TNF-α φάρμακα, προκειμένου να ελαττώσει την πιθανότητα ανάπτυξης αντισωμάτων εναντίων τους. Επίσης χορηγείται βραχυπρόθεσμα για να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των βιολογικών φαρμάκων και να ελέγξει πιθανές μικρές εξάρσεις ψωρίασης που εμφανίζονται κατά τη λήψη τους (Roenigk, et al., 1998).

#### II. Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα κυκλικό εντεκαπεπτίδιο, το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *Tolypocladium inflatum* gams και ήταν το πρώτο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο το οποίο είχε τη δυνατότητα ανοσορρύθμισης των T-κυττάρων χωρίς υπερβολική τοξικότητα και μυελοτοξικότητα, επιτρέποντας την ελαχιστοποίηση του κινδύνου απόρριψης στις μεταμοσχεύσεις οργάνων.

Η κυκλοσπορίνη δρα δημιουργώντας σύμπλοκο με μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την κυκλοφιλίνη (cyclophilin) και αναστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-ATC και AP-1 των T-κυττάρων, σταματώντας την παραγωγή της ιντερλευκίνης-2. Επιπρόσθετα, η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και μειώνει τη έκφραση διαφόρων κυτταρικών μορίων προσκόλλησης (ICAM) ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την αντιφλεγμονώδη δράση της.

Η μειωμένη έκφραση των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης του ενδοθηλίου του δερματικού αγγειακού πλέγματος στις ψωριασικές αλλοιώσεις μειώνει την κυτταρική διήθηση τόσο από τα T-κύτταρα όσο και από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, η κυκλοσπορίνη έχει μελετηθεί ότι επιδρά ανασταλτικά και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα Langerhans και τα δενδριτικά κύτταρα. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμαδειχθεί αν η κυκλοσπορίνη συμβάλλει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των επιδερμικών κυττάρων. Τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν νέους μηχανισμούς δράσης της κυκλοσπορίνης μέσω αναστολής των Th1 και Th17 (Haider, et al., 2008).

#### III. Ρετινοειδή

Η αιτρετίνη είναι το ρετινοειδές που ευρύτερα χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ψωρίασης, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλους συστημικούς και τοπικούς παράγοντες. Επειδή δεν προκαλεί ανοσοκαταστολή, η αιτρετίνη αποτελεί άριστη επιλογή για ασθενείς με HIV, με ιστορικό κακοήθειας ή για ηλικιωμένους. Τα ρετινοειδή συνδυάζονται άριστα με τη φωτοθεραπεία δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα και ασφάλεια, αφού λαμβάνεται μικρότερη ποσότητα ακτινοβολίας και ρετινοειδούς από τον ασθενή. Τελευταία, επίσης, συνδυάζονται με τους βιολογικούς παράγοντες προκειμένου να αυξήσουν την αποτελεσματικότητά τους και να ελέγξουν μικρές εξάρσεις που τυχόν εμφανίζονται κατά τη χρήση τους (Feldman, 2013).

#### 1.1.3.4 Βιολογικοί παράγοντες

Η εμφάνιση των βιολογικών θεραπειών έχει βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών με ψωρίαση και άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές (π.χ. ρευματοειδή αρθρίτιδα και ασθένεια του Crohn) και νεοπλασμάτα (π.χ. μη-Hodgkin λέμφωμα B-κυττάρων) με στόχευση στις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και στους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων. Οι βιολογικοί παράγοντες θεωρείται ότι ασκούν τις φαρμακολογικές επιδράσεις τους τόσο μέσω του μεταβλητού τμήματός τους (με σκοπό να εμποδιστεί το μόριο-στόχος) όσο και μέσω του σταθερού τμήματός τους (το τμήμα Fc της IgG), το οποίο δεσμεύεται ειδικά στους υποδοχείς Fcγ (FcγRs). Οι FcγRs εκφράζονται επί της επιφάνειας σχεδόν όλων των κυττάρων του ανοσοποιητικού και με την σύνδεσή τους με το τμήμα Fc της IgG μπορούν να εκκινήσουν διαφορετικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως η απελευθέρωση κυτταροκινών, η επαγωγή της απόπτωσης, η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρική κυτταροτοξικότητα (ADCC) και η απομάκρυνση ανοσοσυμπλόκων μέσω των μακροφάγων. Αυτές οι δράσεις μπορούν επίσης να προκληθούν από θεραπευτικά αντισώματα (Julia, et al., 2013).

Οι κυριότεροι βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν στη λειτουργία των T-κυττάρων είναι το **efalizumab** και το **alefacept**.

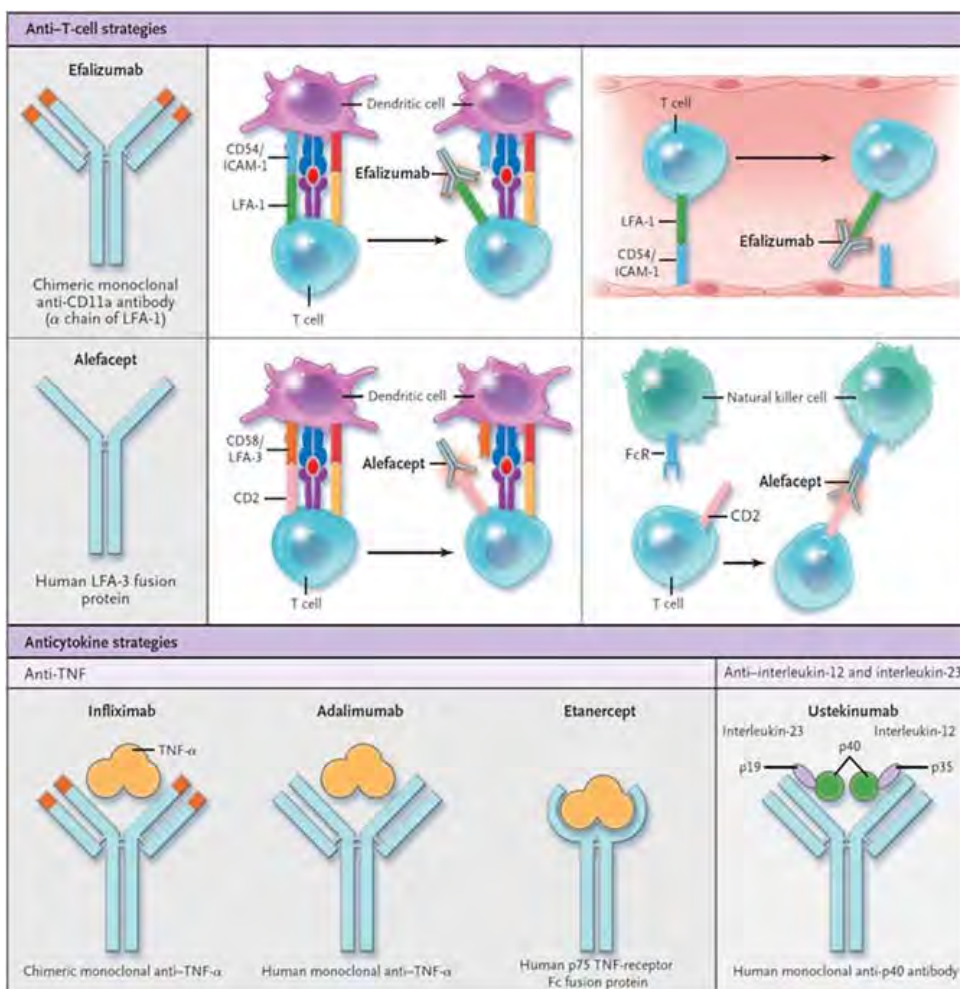
Το **efalizumab** είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει το CD11a, μια υπομονάδα του αντιγόνου των λευκοκυττάρων LFA-1. Το LFA-1 είναι ένα μόριο της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων σημαντικό για την ενεργοποίησή τους, για τη μετανάστευσή τους στο δέρμα και για την κυτταροτοξική τους δράση. Με τη δέσμευση στο CD11a, το φάρμακο εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ LFA-1 και ICAM-1 (Εικόνα 3). Το ICAM-1 βρίσκεται στο αγγειακό ενδοθήλιο, επιτρέπει την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων σε αυτό και την έξοδό τους από τα αγγεία. Κατά συνέπεια, το efalizumab, αποτρέποντας τη σύνδεση με το ICAM-1, εμποδίζει και τη διακίνηση των λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες ή στο δέρμα. Αυτός ο αποκλεισμός των λεμφοκυττάρων είναι αναστρέψιμος και δεν ελαττώνει των αριθμό τους (Weinberg, 2003).

Το efalizumab αποτελεί αποτελεσματική και ασφαλή θεραπεία για μέτρια ως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας. Μελέτες έδειξαν ότι 27-39% των ασθενών είχαν βελτίωση PASI κατά 75% μετά από 3 μήνες θεραπεία. Μετά από 6 μήνες θεραπεία, το ποσοστό ανέρχεται στο 44%. Αν στους 3 μήνες η βελτίωση του PASI δεν είναι τουλάχιστον 50%, τότε το φάρμακο διακόπτεται (Weinberg, 2003).

Το **alefacept** είναι μια διμερής πρωτεΐνη σύντηξης που περιλαμβάνει το εξωκυττάριο τμήμα του ανθρώπινου αντιγόνου LFA-3 (δέσμευση με τον CD2) συνδεδεμένο με το τμήμα Fc της IgG1 (Εικόνα 3). Εμποδίζει τη σύνδεση του LFA-3 με τον CD2 αναστέλλοντας την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων. Επίσης, *in vitro* συντελεί στην απόπτωση των T-κυττάρων μνήμης που εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα CD2 (Weinberg, 2003).

#### Παράγοντες Anti-TNF-α

Υπάρχουν τρεις βιολογικοί παράγοντες που δεσμεύουν τον TNF-α, το **etanercept**, το **infliximab**, και το **adalimumab**. Και οι τρεις είναι αποτελεσματικοί και για τον έλεγχο της ψωριασικής αρθρίτιδας. Αν και οι παράγοντες αντι-TNF-α δεν έχουν επίσημη ένδειξη για θεραπεία άλλων μορφών ψωρίασης εκτός από την ψωρίαση κατά πλάκας, φαίνεται να είναι αποτελεσματικά και σε φλυκταινώδη, ερυθροδερμική, σταγονοειδή ψωρίαση, καθώς και στην ψωριασική ονυχία.



Εικόνα 3: Βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της ψωρίασης.

Παρουσιάζονται οι στοχευμένες βιολογικές θεραπείες που είτε έχουν εγκριθεί είτε έχουν δημοσιευθεί τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών φάσης 3. Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι οι θεραπείες που στοχεύουν στα T-κύτταρα (alefacept και efalizumab) και οι θεραπείες αντι-κυτταροκινών (θεραπίες αντι-TNF): infliximab, adalimumab, etanercept και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ιντερλευκίνης-12 και της ιντερλευκίνης-23 (ustekinumab). Το efalizumab (το οποίο έχει αποσυρθεί από την αγορά) είναι ένα χημειοκίνητο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD11a. Αποτρέπει την αλληλεπίδραση του CD11a (αντιγόνο σχετιζόμενο με τη λειτουργία του λεμφοκυττάρου [lymphocyte-function-associated antigen] 1 [LFA-1]) με το μεσοκυττάριο μόριο προσκόλλησης 1 (ICAM-1), οδηγώντας σε διατάραξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ δενδριτικών και T-κυττάρων, καθώς και αποτροπή σύνδεσης των ανοσοκυττάρων με τα αιμοφόρα αγγεία. Το alefacept είναι μια πρωτεΐνη σύντηξης με την περιοχή Fc του ανθρώπινου LFA 3 (LFA-3) που αποτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ του CD2 των T-κυττάρων και του LFA-3 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Επάγει, επίσης, την εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα στα T-κύτταρα που συνδέονται με το alefacept. Οι θεραπείες αντι-TNF είναι: ① ένα ανθρωποποιημένο χημειοκίνητο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-TNF-α, ② ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-TNF-α και ③ μια ανθρώπινη πρωτεΐνη σύντηξης με την Fc περιοχή του p75 TNF-υποδοχέα. Τέλος, η αναστολή της IL-12 και της IL-23 επιτυγχάνεται με τη βοήθεια αντισωμάτων που στοχεύουν την αλυσίδα p40 των κυτταροκινών (Nestle, et al., 2009).

Το **etanercept** (Enbrel) είναι μια πλήρως ανθρώπινη διμερής πρωτεΐνη σύντηξης που αποτελείται από την εξωκυττάρια θέση σύνδεσης του υποδοχέα p75 του TNF-α και την περιοχή Fc του ανθρώπινου IgG1 (Εικόνα 3), προκαλώντας έτσι την σύνδεση του TNF-α με το μονοκλωνικό αντίσωμα του φαρμάκου και την εξουδετέρωσή της κυτταροκίνης. Σε ασθενείς που λάμβαναν 50mg δύο φορές την εβδομάδα για 3 μήνες παρατηρήθηκε βελτίωση στο PASI κατά 75% στο 49% των ασθενών (Goffe & Cather, 2003).

Το **adalimumab** (Humira) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που προσδένεται στον TNF-α και αποτρέπει τη σύνδεση του TNF-α με τους υποδοχείς του (Εικόνα 3). Είναι πλήρως ανθρώπινο και χορηγείται υποδορίως. Το 80% περίπου των ασθενών εμφανίζει βελτίωση PASI 75%, τέσσερις μήνες μετά την έναρξη του φαρμάκου (Cohen, et al., 2014).

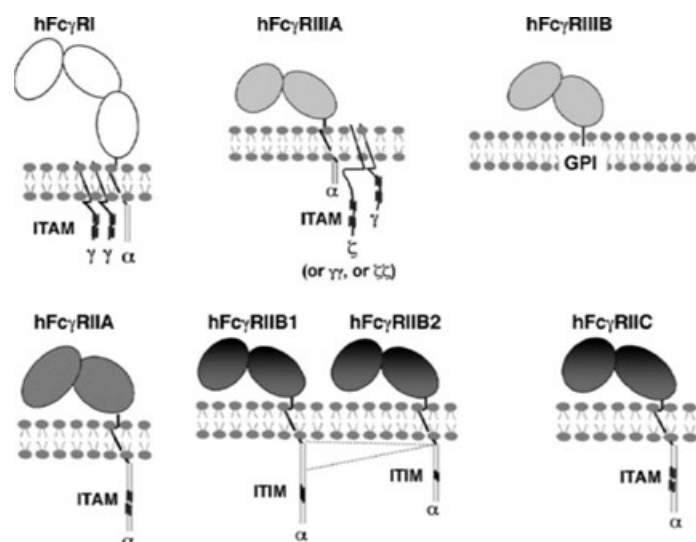
Το **infliximab** (Remicade) είναι ένα χιμαϊρικό (ποντικού-ανθρώπου) μονοκλωνικό αντίσωμα της IgG1 (Εικόνα 3) που δεσμεύει τον TNF-α και αναστέλλει την παραγωγή και άλλων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, μειώνοντας την κυτταρική διήθηση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Χορηγείται ενδοφλέβια σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Crohn και ρευματοειδή αρθρίτιδα. Κατά τη 10η εβδομάδα από την έναρξή του, το 80% των ασθενών επιδεικνύουν βελτίωση PASI 75% (Weinberg, 2003).

Γενικά, και τα τρία αυτά φάρμακα είναι πολύ αποτελεσματικά για τον έλεγχο της ψωρίασης. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αρχή της θεραπείας από ότι η πρωτεΐνη σύντηξης, αλλά τα θεραπευτικά αποτελέσματα φαίνονται να συγκλίνουν σε αποτελεσματικότητα με την πάροδο της θεραπείας, με μια μικρή τάση υπέρ των αντισωμάτων. Αυτό συμβαίνει γιατί παρατηρείται μία τάση για όλους τους παράγοντες αντι-TNF-α να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους με τη συνεχιζόμενη θεραπεία (Weinberg, 2003).

Οι λόγοι που οδηγούν στην ελάττωση της αποτελεσματικότητας των αντι-TNF-α φαρμάκων δεν είναι ξεκάθαροι. Για το etanercept δεν έχει τεκμηριωθεί η ύπαρξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων (παρατηρούνται αντισώματα εναντίον του φαρμάκου σε ποσοστό 6% των ασθενών αλλά δεν έχουν συνδεθεί με απώλεια δράσης). Αντισώματα παρατηρούνται σε αρκετούς ασθενείς με τη συνέχιση της θεραπείας με adalimumab ή infliximab και ένα ποσοστό αυτών είναι εξουδετερωτικά. Το infliximab έχει περισσότερες πιθανότητες να δημιουργήσει εξουδετερωτικά αντισώματα αφού είναι χιμαϊρικό (Weinberg, 2003).

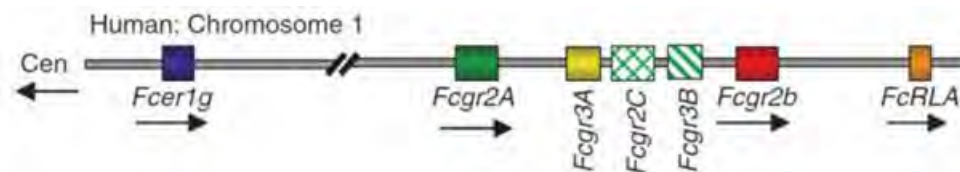
## 1.2 Οι υποδοχείς Fc

Οι ειδικοί υποδοχείς των ανοσοσφαιρινών (FcR) εκφράζονται ευρέως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και επιλεκτικά σε άλλους τύπους κυττάρων, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μεσαγγειακά κύτταρα, και οι οστεοκλάστες (Powell, et al., 1999). Οι λευκοκυτταρικοί υποδοχείς για τα αντισώματα IgG (FcγR), IgE (FcεR) και IgA (FcαR) συμμετέχουν στην απομάκρυνση των ανοσολογικών συμπλόκων, την ρύθμιση της απελευθέρωσης των φλεγμονωδών κυτταροκινών και την αντίσταση του ξενιστή στην λοίμωξη με την αλληλεπίδραση μεταξύ των ανοσολογικών συμπλόκων (Powell, et al., 1999). Προσδένονται στην περιοχή Fc των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα η σύνδεση του FcγRIIIA με την IgG1 γίνεται μέσω της μίας εξωκυττάριας υπομονάδας του υποδοχέα με την περιοχή CH2 του τμήματος Fc του αντισώματος (Radaev & Sun, 2002).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων FcγR (Siberil, et al., 2006).

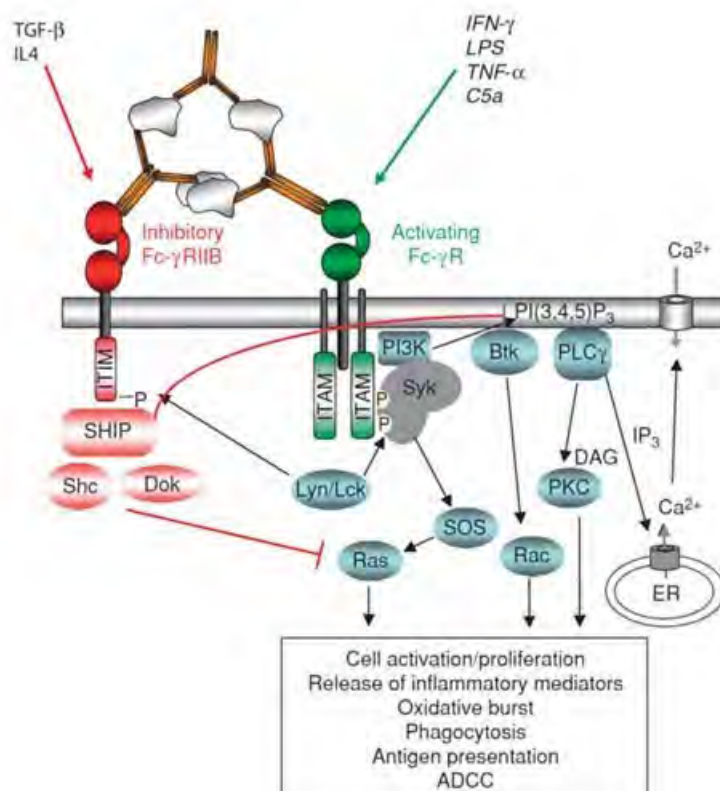
Τα γονίδια των διαφορετικών τύπων FcγR (FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIA και FcγRIIB) (Εικόνα 4) εδράζονται στο χρωμόσωμα 1 με μορφή συμπλόκου γονιδίων (Εικόνα 5). Σε μερικά από αυτά τα γονίδια έχουν διαπιστωθεί λειτουργικές μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου (SNPs), με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορών ως προς στη συγγένεια των υποδοχέων για το τμήμα Fc της IgG. Επίσης, το σύμπλοκο των γονιδίων περιλαμβάνει και τα ψευδογονίδια FcγRIB και FcγRIC, που δεν κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες λόγω μετάλλαξης στο πλαίσιο ανάγνωσης (van Sorge, et al., 2003).



Εικόνα 5: Η οργάνωση των γονιδίων FcR στο άνθρωπο (Nimmerjahn & Ravetch, 2007).

Οι FcRs διαφέρουν σε σχέση με τις οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιούν, και χωρίζονται σε αναστολείς και ενεργοποιητές. Η πλειοψηφία των FcRs ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, με εξαίρεση τον FcγRIIB, που είναι ανασταλτικός υποδοχέας, και τον FcγRIIB, ο οποίος δεν διαθέτει κυτταροπλασματικό τμήμα (Ravetch, 2003).

Λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας στο ίδιο κύτταρο τόσο ανασταλτικών όσο και ενεργοποιητικών υποδοχέων, η απόκριση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους (Εικόνα 6) (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). Στα B-κύτταρα, που δεν εκφράζουν ενεργοποιητικούς FcRs, ο FcγRIIB ρυθμίζει τις οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιεί ο υποδοχέας των B-κυττάρων (BCR) (Bolland & Ravetch, 1999).



Εικόνα 6: Η από κοινού ρύθμιση της σηματοδότησης από ενεργοποιητικούς και ανασταλτικούς FcR.

Η σύνδεση του ανοσοσυμπλόκου με κύτταρα του ανοσοποιητικού, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα, πυροδοτεί ταυτόχρονα ενεργοποιητικά και κατασταλτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην κυτταροπλασματική περιοχή η Lyn φωσφορυλιώνει τόσο το ITAM του FcR και το ITIM του FcγRIIB, ξεκινώντας έτσι και τα δύο μονοπάτια. Οι κόκκινες γραμμές υποδεικνύουν τα σημεία όπου τα ανασταλτικά μονοπάτια σηματοδότησης παρεμβαίνουν με την ενεργοποίηση των ομολόγων τους. Επιπλέον, οι παράγοντες που αλλάζουν την ισορροπημένη έκφραση των ενεργοποιητικών και ανασταλτικών FcRs εμφανίζονται στην κορυφή (Nimmerjahn & Ravetch, 2007).

Διαφορά ως προς τη δομή των ενεργοποιητικών και των ανασταλτικών FcRs αποτελεί το γεγονός ότι ενώ ο ανασταλτικός FcR φέρει στην κυτταροπλασματική του αλυσίδα ένα μοτίβο αναστολής ανοσοϋποδοχέα βάσει τυροσίνης (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), οι ενεργοποιητικοί FcRs, με εξαίρεση τους FcγRIIA και FcγRIIC, δεν μπορούν να ξεκινήσουν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι αυτόνομα (Hulett & Hogarth, 1994). Αντίθετα, είναι απαραίτητο να συνδεθούν με μόρια προσαρμογείς σήματος, που μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (π.χ. στα κύτταρα NK ή ζ-αλυσίδα) (Εικόνα 4) (Kinet, 1999). Οι προσαρμογείς αυτοί διαθέτουν ένα μοτίβο ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέα βάσει τυροσίνης (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM) στο κυτταροπλασματικό τμήμα τους, το οποίο φωσφορυλιώνουν κινάσες της οικογένειας Src (Εικόνα 6) (Nimmerjahn & Ravetch, 2007).

### 1.2.1 Ο υποδοχέας FcγRIIA

Οι ισομορφές του ανθρώπινου FcγRII (A, B1, B2 και C) εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια ως προς το IgG και είναι ευρέως κατανομημένες και βρίσκονται στην επιφάνεια των περισσότερων αιμοποιητικών κύτταρων, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, μακροφάγων, ηωσινόφιλων, ουδετερόφιλων, αιμοπεταλίων, καθώς και των B κύτταρων. Η σύνδεση του ανοσολογικού συμπλόκου στον FcγRIIA, την πιο ευρέως εκφραζόμενη ισομορφή, έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, προκαλώντας την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. TNF-α και IL-1), την έναρξη της

κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από το αντίσωμα (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC), όπως επίσης την ενδοκύττωση και την καταστροφή των παθογόνων (Powell, et al., 1999).



Εικόνα 7: Ο FcγRIIA και τα χαρακτηριστικά του.

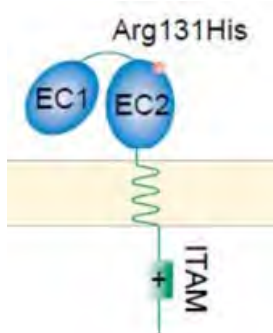
Ο υποδοχέας αποτελείται από δύο εξωκυττάριας περιοχές που έχουν ομολογία με τον FcγRIIB, όμως διαθέτει μοναδικές διαμεμβρανικές και ενδοκυτταρικές περιοχές. Ρόμβος: τυροσίνη που μπορεί να φωσφορυλιωθεί κατά το μονοπάτι ITAM (Hogarth, 2002).

Για να αποφευχθεί η άσκοπη ενεργοποίηση των επικείμενων κυτταρικών λειτουργιών ο υποδοχέας FcγRIIA δεσμεύεται με τις διάφορες υποκατηγορίες του IgG με διαφορετική ισχύ. Έχει βρεθεί ότι ο FcγRIIA αλληλεπιδρά επιλεκτικά με το IgG3 και το IgG1 (0,1-1 mM) και, ενδεχομένως, με το IgG4, με πολύ χαμηλότερη συγγένεια (Powell, et al., 1999).

Ο υποδοχέας αυτός διαθέτει τα εξής μοναδικά χαρακτηριστικά:

- Δεν έχει βρεθεί σε ποντικούς ή οποιαδήποτε άλλο θηλαστικό εκτός του ανθρώπου
- Είναι ο μοναδικός υποδοχέας Fc, και μάλιστα ένας από τους λίγους ανοσοϋποδοχείς, που το ITAM βρίσκεται στην αλυσίδα πρόσδεσης για το IgG (Εικόνα 7).
- Σχηματίζει ένα μη ομοιοπολικό ομοδιμερές. Το διμερές αντιπαραθέτει τις κυτταροπλασματικές ουρές εκάστου μονομερούς σε μια διαμόρφωση που μοιάζει με το ομοιοπολικό ομοδιμερές της αλυσίδας Fcγ.
- Η παραγωγή σήματος από διάφορους άλλους υποδοχείς Fcγ εξαρτάται από τον FcγRIIA. Ο ειδικός για τα ουδετερόφιλα FcγRIIIB εξαρτάται από αυτόν, όπως και ο FcγRI των μακροφάγων. (Hogarth, 2002)

### 1.2.2 Πολυμορφισμοί των υποδοχέων Fcγ



Εικόνα 8: Θέση του πολυμορφισμού H131R στην τεταρτοταγή δομή του FcγRIIA.

Οι υποκατηγορίες των υποδοχέων Fcγ εμφανίζουν λειτουργικούς πολυμορφισμούς (SNPs). Ο υποδοχέας FcγRIIA εμφανίζει στο γονίδιο του έναν πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 519 (G>A), στο τμήμα που κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης του συνδέτη, προκαλώντας μια αμινοξική υποκατάσταση από αργινίνη (R) σε ιστιδίνη (H) στη θέση 131 (rs1801274) (Εικόνα 8) (Warmerdam, et al., 1991). Το αλληλόμορφο FcγRIIA-H131 δείχνει μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα για τις ισομορφές IgG<sub>2</sub> και IgG<sub>3</sub>, σε σύγκριση με το FcγRIIA-R131 (Bruhns, et al., 2009). Το γονίδιο FcγRIIA εμφανίζει ένα πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου στο εξόνιο 4 στο νουκλεοτίδιο 559 (C>A), προκαλώντας μια αμινοξική υποκατάσταση από βαλίνη (V) σε φαινυλαλανίνη (F) στη θέση 158 (rs396991) (Wu, et al., 1997). Η

ενεργοποίηση των κυττάρων NK μέσω της IgG εμφανίζεται να είναι αυξημένη για τον γονότυπο FcγRIIIA-VV158, σε σύγκριση με τον FcγRIIIA-FF158, λόγω της υψηλότερης συγγένειας του πρώτου για τις IgG1, IgG3 και IgG4 (Menter, et al., 2008 ).

Οι γονότυποι που εμφανίζουν χαμηλή δεσμευτική ικανότητα συσχετίζονται με ευαισθησία σε υποτροπιάζουσες ιογενείς λοιμώξεις, με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (O’Rielly & Rahman, 2011; Puig, et al., 2009) και το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (Leppers-van de Straat, et al., 2000) και είναι κλινικά σημαντικές, διότι τροποποιούν την κλινική πορεία και την απόκριση στη θεραπεία πολλών ασθενειών (Domingo, et al., 2002 ).

### 1.3 Φαρμακογενετική μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση

Οι διαφορές που παρατηρούνται από άτομο σε άτομο σε ό,τι αφορά την απόκριση σε φαρμακευτικές θεραπείες συχνά οφείλονται σε γενετικές διαφοροποιήσεις. Αν και η διαφοροποίηση της κλινικής απόκρισης στη θεραπευτική παρέμβαση μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, αυξάνουν ολοένα και περισσότερο οι ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι η διαφορά στην απόκριση σε πολλά είδη φαρμάκων οφείλεται σε πολυμορφισμούς γονιδίων που ενέχονται, ως επί το πλείστο, στο μεταβολισμό των φαρμάκων.

Φαρμακογενετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με ψωρίαση έχουν συσχετίσει πολυμορφισμούς που εντοπίζονται σε γονίδια υποδοχέων που σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες.

Οι Tejasvi, et al. (2012) πραγματοποίησαν φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης δύο SNPs του γονιδίου *TNFAIP3* (rs2230926 και rs610604) με την απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF σε μια ομάδα ασθενών με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα από το Μίσιγκαν ( $n=433$ ) και μια ομάδα από το Τορόντο ( $n=199$ ), (Tejasvi, et al., 2012). Ο πολυμορφισμός rs610604 στο γονίδιο *TNFAIP3* είχε προηγουμένως συσχετιστεί με τη προδιάθεση για ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα (Papp, et al., 2012). Οι συγγραφείς έδειξαν θετική απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF (etanercept, infliximab και adalimumab) και ειδικά στο etanercept σε φορείς του αλληλόμορφου G στην ομάδα από το Μίσιγκαν (Πίνακας 1). Ο απλότυπος TG των rs2230926-rs610604 συσχετίστηκε επίσης με την ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF σε αυτήν την ομάδα (Πίνακας 1). Οι συγγραφείς δεν εντόπισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της απόκρισης της ομάδας φορέων του rs610604 από το Τορόντο με την απόκριση στο adalimumab ή το infliximab. Οι διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο ομάδων αποδόθηκαν στο ότι το μικρότερο μέγεθος της ομάδας από το Τορόντο αποτέλεσε πιθανώς περιοριστικό παράγοντα για τη μελέτη (Tejasvi, et al., 2012).

Οι Vasilopoulos et al. (2012) διεξήγαγαν μια άλλη μελέτη σε 80 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με adalimumab, infliximab και etanercept. Οι συγγραφείς ανέλυσαν πέντε πολυμορφισμούς σε τρία γονίδια, τα *TNF-α* (rs361525, rs1800629, rs1799724), *TNFRSF1A* (rs767455) και *TNFRSF1B* (rs1061622). Τα γονοτυπικά δεδομένα έδειξαν συσχέτιση με την απόκριση στη θεραπεία μετά από 6 μήνες. (Vasilopoulos, et al., 2012).

Ειδικότερα, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφισμού του *TNF-α* (γονότυπος CC για rs1799724,  $P=0,027$ ) και ενός του *TNFRSF1B* (ΤΤ γονότυπος rs1061622,  $P=0,019$ ) με ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF (Πίνακας 1). Η στατιστική ανάλυση του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά αποκάλυψε τη συσχέτιση μεταξύ αυτών των γονότυπων και της θετικής απόκρισης στο etanercept μετά από 6 μήνες θεραπείας ( $P=0,002$  και  $P=0,001$ , αντίστοιχα). Ωστόσο, αυτοί οι πολυμορφισμοί δεν συσχετίστηκαν με απόκριση στην περίπτωση του infliximab ή του adalimumab. Οι συγγραφείς απέδωσαν τη διαφορά αυτή

στον τρόπο δράσης των βιολογικών παραγόντων (το etanercept δεσμεύεται σε διαλυτό TNF- $\alpha$  ενώ το adalimumab και το infliximab προσδένονται σε διαμεμβρανικό TNF- $\alpha$ ). οι απλότυποι CT, CG και TG των πολυμορφισμών rs1799724-rs1061622 (γονίδια *TNFA-TNFRSF1B*) έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $P<0,05$ ) με την απόκριση σε αντι-TNF θεραπεία (Vasilopoulos, et al., 2012).

Οι Julià et al. (2013) διεξήγαγαν μία μελέτη σε 70 ασθενείς με ψωρίαση που λάμβαναν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF- $\alpha$  (adalimumab, infliximab, etanercept). Η μελέτη έδειξε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου *FcγRIIA* και του πολυμορφισμού rs396991 του γονιδίου *FcγRIIIA* με την απόκριση με τη θεραπεία με αντι-TNF (Julià, et al., 2013). Συγκεκριμένα, οι φορείς των πολυμορφισμών υψηλής συγγένειας (*FcγRIIA*-H131 και *FcγRIIIA*-V158) έδειξαν διαφορά στην απόκριση στην θεραπεία σε σχέση με τους φορείς των πολυμορφισμών χαμηλής συγγένειας (*FcγRIIA*-R131 και *FcγRIIIA*-F158), όπου δεν εμφάνισαν κάποια συσχέτιση.

Για να μπορέσει η θεραπεία της ψωρίασης να είναι εξατομικευμένη, θα πρέπει να διενεργηθούν περισσότερες μελέτες σε πολυμορφισμούς που εμφανίζουν πιθανή συσχέτιση με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης. Η παρούσα εργασία διερευνά την συσχέτιση του πολυμορφισμού *FcγRIIA*-H131R με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση σε παράγοντες αντι-TNF.

## 2 Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν ψωριασικοί ασθενείς που βρίσκονται σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α για πάνω από 6 μήνες. Έγινε λήψη περιφερικού αίματος, από το οποίο έγινε απομόνωση ολικού DNA. Κατόπιν, η μελέτη εστίασε στο γονίδιο *FcγRIIIa*, στο οποίο μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs1801274 του υποδοχέα. Έγινε πολλαπλασιασμός του τμήματος που εμπεριέχει τη σημειακή μετάλλαξη με PCR, αλληλούχηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

### 2.1 Ασθενείς

Στην μελέτη συμπεριελήφθησαν 60 ασθενείς με ψωρίαση, οι οποίοι ακολουθούσαν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης.

### 2.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Το αίμα των ασθενών, μετά την αιμοληψία στα Νοσοκομεία στα οποία πραγματοποιήθηκε η θεραπεία, τοποθετήθηκε σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA) ώστε να αποφευχθεί η πήξη και συνεπώς ο διαχωρισμός των έμμορφων συστατικών του αίματος από τον ορό. Η διατήρησή των δειγμάτων έγινε στους -70 °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 επιλεκτική 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 πρωτεϊνάσης, για τον καθαρισμό του DNA από τις ιστόνες και αδρανοποίησης των νουκλεασών που μπορούν να κόψουν 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 δείγματος και της υγρασίας αφού τόσο η φαινόλη όσο και το χλωροφόρμιο συνιστούν ασταθείς, πτητικές χημικές ενώσεις. Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή, μετά από κατακρήμνιση σε δύο βήματα με ισοπροπανόλη και αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH<sub>2</sub>O (Oswald, 2008).

#### 2.2.2 Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα SSC (saline-sodium citrate) 1x (από αραιώση διαλύματος 20x [3 M sodium chloride, 300 mM trisodium 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(CH<sub>3</sub>COONa) 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 (19 °C-25 °C) 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 CH<sub>3</sub>COONa 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 (ρήξη μεμβρανών).
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 ddH<sub>2</sub>O.
22. Αποθήκευση στους -20 °C

### 2.3 Σχεδίαση εκκινητών

Η διαδικασία επιλογής της αλληλουχίας των εκκινητών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία της PCR, καθώς χωρίς κατάλληλους εκκινητές δεν θα παραχθεί προϊόν της 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 τήξης/υβριδοποίησης τους. Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υβριδοποιεί μόνο με το στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι θερμοκρασίες τήξης/υβριδοποίησης. Συνήθως οι εκκινητές έχουν μήκος 17 με 35 ζεύγη βάσεων.
- **Σταθερότητα:** εξαρτάται από την αναλογία C/G στο 3' άκρο, αλλά και στο 5' άκρο, του εκκινητή και απαιτείται ώστε να ξεκινήσει η επιμήκυνση από τη Taq. 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, τη θερμοκρασία τήξης/πρόσδεσης 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 (T<sub>m</sub>):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA σχηματίζουν δίκλινα 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  $T_m$ . Εμπειρική μέθοδος υπολογισμού του  $T_m$  για  $\leq 20$  βάσεις :

$$T_m = (A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C$$

- **Θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_a$ ):** 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 (PremierBiosoft, 1994-2014).

### 2.3.1 Διαδικασία σχεδιασμού εκκινητών

Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε η ιστοσελίδα του National Center for Biotechnology Information (NCBI).

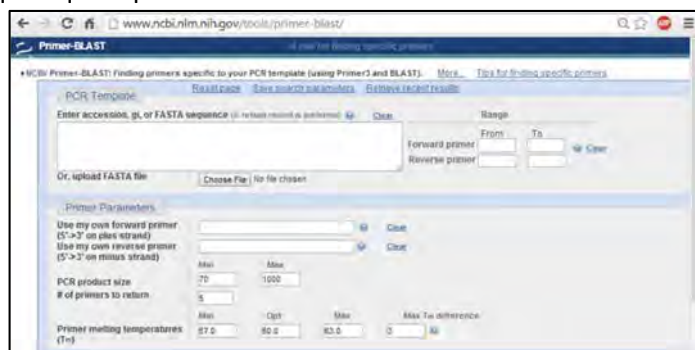
- Κάνουμε αναζήτηση στη σελίδα για το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και μεταφερόμαστε στη σελίδα αυτή. Στον ιστότοπο αυτό μπορούμε να βρούμε πληροφορίες για τη θέση, την αλληλουχία, τους πολυμορφισμούς του γονιδίου και βιβλιογραφία που το αφορά (Εικόνα 9).



Εικόνα 9

- Πραγματοποιούμε την ίδια αναζήτηση στην dbSNP για τον πολυμορφισμό που μας ενδιαφέρει για να εντοπίσουμε τη θέση του, ώστε να μπορέσουμε να σχεδιάσουμε εκκινητές που να περιέχουν τη θέση αυτή.

- Λαμβάνουμε την αλληλουχία του γονιδίου και μεταφερόμαστε στον ιστότοπο του Primer-BLAST. Εδώ προσθέτουμε την αλληλουχία του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και τις παραμέτρους που θέλουμε να πληρούν οι εκκινητές (Εικόνα 10).



Εικόνα 10

- Μετά τον σχεδιασμό είναι απαραίτητο να ελεγχθεί το ζεύγος των εκκινητών για την ειδικότητά τους. Ο έλεγχος μπορεί να γίνει μέσω του Primer-BLAST τοποθετώντας το ζεύγος των εκκινητών και τον οργανισμό στον οποίο θέλουμε να κάνουμε BLAST στο σύνολο του γονιδιώματος (Εικόνα 11).
- Μετά από την επεξεργασία το πρόγραμμα μας δίνει τα στατιστικά δεδομένα του BLAST (Εικόνα 12).

Εικόνα 12

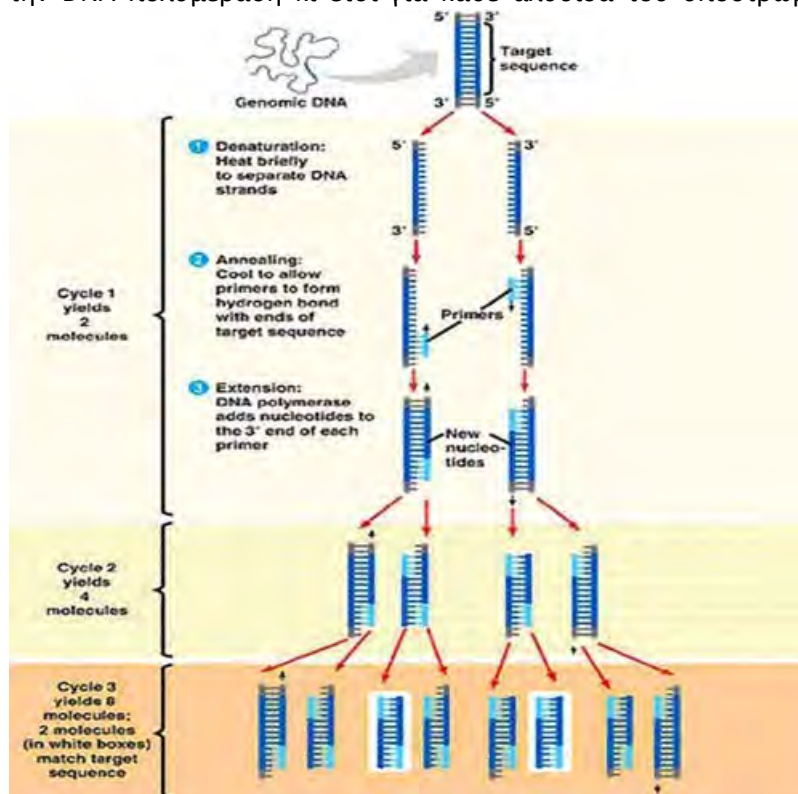
Primer pair 1	Sequence (5' to 3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer 1	CTCACCTGGAGTTCACAG	21	51.37	38.10	0.00	
Reverse primer 1	CTACCTATTACCTGGAGC	19	53.44	52.63	2.00	

Εικόνα 11

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### 2.4.1 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 εκκίνητες λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση κι έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

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 (denaturation of DNA template) στους 94 ή 95 °C.
2. **Υβριδοποίηση των εκκινητών** με το συμπληρωματικό τους DNA-στόχο (annealing), σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους.
3. **Επιμήκυνση** των συνδεδεμένων εκκινητών με παράλληλη σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' (elongation) στους 72 °C (Εικόνα 13).

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για  $n$  κύκλους (όπου  $n$  συνήθως 30-40 κύκλοι αποδιάταξης-υβριδισμού-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  $2^n$ .

#### 2.4.2 Υλικά

- Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
- U/μl Kapa Taq DNA Polymerase
- 10x Kapa Taq Reaction Buffer (με 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)
- Γονιδιωματικό DNA
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές
  - Εμπρόσθιος εκκινητής: CTTGGAATCTATCCTTACAAC
  - Ανάστροφος εκκινητής: CTACCTATTACCTGGGACG

#### 2.4.3 Πειραματική διαδικασία

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

	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA		1μl
10x Kapa Taq Reaction Buffer (με 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x	5μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)		1μl
Forward Primer		1μl
Reverse Primer		1μl
dNTPs		1μl
5 U/μl Kapa Taq DNA Polymerase	1U	0,25μl
ddH <sub>2</sub> O		40μl
Σύνολο		50μl

Σημαντικό βήμα είναι η προσθήκη της πολυμεράσης αμέσως πριν την έναρξη της αντίδρασης και κατευθείαν από τους -20°C, 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		Θερμοκρασία	Χρόνος
Στάδιο			
35 κύκλοι	Προ-αποδιάταξη (Pre-denaturation)	95°C	4 min
	Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	95°C	40 sec
	Υβριδοποίηση εκκινητών-μήτρας DNA (annealing)	57°C	45 sec
	Επιμήκυνση των εκκινητών (elongation)	72°C	30sec
	Τελική επέκταση (delay)	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 (lander), ώστε να γίνει εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR.

Το προϊόν της PCR αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

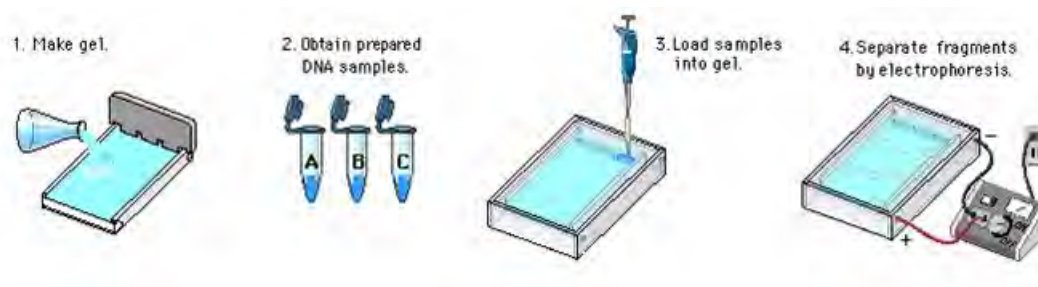
## 2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

### 2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού των μορίων, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά τμήματα 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 μεταναστεύει 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 (υπερελικομένα, 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. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα ή καθόλου.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

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 στην υπεριώδη ακτινοβολία, με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA να γίνονται ορατές.

#### 2.5.2 Υλικά

- Διάλυμα 1xTAE buffer (40mM Tris, 20mM acetic acid και 1mM EDTA).
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- Αγαρόζη
- Διάλυμα χρωστικής bromophenol blue (pH 3-4.6)

#### 2.5.3 Πειραματική διαδικασία

##### 2.5.3.1 Παρασκευή πηκτώματος 1,3% w/v αγαρόζης

1. Διάλυση 1,2 gr αγαρόζης σε 90 ml διάλυμα TAE.
2. Ανάδευση με θερμότητα ως την πλήρη διάλυση της αγαρόζης.
3. Ψύξη του διαλύματος ως περίπου 37-40 °C.
4. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε αναλογία 1  $\mu$ l/ 10 ml πηκτώματος.
5. Στερεοποίηση του πηκτώματος σε διάφανη (στην UV ακτινοβολία) πλαστική θήκη συγκεκριμένων διαστάσεων, τη μήτρα, θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 14). Οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών “χτενών” που τοποθετούνται στη συσκευή πριν από την πήξη του πηκτώματος.

##### 2.5.3.2 Πορεία ηλεκτροφόρησης

1. Προσθήκη στα δείγματα DNA διάλυμα της χρωστικής bromophenol blue σε αναλογία 3  $\mu$ l χρωστικής/ 5  $\mu$ l 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 (Εικόνα 14).
4. Παρατήρηση αποτελέσματος σε σκοτεινό θάλαμο με επιφάνεια ακτινοβολίας UV.

#### 2.6 Αλληλούχηση (Sequencing)

Τα προϊόντα της PCR επεξεργάστηκαν με το kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up για τον καθαρισμό του DNA και η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA.

#### 2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου *FcγRIIA* έγινε διαχωρισμός των ανταποκριθέντων και των μη ανταποκριθέντων ασθενών στη θεραπεία. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ετερόζυγοι και ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό 519 (A>G) και χρησιμοποιώντας πίνακες με διαστάσεις 2x2 υπολογίστηκε η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου A. Για την δοκιμή της ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε το τεστ  $\chi^2$ , ενώ η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία έγινε με το τεστ Cochran–Armitage. Επίσης, εκτελέστηκαν και άλλα τεστ για τα οποία βασίζονται στην υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του κοινού αλληλομόρφου A. Για τη στατιστική ανάλυση το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε  $P \leq 0,05$ .

### 3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1 Ασθενείς

Τα στατιστικά στοιχεία των ψωριασικών ασθενών που εξετάστηκαν καταγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη (n=60).

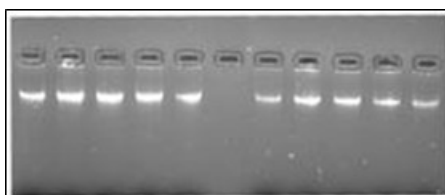
Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	48,08 $\pm$ 14,39
Φύλο Α/Θ	27 / 33
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	14,3 $\pm$ 11,2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	35,4 $\pm$ 13,2
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	27 / 60 (45%)
Αρχικό PASI, μέσος $\pm$ ΤΑ*	17,52 $\pm$ 9,22
PASI στους 6 μήνες, μέσος $\pm$ ΤΑ*	4,82 $\pm$ 3,40
Ανταποκριθέντες, ποσοστό	47 (78,3%)
Μη-ανταποκριθέντες, ποσοστό	13 (21,7%)
Παράγοντες Anti-TNF	
Enbrel	45% (Ανταποκριθέντες: 81,4%)
Remicade	33,3% (Ανταποκριθέντες: 75%)
Humira	21,7% (Ανταποκριθέντες: 84,6%)
*ΤΑ = Τυπική απόκλιση	

Συνολικά εξετάστηκαν 60 δείγματα όπου από τους 60 ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη οι 27 ήταν άντρες ενώ οι 33 γυναίκες και είχαν μέση ηλικία τα 48,08 έτη. Η ψωρίαση είναι μια ασθένεια που προσβάλλει σε ίδιο ποσοστό τους άνδρες και τις γυναίκες. Η εμφάνιση της νόσου έγινε κατά μέσο όρο στα 35,4 έτη και η μέση διάρκεια νοσηρότητας των ασθενών υπολογίστηκε στα 14,3 έτη. Οι 27 από τους ψωριασικούς ασθενείς εμφάνιζαν συνοσηρότητα, κύρια μεταβολικό σύνδρομο και καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο δείκτης PASI των ασθενών πριν από την λήψη της θεραπείας με παράγοντες αντι-TNF υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στο 17,52 ενώ μετά τη λήψη τους στο 4,82.

Από τους 60 ασθενείς οι 27 (45%) υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο Enbrel (etanercept), οι 20 (33,3%) σε θεραπεία με το φάρμακο Remicade (infliximab) και 13 σε θεραπεία με το φάρμακο Humira (adalimumab). Από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο Enbrel ανταπόκριση είχαν 22 (81,4%), ενώ για στο φάρμακο Remicade ανταποκρίθηκαν θετικά οι 15 (75%) και για το φάρμακο Humira οι 11 (84,6%)

### 3.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Μετά τη διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 0,7% w/v (Εικόνα 15). Με τη διαδικασία αυτή έγινε ποιοτικός απολογισμός της διαδικασίας.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αгарόζης.

Για τα δείγματα που πιστοποιήθηκε ικανοποιητική ποσότητα DNA προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο.

### 3.3 Σχεδίαση εκκινητών

Η σχεδίαση των εκκινητών για την διαδικασία της PCR αποτέλεσε σημαντικό σημείο καθώς τα γονίδια του γονιδιακού τόπου FCGR στη χρωμοσωμική περιοχή 1q23 προέρχονται από διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου, γεγονός που οδήγησε σε υψηλή ομολογία μεταξύ των πέντε γονιδίων των υποδοχέων FcGR υψηλής συγγένειας (Su, et al., 2002). Η υψηλή αυτή ομολογία έχει ως αποτέλεσμα να κάνει τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών μόνο για ένα από τα γονίδια αυτά πολύ δύσκολο, καθώς δεν είναι λίγες οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές για πάνω από μία θέση μεταξύ των γονιδίων αυτών.

Έτσι, στο σχεδιασμό των εκκινητών λάβαμε υπ' όψιν την ομολογία μεταξύ των γονιδίων των FcγRs και καταλήξαμε στο ζεύγος εκκινητών:

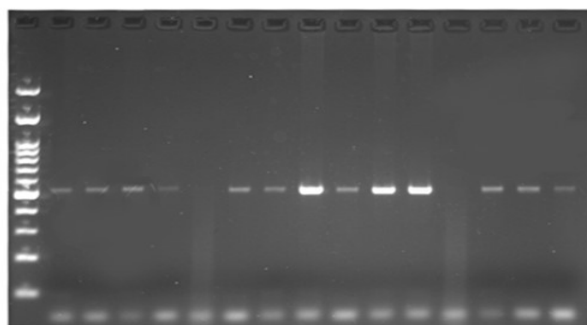
- ο Εμπρόσθιος εκκινητής: CTTGGAATCTATCCTTACAAC
- ο Ανάστροφος εκκινητής: CTACCTATTACCTGGGACG

οι οποίοι παράγουν προϊόν 511bp.

Σύμφωνα με την αλληλουχία NG\_012066.1 που αντιστοιχεί στη γενωμική αλληλουχία του γονιδίου FcγRIIA του ανθρώπου, ο εμπρόσθιος εκκινητής δεσμεύεται στα νουκλεοτίδια 9357 ως 9377 και ο ανάστροφος στα 9867 ως 9849. Η περιοχή που περιέχεται μεταξύ των εκκινητών και περιέχει το εξόνιο 4, στο οποίο εντοπίζεται ο πολυμορφισμός rs1801274. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα στο οποίο συνδέεται η περιοχή Fc των αντισωμάτων IgG.

### 3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μετά από την PCR όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, για να πιστοποιηθεί η παρουσία του προϊόντος (511bp), η ποσότητά του και η



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης ενδεικτικών δειγμάτων μετά από PCR.

απουσία παραπροϊόντων. Η εικόνα 16 δείχνει το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR και του δείκτη μοριακών βαρών (πρώτη θέση από αριστερά).

### 3.5 Γονοτύπηση

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων έγινε με αλληλούχηση των προϊόντων PCR όλων των ασθενών. Οι αντίστοιχοι γονότυποι φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες αντι-TNF.

Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος	Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος	Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος
1	G/A	20	A/A	14Θ	A/A
2	G/A	21	G/A	15Θ	G/A
3	A/A	22	G/A	16Θ	G/A
4	A/A	23	G/G	2K	G/G
5	G/A	24	G/G	3K	A/A
6	A/A	25	A/A	9K	A/A
7	G/A	26	G/A	25K	G/A
8	G/A	81	G/A	46K	A/A
9	G/A	1Θ	G/G	47K	G/G
10	G/A	2Θ	G/G	65K	G/G
11	A/A	3Θ	G/A	67K	G/A
12	G/A	5Θ	G/A	68K	A/A
14	G/A	7Θ	G/A	81K	A/A
15	G/A	8Θ	G/A	99K	A/A
16	A/A	9Θ	G/A	101K	A/A
17	G/A	10Θ	G/G	110K	A/A
18	G/A	11Θ	G/A	130K	G/G
19	G/A	13Θ	G/A		

### 3.6 Ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 στο *FcγRIIA* με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία

Στους Πίνακες 4, 5, 6 και 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 στο γονίδιο *FcγRIIA* με την ανταπόκριση στη θεραπεία τόσο για το σύνολο των φαρμάκων αντι-TNF, όσο και για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά.

Όσο αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς στην θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF (etanercept, infliximab και adalimumab), η γονοτύπηση έδειξε ότι 14 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο A, 8 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G και 25 ετεροζυγώτες. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου A του πολυμορφισμού rs1801274 είναι 0,56 (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για όλους τους ασθενείς (n=60) που έλαβαν παράγοντες αντι-TNF. Οι ασθενείς αυτοί ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με το αν ανταποκρίθηκαν ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIA H131R (A&gt;G) rs1801274</b>	Genotypic [AA/GA/GG]	14 / 25 / 8	4 / 6 / 3	0,583
	Cochran- Armitage [A/G]	53 / 41 (0,56)	14 / 12 (0,54)	0,501
	Επικρατών [(AA+GA)/GG]	39 / 8	10 / 3	0,689
	Υπολειπόμενο [AA/(GA+GG)]	14 / 33	4 / 9	1,000

Όσο αφορά τους μη ανταποκριθέντες, η γονοτύπηση έδειξε ότι 4 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλομόρφο A, 3 ομόζυγοι για το αλληλομόρφο G και 6 ετεροζυγώτες. Η συχνότητα του αλληλομόρφου A υπολογίστηκε στο 0,54 (Πίνακας 4).

Το αλληλομόρφο A εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στους ανταποκριθέντες ασθενείς απ' ότι σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $p=0,827$ ), ως προς τη συσχέτιση του αλληλομόρφου A και την ανταπόκριση στη θεραπεία με τους παράγοντες αντι-TNF.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου A, ο οποίος επίσης δεν έδειξε σημαντικά στατιστικό αποτέλεσμα (Πίνακας 4).

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την ανάλυση για το σύνολο των ασθενών, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού με την απόκριση στους παράγοντες αντι-TNF.

Στους πίνακες 5, 6 και 7 φαίνεται συνοπτικά η ανάλυση της συσχέτισης για κάθε φάρμακο ξεχωριστά.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ομάδα ασθενών που έλαβαν το φάρμακο Remicade. Από τους 20 ασθενείς που έλαβαν το συγκεκριμένο φάρμακο 15 άτομα ανταποκρίθηκαν ενώ 5 δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Οι αντίστοιχοι γονότυποι για κάθε ομάδα φαίνονται στον Πίνακα 5. Η συχνότητα του αλληλομόρφου A εμφανίζεται αυξημένη στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς, παρόλα αυτά το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων ( $n=20$ ).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς (n=20) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Remicade. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με το αν ανταποκρίθηκαν ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIA H131R (A&gt;G) rs1801274</b>	Genotypic [AA/GA/GG]	3 / 10 / 2	3 / 2 / 0	0,346
	Cochran- Armitage [A/G]	16 / 14 (0,53)	8 / 2 (0,80)	0,263 *
	Επικρατών [(AA+GA)/GG]	13 / 2	5 / 0	1,000
	Υπολειπόμενο [AA/(GA+GG)]	3 / 12	3 / 2	0,131

Ωστόσο, για το φάρμακο αυτό έχει αναφερθεί συσχέτιση με τον ίδιο πολυμορφισμό σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Montes, et al., 2014). Ειδικότερα, οι Montes et al. (2014) έδειξαν ότι το αλληλόμορφο G συσχετίζεται με την μη απόκριση στο Remicade σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Το αλληλόμορφο G κωδικοποιεί για αργινίνη στη θέση 131 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και το λειτουργικό αποτέλεσμα αυτής είναι η ασθενέστερη πρόσδεση του IgG στον υποδοχέα FcγRIIA, γεγονός που συνάδει με τη συσχέτιση στους μη ανταποκριθέντες.

Ωστόσο, στην συγκεκριμένη ανάλυση, η παρατηρούμενη αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου A στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Montes et al. (2014). Το αλληλόμορφο A αντιστοιχεί στην ιστιδίνη στη θέση 131 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και το λειτουργικό αποτέλεσμα αυτής είναι η ισχυρή πρόσδεση του IgG στον υποδοχέα FcγRIIA. Οπότε, πιθανώς η τάση συσχέτισης που φαίνεται στα αποτελέσματα δεν θα επιβεβαιωθεί και δεν θα δώσει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα αναλύοντας μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ή, αν οδηγήσει τελικά σε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, θα πρέπει να εξεταστεί διεξοδικά και να αιτιολογηθεί με βάση τη διαφορά που ταυτοποιήθηκε στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς (n=13) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Humira. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με το αν ανταποκρίθηκαν ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIA H131R (A&gt;G) rs1801274</b>	Genotypic [AA/GA/GG]	1 / 9 / 1	0 / 1 / 1	0,670
	Cochran- Armitage [A/G]	11 / 11	1 / 3	0,598
	Επικρατών [(AA+GA)/GG]	10 / 1	1 / 1	0,295
	Υπολειπόμενο [AA/(GA+GG)]	1 / 10	0 / 2	1,000

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα για το φάρμακο Humira φαίνονται στον Πίνακα 6. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων (n=13) από αυτή την ομάδα ασθενών δυσκολεύει την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση στο φάρμακο.

Σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων για την ομάδα ασθενών που έλαβε το φάρμακο Enbrel. Όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 7, από τους 27 ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο οι 22 ανταποκρίθηκαν ενώ οι 5 δεν ανταποκρίθηκαν. Όσον αφορά τις αλληλομορφικές συχνότητες, παρατηρείται αύξηση (όχι στατιστικά σημαντική) στη συχνότητα του αλληλομορφου G στους μη ανταποκριθέντες στην θεραπεία ασθενείς.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς (n=27) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Enbrel. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με το αν ανταποκρίθηκαν ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIA H131R (A&gt;G) rs1801274</b>	Genotypic [AA/GA/GG]	10 / 8 / 4	1 / 3 / 1	0,255
	Cochran- Armitage [A/G]	28 / 16 (0,63)	5 / 5 (0,5)	0,485
	Επικρατών [(AA+GA)/GG]	18 / 4	1 / 4	<b>0,017</b>
	Υπολειπόμενο [AA/(GA+GG)]	10 / 12	1 / 4	0,618

Ωστόσο, η δοκιμή για την επικρατή δράση του αλληλομόρφου A δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (p=0,017). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ο πολυμορφισμός rs1801274 συσχετίζεται με την ανταπόκριση στο φάρμακο Enbrel, αποτέλεσμα το οποίο θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Η παρατήρηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού μόνο με την ανταπόκριση στο Enbrel και όχι στους άλλους βιολογικούς παράγοντες πιθανώς σχετίζεται με το μεγαλύτερο αριθμό ασθενών που έλαβαν αυτή τη θεραπεία. Δηλαδή, πιθανώς, με την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων να ταυτοποιηθεί τελικά συσχέτιση και με τους άλλους παράγοντες. Εναλλακτικά, η παρατηρούμενη συσχέτιση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο φάρμακο αποτελεί το μοναδικό από τους παράγοντες αντι-TNF που δεσμεύει μόνο τον διαλυτό TNF και όχι τον TNF που βρίσκεται στις μεμβράνες των ευαισθητοποιημένων ανοσοκυττάρων.

## 4 Συμπεράσματα

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν παράγοντες αντι-TNF έδειξε:

- Συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου *FcγRIIA*, με βάση την επικρατή δράση του αλληλομόρφου A, και την ανταπόκριση στο φάρμακο Enbrel (etanercept).
- Τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274, και ειδικότερα αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου A στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς, με την ανταπόκριση στο φάρμακο Remicade (infliximab).
- Το μικρό δείγμα των ασθενών αποτέλεσε μειονέκτημα στη στατιστική ανάλυση. Μελλοντικός στόχος αποτελεί η περαιτέρω μελέτη αυτού του πολυμορφισμού σε περισσότερους ασθενείς.

## 5 Βιβλιογραφία

- Arias, A. I. et al., 1997. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in psoriasis. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, p. 118–122.
- Baran, W., Szepietowski, J. C., Mazur, G. & Baran, E., 2008. IFN- $\gamma$  promoter gene polymorphism in psoriasis vulgaris. *Biomarkers*, p. 52–58.
- Bolland, S. & Ravetch, J. V., 1999. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing. *Adv. Immunol*, p. 149–177.
- Bos, J. et al., 1983. Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*, pp. 181-9.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P. & al., e., 2009. Specificity and affinity of human Fc $\gamma$  receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses.. *Blood.*, pp. 3716-3725.
- Büchau, A. S. & Gallo, R. L., 2007. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis.. *Clin Dermatol*, pp. 616-24.
- Campalani, E., Allen, M. H., Fairhurst, D. & al., e., 2006. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *British Journal of Dermatology*, p..345–352.
- Capon, F., Di Meglio, P., Szaub, J. & al., e., 2007. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against. *Hum Genet*, pp. 201-6.
- Cargill, M., Schrod, S., Chang, M. & al., e., 2007. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes.. *Am J Hum Genet*, pp. 273-90.
- Chang, M., Li, Y., Yan, C. & et al., 2008. Variants in the 5q31 cytokine gene cluster are associated with psoriasis. *Genes and Immunity*, pp. 176–181,.
- Christensen, T. et al., 2006. Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes.. *J Invest Dermatol*, pp. 2397-403.
- Christophers, E., 2001. Psoriasis — epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, pp. 314-320.
- Cohen, L., Nanau, R., Delzor, F. & Neuman, M., 2014. Biologic therapies in inflammatory bowel disease.. *Transl Res*.
- Craven, N. M., Jackson, C. W., Kirby, B. & al., e., 2001. Cytokine gene polymorphisms in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, p. 849–853.
- Domingo, P., Muñiz-Diaz, E., Baraldès, M. & al., e., 2002. Associations between Fc $\gamma$  receptor IIA polymorphisms and the risk and prognosis of meningococcal disease.. *Am J Med.*, pp. 19-25.
- Ellinghaus, E., Ellinghaus, D., Stuart, P. E. & al., e., 2010. Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2. *Nature Genetics*, p. 991–995.
- Farber, E. & Nall, M., 1974. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica*, pp. 1-18.
- Feldman, S. R., 2013. *Treatment of psoriasis*. [Online] Available at: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-psoriasis>

Feng, B.-J., Sun, L.-D., Soltani-Arabshahi, R. & al., e., 2009. Multiple loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *PLoS Genetics*.

Goffe, B. & Cather, J. C., 2003. Etanercept: An overview. *J AM ACAD DERMATOL*, pp. 105-111.

Griffiths, C. et al., 1986. Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *Br Med J (Clin Res Ed)*, pp. 731-2.

Haider, A., Lowes, M., Suarez-Farinas, M. & al., e., 2008. Identification of cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF - and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol.*, pp. 1913-20.

Hebert, H. L. et al., 2012. Genetic susceptibility to psoriasis and psoriatic arthritis: implications for therapy. *British Journal of Dermatology*, p. 474-482.

Hogarth, M. P., 2002. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation. *Current Opinion in Immunology*, p. 798-802.

Hohler, T. et al., 1997. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis.. *Journal of Investigative Dermatology*, p. 562-565.

Hollox, E. J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P. L. J. M. & al., e., 2008. Psoriasis is associated with increased  $\beta$ -defensin genomic copy number. *Nature Genetics*, p. 23-25.

Hulett, M. D. & Hogarth, P. M., 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.*, p. 1-127.

Hulett, M. & Hogarth, P., 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol*, p. 1-127.

Iizuka, H., Takahashi, H., Honma, M. & Ishida-Yamamoto, A., 2004. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation. *Journal of Dermatology*, p. 271-276.

Julia, A., Tortosa, R. & Hernanz, J., 2012. Risk variants for psoriasis vulgaris in a large case-control collection and association with clinical subphenotypes. *Human Molecular Genetics*, p. 4549-4557.

Julià, M. et al., 2013. The Role of Fc $\gamma$  Receptor Polymorphisms in the Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Psoriasis. A Pharmacogenetic Study. *JAMA Dermatol*, pp. 1033-1039.

Kanda, N. et al., 2011. Human  $\beta$ -defensin-2 enhances IFN- $\gamma$  and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, p. 935-944.

Kato, T., Tsunemi, Y., Saeki, H. & al., e., 2009. Interferon-18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris but not with atopic dermatitis in Japanese patients. *Journal of Dermatological Science*, p. 162-16.

Kim, Y.-K. et al., 2007. Associations of IL-2 and IL-4 gene polymorphisms with psoriasis in the Korean population. *Journal of Dermatological Science*, p. 133-139.

Kinet, J. P., 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): From physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol*, p. 931-972.

Koks, S. et al., 2004. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes and Immunity*, p. 662-66.

Kulski, J. K. et al., 2005. Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. *Molecular Medicine*, p. 964–975.

Kurian, A. & Barankin, B., 2011. Current Effective Topical Therapies in the Management of Psoriasis. *Skin Therapy Lett.*, pp. 4-7.

Kurzeja, M., Rudnicka, L. & Olszewska, M., 2011. New interleukin-23 pathway inhibitors in dermatology: ustekinumab, briakinumab, and secukinumab. *American Journal of Clinical Dermatology*, p. 113–125.

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V. & al., e., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide.. *Nature*, pp. 564-9.

Leppers-van de Straat, F., van der Pol, W., Jansen, M. & al., e., 2000. A novel PCR-based method for direct Fcγ receptor IIIa (CD16) allotyping.. *J Immunol Methods.*, pp. 127-132.

Li, Y. & Begovich, A. B., 2009. Unraveling the genetics of complex diseases: susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis. *Seminars in Immunology*, p. 318–327.

Lodolce, J. P., Kolodziej, L. E., Rhee, L. & al., e., 2010. African-derived genetic polymorphisms in TNFAIP3 mediate risk for autoimmunity. *Journal of Immunology*, p. 7001–7009.

Louis, E. et al., 1998. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans.. *Clinical and Experimental Immunology*, p. 401–406.

Lowes, M., Chamian, F., Abello, M. & al., e., 2005. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 19057-62.

Luszczek, W., Majorczyk, E., Nockowski, P. & al., e., 2008. Distribution of the CTLA-4 single nucleotide polymorphisms CT60G>A and +49A>G in psoriasis vulgaris patients and control individuals from a Polish Caucasian population. *International Journal of Immunogenetics*, p. 51–55.

Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S. & al., e., 2008. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis, I: overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*, pp. 826-850.

Montes, A. et al., 2014. Association of FCGR2A with response to Infliximab treatment of patients with Rheumatoid Arthritis.

Musone, S. L., Taylor, K. E., Nititham, J. & al., e., 2011. Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes and Immunity*, p. 176–182.

Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C. & al., e., 2009. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-κB pathways. *Nature Genetics*, p. 199–204.

Naldi, L. & Griffiths, C., 2005. Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks.. *Br J Dermatol*, pp. 597-615.

NCBI, 2013. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed 2014].

Nestle, F. & Nickoloff, B., 1994. Role of dendritic cells in benign and malignant lymphocytic infiltrates of the skin. *Dermatol Clin*, pp. 271-82.

Nestle, F. O., Kaplan, D. H. & Barker, J., 2009. Psoriasis. *N Engl J Med*, pp. 496-509.

Nestle, F., Turka, L. & Nickoloff, B., 1994. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis: autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest*, pp. 202-9.

Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V., 2007. Fc-Receptors as Regulators of Immunity. In: *Advances in Immunology*. s.l.:Elsevier Inc., pp. 179-204.

O'Reilly, D. & Rahman, P., 2011. Pharmacogenetics of psoriasis. *Pharmacogenomics*, pp. 87-101.

Oswald, N., 2008. [Online] Available at: <http://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works/>

Papp, K., Cather, J. C., Rosoph, L. & al., e., 2012. Efficacy of apremilast in the treatment of moderate to severe psoriasis: a randomised controlled trial. *Lancet*, p. 738-746.

Powell, M. et al., 1999. Biochemical analysis and crystallisation of FcγRIIa, the low affinity receptor for IgG. *Immunology Letters*, p. 17-23.

PremierBiosoft, 1994-2014. Premier Biosoft. [Online] Available at: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html) [Accessed 2014].

Prieto-Perez, R., Cabaleiro, T., Dauden, E. & Abad-Santos, F., 2013. Gene polymorphisms that can predict response to anti-TNF therapy in patients with psoriasis and related autoimmune diseases. *Pharmacogenomics Journal*, pp. 297-305.

Prieto-Pérez, R. et al., 2013. Genetics of Psoriasis and Pharmacogenetics of Biological Drugs. *Autoimmune Diseases*, Volume 2013, p. 13.

Prinz, J., Braun-Falco, O., Meurer, M. & al., e., 1991. Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet*, pp. 320-1.

Puig, L., Bordas, X., Carrascosa, J. & al., e., 2009. Grupo Español de Psoriasis de la Academia Española de Dermatología y Venereología. of moderate-to-severe psoriasis: Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology [in Spanish]. *Actas Dermosifiliogr*, pp. 277-286.

Radaev, S. & Sun, P., 2002. Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Mol. Immunol.*, p. 1073-1083.

Ravetch, J. V., 2003. Fc receptors. *Fundamental Immunology*, p. 685-700.

Reich, K. et al., 2002. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *Journal of Investigative Dermatology*, p. 155-163.

Reich, K. et al., 1999. Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, p. 214-220.

Roenigk, H. J., Auerbach, R., H, M. & al., e., 1998. Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol*, pp. 478-85.

Schafer, P., 2012. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochemical Pharmacology*, p. 1583-1590.

Settin, A., H.Hassan, El-Baz, R. & Hassan, T., 2009. Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, p. 105–112.

Siberil, S. et al., 2006. Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunology Letters*, p. 111–118.

Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C. A. & al., e., 2010. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genetics*, p. 985–990.

Su, K. et al., 2002. Genomic organization of classical human low-affinity Fcγgamma receptor genes. *Genes Immun* 3, p. 51–6.

Sun, L. D., Cheng, H. & Wang, Z. X., 2010. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nature Genetics*, p. 1005–1009.

Tejasvi, T., Stuart, P. E., Chandran, V. & al., e., 2012. TNFAIP3 gene polymorphisms are associated with response to TNF blockade in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, p. 593–600.

Toussiot, E., 2012. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflammation and Allergy*, p. 159–168.

van Sorge, N., van der Pol, W. & van de Winkel, J., 2003. FcγR polymorphisms: implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*, pp. 189–202.

Vasilopoulos, Y., Manolika, M., Zafiriou, E. & al., e., 2012. Pharmacogenetic analysis of TNF, NFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Mol Diagn Ther*, pp. 29–34.

Wang, L. et al., 2008. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with psoriasis. *International Journal of Immunogenetics*, p. 45–49.

Warmerdam, P. et al., 1991. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*, pp. 1338–1343.

Weinberg, J. M., 2003. An Overview of Infliximab, Etanercept, Efalizumab, and Alefacept as Biologic Therapy for Psoriasis. *CLINICAL THERAPEUTICS*, pp. 2487–2505.

Wu, J., Edberg, J. & Redecha, P., 1997. A novel polymorphism of FcγgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease.. *J Clin Invest*, pp. 1059–70.

Ιωαννίδης, Δ., 2007. Ψωρίαση. Στο: *Κοινωνία και υγεία τομ. VI*. σ.λ.:Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, pp. 123–132.

Κοσμάδακη, Μ. και συν., 2007. Ψωρίαση 2008: Θεραπευτικός οδηγός. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.*, pp. 161–173.

Νοσ.Α.Συγγρός, 2013. *Νοσοκομείο Αφροδισίων & Δερματικών "Ανδρέας Συγγρός"*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <http://www.psoriasi.gr/therapeytikes-epiloges.html> [Πρόσβαση 2014].