

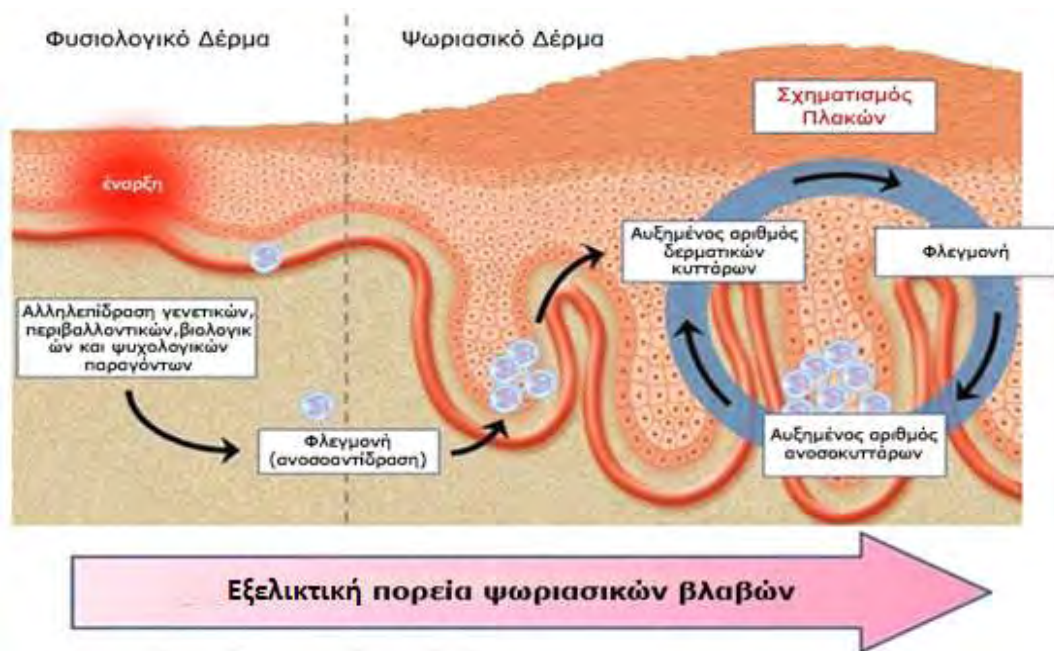


# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ



Θέμα:

### ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Τσάλτα Αλίκη  
Λάρισα 2014

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ  
ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ  
ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

**ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS WITH TREATMENT  
RESPONSE TO PATIENTS WITH PSORIASIS IN THE GREEK  
POPULATION**

**Μέλη τριμελούς επιτροπής**

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

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

**Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας**

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ζήση Μαμούρη και την κ. Σαραφίδου Θεολογία που μου εμπιστεύτηκαν την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τον χρόνο που διέθεσαν για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον κ. Δρ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Ένα επίσης ευχαριστώ, στην κ. Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τους υποψήφιους διδάκτορες Κωνσταντίνα Σαρρή και Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την υπομονή τους και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και την κ Στέλλα Τσουκαλά, Δερματολόγο-Αφροδισιολόγο για την πολύτιμη βοήθεια της.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
1 Εισαγωγή.....	3
1.1 Η ψωρίαση.....	3
1.1.1 Ορισμός.....	3
1.1.2 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά.....	3
1.1.3 Γενετικοί παράγοντες.....	4
1.1.4 Αιτιοπαθογένεια.....	5
1.1.5 Κλινικές μορφές της ψωρίασης.....	6
i Κοινή ψωρίαση ή ψωρίαση κατά πλάκας.....	6
ii Σταγονοειδής ψωρίαση.....	7
iii Ερυθροδερμική ψωρίαση.....	7
iv Φλυκταινώδης ψωρίαση.....	8
vi Ανάστροφη ψωρίαση.....	8
vii Ψωρίαση των ονύχων.....	9
viii Ψωριασική Αρθρίτιδα.....	9
1.1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της ψωρίασης.....	9
i Λοιμώξεις.....	10
ii Φάρμακα.....	10
iii Ψυχολογικοί παράγοντες.....	10
iv Ενδοκρινικοί παράγοντες.....	10
v Τραύμα.....	11
1.1.7 Εκτίμηση της βαρύτητας της ψωρίασης .....	11
1.2 Θεραπευτική αγωγή.....	12
1.2.1 Συστηματική αγωγή.....	12
1.2.2 Τοπική αγωγή.....	16
1.2.3 Φωτοθεραπεία.....	16
1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες.....	18
1.2.5 Ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με ψωρίαση.....	18
2. Φαρμακογενετική.....	18
2.1 Εισαγωγή.....	21
2.2 Γονίδιο <i>ABCBI</i> .....	22

2.3 Πολυμορφισμοί του γονιδίου <i>ABCB1</i> .....	26
2.4 Σκοπός.....	27
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3.1 Συλλογή δειγμάτων.....	27
3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα του περιφερικού αίματος... ..	29
3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA ποιοτικός έλεγχος του DNA.....	30
3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....	34
3.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP).....	35
3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	38
4. Αποτελέσματα .....	38
4.1 Αποτελέσματα.....	38
4.2 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	39
4.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>ABCB1</i> με PCR.....	39
4.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP.....	40
4.5 Στατιστική Ανάλυση.....	42
4.6 Κατασκευή απλοτύπων για το <i>ABCB1</i> .....	43
5. Συζήτηση.....	44
Βιβλιογραφία.....	47



## Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια, μη μεταδοτική, φλεγμονώδης διαταραχή του δέρματος η οποία οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ασθένεια παρατηρείται σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά η συχνότητα της διαφέρει ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα, προκαλώντας σημαντική νοσηρότητα και μεγάλη οικονομική και ψυχολογική επιβάρυνση στους ασθενείς. Η τοπική θεραπεία αποτελεί κοινή πρακτική και η συστηματική θεραπεία χρησιμοποιείται για τις σοβαρές μορφές της νόσου. Η κυκλοσπορίνη αποτελεί μία αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή στην ψωρίαση, εν τούτοις μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές όταν χορηγείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs 2229109 του γονιδίου *ABCB1*, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία της κυκλοσπορίνης. Το γονίδιο *ABCB1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q21.1 και κωδικοποιεί την P-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία είναι μία εξαρτώμενη ATP αντλία εκροής με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος.

Στα πλαίσια της εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης 84 ασθενών με ψωρίαση από την Ελλάδα και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη, με σκοπό τη μελέτη του πολυμορφισμού G1199A (rs 2229109), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR-RLFP. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στη θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του PASI. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά συσχέτιση του πολυμορφισμού του γονιδίου με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Επιπλέον η κατασκευή απλοτύπων χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών των πολυμορφισμών T-199C, C1236T, G2677T και C3435T του *ABCB1*, ανέδειξε τον απλότυπο T-G-C-G-T ως δείκτη πρόβλεψης του ~20% των μη ανταποκριθέντων ασθενών στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

## Summary

Psoriasis is a chronic, non contagious, inflammatory skin disorder with an etiology basis on both environmental and genetic factor. The disease is found worldwide but the prevalence varies among different ethnic groups, causing significant morbidity and high financial and psychological burden in patients. Topical treatment is common



practice, with systemic therapy reserved for severe forms of the disease. The cyclosporine is an effective therapeutic agent in psoriasis, with high risk of adverse reactions, especially if given for extended periods of time.

The aim of the present study was to assess the role of *ABCB1* polymorphism G1199A (rs 2229109) and the clinical response of patients with psoriasis in cyclosporine treatment. The *ABCB1* gene is located on chromosome 7q21.1 and it is encoding of P-glycoprotein (Pgp) which is an ATP-dependent efflux pump with broad substrate specificity. Genetic polymorphisms in the *ABCB1* gene have been shown that effect Pgp expression levels and response to drugs. In this study, 84 patients with psoriasis from Greece were genotyped for the G1199A polymorphism by PCR-RFLP methods. Patients were diagnosed with Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score, before the treatment. Treatment response was assessed according to clinical protocols and changes in PASI.

Analysis of results showed no statistically significant association for the G1199A and the response of patients to treatment with cyclosporine for 3 months. In addition haplotypes were constructed based also on previous data on *ABCB1* polymorphisms T-199C, C1236T, G2677T and C3435T, which revealed a highly significant association of haplotype T-G-C-G-T and negative response to cyclosporine, highlighting as a marker that can predict negative response in approximately 20% of non-responders to cyclosporine treatment.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η ψωρίαση

### 1.1.1 Ορισμός

Η ψωρίαση είναι μία συχνή, χρόνια φλεγμονώδης νόσος του δέρματος, που χαρακτηρίζεται από περιγεγραμμένες, ερυθματώδεις, πλάκες ποικίλων μεγεθών και προσβάλλει περίπου το 2% του πληθυσμού (Menter et al., 2009). Ως προς την κλινική εικόνα μπορεί να έχει ήπια, μέτρια ή σοβαρή εκδήλωση. Η νόσος προσβάλλει κυρίως το δέρμα και ενίοτε τους βλεννογόνους, τους όνυχες, το μυοσκελετικό σύστημα και το γαστρεντερικό σύστημα (Nestle et al., 2009).

### 1.1.2 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Η ψωρίαση παρατηρείται σε παγκόσμιο επίπεδο, και η συχνότητά της ποικίλει ανάλογα με την φυλή, την πληθυσμιακή ομάδα και το γεωγραφικό πλάτος (Εικόνα 1). Εκδηλώνεται λιγότερο συχνά στις τροπικές περιοχές και είναι πιο συχνή στις βόρειες και ψυχρές χώρες (Raychaudhuri et al., 2001). Πρόκειται για μία νόσο που προσβάλλει το 2% του γενικού πληθυσμού και κάθε χρόνο εμφανίζονται περίπου 60 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα (Nevitt et al., 1996 Bell et al., 1991). Στην Ευρώπη και στη Βόρειο Αμερική το ποσοστό κυμαίνεται μεταξύ 1-3% (Raychaudhuri et al., 2001) και στην Ελλάδα το ποσοστό είναι 2-2,5% (Rigoropoulos et al., 2010). Συναντάται σπάνια στη μαύρη και κίτρινη φυλή, και πολύ σπάνια εμφανίζεται στους Εσκιμώους, στους Ινδιάνους της Νότιας Αμερικής, στους ιθαγενείς των νησιών Φίτζι και στους Αυστραλούς αβορίγινες (ιθαγενείς της Αυστραλίας) (Kueger et al., 1994). Προσβάλλει εξίσου συχνά και τα δύο φύλα, με μία τάση για προωριότερη έναρξη στις γυναίκες. Η συχνότερη ηλικία εμφάνισης είναι κατά την 3η-4η δεκαετία και σε ένα μικρότερο ποσοστό ασθενών, περίπου 10%, κατά την 6η-7η δεκαετία της ζωής (Bowcock et al., 2003).

Υπάρχουν δύο τύποι ψωρίασης, οι οποίοι διακρίνονται με βάση την ηλικία έναρξης, τη συσχέτισή τους με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA και την πορεία της νόσου. Ο τύπος I εμφανίζεται συχνότερα σε νεαρούς ασθενείς (πριν την ηλικία των 40), οι οποίοι έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό, έχει βαρύτερη πρόγνωση και το 80% των ασθενών έχει αυξημένη συσχέτιση με το αντιγόνο HLA-Cw6. Ο τύπος II εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (50-60 ετών), τα οποία σπάνια έχουν

θετικό οικογενειακό ιστορικό και μόνο το 20% αυτών έχουν συσχέτιση με το αντιγόνο HLA-Cw6 (Henseler & Christophers et al., 1985).

### 1.1.3 Γενετικοί παράγοντες

Η ψωρίαση είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, δηλ. γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνισή της. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες που τεκμηριώνουν το γενετικό υπόβαθρο της νόσου. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε στα νησιά Φαρόε, στην οποία αναφέρεται ότι ποσοστό 91% των ασθενών με ψωρίαση είχαν τουλάχιστον έναν πρώτου βαθμού συγγενή με ψωρίαση (Lamhot et al., 1963). Η δεύτερη μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Σουηδία, και αναφέρει ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ψωρίασης σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ψωρίαση ανέρχεται στο 2,7 (Hellgren et al., 1967). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 3.000 οικογένειες έδειξε ότι η πιθανότητα εμφάνισης ψωρίασης σε τέκνο που οι γονείς δεν πάσχουν από τη νόσο είναι 4%, ενώ όταν ο ένας από τους δύο γονείς πάσχει, η αντίστοιχη πιθανότητα ανέρχεται στο 28%. Τέλος, όταν και οι δύο γονείς εμφανίζουν ψωριασικές βλάβες η πιθανότητα το τέκνο να εμφανίσει τη νόσο αυξάνεται στο 65% (Rahman et al., 2005). Μελέτες σε διζυγωτικά δίδυμα έχουν δείξει ότι όταν πάσχει το ένα από τα δύο αδέλφια, η πιθανότητα να προσβληθεί και το άλλο είναι 15-20%, ενώ στα μονοζυγωτικά δίδυμα η πιθανότητα να προσβληθεί είναι 64-73%. Η εμφάνισή της ψωρίασης στα μονοζυγωτικά δίδυμα χαρακτηρίζεται από την ίδια ηλικία έναρξης, ίδια κλινική βαρύτητα, και παρόμοια πορεία και κατανομή. Το γεγονός ότι στα μονοζυγωτικά δίδυμα η πορεία της νόσου δεν είναι 100% ίδια υποδεικνύει το ρόλο στην παθογένεια της νόσου και άλλων παραγόντων όπως του περιβάλλοντος, διάφορων λοιμώξεων, του καπνίσματος και του ψυχολογικού στρες (Peters et al., 2000).

Με την εμφάνιση της ψωρίασης έχουν συσχετισθεί συγκεκριμένα αλληλόμορφα γενετικών τόπων που κωδικοποιούν μόρια της τάξης I όπως είναι τα HLA B13, HLA B17, HLA B37, HLA B57, HLA Cw6, HLA DR7 (Rahman et al., 2004). Ιδιαίτερα το Cw6 έχει συσχετιστεί με τη νόσο και φαίνεται να εμπλέκεται τόσο στην κλινική μορφή όσο και στην ηλικία έναρξης (Gudjonsson et al., 2002)

Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε Ευρωπαίους ασθενείς υπέδειξαν ότι υπάρχουν 36 γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ψωρίαση (Tsoi et al., 2012). Αρκετοί από αυτούς του γενετικούς τόπους αλληλοεπικαλύπτονται με άλλους

γενετικούς τόπους που έχουν ταυτοποιηθεί με αυτοάνοσα νοσήματα όπως η νόσος του Crohn και η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα και κάποιοι βρίσκονται κοντά σε γονίδια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων T<sub>H</sub>17 (Cotsapas et al., 2011). Ο γενετικός τόπος PSORS1 είναι ο πιο εκτενώς μελετημένος, και ανευρίσκεται στο 35-50% των περιπτώσεων με θετικό οικογενειακό ιστορικό ψωρίασης. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6q21.3, εντός του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Στην ίδια περιοχή δύο γονίδια έχουν διερευνηθεί για το ρόλο τους στην προδιάθεση της νόσου: Το γονίδιο *HLA-C* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CCHCR1 (Caron et al., 2002) και το *CDSN* που κωδικοποιεί την corneodesmosin (CDSN) η οποία υπερεκφράζεται στις περιοχές του δέρματος που παρουσιάζουν ψωριασικές βλάβες (Asumalathi et al., 2000). Άλλοι γενετικοί τόποι οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την ψωριασική προδιάθεση σε μελέτες διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων είναι ο PSORS2 στο 17q, ο PSORS3 στο 4q, ο PSORS4 στο 1-q21, ο PSORS5 στο 3q21, ο PSORS6 στο 19p, ο PSORS7 στο 1p και ο PSORS9 στο 4q31 (Rahman et al., 2005).

#### 1.1.4 Αιτιοπαθογένεια της ψωρίασης

Η ψωρίαση αποτελεί μια υπερπλαστική διαταραχή, η παθογένεση της οποίας οφείλεται σε έναν υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων ο οποίος καθοδηγείται από έναν περίπλοκο καταρράκτη μεσολαβητών της φλεγμονής. Αρχικά, τα κύτταρα της επιδερμίδας στις ψωριασικές βλάβες πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, έτσι ώστε να παράγονται περίπου 35.000 επιθηλιακά κύτταρα /mm<sup>2</sup> ενώ στη φυσιολογική επιδερμίδα παράγονται 1.246 κύτταρα /mm<sup>2</sup>. Ο χρόνος του κυτταρικού κύκλου των επιδερμικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά, ενώ ο συνολικός αριθμός των βασικών κερατινοκυττάρων που εισέρχονται στη μιτωτική φάση είναι αυξημένος (Weinstein et al., 1985). Επιπρόσθετα, στην ψωρίαση ο χρόνος ωρίμανσης και απόπτωσης ενός κερατινοκυττάρου μειώνεται από 26 περίπου μέρες που είναι στο φυσιολογικό σε 4 ημέρες (Ortonne et al., 1996). Η υπέρμετρη δραστηριότητα του επιθηλίου, δεν επιτρέπει στα επιδερμικά κύτταρα των ψωριασικών βλαβών να ωριμάσουν και να διαφοροποιηθούν ομαλά με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλο μέγεθος, να διατηρούν τους πυρήνες τους στη ζώνη της κερατίνης στοιβάδας και να αποπίπτουν από την επιφάνεια του δέρματος προσκολλημένα το ένα

με το άλλο δημιουργώντας τα αργυρόχρωμα λέπια τα οποία καλύπτουν τις ερυθρές δερματικές βλάβες της ψωρίασης.

Υπάρχουν δύο καίρια σημεία που καταδεικνύουν τη κεντρική θέση του ανοσοποιητικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα των T-λεμφοκυττάρων στη παθοφυσιολογία της ψωρίασης. Πρωτίστως, η νόσος αντιμετωπίζεται με φάρμακα που στοχεύουν στο ανοσοποιητικό σύστημα όπως είναι η κυκλοσπορίνη, η οποία δρα αναστέλλοντας τη μεταγραφή και τη μετάφραση κυρίως του γονιδίου της ιντερλευκίνης 2, μιας γλυκοπρωτεΐνης που εκκρίνεται από τα CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> λεμφοκύτταρα και παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου (Ellis et al., 1991 Nestle et al., 2009). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η νόσος μπορεί να εμφανιστεί μετά από μεταμόσχευση του μυελού των οστών ή αντίθετα να ιαθεί εάν προϋπάρχει στο λήπτη, καθώς η αντικατάσταση του μυελού των οστών με έναν γενετικά διαφοροποιημένο επιφέρει αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα (Eedy et al., 1990).

#### **1.1.5. Κλινικές μορφές της ψωρίασης**

Η ψωρίαση παρουσιάζει ευρεία ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων και ανάλογα με τα κλινικά χαρακτηριστικά, τον εντοπισμό και την μορφολογία της διακρίνεται στις ακόλουθες μορφές:

i. Κοινή ψωρίαση ή ψωρίαση κατά πλάκας: Είναι η συχνότερη μορφή ψωρίασης και αντιπροσωπεύει το 95% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται από ερυθρηματώδεις πλάκες διαφόρων μεγεθών, οι οποίες καλύπτονται από παχιά, αργυρόχρωμα λέπια και το σχήμα τους είναι οβάλ ή ανώμαλο (Εικόνα 1.1). Στην κοινή ψωρίαση παρατηρείται το σήμειο Auspitz ή σημείο αιματηράς δρόσου, το οποίο αναφέρεται στην εμφάνιση μικρής αιμορραγίας μετά την απομάκρυνση των λεπιών από την επιφάνεια της πλάκας. Οι πλάκες εντοπίζονται συχνότερα στους αγκώνες, στα γόνατα, στο τριχωτό της κεφαλής και στο κατώτερο τμήμα της ράχης (Griffiths et al., 2007).



Εικόνα 1.1: Ψωρίαση κατά πλάκας (Karabidouk et al., 2010).

ii. Σταγονοειδής ψωρίαση: στη μορφή αυτή οι πλάκες της ψωρίασης εμφανίζονται πολύ μικρές, (διάμετρος 1cm) και μοιάζουν με σταγόνες νερού (Εικόνα 1.2). Είναι περισσότερο διαδεδομένη σε άτομα νεαρής ηλικίας και αποτελεί τη πρώτη μορφή εκδήλωσης της ψωρίασης στο 14-17% όλων των ασθενών (Camper et al., 1993). Εμφανίζεται μετά από φαρυγγικές στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις, ανεξάρτητα από τη λήψη ή μη αντιβίωσης. Εντοπίζεται στο κορμό και τα άκρα, ενώ συνήθως δεν προσβάλλει τα πέλματα (Martin et al., 1996).



Εικόνα 1.2: Σταγονοειδής ψωρίαση (Roberson et al., 2010)

iii. Ερυθροδερμική ψωρίαση ή ψωριασική ερυθροδερμία: είναι σπάνια μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από καθολική φλεγμονή και ερυθρότητα του δέρματος (Εικόνα 1.3). Η νόσος συνήθως αρχίζει ως κοινή ψωρίαση η οποία μεταπίπτει σε ερυθροδερμική μετά από ακατάλληλη χρήση κορτικοστεροειδών ή φωτοθεραπείας, ή κάποιας παθολογικής διαταραχής (λοιμώξεις). Το εξάνθημα της ερυθροδερμικής ψωρίασης εμφανίζει ένα βαθύ ερυθρό χρώμα με ποικίλου βαθμού απολέπιση. Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν υπό- και υπερθερμία η οποία προκαλείται από την απόφραξη των ενδοεπιδερμικών πόρων των ιδρωτοποιών αδένων λόγω της φλεγμονής του δέρματος. Συχνά εμφανίζεται οίδημα των κάτω άκρων από απώλεια λευκωμάτων και ενδεχόμενα καρδιακή, ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια (Sadeh et al., 1997).



Εικόνα 1.3: Ερυθροδερμική ψωρίαση (Freedberg et al., 2003).

iv. Φλυκταινώδης ψωρίαση: χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλυκταινών με κίτρινο χρώμα που σχηματίζονται πάνω σε έντονα ερυθματώδεις συμμετρικές πλάκες στις παλάμες και τα πέλματα (Εικόνα 1.4). Οι φλύκταινες περιέχουν στείρο περιεχόμενο, το οποίο αποτελείται από μεγάλο αριθμό πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων. Το υγρό αυτό, μετά από 7-10 μέρες αποξηραίνεται δημιουργώντας μια κίτρινόφαιη βλατίδα. Διακρίνεται σε εντοπισμένη και γενικευμένη μορφή (Langley et al., 2005).



Εικόνα 1.4: Φλυκταινώδης ψωρίαση (Hong et al., 2011)

v. Ψωρίαση του τριχωτού της κεφαλής Η προσβολή του τριχωτού της κεφαλής αποτελεί μια από τις συχνότερες εντοπίσεις της ψωρίασης και χαρακτηρίζεται από παχιές πλάκες που καλύπτονται από λέπι, με διάχυτη ή περιορισμένη κατανομή συνήθως στην πρόσθια βρεγματική και οπισθοωτιαία χώρα (Wozel et al., 2011).

Πρόσφατες μελέτες και βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ψωρίασης του τριχωτού και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Συγκεκριμένα, μελέτη στην οποία έλαβαν μέρος 1633 άτομα, έδειξε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ψωριασικής αρθρίτιδας είναι κατά 3,9 φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς με ψωρίαση του τριχωτού (Wilson et al., 2009).

vi. Ανάστροφη ψωρίαση Η μορφή αυτή προσβάλλει τις πτυχές (μηροβουβωνικές, υπομαζικές και οπισθοωτιαία), τα κολπώματα, τον ομφαλό, το πέος και τα χείλη. Χαρακτηρίζεται από σαφώς αφοριζόμενες πλάκες, με τα χαρακτηριστικά ψωριασικά λέπια να απουσιάζουν. Εμφανίζεται συχνότερα στους ηλικιωμένους και ιδιαίτερα στα παχύσαρκα άτομα λόγω έντονης τριβής του δέρματος (Gelfand et al., 2007).

vii. Ψωρίαση των ονύχων Η ψωρίαση των ονύχων (Εικόνα 1.5) προσβάλλει το 25-50% των ασθενών και εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα άνω των 40 ετών (Stuart et al., 2002). Η ψωριασική ονυχία εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα (Lavoroni et al., 1994).



Εικόνα 1.5: Ψωρίαση ονύχων ( Roberson et al., 2010)

viii. Ψωριασική αρθρίτιδα: Πρόκειται για μία φλεγμονώδη οροαρνητική αρθρίτιδα (δεν ταυτοποιείται στον όρο των ασθενών το αυτοαντίσωμα anti-CCP) η οποία εμφανίζεται στο 23-30% των ασθενών που ήδη πάσχουν από ψωρίαση, και ιδιαίτερα σε ασθενείς άνω των 40 ετών (Zachariae et al., 2002). Προσβάλλει και τα δύο φύλα, η συχνότητα των περιστατικών είναι 6/100.000 ετησίως με συχνότητα εμφάνισης 100/100.000 (Shbeeb et al., 2000). Παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την ρευματοειδή αρθρίτιδα, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η διάγνωση της ψωριασικής αρθρίτιδας στα πρώιμα στάδια (εικόνα 1.6).





Εικόνα 6: Ψωριασική αρθρίτιδα (Menter et al., 2008)

### 1.1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της ψωρίασης

i. Λοιμώξεις Διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν ή να επιδεινώσουν τη νόσο. Μεγάλες κλινικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την εμφάνιση σταγονοειδούς ψωρίασης μετά από οξείες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού από β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο π.χ. *Streptococcus pyogenes* (Tefler et al., 1992). Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι των ομάδων Lancefield A, C και G είναι πιθανόν να προκαλέσουν έξαρση της χρόνιας κατά πλάκας ψωρίασης. Τα λεμφοκύτταρα Th1 αναγνωρίζουν τα ινίδια του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων στρεπτόκοκκων, τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη M. ( Gudjonsson et al., 2003 Zhao G, 2005). Έχει διαπιστωθεί ότι κυτταρικές σειρές T λεμφοκυττάρων αντιδρούν με επίτοπους που είναι κοινοί στην στρεπτοκοκκική πρωτεΐνη M και στην πρωτεΐνη κεράτινη που υπάρχει στην επιδερμίδα (Valdimarsson et al., 1995) . Επίσης, λοίμωξη από τον ιό HIV μπορεί να προκαλέσει επιδείνωση της ήδη υπάρχουσας ψωρίασης ( Roenigk et al., 1988), ενώ ύφεση της νόσου παρατηρείται με την έναρξη αντιρετροϊκής αγωγής (Duvic et al., 1987).

ii. Φάρμακα Το λίθιο, οι β- αδρενεργικοί αναστολείς, η κινιδίνη, η ιντερφερόνη είναι ορισμένα φάρμακα που σχετίζονται με την εμφάνιση ή την επιδείνωση της ψωρίασης (Tsankov et al., 2000). Η απότομη διακοπή συστηματικών γλυκοκορτικοειδών ή ισχυρών τοπικών κορτικοστεροειδών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε μεγάλη επιφάνεια του δέρματος μπορεί να προκαλέσουν την εμφάνιση ή την επιδείνωση της νόσου.

iii. Ψυχολογικοί παράγοντες Το έντονο ψυχολογικό στρές επιδεινώνει την κατάσταση της νόσου σε ποσοστό 66-71% των ασθενών, ενώ σε ποσοστό 35% η

νόσος εμφανίζεται σε περιόδους έντονης ανησυχίας και ψυχολογικής φόρτισης (Zachariae et al., 2004).

iv. Ενδοκρινικοί παράγοντες Η πορεία ή η εμφάνιση της ψωρίασης μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους ενδοκρινικούς παράγοντες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τάση βελτίωσης της νόσου κατά την εγκυμοσύνη και η υποτροπή της αμέσως μετά τον τοκετό (Boyd et al., 1996) .

v. Τραύμα Σε ασθενείς με ψωρίαση, ο τραυματισμός του δέρματος μπορεί να προκαλέσει ψωρίαση στη θέση του τραύματος (Εικόνα 1.7). Η πρώτη περιγραφή του φαινομένου έγινε το 1872, από τον δερματολόγο Henrich Koebner, από τον οποίο και ονομάστηκε έτσι. Το φαινόμενο περιγράφει την εμφάνιση ψωριασικών βλαβών σε σημεία τραυματισμού του δέρματος (π.χ. χειρουργικές τομές, εγκαύματα).



Εικόνα 1.7: Φαινόμενο Koebner (Goules et al., 2008)

### 1.1.7 Εκτίμηση της βαρύτητας της ψωρίασης-δείκτες αξιολόγησης

Η ψωρίαση, παρά το γεγονός ότι δεν συνιστά απειλητική για τη ζωή κατάσταση, είναι μία νόσος με σημαντική κλινική και ψυχολογική νοσηρότητα, που επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών, ώστε να μπορεί να συγκριθεί και με άλλες χρόνιες ασθένειες όπως ο διαβήτης και η καρδιακή νόσος (Finlay et al., 1987). Οι ασθενείς νιώθουν κοινωνικά στιγματισμένοι ή περιθωριοποιημένοι, βιώνοντας δυσκολίες στην καθημερινότητα και στην εργασία τους.

Ο ορισμός της σοβαρότητας της ψωρίασης συνυπολογίζεται από τρεις παραμέτρους: τον δείκτη PASI (Psoriasis Area and Severity Index), ο οποίος επιτρέπει την αξιολόγηση της έκτασης των βλαβών και του βαθμού του ερυθήματος των λεπιών, τον δείκτη BSA (Body Surface Area) που βασίζεται στο κριτήριο της προσβεβλημένης επιφάνειας και τέλος τον δείκτη PGA (Physician Global Assessment)

ο οποίος αποτελεί την σφαιρική εκτίμηση του γιατρού για την σοβαρότητα της νόσου. Πρόσφατα, προτάθηκε και ο συνυπολογισμός του δείκτη της ποιότητας ζωής (DLQI) (Mrowietz et al., 2011). Το DLQI αποτελεί ένα πρακτικό ερωτηματολόγιο, το οποίο χρησιμοποιείται σε όλες τις κλινικές μελέτες της ψωρίασης. Περιλαμβάνει 10 ερωτήσεις, σχετικά με το πόσο επηρεάζεται η ζωή των ασθενών από τη νόσο κατά τις προηγούμενες 7 ημέρες (Azfar et al., 2008).

Ως ήπια ψωρίαση ορίζεται το στάδιο της νόσου κατά το οποίο, οι δείκτες BSA, PASI και DLQI είναι μικρότεροι από 10 και ως μέτρια ή σοβαρή ψωρίαση ορίζεται η ψωρίαση με BSA, PASI και DLQI μεγαλύτερο από 10. Όταν το DLQI είναι μεγαλύτερο από 10 υποδηλώνει σημαντική επίδραση της νόσου στην ποιότητα ζωής, ενώ όταν είναι μικρότερο ή ίσο του δέκα υποδηλώνει μικρή επίδραση στη ζωή του ασθενούς.

## **1.2 Θεραπευτική αγωγή**

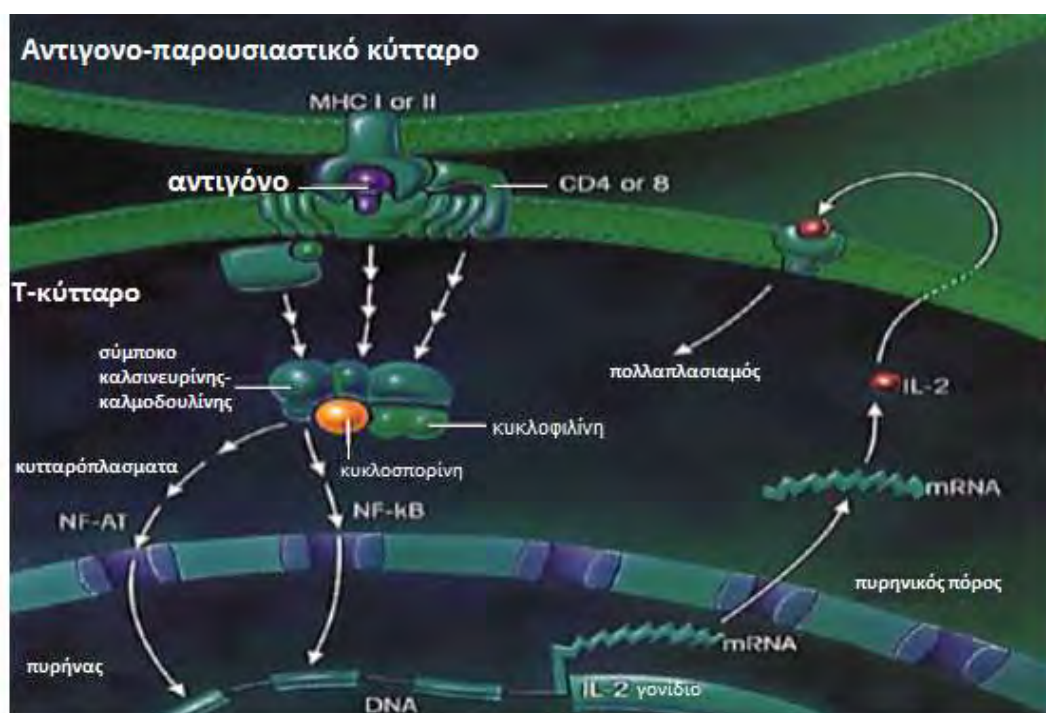
### **1.2.1 Συστημική αγωγή**

#### **Κυκλοσπορίνη**

Πρόκειται για ένα κυκλικό εντεκαπεπτίδιο, υδρόφοβο, το οποίο απομονώθηκε από το μύκητα *Tolyrocladium inflatum gams*. Αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο στις μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων (ήπαρ, καρδιά) και μυελού των οστών. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει εφαρμοστεί και στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων ανάμεσα στα οποία είναι και η ψωρίαση (Muller et al., 1979 Griffins et al., 2000).

Η κυκλοσπορίνη, σε μοριακό επίπεδο για να εισέλθει στο κύτταρο, συνδέεται με μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την κυκλοφιλίνη, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό, συνδέεται με μία πρωτεϊνική φωσφατάση την καλσινευρίνη, αναστέλλοντας την δράση της επί της πυρηνικής μεταφοράς και της συνακόλουθης ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-AT (Nuclear factor of Activated T cells) και AP-1 των T-λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1.8) (Morris et al., 1994). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης αρκετών γονιδίων κυτταροκινών σχετιζόμενων με την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, με κυριότερο το γονίδιο της ιντερλευκίνης 2, μίας γλυκοπρωτεΐνης που κατέχει μείζονα ρόλο στη παθογένεια της ψωρίασης (Stephen et al., 1996).

Ως αντιψωριασικός παράγοντας, η κυκλοσπορίνη είναι αποδεδειγμένα αποτελεσματικό φάρμακο για την θεραπεία εκτεταμένης κατά πλάκας ψωρίασης καθώς και στην φλυκταινώδη και ερυθροδερμική ψωρίαση της παιδική ηλικίας (Juanquim et al., 1998). Μερικές από τις κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου είναι η νεφροτοξικότητα, η αρτηριακή υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, η κεφαλαλγία, οι οποίες είναι συχνά ήπιες και αντιμετωπίσιμες (Lebwohl et al., 2005).



Εικόνα 1.8: Η κυκλοσπορίνη συνδέεται με την κυκλοφιλίνη, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δημιουργώντας ένα συμπλόκο το οποίο οδηγεί στην αναστολή της δράσης της καλσινευρίνης (Steffan et al., 1996).

### Μεθοτρεξάτη

Χρησιμοποιείται αρκετές δεκαετίες (από το 1958) με σημαντική αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της φλυκταινώδους και της ερυθροδερμικής ψωρίασης, ενώ αποτελεί φάρμακο πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της ψωριασικής αρθρίτιδας (Barker et al., 2011). Η μεθοτρεξάτη αποτελεί έναν ανταγωνιστή της αναγωγής του διυδροφυλλικού οξέος, αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA (στη φάση S του κυτταρικού κύκλου). Δρα κυτταροτοξικά στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της επιδερμίδας και στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα

του χορίου. Το φάρμακο παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης του 5-αμινοιμιδαζολο-4-καρβοξυαμιδικού ριβονουκλεοτιδίου (AICAR), αυξάνοντας έτσι την απελευθέρωση της αδενοσίνης. Η αδενοσίνη παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, κυρίως στα ουδετερόφιλα, όπου γίνεται αναστολή της προσκόλλησης και άμεση παραγωγή ελευθέρων ρίζων. Η μεθοτρεξάτη επάγει την απόπτωση στα ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα (Heenen et al., 1998).

Η μεθοτρεξάτη έχει αρκετές σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η ναυτία, η ανορεξία, η λευκοπενία και η μεγαλοβλαστική αναιμία (Gutierrez-Urena et al., 1996). Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται όταν χορηγείται μαζί με άλλα φάρμακα, μπορεί καθώς αλληλεπιδρά με αυτά, δημιουργώντας πολλές παρενέργειες (Furst et al., 1995). Η τεκνοποίηση απαγορεύεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας και 3 μήνες μετά τη λήξη της, και για τα δύο φύλα, καθώς η χρήση του φαρμάκου μπορεί να οδηγήσει σε τερατογένεση (Pathinara et al., 2009).

### **1.2.2 Τοπική αγωγή**

#### **Ρετινοειδή**

Τα ρετινοειδή είναι δομικά και λειτουργικά ανάλογα της βιταμίνης Α. Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της φλυκταινώδους και της ερυθροδερμικής ψωρίασης, ενώ στην ψωρίαση κατά πλάκας, ο συνδυασμός των ρετινοειδών με φωτοθεραπεία ή τοπική θεραπεία επιφέρει σημαντική βελτίωση (Lebwohl et al., 2001). Η ετρετινάτη και η ασιτρετίνη είναι συνθετικά ρετινοειδή τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και αναστέλλουν τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό τους στα σημεία των ψωρισιακών αλλοιώσεων. Σε κυτταρικό επίπεδο τα ρετινοειδή συνδέονται με κυτταροπλασματικούς υποδοχείς, δημιουργούν σύμπλοκα που μεταφέρονται στον πυρήνα των κυττάρων και ασκούν ρυθμιστικό ρόλο σε γονίδια που συμμετέχουν σε διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης, ανάπτυξης και αύξησης (Gollink et al., 1997).

Η σημαντικότερη παρενέργεια των συστηματικών ρετινοειδών είναι η τερατογόνος δράση, και για αυτό το λόγο, το φάρμακο δεν χορηγείται κατά τη διάρκεια της κύησης, ενώ αποφεύγεται σε άτομα που βρίσκονται στην

αναπαραγωγική ηλικία λόγω της μακροχρόνιας παραμονής του φαρμάκου στον οργανισμό και ειδικότερα στο λιπώδη ιστό (Larsen et al., 1993).

### **Πισσούχα σκευάσματα**

Η χρήση της πίσσας, ως θεραπευτικό μέσο, για την αντιμετώπιση της ψωρίασης χρονολογείται από πολλών ετών, και σήμερα χρησιμοποιείται σπάνια. Αποτελεί ένα σύνθετο μείγμα από ουσίες που παράγονται από τον άνθρακα. Ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι εξακριβωμένος και πιθανολογείται ότι δρα μέσω αντιμυτωτικών μηχανισμών. Ανασταλτικοί παράγοντες για τη χρήση τους αποτελούν, η έντονη οσμή, η χρώση του δέρματος και των ρούχων κατά την εφαρμογή. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα, η πίσσα έχει παρουσιάσει καρκινογενετική δράση, χωρίς όμως κάτι τέτοιο να έχει αποδειχθεί στον άνθρωπο (Menter et al., 2009).

### **Τοπικά κορτικοστεροειδή**

Εφαρμόζονται απευθείας σε ψωριασικές βλάβες και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την θεραπεία της ψωρίασης σε ορισμένες ευαίσθητες περιοχές όπως το πρόσωπο, τις πτυχές και τα γεννητικά όργανα. Τα τοπικά κορτικοστεροειδή ασκούν αντιφλεγμονώδη και αγγειοσυσπαστική δράση και μειώνουν τη διαίρεση των κερατινοκυττάρων (Cornell et al., 1992). Εμφανίζουν πλεονεκτήματα, όπως η εύκολη εφαρμογή τους χωρίς την πρόκριση ερυθρότητας, αλλά η μακροχρόνια χρήση τους μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες όπως, ατροφικές ραβδώσεις, ταχυφυλαξία, ακμοειδές εξάνθημα και φλοιοεπιπεφρική ανεπάρκεια (Brunel et al., 2003). Η απότομη διακοπή τους μετά από μακροχρόνια θεραπεία μπορεί να προκαλέσει υποτροπή της νόσου και αύξηση της ανθεκτικότητας στη θεραπεία (Tsambaos et al., 2004).

### **Ανάλογα βιταμίνης D**

Τα ανάλογα της βιταμίνης D χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης, με κυριότερο εκπρόσωπο την καλσιποτριόλη, η οποία χορηγείται στους ασθενείς από τη δεκαετία του 90. Κύριος μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων φαρμάκων είναι να αναστέλλουν την υπέρμετρη μιτωτική δραστηριότητα και να τροποποιούν την λειτουργία των ανοσοδυναμικών κυττάρων του δέρματος (Kang et al., 1998). Η συνδυασμένη θεραπεία με τοπικά στεροειδή ή φωτοθεραπεία (PUVA), αυξάνει την

αποτελεσματικότητά τους (Speight et al., 1994). Η χρήση του φαρμάκου αποφεύγεται σε ευαίσθητες περιοχές όπως το πρόσωπο και οι δερματικές πτυχές καθώς προκαλεί ερεθισμούς (Kienbaum et al., 1996). Η κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια των αναλόγων της βιταμίνης D είναι η υπερασβεσταιμία, η οποία προκαλείται μετά από μακροχρόνια χρήση του φαρμάκου και σε μεγάλες επιφάνειες του δέρματος (Montersen et al., 1993).

### **1.2.3 Φωτοθεραπεία**

Η φωτοθεραπεία έχει την μορφή της έκθεσης στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας και έχει καθιερωθεί τα τελευταία χρόνια ως αποτελεσματική θεραπεία στην ψωρίαση. Υπάρχουν δυο τύποι φωτοθεραπείας:

Η φωτοχημειοθεραπεία (PUVA=Psoralens+ UVA) είναι μία μέθοδος που στηρίζεται στη χορήγηση φωτοευαίσθητοποιών ουσιών που ονομάζονται ψωραλενία σε συνδυασμό με ακτινοβολία του δέρματος με υπεριώδη ακτινοβολία A (UVA) (Zanollì et al., 2004). Τα ψωραλενία είναι ισχυρές φωτοευαίσθητες ουσίες φυσικής προέλευσης και η χορήγησή τους γίνεται από το στόμα ή με τοπική εφαρμογή. Η αντιψωριασική δράση της PUVA, αποδίδεται αφενός στην αναστολή της σύνθεσης του DNA στην επιδερμίδα και της δράση της σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα T-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα Langerhans (Coven et al., 1998).

Η φωτοθεραπεία με ακτίνες UVB στενού φάσματος είναι μια μέθοδος στην οποία χρησιμοποιείται υπεριώδη ακτινοβολία B σε περιορισμένο μήκος χωρίς την ταυτόχρονη χρήση ψωραλενίων. Η φωτοθεραπεία με UVB είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην σταγονοειδή και στην ψωρίαση κατά πλάκας (Lowe et al., 1991).

### **1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες**

Οι βιολογικοί παράγοντες είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες που δρουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια του παθογενετικού μηχανισμού της ψωρίασης (Winterfield et al., 2004). Αποτελούν τα τελευταία χρόνια σημαντικές εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές για τον μακροπρόθεσμο έλεγχο της νόσου, την τοξικότητα και την αντοχή της ψωρίασης στη θεραπεία (Griffiths et al., 2000). Υπάρχουν τρεις βιολογικοί παράγοντες:

Το etanercept είναι μια διμερής πρωτεΐνη, που αποτελείται από τον p75 υποδοχέα του TNF συνδεδεμένο με το Fc τμήμα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1. Το etanercept δεσμεύει τον TNF-α και εμποδίζει τη βιολογική του δράση (Sharma et al., 2004). Έλαβε έγκριση για τη θεραπεία της ψωρίασης από τον FDA, το 2004 και είναι ο μόνος βιολογικός παράγοντας που χορηγείται για την θεραπεία της παιδικής ψωρίασης κατά πλάκας (Winterfield et al., 2005). Στις παρενέργειες του φαρμάκου, συγκαταλέγεται η πιθανότητα αναζωπύρωσης ή εμφάνισης λοιμώξεων, χωρίς όμως να είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με τους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με μεθοτρεξάτη (Moreland et al., 2002).

Το infliximab είναι ένα χμαιοκικό μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 ανθρώπου και επίμυος έναντι του TNF-α, που απαιτεί ενδοφλέβια έγχυση. Χορηγείται σε ενήλικες για τη θεραπεία της μέτριας προς σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας, της νόσου του Crohn, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της ελκώδης κολίτιδας, οι οποίοι παρουσίασαν ανθεκτικότητα ή αντένδειξη σε άλλη συστημική θεραπεία (Winterfield et al., 2004). Το infliximab στοχεύει και καταστρέφει τα κύτταρα που παράγουν τον παράγοντα TNF-α (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, κερατινοκύτταρα, μαστοκύτταρα και ενεργοποιημένα T κύτταρα), καθώς επίσης αδρανοποιεί και τον διαλυτό κυκλοφορούντα παράγοντα TNF-α (Gottlieb et al., 2003). Σημαντικό μειονέκτημα του φαρμάκου είναι ο αυξανόμενος κίνδυνος ευκαιριακών λοιμώξεων και ιδιαίτερα της φυματίωσης. Για το λόγο αυτό, συστήνεται να γίνεται αντίδραση φυματίνης (Mantoux), και ακτινογραφία πριν την έναρξη της θεραπείας για την αποφυγή επανενεργοποίησης μιας προϋπάρχουσας λανθάνουσας φυματίωσης (Fleischmann et al., 2004). Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ταχεία έναρξη δράσης, εμφανή βελτίωση από τη δεύτερη εβδομάδα και μέγιστη βελτίωση των ψωριασικών βλαβών την δέκατη εβδομάδα θεραπείας (Menter et al., 2007).

Το adalimumab είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του TNF-α, στον οποίο και προσδένεται, εμποδίζοντας τον να αλληλεπιδράσει με τους υποδοχείς p55 και p57 της κυτταρικής επιφάνειας (Sharma et al., 2004). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μέτριας προς σοβαρής ψωρίασης, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με μεθοτρεξάτη (Mease et al., 2005). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν, ότι 53-80% των ασθενών που λάμβαναν 40 mg από το φάρμακο εβδομαδιαίως πέτυχαν βελτίωση του PASI κατά 75% ενώ το 14% των ασθενών εμφάνισαν πλήρη κάθαρση (Chem et al., 2004).



### **1.2.5 Ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία για τη ψωρίαση**

Περίπου το 80% των ασθενών με ψωρίαση εμφανίζουν μέτριες προς σοβαρές ψωριασικές βλάβες. Η θεραπεία που ακολουθείται σε κάθε περίπτωση είναι διαφορετική και εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως η ανατομική εντόπιση, η βαρύτητα, η ηλικία και προηγούμενες θεραπείες. Δεν υπάρχει ριζική θεραπεία για την νόσο, υπάρχουν όμως θεραπείες που επιτυγχάνουν τον ικανοποιητικό έλεγχο της ασθένειας. Στη πλειονότητα των ασθενών χορηγούνται τοπικές θεραπείες οι οποίες προσφέρουν αποτελεσματικότητα και ασφάλεια (Menter et al., 2009).. Η μεθοτρεξάτη και η κυκλοσπορίνη χορηγούνται σε ανθεκτικές μορφές της νόσου (ερυθροδερμική και η φλυκταινώδης ψωρίαση) που δεν ανταποκρίνονται σε τοπική θεραπεία ή φωτοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί η φωτοθεραπεία ως μια αποτελεσματική θεραπεία στην ψωρίαση κατά πλάκας και στη σταγονοειδή ψωρίαση, επιτυγχάνοντας πλήρη ύφεση της νόσου στο 85% των ασθενών. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι οι βιολογικοί παράγοντες έχουν πολύ καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα στην ανθεκτική ψωρίαση κατά πλάκας (Griffiths et al., 2000). Οι ασθενείς δεν αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα για την ψωρίαση, ένα φάρμακο μπορεί να είναι αποτελεσματικό ή να προκαλέσει επικίνδυνες παρενέργειες. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να υπάρχει εξατομικευμένη θεραπεία προσαρμοσμένη στο γενετικό προφίλ του κάθε ασθενή. Είναι πολύ λίγες οι φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το ρόλο των πολυμορφισμών που επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα των χορηγούμενων φαρμάκων για την ψωρίαση. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων στην ανταπόκριση των ασθενών στα διάφορα ψωριασικά φάρμακα.

## **2. Φαρμακογενετική**

### **2.1 Εισαγωγή**

Ο τρόπος που ένα φάρμακο εκδηλώνει το θεραπευτικό του αποτέλεσμα καθώς και οι παρενέργειές του διαφέρουν μεταξύ των ασθενών. Μία φαρμακευτική αγωγή, η οποία είναι αποδεδειγμένα αποτελεσματική σε ένα μεγάλο μέρος ασθενών, συχνά δεν επιτυγχάνει το στόχο της σε κάποιους άλλους. Η απόκριση ενός ασθενούς σε κάποια φαρμακευτική ουσία και η αποτελεσματικότητά του για τον συγκεκριμένο ασθενή,

μπορεί να παρουσιάζει μεγάλες επιμέρους διακυμάνσεις, ακόμη και σε άτομα της ίδιας οικογένειας (Wu CY et al., 1995). Η συσχέτιση του γενετικού υπόβαθρου με τη φαρμακολογική απόκριση, τεκμηριώνεται και από το γεγονός ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής ενός φαρμάκου είναι παρόμοιος μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, ποικίλει μεταξύ διζυγωτικών διδύμων και εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ ατόμων του γενικού πληθυσμού (Tsai et al., 2002).

Το φαινόμενο της διαφορετικής απόκρισης των ασθενών σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα έχει παρατηρηθεί από την εποχή του Πυθαγόρα (510π.Χ)(Nebert et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια η πρόοδος της Μοριακής Βιολογίας, της Γενετικής, της Φαρμακολογίας, και η ολοκλήρωση του Προγράμματος Χαρτογράφησης του Γονιδιώματος του Ανθρώπου συνετέλεσαν σημαντικά στην κατανόηση της δράσης των φαρμάκων (Stammer et al., 2005).

Η φαρμακογενετική είναι ένας σχετικά νέος κλάδος της κλινικής φαρμακολογίας, ο οποίος μελετά την επίδραση της γενετικής ποικιλότητας στην απόκριση των ασθενών σε διαφορετικές φαρμακευτικές ουσίες. Απώτερος σκοπός της είναι η εξατομικευμένη αντιμετώπιση της ασθένειας, με την χορήγηση ασφαλέστερων φαρμάκων, στη σωστή δοσολογία, που φέρουν άμεσα αποτελέσματα με λιγότερες παρενέργειες (Ma et al., 2011). Ο όρος φαρμακογενετική πρώτοχρησιμοποιήθηκε από τον γερμανό γενετιστή, F. Vogel το 1959 οποίος περιέγραψε την ύπαρξη γενετικών διαφορών σε σχέση με τη δράση των φαρμάκων (Motulsky et al., 2006). Ο τρόπος δράσης και οι ανεπιθύμητες ενέργειες διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών εξαρτώνται από το σύνολο των γενετικών χαρακτηριστικών που καθορίζουν την φαρμακοδυναμική και τη φαρμακοκινητική τους.

Η φαρμακοδυναμική μελετά τις ενέργειες και το μηχανισμό δράσης του φαρμάκου ενώ η φαρμακοκινητική διερευνά τους μηχανισμούς απορρόφησης, κατανομής μεταβολισμού και απέκκρισης των φαρμακευτικών ουσιών. Μια από τις πρώτες παρατηρήσεις που θεμελίωσε την ύπαρξη σύνδεσης ανάμεσα στο γονότυπο και τη φαρμακολογική απόκριση ήταν ο μεταβολισμός του αντιφυματικού φαρμάκου ισονιαζίδη. Οι ασθενείς που λάμβαναν το φάρμακο διακρίθηκαν σε δύο διαφορετικούς ομάδες με κριτήριο την ταχύτητα απομάκρυνσης του φαρμάκου από τον οργανισμό. Μια μετάλλαξη στο γονίδιο του ηπατικού ένζυμου N-ακετυλάση, καθιστά το ένζυμο λιγότερο αποτελεσματικό, με αποτέλεσμα τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη να ακετυλιώνουν με χαμηλή ταχύτητα την ισονιαζίδη, συνεπώς να επωφελούνται

περισσότερο από τη χορηγούμενη αγωγή και παράλληλα όμως να κινδυνεύουν από νεφροτοξικότητα. Αντίθετα στα άτομα που το φάρμακο μεταβολίζεται ταχύτερα, απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα ενώ υπάρχει κίνδυνος ηπατοξικότητας ( Donald et al., 2004 Kinzig-Schippers et al., 2005).

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί είναι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%. Στην πιο συχνή μορφή τους, οφείλονται στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου σε μία συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία του DNA από ένα άλλο και ονομάζονται πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περισσότερα από 19 εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα και περίπου 60.000 βρίσκονται στην κωδική περιοχή των γονιδίων (Wang et al., 2013). Τα SNPs αποτελούν σημαντικό όπλο στη ανάπτυξη της φαρμακογενετικής και φαρμακογενωμικής λόγω της συχνής τους παρουσίας και ευκολίας στην ανάλυση τους. Χρησιμοποιούνται σε ερευνητικό επίπεδο για τη διερεύνηση γονιδίων τα οποία σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την εξέλιξη μιας νόσου (Sweeny et al., 2004). Οι γονιδιακές μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν τη δράση ορισμένων φαρμάκων, έτσι ώστε να μειώνεται η αποτελεσματικότητά τους ή να γίνονται τοξικά για τον οργανισμό (Roden et al., 2006). Πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε γονίδια που συμμετέχουν στις διαδικασίες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών πιθανώς επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά ενός συγκεκριμένου φαρμάκου. Ειδικότερα, έρευνες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια *CYP3A4*, *CYP3A5* και *ABCB1* επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα πολλών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης και της κυκλοσπορίνης (Llaudo et al., 2013).

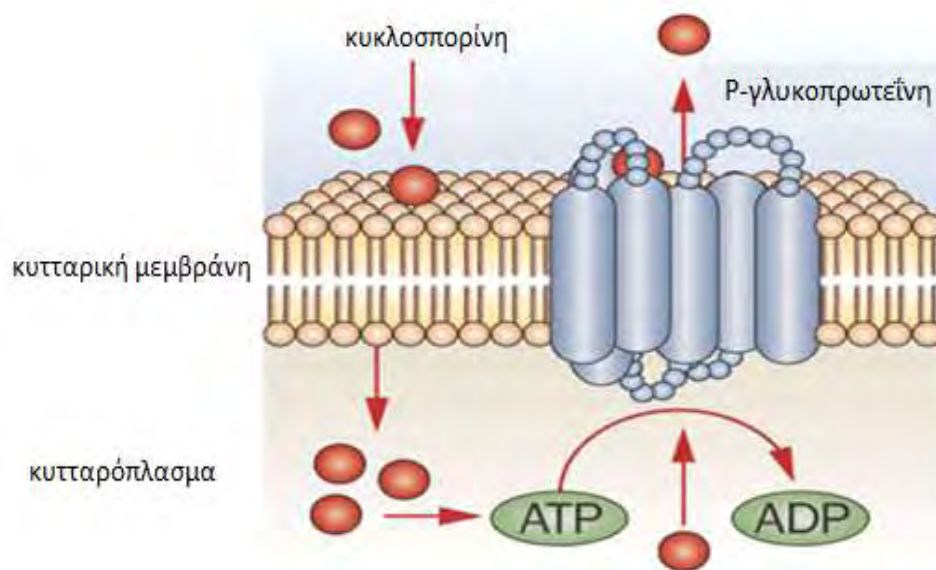
Παρακάτω αναλύεται η P- γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), της οποίας η έκφραση και η λειτουργία πιθανόν να επηρεάζουν την κινητική της κυκλοσπορίνης. Διάφορες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς που τους χορηγείται το φάρμακο, υπέδειξαν το διαφορετικό κλινικό αποτέλεσμα που παρουσίαζαν στην θεραπεία. Οι έρευνες εστιάζονται κυρίως σε τρεις ως επί το πλείστον SNPs του γονιδίου *ABCB1*, τον πολυμορφισμό 3435C>T και τους πολυμορφισμούς 2677G>T και 2677G>A (Kerb et al., 2006).

## 2.2 Γονίδιο ABCB1

Το γονίδιο *ABCB1*, επίσης γνωστό ως MDR1 ή P<sub>gly</sub>1 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών μεταφορέων ABC (ATP binding cassette), μαζί με άλλες 47 πρωτεΐνες, οι οποίες διακρίνονται σε 7 κατηγορίες (A έως G) με βάση της ομοιότητες στην αλληλουχία τους (Borst et al., 2000) είναι μέλος των μεταφορέων του τύπου ABC . Πρόκειται για μεμβρανικό σύστημα μεταφοράς που αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση μορίων του ATP και λειτουργούν σαν διαμεμβρανικοί διάυλοι μεταφοράς. Οι μεταφορείς ABC έχουν μία περιοχή δέσμευσης του ATP (ATP binding domain) και ανάλογα με την πρωτοταγή αλληλουχία και την οργάνωση αυτής κατατάσσονται σε υποοικογένειες (Gottesman et al., 1993). Το γονίδιο *ABCB1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q21.1, και έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 100kb. Το cDNA που προκύπτει από την μεταγραφή του γονιδίου αυτού έχει μήκος περίπου 4,7 kb και περιλαμβάνει 28 εξόνια (Bell et al., 1987).

Η P- γλυκοπρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1*, ανακαλύφθηκε από τους Juliano και Ling το 1976, κατά τη μελέτη λευχαιμικών κυττάρων από χάμστερ που εμφάνιζαν αντίσταση στην κολχικίνη.

Η γλυκοπρωτεΐνη P (P-gp) είναι η πιο ευρέως μελετημένη αντλία εκροής με ενεργητική μεταφορά η οποία λειτουργεί ως κυτταρική αντλία για την έξοδο τοξικών μορίων από το εσωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 2. 9) (Endicott et al., 1989). Εντοπίζεται στη μεμβράνη των κυττάρων και έχει μοριακό βάρος 130-180 KDa ανάλογα με το είδος και τον τύπο των κυττάρων στα οποία βρίσκεται. Φυσιολογικά εκφράζεται στα κύτταρα του ανθρώπου σε χαμηλά επίπεδα, εμφανίζοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων, των νεφρών, του ήπατος, στο φλοιό των επινεφριδίων, στο πάγκρεας, στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (μεταξύ εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού), στον πλακούντα, το ενδομήτριο εγκύων γυναικών (Lankas et al., 1998), στα T και B λεμφοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα (Fromm et al et al., 2004) . Όλες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το ρόλο της P-gp συνηγορούν στο ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και αποβολή κυτταροτοξικών ξενοβιοτικών.



**Εικόνα 2. 9** Η P-γλυκοπρωτεΐνη ενεργώντας ως διαμεμβρανική αντλία εκροής μεταφέρει ξενοβιοτικές ουσίες έξω από το κύτταρο, με την βοήθεια της υδρόλυσης του ATP σε ADP (Cattaneo *et al.*, 2009).

Η P-g αποτελείται από δύο διαμεμβρανικά τμήματα καθένα από τα οποία αποτελείται από έξι υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα και μία περιοχή σύνδεσης του ATP. Η αναγνώριση του υποστρώματος αρκετών φαρμάκων γίνεται εντός των διαμεμβρανικών περιοχών σε πολλαπλές επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης (Ambudkar *et al.*, 2003).

Η P-gp συνδέεται άμεσα με το φαινόμενο της πολυφαρμακευτικής αντίστασης (multidrug resistance), καθώς η υπερεκφρασή της καθιστά τα νεοπλασματικά κύτταρα ανθεκτικά στα διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα (Zaman *et al.*, 1994 Borst *et al.*, 2002). Η P-gp στα νεοπλασματικά κύτταρα που παρουσιάζουν πολυφαρμακευτική αντίσταση ανευρίσκεται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη και τη συσκευή Golgi, και παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης λόγω αυξημένου ρυθμού παραγωγής (Borst *et al.*, 2002 Gottesman *et al.*, 2002).

### 2.3 Πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCB1*

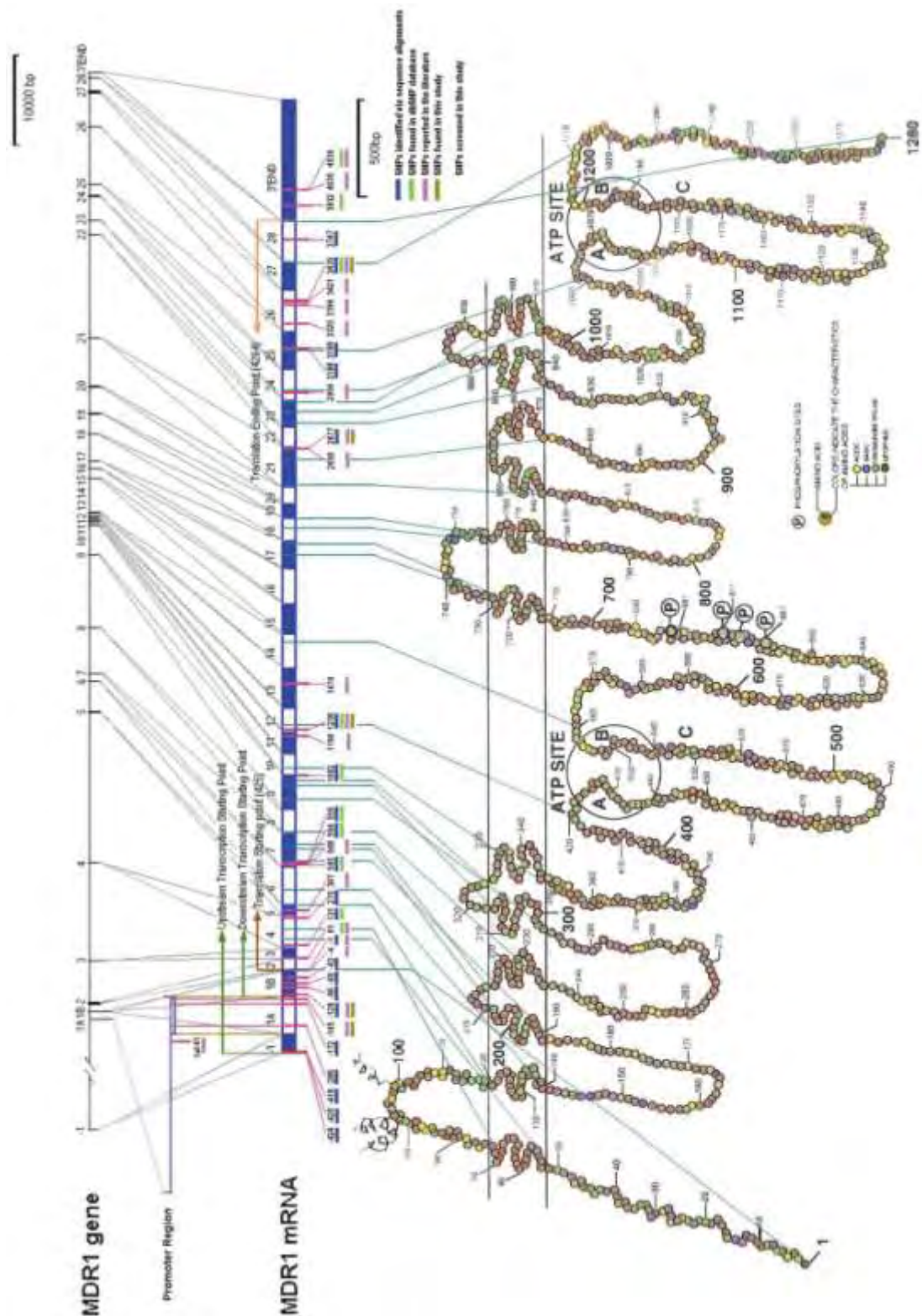
Σύμφωνα με την βάση δεδομένων πολυμορφισμών μόνου νουκλεοτιδίου (dbSNPs) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) έχουν καταγραφεί περίπου 50 SNPs στην κωδική περιοχή του *ABCB1* (Εικόνα 2.10) (Evans and McLeod *et al.*, 2003

Schab et al., 2003 Li YH et al., 2006). Μερικοί πολυμορφισμοί είναι "σιωπηλοί" δηλαδή δεν προκαλούν αμινοξική αντικατάσταση ενώ κάποιιοι άλλοι προκαλούν αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία (Fredericks et al., 2003).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες συσχέτισης των SNPs του γονιδίου *ABCB1*, ορισμένοι απο τους οποίους έχουν συσχετιστοί με διαφορές στην έκφραση του γονιδίου. Οι πιο κοινοί και εκτενώς μελετημένοι SNPs περιλαμβάνουν την σιωπηλή μετάλλαξη 3435 C>T και τους μη-συνώνυμους πολυμορφισμούς 2677G>T (Ala893Ser/Thr) και 2677G>A (Ala893Ser/Thr) (Frank et al., 2010)

Ο πολυμορφισμός C3435T στο εξόνιο 26, αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους πολυμορφισμούς και απαντάται με μεγάλη συχνότητα σε πολλούς πληθυσμούς (Zhou et al., 2008). Ενδεικτικά σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 1280 άτομα από 10 διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο C εντοπίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους Αφρικανούς (84%) σε σχέση με τους Καυκάσιους (48%) και τους Κινέζους (59%) (Ameyaw et al., 2001). Παρά το γεγονός ότι η αντικατάσταση αυτή δεν προκαλεί κάποια αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία, σχετίζεται με αλλαγή της έκφρασης και δομής της P-gp στο δωδεκαδάκτυλο (Hoffmeyer et al., 2000). Σύμφωνα με μελέτες, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της P-gp στο δωδεκαδάκτυλο σε σχέση με αυτούς που φέρουν το αλληλόμορφο C.

Η P-gp διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και απέκκριση του φαρμάκου διγοξίνη, μία καρδιακή γλυκοσίδη που αυξάνει την συσταλτικότητα του μυοκαρδίου. Ασθενείς που τους χορηγείται αυτό το φάρμακο και φέρουν το αλληλόμορφο T, εμφανίζουν 50% υψηλότερα επίπεδα διγοξίνης στο πλάσμα του αίματος και κινδυνεύουν με θανατηφόρες αρρυθμίες (Kerb et al., 2005 Verstfuyft et al., 2003). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για το φάρμακο διγοξίνη παρατηρήθηκε, ότι ασθενείς ομόζυγοι για το T-αλληλόμορφο είχαν μειωμένη έκφραση της Pgp και υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα σε σχέση με τους ομοζυγώτες για το C- αλληλόμορφο (Hoffmeyer et al., 2000).



**Εικόνα 2.10:** Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει τα SNPs της P-gp (μαύροι κύκλοι), τα οποία εντοπίζονται στην κωδική αλληλουχία της. Στο πάνω μέρος, φαίνονται τα 28 εξόνια του γονιδίου *ABCB1*, ενώ η κάθε περιοχή της P-gp που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο εξόνιο αντιστοιχίζεται με μια γραμμή (Ambudkar *et al.*, 2003).

Ο πολυμορφισμός, ο 2677G>T/A έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας πολλών *in vitro* μελετών. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνη, στην θέση 893, από τη σερίνη (Ala893Ser/ Thr) (Mickley et al., 1998). Ο πολυμορφισμός C3435T βρίσκεται σε ανισοροπία σύνδεσης με τον μη συνώνυμο πολυμορφισμό 2677G>T/A στο εξόνιο 21. Αυτή η σύνδεση παρατηρήθηκε στο 60% των Καυκάσιων, στο 13% των Αφροαμερικανών και στο 94% των Ιαπώνων. Καθώς αυτοί οι πολυμορφισμοί συνυπάρχουν, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί αν ο πολυμορφισμός C3435T έχει λειτουργική σημασία ή η συνύπαρξη του με τον 2677G>T/A είναι υπεύθυνη για τις διαφορές στην έκφραση της P-gr. (Kim et al., 2001).

Οι πολυμορφισμοί C3435T, G2677T, C1236T, και T-129C αναλύθηκαν ως προς την συσχέτισή τους με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη στον ελληνικό πληθυσμό. Ο πολυμορφισμός C3435T παρουσίασε συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλομόρφου T αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. (Ιωακείμ Φάσσος Πτυχιακή Εργασία 2012, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Οι πολυμορφισμοί C1236T και G2677T δεν έδειξαν σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην κυκλοσπορίνη. (Ελένη Ντούμου Μεταπτυχιακή εργασία 2012, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Τέλος ο πολυμορφισμός T-129C που εδράζεται στον υποκινητή του γονιδίου *ABCB1* δεν έδειξε συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη (Αικατερίνη Καρρά Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Ο πολυμορφισμός G1199A εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *ABCB1* και οδηγεί σε αντικατάσταση της σερίνης σε ασπαραγίνη στο αμινοξύ 400 (Ser400Asn) στο κυτταροπλασματικό μέρος της πρωτεΐνης (Woodhal et al., 2004). Η συχνότητα εμφάνισής του στην Καυκάσια φυλή είναι 2,5%, στους Αφροαμερικανούς είναι μικρότερη από 1% ενώ δεν εμφανίζεται καθόλου στους Ασιάτες (Kerb et al., 2005). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί για τη συμμετοχή του στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα και εντοπίστηκε συσχέτιση με την αντίσταση στην βινβλαστίνη (vinblastine), τη βινγκριστίνη (vincristine), τη πακλιταξέλη (paclitaxel) και το VP-16 (Erica et al., 2009).



#### 2.4. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα έρευνα έχει σκοπό την μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού G1199A που εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *ABCB1*, με την απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη, στον ελληνικό πληθυσμό. Το γονίδιο *ABCB1* κωδικοποιεί την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) που δρα στην κατανομή της κυκλοσπορίνης στον οργανισμό. Η συγκεκριμένη μελέτη αυτού του πολυμορφισμού σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες στους πολυμορφισμούς C1236T, G2677T και C3435T του γονιδίου *ABCB1* βάζει τις βάσεις για μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού απλότυπου, που θα οδηγήσει σε ένα εξατομικευμένο θεραπευτικό σχήμα για τον κάθε ασθενή.

### 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Συλλογή δειγμάτων

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν 84 ασθενείς από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα με ψωρίαση οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη για τρεις μήνες. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση, βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στη θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του δείκτη PASI. Τα δείγματα, τα οποία προσφέρθηκαν έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς, προέρχονται από την Δερματολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης.

#### 3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτόκολλου επώασης με πρωτεϊνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

#### Αντιδραστήρια

Τα πυκνά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

**20x SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0):** Προσθήκη 175,4 g NaCl και 88,2 gr Sodium citrate σε 1Ltl ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7,0 με σταγόνες HCl.

**3M Sodium Acetate (CH<sub>3</sub>COONa):** Σε 80ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 40,81g οξικό νάτριο. Ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,2 με σταγόνες CH<sub>3</sub>COOH. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O ως τα 100 ml.

**10% SDS:** Προσθήκη 10g SDS σε ddH<sub>2</sub>O και ρύθμιση του όγκου στα 100ml. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7,2 με σταγόνες HCl.

#### Ο ρόλος των αντιδραστηρίων:

**EDTA 0,5M:** χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικός παράγοντας σε δείγματα αίματος. Η δράση του βασίζεται στην δέσμευση ιόντων ασβεστίου που εμπλέκονται στον

μηχανισμό πήξης του αίματος. Το αίμα των ασθενών μετά τη λήψη του διατηρήθηκε σε σωληνάκια falcon των 15ml, τα οποία περιέχουν 0,5ml EDTA 0,5M.

**SSC (saline sodium citrate):** είναι ένα ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα για την απαναιώρηση των ερυθροκυττάρων.

**SDS (δωδεκανικό θειικό νάτριο):** είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο έχει αποδιατακτική δράση. Ως απορρυπαντικό διασπά τις λιπιδικές στιβάδες μειώνοντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να διαλυθούν οι μεμβράνες. Ως αποδιατακτικός παράγοντας, αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών και ταυτόχρονα συντελεί στην κατακρήμνιση των νουκλεοπρωτεϊνών ώστε να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα εξουδετερώνοντας τα θετικά φορτία τους.

**Πρωτεΐνάση K:** είναι μία πρωτεάση σερίνης, η οποία προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών, των ιστόνων και μη ιστόνων και απελευθερώνει το DNA.

**Φαινόλη/ χλωροφθόρμιο :** αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA.

**Ισοπροπανόλη:** για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.

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

### **Διαδικασία**

1. Αρχικά, τα δείγματα αίματος ξεπαγώνουν σε θερμοκρασία δωματίου και ανακινούνται ελαφρά για να γίνουν ομοιογενή. Στη συνέχεια μεταφέρεται 0,5ml δείγματος σε σωλήνα eppendorfs και προστίθενται 1ml 1x SSC. Πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2min.
2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα των κυττάρων 1ml διαλύματος 1x SSC, ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 3min στις 13000 rpm.
3. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 0,5ml CH<sub>3</sub>COONa 0,2M. Ακολουθεί ανάδευση και προσθήκη 50μl SDS 5% και 10μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K συγκέντρωσης 10 ng/μl. Τα δείγματα επωάζονται στους 55° C για 1h, υπό ανάδευση.

4. Αφού προστεθεί 0,5ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης, ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 5min στις 12000rpm.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs και προστίθεται 1ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5min στις 12000rpm.
6. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf, στο οποίο προστίθεται 1ml ισοπροπανόλης και ακολουθεί επώαση για 20 min στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά την επώαση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 min στις 12000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$ , έτσι ώστε να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml κρύας αιθανόλης 70% και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αποξηραίνεται η πελλέτα στους  $55^{\circ}\text{C}$  έως ότου εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
9. προστίθεται 100μl dd H<sub>2</sub>O στο DNA, στη συνέχεια γίνεται ανάδευση και τοποθετείται στους  $55^{\circ}\text{C}$  για 15 min και ολονύκτια στους  $4^{\circ}\text{C}$  έτσι ώστε να γίνει επαναδιάλυση .
10. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση

### **3.3. Ηλεκτροφόρηση DNA - ποιοτικός έλεγχος του DNA**

Για την ανάλυση των προϊόντων της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι τα μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα εξαρτάται από την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, τη συγκέντρωση της αγαρόζης και το μέγεθος των μορίων. Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA χρησιμοποιείται πήκτωμα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης, ενώ για την ανάλυση μικρών μορίων DNA χρησιμοποιείται πήκτωμα με υψηλές συγκεντρώσεις. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ένωσης που παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και φωσφορίζει μετά από διέγερση με υπεριώδη ακτινοβολία.

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Έτσι ταυτοποιείται η ύπαρξη DNA στο δείγμα και η ποιότητά του.

### **Παρασκευή πηκτής:**

- Προσθήκη 40ml TAE 1x και 0,3g αγαρόζη σε κωνική φιάλη.
- Θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Προσθήκη 4μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 1 mg / ml και ανακίνηση.
- Το διάλυμα χύνεται σε ειδικό καλούπι και τοποθετείται ειδικό χτενάκι, έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια, όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα.
- Το διάλυμα αφήνεται μέχρι να πήξει.

### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%**

- Το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία έχουμε γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE.
- Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται αναμεμιγμένα 3μl γενωμικό DNA το οποίο έχει απομονωθεί με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε (30-100 ng/μl) μαζί με 3μl χρωστικής (loading buffer). Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος έγινε ανάμιξη 1ml bromophenol blue 1% w/v με 1ml TBE 10x 100% και προσθήκη ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml..
- Εφαρμόζεται τάση 150V για 15 min περίπου, μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση μέσα στο πήκτωμα.
- Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή UV, όπου παρατηρείται το DNA λόγω της ύπαρξης του βρωμιούχου αιθιδίου.
- Το πήκτωμα φωτογραφίζεται

## **3.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)**

### **Γενικά**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι μια απλή, ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, *in vitro*. Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985, και ο εφευρέτης της ο Dr. K. Mullis τιμήθηκε το 1993 με το βραβείο Nobel. Θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις του 20ού αιώνα, καθώς

αποτέλεσε επανάσταση στο χώρο της μοριακής γενετικής δίνοντας τη δυνατότητα νέων προσεγγίσεων στην ανάλυση των γονιδίων. Πρόκειται για μια αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου (Sambrook J et al., 1989 Mullis et al., 1994). Μία τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται και διαχωρίζεται σε δυο μονόκλιωνα τμήματα με θέρμανση στους 95°C.
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA (annealing). Οι εκκινητές σε περίσσεια υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου με επώαση του δείγματος στους 50 – 65°. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινήτη και την περιεκτικότητα του σε GC και AT.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension) και σύνθεση νέων κλώνων DNA. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι 72°C και εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Οι εκκινητές επιμηκώνονται από μία θερμοανθεκτική πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων και παράγονται δύο συμπληρωματικοί κλώνοι DNA με κατεύθυνση 5' προς 3' χρησιμοποιώντας τους αρχικούς κλώνους ως πρότυπα.

### Συνθήκες PCR

Το μίγμα αντίδρασης που παρασκευάζεται περιέχει ιόντα  $Mg^{++}$ , dNTPs, Taq DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers). Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{++}$  επηρεάζει την ειδικότητα και την ποσότητα του προϊόντος PCR, έτσι ώστε περίσσεια  $Mg^{++}$ , να αυξάνει τον ειδικό πολλαπλασιασμό ενώ έλλειψη να μειώνει την απόδοση της αντίδρασης. Συγκεντρώσεις περίπου στο 1,5mM είναι συνήθως ιδανικές. Τα dNTPs είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση. Τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά το DNA στόχο και λειτουργούν ως σημεία εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων. Τέλος η DNA Taq πολυμεράση (*Thermus aquaticus*) είναι μία θερμοανθεκτική πολυμεράση, με

βέλτιστη θερμοκρασία στους 72<sup>0</sup> C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94<sup>0</sup> C.

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA, Mg<sup>++</sup> και θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών, έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη ενίσχυση του DNA στόχου. Στην PCR ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε 35 φορές. Στους Πίνακες 2.1 και 2.2 παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες, τα συστατικά και οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό G1199A.

### Διαδικασία PCR

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA έχει ως εξής:

1. Παρασκευή μίγματος που αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O, εκκινητές και Taq πολυμεράση σε ποσότητες που περιγράφονται στον Πίνακα 3.1. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν ένα επιπλέον, έτσι ώστε να υπάρχει περίσσεια δείγματος. Ακολουθεί ανάμιξη του δείγματος.
2. Το μίγμα μοιράζεται ισόποσα σε κάθε erpendorf.
3. Στην συνέχεια προστίθεται το DNA από κάθε δείγμα στα erpendorfs και ακολουθεί ανάμιξη.
4. Τοποθετούνται τα erpendorfs στον αυτόματο κυκλοποιητή θερμοκρασίας και πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια που περιγράφονται στον Πίνακα 3.1 και Πίνακα 3.2).

**Πίνακας 3.1:** Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση

Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
DNA	150-200ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X + Mg (1,5 mM)	5μl
MgCl <sub>2</sub> (100mM)	0,25μl
dNTPs (10mM)	1μl

Εκκινητής Forward (50pmol/μl)	1μl
Εκκινητής Reverse (50pmol/μl)	1μl
Ταq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,25μl
dH <sub>2</sub> O	Έως τα 50μl

**Πίνακας 3.2:** Συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1*.

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία / χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 <sup>0</sup> C για 4 min
Αποδιάταξη	95 <sup>0</sup> C για 40 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	59 <sup>0</sup> C για 45sec
Επέκταση	72 <sup>0</sup> C για 45sec

**Πίνακας 3.3:** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *ABCB1*

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος PCR
rs22229109 (1199G>A)	5'-AGA-TCT-ACC-AGG-ACG-AGT3' (Forward)  5'-AGA-TCT-ACC-AGG-ACG-AGT 3' (Reverse)	400bp



### **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%**

Για τον έλεγχο του προϊόντος της PCR, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο 3.3). Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στην συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος

### **3.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για την διερεύνηση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs 22229109 στο γονίδιο *ABCB1*. Κάθε δείγμα DNA που ενισχύθηκε με PCR, υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Acu I*. Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων στο DNA δημιουργώντας τμήματα καθορισμένου μήκους, τα οποία διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση.

Η επιλογή του ενζύμου περιορισμού για την ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού έγινε με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/website>). Με αυτό το τρόπο, επιλέχθηκε το ένζυμο *Acu I*, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία CTGAAG και κόβει 16 νουκλεοτίδια μετά την αναγνωριστική αλληλουχία. Επομένως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει G τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία CTGAAG και κόβει 16 θέσεις μετά το G. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν δύο τμήματα 206 bp και 194 bp. Ενώ αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει A τότε το ένζυμο δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία και το προϊόν της PCR παραμένει άκοπο (400bp).

#### **Διαδικασία RFLP (Πίνακας 3.4)**

1. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν 2μl (~200ng) από το προϊόν PCR.
2. Παρασκευή μίγματος για όλες τις αντιδράσεις πέψεις που περιέχει ddH<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο *Acu I* και μοιράζεται στα δείγματα σε τελικό όγκο 10μl. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας New England Biolands.
3. Εφαρμόζεται ανάμιξη και τα δείγματα επωάζονται στους 37<sup>0</sup> C ολονύκτια

**Πίνακας 3.4:** Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση πέψης

Αντιδραστήρια	Πέψη
προϊόν PCR	2μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 1X NEB4 (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM Dithiothreitol)	1μl
Ένζυμο <i>Acu I</i> (5u/μl)	0,6μl
ddH <sub>2</sub> O	7μl
Τελικός όγκος	10μl

### 3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Μετά την πέψη πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5-500 bp).

#### Διαλύματα:

- **Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:** Παρασκευάζεται με την διάλυση σε ddH<sub>2</sub>O 29 gr ακρυλαμίδης και
  - 1 gr δις ακρυλαμίδης (N,N-Methylene-bis-acrylamide)
  - σε τελικό όγκο 100 ml.
- **10x TBE (890mM Tris, 890mM βορικό οξύ, 20mM EDTA) :**
  - Παρασκευάζεται με την διάλυση 121 g Tris base,
  - 61,7 g βορικού οξέως και
  - 80 ml Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,5 M
  - σε ddH<sub>2</sub>O με τελικό όγκο 2 lt
- **APS 20% :**
  - Παρασκευάζεται με τη διάλυση 2 g Ammonium Persulfate σε ddH<sub>2</sub>O με τελικό όγκο 10 ml

## Λιαδικασία

- Σε ποτήρι ζέσεως των 100ml προστίθενται :
  - 8 gr ουρία
  - 21 ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης 30%
  - 6 ml 10x TBE. Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να διαλυθεί πλήρως η ουρία.
- Το διάλυμα διηθείται, σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος ρυθμίζεται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 65 ml
- Μεταφορά του διαλύματος σε κωνική φιάλη και προσθήκη 65 μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 400 μl APS 20% w/v.
- Τοποθετείται το χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια.
- Το διάλυμα περιχύνεται στην συσκευή όπου και πολυμερίζεται για περίπου 45 min.
- Αφαιρείται το χτενάκι και στη συνέχεια καθαρίζονται προσεχτικά τα πηγαδάκια από υπολείμματα του πηκτώματος.
- Το πήκτωμα που παρασκευάστηκε τοποθετείται σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προστίθεται 1x TBE στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Τοποθετούμε τα προϊόντα της πέψης (10 μl) μαζί με 5 μl loading buffer στα πηγαδάκια. Loading buffer 6X: Bromophenol blue 0,1% w/v, 1X TBE, Γλυκερόλη 8,7%
- Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3h με τάση 250 Volts.

## **Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)**

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι τεχνική για την ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης . Η διακριτική ικανότητα είναι <1,0 ng DNA.

## Διαλύματα

- Διάλυμα 1 (400ml): Προσθήκη 10 ml αιθανόλης 100%, 0,5ml οξικού οξέως 99% και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκο 400ml.

- Διάλυμα 2 (200ml): Προσθήκη 0,2 gr AgNO<sub>3</sub> δείκτης σε 200 ml ddH<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα 3 (200ml) Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 3g υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), 0,02 g βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH<sub>4</sub>), 1 ml φορμαλδεΰδης και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου τα 200 ml.

#### **Διαδικασία:**

- Τα πηκτώματα επωάζονται δύο φορές με το διάλυμα 1 για 3 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί πλύση με απεσταγμένο νερό για 1 min.
- Πραγματοποιείται επώαση υπό ανάδευση με το διάλυμα 2 για 15 min. Ακολουθούν δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό (κάθε πλύση έχει διάρκεια 1 min).
- Τέλος γίνεται επώαση με το διάλυμα 3 υπό ανάδευση έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες του DNA (περίπου 20 min)
- Ακολουθεί παρατήρηση του πηκτώματος σε φως και καταγραφή των αποτελεσμάτων.

### **3.7 Στατιστική ανάλυση**

Η μεταβολή στον δείκτη PASI των ασθενών  $\geq 75\%$  θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη PASI  $\leq 50\%$  υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (Responders) και μη ανταποκριθέντες (Non-responders). Διεξήχθησαν δοκιμές  $\chi^2$  για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για τον πολυμορφισμό G1199A των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 3 μήνες θεραπείας, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας. Κάθε πολυμορφισμός, ο οποίος πέρασε τα κριτήρια του Hardy-Weinberg, μελετήθηκε για συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, χρησιμοποιώντας το Cochran–Armitage trend test καθώς και άλλα tests τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατής δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact test και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p \leq 0.05$ . Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA). Επίσης, τη πραγματοποιήθηκε κατασκευή απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς C3435T, T-

129C, C1236T και G26677T του γονιδίου *ABCBI*, με σκοπό την αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με ψωρίαση. Για την εκτέλεση της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα HapStat.

#### 4. Αποτελέσματα

##### 4.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στη παρούσα έρευνα συμμετείχαν 84 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Η διάγνωση της νόσου, η πορεία της και η ανταπόκριση ή μη ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη βασίστηκε στον δείκτη PASI. Θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη θεωρήθηκε μεταβολή  $\geq 75\%$  του δείκτη PASI, ενώ μεταβολή  $\leq 50\%$  στις τιμές του δείκτη PASI θεωρήθηκε ως μη ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Με αυτό το κριτήριο οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες.

Σε όλους τους ασθενείς μελετήθηκε ο πολυμορφισμός G1199A (rs2229109) του γονιδίου *ABCBI* μέσω γονοτυπικής ανάλυσης, ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Στον πίνακα 4.1 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη.

**Πίνακας 4.1:** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

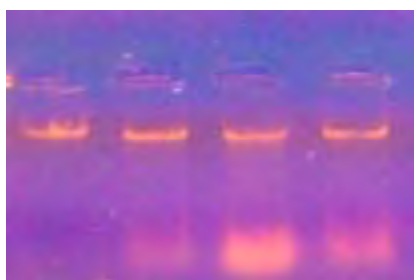
Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	41.23 $\pm$ 15.53
Φύλο Α/Θ	39/45
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	4.3 $\pm$ 1.8
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος $\pm$ ΤΑ*	37.9 $\pm$ 12.5
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	39/84 (46%)
Αρχικό PASI, μέσος $\pm$ ΤΑ*	13.65 $\pm$ 4.76
PASI στους 3 μήνες, μέσος $\pm$ ΤΑ*	3.82 $\pm$ 4.10
Ανταποκριθέντες (PASI $\geq$ 75%), ποσοστό	52 (62%)
Μη-ανταποκριθέντες (PASI<50%), ποσοστό	32 (38%)

\*ΤΑ: Τυπική απόκλιση

Από τον Πίνακα 4.1 φαίνεται ότι από τους 84 ψωριασικούς ασθενείς, οι 39 είναι άντρες και οι 45 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 41 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 37 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 4 έτη. Στο 46% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση και με άλλες ασθένειες, δηλαδή εμφανίζεται συν-νοσηρότητα. Η ανταπόκριση στην θεραπεία (62%) βρίσκεται μέσα στο γενικό εύρος ανταπόκρισης των ασθενών (50-70%) στην κυκλοσπορίνη όπως διαπιστώνεται μέσα από της επίσημες κλινικές μελέτες ( Hodges. et al,2003). Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών (38%) φαίνεται πως δεν παρουσιάζει σημαντική βελτίωση της κλινικής εικόνας μετά από τρίμηνη χορήγηση κυκλοσπορίνης.

#### 4.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

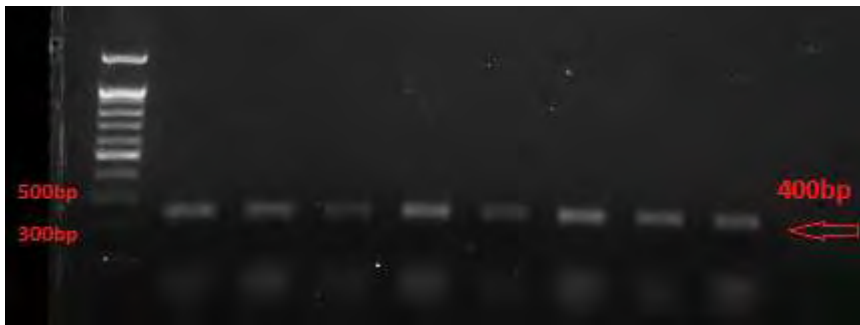
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών. Για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Οι έντονες ζώνες που φαίνονται κάτω από τα πηγαδάκια απεικονίζουν το γενωμικό DNA (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Έλεγχος του απομονωμένου γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

#### 4.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ABCB1* με PCR

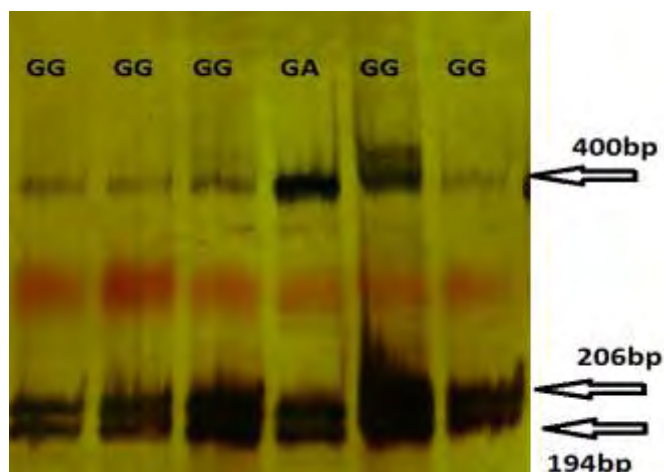
Το τμήμα του γονιδίου *ABCB1*, το οποίο περιέχει το πολυμορφισμό G1199A (rs2229109), ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε είναι 400bp. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και ελέγχθηκε το μέγεθος τους συγκρίνοντας τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών.



**Εικόνα 4.2:** Διαχωρισμός των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης του τμήματος του γονιδίου *ABCBI* που ενισχύθηκε για τον πολυμορφισμό G1199A (rs,2229109 400 bp).

#### 4.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RLFP

Η γονοτύπηση έγινε με τη μέθοδο RLFP. Ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης RLFP φαίνονται στην Εικόνα 4.3 . Στα προϊόντα της PCR έγινε πέψη με το ένζυμο *Acu I*. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδηγεί στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού GG και ετερόζυγων GA. Από αυτή την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο G προκύπτουν δύο τμήματα 206bp και 194bp , ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο A προκύπτει ένα τμήμα 400bp.



**Εικόνα 4.3:** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό G1199A του *ABCBI*

**Πίνακας 4.2:** Γονότυποι ασθενών για τον πολυμορφισμό rs2229109 του γονιδίου *ABCB1*

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1	G/A	47	G/A
2	G/G	48	G/G
3	G/G	50	G/G
4	G/A/	51	G/G
5	G/G	52	G/G
6	G/A	53	G/G
7	G/G	55	G/G
8	G/G	56	G/A
9	G/G	57	G/G
10	G/A	58	G/G
11	G/A	59	G/G
12	G/G	60	G/A
13	G/G	61	G/G
14	G/G	62	G/G
15	G/G	63	G/G
16	G/A	64	G/G
17	G/G	69	G/G
18	G/G	70	G/G
19	G/G	71	G/G
20	G/G	72	G/A
21	G/G	73	G/A
22	G/A	74	G/A
23	G/A	75	G/G
24	G/G	76	G/G
25	G/G	77	G/G
26	G/G	78	G/A
32	G/G	79	G/G
33	G/G	80	G/G



<b>35</b>	<b>G/G</b>	<b>81</b>	<b>G/G</b>
<b>36</b>	<b>G/G</b>	<b>82</b>	<b>G/G</b>
<b>38</b>	<b>G/G</b>	<b>83</b>	<b>G/G</b>
<b>39</b>	<b>G/G</b>	<b>84</b>	<b>G/G</b>
<b>40</b>	<b>G/G</b>	<b>85</b>	<b>G/G</b>
<b>41</b>	<b>G/G</b>	<b>86</b>	<b>G/G</b>
<b>42</b>	<b>G/G</b>	<b>90</b>	<b>G/A</b>
<b>43</b>	<b>G/G</b>	<b>91</b>	<b>G/G</b>
<b>46</b>	<b>G/G</b>	<b>92</b>	<b>G/G</b>

#### 4.5 Στατιστική Ανάλυση

Μετά την συλλογή των αποτελεσμάτων ακολούθησε στατιστική επεξεργασία με το πρόγραμμα SPSS , έτσι ώστε να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση του γονότυπου των ασθενών ή ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου με την ανταπόκριση στην θεραπεία. Ο πολυμορφισμός G1199A βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg στον υπό μελέτη πληθυσμό. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται α) η συχνότητα εμφάνισης του γονότυπου των ασθενών β) η συχνότητα των αλληλομόρφων σε σχέση με την ανταπόκριση στη θεραπεία γ) η υπόθεση ότι το αλληλόμορφο G είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου A είτε τα άτομα είναι ομόζυγα ως προς το G είτε είναι ετερόζυγα δ) η υπόθεση ότι το αλληλόμορφο A είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου G είτε τα άτομα είναι ομόζυγα ως προς το A είτε είναι ετερόζυγα. Τα αποτελέσματα τα στατιστικής ανάλυσης υποδεικνύουν ως μη στατιστικά σημαντική την εμφάνιση του αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού G1199A του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Μη στατιστικά σημαντική είναι και η συσχέτιση του αλληλομόρφου A με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

**Πινάκας 4.3 :** Γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες του πολυμορφισμού σε G1199A σχέση με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες.

Γονίδιο/ Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P	
<b>ABCB1 / G1199A (rs2229109)</b>	<b>Genotypic</b>				
	[GG/GA/AA]	40/12/0	28/4/0	0.785	
	<b>Cochran- Armitage [G/A]</b>	46/6 (0.85)	30/2 (0.93)	0.704	
	<b>Επικρατές</b>	[(GG+GA)/AA]	52/0	32/0	1
	<b>Υπολειπόμενο</b>	[GG/(GA+AA)]	40/12	28/4	0.267

#### 4.6 Κατασκευή απλότυπων για το γονίδιο *ABCB1*

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατασκευή απλότυπων για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *ABCB1* που μελετήθηκαν. Απλότυπος είναι το σύνολο των αλληλομόρφων σ' ένα γενετικό τόπο, τα οποία κληρονομούνται ταυτόχρονα. Στον Πίνακα 4.4 εξετάζεται η συχνότητα των ανταποκριθέντων ή μη ανταποκριθέντων ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη οι οποίοι έχουν έναν από τους τέσσερις απλότυπους για το γονίδιο *ABCB1*. Για κάθε έναν απλότυπο παρουσιάζεται η τιμή P value από τη συσχέτιση της συχνότητας ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων ασθενών. Για τον απλότυπο T-G-C-G-T η τιμή P value είναι στατιστικά σημαντική (Pvalue <0,05) συνεπώς, ότι ο συγκεκριμένος απλότυπος σχετίζεται με την μη ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με ψωρίαση. Ο απλότυπος T-G-C-G-T αντιστοιχεί σε ένα 20% των ασθενών που δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συνδράμουν στη μη ανταπόκριση των ασθενών με τη κυκλοσπορίνη όπως πιθανώς τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 του κυτοχρώματος P450 (CYP) και η κυκλοφιλίνη. Τα ισοένζυμα CYP3A4 , CYP3A5 είναι υπεύθυνα

για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. Πολυμορφισμοί στα αντίστοιχα γονίδια που τα κωδικοποιούν ενδέχεται να επηρεάζουν το μεταβολισμό ή την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Η κυκλοφιλίνη είναι αποτελεί κυτταροπλασματικό υποδοχέα για την κυκλοσπορίνη με την οποία και συνδέεται δημιουργώντας ένα σύμπλοκο για να εισέλθει στο κύτταρο. Αναστολή της δημιουργίας του συγκεκριμένου συμπλόκου συνεπάγεται και αυτόματη αναστολή της δράσης της κυκλοσπορίνης.

**Πίνακας 4.4 :** Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των απλοτύπων με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Οι απλότυποι που μελετήθηκαν και σχετίζονται με το γονίδιο *ABCB1* (T-199C-G1199A-C1236T-G2677T-C3435T). Παρουσιάζονται οι συχνότητες των απλοτύπων για τους ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες. Για την εκτέλεση της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα HapStat. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές φαίνονται με έντονα γράμματα.

Haplotypes	Responders	Non-responders	<i>P</i> values
T-G-C-G-C	0.456	0.390	0.078
T-G-C-G-T	0.115	0.255	<b>&lt;0.001</b>
T-G-T-T-T	0.205	0.215	0.456
T-G-T-G-C	0.09	0.03	0.085
Other	0.134	0.110	0.320

## 5. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του μονοκλεοτιδικού πολυμορφισμού G1199A που εδράζεται στο εξώνιο 11 του γονιδίου *ABCB1*, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Το γονίδιο *ABCB1* κωδικοποιεί την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία παίζει ρόλο στην απορρόφηση και στην κατανομή των φαρμάκων στον οργανισμό. Ο πολυμορφισμός G1199A οδηγεί σε αντικατάσταση της σερίνης σε ασπαραγίνη στο αμινοξύ 400 (Ser400Asn) στο κυτταροπλασματικό μέρος της πρωτεΐνης (Woodhal et al., 2004). Η συχνότητα εμφάνισης του στη καυκάσια φυλή είναι 2,5%, στους Αφροαμερικανούς είναι λιγότερο του 1% και δεν εμφανίζεται καθόλου στους Ασιάτες (Kerb et al., 2005)

Ο πολυμορφισμός G1199A έχει μελετηθεί για τη συμμετοχή του στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Υπήρξε συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε συγκεκριμένα φάρμακα όπως η βινβλαστίνη (vinblastine), η βινγκριστίνη (vincristine), η πακλιταξέλη (paclitaxel) και το VP-16 (Erica et al., 2009). Επίσης, ο πολυμορφισμός G1199A έχει μελετηθεί στα πλαίσια της χορήγησης κυκλοσπορίνης σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε μεταμόσχευση νεφρού. Μεταμοσχευμένοι ασθενείς που έφεραν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό είχαν υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της κυκλοσπορίνης στο αίμα τους.

Αρχικά, έγινε απομόνωση των γενωμικού DNA από τα κύτταρα του περιφερικού αίματος 84 ασθενών με ψωρίαση, στους οποίους χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Οι 39 είναι άντρες και οι 45 είναι γυναίκες επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Το 62% των ασθενών με ψωρίαση ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και το 38% δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Τα ποσοστά ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (50-70% των ασθενών) (Hodges et al., 2003). Από τη στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης για τον πολυμορφισμό G1199A δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ( $P=0,704$ ). Η τιμή  $P$  value είναι στατιστικά σημαντική για τιμές χαμηλότερες του 0,05 ( $Pvalue>0.05$ ). Καθώς το αποτέλεσμα της παρούσας στατιστικής ανάλυσης απέχει σημαντικά από το  $Pvalue>0.05$ , δεν κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη του πολυμορφισμού G1199A σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με ψωρίαση σε σχέση με την ανταπόκριση τους στην κυκλοσπορίνη.

Στο γονίδιο *ABCB1* έχουν μελετηθεί τέσσερις επιπλέον πολυμορφισμοί οι οποίοι συμπεριλαμβάνονται σε μία μεγάλη μελέτη φαρμακογενετικής ανάλυσης πολυμορφισμών του συγκεκριμένου γονιδίου και της θεραπείας με κυκλοσπορίνη που πραγματοποιείται στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι πολυμορφισμοί, C1236T στο εξόνιο 12 (rs1128503) και G2677T στο εξόνιο 21 (rs20325S2) δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ή μεθοτρεξάτη (Ελένη Ντούμου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Μεταπτυχιακή εργασία 2012). Επίσης, ο πολυμορφισμός T-129C που εδράζεται στον υποκινητή του γονιδίου *ABCB* δεν έδειξε συσχέτιση με την

ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη (Αικατερίνη Καρρά, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πτυχιακή εργασία 2013).

Αντίθετα, ο πολυμορφισμός C3435T, παρουσίασε συσχέτιση με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλόμορφου T αυξάνεται στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία (Ιωακείμ Φάσσος Πτυχιακή εργασία 2012, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,). Καθώς ο υπό μελέτη πολυμορφισμός, αποτελεί κομμάτι μίας μεγαλύτερης μελέτης του ABCB1, κατασκευάστηκαν απλότυποι, που ανέδειξαν τη χρήση του απλότυπου T-G-C-G-T των SNPs T-199C-G1199A-C1236T-G2677T-C3435T ως δείκτη πρόβλεψης για την μη ανταπόκριση ασθενών στην κυκλοσπορίνη. Το ποσοστό αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη και άλλων δεικτών που συμβάλλουν στην διαδικασία πρόβλεψης της ανταπόκρισης όπως η κυκλοφιλίνη και το γονίδιο CYP3A.

Η μελέτη του πολυμορφισμού G1199A σε σχέση με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην κυκλοσπορίνη συμπεριλαμβάνεται σε μία μεγαλύτερη μελέτη φαρμακογενετικής ανάλυσης των πολυμορφισμών του γονιδίου και της θεραπείας με κυκλοσπορίνη. Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού απλότυπου για την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη στον ελληνικό πληθυσμό. Κρίνεται αναγκαία η συνέχιση και ή επέκταση της μελέτης σε μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών και με περισσότερους γενετικούς δείκτες με ψωρίαση από όλη την Ελλάδα, που θα οδηγήσει σε ένα εξατομικευμένο θεραπευτικό σχήμα που θα είναι αποτελεσματικό για τον ασθενή, αυξάνοντας τα ποσοστά αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής

## **Βιβλιογραφία**

- 1.Azfar, Rahat S;** Gelfand, Joel M, Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20:41
- 2.Ambudkar SV,** Kim chi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P- glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003, 22:74-68-85
- 3.Ameyaw Margaret-Mary Regateiro,** Fernando; Li, Tao Liu, Xiehe Tariq, Mohammed, Mobarek, Abeer, Thornton, Nadia, Folayan, Gbolahan O., Githang'a, Jessie, Indalo, Anne, Ofori-Adjei, David, Price-Evans, David A, McLeod, Howard L. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity
- 4.Amstutz U,** Froehlich TK, Largiadèr CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. Sep 2011;12(9):1321-36
- 5.Arno G,** Motulsky, Ming Qi, Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *Zhejiang Univ Sci B*. 2006 February; 7(2): 169–170.
- 6.Barker J et al.** Efficacy and safety of infliximab vs. methotrexate in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis:results of an open-label, active controlled, randomized trial. *Br J Dermatol*, 2011; 165(5) 1109-17
- 7.Bell D.R,** J.M. Trent, H.F. Willard, J.R. Riordan, V. Ling, Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences, *Cancer Genet. Cytogenet* 25(1987) 141-148
- 8.Bell LM,** Sedlack R, Beard CM et al. Incidence of psoriasis in Rochester, Minnesota, 1980-83. *Arch Dermatol* 1991;127:1184-7.
- 9.Boer J,** Smeenk G. Effect of short-contact anthralin therapy on ultraviolet B irradiation of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:198-204
- 10.Borst P,** Evers R, Kool M, Wijnhold J. A family of drug transporters. The multidrug-resistance associated proteins. 2000 92;1295-1302  
Borst P and Elferink RO. (2002). *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 537–592.
- 11.Bowcock AM,** Barker JN. Genetics of psoriasis: the potential impact on new therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Aug;49(2 Suppl):S51-6.
- 12.Bowcock AM.** Psoriasis genetics: the way forward. *J. Invest. Dermatol*. 122:xv-xvii (2004)
- 13.Boyd AS,** Morris LF, Phillips CM, Menter MA. Psoriasis and pregnancy:hormone and immune system interaction. *Int J Dermatol* 1996;35:169-72

- 15. Bruner CR**, Feldman SR, Ventrapragada M, Fleischer AB Jr. Dermatol Online J. A systematic review of adverse effects associated with topical treatments for psoriasis. 2003 Feb;9(1):2.
- 16. Chem DM**, Gordon K, Leonardi MD, et al. Adalimumab efficacy and safety in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: Preliminary findings from a 12-week dose-ranging trial, J Am Acad Dermatol 2004;50, and PS 491 ;Ps
- 17. Cornell RC**. Clinical trials of topical corticosteroids in psoriasis: correlations with vasoconstrictor assay. Int J Dermatol 1992; 31(Suppl 1):38-40.
- 18. Coven TR**, Murphy FP, Gilleaudeau P, Cardinale I, Krueger JG. Trimethylpsoralen bath PUVA is a remittive treatment for psoriasis vulgaris. Evidence that epidermal immunocytes are direct therapeutic targets. Arch Dermatol. 1998 Oct;134(10):1263-8.
- 19. Coulthard, S. and Hogarth, L.** 'The thiopurines: an update', Invest New Drugs, 23(6), 523-32(2005).
- 20. Dunna SF**, Finlay AY. Psoriasis: improvement during and worsening after pregnancy. Br J Dermatol. 1989 Apr;120(4):584.
- 21. Duvic M.** Staphylococcal infections and the pruritus of AIDS-related complex. Arch Dermatol. 1987 Dec;123(12):1599.
- 22. Eedy DJ**, Burrows D, Bridges JM, Jones FG BMJ. Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. 1990 Apr 7;300(6729):908.
- 23. Endicott JA**, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 1989, 58: 137-71.
- 24. Ellis CN**, Fradin MS, Messana JM et al. Cyclosporine for plaque-type psoriasis: results of a multidose, double-blind trial. N Engl J Med 1991;324:277-84
- 25. Finlay AY**, Kelly SE. Psoriasis-an index of disability. Clin Exp Dermatol 1987; 12:8-11
- 26. Fleischmann R**, Yocum D. Does safety make a difference in selecting the right TNF antagonist? Arthritis Res Ther 2004; 6 (Suppl 2): 512-518  
Fredericks S, Holt DW. Pharmacogenomics of immunosuppressive drug metabolism. Oncogene 2003; 12:607-13
- 27. Fromm M.F. (2004).** Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers, Trends Pharmacology Sciences 25:423-429

- 28. Gelfand JM.,** Troxel AB., Lewis JD., Kurd SK., Shin DB., Wang X., Margolis DJ., Strom BL. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Archives of Dermatological* 143(12):1493-9.
- 29. Gollnick HP,** Dummer U. Retinoids. *Clin Dermatol* 1997;15:799-810 Department of Dermatology, Mount Sinai School of Medicine, New York University 10029-6574, USA.
- 30. Gordon K, et al.** Long-term efficacy and safety of adalimumab in patients with moderate to severe psoriasis treated continuously over 3 years: Results from an open-label extension study for patients from REVEAL. *L Am Acad Dermatol*, 2011
- 31. Gomaa Mostafa-Hedeab MD,** Maha M. Saber-Ayad MD, MRCP(UK) Inas A. Latif MD. Functional G1199A ABCB1 Polymorphism May Have an Effect on Cyclosporine Blood Concentration in Renal Transplanted Patients *The Journal of Clinical Pharmacology* Volume 53, Issue 8, pages 827–833, August 2013
- 32. Gottesman MM,** Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427
- 33. Gottesman MM,** Fojo T and Bates SE. (2002). *Nat. Rev. Cancer*, 2, 48–58.
- 34. Goules D,** A. Katsampas. Psoriatic Disease: psoriasis and psoriatic arthritis. *Hellenic Rheumatology* 2008, 19(3):192-202
- 35. Griffiths CE,** Clark CM, Chalmers RJ et al. A systemic review of treatments for severe psoriasis. *Health Technol Assess* 2000;4:1-125
- 36. Griffiths C E.,** Christophers E., Barker J. N., Chalmers R. J., Chimenti S., Krueger G. G., Leonardi C., Menter A., Ortonne J. P. and Fry L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology* 156, 258–262
- 37. Gudjonsson JE, et al:** Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 2003;149:530
- 38. Erica L,** Woodhal, Ziping Zang, Tot Bui, Danny D, Shen and Rodney J. Y. Ho. Multidrug Resistance Gene G1199A Polymorphism alters efflux transport activity of G-glycoprotein. 10.1124/jpet.104.065383 *JPET September 2004 vol. 310 no. 3 1199-1207*
- 39. Hellgren L.** Psoriasis. Stockholm, Sweden: Almqvist & Wiksell; 1967
- 40. Henseler T,** Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris *J Am Acad Dermatol* 1985;13:450-6



Hoffmeyer S. O. Burk, O. von Richter, H.P. Arnold, J. Brockmoller, A. John, et al., Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of the allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92(2000) 3473-3478).

**41.Jóhann E Gudajónsson**, Ari Kárason, Arna A Antonsdóttir, E Hjaltey Rúnarsdóttir, Jeffrey R Gulcher, Kári Stefánsson and Helgi Valdimarsson, HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients with Psoriasis Vulgaris have Distinct Clinical Features *Journal of Investigative Dermatology* (2002) 118, 362–365;

**42.Ingolf Cascorbi**, Thomas Gerloff, Andreas John, Christian Meisel, Sven Hoffmeyer, Matthias Schwab, Elke Schaeffeler, Michel Eichelbaum, Ulrich Brinkmann and Ivar Roots .Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects\*Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69, 169-174 (March 2001)

**43.Kang S, Yi S, Griffiths CE, Fancher L, Hamilton TA, Choi JH.** Calcipotriene-induced improvement in psoriasis is associated with reduced interleukin-8 and increased interleukin- 10 levels within lesions. *Br J Dermatol.* 1998 Jan;138(1):77-83.

**44.Kienbaum S, Lehmann P, Ruzika T.** Topical calcipotriol in the treatment of intertriginous psoriasis. *Br J Dermatol* 1996;135:647-50

**45, Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, et al. (2001)** Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70: 189-199.

**46.Lankas R., Wise D., Cartwright E., Pippert T., Umbenhauer R., 1998.** Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive Toxicology* 12:457–463

**47.Larsen FG, Jakobsen P, Knudsen J, Weismann K, Kragballe K, Nielsen-Kudsk F.** Conversion of acitretin etretinate in psoriatic patients is influenced by ethanol. *J Invest Dermatol* 1993;100:623-7

**48.Lavaroni G, Kokelj F, Pauluzzi P, Trevisan G.** The nails in psoriatic arthritis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1994;186:113.

**49.Lazar AP, Roenigk HH Jr.** Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) can exacerbate psoriasis.*J Am Acad Dermatol.* 1988 Jan;18(1 Pt 1):144.

**50.Lebwohl MD** , Menter A, Koo J, Gottlieb AB, Zanolli M, Young M, McClelland P Consensus conference: acitretin in combination with UVB or PUVA in the treatment of psoriasis Find all citations in this journal (default).

Journal of the American Academy of Dermatology[2001 2001, 45(4):544-553]

**51.Lebwohl M**, Berman B, France DS, Addition of short-contract anthralin therapy to an ultraviolet B phototherapy regimen: assessment of efficacy. J Am Acad Dermatol 1985;

**52.Lomholt G.** Psoriasis : Prevalence, Spontaneous Course and Genetics.Copenhagen, Denmark : GEC GAD ; 1963

**53.Lowe NJ**, Phystowsky JH, Bourget T, Edelstein J, Nychay S, Armstrong R. Acitretin plus UVB therapy for psoriasis: comparisons with placebo plus UVB and acitretin alone. J Am Acad Dermatol 1991;24:591-4

**54.Lowes MA**, Bowcock AM et al. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature 2007;445:866-73

**55.Ma Q., Lu A., 2011.** Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine. *Pharmacological Reviews*, 63: 437-459

**56.Mease PJ**, Gladman DD, Ritchlin CT, Ruderman EM, Steinfeld SD, Choy EH, Sharp JT, Ory PA, Perdok RJ, Weinberg MA; Adalimumab Effectiveness in Psoriatic Arthritis Trial Study Group. Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis. Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 52: 2005; 3279-3289

**57.Menter A**, Korman CA et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. J Am Acad Dermatol 2009; 60:643-59

**58.Menter A, et al.** A randomized comparison of continuous vs, intermittent infliximab maintenance regimens over 1 year in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. J Am Acad Dermatol, 2007;56(1):31 e1-15

**59.Menter A.,** Gottlieb A., Steven R., Feldman, Abby S., Van Voorhees, Kenneth B., Gordon, Lebwohl M., John Y.M. Koo, Craig A., Elmets, Neil J. Korman, jKarl R., Beutner, Reva Bhushan. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis : Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the

treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58(5):826–850.

**60.Meola T Jr**, Soter NA, Lim HW. Are topical corticosteroids useful adjunctive therapy for the treatment of psoriasis with ultraviolet radiation? A review of the literature. *Arch Dermatol* 1991;127:1708-13

**61.Montensen L**, Kragballe K, Wegmann E, Schifter S, Risteli J, Charles P. Treatment of psoriasis vulgaris with topical calcipotriol has no short-term effect on calcium or bone metabolism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Acta Derm Venerol* 1993;73:300-4

**62.Moreland LW**, Schiff M, Cohen S, Fleischmann RM, Baumgartner S, Burge D et al. Safety and efficacy of up to 5 years of etanercept therapy in rheumatoid arthritis. Presented at the European League Against Rheumatism 12-15 june 2002

**63.Mrowietz U, K.** Kragballe, K. Reich, et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res.* 2011 January; 303(1): 1–10.

**64.Mourad M**, Wallemacq P, De Meyer M, Malaise J, De Pauw L, Eddour DC, Goffin E, Lerut J, Haufroid V. Biotransformation enzymes and drug transporters pharmacogenetics in relation to immunosuppressive drugs: impact on pharmacokinetics and clinical outcome. 2008 Apr 15;85(7 Suppl):S19-24. doi: 10.1097/TP.0b013e318169c380.

**65.Mullis KB**, Ferre F, Gibbs RA. The polymerase chain reaction. Birkhauser, 1994.

**66.Nestle F, D.** Kaplan and J. Barker. Psoriasis, *N Engl J Med*, 361:496-509, 2009.  
Nevitt GJ, Hutchinson PE. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patient's beliefs and attitudes towards the disease. *Br Dermatol* 1996;135:533-7  
Ortonne JP. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol.* 1996 Oct;135 Suppl 49:1-5

**67.Peters BP**, Weissman FG, Gill MA. *Am J Health Syst Pharm.* Pathophysiology and treatment of psoriasis. 2000 Apr 1;57(7):645-59; quiz 660-1

.Persico M, Persico E, Bakker C et al. Hepatic uptake of organic anions affects the plasma bilirubin level in subjects with Gilbert's syndrome mutations in UGT 1A.Hepatology 2001; 33: 627-32

**68.Rahman P**, J T Elder. Epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis *Ann Rheum Dis* 2005;64:ii37-ii39 doi:10.1136/ard.2004.030775

**69.Rahman P.** and J. Elder. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis, *Ann Rheum Dis*, 64:ii37-ii39, 2005.

**70.Raychaudhuri SP,** Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:16-7  
Roden DM, Altman RB, Benowitz NL, Flockhart DA, Giacomini KM, Johnson JA, Krauss RM, McLeod HL, Ratain MJ, Relling MV, et al. (2006) Pharmacogenomics: challenges and opportunities. *Ann Intern Med* 145:749–757

**71.Richard C.** Trembath<sup>1</sup>, R. Lee Clough<sup>1</sup>, Jane L. Rosbotham<sup>1,2</sup>, Andrew B. Jones<sup>2</sup>, Richard D. R. Camp<sup>1</sup>, Angela Frodsham<sup>1</sup>, Julie Brown<sup>1</sup>, Ruth Barber<sup>1</sup>, Joseph Terwilliger<sup>3,4</sup>, G. Mark Lathrop and Jonathan N. W. N  
Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 1997;6:813-20

**72.Sachidanandam R,** Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, et al. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409:928–933.

**73.U Brikmann,** I Roots, M Eichelhaum. Pharmacogenetics of the human drug–transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Disc Today* 2001; 6:835–839

**74.Sharma P. K.,** Hota D., Pandhi P., Biologics in Rheumatoid Arthritis, *J Assoc Physicians India*, 2004 Mar;52:231-6.

Shbeeb M, Uramoto KM, Gibson LE, O'Fallon WM, Gabriel SE The epidemiology of psoriatic arthritis in Olmsted County, Minnesota, USA, 1982-1991. *J Rheumatol.* 2000 May;27(5):1247-50

**75.Siddiqui A.,** Kerb R., Weale E., Brinkmann U., Smith A., Goldstein B., Wood W., Sisodiya M., 2003. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *New England Journal of Medicine* 15:1442-1448

**76.Speight EL,** Farr PM. Calcipotriol improves the response of psoriasis to PUVA. *Br J Dermatol* 1994;130:79-82

**77.Stammer UM,** Bayerer B, Stuber F. Genetics and variability in opioid response. *Eur J Pain* 2005; 9:101-4

- 78.Stern RS**, Genetical tumors among men with psoriasis exposed to psoralens and ultraviolet A radiation (PUVA) and ultraviolet B radiation. The Photochemotherapy Follow-up Study. *N Engl J Med* 1990;322:1093-7
- 79.Stuart P**, Malick F, Nair RP et al. Analysis of phenotypic variation in psoriasis as a function of age of onset and family history *Arch Dermatol Res* 2002; 294:207-13
- 80.Sweeny BP**, Watson and Crick. 50 years on. From double helix to pharmacogenomics. *Anaesthebia* 2004; 59:150-65
- 81.Tefler NR**, Chamers RJG, Whale K, Colman G. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch. Dermatol*, 1992, 128:39-42
- 82.Tsankov N**, Angelova I, Kazandjieva J. Source Drug-induced psoriasis. Recognition and management Department of Dermatology, Medical University, Sofia, Bulgaria *Am J Clin Dermatol*. 2000 May-Jun;1(3):159-65
- 83.Tsai YJ**, Hoyme HE. Pharmacogenomics: the future of Drug Therapy. *Clin Genet* 2002; 62: 257-64
- 84.Tsoi C Lam et al**. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nature Genetics* 49, 1341-1348(2012) doi:10.1038/ng.2467
- 85.Veal CD**, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, Patel S, Burden D, Tillman D, Barker JN, Trembath RC. Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis susceptibility locus. *Am J Hum Genet*. 2002 Sep;71(3):554-64.
- 86.Weinstein GD**, McCullough JL, Ross PA Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1985 Dec;85(6):579-83.
- 87.Weinstein GD**, Koo JY, Krueger GG, Lebwohl MG, Lowe NJ, Menter MA, et al. Tazarotene cream in the treatment of psoriasis: two multicenter, double-blind, randomized, vehicle-controlled studies of the safety and efficacy of tazarotene creams 0.05% and 0.1% applied once daily for 12 weeks. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48:760–767
- 88.Wilson FC**, Icen M, Crowson CS, et al . Incidence and clinical predictors of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: a population-based study. *Arthritis Rheum*. 2009;61:233-9
- 89.Winterfield LS**, Menter A. Influximab. *Dermatol Ther* 2004; 17:409-426

**90. Winterfield LS**, Menter A, K Gordon, Gottlieb A. Psoriasis treatment: current and emerging directed therapies. *Ann Rheum Dis* 2005;64:87-90

Woodhal El, Yang Z, Bui T, et al. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport of G-glycoprotein. *J Pharmacol Exp. Ther* 2004;310:1199-1207

**91. Wozel G**, Klein E, Mrowietz U, et al. Scalp psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges. Transpl Int.* 2013 Feb;26(2):177-86. doi: 10.1111/tri.12018. Epub 2012 Dec 7.

Llaudó I, Colom H, Giménez-Bonafé P, Torras J, Caldés A, Sarrias M, Cruzado JM, Oppenheimer F, Sánchez-Plumed J, Gentil MÁ, Ekberg H, Grinyó JM, Lloberas N. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. 2011;9:70-4

**92. Wu CY**, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY, Wachter VJ. Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58:492-7.

**93. Zachariae H**, Zachariae R, Blomqvist K, Davidsson S, Molin L, Mørk C, Sigurgeirsson B. .Quality of life and prevalence of arthritis reported by 5,795 members of the Nordic Psoriasis Associations. Data from the Nordic Quality of Life Study. *Acta\_Derm Venereol.* 2002;82(2):108-13 Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Apr;60(4):643-59.

**94. Zanolli M**. Phototherapy arsenal in the treatment of psoriasis. *Dermatol Clin* 2004; 22:397-406 Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, Lai X, Wang JC, Li , Tian M, et al. (2008) Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab* 9:738–784

**95. Zukic, B.**, Radmilovic, M., Stojiljkovic, M., Tomic, N., Pourfarzad, F., Dokmanovic, L., Janic, D., Colovic, N., Philipsen, S., Patrinos, G. P. and Pavlovic, S. (2010) 'Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription', *Pharmacogenomics*, 11(4), 547-557

