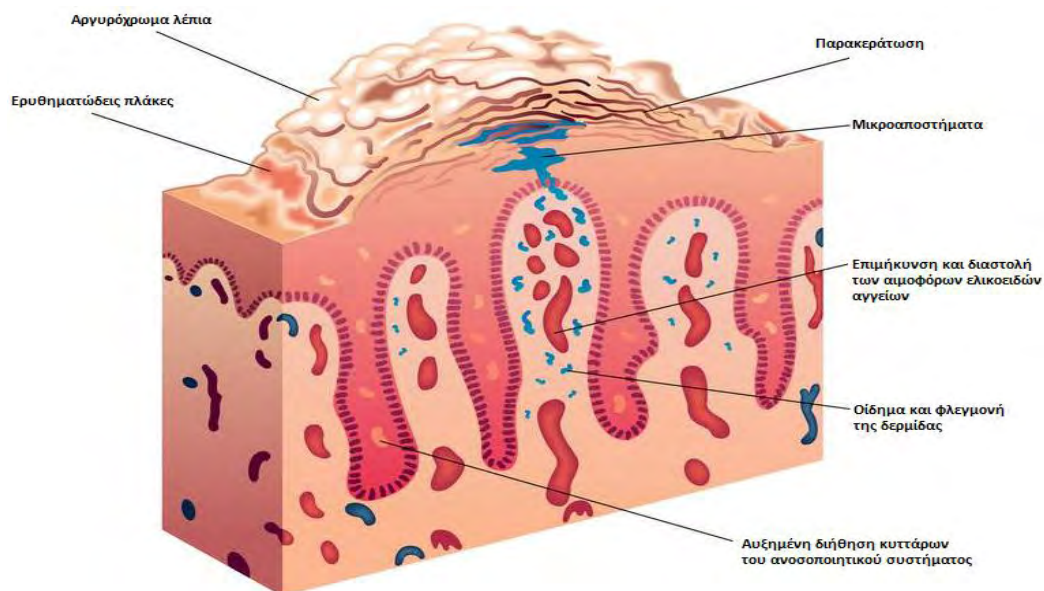




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

ΘΕΜΑ:

Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης του υποδοχέα FcγRIIIA με την ανταπόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες αντι-TNFα



Παπαδοπούλου Δέσποινα  
2014

Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης του υποδοχέα FcγRIIIA με την ανταπόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες αντι-TNFα.

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

## Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

### **Σαραφίδου Θεολογία,**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας  
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Μαμούρης Ζήσης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Ζαφειρίου Ευτέρπη**

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σαραφίδου Θεολογία, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για το χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για τη συνεχή βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση, για τη συνεργασία του καθώς και την κ. Ζαφειρίου Ευτέρπη, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Σαρρή για την πολύτιμη βοήθεια της, τις χρήσιμες συμβουλές και την υπομονή της.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT.....	8
1. Εισαγωγή .....	9
1.1 Ψωρίαση .....	9
1.1.1 Επιδημιολογία της ψωρίασης .....	9
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης .....	9
1.1.3 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης.....	12
1.1.4 Ιστολογικά χαρακτηριστικά .....	13
1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση.....	14
1.1.5.1 Γενετικοί παράγοντες.....	14
1.1.5.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	16
1.1.6 Ανοσοπαθγένεια της ψωρίασης .....	16
1.1.7 Ο ρόλος του TNF-α στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης.....	20
1.2 Θεραπεία της ψωρίασης .....	20
1.2.1 Τοπική θεραπεία .....	20
1.2.2 Φωτοθεραπεία.....	22
1.2.3 Συστηματική θεραπεία.....	22
1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες .....	23
1.3 Οι υποδοχείς Fc.....	26
1.3.1 Οι υποδοχείς Fcγ.....	26
1.3.2 Ο υποδοχέας FcγIIIa .....	28
1.3.3 Πολυμορφισμοί των υποδοχέων Fcγ.....	30
1.4 Φαρμακογενετική.....	31
1.4.1 Φαρμακογενετική μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση.....	31
1.5 Σκοπός .....	34
Υλικά και μέθοδοι .....	35
2.1 Αιμοληψία.....	35
2.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος .....	35
2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38

2.5 Σχεδίαση εκκινητών.....	40
2.6 Αλληλούχηση (Sequencing) .....	43
2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	43
3. Αποτελέσματα .....	44
3.1 Ασθενείς .....	44
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	45
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	45
3.4 Αλληλούχηση.....	46
3.5 Γονοτύπηση.....	47
3.6 Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs396991 στο FcγRIIIA με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία.....	48
4. Συζήτηση .....	51
Βιβλιογραφία .....	53

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που επηρεάζει 1-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Αυτή η νόσος χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η ακριβής αιτία πρόκλησης παραμένει άγνωστη. Ένας συνδυασμός παραγόντων, όπως η γενετική προδιάθεση, περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς επίσης και το ανοσοποιητικό σύστημα, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο. Δεν υπάρχει ριζική θεραπεία για την ψωρίαση, αλλά θεραπευτικές στρατηγικές που συμβάλλουν στον περιορισμό των δερματικών αλλοιώσεων. Οι βιολογικοί παράγοντες αντι-TNF αποτελούν μία σημαντική θεραπευτική στρατηγική για τους ψωριασικούς ασθενείς. Είναι μονοκλωνικά αντισώματα που δεσμεύουν την κυτταροκίνη TNF- $\alpha$  και διαθέτουν το τμήμα Fc των αντισωμάτων που προσδένεται στους υποδοχείς Fc $\gamma$ . Με τον τρόπο αυτό εμποδίζουν την μεταγωγή σήματος που ενεργοποιεί ο TNF- $\alpha$ , ο οποίος αποτελεί βασική κυτταροκίνη των ανοσοαποκρίσεων.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση της ανάλυσης συσχέτισης του SNP rs396991 (519 G> T) του γονιδίου Fc $\gamma$ RIIIA με την απόκριση σε αντι-TNF παράγοντες. Αυτός ο πολυμορφισμός οδηγεί σε υποκατάσταση αμινοξέος στη θέση 158 από βαλίνη (V) σε φαινυλαλανίνη (F). Αυτή η υποκατάσταση έχει λειτουργική επίδραση, καθώς βρίσκεται στην δεύτερη εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα που δεσμεύει την περιοχή Fc της IgG, με την παρουσία της βαλίνης να επάγει τον σχηματισμό πιο ισχυρής και αποτελεσματικής αλληλεπίδρασης με την IgG.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ψωρίαση (n = 65) που έλαβαν αντι-TNF θεραπεία για 6 μήνες και τα δείγματα ελήφθησαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και το Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης.

Η στατιστική ανάλυση του πολυμορφισμού rs396991, έδειξε μια σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου G με απόκριση σε θεραπεία με όλους τους αντι-TNF παράγοντες (P=0,0035, Odds Ratio=3.857), καθώς και επικρατή δράση του αλληλομόρφου G (P=0,0073), που είναι σύμφωνη με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν Enbrel (n=39), έδειξε ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου G και των ανταποκριθέντων (P=0,0036), ενώ η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν Remicade ή Humira (n=26) δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

## ABSTRACT

Psoriasis is a chronic, inflammatory, skin disorder that affects 1-3% of the world's population. This disease is characterized by excessive growth and aberrant differentiation of keratinocytes. The exact cause remains unknown. There may be a combination of factors, including genetic predisposition and environmental factors. The immune system is, also, thought to play a major role. There is no cure for psoriasis, but treatment will usually help keep the condition under control. Anti-TNF therapeutic strategy for psoriasis includes monoclonal antibodies (infliximab, etanercept, and adalimumab), that bind to TNF- $\alpha$  and to Fc $\gamma$  receptors with their Fc region.

The aim of this study is to investigate the association analysis between the SNP rs396991 (519 G>T) of Fc $\gamma$ RIIIA gene and the response to treatment with anti-TNF agents. This polymorphism leads to an amino acid substitution at position 158 from valine (V) to phenylalanine (F). This substitution has functional impact, as it is located in the second extracellular region of the receptor that binds the Fc region of IgG, with the presence of valine, forming a stronger and more effective interaction with IgG.

This analysis was performed on psoriatic patients (n=65) who received anti-TNF therapy for 6 months and samples were obtained from the University Hospital of Larissa and the Papageorgiou Hospital of Thessaloniki.

The statistical analysis of the rs396991 polymorphism, showed a significant association of the allele G in response to treatment with all anti-TNF agents (P=0,0035, Odds Ratio=3.857) and dominant action of the allele G (P=0,0073), that is consistent with the current bibliography. The association analysis for patients who received Enbrel (n=39) showed that there was significant association between the allele G and responders (P=0,0036), while the analysis for patients who received Remicade or Humira (n=26), showed no statistically significant association, probably due to the small number of samples.



# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, αυτοάνοση ασθένεια που επηρεάζει το δέρμα και τις αρθρώσεις και προκαλείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόκειται για μια φλεγμονώδη δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η διέγερση της απόκρισης των κερατινοκυττάρων οφείλεται στην απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα T-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, αρκετές κυτταροκίνες και κάποιες χημειοκίνες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου (Lowes et al, 2007). Παρόλο που η ακριβής αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη, είναι ευρέως αποδεκτό, πως αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή στην οποία εμπλέκεται η γενετική προδιάθεση, αλλά και ανοσολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (Hani et al, 2013).

### 1.1.1 Επιδημιολογία της νόσου

Η ψωρίαση προσβάλλει περίπου το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά η συχνότητα εμφάνισής της ποικίλλει σημαντικά. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι υψηλότερη στην Βόρεια Ευρώπη, και ειδικότερα στις σκανδιναβικές χώρες υπολογίζεται περίπου στο 3% του πληθυσμού. Αντίθετα, στη Βόρεια Αμερική και το Ηνωμένο Βασίλειο η συχνότητα είναι περίπου 2%, ενώ στην Ιαπωνία τα επίπεδα εμφάνισης είναι αρκετά χαμηλά κοντά στο 0,2% του πληθυσμού (Langley et al, 2005). Η ψωρίαση υπολογίζεται ότι αφορά σε πάνω από 3% του πληθυσμού στην Ελλάδα (Κοσμαδάκη και συν, 2007).

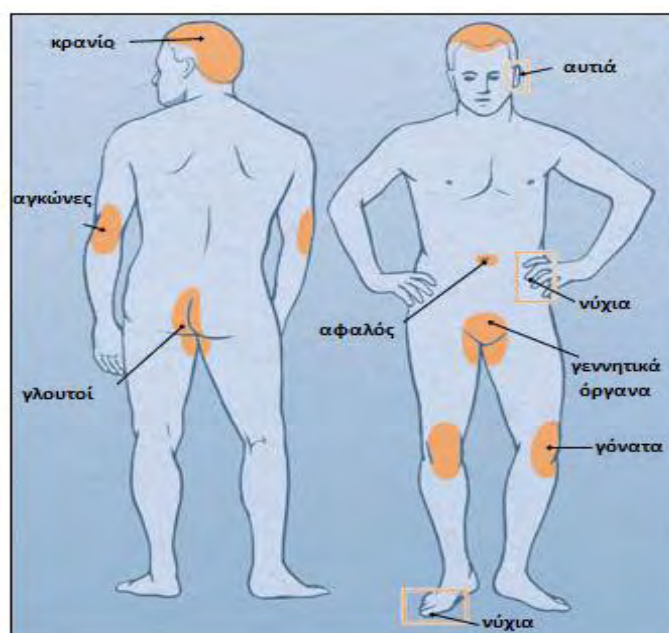
Η μέση ηλικία έναρξης για την πρώτη εμφάνιση της νόσου κυμαίνεται από την ηλικία των 15 έως 20 ετών. Ακολουθεί μια δεύτερη περίοδος, όπου παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης της ασθένειας σε άτομα κοντά στην ηλικία των 55 με 60 χρόνων. Βάσει της κλινικής εμφάνισης της ψωρίασης και της ηλικία έναρξης, η ψωρίαση διακρίνεται σε δυο τύπους, τον I και τον II (Langley et al, 2005). Ο τύπος I, που είναι ο συχνότερος (αντιστοιχεί σε περισσότερο από το 75% των περιπτώσεων), εμφανίζεται σε εφήβους και ενήλικες 16-22 ετών, σχετίζεται με υψηλές τιμές των δεικτών του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA ενώ ο τύπος II, εμφανίζεται σε άτομα 57-60 ετών και συνδυάζεται με χαμηλές τιμές των δεικτών HLA (Henseler et al, 1985).

### 1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια δερματική νόσος με μεταβλητή μορφολογία, κατανομή, σοβαρότητα και αιτία. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ερυθρηματολεπιδωδών βλατίδων

οι οποίες έχουν διάμετρο μικρότερη του ενός εκατοστού (<1 cm) και από την κλιμακωτή αύξηση των βλατίδων που οδηγεί στην δημιουργία ερυθρηματωδών πλακών, οι οποίες καλύπτονται από αργυρόχρωμα λέπια και έχουν διάμετρο μεγαλύτερη του ενός εκατοστού (1-10cm) (Zangeneh et al, 2013). Οι πλάκες συνήθως περιβάλλονται από ένα λευκό δακτύλιο, γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff (Griffiths et al, 2007).

Η ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε περιοχή του δέρματος και το ποσοστό επιφάνειας του σώματος που προσβάλλεται, διαφέρει κάθε φορά. Οι αλλοιώσεις συνήθως διανέμονται στο κρανίο και κυρίως στο τριχωτό της κεφαλής, στην μέση, στους αγκώνες, στα γόνατα και γενικότερα στις πτυχώσεις του σώματος, στα γεννητικά όργανα και στα νύχια (Εικόνα 1) (Zangeneh et al, 2013).



**Εικόνα 1:** Εμφάνιση της ψωρίασης στις διάφορες περιοχές του σώματος (προσαρμογή από Pardasani et al, 2000).

Η ψωρίαση μπορεί να εμφανίζεται ως μια χρόνια και σταθερή κατάσταση ή μπορεί να παρουσιάσει ξαφνική και ταχεία εξέλιξη. Η νόσος αυτή είναι συνήθως ασυμπτωματική, όμως παρατηρούνται και περιπτώσεις όπου οι ασθενείς αναφέρουν έντονο κνησμό ή κάψιμο (Langley et al, 2005).

Οι διάφοροι τύποι και μορφές της ψωρίασης είναι έξι και διαχωρίζονται σύμφωνα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά:

1. Η «κοινή» ψωρίαση ή ψωρίαση κατά πλάκας
2. Η σταγονοειδής ψωρίαση
3. Η ανάστροφη ψωρίαση
4. Η φλυκταινώδης ψωρίαση
5. Η ερυθροδερμική ψωρίαση
6. Η ψωριασική αρθρίτιδα

Η συχνότερη μορφή της ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας ή ψωρίαση Vulgaris (Εικόνα 2.α), που έχει παρατηρηθεί σε περισσότερο από το 80% των ασθενών. Στην κοινή ψωρίαση, οι ψωριασικές πλάκες έχουν ερυθρό χρώμα και ξεχωρίζουν από το φυσιολογικό δέρμα. Είναι στρογγυλές ή ωοειδείς και στην επιφάνεια τους καλύπτονται από αργυρόχρωμα λέπια. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν από λίγες μεμονωμένες πλάκες έως και πολυάριθμες αλλοιώσεις που καλύπτουν σχεδόν ολόκληρη την επιφάνεια του σώματος. Κατά την έξαρση της νόσου μικρότερες πλάκες ή βλατίδες μπορεί να συνενώνονται, δημιουργώντας εντονότερες αλλοιώσεις. Οι ψωριασικές πλάκες εντοπίζονται συχνότερα στο τριχωτό της κεφαλής, στον κορμό, στους γλουτούς και στα άκρα (κυρίως στους αγκώνες και στα γόνατα) (Menter et al, 2008).

Η σταγονοειδής ψωρίαση (Εικόνα 2.β), είναι μια μορφή της ασθένειας, που συχνά ξεκινά κατά την παιδική ηλικία ή στα πρώτα στάδια της ενηλικίωσης. Αυτή είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή της ψωρίασης, μετά την ψωρίαση κατά πλάκας. Περίπου το 10 % των ασθενών αναπτύσσουν σταγονοειδή ψωρίαση. Η μορφή αυτή χαρακτηρίζεται από εκατοντάδες ερυθματολεπιδώδης βλατίδες, πολύ μικρού μεγέθους, οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφανείας του σώματος. Σε αυτόν τον τύπο ψωρίασης, οι αλλοιώσεις εμφανίζονται συνήθως στον κορμό και στα άκρα και κάποιες φορές στο τριχωτό της κεφαλής, το πρόσωπο και τα αυτιά (National Psoriasis Foundation, 2014).

Η ανάστροφη ή καμπτική ψωρίαση (Εικόνα 2.γ), εμφανίζεται σε πτυχωτές περιοχές του σώματος (π.χ. μασχालιά περιοχή, βουβωνική χώρα, περιοχή κάτω από τους μαστούς, περιοχή των γεννητικών οργάνων και γλουτιαία περιοχή). Μορφολογικά διακρίνεται από τις βλάβες της κοινής ψωρίασης, καθώς στην περίπτωση της καμπτικής ψωρίασης, οι πλάκες δεν καλύπτονται από τα χαρακτηριστικά ξηρά λέπια και είναι υγρές λόγω του ανατομικού τους εντοπισμού (National Psoriasis Foundation, 2014).

Η φλυκταινώδης ψωρίαση (Εικόνα 2.δ), θεωρείται ιδιαίτερα σπάνια και έχει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους ενήλικες από ότι στα παιδιά. Οι αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από φλύκταινες, δηλαδή φυσαλίδες που περιέχουν πύον και περιβάλλονται από ερυθρό δέρμα (Menter et al, 2008). Αυτή η μορφή της ψωρίασης μπορεί, είτε να περιορίζεται σε ορισμένες περιοχές του σώματος, όπως οι παλάμες και τα πέλματα (εντοπισμένη φλυκταινώδης ψωρίαση), είτε να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του σώματος (γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση) (National Psoriasis Foundation, 2014).

Η ερυθροδερμική ψωρίαση (Εικόνα 2.ε), χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πολλαπλών ερυθματολεπιδωδών πλακών οι οποίες καλύπτουν ολόκληρη την επιφάνεια του σώματος. Το εξάνθημα εμφανίζει ένα βαθύ ερυθρό χρώμα με ποικίλου βαθμού απολέπιση. Η μορφή αυτή της νόσου μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Συνήθως όμως οφείλεται σε επιδείνωση των υπολοίπων μορφών, και ιδίως της ψωρίασης κατά πλάκας (Zangeneh et al, 2013). Κατά την ερυθροδερμική ψωρίαση παρατηρούνται διάφορες συστηματικές διαταραχές. Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η απώλεια της θερμορυθμιστικής ικανότητας του δέρματος, γεγονός που οδηγεί σε υποθερμία. Επιπλέον παρατηρείται νεφρική και καρδιακή ανεπάρκεια και μεταβολικές αλλαγές, περιλαμβανομένης της αναιμίας, που οφείλεται στην απώλεια του σιδήρου (Langley et al, 2005).

Η ψωριασική αρθρίτιδα (Εικόνα 2.στ), είναι μια μορφή φλεγμονώδους, χρόνιας αρθρίτιδας, η οποία προσβάλλει κυρίως τις αρθρώσεις των άνω και κάτω άκρων, την σπονδυλική στήλη αλλά και το δέρμα. Η προσβολή των οστών και των αρθρώσεων παρατηρείται σε ποσοστό 7-15% σε ψωριασικούς ασθενείς και 0,1-0,25% στον γενικό πληθυσμό (Zangeneh et al, 2013). Η νόσος προσβάλλει σε ίση συχνότητα τόσο άντρες όσο και γυναίκες, περίπου 7-10 χρόνια μετά την εμφάνιση ψωρίασης (Kimball et al, 2008). Τυπικά κλινικά ευρήματα της ασθένειας είναι: οίδημα, ερύθημα, άλγος και περιορισμός της κινητικότητας των αρθρώσεων (Langley et al. 2005). Η ψωριασική αρθρίτιδα ανήκει στην κατηγορία των σπονδυλοαρθροπαθειών και διακρίνεται από τις άλλες μορφές της φλεγμονώδους αρθρίτιδας, κυρίως λόγω της δερματικής πάθησης που προκαλεί (Zangeneh et al, 2013).



Εικόνα 2: Οι τύποι ψωρίασης: α) ψωρίαση κατά πλάκας, β) σταγονοειδής ψωρίαση, γ) ανάστροφη ψωρίαση, δ) φλυκταινώδης ψωρίαση, ε) ερυθροδερμική ψωρίαση, στ) ψωριασική αρθρίτιδα (Roberson et al, 2010).

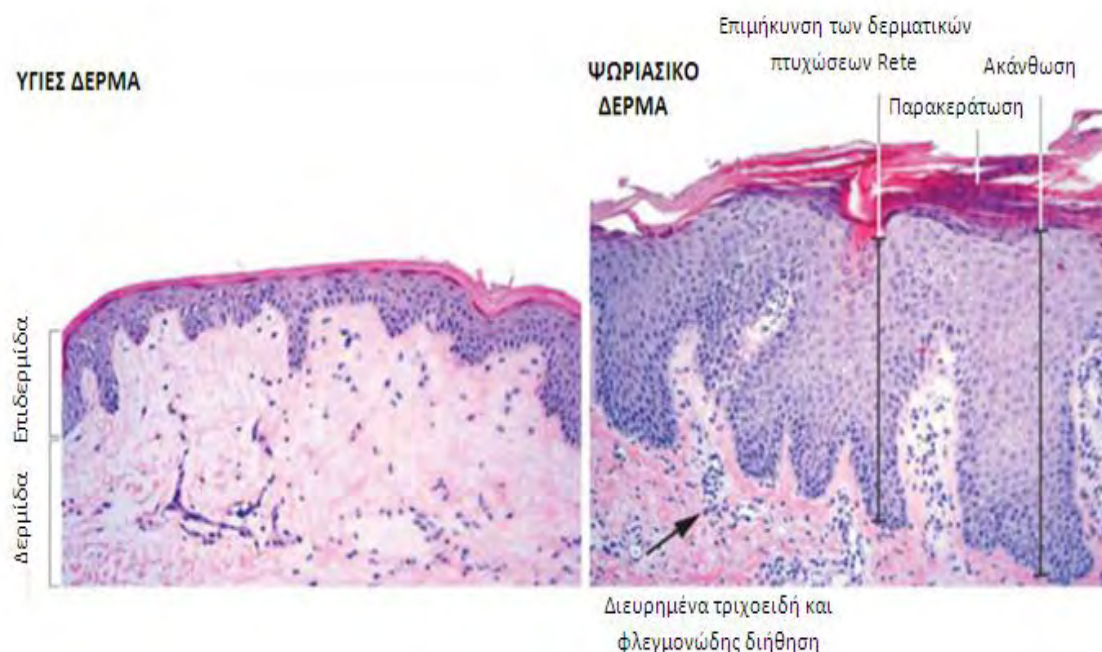
### 1.1.3 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης

Ο κλινικός δείκτης PASI (Psoriasis Area and Severity Index) είναι μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος αξιολόγησης της βαρύτητας της ψωρίασης. Ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται κυρίως σε κλινικές δοκιμές, που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Ο PASI εκτιμά την σοβαρότητα της νόσου αξιολογώντας την έκταση, το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών και παίρνει τιμές από 0 έως 72. Ο δείκτης PASI υπολογίζεται πριν, κατά την διάρκεια, και μετά το τέλος μίας θεραπείας, για να καθορίσει την ανταπόκριση των ψωριασικών αλλοιώσεων στη δοκιμαστική θεραπεία. Μία μείωση της βαθμολογίας του PASI, και ειδικότερα μια βελτίωση

75% του PASI (PASI 75), αποτελεί ένδειξη αποτελεσματικότητας του φαρμάκου σε κλινικές δοκιμές που πραγματοποιούνται σε ψωριασικούς ασθενείς (Menter et al, 2008).

#### 1.1.4 Ιστολογικά χαρακτηριστικά

Η ιστολογική εικόνα μιας τυπικής ψωριασικής δερματικής βλάβης ποικίλλει αναλόγως της μορφής, της ηλικίας και της εντόπισης της εξεταζόμενης βλάβης. Σε μια πλήρως ανεπτυγμένη ψωριασική πλάκα, εμφανίζονται κάποιες χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Αρχικά, παρατηρείται επιμήκυνση και διαστολή των αιμοφόρων ελικοειδών αγγείων του θηλώδους χορίου, που οδηγεί σε εμφάνιση ερυθρότητας στο δέρμα και σε αυξημένη περιαγγειακή φλεγμονώδη διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, (κυρίως Τ-λεμφοκυττάρων) (Εικόνα 3, βέλος). Επιπλέον, μέσω αυτών των διευρυμένων αγγείων, πολυμορφοπυρήνα ουδετερόφιλα φτάνουν στην επιδερμίδα δημιουργώντας μικρά αποστήματα στην κεράτινη στοιβάδα, γνωστά ως μικροαποστήματα Munro, αλλά και στην υπερθηλαία μοίρα της επιδερμίδας δημιουργώντας μικρά σπογγοειδή φλυκταινίδια (φλυκταινίδια του Kogoj). Στην συνέχεια, παρατηρείται υπερπλασία της επιδερμίδας, λόγω της ταχείας ωρίμανσης των κερατινοκυττάρων και της διατήρησης των πυρήνων τους στην κεράτινη στοιβάδα (παρακεράτωση). Αυτό το φαινόμενο οδηγεί στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών αργυρόχρωων λεπιών που βρίσκονται στις πλάκες της ψωρίασης. Στην επιδερμίδα, επιπλέον, σημειώνεται έντονη πάχυνση (ακάνθωση) και επιμήκυνση των ραβδώσεων Rete των δερματικών πτυχώσεων, που είναι επιδερμικές πυκνώσεις, οι οποίες εκτείνονται κάθετα στο θηλώδες χόριο (Εικόνα 3) (Wagner et al, 2010).



Εικόνα 3: Απεικόνιση των κύριων ιστολογικών ευρημάτων στην ψωρίαση: πάχυνση της επιδερμίδα (ακάνθωση), επιμήκυνση των ραβδώσεων Rete των δερματικών πτυχώσεων, διευρυμένα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία και επακόλουθη φλεγμονώδη διήθηση Τ-λεμφοκυττάρων, παρακεράτωση (προσαρμογή από Wagner et al, 2010).

### 1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα συμβάλουν στην εκδήλωση της νόσου, σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η υπερβολική ενεργοποίηση και ο ανεπαρκής έλεγχος της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης στο δέρμα, οδηγεί σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων.

#### 1.1.5.1 Γενετικοί παράγοντες

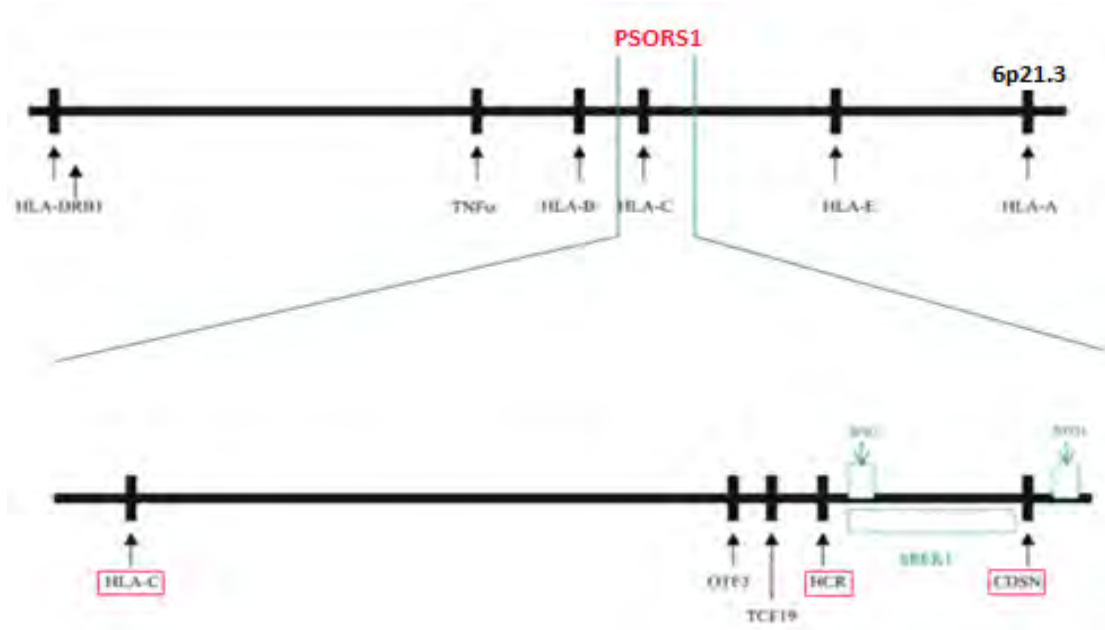
Ένα σύνολο γενετικών παραγόντων αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της ψωρίασης. Μελέτες αποδεικνύουν ότι σε ποσοστό 30-50% των περιπτώσεων εμφάνισης της νόσου, υπάρχει οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας. Επιπλέον, έρευνες σε μονοζυγωτικούς διδύμους, έδειξαν ότι η συμπτωτικότητα είναι 70%, πράγμα που υποδηλώνει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο (Schon et al, 2005). Η γνώση των γονιδίων που σχετίζονται με προδιάθεση της ασθένειας μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βήμα για την κατανόηση της μοριακής βάσης της νόσου και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών (Schon et al, 2005).

Γενικότερα η εμφάνιση της ψωρίασης έχει συσχετιστεί με κάποια γονίδια που εμπλέκονται στην οργάνωση και διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων, όπως το γονίδιο IVL, που εμπλέκεται στην διαφοροποίηση και παρακεράτωση των κερατινοκυττάρων, αλλά κυρίως με γονίδια που εμπλέκονται σε ανοσοαποκρίσεις και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Τα γονίδια αυτά, όπως TNF- $\alpha$ , IL-12B, και IL-23R φέρουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την εμφάνιση της ασθένειας (Prieto-Perez et al, 2013). Μέχρι στιγμής, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 30 SNPs, που συσχετίζονται με διαφορετικού βαθμού κίνδυνο ανάπτυξης της ψωρίασης (National Psoriasis Foundation, 2014).

Επιπλέον, μελέτες σύνδεσης σε οικογένειες ατόμων με ψωρίαση, έχουν αναδείξει την ύπαρξη χρωμοσωμικών περιοχών που συνδέονται με την γενετική προδιάθεση της ασθένειας (Schon et al, 2005).

Ο γενετικός τόπος PSORS1 (psoriasis susceptibility 1) στην χρωμοσωμική περιοχή 6p21.3 (Εικόνα 4), ο οποίος εδράζεται στην περιοχή του MHC (Major Histocompatibility Complex), θεωρείται ο σημαντικότερος για την εμφάνιση ευαισθησίας στην νόσο, καθώς εμπλέκεται σε περισσότερες από 50% των περιπτώσεων της ψωρίασης (Veal et al, 2002). Από μελέτες συσχέτισης πολυμορφισμών εντός του PSORS1, που πραγματοποιήθηκαν σε οικογένειες ψωριασικών ατόμων, διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ψωρίασης και των γονιδίων HLA (λευκοκυτταρικών αντιγόνων του ανθρώπου), που εμπεριέχονται στον συγκεκριμένο γενετικό τόπο (Fan et al, 2008). Συγκεκριμένα το αλληλόμορφο HLA-Cw\*0602, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη MHC τάξης I και αποτελεί μια παραλλαγή του HLA-C, έχει συσχετιστεί με 46% των περιπτώσεων της ψωρίασης κατά πλάκας και με 73% των περιπτώσεων της σταγονοειδούς ψωρίασης (Roberson et al, 2010). Στην περιοχή 6p21.3 απαντώνται δύο ακόμα γονίδια που σχετίζονται με προδιάθεση της νόσου. Το γονίδιο CCHCR1 που κωδικοποιεί την Coiled-Coil  $\alpha$ -Helical Rod Protein 1, η οποία

υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και ίσως, είναι ένας ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και το γονίδιο CDSN που κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και ίσως συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα (Nair et al, 2006).



**Εικόνα 4:** Η θέση του γενετικού τόπου PSORS1 στην χρωμοσωμική περιοχή 6p21.3 και τα γονίδια που συσχετίζονται με την ψωρίαση (Hert, 2011)

Ένας ακόμα γονιδιακός τόπος, ο οποίος φαίνεται να προσδίδει ευαισθησία στην εμφάνιση ψωρίασης είναι ο PSORS2. Ο PSORS2 εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 17q25, όπου βρίσκονται και τα γονίδια SLC9A3R1 και NAT9 (Helms et al, 2003). Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP), ο rs734232, βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων SLC9A3R1 και NAT9, και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1, ο οποίος επάγει την έκφραση του γονιδίου SLC9A3R1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία φωσφοπρωτεΐνη, η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (Hert, 2011).

Στην χρωμοσωμική περιοχή 3q21, εντοπίζεται ο τόπος PSORS5, εντός του οποίου υπάρχει το γονίδιο SCL12A8. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν κατιονικό μεταφορέα, που φαίνεται να εμπλέκεται στην εμφάνιση ψωρίασης και σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, όπως τη νόσο του Crohn's και την ρευματοειδή αρθρίτιδα (Stoff et al, 2010).

Επί προσθέτως, ένα ευρύ φάσμα γενετικών τόπων, συμπεριλαμβανομένου του PSORS3 στην χρωμοσωμική περιοχή 3q, του PSORS4 στην περιοχή 1q21, του PSORS6 στην 19q13, του PSORS7 στην 1p, του PSORS8 στην 16q, του PSORS9 στην 4q31 και του PSORS10 στην 18p11, φαίνεται να συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου. Η συμβολή αυτών των γονιδιακών τόπων στην εμφάνιση της ασθένειας, είναι πιθανώς λιγότερο σημαντική συγκριτικά με τους καλύτερα μελετημένους τόπους, όπως ο PSORS1. Αρκετά από τα γονίδια

που εδράζονται σε αυτούς τους τόπους, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης, όπως μία υπομονάδα της ιντερλευκίνης-23 (IL 23) που κωδικοποιείται από τον PSORS7 και μία υπομονάδα της ιντερλευκίνης-15 (IL 15) από τον PSORS9. Και οι δύο αυτές ιντερλευκίνες προάγουν την φλεγμονή που παρατηρείται στις ψωριασικές αλλοιώσεις. Τέλος, ο γενετικός τόπος PSORS3 κωδικοποιεί τον παράγοντα IRF-2 (Interferon Regulatory Factor-2), ο οποίος αναστέλλει την έκφραση της ιντερφερόνης-α (INF-α) και της ιντερφερόνης-γ (INF-γ) (Stoff et al, 2010).

#### 1.1.5.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την επιδείνωση των ψωριασικών αλλοιώσεων ή ακόμα και να επάγουν την εκδήλωσή της νόσου (Dika et al, 2007). Αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες πυροδότησης μπορεί να είναι τραυματισμοί, λοιμώξεις και η χρήση φαρμάκων (Hani et al, 2013).

Σύμφωνα με το φαινόμενο Koebner, παρατηρείται εμφάνιση ψωριασικών βλαβών σε υγιές δέρμα ασθενών, ως συνέπεια τραυματισμού του δέρματος. Η παθογένεια του φαινομένου δεν είναι πλήρως γνωστή, αλλά οι μηχανισμοί που εμπλέκονται, οδηγούν σε αύξηση της απελευθέρωσης κυτταροκινών και ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και τον σχηματισμό ψωριασικών βλαβών στη θέση τραυματισμού. Η εμφάνιση των αλλοιώσεων παρατηρείται, είτε στις θέσεις τραυματισμού, είτε σε άλλα σημεία εκτός τραυματισμού. Το φαινόμενο Koebner συναντάται περίπου στο 25% των ψωριασικών ασθενών (Martin et al, 2011).

Μία λοίμωξη είναι σε θέση να επάγει επιδείνωση ή πρόκληση της νόσου. Συγκεκριμένα, η στρεπτοκοκκική λοίμωξη έχει συσχετιστεί κυρίως με την εμφάνιση οξείας σταγονοειδούς ψωρίασης. Η μόλυνση από στρεπτόκοκκο της ομάδας A, οδηγεί σε εκδήλωση ψωριασικών βλαβών, μέσω μίας εξωτοξίνης που διεγείρει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και κατ'επέκταση τον υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Karabudak et al, 2012).

Επιπλέον, ορισμένα χορηγούμενα φάρμακα, όπως οι αναστολείς των β-αδρενεργικών υποδοχέων (προπρανολόλη), το λίθιο και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ινδομεθακίνη) μπορούν να προκαλέσουν την εκδήλωση ή επιδείνωση της ψωρίασης (Kim et al, 2010).

Η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και το στρες αποτελούν βλαπτικούς παράγοντες που αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου (Higgins 2000).

#### 1.1.6 Ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης

Ένας συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, πυροδοτούν ανοσοιστολογικές αλλαγές στο δέρμα, μέσω της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί σε λανθασμένο επιδερμικό πολλαπλασιασμό και επαγωγή της ανάπτυξης ψωριασικών αλλοιώσεων.



Γενικά, η εκδήλωση της νόσου είναι παρόμοια με μία τυπική ανοσολογική αντίδραση, η οποία αποτελείται από τρεις φάσεις: μία φάση ευαισθητοποίησης, μια σιωπηλή φάση και μια δραστική φάση. Κατά τη φάση της ευαισθητοποίησης, πραγματοποιείται αντιγονοπαρουσίαση από δενδριτικά κύτταρα, η οποία ακολουθείται από την διαφοροποίηση των δραστικών T-κυττάρων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η φάση ευαισθητοποίησης δεν συνοδεύεται από τυχόν αλλοιώσεις του δέρματος. Στην συνέχεια επέρχεται μια σιωπηλή φάση η οποία προηγείται της δραστικής φάσης. Η δραστική φάση περιλαμβάνει την διήθηση του δέρματος από κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενεργοποίηση των ανοσολογικών κυττάρων στο δέρμα και απόκριση των κερατινοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα παράγουν διάφορους μεσολαβητές που μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω μετανάστευση των ανοσοποιητικών κυττάρων, οδηγώντας στην συμπτωματολογία της νόσου (Sabat et al, 2007).

Πιο συγκεκριμένα, η ανοσοπαθοφυσιολογία της ψωρίασης περιλαμβάνει κάποια συγκεκριμένα γεγονότα που οδηγούν στην απορρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος προκαλώντας αυτοανοσία. Σύμφωνα με την εικόνα 6, μετά από κάποιο τραύμα ή λοίμωξη, επέρχεται ενεργοποίηση των δερματικών δενδριτικών κυττάρων (DDCs). Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους. Το πρώτο μονοπάτι γίνεται μέσω της παραγωγής ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF-α) από τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας. Το δεύτερο μονοπάτι αποτελείται από την δημιουργία συμπλόκων ανάμεσα στα αντιμικροβιακά πεπτίδια LL-37 που απελευθερώνονται από τα κερατινοκύτταρα και μόρια DNA και RNA που έχουν απελευθερωθεί από αποπτωτικά κύτταρα του δέρματος. Τα σύμπλοκα αυτά ενεργοποιούν τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs), τα οποία παράγοντας ιντερφερόνη-α (IFN-α) επάγουν την ενεργοποίηση των DDCs (Εικόνα 5.A). Τα ενεργοποιημένα δερματικά δενδριτικά κύτταρα (DDCs) μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και δρώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα επάγουν την διαφοροποίηση των ανώριμων T-κυττάρων σε δραστικά T-κύτταρα [T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 17 (Th17), T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (Th1), T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 22 (Th22)] (Εικόνα 5.B) (Di Meglio et al, 2011).

Τα δραστικά T-κύτταρα που εκφράζουν το δερματικό λευκοκυτταρικό αντιγόνο (CLA), έχουν την ιδιότητα να προσελκύονται από τις χημειοκίνες 20 και 17 (CCL20 και CCL17) που εκκρίνονται από τα κερατινοκύτταρα και να μεταναστεύουν με την βοήθεια μορίων προσκόλλησης που εκκρίνονται από ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αίματος στο ψωριασικό χόριο, όπου συμβάλλουν στην δημιουργία της ψωριασικής πλάκας (Εικόνα 5.Γ) (Di Meglio et al, 2011).

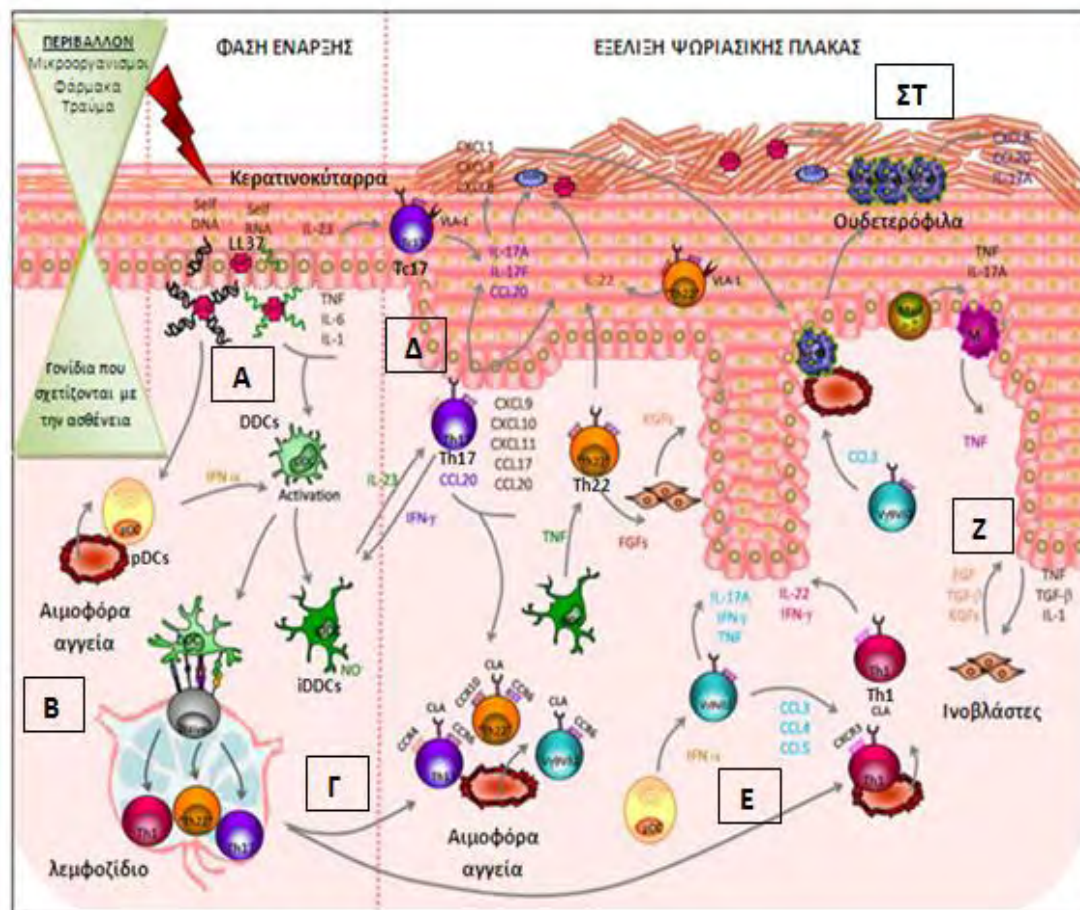
Τα φλεγμονώδη δερματικά δενδριτικά κύτταρα (iDDCs) τα οποία προέρχονται από τα DDCs παράγουν ιντερλευκίνη 23A (IL-23A), ρίζες νιτρικών οξειδίων (NO<sup>·</sup>) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α). Η ιντερλευκίνη 23A (IL-23A) επάγει την έκκριση ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) από τα Th17 κύτταρα, η οποία επιφέρει περαιτέρω ενεργοποίηση των iDDCs, αλλά και της ιντερλευκίνης 17A (IL-17A), της ιντερλευκίνης 17F (IL-17F) και της χημειοκίνης 20 (CCL20), οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), όπως LL-37 και μέλη της οικογένειας S100, από τα κερατινοκύτταρα. Τα μόρια αυτά, έχουν την ιδιότητα να προσελκύουν ουδετερόφιλα και άλλα φαγοκύτταρα, συμβάλλοντας στην δημιουργία φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Ανάλογο αποτέλεσμα μπορεί να επιφέρει ο TNF επάγοντας την έκκριση ιντερλευκίνης 22 (IL-22) από τα Th22 κύτταρα. Τα Th17 κύτταρα

έχουν επίσης, την ιδιότητα να εκκρίνουν απευθείας IL-22. Επιπλέον, συσσώρευση ουδετερόφιλων μπορεί να προκαλέσει τα T-κυτταροτοξικά (Tc17) και Th22 κύτταρα που εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης VLA-1 (very late antigen-1), απελευθερώνοντας IL-17A, IL-17F και CCL20 (Εικόνα 5.Δ) (Di Meglio et al, 2011).

Συμπληρωματικά πρέπει να επισημανθεί πως τα ενεργοποιημένα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs), παράγοντας ιντερφερόνη-α (IFN-α) επάγουν την ενεργοποίηση των Vγ9Vδ2 T-κυττάρων, μιας ειδικής κατηγορίας γδ-T κυττάρων του ανθρώπινου περιφερικού αίματος (Wu et al, 2014). Αυτά τα κύτταρα μπορούν να προσελκύσουν τα ουδετερόφιλα είτε άμεσα μέσω παραγωγής IL-17A, INFγ και TNF-α, είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής χημειοκίνης 3 (CCL3) η οποία ενεργοποιεί τα Th1 κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα Th1 εκκρίνουν IL-22 επάγοντας τη συσσώρευση ουδετερόφιλων και συμβάλλουν στη διατήρηση της φλεγμονής στην επιδερμίδα (Εικόνα 5.Ε) (Di Meglio et al, 2011).

Η IL-22 και η IL-17A που παράγονται από κύτταρα Th1, Th17, και Th22 προκαλούν επιδερμική υπερπλασία στην περιοχή της αλλοίωσης, καθώς επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την λανθασμένη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Εικόνα 5.ΣΤ). Αυτό τελικά οδηγεί στο σχηματισμό της ψωριασικής πλάκας που χαρακτηρίζεται από ακάνθωση (πάχυνση του δέρματος), παρακεράτωση (παραμονή του πυρήνα στην κεράτινη στοιβάδα) και επιμήκυνση των δερματικών πτυχώσεων Rete (Di Meglio et al, 2011).

Τέλος, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κερατινοκυττάρων που παράγουν IL-1, TNF και μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β) και των ινοβλαστών που αποκρίνονται απελευθερώνοντας αυξητικό παράγοντα κερατινοκυττάρων (KGF), επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), αλλά και κύτταρα Th22 που απελευθερώνουν αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGFs), συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση ιστών και στην ανανέωση της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας (Εικόνα 5.Ζ) (Di Meglio et al, 2011).



Εικόνα 5: Η ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης. Στην εικόνα απεικονίζονται οι πληθυσμοί των κυττάρων και οι μεσολαβητές που εμπλέκονται στην εξέλιξη των ψωριασικών αλλοιώσεων από την έναρξή ως την διατήρηση της νόσου. Η έναρξη της νόσου επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Το έναυσμα μπορεί να δώσει ένα τραύμα ή μια βακτηριακή λοίμωξη, οδηγώντας στον σχηματισμό του συμπλόκου DNA/LL-37, στην ενεργοποίηση των πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs), και στην έκκριση ιντερφερόνης-α, η οποία επάγει την ενεργοποίηση των DDCs. Τα ενεργοποιημένα δερματικά δενδρικά κύτταρα (DDCs) μεταναστεύουν στους λεμφαδένες και μέσω της αντιγονοπαρουσίασης, επάγουν την διαφοροποίηση των ανώριμων T-κυττάρων σε δραστικά T-κύτταρα, τα οποία επιστρέφουν στην κυκλοφορία. Τα δραστικά T-κύτταρα προσελκύονται από τις χημειοκίνες 20 και 17 (CCL20 και CCL17) που εκκρίνονται από τα κερατινοκύτταρα και μεταναστεύουν στο ψωριασικό χόριο, με την βοήθεια μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων. Τα φλεγμονώδη δερματικά δενδρικά κύτταρα (iDDCs) παράγουν ιντερλευκίνη 23A (IL-23A), ρίζες νιτρικών οξειδίων (NO<sup>•</sup>) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α). Τα μόρια αυτά έχουν την ιδιότητα να επάγουν την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης 17A (IL-17A), της ιντερλευκίνης 17F (IL-17F) και της ιντερλευκίνης 22 (IL-22) από τα κύτταρα Th17, Th22, Th1 και Tc17, και την παραγωγή χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), από τα κερατινοκύτταρα. Μέσω αυτών των παραγόντων, πραγματοποιείται συσσώρευση ουδετερόφιλων και άλλων φαγοκυττάρων, δημιουργώντας ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και την λανθασμένη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Αυτό οδηγεί σε υπερπλασία στην περιοχή της αλλοίωσης και στον μετέπειτα σχηματισμό της ψωριασικής πλάκας. Επιπλέον, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών που απελευθερώνουν αυξητικό παράγοντα κερατινοκυττάρων (KGF), επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση ιστών (προσαρμογή από Di Meglio et al, 2011).

### 1.1.7 Ο ρόλος του TNF-α στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης

Μελέτες σε ψωριασικούς ασθενείς έδειξαν υψηλή συγκέντρωση του TNF-α στο σημείο των αλλοιώσεων στο δέρμα, στις αρθρώσεις και στο πλάσμα του αίματος, κάτι που οδήγησε στην υπόθεση ότι φάρμακα ικανά να καταστείλουν την επίδραση του TNF-α θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στη θεραπεία αυτής της νόσου (Lima et al, 2011).

Ο παράγοντας νέκρωση όγκων (TNF-α ή απλώς TNF) είναι μία προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη που ενισχύει τη φλεγμονή μέσω των εξής μονοπατιών: α) επαγωγή μορίων προσκόλλησης σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο των φλεγμονωδών κυττάρων στις αλλοιώσεις του δέρματος, β) προώθηση της απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοτακτικών παραγόντων από τα κερατινοκύτταρα, γ) υπερπολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων και δ) ενεργοποίηση των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (Yost et al, 2009). Στον μηχανισμό δράσης του TNF-α, ενέχεται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB1, ο οποίος ελέγχει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών γονιδίων, προωθώντας την παραγωγή κυτταροκινών, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων (Dubois-Declerc et al, 2013).

## 1.2 Θεραπεία της ψωρίασης

Δεν υπάρχει καμία ριζική θεραπεία για την ψωρίαση, αν και υπάρχουν αποτελεσματικές κατασταλτικές θεραπείες που στοχεύουν στο να εξαφανίσουν τις βλάβες ή στο να τις ελαττώσουν σε έκταση και βαρύτητα, ώστε να είναι ανεκτές από τον ασθενή (Κοσμάδακη και συν, 2007). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατατάσσονται κυρίως σε τοπικές, στη φωτοθεραπεία, σε συστηματικές και στους βιολογικούς παράγοντες, αν και αρκετές φορές χρησιμοποιούνται συνδυαστικά.

Οι τοπικές θεραπείες, όπως τα κορτικοστεροειδή και τα αναλόγα βιταμίνης D3, χρησιμοποιούνται για περιορισμένης έκτασης νόσο. Η φωτοθεραπεία με υπεριώδη ακτινοβολία Β (UVB) και η φωτοχημειοθεραπεία PUVA, είναι αποτελεσματικές για μέτριας μορφής νόσο. Τέλος, η συστηματική θεραπεία, με μεθοτρεξάτη, ρετινοειδή, και κυκλοσπορίνη είναι αποτελεσματική για ασθενείς με ανθεκτική ή εκτεταμένη δερματική νόσο (Lebwohl et al, 2005).

Οι βιολογικοί παράγοντες αποτελούν την πιο σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης σε περιπτώσεις σοβαρής ψωρίασης και επικεντρώνονται στις ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη της νόσου με την λήψη αναστολέων των αντιδράσεων (Winterfield et al, 2005).

### 1.2.1 Τοπικές Θεραπείες

Η τοπική θεραπεία αποτελεί την πρώτη επιλογή όταν οι ψωριασικές πλάκες δεν ξεπερνούν το 10% της επιφάνειας του σώματος. Στις βαρύτερες μορφές της νόσου συνδυάζεται με συστηματική αγωγή ή ακτινοβολία (UVB, PUVA).

### **Τοπικά κορτικοστεροειδή**

Τα τοπικά κορτικοστεροειδή παραμένουν η πιο διαδεδομένη μέθοδος θεραπείας για την ψωρίαση κατά πλάκας. Τα κορτικοστεροειδή είναι διαθέσιμα σε διάφορες μορφές, όπως σκόνες, αλοιφές, γέλες και ταινίες και χρησιμοποιούνται ως αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες για την μείωση του οιδήματος και της ερυθρότητας των αλλοιώσεων. Αν και παρουσιάζουν αντιψωριασική δράση, προκαλούν παρενέργειες στο δέρμα όπως ατροφία, τηλαγγειεκτασίες και ραβδώσεις. Ένα από τα πιο ανησυχητικά χαρακτηριστικά τους είναι η ανάπτυξη ταχυφυλαξίας, κατά την οποία ένα φάρμακο που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό αρχικά, σταδιακά χάνει την αποτελεσματικότητά του λόγω της παρατεταμένης χρήσης του. Τα τοπικά στεροειδή συνδυάζονται άριστα με άλλες τοπικές και συστηματικές θεραπείες (Lebwohl et al, 2005).

### **Ανάλογα βιταμίνης D3**

Τα τοπικά ανάλογα της βιταμίνης D3 χορηγούνται ως θεραπεία σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ψωρίαση κατά πλάκας. Τα ανάλογα της βιταμίνης D3, τα οποία είναι η καλσιποτριόλη, η καλσιτριόλη και η τακαλσιτόλη, ασκούν την θεραπευτική τους δράση μέσω της δέσμευσης τους στους υποδοχείς της βιταμίνης D3, οδηγώντας έτσι στην μείωση της διαφοροποίησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συχνά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες τοπικές ή συστηματικές θεραπείες, όπως τα τοπικά κορτικοστεροειδή, αλλά και με φωτοθεραπεία UVB. Η χρήση ενός παράγοντα της βιταμίνης D3 συμβάλλει στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των τοπικών κορτικοστεροειδών για την ψωρίαση και στην ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών που σχετίζονται με αυτά (O'Neill et al, 2010).

### **Τοπικά ρετινοειδή (Ταζαροτένη)**

Η ταζαροτένη αποτελεί ένα τοπικό ρετινοειδές το οποίο χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ήπιας ως μέτριας ψωρίασης κατά πλάκας. Ελαττώνει κυρίως την απολέπιση και τη διήθηση των ψωριασικών πλακών ενώ έχει μικρότερη επίδραση στο ερύθημα (Κοσμαδάκη και συν, 2007). Συχνά χορηγείται σε συνδυασμό με τοπικά κορτικοστεροειδή, καθώς έχει την ιδιότητα να αναστρέφει την δερματική ατροφία που αυτά προκαλούν (Lebwohl et al, 2005).

### **Άλλες τοπικές θεραπείες**

Κερατολυτικά παρασκευασμάτα, τα οποία περιέχουν σαλικυλικό οξύ και ουρία, αλλά και μαλακτικά, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την απομάκρυνση των λεπιών. Επιπλέον, παλαιότερες τοπικές θεραπείες, όπως η ανθραλίνη και η λιθανθρακόπισσα, χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα ενάντια σε ήπιες ψωριασικές αλλοιώσεις. Επειδή όμως η χρήση τους είναι δυσάρεστη για τον ασθενή, λόγω της έντονης οσμής και της πρόκλησης ερεθισμού και χρωματισμού του δέρματος, προτιμούνται λιγότερο συχνά από ό,τι τα προαναφερθέντα φάρμακα τοπικής χρήσης (Lebwohl et al, 2005).

## 1.2.2 Φωτοθεραπεία

Η φωτοθεραπεία ενδείκνυται για μέτριας έκτασης νόσο και συχνά συνδυάζεται με τοπική ή συστηματική αγωγή. Διακρίνεται στη φωτοθεραπεία με υπεριώδη ακτινοβολία (UVB) και στη φωτοχημειοθεραπεία (PUVA). Η UV ακτινοβολία μπορεί να επιφέρει επιβράδυνση της κερατινοποίησης και επαγωγή απόπτωσης των παθογόνων Τ-κυττάρων σε ψωριασικές πλάκες. Η φωτοθεραπεία ενοχοποιείται για την εμφάνιση καρκίνου του δέρματος και την πρόκληση φωτογήρανσης (Weinstein et al, 2001).

### **Φωτοθεραπεία με UVB**

Η μέθοδος της φωτοθεραπείας περιλαμβάνει την εκπομπή UVB ακτινοβολίας, η οποία διεισδύει στο δέρμα και επιβραδύνει την ανάπτυξη των κυττάρων (National Psoriasis Foundation, 2014). Η θεραπεία περιλαμβάνει την έκθεση του δέρματος σε μια τεχνητή πηγή ακτινοβολίας και μπορεί να αφορά σε όλο το φάσμα της UVB (UVB ευρέος φάσματος, 290-320 nm) ή μόνο στο πιο θεραπευτικό τμήμα της (UVB στενού φάσματος, 311 nm) (Κοσμάδακη και συν, 2007).

### **Φωτοχημειοθεραπεία PUVA**

Η φωτοχημειοθεραπεία (PUVA), περιλαμβάνει την έκθεση του ψωριασικού δέρματος σε UVA ακτινοβολία (320-400 nm) μετά από χορήγηση ή τοπική εφαρμογή ψωραλενίων (8-μεθοξυ-ψωραλένιο). Η UVA επάγει την παραγωγή ριζών οξυγόνου και έχει έντονη μεταλλαξιγόνο δράση, ενώ σε συνδυασμό με μία φωτοευαίσθητη ουσία, όπως η 8-μεθοξυψωραλένιο που χρησιμοποιείται κατά την PUVA, οδηγεί σε παρεμβολή του φωτοευαίσθητοποιητή στην διπλή έλικα του DNA, δημιουργώντας μεταλλάξεις που επάγουν ανοσοκαταστολή (Weischer et al, 2004).

## 1.2.3 Συστημικές Θεραπείες

### **Μεθοτρεξάτη**

Η μεθοτρεξάτη είναι ένας ανοσοκατασταλτικός ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος, ο οποίος καταστέλλει τη σύνθεση του DNA, αναστέλλοντας την διϋδροφολική αναγωγή. Είναι ένα αποτελεσματικό φάρμακο για μέτρια και σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας, ερυθροδερμική και φλυκταινώδη ψωρίαση, αλλά και ψωριασική αρθρίτιδα. Συνηθέστερα χορηγείται μέσω της στοματικής οδού, αλλά και μέσω υποδόριας χορήγησης. Η μεθοτρεξάτη μπορεί να προκαλέσει αναιμία, ναυτία και σπανίως πανκυτταροπενία. Οι παρενέργειες αυτές μπορούν να μειωθούν με συμπληρώματα φυλλικού οξέος (Lee et al, 2008).

### **Κυκλοσπορίνη**

Η κυκλοσπορίνη θεωρείται μία εξαιρετικά αποτελεσματική θεραπεία για όλους τους τύπους της ψωρίασης, η οποία όμως εμφανίζει πολυάριθμες παρενέργειες, όπως νεφροτοξικότητα και η υπέρταση. Η κυκλοσπορίνη έχει ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, καθώς αναστέλλει την μεταγραφή του γονιδίων της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) σε

ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δέσμευσής της σε μια ομάδα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, που ονομάζονται κυκλοφιλίνες. Το σύμπλοκο αυτό, προσδέεται και αναστέλλει την καλσινευρίνη, μια ασβεστο-εξαρτώμενη φωσφατάση που ρυθμίζει την πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 (Matsuda et al, 2000).

#### **Συστημικά Ρετινοειδή (ακιτρετίνη)**

Τα συστημικά ρετινοειδή χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις σοβαρής ψωρίασης, συμπεριλαμβανομένης της φλυκταινώδης και ερυθροδερμικής μορφής. Το ρετινοειδές που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η ακιτρετίνη, η οποία μπορεί να χορηγηθεί σε συνδυασμό με UVB ή PUVA θεραπεία, συμβάλλοντας στην αύξηση της ανταπόκρισης των ασθενών στην φωτοθεραπείας και στην ελάττωση της ακτινοβολίας. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που παρατηρούνται κατά την θεραπεία με ρετινοειδή είναι η χειλίτιδα, η αλωπεκία και η υπερτριγλυκεριδαμία (Winterfield et al, 2005).

### **1.2.4 Βιολογικοί παράγοντες**

Η αποσαφήνιση της ανοσοπαθογένειας της ψωρίασης, έχει οδηγήσει στην εμφάνιση νέων θεραπειών που στοχεύουν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε μόρια τα οποία επάγουν και διατηρούν τις κλινικές μεταβολές που παρατηρούνται στις ψωριασικές πλάκες. (Winterfield et al, 2005). Οι βιολογικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται σαν θεραπεία σε περιπτώσεις σοβαρής ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας και δρουν είτε στοχεύοντας σε T κύτταρα, είτε μπλοκάροντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Sullivan et al, 2009).

Η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων δεν εξαρτάται μόνο από την ανασταλτική επίδρασή τους στα μόρια στόχους, αλλά και από τη συγγένεια τους στους υποδοχείς Fcγ (FcγRs), στους οποίους δεσμεύονται μέσω της σταθερής περιοχής Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG1 (Ramirez et al, 2010).

Η εμφάνιση των βιολογικών παραγόντων έχει βελτιώσει σημαντικά την θεραπεία κατά της ψωρίασης. Πολλές βιολογικές θεραπείες έχουν προκύψει την τελευταία δεκαετία και περιλαμβάνουν: α) παράγοντες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και την μετανάστευση των T-κυττάρων, όπως το alefacept και το efalizumab, β) παράγοντες που στοχεύουν στον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α), όπως το infliximab, το etanercept και το adalimumab, και γ) παράγοντες που στοχεύουν στην υπομονάδα p40 της IL-12 και IL-23, όπως το ustekinumab (Sivamani et al, 2010).

#### **T- κυτταρικοί παράγοντες**

##### **Alefacept**

Το Alefacept είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που προήλθε από την σύντηξη του ανθρωπίνου λεμφοκυτταρικού αντιγόνου-3 (LFA-3) με τμήματα Fc της ανθρώπινης IgG1. Το Alefacept δεσμεύεται στο μόριο CD2 στην επιφάνεια των T-κυττάρων, εμποδίζοντας τη σύνδεση του LFA-3 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τον CD2. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων. Επιπλέον, επάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων T- κύτταρων μνήμης που εκφράζουν υψηλά

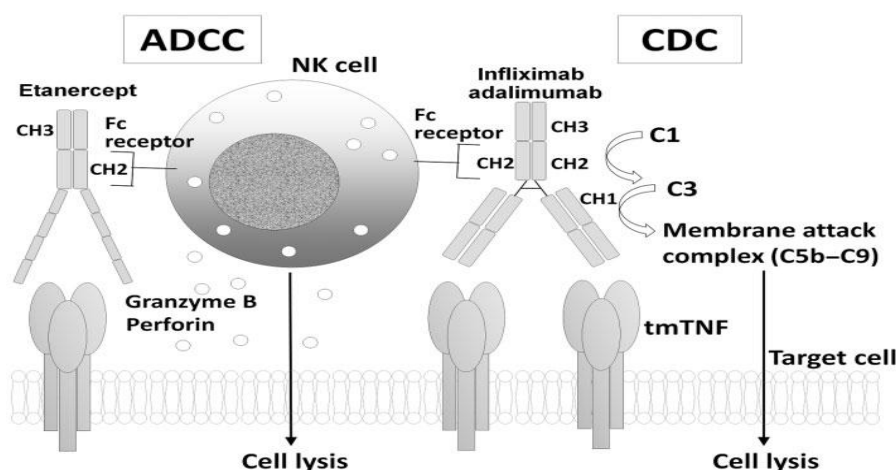
επίπεδα του υποδοχέα CD2, μέσω της πρόσδεση της με τον υποδοχέα FcγRIII των φυσικών φονικών κυττάρων και των μακροφάγων (Winterfield et al, 2005).

### Efalizumab

Το efalizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο αντι-CD11a μονοκλωνικό αντίσωμα, που δεσμεύεται στην CD11a υπομονάδα του αντιγόνου των λευκοκυττάρων LFA-1 και εμποδίζει την αλληλεπίδραση των LFA1-ICAM-1. Το ICAM-1 είναι ένα μόριο προσκόλλησης που βρίσκεται στο αγγειακό ενδοθήλιο και συμβάλλει στην μετανάστευση των λεμφοκυττάρων. Το efalizumab, αποτρέποντας τη σύνδεση του LFA-1 με το ICAM-1, αναστέλλει την προσκόλλησή λεμφοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτρέποντας έτσι την μετανάστευση τους στο δέρμα (Krueger, 2002).

### Παράγοντες Αντι-TNF-α

Ο TNF-α, είναι μία προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, πολύ σημαντική για την ανάπτυξη της φλεγμονής στην ψωρίαση, καθώς διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης από τα κερατινοκύτταρα, αυξάνοντας την στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι παράγοντες αντι-TNF-α δεσμεύουν τον TNF-α και εμποδίζουν τη δραστηριότητά του, οδηγώντας σε μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κερατινοκυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Dubois-Declerc et al, 2013). Επιπλέον, προσδένονται, μέσω της σταθερής Fc περιοχής τους, στους υποδοχείς Fcγ, ρυθμίζοντας έτσι λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η επαγωγή της απόπτωσης, η εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC) και η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρική κυτταροτοξικότητα (ADCC) (Wojtal et al, 2012). Μέχρι σήμερα, έχουν εγκριθεί τρεις αναστολείς TNF-α ως θεραπεία κατά της ψωρίασης: infliximab, etanercept, και adalimumab (Εικόνα 6) (Dubois-Declerc et al, 2013).



Εικόνα 6: Οι αναστολείς TNF-α: infliximab, adalimumab και etanercept, περιέχουν την περιοχή CH2 του σταθερού τμήματος Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG1. Η CH2 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C1 του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα την επαγωγή της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C3 του συμπληρώματος και τον μετέπειτα σχηματισμό του συμπλόκου C5b-C9, οδηγώντας στην



καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και την λύση των κυττάρων-στόχων (CDC). (Να σημειωθεί ότι το etanercept δεν περιέχει την περιοχή CH1 της IgG1, που είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C3 και επομένως δεν ενεργοποιεί την CDC). Επιπλέον το infliximab, adalimumab και etanercept μέσω των περιοχών CH2 και CH3 του τμήματος Fc του IgG1 που περιέχουν, δεσμεύονται στους υποδοχείς Fc, επάγοντας την απελευθέρωση γρανζύμου B και περφορίνης από φυσικά φονικά κύτταρα (NK) και την ακόλουθη λύση των κυττάρων-στόχων. (Horiuchi et al, 2010).

### adalimumab

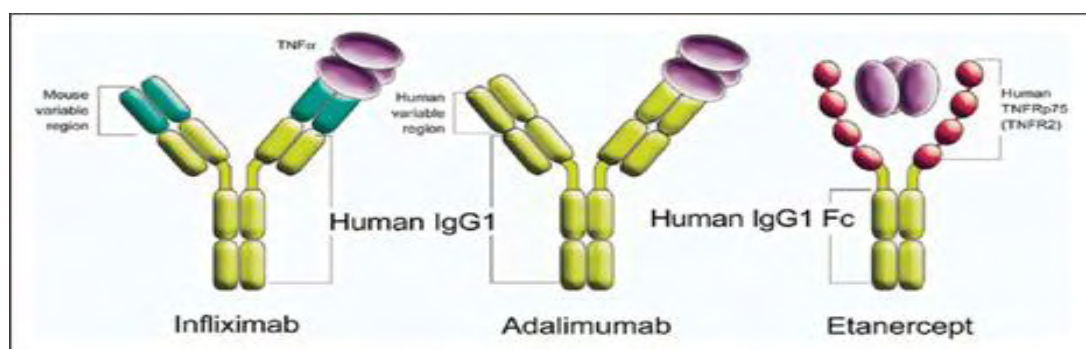
Το adalimumab (Humira) είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που δεσμεύεται με υψηλό βαθμό συγγένειας και ειδικότητας στον TNF-α (Εικόνα 7). Αυτός ο ειδικός ανταγωνιστής του TNFα, αναστέλλει τη βιολογική δράση του TNF-α, παρεμποδίζοντας τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς του. Το 80% περίπου των ασθενών εμφανίζει βελτίωση PASI 75%, τέσσερις μήνες μετά την έναρξη του φαρμάκου (Weinblatt et al, 2003).

### infliximab

Το infliximab (Remicade) είναι ένα χμαιοκικό (ποντικού-ανθρώπου) μονοκλωνικό αντίσωμα της τάξης IgG1, που δεσμεύει τον TNF-α και αναστέλλει την παραγωγή άλλων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Εικόνα 7) (Dubois-Declerc et al, 2013). Κατά τη 10η εβδομάδα από την έναρξη της χορήγησης 5mg φαρμάκου, το 75,5 με 88% των ασθενών επιδεικνύουν βελτίωση PASI 75% (Sivamani et al, 2010).

### etanercept

Το etanercept (Enbrel) είναι μία χμαιοκική πρωτεΐνη, που αποτελείται από την εξωκυττάρια θέση σύνδεσης του υποδοχέα p75 του TNF-α και την περιοχή Fc του ανθρώπινου IgG1 (Εικόνα 7). Αυτός ο συνθετικός υποδοχέας εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια για τον TNF-α από ό, τι ο φυσικός υποδοχέας. Η σύνδεση του TNF-α με τον αναστολέα, οδηγεί στην εξουδετέρωσή του και στην μείωση της ψωριασικής φλεγμονής (Dubois-Declerc et al, 2013). Κατά την διάρκεια κλινικών δοκιμών, μετά από υποδόρια χορήγηση 25 mg του etanercept δύο φορές την εβδομάδα, για 12 συνεχόμενες εβδομάδες, επιτυγχάνεται βελτίωση PASI 75% σε ποσοστό 30-34% των ασθενών, ενώ ο διπλασιασμός της δόσης του φαρμάκου στα 50 mg αύξησε το ποσοστό σε 49% (Winterfield et al, 2005).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της δομής των τριών αναστολέων TNF-α (infliximab, etanercept, και adalimumab) (Anderson, 2005).

## Αναστολείς Ιντερλευκινών

### Ustekinumab

Το ustekinumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την υπομονάδα p40 της IL-23 και της IL-12. Οι δύο ιντερλευκίνες παράγονται από δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Το ustekinumab μέσω της σύνδεσής του με IL-12 και IL-23, αναστέλλει την διαφοροποίηση των ανώριμων T-κυττάρων σε Th1 και Th17. Επιπλέον, το ustekinumab επάγει έμμεσα την μείωση της παραγωγή IL-17, αναστέλλοντας την στρατολόγηση των ουδετερόφιλων στις ψωριασικές βλάβες (Dubois-Declerc et al, 2013).

## 1.3 Οι υποδοχείς Fc

Ο υποδοχέας των ανοσοσφαιρινών (FcR) είναι μια πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα Β-λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK), τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα, και συμβάλλει στις προστατευτικές λειτουργίες του οργανισμού έναντι των παθογόνων. Οι FcRs δεσμεύονται μη ειδικά με την σταθερή περιοχή (Fc) των αντισωμάτων. Η δέσμευση των ανοσοσυμπλεγμάτων, διεγείρει φαγοκυτταρικά ή κυτταροτοξικά κύτταρα και οδηγεί στην καταστροφή των παθογόνων, μέσω μίας φλεγμονώδους απόκρισης. (Anderson, 2003). Υποδοχείς Fc έχουν περιγραφεί για όλες τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών. Έτσι έχουν βρεθεί: ο FcαR που δεσμεύει τα αντισώματα IgA, ο FcεR που δεσμεύει τα IgE και ο FcγR που συνδέεται με τα αντισώματα IgG (Kindt et al, 2007).

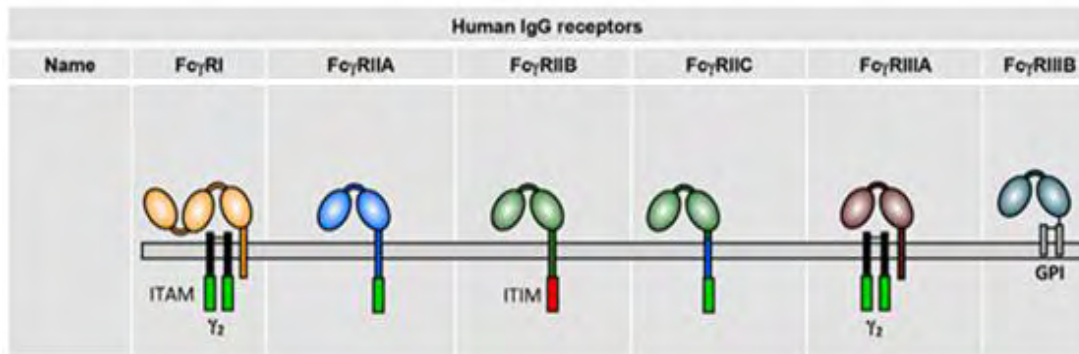
### 1.3.1 Οι υποδοχείς Fcγ

Η IgG είναι η πιο άφθονη ανοσοσφαιρίνη του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελείται από 4 υποτάξεις (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4), οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για τους FcγRs (Kindt et al, 2007). Τα IgG προσδένονται ειδικά σε αντιγόνα, μέσω των δύο αντιγονο-δεσμευτικών περιοχών τους (θραύσματα Fab), και έπειτα συνδέονται μέσω της σταθερής τους περιοχής (περιοχή Fc) στους υποδοχείς Fcγ των λευκοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση αυτή, οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη μεταγωγής σήματος, που επιφέρει την αντίσταση του ξενιστή στην λοίμωξη. Ανάλογα με τον τύπο των λευκοκυττάρων, αλλά και τον τύπο του υποδοχέα Fcγ που ενεργοποιείται, επάγεται είτε οψωνισμός και φαγοκυττάρωση, είτε κυτταρική αποκοκκίωση, είτε παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών, είτε ενεργοποίηση αποπτωτικών γονιδίων, είτε εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC) (Rosales et al, 2013).

Οι υποδοχείς Fcγ είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών και αποτελούνται από μία α-υπομονάδα, η οποία περιέχει θέσεις δέσμευσης της IgG εξωκυτταρικά, μία διαμεμβρανική

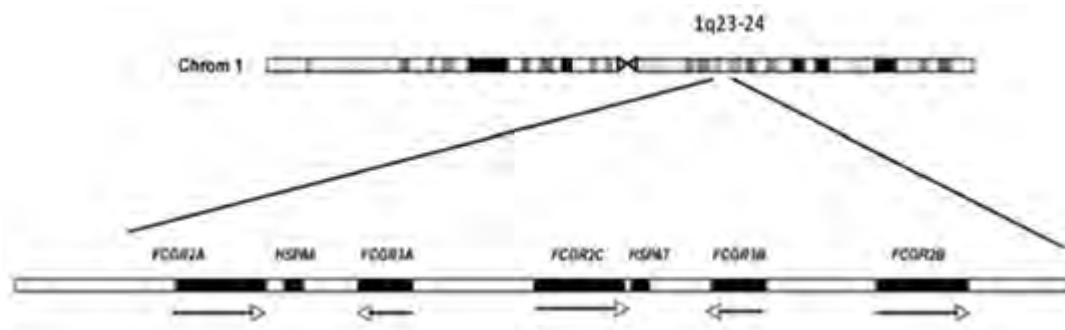
περιοχή και ένα μικρό ενδοκυτταρικό άκρο, και από ένα ζεύγος αλυσίδων  $\gamma$ , το οποίο εμπλέκεται στην σηματοδότηση του υποδοχέα (Kindt et al, 2007).

Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις κατηγορίες υποδοχέων Fc $\gamma$ : ο Fc $\gamma$ RI (CD64), ο Fc $\gamma$ RII (CD32) και ο Fc $\gamma$ RIII (CD16), οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και διαφέρουν ως προς την συγγένεια τους για την IgG, την δομή τους και την κυτταρική τους κατανομή (Εικόνα 8) (Rosales et al, 2013). Ο Fc $\gamma$ RI είναι ένας υποδοχέας υψηλής συγγένειας για την IgG, σε αντίθεση με τον Fc $\gamma$ RII και τον Fc $\gamma$ RIII που εμφανίζουν χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης (Breunis et al, 2009).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων Fc $\gamma$ R (Gillis et al, 2014)

Ο υποδοχέας Fc $\gamma$ RII κωδικοποιείται από τρία παράλογα γονίδια (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB και Fc $\gamma$ RIIC), ενώ ο Fc $\gamma$ RIII από δύο (Fc $\gamma$ RIIIA και Fc $\gamma$ RIIIB), τα οποία επίσης εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία τους. Τα γονίδια αυτά εδράζονται στην χρωμοσωμική περιοχή 1q23-24, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο γονιδίων (Εικόνα 9). Μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) εντός των γονιδίων αυτών, που φαίνεται να επηρεάζουν την λειτουργία του υποδοχέα, μεταβάλλοντας την συγγένεια του για την IgG (Breunis et al, 2009).



Εικόνα 9: Η οργάνωση των γονιδίων Fc $\gamma$ R στην χρωμοσωμική περιοχή 1q23-24 (Breunis et al, 2009).

Οι υποδοχείς Fc $\gamma$  περιέχουν ένα μοτίβο ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέα βάσει τυροσίνης (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM), στο κυτταροπλασματικό τμήμα τους, το οποίο φέρει κατάλοιπα τυροσίνης, που φωσφορυλιώνονται από κινάσες της

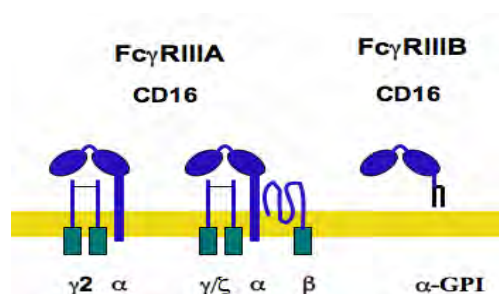
οικογένειας Src. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται θέσεις συνδέσεις για άλλα σηματοδοτικά μόρια, όπως οι κινάσες Syk, που ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, οδηγώντας σε μία συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση όπως η ADCC και η φαγοκυττάρωση. Εξάιρεση αποτελεί, ο FcγRIIB, ο οποίος είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας που περιέχει ενδοκυτταρικά ένα μοτίβο αναστολής ανοσοϋποδοχέα βάσει τυροσίνης (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) και η ενεργοποίηση του οδηγεί σε καταστολή της σηματοδότησης, μέσω της σύνδεσης φωσφατασών. Η συνέκφραση ενεργοποιητικών και ανασταλτικών FcγRs σε ένα κύτταρο, επιφέρει την ταυτόχρονη πυροδότηση τόσο διεγερτικών όσο και ανασταλτικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα την από κοινού ρύθμιση της σηματοδότησης του κυττάρου. Η ρύθμιση αυτή, επιτυγχάνεται με την δημιουργία ενός ορίου ενεργοποίησης του κυττάρου, το οποίο καθορίζεται από την έκφραση των δύο τύπων FcγRs (Rosales et al, 2013).

### 1.3.2 Ο υποδοχέας FcγRIIIA

Ο υποδοχέας FcγRIIIA κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, που εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 1 στη θέση 23. Το γονίδιο FcγRIIIA εμφανίζει μεγάλη ομολογία με ένα άλλο γονίδιο του χρωμοσώματος 1, το FcγRIIIB, το οποίο εκφράζεται σε πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/term=2214>).

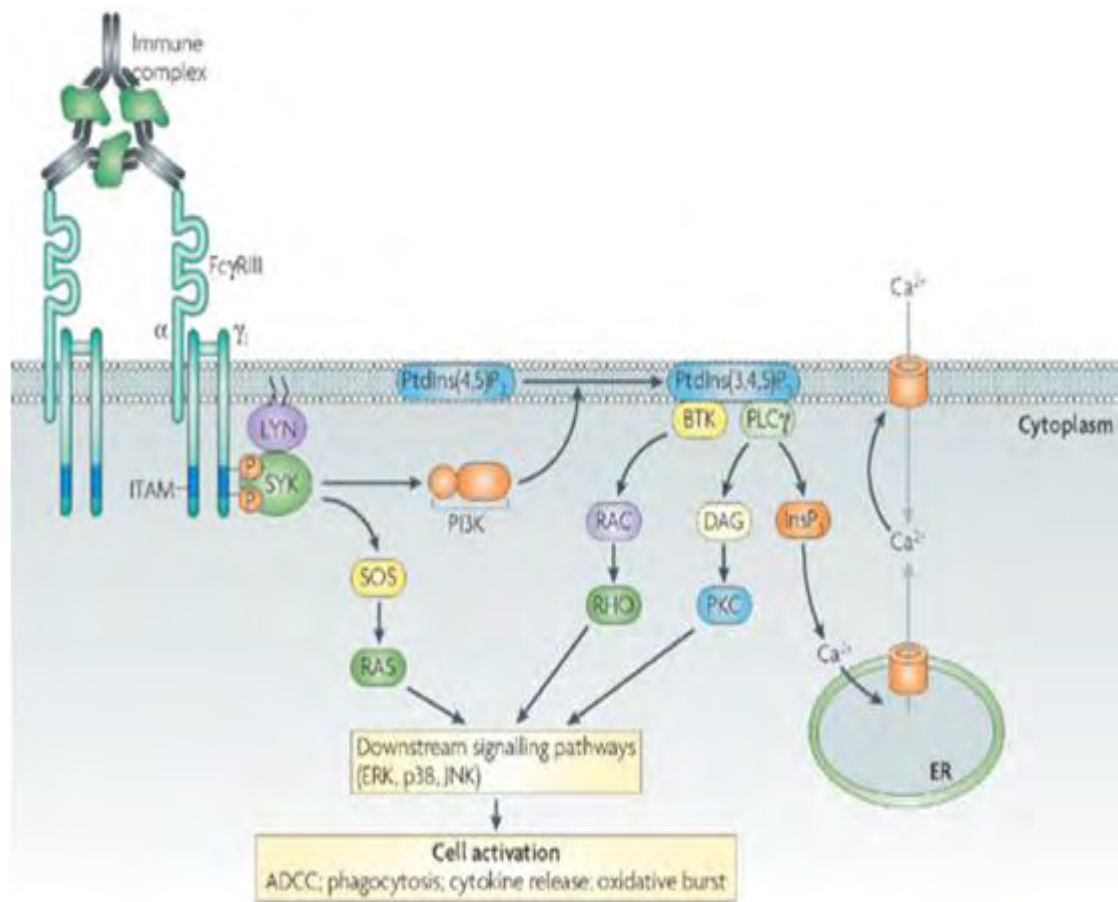
Ο υποδοχέας FcγRIIIB συνδέεται στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω ενός δεσμού με μία γλυκοσυλ-φωσφατιδυλινοσιτόλη (GPI) και δεν περιέχει κυτταροπλασματικό άκρο (Εικόνα 10). Μελέτες αποδεικνύουν την ύπαρξη μηχανισμού σηματοδότησης, ο οποίος όμως παραμένει άγνωστος (Rosales et al, 2013).

Ο υποδοχέας FcγRIIIA που εκφράζεται στα μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), και δενδριτικά κύτταρα, αποτελείται από μία υπομονάδα-α που περιέχει δύο εξωκυτταρικές θέσεις δέσμευσης της IgG, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική ουρά, και συνδέεται με ένα ομοδιμερές γ αλυσίδων που περιέχει περιοχές ITAM. Απ' την άλλη ο FcγRIIIA που εκφράζεται στα βασεόφιλα και στα σιτευτικά κύτταρα, διαφοροποιείται, καθώς συνδέεται με ένα ετεροδιμερές γ και ζ αλυσίδων και περιέχει μια επιπλέον αλυσίδα β (Εικόνα 10) (Indik et al, 1995).



Εικόνα 10: Απεικόνιση της δομής του υποδοχέα FcγRIIIA στα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) και στα μακροφάγα, της διαφοροποιημένης δομής του FcγRIIIA που παρατηρείται σε βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα και της δομής του συνδεδεμένου με GPI υποδοχέα FcγRIIIB στα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Rosales et al, 2013).

Ο FcγRIIIA αποτελεί έναν ενεργοποιητικό υποδοχέα και η σηματοδότηση του έχει ως εξής: Μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα, επάγεται φωσφορυλίωση κάποιων κατάλοιπων τυροσίνης εντός της ITAM, από κινάσες της οικογένειας Src. Τα φωσφορυλιωμένα αυτά κατάλοιπα, καθίστανται ως θέσεις πρόσδεσης για τις κινάσες Syk, οι οποίες ενεργοποιούν μία σειρά από μόρια μεταγωγής σήματος, όπως η κινάση της 3-φωσφοινοσιτόλης (PI3K). Η δημιουργία της 3,4,5-τριφωσφορικής -φωσφατιδυλινοσιτόλης (PtdIns (3,4,5) P3) επάγει την στρατολόγηση της κινάσης τυροσίνης του Bruton (BTK) και την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης Cγ (PLCγ), που οδηγεί στην παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορικής -ινοσιτόλης (InsP3). Τα μόρια αυτά επάγουν την αυξημένη απελευθέρωση ασβεστίου ενδοκυτταρικά και την ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και οδηγούν στην απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, την φαγοκυττάρωση και την ADCC (Εικόνα 11) (Nimmerjahn et al, 2008).



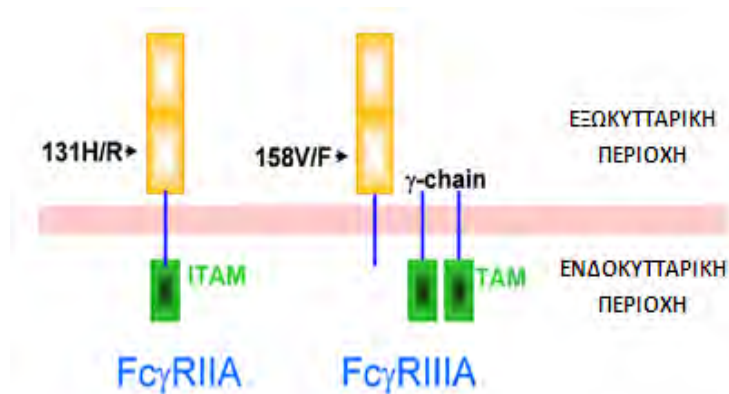
Εικόνα 11: Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σηματοδοτούνται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα FcγRIIIA. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα FcγRIIIA από την ανοσοσφαιρίνη IgG, επάγεται φωσφορυλίωση κατάλοιπων τυροσίνης εντός της κυτταροπλασματικής περιοχής ITAM, από κινάσες Src. Με αυτόν τον τρόπο στρατολογούνται οι κινάσες Syk, οι οποίες ενεργοποιούν μία σειρά από μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία οδηγούν στην ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων που είναι για την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, την φαγοκυττάρωση και την ADCC (Nimmerjahn et al, 2008).

### 1.3.3 Πολυμορφισμοί των υποδοχών Fcγ

Οι FcγRs περιέχουν λειτουργικούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που επηρεάζουν τις δυνατότητες τους ως τελεστές (Munde et al, 2012). Η ύπαρξη ενός SNP στην περιοχή κωδικοποίησης ενός γονιδίου συχνά καταλήγει σε αμινοξικές αλλαγές που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Ορισμένα SNPs στις κωδικές περιοχές των γονιδίων FcγRIIA και FcγRIIA έχουν κλινική σημασία, καθώς φαίνεται να σχετίζονται με αποκρίσεις σε θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα, όπως οι αναστολείς TNF-α (infliximab, etanercept, και adalimumab) (Mellor et al, 2013).

Στο γονίδιο FcγRIIA εμφανίζεται ένας πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 519 (G>A), στο τμήμα που κωδικοποιεί την δεύτερη εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, προκαλώντας μια αμινοξική υποκατάσταση από αργινίνη (R) σε ιστιδίνη (H) στη θέση 131 (rs1801274) (Εικόνα 12). Το αλληλόμορφο FcγRIIA-H131 εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της IgG1 και της IgG2, σε σύγκριση με το FcγRIIA-R131 (Li et al, 2009).

Ο υποδοχέας FcγRIIA εμφανίζει στο γονίδιό του ένα SNP στη θέση 559 (G>T), στο τμήμα που κωδικοποιεί την δεύτερη εξωκυτταρική περιοχή δέσμευσης της IgG, προκαλώντας μια αμινοξική υποκατάσταση από βαλίνη (V) σε φαινυλαλανίνη (F) στη θέση 158 (rs396991) (Εικόνα 12) (Li et al, 2009). Λόγω της ύπαρξης του πολυμορφισμού V158F, εμφανίζονται δύο αλληλόμορφα του γονιδίου FcγRIIA, το FcγRIIA-158V και το FcγRIIA-158F, τα οποία κωδικοποιούν υποδοχείς με διαφορετική δεσμευτική ικανότητα (Carton et al, 2007).



Εικόνα 12: Απεικόνιση της θέσης του πολυμορφισμού H131R στον υποδοχέα FcγRIIA και του πολυμορφισμού V158F στον υποδοχέα FcγRIIA (Li et al, 2009).

Η δεύτερη εξωκυτταρική περιοχή στην οποία πραγματοποιείται η αμινοξική υποκατάσταση από βαλίνη (V) σε φαινυλαλανίνη (F), φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα την δέσμευση των προσδετών. Οι Koene et al, 1997, απέδειξαν πως ο υποδοχέας FcγRIIA που εκφράζεται σε κύτταρα NK τα οποία απομονώθηκαν από ομόζυγους FcγRIIA-158V δότες, έχει υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τις ισομορφές IgG1, IgG3 και IgG4, συγκριτικά με κύτταρα από ομόζυγους FcγRIIA-158F και ετερόζυγους δότες, παρά τα πανομοιότυπα επίπεδα έκφρασης υποδοχέα (Koene et al, 1997). Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι ο

πολυμορφισμός rs396991 στην νουκλεοτιδική θέση 559 μεταβάλλει την συγγένεια του FcγRIIIA για την IgG στα NK κύτταρα (Wu et al, 1997). Επιπλέον, η ενεργοποίηση των κυττάρων NK εμφανίζεται να είναι αυξημένη για τον γονότυπο FcγRIIIA-VV158, σε σύγκριση με τον FcγRIIIA-FF158, λόγω της αυξημένης δεσμευτικής ικανότητας των συγκεκριμένων κυττάρων (Munde et al, 2012).

## 1.4 Φαρμακογενετική

Η φαρμακογενετική είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ των γενετικών παραλλαγών και της απόκρισης στα φάρμακα. Αν και πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την φαρμακολογική απόκριση, όπως η ηλικία, η διατροφή, η συνυπάρχουσα θεραπεία και η αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκων, εκτιμάται ότι διάφοροι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να ευθύνονται για τη διαφοροποίηση της ανταπόκρισης σε ένα φάρμακο. Ο πιο συχνός τύπος πολυμορφισμού είναι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP), που προκύπτει ύστερα από αντικατάσταση μιας νουκλεοτιδικής βάσης από μια άλλη, σε μια ή περισσότερες θέσεις του γονιδίου. Ιδίως, λειτουργικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν φάρμακα, καθώς και σε γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες μεταφορείς και στόχους φαρμάκων, φαίνεται να ευθύνονται για αυτήν την διαφοροποιημένη απόκριση στη θεραπεία (Giacomini et al, 2007).

Στόχο της φαρμακογενετικής αποτελεί η εξατομίκευση της θεραπείας, μέσω της ανακάλυψης βιοδεικτών εντός του γονιδιώματος, οι οποίοι θα διευκολύνουν την πρόβλεψη της ανταπόκρισης του ασθενούς σε μια φαρμακευτική αγωγή με βάση το γενετικό του προφίλ. Η εξατομικευμένη θεραπεία, η οποία θα είναι προσαρμοσμένη στα γενετικά χαρακτηριστικά του ασθενή, θα οδηγήσει στην μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και την αποφυγή ανεπιθύμητων παρενεργειών. Επιπλέον, θα συμβάλλει στη μείωση του κόστους της θεραπείας, καθώς οι γιατροί θα είναι σε θέση να συνταγογραφούν περισσότερο στοχευμένα και αποτελεσματικά φάρμακα σε κάθε ασθενή και οι φαρμακευτικές εταιρείες θα κατορθώσουν να αναπτύξουν και να διαθέσουν φάρμακα για συγκεκριμένες ομάδες ασθενών (Hunt, 2008).

### 1.4.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση

Φαρμακογενετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με ψωρίαση έχουν συσχετίσει πολυμορφισμούς που εντοπίζονται σε γονίδια υποδοχέων Fcγ (FcγR) με την διαφοροποιημένη ανταπόκριση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες.

Οι Ramirez et al. (2010), πραγματοποίησαν μια φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης ενός πολυμορφισμού, του rs1801274 του γονιδίου FcγRIIA, με την απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF σε μια ομάδα ασθενών με ψωριασική αρθρίτιδα. Στους 110 ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη, χορηγήθηκαν αναστολείς του TNF-α (adalimumab, infliximab, etanercept) για 12 και 24 εβδομάδες, όμως τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών που έφεραν το υψηλής συγγένειας αλληλόμορφο (FcγRIIA

HH/HR) και αυτών που έφεραν το χαμηλής συγγένειας αλληλόμορφο (FcγRIIA RR). Ωστόσο, υπήρχε μια τάση για καλύτερη φαρμακολογική ανταπόκριση των ομόζυγων-FcγRIIA HH και ετερόζυγων ασθενών (Ramirez et al, 2010).

Το 2012, οι Ramirez et al. επανέλαβαν την μελέτη τους με στόχο να αξιολογήσουν την επίδραση των γενετικών πολυμορφισμών FcγRIIA-H131R και FcγRIIA-V158F στην απόκριση της θεραπείας με αντι-TNF παράγοντες σε ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα. Αναστολείς αντι-TNF (adalimumab, infliximab, etanercept) χορηγήθηκαν σε συνολικά 103 ασθενείς για 3 και 6 μήνες. Οι περισσότεροι ασθενείς με γονότυπο FcγRIIA υψηλής συγγένειας (FcγRIIA HH/HR) πέτυχαν σημαντική απόκριση στους 6 μήνες σε σύγκριση με ασθενείς με γονότυπο χαμηλής συγγένειας (FcγRIIA RR). Δεν βρέθηκε όμως σημαντική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό FcγRIIA -V158F (Ramirez et al, 2012).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των βιολογικών παραγόντων ξεχωριστά, καθώς η διαφορά στη δομή και στον τρόπο δράσης τους (το etanercept είναι ένας διαλυτός υποδοχέα που δεσμεύεται σε διαλυτό TNF-α, ενώ το infliximab και adalimumab είναι μονοκλωνικά αντισώματα που προσδένονται σε διαμεμβρανικό TNF-α), θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απόκριση στην θεραπεία. Αποκαλύφθηκε η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού του FcγRIIA και της θετικής απόκριση στο etanercept μετά από 6 μήνες θεραπείας. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το αλληλόμορφο υψηλής συγγένειας (FcγRIIA HH/HR) εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στο υψηλότερο ποσοστό των ανταποκριθέντων, σε σύγκριση με τους μη ανταποκριθέντες ασθενείς που έλαβαν etanercept. Επιπλέον, οι ασθενείς που λαμβάνουν infliximab και adalimumab παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά ανταπόκρισης (Ramirez et al, 2012).

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

Οι Vasilopoulos et al. (2012) διεξήγαγαν μια διαφορετική μελέτη, με σκοπό να διερευνήσουν την πιθανή επίδραση πέντε πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν τον TNF-α, τον υποδοχέα I του TNF-α (TNFRSF1A) και τον υποδοχέα II του TNF-α (TNFRSF1B), στην ανταπόκριση ψωριασικών σε θεραπεία με αντι-TNF-α αναστολείς. Στην μελέτη συμμετείχαν 80 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με adalimumab, infliximab και etanercept. Οι συγγραφείς ανέλυσαν τους εξής πολυμορφισμούς: Στο γονίδιο του TNF-α τον rs361525, rs1800629 και rs1799724, στο γονίδιο του TNFRSF1A τον rs767455 και στο TNFRSF1B τον rs1061622. Τα γονοτυπικά δεδομένα έδειξαν συσχέτιση με την απόκριση στη θεραπεία μετά από 6 μήνες (Vasilopoulos, et al, 2012). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs1799724 (αλληλόμορφο C) του TNF-α και του rs1061622 (αλληλόμορφο T) του TNFRSF1B, με ανταπόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF. Η στατιστική ανάλυση του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά, αποκάλυψε τη συσχέτιση μεταξύ των γονότυπων CC για τον rs1799724 και TT για τον rs1061622, και της θετικής απόκριση στο etanercept μετά από 6 μήνες θεραπείας. Ωστόσο, αυτοί οι



πολυμορφισμοί δεν συσχετίστηκαν με απόκριση στην περίπτωση του infliximab ή του adalimumab (Vasilopoulos et al, 2012).

Οι Montes et al. (2014) πραγματοποίησαν μια μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου FcγRIIA, με την απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες σε ασθενείς που έπασχαν από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στην μελέτη συμμετείχε ένα σύνολο 429 ασθενών, οι οποίοι ακολούθησαν θεραπεία με adalimumab, infliximab και etanercept για 3, 6 και 9 μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία μικρή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού H131R (αλληλόμορφο R) και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με infliximab, αλλά όχι με τους άλλους δύο TNF-αναστολείς (Montes et al, 2014).

Η μελέτη των Montes et al. (2014), έδωσε το έναυσμα για την εκπόνηση μίας φαρμακογενετικής μελέτης συσχέτισης του πολυμορφισμού H131R του FcγRIIA με την απόκριση ψωριασικών ασθενών σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α, από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Αγγέλου Λήδα-Ξένια (2014), καθώς η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μία αυτοάνοση νόσος, η οποία εμφανίζει κοινή ανοσοπαθοφυσιολογία με την ψωρίαση. Στην μελέτη συμμετείχαν 60 ασθενείς με ψωρίαση, που έλαβαν αντι-TNF αναστολείς (adalimumab, infliximab και etanercept). Η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν etanercept έδειξε ότι υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου R και της μη ανταπόκρισης στο φάρμακο, ενώ η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν infliximab έδειξε ότι υπήρξε τάση συσχέτισης για το ίδιο αλληλόμορφο. Για το adalimumab δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

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

## 1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού V158F του γονιδίου FcγRIIIA (rs396991), με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF (adalimumab, infliximab, etanercept).

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Αιμοληψία

Στην μελέτη συμμετείχαν 65 ασθενείς με ψωρίαση, οι οποίοι ακολουθούσαν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α για 6 μήνες στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης. Αμέσως μετά την λήψη περιφερικού αίματος από τους ασθενείς, το αίμα τοποθετείται σε ειδικά σωληνάρια που περιέχουν αντιπηκτικό (EDTA). Το EDTA δεν επηρεάζει τον αριθμό και την μορφολογία των κυττάρων και η αντιπηκτική του δράση οφείλεται στην δέσμευση ιόντων  $Ca^{2+}$  του πλάσματος, τα οποία είναι απαραίτητα για την πήξη του αίματος. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται ο διαχωρισμός των έμμορφων συστατικών του αίματος από τον ορό (Nayana, 2009). Η διατήρηση των δειγμάτων έγινε στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση του DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση. Στόχος της μεθόδου είναι η ανάκτηση του DNA, που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου. Αρχικά, γίνεται διάρρηξη των μεμβρανών με την χρήση απορρυπαντικών (SDS) που δεσμεύουν τα λιπίδια και καταστρέφουν την δομή των κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA στο διάλυμα. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα πρωτεΐνάσης K, που επάγει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, (κυρίως ιστονών που είναι συνδεδεμένες με το DNA) και την αδρανοποίηση των νουκλεασών που είναι σε θέση να καταστρέψουν τα μόρια του DNA κατά την απομόνωση. Στην συνέχεια, τα υπολείμματα κυττάρων, τα θραύσματα των μεμβρανών και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Ως οργανικοί διαλύτες, χρησιμοποιούνται διαλύματα φαινόλης και χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Στην φαινόλη οφείλεται ο διαχωρισμός των φάσεων και η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται τόσο για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για την περαιτέρω χρήση του DNA, όσο και για την εκχύλιση των λιπιδίων. Στην συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, αρχικά από ισοπροπανόλη και έπειτα από αιθανόλη 70%. Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή με επαναδιάλυσή του σε  $ddH_2O$ .

#### Υλικά:

- **20X SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0):** Για την παρασκευή του διαλύματος 1X SSC γίνεται αρραίωση του πυκνού διαλύματος 20X SSC.

- **3 M Οξικό Νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa) :**  
Προστίθενται 40,8gr οξικό νάτριο σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O. Ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH<sub>3</sub>COOH. Για την παρασκευή διαλύματος οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) 0,2 M, γίνεται αραιώση του πυκνού διαλύματος 3 M
- **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate):**  
Προστίθενται 10 gr SDS σε τελικό όγκο 100 ml ddH<sub>2</sub>O. Για την παρασκευή του διαλύματος 5 % SDS, γίνεται αραιώση του διαλύματος 10% SDS
- **Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)**
- **Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v):**  
24 ml χλωροφόρμιο: 1 ml ισοαμυλική αλκοόλη
- **Διάλυμα φαινόλης**
- **Διάλυμα ισοπροπανόλης**
- **Διάλυμα αιθανόλης 70% v/v**

#### **Διαδικασία:**

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 0,5 ml δείγματος σε erpendorfs των 2ml, όπου προστίθεται 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.
2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml 1X SSC. Γίνεται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm στους 37°C.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστίθεται 0,5ml οξικού νατρίου 0,2M, 50 μl SDS 5% και 10 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55°C για περίπου 1h υπό ανάδευση.
4. Προστίθεται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorfs, προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm στους 4°C.
6. Στην συνέχεια γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs, προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης και επώαση για τουλάχιστον 20 min στους -20°C. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους 4°C για να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 70%. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm, στους 4°C.
8. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επώαση στους 55°C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.

9. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προστίθεται 100 μl ddH<sub>2</sub>O στο DNA, και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

## 2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA και των προϊόντων της PCR καθώς επιτρέπει το διαχωρισμό των τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και την στερεοδιάταξή τους. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι τα μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά τμήματα DNA, όπως αυτά που μελετάμε, κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και διανύουν απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές στο πήκτωμα χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο κατά την παρασκευή του, μία ένωση που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA. Παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας, το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να φθορίζει και έτσι μπορούμε να παρατηρήσουμε την ακριβή θέση του DNA μέσα στο πήκτωμα.

### Υλικά:

- **TAE 50X** :Tris Base 2 M  
Οξικό οξύ 7,7%  
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,05 M
- **Loading buffer 6X** : Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v  
TBE 1X (Tris Base 0,05 M, Βορικό οξύ 0,004 M, EDTA 0,002 M)  
Γλυκερόλη 8,7%
- **Αγαρόζη**
- **Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)**

### Διαδικασία:

Παρασκευή πηκτώματος:

- I. Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για την παρασκευή του πηκτώματος, τοποθετώντας τα ειδικά χτενάκια
- II. Προσθήκη 40 ml TAE 1X και 0,6 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη
- III. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
- IV. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει

- V. Προσθήκη 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου 1 mg / ml και καλή ανάδευση
- VI. Στην συνέχεια το διάλυμα ρίχνεται στο ειδικό καλούπι με τα χτενάκια, για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια του πηκτώματος
- VII. Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται μέχρι να πήξει για περίπου 30 λεπτά
- VIII. Τα χτενάκια αφαιρούνται

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης:

1. Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία έχει γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X
2. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 5μl DNA μαζί με 3μl loading buffer
3. Εφαρμόζεται τάση 100V για περίπου 20min, μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση στο πήκτωμα
4. Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή UV
5. Παρατήρηση των ζωνών και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA
6. Φωτογράφιση του πηκτώματος

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών του DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής (συνήθως 25-40) που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια (Εικόνα ):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες των μονόκλωνων αλυσίδων DNA .
3. Επιμήκυνση των εκκινητών - σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3', με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης

### Υλικά:

- **Taq πολυμεράση** (μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση). Το ένζυμο αυτό καταλύει την σύνθεση του DNA.
- Ένα **ζευγάρι εκκινητών**. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται από την Taq πολυμεράση ως εναρκτήρια τμήματα για τη σύνθεση του DNA. Σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε ο καθένας να υβριδοποιείται στο 3' άκρο των μονόκλωνων αλυσίδων του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστούν κατά την αντίδραση PCR.
- **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)**, δηλαδή dATP, dTTP, dGTP, dCTP που είναι απαραίτητα συστατικά για την σύνθεση της νέας αλυσίδας.

- **MgCl<sub>2</sub>**. Η Ταq DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg<sup>2+</sup> ως μεταλλικό συμπαράγοντα.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)**. Συνήθως ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται Tris-HCl, προκειμένου το pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στην θερμοκρασία των 72°C στην οποία επιτελείται ο πολυμερισμός, το pH πέφτει κατά μια περίπου μονάδα φθάνοντας στο 7,2, που είναι η κατάλληλη τιμή για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών.
- **DNA-μήτρα**. Πρόκειται για το DNA που περιλαμβάνει την αλληλουχία-στόχο.

Στο πρώτο στάδιο γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί, συνήθως μεταξύ 92-96°C. Μ'αυτόν τον τρόπο, το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στην συνέχεια ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65°C για περίπου 45 sec, επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>), το οποίο υπολογίζεται απ' τον τύπο:  $T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$ . Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός) σε θερμοκρασία 72°C με μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) και παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Κατά τον πολυμερισμό οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών μορίων και οι ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση του DNA γίνεται πάντοτε με κατεύθυνση 5' → 3'.

Για την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο (T<sub>a</sub>), οι συγκεντρώσεις του MgCl<sub>2</sub> και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους σταδίου. Στην PCR, η σειρά των τριών σταδίων (αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επέκταση) αποτελεί ένα κύκλο. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, συνήθως πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους. Επομένως το τμήμα του DNA-στόχου μεγεθύνεται κατά 2<sup>n</sup> (όπου n: ο αριθμός των κύκλων).

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την θερμοκρασία μεταξύ των τριών πρώτων σταδίων, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Για την ενίσχυση τμήματος, μεγέθους 987 bp, του γονιδίου FcγRIIIA, που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs396991, εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR. Στην PCR, ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε 40 φορές. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση.

Συστατικά PCR	Ποσότητες (μl)
DNA μήτρα	1μl
Buffer 10X +1.5 mM Mg	3μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0.6μl
dNTPs (10mM)	0.6μl
Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	0.3μl
Εκκινητής Reverse (50pmol/ml)	0.3μl
Taq DNA πολυμεράση(5U/μl)	0.2μl
ddH <sub>2</sub> O	24.2μl
Τελικός όγκος (VT)	30μl

Πίνακας 2: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της PCR. Η αντίδραση περιλαμβάνει 40 κύκλους.

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min
Αποδιάταξη	95°C	15 sec
Υβριδοποίηση	62°C	40 sec
Επέκταση	73°C	1 min
Τελική επέκταση	72°C	10 min

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, σε μια από τις θέσεις προστέθηκε δείκτης μοριακών βαρών (ladder), ώστε να γίνει εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR. Το προϊόν της PCR αποθηκεύεται στους -20°C.

## 2.5 Σχεδίαση εκκινητών

Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης της PCR, καθώς χωρίς λειτουργικούς εκκινητές δεν είναι δυνατόν να παραχθεί προϊόν. Τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν οι εκκινητές είναι:

1. Μοναδικότητα: Για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει αποκλειστικά ένας στόχος στη μήτρα του DNA.
2. Μήκος: το μήκος των εκκινητών επιδρά τόσο στη μοναδικότητα τους όσο και στη θερμοκρασία τήξης και υβριδοποίησής τους. Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υβριδοποιεί μόνο με το στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι



θερμοκρασίες τήξης/υβριδοποίησης. Συνήθως οι εκκινητές έχουν μήκος 17 με 35 ζεύγη βάσεων.

3. Σταθερότητα: η επιμήκυνση από την Taq πολυμεράση ξεκινά όταν η αλληλουχία στο 3' άκρο του εκκινητή υβριδοποιηθεί σταθερά στη μήτρα DNA. Για την αποφυγή υβριδοποίησης του εκκινητή σε πολλαπλά ή σε λανθασμένα σημεία, συνήθως προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δυο βάσεις G/C, και 3' άκρα με μία ή και καμία βάση G/C.

4. Σύσταση βάσεων: επηρεάζει την υβριδοποίηση, τη θερμοκρασία τήξης/πρόσδεσης και τη σταθερότητα. Προτιμώνται οι αλληλουχίες τυχαίας σύστασης, ενώ αποφεύγονται οι περιοχές πλούσιες σε A+T είτε σε G+C (μέση περιεκτικότητα σε G+C ≈50-60%).

5. Θερμοκρασία Τήξης (T<sub>m</sub>): είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA είναι δίκλινα μόρια. Η T<sub>m</sub> εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε G+C έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου, άρα και υψηλότερο T<sub>m</sub>. Μια απλή μέθοδος υπολογισμού T<sub>m</sub> για ολιγονουκλεοτίδια ≤20 βάσεις είναι η εξής:  $T_m = [(A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}]$

6. Θερμοκρασία υβριδοποίησης (T<sub>a</sub>): είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στη μήτρα του DNA. Συνήθως η T<sub>a</sub> επιλέγεται να είναι κατά 5°C μικρότερη από την μικρότερη T<sub>m</sub> και των δύο εκκινητών.

7. Εσωτερικές δομές: Μία μονόκλινη νουκλεοτιδική αλυσίδα είναι συνήθως ασταθής και δημιουργεί δευτεροταγείς δομές (δομές φουρκέτας). Η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους ή σχηματίζουν τέτοιου είδους δομές.

8. Επαναλήψεις: Μονονουκλεοτιδικές ή δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις πρέπει να αποφεύγονται καθώς δημιουργούν πρόβλημα στην σωστή σύνδεση των εκκινητών με την μήτρα DNA. Το ανώτερο επιτρεπτό όριο είναι τέσσερις επαναλήψεις μονονουκλεοτιδίων ή δινουκλεοτιδίων.

9. Συμπληρωματικότητα: Ο εμπρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες. (PremierBiosoft, 2014).

Η σχεδίαση των εκκινητών για την διαδικασία της PCR αποτέλεσε σημαντικό σημείο, καθώς τα γονίδια του γονιδιακού τόπου FcγR στη χρωμοσωμική περιοχή 1q23 προέρχονται από διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου, γεγονός που οδήγησε σε υψηλή ομοιότητα μεταξύ και των πέντε γονιδίων των υποδοχέων FcγR υψηλής συγγένειας (Su, et al, 2002). Πραγματοποιώντας BLAST μεταξύ του εξωνίου που περιέχει τον υπό μελέτη πολυμορφισμό (rs696991) και της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου FcγRIIIA, προκύπτει συγχρόνως και αντιστοιχία μεταξύ του εξωνίου και του γονιδίου FcγRIIIB. Το FcγRIIIA και το FcγRIIIB είναι μεταξύ τους παράλογα και εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιώντας BLAST μεταξύ των αλληλουχιών των δύο αυτών γονιδίων ανακαλύπτουμε την ύπαρξη 97% ομοιότητας, με εξαίρεση κάποια μεμονωμένα νουκλεοτίδια που διαφοροποιούνται στο κάθε γονίδιο. Η μεγάλη αυτή ομοιότητα έχει ως αποτέλεσμα να κάνει τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για ένα μόνο από τα δύο αυτά γονίδια αρκετά δύσκολο. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραμέτρους που πρέπει να πληρεί ένα ζεύγος

εκκινητών, καθώς και τις θέσεις στις οποίες παρατηρείται αναντιστοιχία μεταξύ των γονιδίων των FcγRIIIA και FcγRIIIB, καταλήξαμε σε ένα ειδικό ζεύγος εκκινητών, το οποίο παράγει ένα προϊόν 987bp.

**Πίνακας 3: Αλληλουχία του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση της PCR.**

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
FcV158F_FW	5'-GAACACTGCTCTGCATAAGG-3'
FcV158F_RV	5'-TCTGGAGGCTGGTGCTACA-3'

Σύμφωνα με την αλληλουχία NG\_009066.1, η οποία έχει μέγεθος 8.87kb και αντιστοιχεί στη γενωμική αλληλουχία του γονιδίου FcγRIIIA του ανθρώπου, ο εμπρόσθιος εκκινητής (FW), δεσμεύεται στα νουκλεοτίδια 5742 ως 5761 και ο ανάστροφος (RV) στα 6728 ως 6710. Ο ανάστροφος εκκινητής είναι αυτός που διασφαλίζει την ενίσχυση τμήματος αποκλειστικά του γονιδίου FcγRIIIA και όχι του παράλογου γονιδίου FcγRIIIB. Αυτό συμβαίνει γιατί στις θέσεις 6709 και 6710 της αλληλουχίας του FcγRIIIA (που αποτελούνται G και T αντίστοιχα), στις οποίες υβριδοποιείται ο ανάστροφος, δεν εμφανίζεται ομολογία μεταξύ των δύο γονιδίων. Αυτό το γεγονός οδηγεί στην ανικανότητα προσθήκης νουκλεοτιδίων από την Taq πολυμεράση στον εκκινητή RV, ο οποίος υβριδοποιείται μη ειδικά στο γονίδιο FcγRIIIB. Επομένως, συμπεραίνουμε πως το παραγόμενο προϊόν της PCR, το οποίο είναι το τμήμα που ενισχύεται μεταξύ του FW και του RV, προέρχεται αποκλειστικά από το γονίδιο FcγRIIIA. Πρέπει να επισημανθεί, πως σημαντικό εργαλείο κατά την σχεδίαση των εκκινητών, αποτέλεσε η ιστοσελίδα του NCBI (National Center for Biotechnology Information), από όπου και ανακτήθηκαν οι γενωμικές αλληλουχίες των γονιδίων.



**Εικόνα 14:** Απεικόνιση τμημάτων των αλληλουχιών των γονιδίων FcγRIIIA και FcγRIIIB, μεταξύ των οποίων έχει πραγματοποιηθεί BLAST. Στην εικόνα φαίνεται η μεγάλη ομοιότητα που υπάρχει μεταξύ τους, καθώς και κάποια σημεία αναντιστοιχίας (γκρι χρώμα). Με μωβ συμβολίζεται ο υπό μελέτη πολυμορφισμός (rs396991). Επιπλέον παρατίθεται και η αλληλουχία των εκκινητών (με

κόκκινο συμβολίζεται ο FW και με πράσινο ο RV). Να σημειωθεί πως το βέλος συμβολίζει την πολύ σημαντική αναντιστοιχία εντός της θέσης υβριδοποίησης του RV, η οποία διασφαλίζει την παραγωγή προϊόντος αποκλειστικά από το γονίδιο FcγRIIIA και όχι από το παράλογο FcγRIIIB. (Με τελείες συμβολίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων που δεν εμφανίζεται στην εικόνα).

## 2.6 Αλληλούχηση (Sequencing)

Αρχικά πραγματοποιείται καθαρισμός των προϊόντων PCR που πρόκειται να σταλούν για αλληλούχηση, προκειμένου να απομακρυνθούν εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση και άλατα που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα και ίσως προκαλέσουν προβλήματα στη διαδικασία της αλληλούχησης. Τα προϊόντα της PCR επεξεργάζονται με το κιτ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας MACHEREY-NAGEL.

Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικά plates και στέλνονται στην Κορέα, όπου πραγματοποιείται η αλληλούχηση τους από την εταιρία MacroGen.

## 2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού rs396991 του γονιδίου FcγRIIIA έγινε διαχωρισμός των ανταποκριθέντων και των μη ανταποκριθέντων ασθενών στη θεραπεία. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ετερόζυγοι και ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό V158F (G>T) και χρησιμοποιώντας πίνακες με διαστάσεις 2x2 υπολογίστηκε η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G. Για την δοκιμή της ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε το τεστ  $\chi^2$ , ενώ η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία έγινε με το τεστ Cochran–Armitage. Επίσης, εκτελέστηκαν και άλλα τεστ για τα οποία βασίζονται στην υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του κοινού αλληλομόρφου G. Για τη στατιστική ανάλυση το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε  $P < 0,05$ .

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Ασθενείς

Τα στατιστικά στοιχεία των ψωριασικών ασθενών που εξετάστηκαν καταγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ψωρίαση που έλαβαν μέρος στη μελέτη (n=65).

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος ± ΤΑ*	43.24±12.65
Φύλο Α/Θ	30/35
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος ± ΤΑ*	14.3±11.2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος ± ΤΑ*	35.4±13.2
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	27/65 (41.5%)
Αρχικό PASI, μέσος ± ΤΑ*	18.52±7.35
PASI στους 6 μήνες, μέσος ± ΤΑ*	3.75±2.10
Ανταποκριθέντες, ποσοστό	50 (77%)
Μη-ανταποκριθέντες, ποσοστό	15 (23%)
<b>Παράγοντες Anti-TNF</b>	
Enbrel	60% (Ανταποκριθέντες: 79.5%)
Remicade+Humira	40% (Ανταποκριθέντες: 73%)

\*ΤΑ = Τυπική απόκλιση

Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν 65 (n=65). Τα δείγματα αυτά προήλθαν από 59 ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Η δυσαναλογία αυτή μεταξύ δειγμάτων και ασθενών οφείλεται στο ότι κάποιοι ασθενείς έλαβαν δύο διαφορετικές θεραπείες με αποτέλεσμα να υπολογίζονται σαν δύο ξεχωριστά δείγματα. Από τα άτομα που συμμετείχαν, οι 30 ήταν άντρες ενώ οι 35 γυναίκες, επιβεβαιώνοντας την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα και η μέση ηλικία τους ήταν τα 43,24 έτη. Η εμφάνιση της νόσου έγινε κατά μέσο όρο στα 35,4 έτη και η μέση διάρκειά της υπολογίστηκε στα 14,3 έτη. Οι 27 από τους ψωριασικούς ασθενείς εμφάνιζαν συν-νοσηρότητα, κυρίως κάποιο μεταβολικό σύνδρομο και καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο δείκτης PASI των ασθενών πριν από την λήψη της θεραπείας με παράγοντες αντι-TNF υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στο 18,52, ενώ μετά τη λήψη τους στο 3,75.

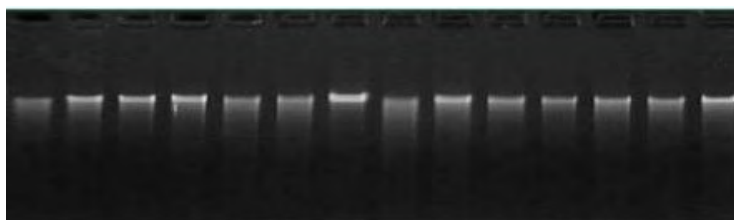
Από τους 65 συνολικά ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη, οι 39 (60%), υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο Enbrel (etanercept) και οι 26 (40%) σε θεραπεία με το φάρμακο Remicade (infliximab) ή με το Humira (adalimumab). Το Remicade και το Humira

αποτελούν μονοκλωνικά αντισώματα και λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων, στην παρούσα μελέτη ομαδοποιήθηκαν μαζί.

Από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο Enbrel ανταπόκριση είχαν οι 31 (79,5%), ενώ στα φάρμακα Remicade ή Humira ανταποκρίθηκαν θετικά οι 19 (73%).

### 3.2. Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

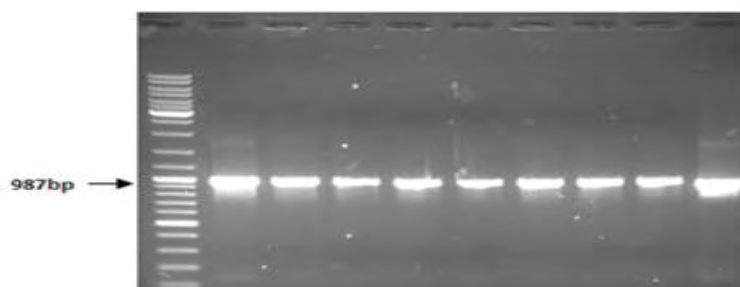
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από όλους τους ασθενείς από κύτταρα του περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8% w/v. Σύμφωνα με την εικόνα που προκύπτει ύστερα από έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία, κρίνεται αν το γενωμικό DNA που εξήχθη είναι ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω διαδικασίες (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% w/v.

### 3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

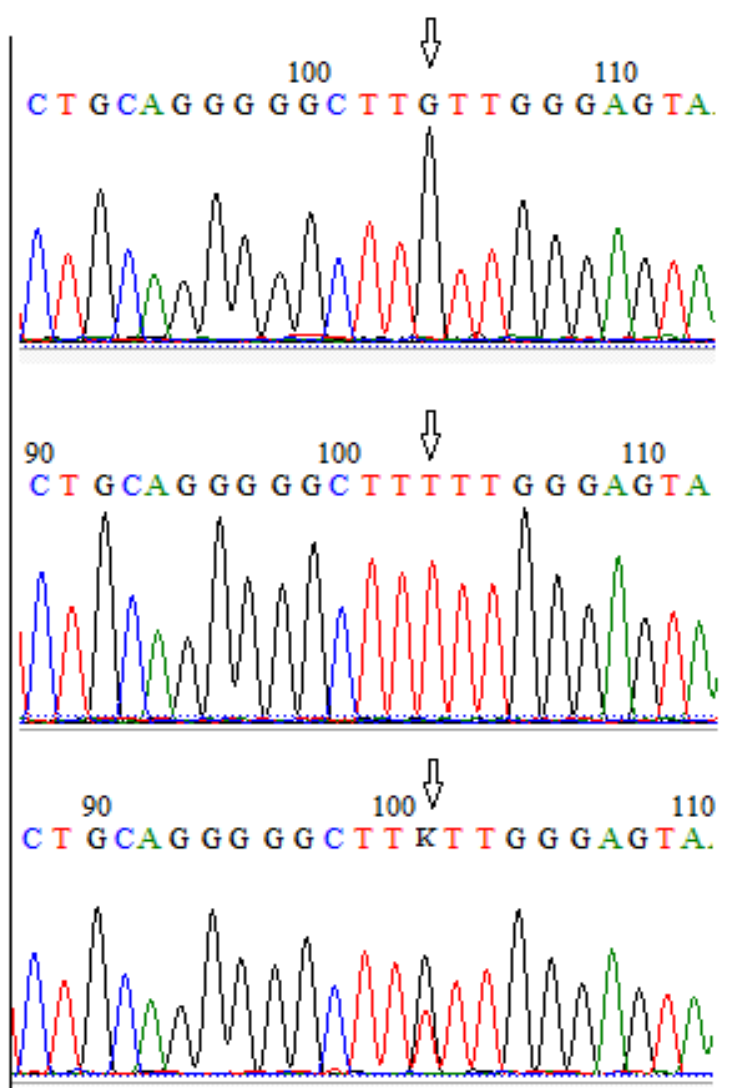
Το τμήμα του γονιδίου FcγRIIIA, το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό V158F (rs396991) ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR. Στην συνέχεια, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5% w/v, για να πιστοποιηθεί η παρουσία και η ποσότητα του προϊόντος, αλλά και η ύπαρξη παραπροϊόντων. Στην Εικόνα 16, απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR, μεγέθους 987bp. Στην πρώτη θέση από αριστερά, εμφανίζεται ο δείκτης μοριακών βαρών (ladder).



Εικόνα 16. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR (μεγέθους 987 bp) σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v.

### 3.4 Αλληλούχηση

Τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρία Macrogen, με αποτέλεσμα την ανάκτηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ενισχυμένου τμήματος με τη μορφή χρωματογραφήματος. Στην Εικόνα 17, παρουσιάζονται τρία διαφορετικά χρωματογραφήματα, στα οποία εμφανίζεται ο πολυμορφισμός rs396991 (Εικόνα 17. Βέλος). Μέσω των κορυφών του χρωματογραφήματος, αλλά και του διαφορετικού χρώματος του κάθε νουκλεοτιδίου, είμαστε σε θέση να αναγνωρίσουμε την ύπαρξη ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας στον υπό μελέτη πολυμορφισμό. Επομένως είναι εύκολο να αντιληφθούμε πως το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G (GG), το δεύτερο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T (TT) και το τρίτο σε ετεροζυγωτία (GT).



Εικόνα 17: Απεικόνιση τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR με τη μορφή χρωματογραφήματος. Το βέλος προσδιορίζει τον πολυμορφισμό rs396991. Να σημειωθεί πως το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G (GG), το δεύτερο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T (TT) και το τρίτο σε ετεροζυγωτία (GT).

### 3.5 Γονοτύπηση

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων έγινε μέσω των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση όλων των προϊόντων της PCR. Στον Πίνακα 4, εμφανίζεται η κωδική ονομασία του κάθε ασθενούς, καθώς και ο αντίστοιχος γονότυπος.

**Πίνακας 4: Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες αντι-TNF.**

Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος
1	G/T
2	G/T
3	G/T
4	G/T
5	G/T
6	T/T
7	G/G
8	T/T
9	G/T
10	T/T
11	G/G
12	T/T
14	G/T
15	G/G
16	G/T
17	T/T
18	G/T
19	G/T
20	G/T

Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος
21	G/T
22	T/T
23	T/T
24	G/T
25	T/T
26	G/T
28	G/G
40	G/G
73	T/T
74	G/G
75	T/T
76	G/T
79	G/T
80	G/G
81	T/T
82	G/T
88	T/T
92	T/T

Κωδικός Ασθενούς	Γονότυπος
10	G/T
20	G/G
30	G/T
40	G/G
50	T/T
70	G/G
80	G/T
90	T/T
100	G/G
110	G/T
130	G/T
140	G/T
150	T/T
160	G/G
230	G/T
310	G/T
400	T/T
2K	G/T
3K	G/T
47K	G/G
110K	G/G
130K	G/T

### 3.6 Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs396991 στο FcγRIIIA με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία

Στους Πίνακες 5, 6 και 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης του πολυμορφισμού rs396991 στο γονίδιο FcγRIIIA με την ανταπόκριση στη θεραπεία τόσο για το σύνολο των παραγόντων αντι-TNF-α, όσο και για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά. (Να σημειωθεί πως το Humira και το Remicade ομαδοποιήθηκαν μαζί).

**Πίνακας 5: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για όλους τους ασθενείς (n=65) που έλαβαν παράγοντες αντι-TNF-α. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με την ανταπόκριση ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.**

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIIA V158F (G&gt;T) (rs396991)</b>	Genotypic [GG/GT/TT]	14/26/10	1/5/9	0.099
	Cochran- Armitage [G/T]	54/46 (0.54)	7/23 (0.23)	<b>0.0035</b>
	Επικρατών [(GG+GT)/TT]	40/10	6/9	<b>0.0073</b>
	Υπολειπόμενο [TT/(GT+GG)]	14/40	1/14	0.1593

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γονοτύπησης, αλλά και της μεταβολής του δείκτη PASI που υπολογίστηκε για όλους τους ασθενείς διαμορφώθηκε ο παραπάνω πίνακας (Πίνακας 5), στον οποίο το σύνολο των ασθενών που έλαβαν μέρος στην μελέτη, χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες (PASI>75%) και μη-ανταποκριθέντες (PASI<50%) σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF (etanercept, infliximab και adalimumab). Όσον αφορά τους ανταποκριθέντες ασθενείς, η γονοτύπηση έδειξε ότι 14 από αυτούς ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, 10 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T και 26 ετερόζυγοι. Η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G του πολυμορφισμού rs396991 στους ανταποκριθέντες είναι 0,54 (Πίνακας 5). Όσον αφορά τους μη-ανταποκριθέντες, η γονοτύπηση έδειξε ότι μόνο 1 από αυτούς ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο G, 9 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T και 5 ετερόζυγοι. Η συχνότητα του αλληλομόρφου G στους μη-ανταποκριθέντες υπολογίστηκε στο 0,23 (Πίνακας 5).

Το αλληλόμορφο G εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα (σχεδόν διπλάσια) στους ανταποκριθέντες ασθενείς σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων των δύο ομάδων με το τεστ Cochran-Armitage έδειξε



στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $p=0,0035$ ), ως προς τη συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία με τους παράγοντες αντι-TNF.

Επιπλέον, το ρίσκο εμφάνισης του αλληλομόρφου G σε έναν ανταποκριθέντα ασθενή είναι: Odds Ratio=3.857. Σύμφωνα με αυτό, υπάρχει περίπου 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα, ένας ασθενής που παρουσιάζει ανταπόκριση στην θεραπεία να φέρει το αλληλόμορφο G.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος βάσει της υπόθεσης επικρατούς ή υπολειπόμενης δράσης του αλληλομόρφου G, ο οποίος επίσης έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα για την επικρατή δράση του συγκεκριμένου αλληλομόρφου ( $p=0,0073$ ) (Πίνακας 5).

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την ανάλυση για το σύνολο των ασθενών, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs396991 και συγκεκριμένα του αλληλομόρφου G, με την απόκριση σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF.

Στους Πίνακες 6 και 7 παρουσιάζεται συνοπτικά η ανάλυση της συσχέτισης για κάθε φάρμακο ξεχωριστά.

**Πίνακας 6: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς (n=26) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Remicade ή Humira. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με την ανταπόκριση ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.**

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcγRIIIA V158F (G&gt;T) (rs396991)</b>	Genotypic [GG/GT/TT]	6/7/6	0/3/4	0.559
	Cochran- Armitage [G/T]	19/19 (0.5)	3/11 (0.27)	0.112
	Επικρατών [(GG+GT)/TT]	13/6	3/4	0.369
	Υπολειπόμενο [TT/(GT+GG)]	6/13	0/7	0.145

Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα αποτελέσματα για την ομάδα ασθενών που έλαβαν είτε το φάρμακο Remicade, είτε το φάρμακο Humira. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα πλαίσια αυτής της εργασίας τα δύο αυτά φάρμακα ομαδοποιήθηκαν μαζί, κυρίως λόγω του πολύ μικρού αριθμού δειγμάτων, που θα δυσκόλευε την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά τη συσχέτιση του υπό μελέτη πολυμορφισμού με την ανταπόκριση στο κάθε φάρμακο ξεχωριστά.

Από τους 26 ασθενείς που έλαβαν ένα από τα δύο φάρμακα, 19 άτομα ανταποκρίθηκαν ενώ 7 δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, από τους ανταποκριθέντες ασθενείς, οι 6 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, οι 6 ομόζυγοι για το

αλληλόμορφο T και οι 7 ήταν ετερόζυγοι, ενώ από τους μη-ανταποκριθέντες κανένας δεν ήταν ομόζυγος για το αλληλόμορφο G, 4 ήταν ομόζυγοι για το T και 3 ήταν ετερόζυγοι. Η συχνότητα του αλληλομόρφου G εμφανίζεται αυξημένη στους ανταποκριθέντες ασθενείς (0,5) σε σχέση με του μη-ανταποκριθέντες (0,27). Παρόλα αυτά το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό ( $p=0,112$ ), πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων ( $n=26$ ).

**Πίνακας 7: Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς ( $n=39$ ) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Enbrel. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά ανάλογα με την ανταπόκριση ή όχι στη θεραπεία, σύμφωνα με τον δείκτη PASI.**

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη- ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
<b>FcyRIIIA V158F (G&gt;T) (rs396991)</b>	Genotypic [GG/GT/TT]	8/19/4	1/2/5	0.153
	Cochran- Armitage [G/T]	35/27 (0.56)	4/12 (0.25)	<b>0.0036</b>
	Επικρατών [(GG+GT)/TT]	27/4	3/5	<b>0.0089</b>
	Υπολειπόμενο [TT/(GT+GG)]	8/23	1/7	0.653

Σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων για την ομάδα ασθενών που έλαβε το φάρμακο Enbrel. Όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 7, από τους 39 ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο ανταποκρίθηκαν οι 31, ενώ μόλις 8 δεν ανταποκρίθηκαν. Από τους ανταποκριθέντες ασθενείς, οι 8 ήταν ομόζυγοι για το αλληλόμορφο G, οι 4 ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T και οι 19 ήταν ετερόζυγοι, ενώ από τους μη-ανταποκριθέντες, 1 ήταν ομόζυγος για το G, 5 ήταν ομόζυγοι για το T και 2 ήταν ετερόζυγοι.

Όσον αφορά τις αλληλομορφικές συχνότητες, η στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων μεταξύ ανταποκριθέντων και μη-ανταποκριθέντων με το τεστ Cochran-Armitage, έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $p=0,0036$ ), ως προς τη συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Enbrel.

Επιπλέον, και η δοκιμή για την επικρατή δράση του αλληλομόρφου G δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $p=0,0089$ ).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός rs396991 εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στο φάρμακο Enbrel. Σαφώς, αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

## 4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού V158F (rs396991) του γονιδίου FcγRIIIA, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α (etanercept, infliximab και adalimumab). Αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 65 ασθενών με ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με αναστολείς TNF-α για 6 μήνες. Στην συνέχεια ακολούθησε ενίσχυση τμήματος 987bp του γονιδίου FcγRIIIA, το οποίο περιείχε τον υπό μελέτη πολυμορφισμό με την μέθοδο της PCR και γονοτυπική ανάλυση των ασθενών μετά από αλληλούχηση.

Η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs396991 με την ανταπόκριση των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν παράγοντες αντι-TNF έδειξε:

- Σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το σύνολο των παραγόντων αντι-TNF ( $P=0,0035$ ), (Πίνακας 5)
- Επικρατή δράση του του αλληλομόρφου G ( $P=0,0073$ ), (Πίνακας 5)
- Σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την ανταπόκριση στη θεραπεία με το φάρμακο Enbrel ( $P=0,0036$ ), (Πίνακας 7)
- Καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού rs396991 με την ανταπόκριση στην θεραπεία με τα φάρμακα Remicade ή Humira (Πίνακας 6)

Συμφώνα με τα στατιστικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, η σημαντική συσχέτιση που εμφανίζεται μεταξύ του πολυμορφισμού rs396991 και της ανταπόκρισης στο σύνολο των παραγόντων αντι-TNF, προφανώς οφείλεται στην παρουσία του φαρμάκου Enbrel και όχι στα άλλα δύο φάρμακα. Η παρατήρηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού μόνο με την ανταπόκριση στο Enbrel και όχι με τους άλλους βιολογικούς παράγοντες πιθανώς σχετίζεται με το μεγαλύτερο αριθμό ασθενών που έλαβαν την συγκεκριμένη θεραπεία. Συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα, με την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων να ταυτοποιηθεί τελικά συσχέτιση και με τους άλλους παράγοντες.

Εναλλακτικά, η παρατηρούμενη συσχέτιση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το Enbrel αποτελεί το μοναδικό από τους παράγοντες αντι-TNF που δεσμεύει μόνο τον διαλυτό TNF και όχι τον TNF που βρίσκεται στις μεμβράνες των ανοσοκυττάρων. Τα επίπεδα του διαλυτού TNF στον οργανισμό είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά του μεμβρανικού TNF. Πιθανώς, αυτή η διαφοροποίηση να συμβάλλει στην θετική ανταπόκριση για τον συγκεκριμένο παράγοντα, καθώς, το Enbrel δεσμεύοντας τον διαλυτό TNF επάγει εντονότερη καταστολή της φλεγμονής στις ψωριασικές αλλοιώσεις σε σχέση με τα άλλα δύο μονοκλωνικά αντισώματα Remicade και Humira.

Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από τα αποτελέσματα είναι η επικρατής δράση του αλληλομόρφου G (Πίνακας 5), η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με αυτά, στο γονίδιο FcγRIIIA ο πολυμορφισμός rs396991 στη θέση 559 (G>T), προωθεί μια αμινοξική αντικατάσταση από βαλίνη (V) σε φαινυλαλανίνη (F) στη θέση 158. Η αντικατάσταση αυτή, πραγματοποιείται στην δεύτερη εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα και φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα

την δέσμευση των προσδετών. Συγκεκριμένα το κοινό αλληλόμορφο G, κωδικοποιεί υποδοχείς υψηλής δεσμευτικής ικανότητας, ενώ το αλληλόμορφο T, υποδοχείς με χαμηλή δεσμευτική ικανότητα (Li et al, 2009). Αυτός είναι ίσως και ο λόγος που το αλληλόμορφο G εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες, καθώς τα φάρμακα αυτά, μέσω του Fc τμήματος της IG1 που φέρουν, είναι σε θέση να συνδέονται με υψηλότερη συγγένεια στους υποδοχείς FcγRIIIA που περιέχουν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο.

Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της έρευνας αυτής θα πρέπει να γίνει με προσοχή και επιφύλαξη, καθώς παρόλο που οι τιμές των αποτελεσμάτων της ανάλυσης είναι στατιστικά σημαντικές, το δείγμα των ασθενών είναι σχετικά μικρό για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs396991 με την ανταπόκριση στη θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί, πως διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την συσχέτιση πολυμορφισμών των γονιδίων των Fcγ υποδοχέων με απόκριση σε θεραπεία με αντι-TNF και για άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, εκτός της ψωρίασης.

Σημαντικές φαρμακογενετικές μελέτες συσχέτισης πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι Zhang et al. (2014), επισημάναν την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs396991 του γονιδίου FcγRIIIA, και ειδικότερα του κοινού αλληλομόρφου G με την απόκριση σε αντι-TNF παράγοντες. Επιπλέον, οι Montes et al. (2014) πραγματοποίησαν μια μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου FcγRIIA, με την απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, έδειξαν μία μικρή συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου R και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με infliximab, αλλά όχι με τους άλλους δύο TNF-αναστολείς.

Η έρευνα, μάλιστα, των Montes et al. (2014), ήταν η αφορμή για την διεξαγωγή μιας μελέτης συσχέτισης του πολυμορφισμού H131R (rs1801274) του FcγRIIA με την απόκριση ψωριασικών ασθενών σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α, από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Αγγέλου Λ. (2014). Η στατιστική ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν etanercept, έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου R και της μη ανταπόκρισης στο φάρμακο, ενώ η ανάλυση για τους ασθενείς που έλαβαν infliximab έδειξε την ύπαρξη τάσης συσχέτισης για το ίδιο αλληλόμορφο. Για το adalimumab δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Στην παρούσα φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης του rs396991 με την ανταπόκριση σε θεραπεία ψωριασικών με παράγοντες αντι-TNF, το μικρό δείγμα των ασθενών αποτέλεσε μειονέκτημα στη στατιστική ανάλυση. Γι' αυτόν τον λόγο, μελλοντικό στόχο αποτελεί η επαλήθευση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, καθώς και η συνδυαστική μελέτη του rs396991 με τον rs1801274 και η κατασκευή απλοτύπων για την διερεύνηση της συνδυαστικής δράσης τους, στην απόκριση των ασθενών στους αντι-TNF παράγοντες, όπως αναφέρει και πρόσφατη βιβλιογραφία (Julia et al, 2013).

# Βιβλιογραφία

1. Anderson P. (2005). Tumor Necrosis Factor Inhibitors: Clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum*, 34: 19-22
2. Anderson R (2003). "Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses". *Adv. Virus Res.* 59: 229–74
3. Breunis W., Mirre E., Geissler J., Laddach N., Wolbink G., Schoot E., Haas M., Boer M., Roos D. and Kuijpers T. (2009). Copy Number Variation at the FCGR Locus Includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Human Mutation* 30: 640-650
4. Cartron G., Watier H. and Colombat P. (2007). FCGR3A genotype and methods for evaluating treatment response to non-depleting antibodies. Patent Application Publication :1-10
5. De Rosa G. and Mignogna C. (2007). The histopathology of psoriasis. *Reumatismo. Suppl* 1:46-8
6. Di Meglio P., Perera G. and Nestle F. (2011). The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. Volume 35, Issue 6, 857–869
7. Dika E., Bardazzi F., Balestri R. and Maibach H. (2007). Environmental factors and psoriasis. *Curr Probl Dermatol* 35: 118-35
8. Dubois-Declerc S. and Pouliot R. (2013). Promising New Treatments for Psoriasis. *The Scientific World Journal* Volume 2013, Article ID 980419
9. Fan X., Yang S, Huang W., Wang Z., Sun L.,Liang Y., Gao M., Ren Y., Zhang K., Du W., Shen Y., Liu J. and Zhang X. (2008). Fine Mapping of the Psoriasis Susceptibility Locus PSORS1 Supports HLA-C as the Susceptibility Gene in the Han Chinese Population. *PLoS Genet.* Mar 4(3): e1000038
10. Giacomini K., Brett C., Altman R., Benowitz N., Dolan M., Flockhart D., Johnson J., Hayes D., Klein T., Krauss R., Kroetz D., McLeod H., Nguyen A., Ratain M., Relling M., Reus R., Roden D., Schaefer C., Shuldiner A., Skaar T., Tantisira K., Tyndale F., Wang L., Weinshilboum R., Weiss S. and Zineh I. (2007). The Pharmacogenetics Research Network: From SNP Discovery to Clinical Drug Response. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 81, 328–345
11. Gillis C., Gouel-Chéron A., Jonsson F. and Bruhns P. (2014). Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies. *Front Immunol* 5: 254
12. 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
13. Hani A., Shahzad M., Al-Marshood A., Khalil A., Settin A. and Barrimah I. (2010). Genetic Background of Psoriasis. *Int J Health Sci (Qassim)* 4(1): 23–29
14. Hani A. and Qureshi M.G. (2013). Pathophysiology of Psoriasis: Current Concepts. *Hermenio Lima*, ISBN 978-953-51-1065-1

15. Helms C., Cao L., Krueger JG., Wijsman EM., Chamian F., Gordon D., Heffernan M., Daw JA., Robarge J., Ott J., Kwok PY., Menter A. and Bowcock AM. (2003). A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet.* 35(4):349-56
16. Henseler T., Christophers E. (1985). Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* 13:450–6
17. Hert M. (2011). *Autoimmune Diseases of the Skin: Pathogenesis, Diagnosis, Management.* Springer Wien New York ISBN 978-3-211-99224
18. Higgins E. (2000). Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 25(2):107-10
19. Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S., Tsukamoto S. and Shimoda T. (2010). Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49:1215–1228
20. Hunt S. (2008) Pharmacogenetics, personalized medicine, and race. *Nature Education* 1(1):212
21. Indik Z., Park J, Hunter S. and Schreiber A. (1995). The Molecular Dissection of Fc $\gamma$  Receptor Mediated Phagocytosis. *Blood*, Vol 86, No 12 : 4389-4399
22. Karabudak A. and Dogan B. (2012). Management of guttate psoriasis in patients with associated streptococcal infection. *Psoriasis: Targets and Therapy* 2: 89–94
23. Kim G. and Del Rosso J. (2010). Drug-Provoked Psoriasis: Is It Drug Induced or Drug Aggravated: Understanding Pathophysiology and Clinical Relevance. *J Clin Aesthet Dermatol.* 3(1): 32–38
24. Kimball Alexa B., Gladman Dafna,, Joel M. Gelfand, Kenneth Gordon, Elizabeth J. Horn, , Neil J. Korman, Gretchen Korver, Gerald G. Krueger, Bruce E. Strober and Mark G. Lebwohl (2008). National Psoriasis Foundation Clinical Consensus on Psoriasis Co-morbidities and Recommendations for Screening. *J Am Acad Dermatol* 58(6): 1031–1042
25. Kindt T., Osborne B. and Goldsby R. (2007). *Kuby Immunology.* W.H Freeman Company
26. Koene H., Kleijer M., Algra J., Roos D, Borne A. and Haas M.(1997). Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 90(3):1109-14
27. Krueger J. (2002). The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 46:1-23
28. Langley B., Krueger G. and Griffiths M. (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum (Suppl II):*18–23
29. Lee M. and Kalb R. (2008). Systemic Therapy for Psoriasis. *Dermatology Nursing.* 20(2):105-111
30. Li X., Ptacek T., Brown E. and Edberg J. (2009). Fc $\gamma$  Receptors: Structure, Function and Role as Genetic Risk. Factors in SLE. *Genes Immun.* 10(5): 380–389
31. Lima E. and Lima M. (2011). Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol.* 86(6): 1151-8
32. Lowes MA., Bowcock AM., Krueger JG. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-73

33. Mak R., Hundhausen C. and Nestle F.O. (2009). Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 100(Suppl 2): 2–13
34. Martin A., Padgett J. and Mayo K. (2011). Koebner Phenomenon. Volume 51 Issue 6
35. Matsuda S. and Koyasu S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47:119–1
36. Mellor J., Brown M., Irving H., Zalcborg J. and Dobrovic A. (2013). A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 6:1
37. 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 guide-lines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58(5):826–850
38. Montes A., Perez-Pampin E., Narváez J., Canete J., Navarro-Sarabia F., Moreira V., Fernández-Nebro A. Ordóñez M., Serna A., Magallares B., Vasilopoulos Y., Sarafidou T., Caliz R., Ferrer M., Joven B., Carreira P., Gómez-Reino J. and Gonzalez A. (2014), Association of FCGR2A with the response to infliximab treatment of patients with rheumatoid arthritis Volume 24 Issue 5 p 238-245
39. Munde E., Okeyo W., Anyona S., Raballah E., Konah S., Okumu W., Ogonda L., Vulule J. and Collins O. (2012). Polymorphisms in the Fc Gamma Receptor IIIA and Toll-Like Receptor 9 Are Associated with Protection against Severe Malarial Anemia and Changes in Circulating Gamma Interferon Levels. *Infect Immun.* 80(12): 4435–4443
40. National Psoriasis Foundation (1996-2014). Systemic medications for psoriasis and psoriatic arthritis, including biologics. (<http://www.psoriasis.org/page.aspx.pid=455>)
41. Nayana P. (2009). Why is EDTA the anticoagulant of choice for hematology use. Volume 7, No. 1
42. Nimmerjahn F. and Ravetch J. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8: 34-47
43. O'Neill J. and Feldman S. (2010). Vitamine D analogue-based therapies for psoriasis. *Drugs of Today* 46(5):351-360
44. Pardasani A., Felldman S. and Clark A.(2000). Treatment of Psoriasis: An Algorithm-Based Approach for Primary Care Physicians.*Am Fam Physician* 1 61(3):725-733
45. PremierBiosoft, 1994-2014. Premier Biosoft. [Online] Available at: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.htm](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.htm) [Accessed 2014]
46. Prieto-Perez, R., Cabaleiro, T., Dauden, E. and Abad-Santos, F. (2013). Genetics of Psoriasis and Pharmacogenetics of Biological Drugs. *Autoimmune Diseases*, Volume 2013, p. 13
47. Ramirez J., Fernandez-Sueiro J., Lopez R., Montilla C., Suarez B., Moll C., Rodriguez R., Blanco F., Alsina M., Sanmarti R., Lozano F. and J Canete J. (2010). Influence of variants of Fcγ receptor IIA on the European league against rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in psoriatic arthritis. *Journal of Translational Medicine* 8 (Suppl 1):P38

48. Ramirez J., Fernandez-Sueiro J., Lopez R., Montilla C., Arias M., Moll C., Alsina M., Sanmarti R., Lozano F. and Canete J. (2012). FCGR2A/CD32A and FCGR3A/CD16A Variants and EULAR Response to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Blockers in Psoriatic Arthritis: A Longitudinal Study with 6 Months of Followup. *J Rheumatol* 39:1035-1041
49. Roberson E. and Bowcock A. (2010). Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet.* 26(9): 415–423
50. Rosales C. and Uribe-Querol E. (2013). Fc receptors: Cell activators of antibody functions *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4 21-33
51. Sabat R., Phillip S., Hoflich C., Kreutzer S., Wallace E., Asadullah K., Volk H., Sterry W. and Wolk K. (2007). Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental Dermatology* 16: 779–798
52. Schon M. and Boehncke H. (2005). Medical progress:Psoriasis. *N Engl J Med* 352:1899-912
53. Sivamani R.,Correa G., Ono Y., Bowen.,Raychaudhuri S. and Maverakis E. (2010). BIOLOGICAL THERAPY OF PSORIASIS. *Indian J Dermatol.* 55(2): 161–170
54. Stoff B. and Menter A. (2010).PSORIASIS. Manson Publishing Ltd. ISBN: 978-1-84076-122-1
55. Su K., Wu J., Edberg J., McKenzie E. and Kimberly R. (2002). Genomic organization of classical human low-affinity Fc $\gamma$  receptor genes. *Genes Immun* 3, p. 51–6
56. Sullivan J. and Preda V. (2009). Treatments for severe psoriasis. *Aust Prescr.* 32:14–18
57. Vasilopoulos Y., Manolika M., Zafiriou E., Sarafidou T., Bagiatis V., Kruger-Krasagaki S., Tosca A., Patsatsi A., Sotiriadis D., Mamuris Z. and Roussaki-Schulze A. (2012). Pharmacogenetic Analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B Gene Polymorphisms and Prediction of Response to Anti-TNF Therapy in Psoriasis Patients in the Greek Population. *Mol Diagn Ther* 15 (6): 1-6
58. Veal C., Capon F., Allen M. , Heath E, Evans J., Jones A., Patel S., Burden D., Tillman D., Barker J. and Trembath R. (2002). Family-Based Analysis Using a Dense Single-Nucleotide Polymorphism–Based Map Defines Genetic Variation at PSORS1, the Major Psoriasis-Susceptibility Locus. *Volume 71, Issue 3, Pages 554–564*
59. Wagner E., Schonthaler H., Viniestra J. and Tschachler E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 704-714
60. Weinblatt M., Keystone E., Furst D., Moreland L., Weisman M., Birbara C., Teoh L., Fischkoff S. and Chartash E. (2003). Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate. *Arthritis & Rheumatism.* Volume 48, Issue 1, pages 35–45
61. Weinstein G. and Gottlieb A. (2001).Therapy of Moderate-to-Severe-Psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 45:487-9
62. Weischer M., Blum A., Eberhard F., Rocken M. and Berneburg M. (2004). No Evidence for Increased Skin Cancer Risk in Psoriasis Patients Treated with Broadband or Narrowband UVB Phototherapy: A First Retrospective Study. *Acta Derm Venereol* 84: 370–374



63. Winterfield L., Menter A., Gordon K. and Gottlieb A. (2005). Psoriasis treatment: current and emerging directed therapies. *Ann Rheum Dis* 64 (Suppl II):ii87–ii90
64. Wojtal K., Rogler G., Scharl M., Biedermann L., Frei P., Fried M., Weber A., Eloranta J., Kullak-Ublick G. and Vavricka S. (2012). Fc Gamma Receptor CD64 Modulates the Inhibitory Activity of Infliximab. DOI: 10.1371/journal.pone.0043361
65. Wu J., Edberg J. and Redecha P. (1997). A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*, pp. 1059-70
66. Wu Y., Ding Y., Tanaka Y., Shen L., Wei C., Minato N. and Zhang W. (2014). γδ T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *Int J Biol Sci* 10(2):119-135
67. Yost J. and Gudjonsson J. (2009). The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy. New implications for associated comorbidities. *F1000 Medicine Reports*, 1:30
68. Zangeneh F.Z. and Shooshtary F.S. (2013). Psoriasis — Types, Causes and Medication. Hermenio Lima, ISBN 978-953-51-1065-1
69. Zhang R., Luan M., Shang Z., Duan L., Tang G., Shi M., Lv W., Zhu H., Li J., Hongchao L., Zhang M., Liu G., Chen H. and Jiang Y. (2014). RADB: a database of rheumatoid arthritis-related polymorphisms. *Oxford Journals. Database. Volume 2014*. 10.1093/database/bau090
70. Αγγέλου Λ. (2014). Φαρμακογενετική Μελέτη Συσχέτισης Πολυμορφισμών στον Υποδοχέα FcγRIIA με την Απόκριση Ψωριασικών Ασθενών στη Θεραπεία με Βιολογικούς Παράγοντες TNFα. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ. Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
71. Κοσμαδάκη Μ., Αντωνίου Χ., Αυγερινού Γ., Στρατηγός Α.Ι., Σταυρόπουλος Π., Ποτουρίδου Ε., Πολυδώρου Α., Στεφανάκη Ε., Κατσάμπας Α., (2007). Ψωρίαση: Θεραπευτικός οδηγός. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 18:2 161-173
72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=2214>