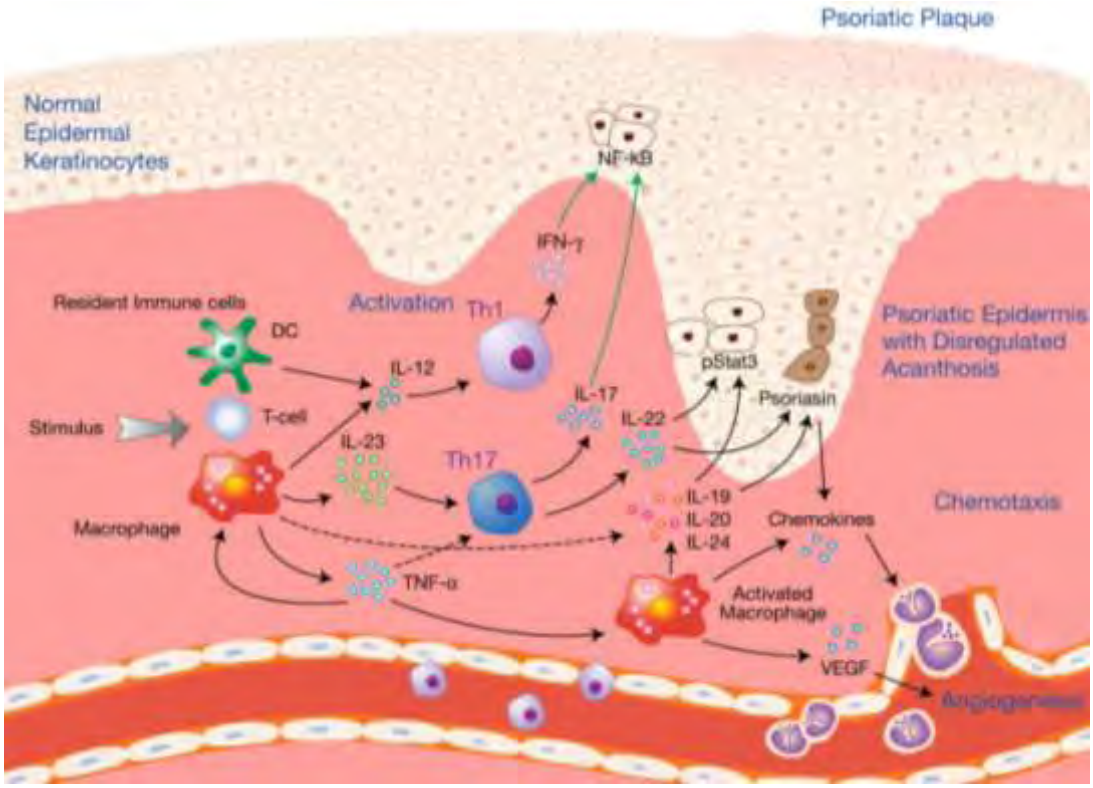
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου TNFα και ανταπόκρισης στην θεραπεία παραγόντων αντι-TNFα σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό.

Μανώλικα Ελένη-Μαρία



- Λάρισα 2011 -

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου TNFα και ανταπόκρισης στην θεραπεία παραγόντων αντι-TNFα σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζίφα Αιμιλία
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευρολογίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **I**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ..... **III**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **V**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

1.1. Ψωρίαση 1

1.1.1. Γενικά *1*

1.1.2. Επιδημιολογία *1*

1.1.3. Περιβαλλοντικοί και Γενετικοί παράγοντες *2*

1.1.4. Κλινικοί τύποι της ψωρίασης *3*

1.1.5. Αξιολόγηση της ψωρίασης *6*

1.1.6. Ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης *7*

1.2. Θεραπεία της ψωρίασης 12

1.2.1. Τοπική θεραπεία *12*

1.2.2. Φωτοθεραπεία *13*

1.2.3. Συστηματική θεραπεία *14*

1.2.4. Βιολογικοί Παράγοντες *15*

1.3. Γονίδια που εμπλέκονται με τη Ψωρίαση 20

1.3.1. TNFα (tumour necrosis factor alpha) *20*

1.3.2. Υποδοχείς του TNFα – TNFR1 και TNFR2 ..... *21*

1.3.3. Ο βιολογικός ρόλος του TNFα *25*

1.3.4. Πολυμορφισμοί του TNFα και των υποδοχέων του στην Ψωρίαση *27*

1.4. Φαρμακογενετική 29

1.4.1. Φαρμακογενετική και αντί-TNF θεραπεία *31*

1.5. Σκοπός 32

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **33**

2.1. Συλλογή δειγμάτων 33

2.2. Απομόνωση DNA 33

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

2.2.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων *35*

2.2.2. Ο ρόλος των αντιδραστηρίων *36*

2.3. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA 37

2.3.1. Φωτομέτρηση - Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA *37*

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση – Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA *38*

2.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) 40

2.4.1. Γενικά *40*

2.4.2. Στάδια Θερμικής Κυκλοποίησης *41*

2.4.3. Συνθήκες PCR *43*

2.4.4. Πειραματική Διαδικασία PCR *45*

2.4.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% *46*

2.5. Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP) 47

2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 51

2.6.1. Παρασκευή 50 ml πηκτής πολυακρυλαμίδης 8% *52*

2.7. Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining) 53

2.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων 55

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 57

3.1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών 57

3.2. RFLP – PAGE γονοτύπηση πολυμορφισμών 59

3.3. Μελέτες συσχέτισης και ανάλυση αποτελεσμάτων 61

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 66

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 70

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ 84

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ 86

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης μεταπτυχιακής διατριβής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες».

Πρώτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής μου, τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και πρόεδρο του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Μαμούρη Ζήση για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ακολούθως, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Διδάσκοντα Π.Δ 407/80 κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για την διαρκή συμβολή και συμπαράστασή του, τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής. Εξίσου βαθιές είναι οι ευχαριστίες μου προς την κ. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της οποίας η καθοδήγηση και επίβλεψή αποδείχθηκε ουσιαστική, καθώς και η επιστημονική της εμπειρία και αρτιότητα ήταν καθοριστική.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη κ. Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και στη κ. Ζαφειρίου Ευτέρπη, Λέκτορα Δερματολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς επίσης και στον Σωτηριάδη Δημήτρη, Καθηγητή Δερματολογίας και κ. Πατσατσή Κατερίνα, Λέκτορα Δερματολογίας του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου στη Θεσσαλονίκη και στην Κρούγκερ- Κρασαγάκη Σαμπινέ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου στο Ηράκλειο Κρήτης για την συλλογή και παραχώρηση των δειγμάτων αίματος των ασθενών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπαγιάτη Βασίλειο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την βοήθεια που προσέφερε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Σταμάτη Κωνσταντίνο και Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την προθυμία, τις συμβουλές και την ηθική συμπαράσταση που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον φίλο μου, Στυλιανό Βιτάλη για τη σημαντική συμβολή του στη μορφοποίηση της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευρολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Ζίφα Αιμιλία και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτώρια για την τιμή που μου κάνουν συμμετέχοντας στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, οι μεγαλύτερες ευχαριστίες, που δύσκολα ο λόγος μπορεί να τις αποδώσει στο μέτρο που θα έπρεπε, εκφράζονται στην οικογένεια μου, στον πατέρα μου, στη μητέρα μου και στον αδερφό μου και ιδιαίτερα, ταπεινά, στους γονείς μου που συμμετείχαν ακούσια και εκούσια στην προσπάθεια αυτή. Κλείνοντας θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην γιαγιά μου, τη Μαρία για την ολόψυχη αγάπη της όλα αυτά τα χρόνια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που προσβάλλει περίπου το 1-3% του πληθυσμού παγκοσμίως με σοβαρές κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις. Την τελευταία δεκαετία η εισαγωγή των βιολογικών αναστολέων του TNFα (Infliximab, Etanercept, Adalimumab) έχουν επιφέρει επανάσταση στην θεραπεία ασθενών με ψωρίαση όσον αφορά την αποτελεσματικότητα αλλά και ραγδαία αύξηση στο κόστος. Ωστόσο τα κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι περίπου ένα 50-80% των ασθενών ανταποκρίνονται στην θεραπεία, ενώ πολλοί ασθενείς έχουν μερική ύφεση των συμπτωμάτων[112].

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση γνωστών πολυμορφισμών στον υποκινητή του γονιδίου TNFα (G-238A, G-308A, C-857T) και του ενός υποδοχέα του, TNFR2 (T676G), με την κλινική ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες, στον ελληνικό πληθυσμό, με απώτερο στόχο την ανάδειξη ενός προγνωστικού απλοτύπου για την ανταπόκριση στη δεδομένη θεραπεία.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 80 ασθενείς από την Νότια, Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα, με Ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με αντί – TNF παράγοντα για τουλάχιστον 6 μήνες. Οι αντί – TNF παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Infliximab, το Etanercept και το Adalimumab. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με Ψωρίαση, βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του δείκτη PASI. Η γονοτύπηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών με τη μέθοδο PCR-RFLP.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFC-857T και του TNFR2T-676G υποδοχέα με την ανταπόκριση στην δεδομένη θεραπεία στους 6 μήνες. Με βάση το διαχωρισμό των επιμέρους παρατηρήσεων για τους παράγοντες Enbrel και Humira/Remicade φαίνεται ότι η συσχέτιση αυτή αποδίδεται κυρίως στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Enbrel πιθανότατα λόγω του διαφορετικού μηχανισμού δράσης του από τους άλλους δύο παράγοντες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ψωρίαση

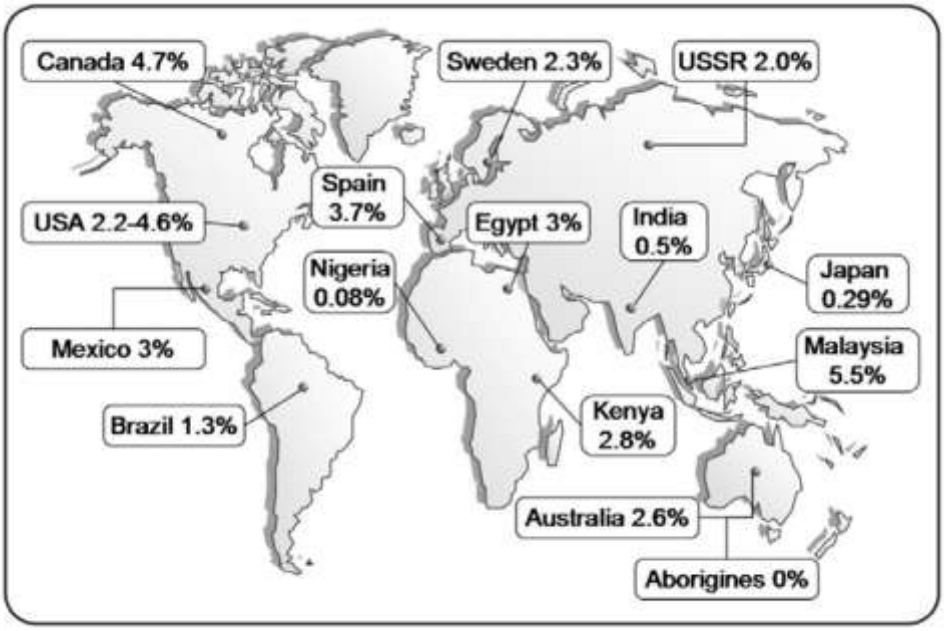
1.1.1. Γενικά

Η ψωρίαση είναι μια συχνή, χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που προκαλείται από δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζεται απο περιόδους ύφεσης και έξαρσης. Η κλινική της εικόνα ποικίλλει από λίγες μόνο εντοπισμένες ερυθηματώδεις πλάκες, καλυπτόμενες από αργυρόχροα λέπια, μέχρι γενικευμένη προσβολή του δέρματος, των ονύχων, των αρθρώσεων και των βλεννογόνων. Επειδή η ψωρίαση εμφανίζεται σε ένα προσβάσιμο όργανο, είναι εφικτή η μελέτη των κυτταρικών και γενωμικών χαρακτηριστικών της με εξαιρετική λεπτομέρεια σε σύγκριση με άλλες αυτοάνοσες νόσους[1].

1.1.2. Επιδημιολογία

Η ψωρίαση είναι κατανεμημένη σε όλο τον κόσμο, προσβάλλει περίπου το 1-3% του πληθυσμού παγκοσμίως. Παρόλα αυτά ο επιπολασμός της κυμαίνεται μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών και εθνικών ομάδων[2]. Χαμηλός επιπολασμός έχει αναφερθεί στους Ιάπωνες, Εσκιμώους, Δυτικούς Αφρικάνους και στους Ινδούς από τη Νότια Αμερική, ενώ η επικράτηση στην Ευρώπη, συμπεριλαμβανομένων των σκανδιναβικών χωρών, του Ηνωμένου Βασιλείου και της Βόρειας Αμερικής είναι υψηλή[2,3]. (Εικόνα 1) Οι Καυκάσιοι γενικά επηρεάζονται πιο συχνά από ότι άλλες εθνικές ομάδες. Στην Ελλάδα 200.000 άτομα περίπου πάσχουν από την ασθένεια της ψωρίασης. Ο λόγος για αυτές τις παραλλαγές είναι ασαφές, αλλά είναι πιθανόν ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν κάποιο ρόλο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 1: Επιπολασμός ψωρίασης

Εμφανίζεται και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Η πρώτη εκδήλωση της ασθένειας συμβαίνει συνήθως γύρω στην ηλικία των 20 ή μεταξύ των ηλικιών 50 και 60[4]. Σύμφωνα με τους Hensler και Christopher, η ψωρίαση μπορεί να διακριθεί σε δύο υποκατηγορίες: η τύπου I, η οποία ξεκινάει πριν την ηλικία των 40, και η τύπου II, η οποία εμφανίζεται μετά την ηλικία των 40[5]. Η ψωρίαση τύπου I, η οποία ευθύνεται για περίπου το 75% των ασθενών, συνδέεται με τη πιο σοβαρή πορεία της ασθένειας, με περιορισμένη επιτυχία της θεραπείας και με τους πιο ισχυρούς κληρονομικούς δεσμούς[6,7].

1.1.3. Περιβαλλοντικοί και Γενετικοί παράγοντες

Αν και το κληρονομικό πρότυπο και η αιτιολογία της ψωρίασης είναι μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστα, οι γενετικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της ψωρίασης. Αυτή η εκτίμηση βασίζεται σε τρείς παρατηρήσεις. Πρώτον, στο ότι η πιθανότητα εμφάνισης της ψωρίασης αυξάνεται σε πρώτου βαθμού συγγενείς. Μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα εχουν δείξει ότι άν ένα μονοζυγωτικό δίδυμο πάσχει από ψωρίαση, η πιθανότητα να προσβληθεί και το άλλο είναι 63-73%[8-10]. Δεύτερον, στο ότι η ψωρίαση συνδέεται με σταθερούς HLA τύπους. Τρίτον, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 9 χρωμοσωμικές περιοχές σύνδεσης με την ψωρίαση (PSORS1 εως PSORS9). Η PSORS1 που εδράζεται στη περιοχή του μείζονος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στο χρωμόσωμα 6 (6p21) φαίνεται ότι συνδέται με τις περισσότερες περιπτώσεις της ψωρίασης[11-13].

Επίσης η ψωρίαση μπορεί να πυροδοτηθεί σε γενετικώς προδιαθετημένα άτομα, από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι θα διεγείρουν την ανοσολογική διαταραχή, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριακής μόλυνσης, του τοπικού τραύματος, των ψυχολογικών παραγόντων (στρές, συναισθηματική φόρτιση), των φαρμάκων (λίθιο, ορισμένα καρδιολογικά φάρμακα, ιντερφερόνη κ.α.), του αλκοόλ και του κλίματος (υπερέκθεση στον ήλιο, ψυχρό κλίμα)[14,15]. (Εικόνα 2) Παρά το γεγονός ότι η ψωρίαση σπάνια είναι απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής. Εφόσον πρόκειται για χρόνια ασθένεια που σχετίζεται με αντιαισθητική εμφάνιση, συχνά έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή αυτοπεποίθηση, την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής και με την πάροδο του χρόνου, την κατάθλιψη[12].

1.1.4. Κλινικοί τύποι της ψωρίασης

Χαρακτηριστική είναι η κλινική πολυμορφία της νόσου που μπορεί να εκδηλώνεται με διάφορες μορφές ψωρίασης. Κατατάσσεται σύμφωνα με τον τύπο των βλαβών στις παρακάτω:

i. Η «κοινή» ψωρίαση, ή κατά πλάκας ψωρίαση.

Η κλινική αυτή μορφή είναι η πιο συχνή και αποτελεί περίπου το 80% όλων των μορφών της ψωρίασης. Χαρακτηρίζεται από ερυθυματώδεις, φολιδωτές πλάκες. Το μέγεθος των βλαβών κυμαίνεται από μισό εκατοστό έως τριάντα εκατοστά. Συχνά οι πλάκες επεκτείνονται και συνενώνονται καταλαμβάνοντας μεγάλες περιοχές του σώματος. Η ψωρίαση κατά πλάκας ενδέχεται να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος, ωστόσο τα γόνατα, οι αγκώνες, το τριχωτό της κεφαλής και ο κορμός αποτελούν

Εικόνα 2: Ψωρίαση κατά πλάκας[16]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

εκλεκτικές εντοπίσεις της μορφής αυτής. (Εικόνα 2) Εμφανίζεται συνήθως στους ενήλικες και σπανίως στα παιδιά[17,18].

ii. Η σταγονοειδής ψωρίαση

Εικόνα 3: Σταγονοειδής ψωρίαση[19]

Η μορφή αυτή χαρακτηρίζεται απο μικρές, ερυθρές μεμονωμένες σταγονοειδείς πλάκες στο δέρμα και είναι ενδεχόμενα συνδεδεμένη με στρεπτοκοκκική λοίμωξη. (Εικόνα 3) Υπολογιζόμενη στο 18% των περιπτώσεων της νόσου, προσβάλλει, συχνότερα, παιδιά και νέους ενήλικες[18].

iii. Η φλυκταινώδης ψωρίαση

Χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλυκταινών (φυσαλίδες με πύον). Υπάρχουν δύο μορφές. Μια γενικευμένη μορφή και μία μορφή που εντοπίζεται στις παλάμες και στα πέλματα.

α) Γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση. Πρόκειται για σοβαρή, σπάνια κατάσταση που μπορεί να απειλήσει τη ζωή του ασθενούς. Αρχικά εμφανίζεται έντονο ερύθημα που μέσα σε λίγες ώρες επεκτείνεται σε μεγάλες επιφάνειες. (Εικόνα 4) Στη συνέχεια εμφανίζονται φλύκταινες κατά σωρούς, που προοδευτικά συνενώνονται και σχηματίζουν «λίμνες» με άσηπτο πυώδες υγρό. Συνυπάρχει πυρετός, κακουχία, αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και έντονες συστηματικές εκδηλώσεις, ονυχόλυση κ.ά.

Εικόνα 4: Φλυκταινώδης ψωρίαση

β) Φλυκταινώδης ψωρίαση παλαμών και πελμάτων. Χαρακτηρίζεται από παρουσία πολυάριθμων μικρών άσηπτων φλυκταινών που εξελίσσονται σε ερυθρές εφελκίδες στα άκρα. Προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες και τους ενήλικες[18,20].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

iv. Η ερυθροδερμική ψωρίαση

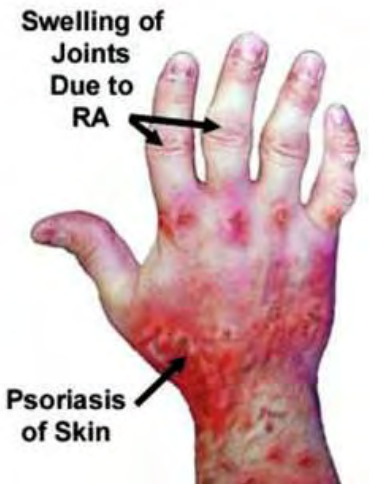
Είναι σπάνια μορφή με προσβολή όλου του δέρματος, το οποίο είναι ερυθρό και καλύπτεται από λέπια, τα οποία είναι διαφορετικά από τα κλασικά λέπια της κατά πλάκας ψωρίασης. (Εικόνα 5) Λόγω της εκτεταμένης αγγειοδιαστολής μπορεί να εκδηλωθεί υποθερμία. Συχνά εμφανίζεται πυρετός και ρίγη, οίδημα κάτω άκρων από απώλεια λευκωμάτων και ενδεχόμενα καρδιακή, ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια. Εκλύεται μετά από ακατάλληλη χρήση κορτικοειδών, λοιμώξεις ή μετά από φωτοθεραπεία.

Εικόνα 5: Ερυθροδερμική Ψωρίαση

v. Φαινόμενο Koebner

Ονομάζεται το γεγονός της εμφάνισης βλαβών ψωρίασης σε σημεία τραυματισμού του δέρματος. Οι βλάβες εμφανίζονται 10-15 μέρες μετά τον τραυματισμό. Η παθογένεια του φαινομένου αυτού δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Ένα ποσοστό 15-25% των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση εμφανίζουν *ψωριασική αρθρίτιδα*. (Εικόνα 6) Η ψωριασική αρθρίτιδα αποτελεί μια ξεχωριστή μορφή ψωρίασης, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη κλινικών εκδηλώσεων αρθρίτιδας και προσβάλλει περίπου 1/1000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού. Στη χώρα μας το αντίστοιχο ποσοστό φαίνεται να είναι 0,17% των ενηλίκων. Στην ψωριασική αρθρίτιδα το εξάνθημα της ψωρίασης προηγείται της αρθρίτιδας στο 65% των ασθενών. Η έναρξη, πολύ συχνά, παρουσιάζεται μεταξύ των ηλικιών 20 και 50 ετών, με



Εικόνα 6: Ψωριασική Αρθρίτιδα[21]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

μέση ηλικία έναρξης τα 38 έτη και μπορεί να συνυπάρχει με όλες τις μορφές της ψωρίασης[22-24].

1.1.5. Αξιολόγηση της ψωρίασης

Τα βασικά χαρακτηριστικά των ψωριασικών αλλοιώσεων –ερυθρότητα, πάχος και φολιδώσεις- υποδεικνύουν τη σοβαρότητα της ασθένειας. Το τρέχον πρότυπο για την αξιολόγηση της εκτεταμένης ψωρίασης είναι ο Δείκτης Έκτασης και Βαρύτητας της Ψωρίασης (Psoriasis Area and Severity Index, PASI). Ο δείκτης αυτός είναι ένα μέτρο αξιολόγησης της μέσης ερυθρότητας, του πάχους, και της κλιμάκωσης των ψωριασικών βλαβών σε τέσσερις περιοχές του σώματος: το κεφάλι, τον κορμό, τα άνω και κάτω άκρα που αντιστοιχούν στο 10%, 20%, 30% και 40% της συνολικής έκτασης της Περιοχής Επιφάνειας Σώματος (Body surface area, BSA), αντίστοιχα. Η Ψωρίαση χαρακτηρίζεται ώς ήπια άν ο βαθμός PASI είναι χαμηλότερος από 10, και μέτρια προς σοβαρή άν ισούται ή υπερβαίνει το 10, με υψηλότερη πιθανή τιμή του PASI το 72. Μέχρι στιγμής το μεγαλύτερο μειονέκτημα του PASI είναι η χαμηλή ευαισθησία[25].

Στις περισσότερες κλινικές δοκιμές μια μείωση ≥ 75% από την αρχική τιμή των αποτελέσματων του PASI (PASI 75) είναι το σημείο αναφοράς των πρωτογενών παράμετρων για την αξιολόγηση της θεραπείας για την ψωρίαση. Ωστόσο, το PASI 75 θεωρήθηκε πολύ αυστηρό κριτήριο από τον Carlin CS και τους συνεργάτες του. Στην πραγματικότητα, οι συγγραφείς αυτοί δημοσίευσαν στοιχεία που δείχνουν ότι μια μείωση ≥ PASI 50 (PASI 50) καταδεικνύει μια κλινικά σημαντική βελτίωση και αποτελεί το κατάλληλο, κύριο τελικό σημείο για τις κλινικές δοκιμές. Ως ήπια ψωρίαση ορίζεται η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από βλάβες που καλύπτουν λιγότερο από το 2% του σώματος, μέτρια ψωρίαση είναι η ασθένεια που καλύπτει το 2-10% του σώματος και ως σοβαρή ψωρίαση, η ασθένεια που καλύπτει περισσότερο από το 10% του σώματος. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMEA), ήπια έως μέτρια ψωρίαση ορίζεται ως ποσοστό BSA μικρότερο του 10% και μέτρια ως 10-20%, με τις βλάβες που καλύπτουν περισσότερο από το 20% του σώματος να συνιστά σοβαρή ψωρίαση[26].

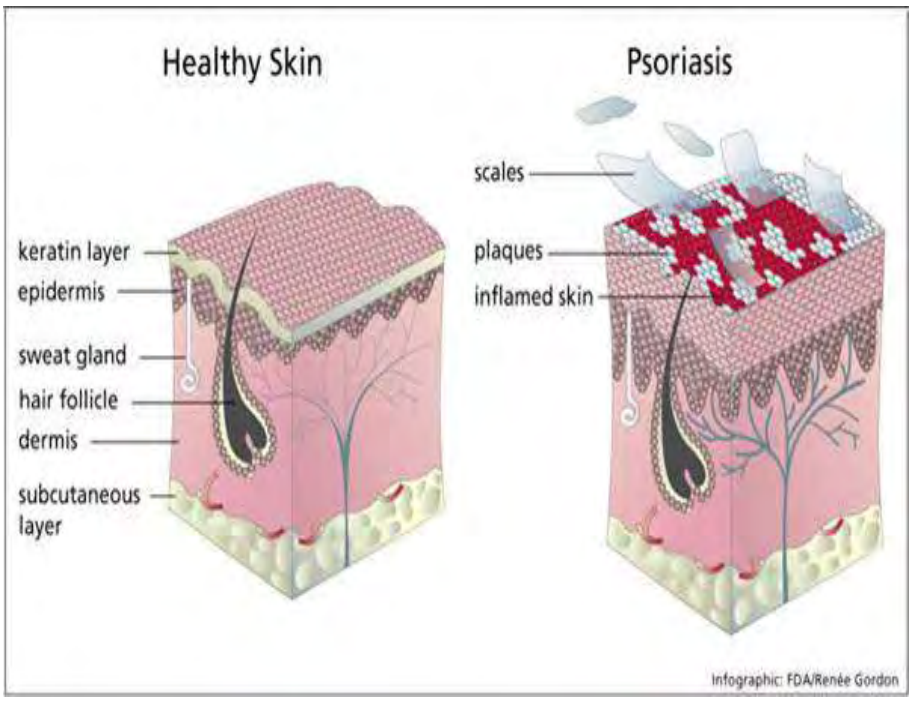
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Ένα χρήσιμο μέσο για την αξιολόγηση αυτή είναι η Dermatology Life Quality Index (DLQI). Η DLQI μπορεί να πάρει τιμές από 0 έως 30. Εάν η DLQI είναι 0 ή 1, η ποιότητα ζωής του ασθενούς, δεν επηρεάζεται από τη δερματολογική του ασθένεια.Τιμές μεγαλύτερες από 10 δηλώνουν μια σοβαρή ανεπάρκεια της ποιότητας ζωής[27]. Όλες αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται επίσης για να κριθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε κλινικές μελέτες και είναι κατάλληλες για τον ορισμό των θεραπευτικών στόχων. Αν το PASI ή το BSA είναι μεγαλύτερο από 10, και η DLQI είναι επίσης μεγαλύτερη από 10, τότε ο ασθενής θεωρείται ότι έχει μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση, η οποία γενικά θα πρέπει να αντιμετωπίζεται συστηματικά[28,29]. Για την εκτίμηση της σοβαρότητας της ψωρίασης, πρέπει κανείς να εξετάσει επίσης τις περαιτέρω παραμέτρους όπως ο βαθμός ανταπόκρισης σε προηγούμενες θεραπείες, η συμμετοχή των ορατών περιοχών (συμπεριλαμβανομένου του τριχωτού της κεφαλής και τα νύχια), η περιοχή των γεννητικών οργάνων, και η παρουσία ή η απουσία ειδικών συμπτωμάτων, όπως κνησμός, που μπορεί να απαιτήσει συστηματική θεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις[25,26].

1.1.6. Ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης

Ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός για τη ψωρίαση παραμένει άγνωστος. Στην κλινική και ιστοπαθολογική εικόνα της ψωρίασης παρατηρούνται φανερές αλλαγές στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα σε σύγκριση με το υγιές δέρμα. Η κύρια ανωμαλία στην ψωρίαση είναι η βράχυνση του κυτταρικού κύκλου των επιδερμικών κυττάρων από 311 σε 36 ώρες με αποτέλεσμα η παραγωγή τους να γίνεται με 28πλάσιο ρυθμό. Επιπλέον, μειώνεται ο χρόνος ανανέωσης του δέρματος, δηλαδή ο χρόνος μετάβασης των κερατινοκυττάρων από τη βασική στην κεράτινη στοιβάδα από 28 σε 4 ημέρες[30]. Έτσι τα κύτταρα φθάνοντας στην κεράτινη στιβάδα δεν έχουν ωριμάσει πλήρως, παραμένουν κολλημένα μεταξύ τους και δεν αποβάλλονται, δημιουργώντας τα αργυρόχρωμα λέπια, τα οποία καλύπτουν τις ερυθρές δερματικές βλάβες της ψωρίασης (Εικόνα 7). Ο υπερπολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων διεγείρεται απο κυτταροκίνες που απελευθερώνονται απο τα Τ λεμφοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα[31,32].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 7: Ιστολογική εικόνα ψωριασικού δέρματος σε σύγκριση με το φυσιολογικό[33].

Εδώ και κάποια χρόνια έχει αποδειχθέι ότι στην παθογένεια της νόσου ενέχονται ανοσολογικά φαινόμενα, καθώς στις ψωριασικές βλάβες υπάρχει διήθηση από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (βοηθητικά CD4+ και κατασταλτικά CD8+). Τα περισσότερα από τα Τ κύτταρα, βάσει των κυτταροκινών που παράγουν, διακρίνονται σε δύο υποπληθυσμούς, τα T_H1 και τα T_H2 κύτταρα. Τα T_H1-κύτταρα παράγουν εκκριτική ιντερλευκίνη (IL)-2, ιντερφερόνη (IFN)-γ,TNF-α και IL-18. Η ανταπόκριση των Τ- κυττάρων στην ψωρίαση είναι, ως επι το πλείστον, μία αντίδραση τύπου 1. Το δέρμα στις ψωριασικές βλάβες έχει αυξημένα επίπεδα TNF-α και IFN-γ συγκριτικά με το υγιές δέρμα[34].

<u>Ο ρόλος των Τ κυττάρων στη ψωρίαση</u>

Η εμπλοκή των Τ λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της ψωρίασης μπορεί να περιγραφεί σε σχέση με 3 γεγονότα: 1) την αρχική ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων, 2) τη μετανάστευση των Τ λεμφοκυττάρων στο δέρμα και 3) τους ποικίλους ρόλους που διαδραματίζουν οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα[31,35].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

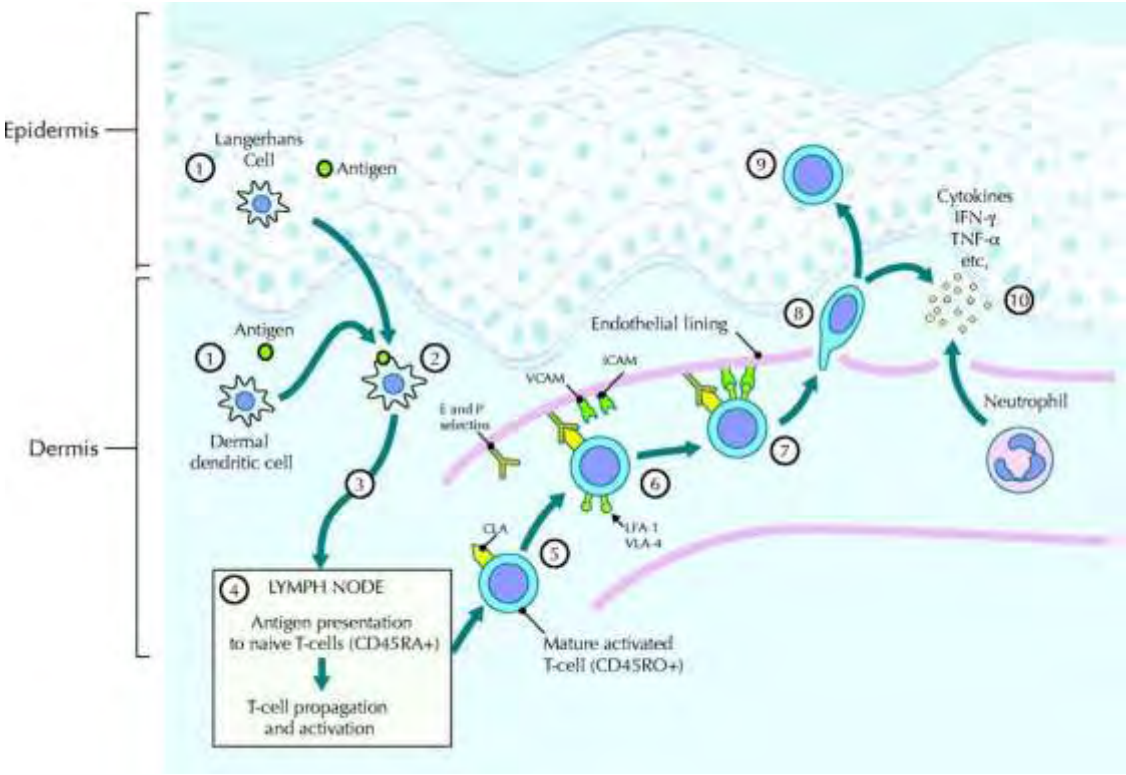
Ενεργοποίηση Τ κυττάρων

Τα Τ-κύτταρα ενεργοποιούνται σε τρείς φάσεις: Πρώτα, τα Τ-κύτταρα δεσμεύονται και ενεργοποιούνται απο τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και συγκεκριμένα απο τα ώριμα Langerhans κύτταρα. Η διαδικασία αυτή είναι αναστρέψιμη και γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιφανειακών μορίων LFA-1 και CD2 που βρίσκονται στα Τ-κύτταρα και των ICAM-1και LFA-3 που βρίσκονται στα APC κύτταρα. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς (TcR) των Τ-κυττάρων αναγνωρίζουν αντιγονικά πεπτίδια πάνω στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) ενός APC σε μια αντιγονο-ειδική αλληλεπίδραση (Εικόνα 8). Τέλος, απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων είναι η ύπαρξη μορίων συν-διέγερσης στα APCs. Παρουσία αντιγόνου και μορίων συν-διέγερσης τα Τ-κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τις λειτουργίες των Τ- κυττάρων[35,36].

Μετανάστευση Τ κυττάρων στο δέρμα

Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων στον λεμφαδένα, τα περισσότερα απο αυτά υποβάλλονται σε απόπτωση. Μια μειονότητα, ωστόσο, γίνονται κύτταρα μνήμης και μεταναστεύουν απο τον λεμφαδένα στο κυκλοφορικό σύστημα και μέσω συν-διέγερσης με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων μεταναστεύουν στη φλεγμονή του δέρματος[36,37]. (Εικόνα 8)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



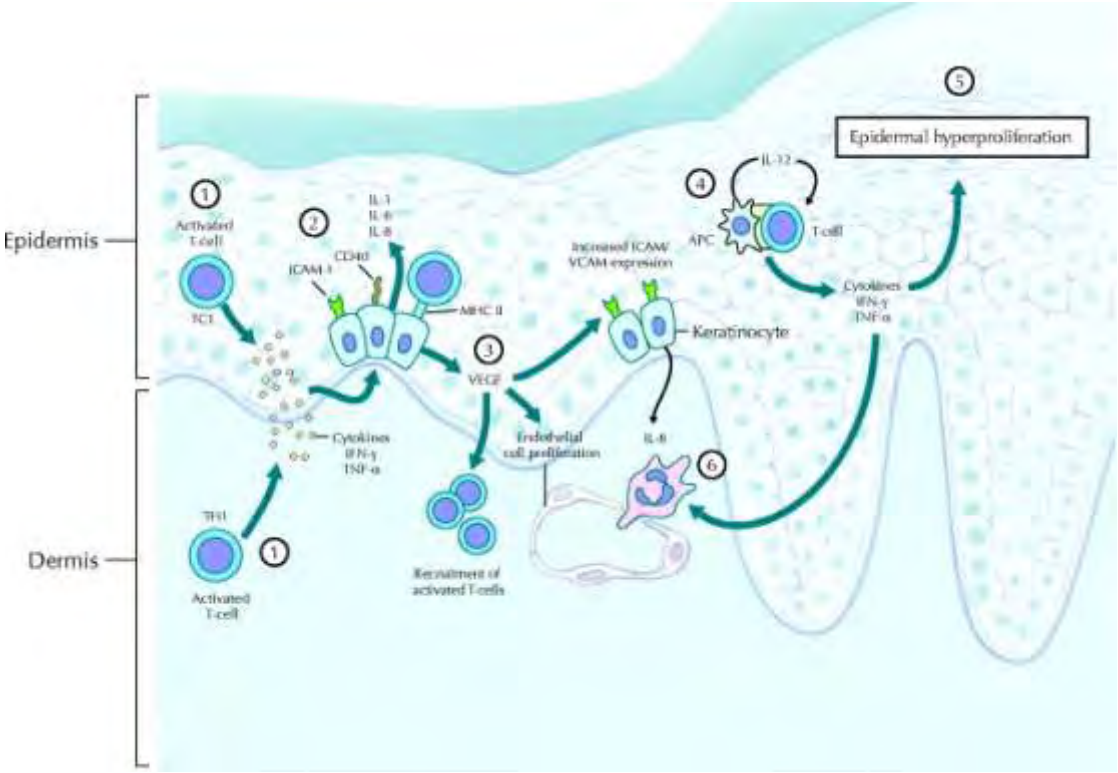
Εικόνα 8: Έναρξη της ψωριασικής ανοσολογικής απόκρισης με ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων από τα APCs με αποτέλεσμα τη παραγωγή κυτταροκίνων και την έναρξη της παθογένεσης.[38]

Ο ρόλος των κυτταροκινών

Μόλις φτάσουν στο ερεθισμένο σημείο του δέρματος, τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα συναντούν το αρχικό αντιγόνο, και απελευθερώνουν τύπου Th1 κυτταροκίνες, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην φαινοτυπική έκφραση της ψωρίασης[39](Εικόνα 9). Οι κυτταροκίνες τύπου Th1 που εμπλέκονται στη παθογένεση της ψωρίασης είναι οι IFN-γ, IL-2 και TNF-α. Η ιντευρλευκίνη (IL)-2 λειτουργεί ως διεγέρτης του πολλαπλασιασμού των Τ-κυττάρων[30,40]. Η ιντερφερόνη (IFN)-γ μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων, ενισχύοντας την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-x στα κύτταρα αυτά. Αυτό συμβάλλει μάλλον στον υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων που παρατηρήθηκαν σε ψωριασικές βλάβες[38]. Επίσης η (IFN)-γ αποτελεί έναν ισχυρό διεγέρτη για την απελευθέρωση TNF-α από τα μακροφάγα[35]. Ο TNF-α μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη της ψωρίασης με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και αυξάνοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα Τ λεμφοκύτταρα και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

τα μακροφάγα, καθώς και των μορίων προσκόλλησης από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα[42]. Συγκεκριμένα, ο TNF-α διεγείρει τα κερατινοκύτταρα για την παραγωγή IL-8, ICAM-1, TGF-α, β-defensins (αντιμικροβιακά πεπτίδια), και PAI2 (ενεργοποιητή πλασμινογόνου αναστολέα-2), η οποία θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Επίσης, όταν τα μακροφάγα διεγείρονται απο τον TNF-α ενισχύεται η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών. Η αλληλεπίδραση του TNF-α με το αγγειακό επιθήλιο οδηγεί στην αυξημένη έκφραση ορισμένων μορίων προσκόλλησης και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, ο οποίος ενθαρρύνει την αγγειογένεση και διευκολύνει τη μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων[36,43].



Εικόνα 9: Εντοπισμένη ανοσολογική απάντηση. Τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα συναντούν το αρχικό αντιγόνο, και απελευθερώνουν κυτταροκίνες, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην φαινοτυπική έκφραση της ψωρίασης[38]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

1.2. Θεραπεία της ψωρίασης

Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για την ψωρίαση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η κλινική της μορφή, η εντόπιση και η έκτασή της, η γενική κατάσταση και η ηλικία του ασθενούς, συνοδές παθήσεις π.χ. HIV και η προηγηθείσα θεραπεία.

1.2.1. Τοπική θεραπεία

Οι τοπικές θεραπείες είναι θεραπείες πρώτης γραμμής, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι οι συγκεκριμένες θεραπείες συνήθως εφαρμόζονται πριν από τις συστηματικές. Χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με ήπια εώς μετρίου σοβαρότητος ψωρίαση[44]. Οι επιλογές για τοπική θεραπεία περιλαμβάνουν τα κορτικοστεροειδή, λιθανθρακόπισσα, ανθραλίνη, ταζαροτένη, ανάλογα της βιταμίνης D (καλσιποτριόλη) και κερατολυτικούς παράγοντες. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι τα στεροειδή και τα ανάλογα της βιταμίνης D[45,46].

Κορτικοστεροειδή

Η τοπική εφαρμογή κορτικοστεροειδών αποτελεί την πιο δημοφιλή θεραπεία της ψωρίασης σ' όλο τον κόσμο[47]. Η αντιψωριασική δράση τους οφείλεται στις αντιφλεγμονώδεις, αντιμιτωτικές, ανοσοκατασταλτικές και αγγειοσυσταλτικές ιδιότητές τους[48]. Η τοπική θεραπεία με κορτικοστεροειδή είναι αποτελεσματική, άμεση, εύκολη στη χρήση και οικονομικότερη από άλλες αγωγές. Στην αρχή χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση για το γρήγορο έλεγχο των βλαβών και την αντιμετώπιση της συνυπάρχουσας φλεγμονής. Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η πρόκληση ατροφίας ή λέπτυνσης του δέρματος, η εμφάνιση ραβδώσεων, ευρυαγγειών, υπερτρίχωσης και ακμοειδούς εξανθήματος. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα (περισσότερο από δύο εώς τέσσερις βδομάδες) ή ως βασική θεραπεία σε μεγάλη έκταση ψωριασικών βλαβών (άνω του 20% της συνολικής επιφάνειας). Χορηγούνται σε συνδυασμό με ένα άλλο τροποιητικό της νόσου φάρμακο στους ασθενείς με ενεργό νόσο[37].

Ανάλογα βιταμίνης D (καλσιποτριόλη, καλσιτριόλη)

Όταν τα ανάλογα της βιταμίνης D εφαρμόζονται στην ψωρίαση, συμβάλλουν: στη ρύθμιση του επιδερμιδικού κυτταρικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

υπερπολλαπλασιασμού, στην επαγωγή του φυσιολογικού ρυθμού κερατινοποίησης, στην αναστολή των τύπου – TH1 δράσεων, στην επαγωγή της στροφής TH1 προς TH2, στην αναστολή της δραστηριοποίησης των πολυμορφοπυρήνων ουδετεροφίλων και στην επαγωγή της διαδικασίας απόπτωσης των φλεγμονωδών κυττάρων.Έχουν μια σχετικά αργή έναρξη της δράσης και μπορεί να συνδυαστεί με κορτικοστεροειδή[25,46].

Η καλσιποτριόλη είναι ανάλογο της βιταμίνης D3 και χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ήπιας έως μέτριας κατα πλάκας ψωρίασης. Ο τρόπος δράσης της δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός, θεωρείται όμως ότι η δράση της καλσιποτριόλης συνίσταται στην καταστολή του υπερπολλαπλασιασμού των κερατινοτυττάρων και σε ανοσολογικές μεταβολές στο ψωριασικό δέρμα. Πρέπει να εφαρμόζεται δύο φορές την ημέρα και οι βλάβες του 70% των ασθενών υποχωρούν ή καθαρίζουν έπειτα από θεραπεία 8 εβδομάδων. Οι συνηθέστερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι το αίσθημα καύσου, ο κνησμός και ο ερεθισμός του δέρματος και παρουσιάζονται σε ποσοστό 10-15% των ασθενών[49].

1.2.2. Φωτοθεραπεία

Η φωτοθεραπεία έχει τη μορφή της έκθεσης σε δύο τύπους υπεριώδους φωτός (UVA ή UVB) με τη χρήση ειδικών μηχανημάτων φωτός υπό ιατρική παρακολούθηση. Η φωτοθεραπεία ενδείκνυται όταν η πάθηση καταλαμβάνει το 20-30% της επιφάνειας του σώματος. Η φωτοθεραπεία συνδυάζεται με τοπικούς και συστηματικούς παράγοντες, με σκοπό την αμοιβαία μείωση της δόσης και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Διακρίνεται: α) στη φωτοθεραπεία με UVB (υπεριώδη) ακτινοβολία, β) στη φωτοχημειοθεραπεία (PUVA)[50].

Στη θεραπεία UVB το δέρμα εκτίθεται σε UVB ακτινοβολία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι περισσότεροι ασθενείς χρειάζονται 18-30 θεραπείες προκειμένου να έχουν το μέγιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα[51].

Η **θεραπεία PUVA** είναι μια ειδική θεραπεία η οποία συνδυάζει την έκθεση σε ακτινοβολία UVA και τη λήψη δισκίων με την ονομασία Ψωραλενίου (χημική ουσία που αντιδρά με την ακτινοβολία UVA)[52] (Εικόνα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

11). Η θεραπεία PUVA είναι αποτελεσματική, ωστόσο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η παρατεταμένη χρήση της αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του δέρματος[53].

1.2.3. Συστηματική θεραπεία

Οι συνήθεις συστηματικές θεραπείες είναι η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη και τα ρετινοειδή.

Μεθοτρεξάτη: Η μεθοτρεξάτη είναι ένα αποτελεσματικό, φάρμακο πρώτης επιλογής, που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας από το 1960 (Εικόνα 10). Είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος και αναστέλλει τη σύνθεση του DNA[54]. Χρησιμοποιείται είτε σε συνδυασμό με κάποιο άλλο φάρμακο είτε μόνο του. Η θεραπευτική της δράση εμφανίζεται συνήθως μετά από 4-10 εβδομάδες. Το 60-70% των ασθενών εμφανίζει βελτίωση. Συχνά συνδυάζεται και με άλλα τροποποιητικά της νόσου φάρμακα, όπως πχ. οι ανταγωνιστές του TNFα ή τα κορτικοστεροειδή. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ναυτία, ο εμετός, η κόπωση, η μυελοκαταστολη και τα αυξημένα ηπατικά ένζυμα. Ακόμα κι αν οι βιολογικοί παράγοντες φαίνεται να είναι μια πιο αποτελεσματική θεραπεία, η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως, λόγω του χαμηλού κόστους της[55].

Εικόνα 10: Σκεύασμα Μεθοτρεξάτης

Κυκλοσπορίνη: Η κυκλοσπορίνη Α είναι δεκαπεπτίδιο (11 αμινοξέα) που παράγεται από μύκητα. Έχει ισχυρή ανοσορρυθμιστική δράση και αναστέλλει κυρίως την ενεργοποίηση των CD4 T λεμφοκυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια καθημερινή δόση των 2,5 έως 5 mg / kg / ημέρα για περίπου 12-16 εβδομάδες, οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της ψωριασικής αλλοιώσης μέχρι και στο 80-90% των ασθενών[56]. Η υπέρταση, η νεφρική ανεπάρκεια και ο δυνητικός κίνδυνος δερματικών κακοηθειών είναι οι πιο σημαντικές παρενέργειες της κυκλοσπορίνης[54].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

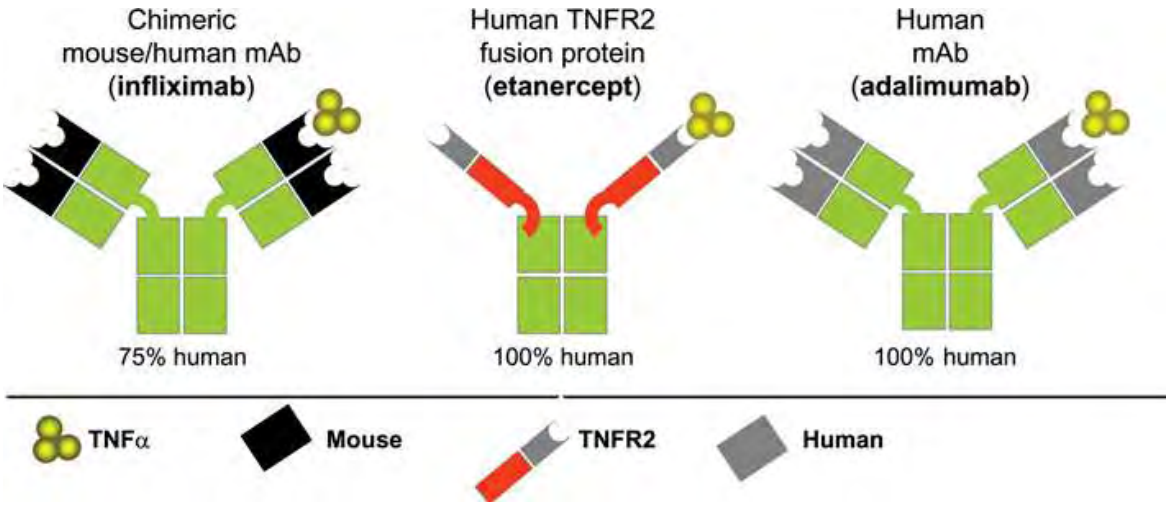
Ρετινοειδή: Τα ρετινοειδή που λαμβάνονται από το στόμα είναι χημικά παράγωγα της βιταμίνης Α. Ο τρόπος δράσης τους εστιάζεται στην ομαλοποίηση του ρυθμού και του τρόπου ανάπτυξης των κυττάρων της επιδερμίδας. Τόσο η ασιτρεσίνη όσο και η ισοτρετινοϊνη έχουν ένδειξη στη θεραπεία της ερυθροδερμικής, της φλυκταινώδους και της γενικευμένης κατά πλάκας ψωρίασης που δύσκολα ανταποκρίθηκαν σε άλλες θεραπείες. Τα φάρμακα αυτά είναι τερατογονά και θα πρέπει να λαμβάνονται με προσοχή από γυναίκες που βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία[57].

1.2.4. Βιολογικοί Παράγοντες

Τα τελευταία χρόνια, με την κατανόηση των φλεγμονωδών διαδικασιών και των μεσολαβητών που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωρίασης, αναπτύχθηκαν νέα φάρμακα με στόχο την τροποποίηση της εξέλιξης της ασθένειας. Μελέτες έχουν δείξει ότι παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ψωριασικών πλάκών. Συγκεκριμένα, ο TNFα είναι μια ισχυρή προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στην ψωρίαση. Επίσης, ο TNFα επηρεάζει την παθογένεση της ψωρίασης με την ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, ο TNF-α έχει γίνει στόχος για θεραπεία στην βιολογική αντιμετώπιση της ψωρίασης[58].

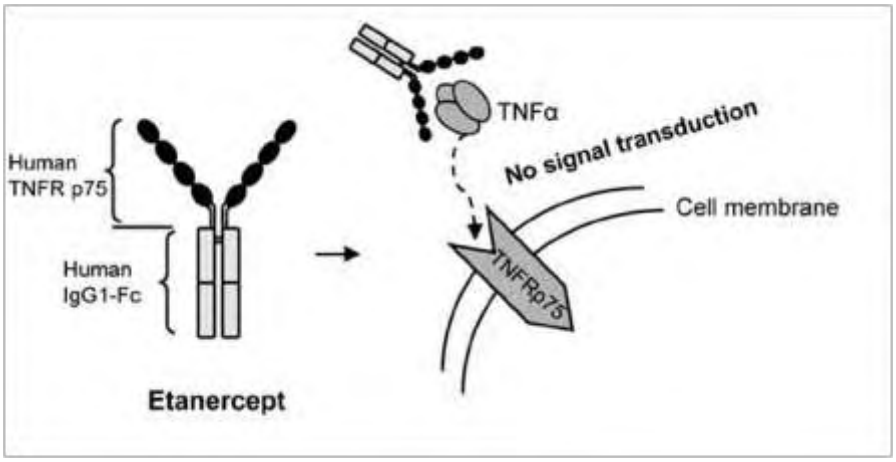
Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα είναι το etanercept (enbrel), το infliximab (remicade) και το adalimumab (humira) (Εικόνα 11). Και τα τρία αυτά φάρμακα προσδένουν στον TNFα με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τη σύνδεσή του στους υποδοχείς[59]. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν ασθενείς που τους χορηγήθηκε κάποιο από τα τρία αυτά φάρμακα (etanercept, infliximab, adalimumab).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των τριών ανταγωνιστών του TNFα[60]

Etanercept: Το φάρμακο χορηγείται στη μέτρια και σοβαρού τύπου ψωρίασης και χορηγείται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τη μεθοτρεξάτη. Είναι η αναδυνδυασμένη μορφή του p75 υποδοχέα του TNFα που συνδέεται με το Fc τμήμα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G1 (IgG1). Το etanercept συνδέεται με τον TNFα και περιορίζει αποτελεσματικά και παροδικά τις βιολογικές δράσεις του[59] (Εικόνα 12).



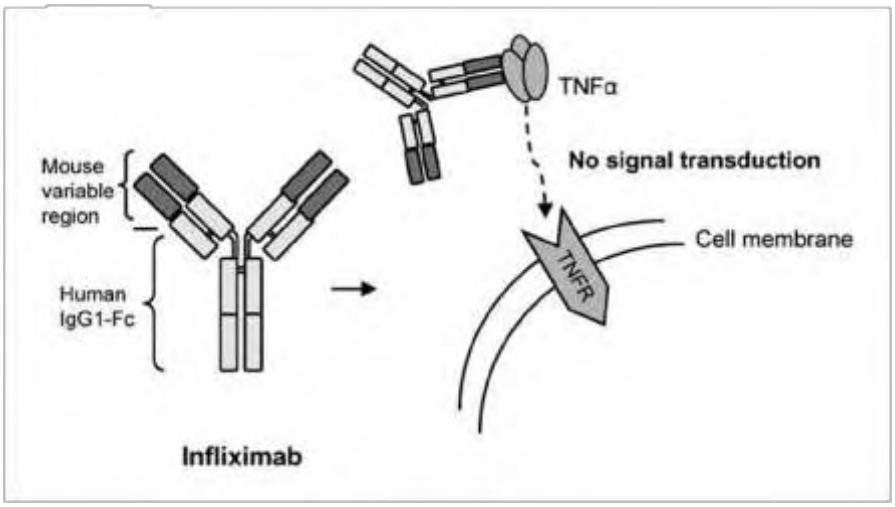
Εικόνα 12: Μοριακός μηχανισμός του etanercept[61]

Η etanercept εγκρίθηκε για την ψωρίαση από το FDA (U.S. Food and Drug Administration) το 2004 με αρχική δόση των 50 mg δύο φορές την εβδομάδα για 12 εβδομάδες ακολουθούμενο από 25 mg δύο φορές την εβδομάδα για συντήρηση[62,63]. Στις μελέτες φάσης III της etanercept σε ασθενείς με ψωρίαση ψωρίαση χορηγήθηκαν 25 mg δύο φορές εβδομαδιαίως με υποδόρια ένεση και 50 mg δύο φορές την εβδομάδα και έδωσαν >75%

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

βελτίωση στο 34% και 49% των ασθενών, αντίστοιχα, μετά από 12 εβδομάδες σε σύγκριση με το 4% των ασθενών που λάμβαναν εικονικό φάρμακο. Το etanercept θεωρείται ένα ασφαλές φάρμακο με καλό προφίλ ανεκτικότητας, εφόσον χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί κάποια προβλήματα κυρίως στην περιοχή που γίνεται η ένεση[64]. Επιπλέον, η θεραπεία με αντί-TNFα θεραπεία μπορεί να σχετίζεται με σοβαρές μολύνσεις λόγω της εξασθενημένης άμυνας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, με φυματίωση, με λεμφώματα, καρδιακή ανεπάρκεια[59]. Το etanercept αντενδείκνυται σε ασθενείς που έχουν γνωστή υπερευαισθησία στο φάρμακο ή έχουν κάποια ενεργή μόλυνση. Διακοπή της θεραπείας απαιτείται αν ο ασθενής εμφανίσει σοβαρή μόλυνση κατά τη διάρκεια της θεραπείας[54].

Infiximab: είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα με 75% ανθρώπινη και 25% πρωτεΐνη ποντικού που προσδένεται και στις διαλυτές αλλά και στις διαμεμβρανικές μορφές του TNFα (Εικόνα 13).

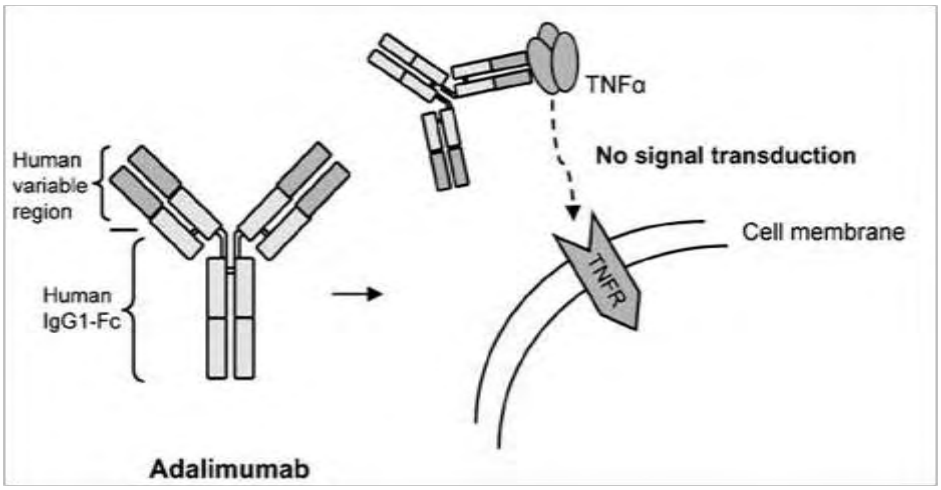


Εικόνα 13: Μοριακός μηχανισμός του infliximab[61]

Έχει εγκριθεί απο το FDA για τη ρευματοειδή και ψωριασική αρθρίτιδα, τη νόσο του Crohn με και χωρίς μεθοτρεξάτη και για τις μέτριες-σοβαρές μορφές ψωρίασης. Χορηγείται ενδοφλεβίως εντός διαστήματος 2 ωρών σε δόση 5 mg/kg βάρους σώματος, αρχικά σε 2 εβδομάδες από την πρώτη θεραπεία, κατόπιν σε ένα μήνα και στην συνέχεια κάθε 2 μήνες[62,63]. Η ανταπόκριση της ψωρίασης στο infliximab είναι καλή. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται είναι κεφαλγία, πυρετική κίνηση, κνησμός, εξάνθεμα[65].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

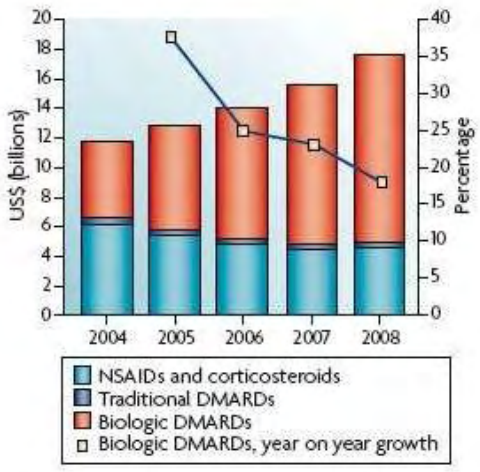
Adalimumab: Είναι ένα πλήρως εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει ενάντια στον TNFα. Το μόριο αυτό έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με το infliximab και προκαλεί μικρότερη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενή, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για αραιότερη δοσολογία[59]. Η δοσολογία για την ψωρίαση είναι 80mg χορηγείται υποδόριως τη πρώτη εβδομάδα, ακολουθούμενη από 40mg υποδόριως την επόμενη εβδομάδα και στη συνέχεια κάθε δύο εβδομάδες[66]. Το adalimumab έχει παρόμοιο μοριακό μηχανισμό με αυτόν του infliximab (Εικόνα 14). Συγκεκριμένα, προσδένει τον διαλυτό και διαμεμβρανικό TNFα και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, τον TNFR1 και τον TNFR2. Επιπλέον, το adalimumab ρυθμίζει τις βιολογικές απαντήσεις που προάγονται από τον TNF και μειώνει τα επίπεδα της IL-6 και των MMPs (MMP-1, MMP-3)[61]. Η θεραπεία με adalimumab δε πρέπει να εφαρμόζεται σε ασθενείς με ενεργή μόλυνση, συμπεριλαμβανομένου τις χρόνιες και τοπικές λοιμώξεις. Εάν ένας ασθενής κατά τη θεραπεία αναπτύξει κάποια μόλυνση τότε το adalimumab θα πρέπει να διακόπτεται άμεσα. Το adalimumab μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε συνδυασμό με άλλα DMARDs είτε μόνο του[59]. Το Adalimumab ενδείκνυται για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής χρόνιας κατά πλάκας ψωρίασης σε ενήλικες ασθενείς οι οποίοι απέτυχαν να ανταποκριθούν, ή έχουν αντένδειξη για άλλη συστηματική θεραπεία συμπεριλαμβανομένης της κυκλοσπορίνης, της μεθοτρεξάτης ή της PUVA[66].



Εικόνα 14: Μοριακός μηχανισμός του adalimumab[61]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Παρόλο που αυτοί οι βιολογικοί παράγοντες δρουν γρηγορότερα έτσι ώστε να ελέγξουν έγκαιρα την ασθένεια, και έχουν καλύτερο προφίλ ανεκτικότητας σε σχέση με τα συμβατικά DMARDs, δεν είναι ικανά να θεραπεύσουν πλήρως τη ψωρίαση. Είναι γεγονός ότι την τελευταία δεκαετία η εισαγωγή των βιολογικών αναστολέων του TNF-α (Infliximab, Etanercept, Adalimumab) έχουν επιφέρει επανάσταση στην θεραπεία ασθενών με ψωρίαση όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ζητήματα και πιθανοί περιορισμοί που προκύπτουν με τη χρήση των ουσιών αυτών είναι το αναμενόμενο υψηλό κόστος της θεραπείας (Εικόνα15) και η έλλειψη μακροχρόνιας παρακολούθησης. Η επίδραση της χρήσης των παραγόντων αυτών δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Η μακροχρόνια παρακουλήθηση των παραγόντων αυτών, κρίνεται αναγκαία για τον προσδιορισμό του δυνητικού κίνδύνου για αυξημένη μόλυνση και κακοήθεια σε ασθενείς που έλαβαν αυτή τη θεραπεία.



Εικόνα 15: Αυξανόμενο κόστος των βιολογικών παραγόντων[67]

Πρόσφατα ένας νέος βιολογικός παράγοντας εγκρίθηκε απο το FDA, το ustekinumab (Stelara) ο οποίος χορηγείται σε ενήλικες με μέτρια προς σοβαρή μορφή ψωρίασης. Το ustekinumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που προσκολλάται στην πρωτεΐνη IL-12/23p40. Η εν λόγω πρωτεΐνη αποτελεί μέρος των κυτταροκινών, ιντερλευκίνη-12 και ιντερλευκίνη-23. Οι συγκεκριμένες κυτταροκίνες ευθύνονται για την πρόκληση φλεγμονής και για άλλες διαδικασίες που προκαλούν ψωρίαση. Αναστέλλοντας τη

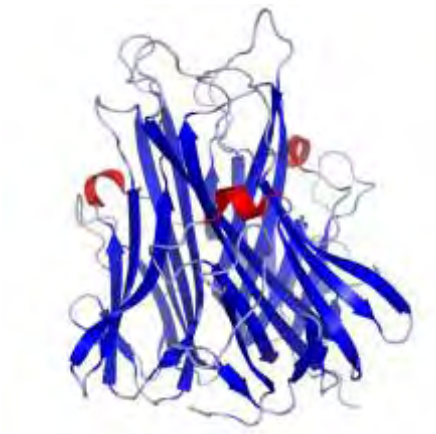
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

δραστηριότητά τους, η ουστεκινουμάμπη μειώνει τη δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα συμπτώματα της νόσου[68,69].

1.3. Γονίδια που εμπλέκονται με τη Ψωρίαση

1.3.1. TNFα (tumour necrosis factor alpha)

Ο TNF αναγνωρίστηκε το 1975 ως μία γλυκοπρωτεΐνη επαγόμενη από μια ενδοτοξίνη, που προκαλούσε αιμορραγική νέκρωση των σαρκωμάτων που μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια. Ο ανθρώπινος TNF κλωνοποιήθηκε το 1985. Ο TNF φαίνεται ότι εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών, μολυσματικών και κακοηθών καταστάσεων. Η εμπλοκή του TNFα στη φλεγμονή έχει αποδειχτεί από την αποτελεσματικότητα των αντί - TNF αντισωμάτων ή των διαλυτών TNF υποδοχέων (TNFRs) στον έλεγχο της ασθένειας στη ψωρίαση, στη ρευματοειδή και ψωριασική αρθρίτιδα, στη νόσο του Crohn και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις[71]. Ο TNF-άλφα είναι μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που μπορεί να παραχθεί από πολλά κύτταρα του δέρματος, συμπεριλαμβανομένων τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα μακροφάγα, και τα κύτταρα του Langerhans. Η κυτταροκίνη αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός μεγάλου φάσματος βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, του μεταβολισμού των λιπιδίων και της πήξης. Επιπλέον, είναι υπεύθυνη για σε μία μεγάλη ποικιλία ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου διάφορων αυτοάνοσων ασθενειών, αντίσταση στην ινσουλίνη και καρκίνο[72].



Εικόνα 16: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFα[70]

Το γονίδιο του TNFα βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 του ανθρώπου, και συγκεκριμένα στη θέση 6p21.3. Υπάρχει ένα αντίγραφο του γονιδίου σε κάθε χρωμόσωμα. Το γονίδιο εδράζεται στην περιοχή όπου βρίσκονται τα γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

συγκεκριμένα στην περιοχή της τάξης III, γεγονός που υποδηλώνει ότι εμπλέκεται με αυτό, και ανήκει στην υπεροικογένεια TNF. Το γονίδιο έχει τέσσερα εξώνια, που διακόπτονται από τρία ιντρόνια και αποτελείται από 2762 ζεύγη βάσεων[73]. Το τελευταίο εξώνιο κωδικοποιεί παραπάνω από το 80% της ώριμης πρωτεΐνης ενώ τα εξώνια I και II περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά τις πεπτιδικές αλληλουχίες του εκκινητή[73]. Η 3' αμετάφραστη περιοχή του TNFα είναι πλούσια σε στοιχεία AU (ARE). Το mRNA μεταφράζεται σε μία πρωτεΐνη 157 αμινοξέων. Η τελική μορφή της πρωτεΐνης του TNFα είναι τριμερής και αποτελείται από τρεις όμοιες υπομονάδες (Εικόνα 16).

Ο TNFα δρα και λειτουργεί μέσω της πρόσδεσής του με έναν από τους δύο υποδοχείς του, τον TNFR1 γνωστός και ώς p55 ή τύπος 1 και τον TNFR2 ή p75 ή τύπος2. Και οι 2 μορφές είναι λειτουργικές στη διαλυτή τους μορφή στη ψωρίαση. Αυτοί οι διαλυτοί υποδοχείς συναγωνίζονται με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων για τη σύνδεσή τους με τον TNFα και κατ' επέκταση για την αναχαίτιση της δραστηριότητάς του. Και οι 2 υποδοχείς συνδέονται στον TNFα με παρεμφερείς συγγένειες[59]. Ο TNFα προάγει τη δημιουργία φλεγμονής. Η βιολογική του δράση είναι συνάρτηση της ποσότητας στην οποία παράγεται. Συγκεκριμένα, σε μικρές συγκεντρώσεις λειτουργεί σαν ένας αυτοκρινής ή παρακρινής προαγωγέας της λειτουργίας των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο και διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων της IL-1, IL-6, IL-8, του παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM – CSF) αλλά και του ίδιου TNF, από τα μονοπύρηνα. Ο TNFα, κατά το σχηματισμό της φλεγμονής, προκαλεί τους ινοβλάστες να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης[34]. Αυτά τα μόρια προσκόλλησης αλληλεπιδρούν με τους προσδέτες τους στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα να καταλύεται αυξημένη μεταφορά λευκοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής[74].

1.3.2. Υποδοχείς του TNFα – TNFR1 και TNFR2

Ο TNF-α για να ασκήσει τις δράσεις του θα πρέπει να συνδεθεί με υποδοχείς κυττάρων με τους οποίους έχει μεγάλη συγγένεια και κατ' επέκταση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

μεγάλη ειδικότητα. Οι υποδοχείς που ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία είναι δύο και είναι ευρέως κατανεμημένοι στην πλειοψηφία των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού, με τον καθένα να παρουσιάζει διαφορετικές βιολογικές συνέπειες: ο TNFR1, πεπτίδιο μοριακού βάρου 60 kDa, και ο TNFR2, πεπτίδιο μοριακου βάρους 80 kDa[75,76]. Και οι δύο υποδοχείς αντιπροσωπεύουν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες με ομολογία 28% κυρίως στην εξωκυττάρια περιοχή τους[75]. Ο κάθε υποδοχέας αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, στο οποίο προσδένεται ο TNF-α και ένα ενδοκυττάριο το οποίο, μετά την πρόσδεση του TNF-α στον υποδοχέα, βοηθά στην παραγωγή σημάτων που ενεργοποιούν τις φλεγμονώδεις λειτουργίες του κυττάρου. Τα εξωκυττάρια τμήματα και στον TNFR1 και στον TNFR2 έχουν ομόλογη αλληλουχία, ενώ τα ενδοκυτάρια διαφέρουν σημαντικά[73,75,76]. Η ικανότητα των TNFR1 και του TNFR2 να αλληλεπιδρούν με παρόμοια και με διαφορετικά μόρια μπορεί, κατά κάποιο τρόπο, να εξηγήσει τις λειτουργίες τους. Μελέτες βασισμένες σε γενετικά τροποιημένους ποντικούς, στους οποίους δεν εκφράζονται τα γονίδια των υποδοχέων έδειξαν ότι ο TNFR1 υποδοχέας διαθέτει μια κυτταροπλασματική περιοχή απόπτωσης, μια αλληλουχία 80 αμινοξέων που δεσμεύει γρήγορα το αποπτωτικό μονοπάτι σηματοδότησης των κυττάρων. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές του TNFR2 δεν φέρουν καμία δομική ή λειτουργική ομοιότητα με εκείνη του TNFR1. Ο TNFR2 έχει αποδειχτεί ότι μεσολαβεί σε μονοπάτια που προωθούν την επανόρθωση των ιστών και την αγγειογένεση[71].

Οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων TNF την οποία αποτελούν μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου 1, με το εξωκυττάριο τμήμα τους να χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα τμήματα πλούσια σε κυστεΐνη, τα οποία σχηματίζονται από 3 δισουλφιδικούς δεσμούς και ουσιαστικά αποτελούν το “κλειδί” των υποδοχέων. Αναλυτικότερα, το γονίδιο του TNFR1 (TNF receptor type 1; CD120a; p55/60) βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 και συγκεκριμένα στη θέση 12p13.2. Αποτελείται από 13,340 ζεύγη βάσων, έχει 10 εξώνια και το προϊόν του γονιδίου έχει μήκος

Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR1[77]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

434 αμινοξέα[73]. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων (Εικόνα 17). Αυτή η πρωτεΐνη είναι από τους σημαντικότερους υποδοχείς για τον TNFα. Ο υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει τον NF-kappaB, να μεσολαβήσει στην απόπτωση και να λειτουργήσει σαν ρυθμιστής της φλεγμονής. Το γονίδιο του TNFR2 (TNF receptor type 2; CD120b; p75/80) βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 του ανθρώπου, και συγκεκριμένα στη θέση 1p36.3-p36.2. Αποτελείται από 42,220 ζεύγη βάσεων, έχει 10 εξώνια[72] και η πρωτεΐνη που προκύπτει έχει 439 αμινοξέα[73](Εικόνα 18).

Ο υποδοχέας TNFR1 μεσολαβεί σε πολλές από τις δράσεις του TNF-α, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του NF-kappaB, τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων , την παραγωγή Th1 κυταρροκίνων, και την απόπτωση των κυττάρων[78,79,80]. Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα, ο υποδοχέας αυτός βρέθηκε στα κερατινοκυττάρα και στα δενδριτικά κύτταρα της επιδερμίδος σε υγιή και ψωριασική επιδερμίδα. Ωστόσο, σε ψωριασικές βλάβες, η έκφραση τουTNFR1 αυξάνεται στα δερματικά αιμοφόρα αγγεία και στην κεράτινη στιβάδα[79,81]. Επιπλέον, εντοπίστηκε αύξηση των διαλυτών TNF-RI στο πλάσμα ασθενών με ψωρίαση, σε σχέση με το πλάσμα ασθενών χωρίς ψωρίαση[81]. Αν και διαλυτό TNFR1 μπορεί να ανταγωνισθεί τη δραστηριότητα του TNF-α, έχει βρεθεί να προκαλεί αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενδεχομένως συμβάλλει στην αγγειογένεση και τη διευκόλυνση της Τ εισβολής των κυττάρων της επιδερμίδας[82].

Σε σύγκριση με τον TNFR1, ο TNFR2 μεσολαβεί σε παρόμοιες δράσεις του TNF-α όπως ο πολλαπλασιασμός των Τ κυτταρων και η παραγωγή κυτταροκινών[84,85] καθώς και σε άλλες δράσεις, όπως η μετανάστευση των κυττάρων του Langerhans στους λεμφαδένες[86]. Στο υγιές δέρμα, ο TNFR2 δεν βρίσκεται στην επιδερμίδα, συνδέεται μόνο με τους εκκριτικούς αγωγούς του ιδρώτα και με δερματικά δενδριτικά κύτταρα. Η έκφραση του TNFR1 και TNFR2 αυξάνεται στην

Εικόνα 18: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR2[83]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

κερατίνη στιβάδα των ψωριασικών βλαβών και συνδέεται επίσης με τα αιμοφόρα αγγεία της επιδερμίδος[79,81].

Σχεδόν όλα τα εμπύρηνα κύτταρα εκφράζουν TNFα υποδοχείς, ενώ η κατανομή τους ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο TNFR1 εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους πχ. ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα[73], εκτός από τα ερυθροκύτταρα ενώ ο TNFR2 εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα[87]. Στο ανθρώπινο σύστημα, η διαλυτή μορφή του TNF συνδέεται ταχέως με τον TNFR1 με υψηλή συγγένεια και αργή αποσύνδεση, με αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η κινητική αποσύνδεσης του TNF από τον TNFR2 είναι 20 έως 30 φορές ταχύτερη από ότι στον TNFR1[81,87]. Ο TNFR1 μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως και από τη διαμεμβρανική και από τη διαλυτή τριμερή μορφή του TNFα, ενώ ο TNFR2 εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T cells) και σχετίζεται με τη διαμεμβρανική μορφή του TNF. Μία σειρά ερεθισμάτων που περιλαμβάνουν τον TNF, την IL-1, την IL-10 και τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου ιστών (tissue plasminogen activator), έχουν την δυνατότητα να αυξάνουν την έκφραση του TNFR2 μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής του. Αντίθετα, ο TNFR1 υπορυθμίζεται παρουσία αυτών των ερεθισμάτων[88,89,90].

Οι υποδοχείς του TNFα σχηματίζουν επίσης τριμερή[91]. Η πρόσδεση του υποδοχέα με τον TNFα προκαλεί δομικές αλλαγές στον υποδοχέα, προκαλώντας την απόσπαση της ανασταλτικής πρωτεΐνης SODD από την ενδοκυτταρική επικράτεια. Αυτή η απόσπαση δίνει τη δυνατότητα στην πρωτεΐνη TRADD να προσδεθεί στην επικράτεια και να οδηγήσει, στα εξής μονοπάτια σηματοδότησης[92,93]:

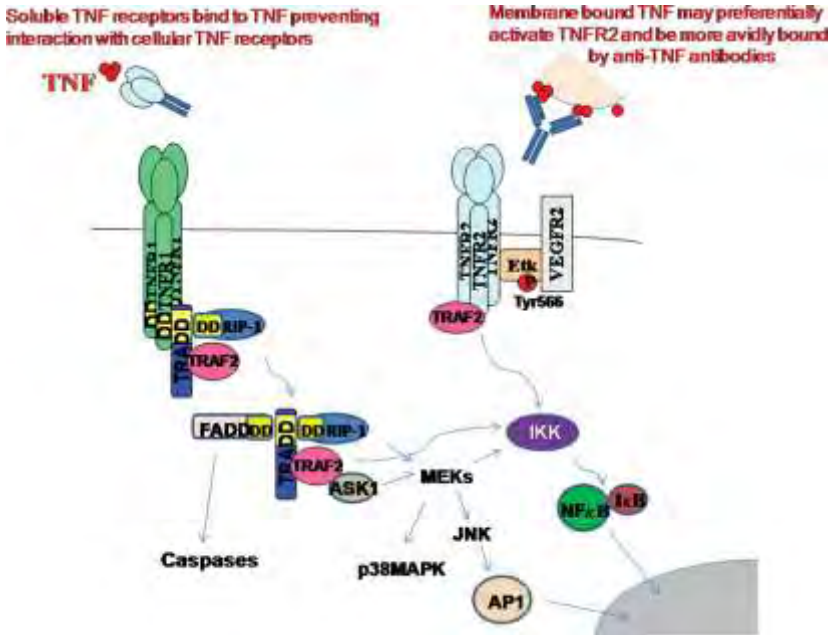
- **Ενεργοποίηση του NF-kB**: η TRADD στρατολογεί την TRAF2 και την RIP. Η TRAF2 με τη σειρά της στρατολογεί την κινάση IKK, όπου με την δράση της serine-threonine κινάσης RIP την ενεργοποιεί. Μία πρωτεινη αναστολέας, IκBα, που φυσιολογικά προσδένεται στον NF-κB και αναστέλλει την μετανάστευσή του, φωσφορυλιώνεται από την IKK και στην συνέχεια αποικοδομείται, απελευθερώνοντας τον NF-κB. Ο NF-κB είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

μεταναστεύει στον πυρήνα και μεσολαβεί στη μεταγραφή μιας μεγάλης ποικιλίας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό, στην φλεγμονώδη ανταπόκριση και σε αντι-αποπτωτικούς παράγοντες.

- **Ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPK:** Από τα τρία βασικά μονοπάτια των MAPK, ο TNFα προάγει την ενεργοποίηση της JNK ομάδας που σχετίζεται με το στρες. Το JNK μονοπάτι εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και είναι γενικά προ-αποπτωτικό.

- **Προαγωγή του κυτταρικού θανάτου:** ο TNFR1 εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο, όπως όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TNF. Ωστόσο, ο ρόλος του TNF στα μονοπάτια της απόπτωσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με την εμπλοκή του στη φλεγμονή[92,93].



Εικόνα 19: Τα μονοπάτια σηματοδότησης που προκαλούνται από τις ενδοκυτταρικές δράσεις του TNFα[71]

1.3.3. Ο βιολογικός ρόλος του TNFα

Οι βιολογικές δράσεις του TNF-α ποικίλουν και ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν είναι σχετικά περίπλοκος. Αυτή η πρωτεϊνη η οποία από τη μία συνεισφέρει στην αντίσταση σε ορισμένα είδη μολύνσεων και από την άλλη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

προκαλεί παθολογικές επιπλοκές, εκτελεί αντιφατικούς ρόλους κάτι που μπορεί να οφείλεται σε ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται. Οι ποικίλοι θεραπευτικοί ρόλοι του TNF-α, συμπεριλαμβάνουν την ανοσοδιέγερση, την αντίσταση σε μολυσματικούς παράγοντες, την αντίσταση σε όγκους, τη ρύθμιση του ύπνου και την εμβρυϊκή ανάπτυξη[94]. Ένας από τους κύριους βιολογικούς ρόλους του TNFα είναι η άμυνα του ξενιστή ενάντια σε βακτηριακές, ιϊκές και παρασιτικές μολύνσεις[71,87]. Φυσιολογικά ο TNFα είναι σημαντικός για την φυσιολογική ανταπόκριση σε μολύνσεις αλλά η υπερβολική παραγωγή μπορεί να είναι επιβλαβής[71].

Ο TNFα μπορεί να παραχθεί από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένου των μακροφάγων, των κερατινοκυττάρων, των βασεόφιλων, των Τ λεμφοκυττάρων, των ινοβλαστών, των νευρικών κυττάρων, των κοκκιοκυττάρων, των κυτταροτοξικών (NK) και των λείων μυϊκών κυττάρων[94]. Ο TNFα μεσολαβεί σε μία ποικιλία μηχανισμών στα κύτταρα ανάλογα με τα επίπεδα συγκέντρωσης του στο κυκλοφορικό σύστημα. Διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών, όπως είναι η IL-1, ιντερφερόνη-γ, IL-2, και τη καταστροφή ιστών τοποθετώντας τον έτσι στην κορυφή του φλεγμονώδους καταρράκτη. Η ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNFα έδειξε ότι προκαλείται η έκφραση γονιδίων που αναχαιτίζουν την απόπτωση, ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συμμετέχουν στην μετανάστευση καρκινικών κυττάρων όγκων και στη μετάσταση[95]. Αυτό προτείνει ότι πιθανώς οι ανταγωνιστές του TNFα να είναι αποτελεσματικοί σε κάποια είδη καρκίνου[94].

Οι βιολογικές λειτουργίες του TNF-α είναι πολύ σημαντικές για την άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων λοιμώξεων. Στις περιπτώσεις που το σήμα που διεγείρει την παραγωγή του είναι παρατεταμένο, οπότε και παράγονται μεγάλες συγκεντρώσεις του μορίου, τότε ο TNF-α δρα ενδοκρινώς. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι κυριότερες λειτουργίες του είναι: α) Δρα ως πυρετογόνο στα κύτταρα του υποθαλάμου του εγκεφάλου και τελικά προκαλεί πυρετό.β) Επιδρά στα μονοπύρηνα μακροφάγα και διεγείρει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1 και η IL-6. γ) Δρα στα κύτταρα του ήπατος με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών του

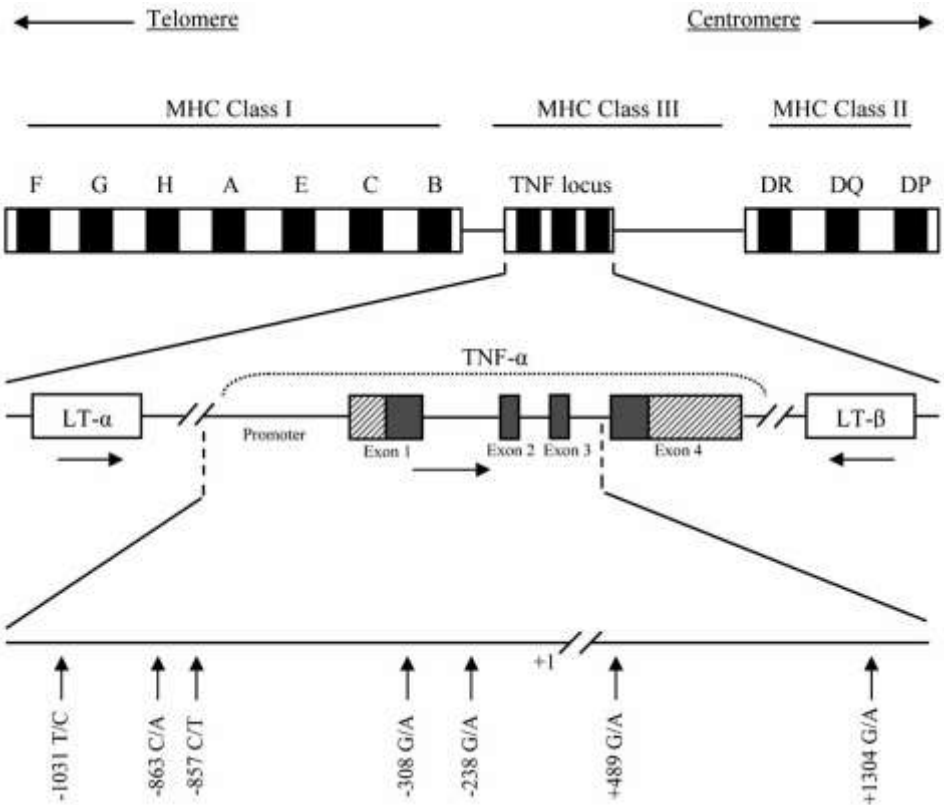
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ορού, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξεία φάση της λοίμωξης. δ) Ενεργοποιεί το σύστημα πήξης. ε) Καταστέλλει την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό πολλών βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών.

1.3.4. Πολυμορφισμοί του TNFα και των υποδοχέων του στην Ψωρίαση

Εντός και περί της περιοχής του γονιδίου του TNF-α έχουν βρεθεί πολλοί πολυμορφισμοί, οι περισσότεροι από τους οποίους προκύπτουν από την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γονίδιο έχουν εντοπιστεί ανοδικά του γονιδίου και βρίσκονται ως επί των πλείστον στον υποκινητή του. Από τους πιο γνωστούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο του TNFα είναι οι: TNF G-308A, TNF G-238A, TNF C-857T, TNF C-1031T , TNF C-863A, ο TNF G+489A, ο TNF G+1304A (Εικόνα 20). Υπάρχουν και άλλοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό αλλά είναι σχετικά σπάνιοι. Μία αλλαγή στην αλληλουχία ενός γονιδίου μπορεί να επηρεάσει την παραγόμενη πρωτεΐνη σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται και το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει. Αυτό μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στο άτομο που φέρει το SNP ειδικά εάν το SNP εμπλέκεται άμεσα με κάποια ασθένεια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 20: - Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFα[61]

Μία συσχέτιση της κατα πλάκας ψωρίασης με λειτουργικούς πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιου TNF-α έχει αναφερθεί[96]. Οι πολυμορφισμοί TNFG- 238A και TNF G-308A είναι από τους πιο καλά μελετημένους πολυμορφισμούς για τη κατά πλάκας ψωρίαση Μελέτες έδειξαν επανειλημμένα, ότι η μεταφορά του αλληλόμορφου TNFG-238A σε Καυκάσιους είναι 3-5 φορές πιο συχνή σε ασθενείς με κατά πλάκας ψωρίαση σε σύγκριση με υγιή άτομα[97]. Βέβαια χρειάζονται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά ισχυρά. Ο πολυμορφισμός αυτός αφορά την αντικατάσταση του αλληλόμορφου G από το A και βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου[61]. Το A αλληλόμορφο είναι αρκετά σπάνιο και έτσι συνήθως τα άτομα έχουν το GG ή το GA γονότυπο.

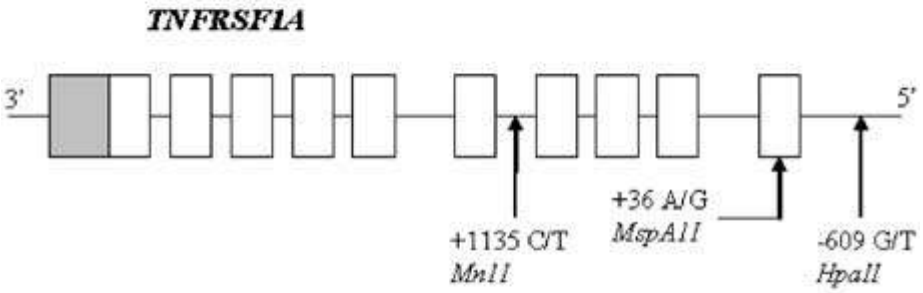
Ένας αρκετά μελετημένος, για τη ψωρίαση και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, πολυμορφισμός είναι ο TNF G-308A, που αφορά την αντικατάσταση του φυσιολογικού αλληλομόρφου G από το αλληλόμορφο A. Η ύπαρξη του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου έχει συσχετιστεί με τον απλότυπο HLA-A1-B8-DR3-DQ2[98,99] καθώς επίσης με αυτοάνοσες ασθένειες και την υπερπαραγωγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

του TNFα[99,100]. Πιθανώς αυτό το A αλληλόμορφο να μεσολαβεί στην απορρύθμιση της λειτουργίας των κυτταροκινών και να επηρεάζει την παθογένεια στην ΡΑ και στη ψωρίασης, προκαλώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου οδηγώντας έτσι τα επίπεδα του TNFα σε υψηλότερα από τα φυσιολογικά[99,101,102].

Επίσης, αρκετά συχνός είναι ο πολυμορφισμός TNF C-857T, που αφορά την αντικατάσταση του C αλληλομόρφου από T. Θεωρείται ότι ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με την αρθρίτιδα και πιο συγκεκριμένα με την ψωριασική αρθρίτιδα[103].

Τέλος, ο πολυμορφισμός T676G του TNFR2 εντοπίζεται στο εξώνιο 6 του γονιδίου και αφορά την αντικατάσταση μιας βάσης στο κωδικόνιο 196, με αποτέλεσμα από A**T**G να προκύπτει A**G**G (Εικόνα 21). Αυτή η μη συντηρητική αλλαγή στην πεπτιδική αλυσίδα οδηγεί στην αντικατάσταση της μεθειονίνης από την αργινίνη[66]. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με τη ΡΑ, συγκεκριμένα με τα επίπεδα των TNFRs που απελευθερώνονται από τα T κύτταρα σε ασθενείς με ΡΑ[104]. Η ύπαρξη του G αλληλόμορφου μπορεί να αυξήσει την παραγωγή της IL-6 περισσότερο σε σχέση με το T αλληλόμορφο. Επιπλέον, το αλληλόμορφο G μπορεί να επηρεάσει την αποδιάταξη των υποδοχέων των μεμβρανών και/ή την πρόσδεση του αντίστοιχου προσδέτη[105].



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση τμήματος του γονιδίου TNFR1[106]

1.4. Φαρμακογενετική

Τα αποτελέσματα μίας φαρμακευτικής αγωγής μπορεί να διαφέρουν μέσα σε ένα πληθυσμό. Παρότι κάποια άτομα έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα, κάποιοι άλλοι ίσως έχουν ελάχιστη ή και καθόλου ανταπόκριση στη θεραπεία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Επιπλέον, μερικοί ασθενείς ενδέχεται να παρουσιάσουν παρενέργειες που μπορεί να είναι από ενοχλητικές έως επικίνδυνες για τη ζωή τους. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στη διαφορετικότητα της ανταπόκρισης σε ένα φάρμακο, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, της φυλής, του φύλου, της αλληλεπίδρασης με άλλα φάρμακα, άλλες λιγότερο σημαντικές ασθένειες, και τη νεφρική και ηπατική λειτουργία. Ωστόσο, εμφανίζονται έντονες αποδείξεις ότι οι γενετικές διαφορές μπορεί να είναι ένας σημαντικός (και σε μερικές περιπτώσεις ο δεσπόζων) παράγοντας επιρροής της διακύμανσης της φαρμακευτικής ανταπόκρισης[107-109].

Η φαρμακογενετική αποτελεί ένα νέο κλάδο των βιολογικών επιστημών που στοχεύει στο σχεδιασμό και την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων που θα βασίζονται σε συγκεκριμένο γενετικό χαρακτηριστικό του ασθενού ή ομάδας ασθενών, με σκοπό να περιοριστούν στο ελάχιστο οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου και ταυτόχρονα να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του σε θεραπευτικό επίπεδο[108,109].

Είναι απόλυτα εξακριβωμένο σήμερα ότι τόσο η αποτελεσματικότητα όσο και οι ανεπιθύμητες ενέργειες ενός φαρμάκου εξαρτώνται από διάφορους γενετικά καθορισμένους παράγοντες, όπως την απορρόφηση και κατανομή του στους ιστούς, το μεταβολισμό του, τη συγκέντρωσή του στο σημείο-στόχο και τον αριθμό και τη μορφολογία των υποδοχέων δράσης του.

Η εξέλιξη της φαρμακογενετικής δεν θεωρείται πλήρης, αλλά μάλλον βρίσκεται σε πολύ αρχικά στάδια έχοντας ως απώτερο σκοπό την εξατομίκευση της θεραπείας με βάση το γονιδίωμα του ασθενούς (personalised medicine). Παρότι πολλές προσπάθειες μέχρι σήμερα έχουν εστιάσει σε απλά γονίδια, είναι εμφανές ότι υπάρχουν πολυάριθμα που συμβάλουν στη διακύμανση της φαρμακευτικής ανταπόκρισης, ενώ και ο αριθμός των ασθενών που απαιτείται είναι σχετικά μεγάλος ξεφεύγοντας από τα στενά όρια ενός κράτους, κρίνοντας έτσι αναγκαίο την συνεργασία πολλών διαφορετικών πανεπιστημιακών νοσοκομειακών μονάδων (multi-centre study). Συνεπώς, η φαρμακογενετική μετατρέπεται σε ένα πεδίο βασισμένο στη γενωμική, οδηγώντας σε ένα νέο όρο, τη φαρμακογενωμική. Οι διαφορές στους ορισμούς της φαρμακογενετικής και της φαρμακογενωμικής είναι συχνά αντικείμενο διαμάχης, αλλά χρησιμοποιούνται συχνά σαν συνώνυμα, και είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

πιθανό ότι ο όρος “φαρμακογενωμική” θα αντικαταστήσει, τελικά, τη φαρμακογενετική[110,111].

1.4.1. Φαρμακογενετική και αντί-TNF θεραπεία

Ακόμη και αν, η αντι-TNF θεραπεία έχει αποδειχθεί να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της ψωρίασης, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στην ανταπόκριση σε βιολογικούς παράγοντες[112]. Επίσης, η θεραπεία με αντι-TNFα είναι πολύ ακριβή και έχουν σημαντικούς κινδύνους. Μελέτες που διεξήχθησαν σε ασθενείς με ΡΑ σχετικά με διαφορές στο φαρμακογενωμικό προφίλ απόκρισης μεταξύ ανταποκρίθέντων και μη ανταποκριθέντων, ανέδειξαν κάποια ενδιαφέροντα γονιδία με μεταβολές της έκφρασης τους κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι τροποποιήσεις αυτές συνδέονται με την ορθή κλινική ανταπόκριση.

Ο Seitz και οι συνεργάτες του εξέτασαν την επίδραση του πολυμορφισμού TNFG-308A, στη θεραπευτική απόκριση των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ), ψωριασική αρθρίτιδα (ΨΑ) και αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ) που λάμβαναν anti-TNFα παράγοντες. Η μελέτη αυτή έγινε σε 54 ασθενείς με ΡΑ, 10 με ΨΑ και 22 με ΑΣ στους οποίους είχε γίνει γονοτύπηση για τον υπό εξέταση πολυμορφισμό. Μετά από 24 εβδομάδες που έλαβαν θεραπεία με infliximab (n = 63), adalimumab (n = 10) ή etanercept (n = 13), η κλινική ανταπόκριση ήταν πολύ καλύτερη για τους ασθενείς με G / G γονότυπο, σε σύγκριση με την μέτρια ανταπόκριση των ασθενών με A / G γονότυπο και την πλήρη αποτυχία των ασθενών με A / A γονότυπο, ανεξαρτήτως της ασθένειας που αντιμετώπιζαν[113]. Επίσης, ο Guis και οι συνεργάτες του εξέτασαν την επίδραση του -308 A / G πολυμορφισμού στο TNF-α γονίδιο για θεραπεία με Etanercept σε 86 ασθενείς με ΡΑ. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με ΡΑ με γονότυπο −308 G/G TNFα ανταποκρίθηκαν καλύτερα στο Etanercept από τους ασθενείς με -308 A / G γονότυπο[114].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

1.5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση γνωστών πολυμορφισμών στο γονίδιο του TNFα και του υποδοχέα του, TNFR2, με την κλινική ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες, στον ελληνικό πληθυσμό, με απώτερο στόχο την ανάδειξη ενός προγνωστικού απλοτύπου για την ανταπόκριση στη δεδομένη θεραπεία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 80 ασθενείς από την Νότια, Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα, με Ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με αντί – TNF παράγοντα για τουλάχιστον 6 μήνες. Οι αντί – TNF παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το **Infliximab (Remicade, MSD)**, το **Etanercept (Enbrel, Pfizer)** και το **Adalimumab (Humira, Abbott)**. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με Ψωρίαση, βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του δείκτη PASI.

Υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε το περιφερικό αίμα ασθενών με ψωρίαση από την Νότια, Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα. Τα δείγματα, τα οποία προσφέρθηκαν έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς, προέρχονται από την Δερματολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης.

2.2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από το αίμα είναι πρωταρχικής σημασίας για τη μελέτη του. Στο στάδιο αυτό, το DNA που θα απομονωθεί θα πρέπει να είναι καλής ποιότητας, δηλαδή μη αποικοδομημένο και επαρκούς ποσότητας. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι και πρωτόκολλα για την απομόνωση του DNA με βάση το είδος του DNA που πρόκειται να απομονωθεί (πυρηνικό,μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό) καθώς και το είδος και την ποσότητα των κυττάρων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτόκολλου επώασης με πρωτεϊνάση Κ. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ώς εξής:

1. Αρχικά, αφήνουμε τα δείγματα να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε ελαφρά κάθε δείγμα ώστε να μην πήξει το αίμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

2. Όταν ξεπαγώσουν εντελώς, μεταφέρουμε 0,5ml αίματος σε σωλήνα eppendorf (2ml) και προστίθεται 1ml SSC 1x. Ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4° C για 3 min.
3. Στη συνέχεια, απομακρύνεται 1 ml του υπερκείμενου και προστίθεται 1 ml SSC 1x. Πραγματοποιείται ανάδευση στη συσκευή vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4° C για 1 min.
4. Έπειτα, αφού απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο, προστίθεται 0,5 ml CH_3COONa 0,2M. Πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex και στη συνέχεια προστίθενται 50 μl SDS 5% και 5 μl proteinase K (20ng/μl). Αναδεύουμε τους σωλήνες και ακολουθεί επώαση για 1h στους 55° C, με ανακίνηση των σωλήνων κάθε ένα τέταρτο.
5. Μετά την επώαση, προστίθενται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml chloroform [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol], ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στους 4° C στις 13000 rpm. Με τη φυγοκέντρηση, δημιουργούνται τρεις στρώσεις, που είναι: μία ανώτερη υδατική φάση, μία κατώτερη οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα μεταξύ των δύο προηγούμενων φάσεων. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός της διαλυτής φάσης που περιέχει το DNA, από την οργανική.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο eppendorf και προσθέτουμε 1ml chloroform [24:1 (v/v) chloroform - isoamyl alcohol], αναδεύουμε στο vortex και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10min στους 4° C στις 13000 rpm.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorf και προσθέτουμε 1ml isopropanol. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή στους -20 για 15min ή overnight. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους 4° C.
8. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml διαλύματος αιθανόλης 70%. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10min στους 4° C στις 13000 rpm.
9. Αφαιρούμε το υπερκείμενο πολύ προσεκτικά ώστε να μην φύγει το ίζημα και στη συνέχεια τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο για ξήρανση για 1 ώρα στους 37° C. Στόχος είναι να εξατμιστεί η αιθανόλη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

εντελώς και να μείνει μόνο το DNA, το οποίο θα είναι κολλημένο στα eppendorfs λόγω της προηγούμενης φυγοκέντρησης.

10. Αφότου στεγνώσει το DNA, προσθέτουμε 100μl dd H_2O για επαναδιάλυση του DNA.
11. Αφήνουμε τα δείγματα στους 4° C για να επαναδιαλυθούν overnight. Για αποθήκευση των δειγμάτων τα τοποθετούμε στους -20 για μελλοντική χρήση.

Το DNA που λήφθηκε ,μετά απο μέτρηση σε φωτόμετρο, είχε μέση συγκέντρωση 100-150ng/μl

2.2.1. Παρασκευή αντιδραστηρίων

Τα stock διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση είναι τα εξής:

- **20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, pH 7.0):** Προσθήκη 175,4 g NaCl και 88,2 gr Sodium citrate dehydrate σε 500 ml ddH_2O. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.0 με σταγόνες HCl. Τελικός όγκος διαλύματος 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση. Το διάλυμα **SSC 1x** που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση DNA προέκυπτε από την αραίωση του παραπάνω διαλύματος.
- **3M Sodium Acetate (NaOAc):** Διαλύονται 40,81gr sodium citrate σε 80ml ddH_2O. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 5.2 με σταγόνες glacial acetic acid (CH_3COOH). Συμπληρώνουμε με ddH_2O ως τα 100ml. Ακολουθεί αποστείρωση. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε **Sodium Acetate (NaOAc) 0,2 M**, το οποίο προέκυπτε από την αραίωση του πυκνού διαλύματος.
- **10% SDS:** Αναμειγνύονται 10 g Electrophoresis grade SDS σε 90ml ddH_2O. Ανάδευση στους 68° C για επιτάχυνση της διάλυσης. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 7,2 προσθέτοντας σταγόνες HCl. Προσθήκη ddH_2O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 100ml. Μετά την αραίωση του διαλύματος 10% SDS προέκυπτε το διάλυμα **5% SDS** που χρησιμοποιήθηκε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

- **Chloroform [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol]**: Για την παρασκευή του διαλύματος αναμειγνύονταν 24 ml χλωροφορμίου και 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης.

2.2.2. Ο ρόλος των αντιδραστηρίων

- **EDTA 0,5M:** είναι αντιπηκτικός παράγοντας που αποτρέπι τη πήξη του αίματος και τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.Γι' αυτό το λόγο το αίμα των ασθενών με ψωρίαση μετά τη λήψη του διατηρήθηκε σε σωληνάκια falcon των 15ml που περιέχουν 0,5ml EDTA 0,5M.
- **SSC:** είναι ένα ήπιο διάλυμα που έχει το ρόλο ενός λυτικού διαλύματος. Έχει την ιδιότητα να καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να μπορέσουν τα επόμενα διαλύματα να επιδράσουν στις πυρηνικές μεμβράνες, ενώ το **NaOAc** χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.
- **SDS:** είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό που διασπά τη πυρηνική μεμβράνη και γαλακτωματοποιεί τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Παρεμβαίνει στις πολικές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές των λιπιδίων και των πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.
- **Πρωτεϊνάση Κ 20ng/μl:** προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών, όπως οι νουκλεάσες που μπορούν να αποικοδομήσουν το DNA. Το ένζυμο παραμένει ενεργό κατά την παρουσία διάφορων χημικών ουσιών που αποδιατάσουν πρωτεΐνες όπως είναι το SDS.
- **Φαινόλη** έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να διαχωρίζει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεικά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH >7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου στην συνέχεια έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Προκαλεί επίσης τη μετουσίωση των πρωτεινών και την απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει τον αφρό και σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ της υδατικής και της οργανικής, όπου συλλέγονται οι πρωτεϊνες.

- **Χλωροφόρμιο [24:1 (v /v) chloroform - isoamyl alcohol]:** . Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Το χλωροφόρμιο είναι ένας οργανικός, πτητικός παράγοντας που προκαλέι μετουσίωση των προτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται πρωτεϊνες.
- **Ισοπροπανόλη-Παγωμένη αιθανόλη 70%:** Το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και στη συνέχεια ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70%. Το DNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

2.3. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

2.3.1. Φωτομέτρηση - Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA που απομονώθηκε από το αίμα έγινε με τη μέθοδο της φωτομέτρησης. Το φωτόμετρο αποτελεί το κατάλληλο όργανο για τη ταχεία και αξιόπιστη φωτομέτρηση του DNA. Το DNA απορροφά το υπεριώδες φως με μέγιστο στα 260 nm μήκος φωτός, λόγω της ύπαρξης των αρωματικών βάσεων, δηλαδή της αδενίνης, θυμίνης, κυτοσίνης και γουανίνης. Κατά τη διαδικασία της φωτομέτρησης το δείγμα εκτίθεται στο υπεριώδες φως και ένας φωτοανιχνευτής μετρά το φως που περνά διαμέσου του δείγματος. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του DNA στο δείγμα .Έτσι, αραιώθηκαν 2μl DNA σε 98 μl ddH_2O. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε κυψελίδα φωτομέτρησης και κατόπιν τοποθετήθηκε στο φωτόμετρο.

Τα απομονωμένα δείγματα DNA μπορεί να είναι μολυσμένα με άλλα μόρια (πρωτεΐνες). Το φωτόμετρο έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει τη τιμή του λόγου 260/280, ο οποίος αποτελεί δείκτη του περιεχομένου νουκλεϊκών οξέων/πρωτεϊνών στο δείγμα. Ο λόγος αυτός αποτελεί ένδειξη για τη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

καθαρότητα του δείγματος απο πρωτεϊνες και πρέπει να έχει τιμές μεταξύ 1,80-2,00. Στη περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος τότε το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεϊνες ή φαινόλη και η μέτρηση του δεν είναι ακριβής.

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση – Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή είναι η κύρια μέθοδος για το διαχωρισμό μορίων DNA με διαφορετικό μέγεθος. Η ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Στη ηλεκροφόρηση σε πηκτή κυρίαρχο ρόλο στο διαχωρισμό παίζει το μοριακό μέγεθος, ενώ λιγότερο σημαντικά είναι το φορτίο και το σχήμα του μορίου. Αυτό συμβαίνει γιατί το πήκτωμα είναι ένα δίκτυο από πόρους μέσα στους οποίους τα μόρια του DNA πρέπει να ταξιδέψουν έως ότου φτάσουν στο θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο απο τους πόρους της πήκτης σε σχέση με τα μεγαλύτερα και ως εκ τούτου κινούνται ταχύτερα. Σχηματίζονται συνεπώς στο πήκτωμα ζώνες (bands) από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση υπεριώδους φωτός.

Υπάρχουν δύο τύποι πηκτής, το πήκτωμα αγαρόζης και το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR και το ποιοτικό έλεγχο των απομονωμένων DNA δειγμάτων χρησιμοποιούμε το πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300nm διάμετρο.

<u>Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA</u>

Ο ποιοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Με τη διαδικασία αυτή μπορεί να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA, καθώς και εάν είναι συμπαγές ή σε θραύσματα.

Η παρασκευή της πηκτής 1% γίνεται ώς εξής:

- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 40ml TAE 1x και 0,3g αγαρόζης.
- Το παρασκεύασμα θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη (το μίγμα γίνεται διαυγές).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

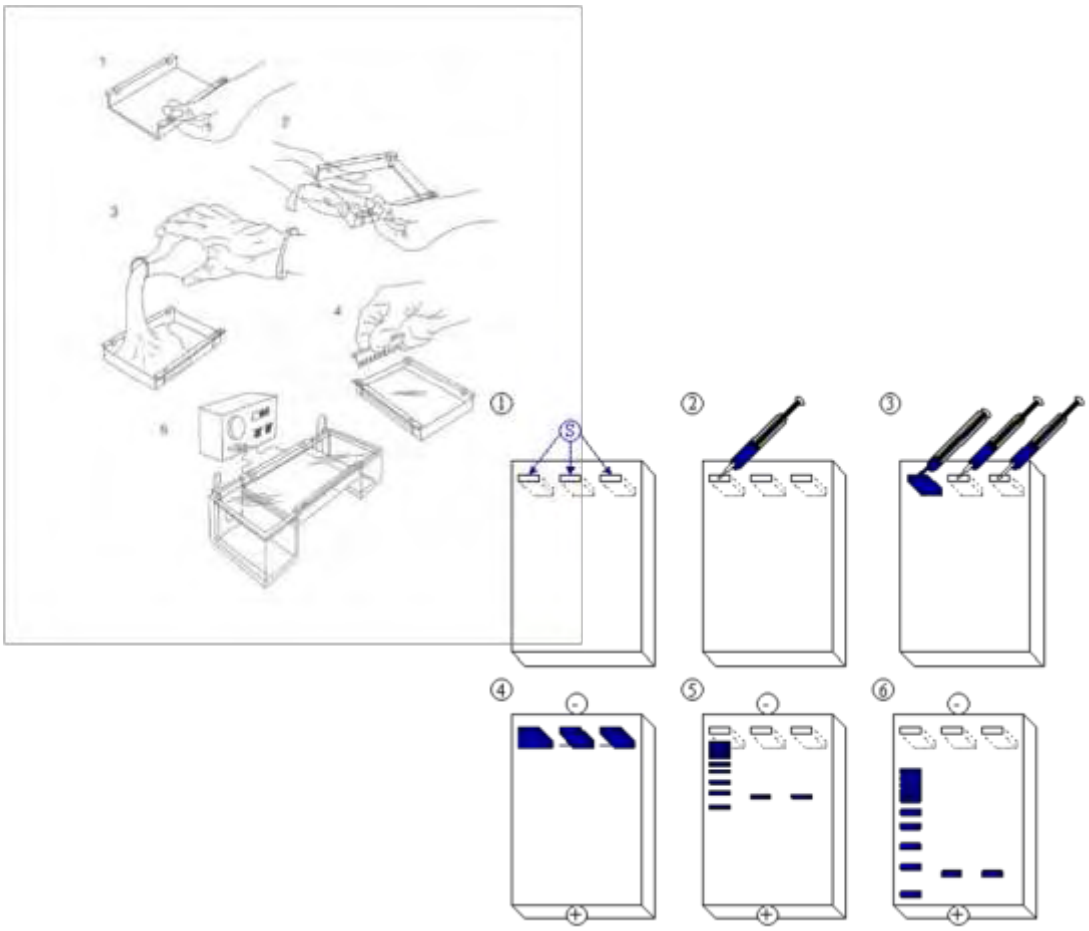
- Προστίθενται 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και γίνεται καλή ανακίνηση. Αυτή η χημική ένωση έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και να φωσφορίζει όταν ενεργοποιηθεί με υπεριώδη ακτινοβολία.
- Στη συνέχεια χύνεται σε κατάλληλη πλάκα (Perspex plate), με ταινία γύρω γύρω ώστε να σταθεροποιηθεί.
- Τοποθετούμε τα χτενάκια στο πήκτωμα για να σχηματιστούν τα «πηγαδάκια» στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.
- Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει για 30 λεπτά περίπου.

Τέλος, αφαιρούνται τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x έτσι ώστε να γεμίσουν οι θέσεις που φορτώνουμε τα δείγματα. Σε κάθε θέση τοποθετείται 3μl DNA αναμεμειγμένο με 3 μl χρωστικής (loading buffer). Στη συνέχεια κλείνουμε τη συσκευή και ορίζουμε την τάση γύρω στα 100V (180mA) έως ότου η χρωστική να καλύψει τα 2/3 της απόστασης από το σημείο που τοποθετήθηκαν τα δείγματα (περίπου 20 λεπτα). Έπειτα μεταφέρουμε το πήκτωμα σε συσκευή UV όπου μπορούμε να δούμε το DNA λόγω της ύπαρξης του βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 22). Το γενωμικό DNA περιμένουμε να βρίσκεται μέσα ή λίγο πιο κάτω από τα πηγάδια της πηκτής. Το τζέλ φωτογραφίζεται.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη είναι:

- **TAE 50x**: Το TAE 50x παρασκευάζεται διαλύοντας 121 gr Tris base, 28,5 ml acetic acid και 50 ml EDTA 0,5M σε τελικό όγκο 500ml. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Για να χρησιμοποιήσουμε TAE 1x αραιώνουμε τον επιθυμητό όγκο από το πυκνό διάλυμα TAE 50x.
- **Loading buffer 6x:** Αναμειγνύουμε 1 ml bromophenol blue 1% w/v με 1 ml TBE 10x και 5 ml γλυκερόλη 100%. Συμπληρώνουμε με ddH_2O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10ml.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Προετοιμασία της πηκτής και "φόρτωση" των δειγμάτων[115,70]

2.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

2.4.1. Γενικά

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) επινοήθηκε από τον Kary Mullis το 1983 (Mullis και συν.,1983), ανακάλυψη για την οποία τιμήθηκε με το Νόμπελ Χημείας το 1993[116]. Η τεχνική της PCR αποτελεί, μέχρι σήμερα, ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία των βιολογικών και ιατρικών επιστημών.

Προκειμένου να μελετήσουμε τους πολυμορφισμούς που βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων TNFα και $TNFR_2$ χρησιμοποιούμε τη τεχνική της PCR, αποφεύγοντας έτσι τη μέθοδο της κλωνοποίησης. Με τη PCR, μπορούμε να ενισχύσουμε το συγκεκριμένο τμήμα που μας ενδιαφέρει σε μεγάλες ποσότητες με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, όπου υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

πολλαπλασιάσουμε. Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί. Οι υβριδοποιημένοι εκκινητές λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για τη δράση της DNA πολυμεράσης και έτσι για κάθε αλυσίδα δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεσοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs).

2.4.2. Στάδια Θερμικής Κυκλοποίησης

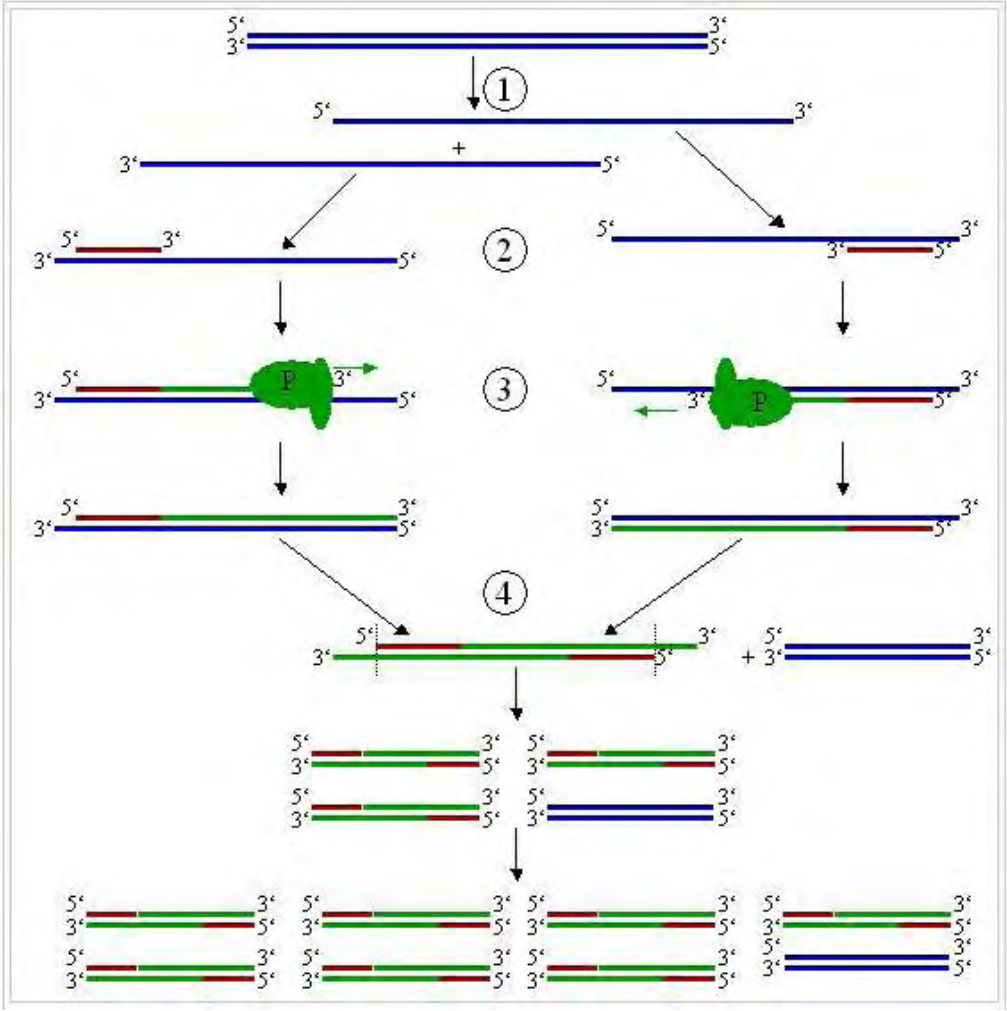
Η τεχνική της PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών σταδίων, τα οποία διαφέρουν στη θερμοκρασία και στο χρόνο. Ο κάθε κύκλος αποτελείται απο τα εξής στάδια (εικόνα 23):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με θέρμανση σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού (91-95°C), έτσι ώστε να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA και να προκύψει μονόκλωνο DNA. Και οι δυο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων μορίων.
2. Υβριδισμός των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με την αλληλουχία στόχο (primer annealing). Η DNA πολυμεράση δε μπορέι να συνθέσει από μόνη της τον συμπληρωματικό κλώνο, διότι χρειάζεται πάντα ένα ελεύθερο 3’ άκρο. Συνεπώς χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές μήκους 18-22 βάσεων, που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος που θέλουμε να ενισχυθεί. Η θερμοκρασία πρόσδεσης δεν είναι συγκεκριμένη διότι εξαρτάται καθαρά από το μήκος του εκκινητή και τη περιεκτικότητά του σε GC και AT. Συνήθως οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε το περιεχόμενο τους σε GC να κυμαίνεται μεταξύ του 45%-55%[117].
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση το 3’ άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Tag πολυμεράσης (primer extension).Η θερμοκρασία του σταδίου αυτού εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται.

Πριν από τον πρώτο κύκλο, το DNA συχνά αποδιατάσσεται για 5-10 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί ότι θα είναι μονόκλωνο και θα μπορεί να υβριδιστεί με τους μονόκλωνους εκκινητές. Επίσης, μετά το τέλος των κύκλων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

εφαρμόζεται ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης (5-10 λεπτά) για να διασφαλιστεί ότι οποιοδήποτε DNA έχει απομείνει μονόκλωνο θα αντιγραφεί επιτυχώς.



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR[118]

Μια εκτέλεση των τριών αυτών σταδίων, αποτελεί 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται πολλές φορές (συνήθως 30-40 κύκλους) σε θερμοκυκλοποιητές που εναλλάσσουν θερμοκρασίες. Υπό βέλτιστες συνθήκες, το ποσό του DNA στόχου διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής DNA να είναι εκθετικός. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή 2n δίκλωνων μορίων DNA, τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές.

Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την εφαρμογής της μεθόδου χρησιμοποιείται μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το βακτήριο Thermus aquaticus, το οποίο είναι ένα θερμόφιλο βακτήριο, ικανό να αναπτύσσεται σε θερμοκρασιές 70-75°C. Η καθαρή πρωτεϊνη έχει μοριακό βάρος 94kDa και ιδανική θερμοκρασία πολυμερισμού 70-80°C. Χάνει τη δραστικότητα της (αλλά δεν αποδιατάσσεται) σε θερμοκρασίες πάνω των 90°C, ενώ είναι πάλι λειτουργική όταν η θερμοκρασία επανέλθει σε χαμηλότερες τιμές. Η δραστικότητα του ενζύμου αυτού φτάνει να πολυμερίζει 150 βάσεις ανά δευτερόλεπτο σε ιδανική θερμοκρασία, ενώ η δραστικότητα αυτή μειώνεται κατά 2 βάσεις ανά δευτερόλεπτο ανά μόριο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η Taq πολυμεράση προστίθεται μόνο μια φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των θερμικών κυκλοποιητών.

2.4.3. Συνθήκες PCR

Το σύνηθες PCR διάλυμα περιέχει $MgCl_2$, dNTPs, Taq DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτίδια έναρξης. Η συγκέντρωση μαγνησίου επηρεάζει την αντίδραση με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε πολύ λίγο μαγνήσιο να μειώνει την απόδοση της αντίδρασης και πολύ μεγάλη συγκέντρωση να αυξάνει το μη ειδικό πολλαπλασιασμό.1,5mM $MgCl_2$ είναι συνήθως ιδανικό αλλα μεταβάλλοντας αυτή τη συγκέντρωση μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σημαντικά σε ορισμένες περιπτώσεις. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια συνδέονται στα ιόντα Mg^{2+}, και συνεπώς η μεταβολή στη συγκέντρωση των dNTPs απαιτεί και μεταβολή στη συγκέντρωση του μαγνησίου. Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ενίσχυση του DNA στόχου πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών, οι οποίες περιλαμβάνουν αλλαγές στη συγκέντρωση του $MgCl_2$ και του DNA στο μίγμα της αντίδρασης, καθώς και αλλαγές στη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών στο DNA εκμαγείο. Οι συνθήκες που προσδιορίστηκαν για την υβριδοποίηση των εκκινητών και την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων των γονιδίων TNFα και $TNFR_2$ παρατίθονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1):

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Πίνακας 1. Συνθήκες PCR για κάθε πολυμορφισμό

Πολυμορφισμός	Συνθήκες PCR	Συγκέντρωση MgCl2 (mM)
TNF G-238A	95o C → 5 min 95o C → 45 sec 58o C → 45 sec } x 34 72o C → 45 sec 72o C → 10 min Hold 4o C	2,0 mM
TNF G-308A	95o C → 5 min 95o C → 45 sec 57o C → 45 sec } x 34 72o C → 45 sec 72o C → 10 min Hold 4o C	1,5 mM
TNF C-857T	95o C → 5 min 95o C → 45 sec 58o C → 45 sec } x 34 72o C → 45 sec 72o C → 10 min Hold 4o C	1,5 mM
TNFR2 T676G	95o C → 5 min 95o C → 45 sec 58o C → 45 sec } x 34 72o C → 45 sec 72o C → 10 min Hold 4o C	1,5 mM

Για τη μελέτη του κάθε πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (πίνακας 2), βάσει προηγούμενων μελετών στους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, που ενισχύουν ένα συγκεκριμένο τμήμα των γονιδίων μόνο[119-123].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος
TNF G-238A	5' AAACAGACCACAGACCTGGTC 3' (Forward) 5' CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC 3' (Reverse)	155 bp
TNF G-308A	5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3' (Forward) 5' TCATCTGGAGGAAGCGGTAG 3' (Reverse)	228 bp
TNF C-857T	5' GGCTCTGAGGAATGGGTTAC 3' (Forward) 5' CCTCTACATGGCCCTGTCTAC 3' (Reverse)	128bp
TNFR2 T676G	5' ACTCTCCTATCCTGCCTGCT 3' (Forward) 5' TTCTGGAGTTGGCTGCGTGT 3' (Reverse)	242 bp

Ο εμπρόσθιος (forward) εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμορφισμό TNF G-308A περιλαμβάνει στην αλληλουχία του μία θέση αναγνώρισης για ένζυμο περιορισμού, η οποία δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Ο αντίστροφος (reverse) εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμορφισμό TNF G-238A περιλαμβάνει, επίσης, μία θέση ενζύμου περιορισμού, που δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου. Στον πίνακα 1 σημειώθηκαν τα νουκλεοτίδια των εκκινητών που διαφέρουν από την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου.

2.4.4. Πειραματική Διαδικασία PCR

Η ακριβής πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα DNA έχει ώς εξής:

1) Αρχικά, παρασκευάζουμε το μίγμα της αντίδρασης (master mix) που περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (εκτός απο το DNA). Η ποσότητα των αντιδραστηρίων υπολογίστηκε για ν+1 δείγματα έτσι ώστε να έχουμε περίσσεια μίγματος.
2) Εν συνεχεία, αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση, το μίγμα μοιράζεται ισόποσα σε σωλήνες (tubes) PCR.
3) Έπειτα, προσθέτουμε το DNA κάθε δείγματος σε διαφορετικό σωληνάκι.
4) Εκτελούμε περιστροφή (spin) στη φυγόκεντρο διάρκειας για 4, περίπου, δευτερόλεπτα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

5) Τέλος, τοποθετούμε τα σωληνάκια στον θερμικό κυκλοποιητή και ενεργοποιούμε το κατάλληλο πρόγραμμα.

Πίνακας 3. Αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR

	TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR2 T676G		**TNF G-238A**	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	**Τελική συγκέντρωση**	**Τελικός όγκος**	**Τελική συγκέντρωση**	**Τελικός όγκος**
dH_2O		18,7 μl		18,2 μl
PCR Buffer (10x) + Mg (1,5mM)	1x	2,5 μl	1x	2,5 μl
$MgCl_2$ (25mM)	1,5 mM	-	2 mM	0,5 μl
dNTPs (10mM από το καθένα)	0,2mM	0,5 μl	0,8mM	0,5 μl
Primer forward (50 pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl	1 pmol/μl	0,5 μl
Primer reverse (50 pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl	1 pmol/μl	0,5 μl
Taq polymerase (5U/μl)	1U	0,3 μl	1U	0,3 μl
DNA		~2 μl		~2 μl
Τελικός όγκος		25 μl		25 μl

Όλες οι αντιδράσεις της PCR είχαν τελικό όγκο 25μl. Τα προϊόντα της PCR φυλάχτηκαν στους 4°C

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούσαμε για κάθε αντίδραση των πολυμορφισμών φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 3.

2.4.5. ***Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%***

Για την αξιολόγηση του προϊόντος της PCR παρασκευάζουμε μια πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Ζυγίζουμε 0,6 g αγαρόζης και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτη αγαρόζης 1% για έλεγχος απομόνωσης DNA όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.2.Η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

διαφορά είναι ότι εκτελείται ηλεκτροφορόρηση με 5μl PCR προϊόντος από το κάθε δείγμα, αναμεμειγμένο με 3μl χρωστικής (loading buffer).

2.5. Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)

Για τη διερεύνηση των πολυμορφισμών, τα προϊόντα της PCR, χρησιμοποιούνται για πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού εφαρμόζοντας τη μέθοδο **RFLP** (**Restriction Fragment Length Polymorphism)**. Με τη συγκεκριμένη διαδικασία μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τυχόν πολυμορφισμούς που επηρεάζουν τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τμημάτων διαφορετικού μεγέθους. Συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί μπορεί να δημιουργούν ή να καταργούν θέσεις κοπής του DNA από ένζυμα περιορισμού, γι' αυτό και είναι από τις πιο ευρείες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για γονοτύπηση[116].

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα περιορισμού προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή εξωγενούς DNA και έχουν ως ιδιότητα να πέπτουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται διότι είναι μεθυλιωμένο. Η προεξέχουσα μεθυλική ομάδα προφανώς εμποδίζει τη κατάλυση, παρεμβαίνοντας στη στενή μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ του περιοριστικού ενζύμου και της θέσης αναγνώρισή τους. Συγκεκριμένα, κάθε περιοριστικό ένζυμο «σαρώνει» κατά μήκος ένα μόριο DNA, σταματώντας μόνο όταν αναγνωρίσει μία συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, όπου τη πέπτει. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν αλληλουχίες 4-8bp[124]. Έτσι με τη παρουσία κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου, το DNA θα κοπεί σε ένα σύνολο από τμήματα πέψεων, παράγοντας δύο ή περισσότερα τμήματα, ανάλογα αν το αρχικό τμήμα είναι γραμμικό ή κυκλικό και πόσες θέσεις κοπής απαντώνται. Συγκρίνοντας το μέγεθος και τον αριθμό των τμημάτων που έχουν παραχθεί από μία συγκεκριμένη περιοχή μετά την επεξεργασία της με ένα συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, μπορούμε να συνθέσουμε τον *χάρτη περιορισμού* της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, ο οποίος θα δείχνει την ακριβή τοποθεσία κάθε σημείου περιορισμού[124]. Το πρότυπο που προκύπτει μετά από πέψη με ένζυμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

περιορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση του συγκεκριμένου τμήματος DNA και για τον έλεγχο ορισμένων αλλαγών στο μέγεθος, στη δομή ή στην αλληλουχία του DNA. Η τοποθεσία και η σειρά των θέσεων περιορισμού πάνω στο τμήμα DNA είναι μοριακό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου τμήματος[125].

Η διαφορά στους χάρτες περιορισμού μεταξύ δύο ή περισσοτέρων ομόλογων τμημάτων γενετικού υλικού, απόρροια των διαφορετικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τους ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLPs-Restriction Fragment Length Polymorphism). Τα RFLPs αποτελούν τη βάση των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης και χαρτογράφησης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για κλινικές αναλύσεις δομικών αλλαγών στα χρωμοσώματα που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες (όπως μετατοπίσεις, ελλείμματα, προσθήκες, αντικαταστάσεις βάσεων κλπ). Επίσης, το RFLP βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης κάποιας ασθένειας ή στον προσδιορισμό πατρότητας[125].

Τα RFLPs που έχουν εξεταστεί έως τώρα είναι απλές αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου, που δημιουργούν ή καταστρέφουν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων. Γενικά, η αλλαγή μια βάσεως που αναγνωρίζεται από ένα περιοριστικό ένζυμο, οδηγώντας σε έναν πολυμορφισμό δεν είναι η αιτία μιας ασθένειας αλλά ένα παρατηρήσιμο χαρακτηριστικό που υποδεικνύει τους φορείς της ή την προδιάθεση[124]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όμως ως δείκτης ενός συγκεκριμένου χρωμοσώματος ώστε να παρακολουθήσουμε την κληρονόμηση του. Η κληρονόμηση των αλληλομόρφων RFLP ακολουθεί πιστά τους νόμους του Mendel. Όταν παρακολουθούμε τη κληρονόμηση ενός χρωμοσώματος, χρησιμοποιώντας RFLPs, οι πιο χρήσιμοι πολυμορφισμοί είναι εκείνοι για τους οποίους τα περισσότερα άτομα είναι ετερόζυγα.

Συνήθως τα προϊόντα της PCR επιλέγονται έτσι ώστε να περιλαμβάνουν μία πολυμορφική αλληλουχία αναγνώρισης από κάποιο ένζυμο περιορισμού. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει κάποια αλληλουχία αναγνώρισης, τότε δημιουργείται τεχνητά, συμπεριλαμβάνοντας την επιθυμητή αλληλουχία στους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR[117,126].Για κάθε πολυμορφισμό που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκε και ένα διαφορετικό ένζυμο περιορισμού. Κάθε ένζυμο κόβει το PCR προϊόν αναγνωρίζοντας μία μόνο συγκεκριμένη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

αλληλουχία με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο νέα τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους.

Συγκεκριμένα για την ανίχνευση του πολυμορφισμού **TNF G-238A** χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο **BamHI**, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία **gGATCC** και δημιουργεί κολλώδη άκρα. Το πρώτο G σε αυτή την αλληλουχία είναι η θέση του πολυμορφισμού. Έτσι όταν η βάση που υπάρχει είναι G τότε το ένζυμο κόβει και προκύπτουν δύο τμήματα μήκους 130 bp και 25 bp. Εάν η βάση είναι A τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει και έχουμε ένα τμήμα μόνο, μήκους 155 bp.

Παρομοίως για τον πολυμορφισμό **TNF G-308A** χρησιμοποιήσαμε το **NcoI**, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία **CCATGg** και δημιουργεί κολλώδη άκρα. Το δεύτερο G είναι η θέση του πολυμορφισμού και ανάλογα με την βάση που βρίσκεται σ' αυτή τη θέση, το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να κόβει ή όχι το τμήμα DNA. Εάν στη θέση αυτή υπάρχει G τότε το ένζυμο κόβει και προκύπτουν δύο τμήματα DNA, ένα 20 bp και ένα 208 bp. Εάν το G αντικαθίσταται από A τότε το ένζυμο δεν βρίσκει την αλληλουχία αναγνώρισης με αποτέλεσμα το προϊόν της PCR να παραμένει άκοπο.

Όσον αφορά τον **TNF C-857T** χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο **HpyCH4IV**. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι **AcGT**, και η δεύτερη βάση στην αλληλουχία αναγνώρισης, το C, είναι η θέση του πολυμορφισμού. Έτσι, όταν το ένζυμο βρίσκει αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα DNA σε δύο τμήματα μήκους 106 bp και 22 bp. Στην περίπτωση που στη θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει και το προϊόν παραμένει άκοπο, μήκους 128 bp. Και αυτό το ένζυμο δημιουργεί κολλώδη άκρα.

Τέλος, για τον πολυμορφισμό του **TNFR2 T676G** χρησιμοποιήθηκε το **NlaIII**. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει αυτό το ένζυμο είναι **CAtG**, όπου T είναι η θέση του πολυμορφισμού. Το ένζυμο αναγνωρίζοντας αυτή την αλληλουχία κόβει το τμήμα DNA και προκύπτουν δύο νέα τμήματα μήκους 134 bp και 108 bp. Όταν το T αντικαθίσταται από G τότε το ένζυμο δε μπορεί να κόψει το τμήμα DNA, το οποίο είναι μήκους 242 bp. Τα προκύπτοντα τμήματα έχουν κολλώδη άκρα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

SNP	Ένζυμο περιορισμού	Προϊόντα πέψης	Άκοπο προϊόν	Αλληλουχία αναγνώρισης
TNF G-238A	BamHI	130 bp, 25bp	155 bp	5' g/GATCC 3' 3' cCTAG/G 5'
TNF G-308A	NcoI	208bp, 20bp	228 bp	5' C/CATGg 3' 3' GGTAC/c 5'
TNF C-857T	HpyCH4IV	106bp, 22bp	128 bp	5' A/cGT 3' 3' TgC/A 5'
TNFR2 T676G	NlaIII	134bp, 108bp	242 bp	5' CAtG/ 3' 3' /GTaC 5'

Πίνακας 4. Συνοπτική παρουσίαση των ενζύμων και των προϊόντων πέψης

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας *New England Biolabs*. Κάθε ένζυμο περιορισμού χρειάζεται ένα συγκεκριμένο buffer το οποίο βελτιστοποιεί τις αποδόσεις του ενζύμου. Συγκεκριμένα,όπως παρατηρούμε και στον πίνακα, το ένζυμο NcoI χρησιμοποιήθηκε με το buffer 3, το BamHI με το buffer 3, το HpyCH4IV με το buffer 1 και το NlaIII με το buffer 4. Η αρχική συγκέντρωση του buffer είναι 10x και σε κάθε αντίδραση ήταν επιθυμητή η αραίωσή του σε 1x.

Με τα ένζυμα BamHI και NlaIII χρειαζόταν να χρησιμοποιήσουμε BSA (10mg/ml). Η BSA (Bovine Serum Albumin) είναι μία πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στις πέψεις λόγω της ιδιότητάς της να σταθεροποιεί τα ένζυμα κατά τη διάρκεια της πέψης του DNA. Η ύπαρξη της BSA στην πέψη εμποδίζει την προσκόλληση του ενζύμου στους σωλήνες της αντίδρασης. Η πρωτεΐνη αυτή δεν επηρεάζει τα ένζυμα που δε τη χρειάζονται για σταθεροποίηση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιείται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό άλλων πρωτεϊνών, συγκρίνοντας πρωτεΐνη άγνωστης ποσότητας με γνωστή ποσότητα BSA. Για κάθε αντίδραση η επιθυμητή ποσότητα BSA που χρησιμοποιήθηκε είναι 100μg/ml. Η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου είναι 10000U/m

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- ✓ Αρχικά φτιάχνουμε ένα μίγμα που περιέχει dH_2O,το Buffer (το κατάλληλο για κάθε ένζυμο) και το ένζυμο περιορισμού.
- ✓ Στο μίγμα αυτό προσθέτουμε το BSA, σε όποια ένζυμα το απαιτούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

- ✓ Μοιράζουμε 5μl από το μίγμα σε κάθε σωλήνα που θα χρησιμοποιήσουμε για πέψη.
- ✓ Προσθέτουμε 5 μl σε κάθε σωλήνα από το PCR προϊόν, με αποτέλεσμα να έχουμε 10 μl τελικό όγκο.
- ✓ Εν συνεχεία, εκτελούμε ένα spin 4 δευτερολέπτων περίπου.
- ✓ Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον κλίβανο στους 37° C, για περίπου 12 ώρες (overnight).

Αναλυτικά οι αναλογίες του μίγματος της πέψης είναι οι εξής:

Πίνακας 5. Αναλογίες των αντιδραστηρίων για τις πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Αντιδραστήρια	BamHI	NcoI	HpyCH4IV	NlaIII
Buffer	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Ένζυμο περιορισμού	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
BSA	0,1 μl	-	-	0,1 μl
dH2O	3,7 μl	3,8 μl	3,8 μl	3,7 μl
Τελικός όγκος	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl

2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Μετά τη πέψη ακολουθείται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε να διαπιστώσουμε πως έδρασε το ένζυμο. Η ηλεκτροφόρηση είναι είτε αγαρόζης είτε πολυακρυλαμίδης.Το τζέλ πολυακρυλαμίδης έχει μικρότερου μεγέθους πόρους από το τζέλ αγαρόζης και έτσι επιτρέπει τον ακριβή διαχωρισμό μορίων μεγέθους 10 εώς 1500bp.Για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη διότι τα τμήματα των υπό μελέτη τμημάτων DNA είναι σχετικά μικρά.

Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης, αρχικά ετοιμάζουμε τα τζάμια που θα χρησιμοποιήσουμε, τα οποία τα στήνουμε σε ένα ειδικό στατώ. Τα τζάμια που χρησιμοποιούνται σχηματίζουν ένα ειδικό άνοιγμα ώστε να μπορούμε να ρίξουμε το μίγμα πριν κρυώσει και πήξει. Στα δύο άκρα των τζαμιών και κατακόρυφα τοποθετούμε διαχωριστικά (spacers) έτσι ώστε να δημιουργήσουμε το επιθυμητό πάχος στο τζελ. Τα spacers που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

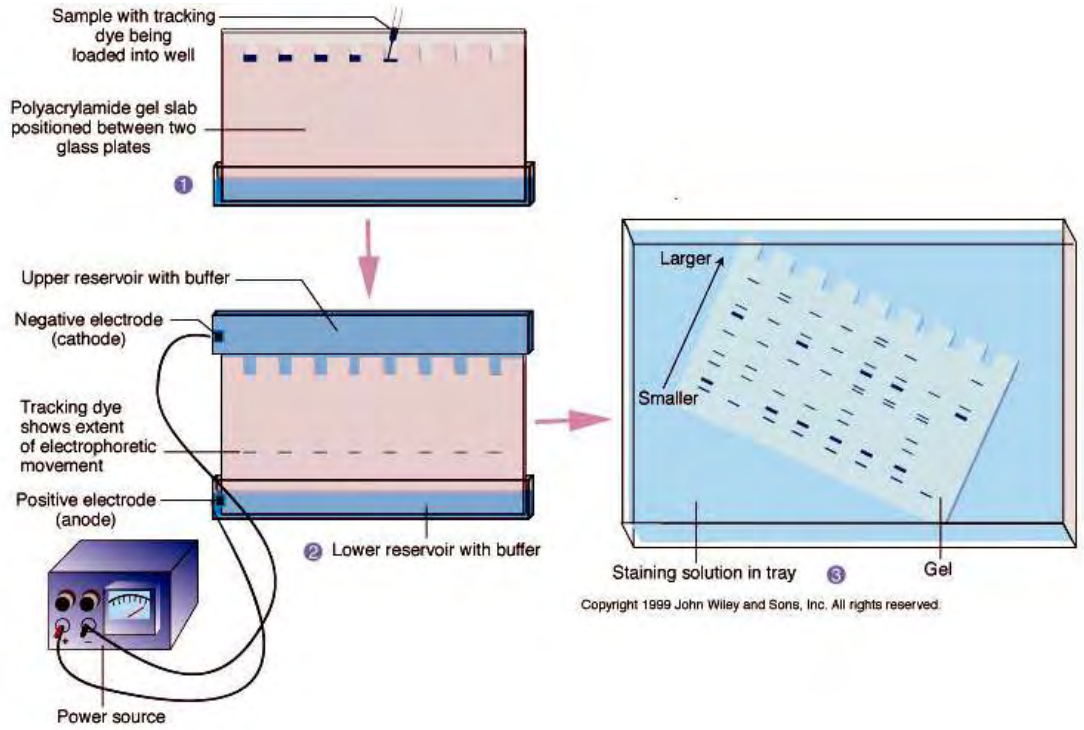
χρησιμοποιήθηκαν είχαν πάχος 1,5 εκατοστά και παρασκευάζουμε ανάλογη ποσότητα πηκτής. Αφού σταθεροποιήσουμε τα τζάμια στο στατό και σιγουρευτούμε ότι δε θα έχουμε διαρροές, αρχίζουμε την παρασκευή του διαλύματος.

2.6.1. Παρασκευή 50 ml πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Για τη παρασκευή μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης πάχους 1,5mm παρασκευάζουμε 50 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 8%. Αναλυτικότερα, σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100ml προσθέτουμε 6,4g ουρίας, 13,3 ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης 30%, 6,6ml TBE 10x. Το μείγμα αφήνεται να ομογενοποιηθεί σε ένα αναδευτήρα με τη βοήθεια ενός μαγνήτη ανάδευσης. Στη συνέχεια διηθούμε το διάλυμα με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και μεταφέρεται σε έναν ογκομετρικό σωλήνα. Αφού διηθηθεί συμπληρώνουμε το διάλυμα με ddH_2O μέχρι τα 50ml. Τέλος, μεταφέρουμε το διάλυμα σε μια κωνική φιάλη προσθέτουμε 50μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 300μl APS 20% (Ammonium Persulfate). Αφού αναδεύσουμε το διάλυμα, το ρίχνουμε γρήγορα στα τζάμια, τοποθετούμε τα χτενάκια και κοιτάμε για τυχόν διαρροές. Το αφήνουμε να πήξει περίπου στη μισή ώρα.

Όταν το τζελ πήξει τότε βγάζουμε τα τζάμια από το στατό και τα χτενάκια. Καθαρίζουμε προσεχτικά τα πηγαδάκια διότι έχουν υπολείμματα ακρυλαμίδης. Έπειτα τοποθετούμε τα τζάμια στη συσκευή, γεμίζουμε με TBE 1x την συσκευή και ανάμεσα από τα τζάμια έτσι ώστε να δημιουργηθεί κύκλωμα. Στην συνέχεια, «φορτώνουμε» στα πηγαδάκια τα δείγματα βάζοντας 5μl από ένα μάρτυρα μοριακών βαρών, συνήθως 100 bp, 5 μl από ένα PCR προϊόν που θα χρησιμεύσει ως άκοπο και 10 μl για το κάθε δείγμα που έχει υποστεί πέψη. Κάθε δείγμα που θα «φορτώσουμε» αναμειγνύεται με 5μl χρωστικής (loading buffer), έτσι ώστε το δείγμα να επικαθίσει στη βάση των πηγαδιών. Κλείνουμε τη συσκευή και ορίζουμε την τάση γύρω στα 210-230 V, σε θερμοκρασία δωματίου. Συνήθως, χρειάζονται 2-2,5 ώρες για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 24).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (RFLP) και ακόλουθη χρώση[127]

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι τα ακόλουθα:

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%: Το μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30% παρασκευάζεται με τη διάλυση 29 gr acrylamide 99% με 1 gr bis acrylamide σε 100ml ddH_2O.

TBE 10x: Για τη Παρασκευή του TBE 10x διαλύονται 121g Tris Base μαζί με 61,7g Boric Acid και 80 ml EDTA 0,5M. Συμπληρώνουμε με ddH_2O ώστε να έχουμε τελικό όγκο 2 lt. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Το TBE 1x παρασκευάζεται με την αραίωση του πυκνού διαλύματος 10x.

APS 20%: Διαλυουμε 2 gr Ammonium Persulfate σε 10ml ddH_2O. Αναδεύουμε ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.

2.7. Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η πήκτη πολυακρυλαμίδης είναι αρχικά διαφανής. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA πρέπει η πήκτη να υποβληθεί σε χρώση νιτρικού αργύρου. Ο νιτρικός άργυρος έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA και να σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα φωσφορικού αργύρου με τις φωσφορικές ομάδες του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

DNA. Όταν αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη (HCHO) , παρουσία βάσης, η πηκτή βάφεται σε φόντο κίτρινο και οι ζώνες με τα επιθυμητά τμήματα βάφονται σκούρο καφέ[115,128]. Η χρώση με νιτρικό άργυρο έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA (<100pg DNA) σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρέθηκαν τα τζάμια από τη συσκευή με τη βοήθεια μια λαβίδας και απομακρύνθηκε η πηκτή. Προκειμένου να γνωρίζουμε τη κατεύθυνση που τοποθετήθηκαν τα δείγμάτα, είτε τοποθετούμε τον μάρτυρα στο πρώτο πηγαδάκι είτε δημιουργούμε μια μικρή σχισμή στο τέλος της πήκτης. Στη συνέχεια η πήκτη τοποθετήθηκε σε νάυλον μεμβράνη μέσα σε ειδικά μεταλλικά σκεύη στον αναδευτήρα.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην χρώση αποτελείται από τρία στάδια και σε κάθε στάδιο χρησιμοποιήθηκε και ένα διαφορετικό διάλυμα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για αυτήν την χρώση είναι τα ακόλουθα:

- ✓ **Διάλυμα 1**

  Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 10ml αιθανόλη 100% , 0,5 ml οξικό οξύ και ddH2O μέχρι τελικού όγκου 400 ml. Κατόπιν εκτελούμε 2 πλύσεις με 200ml κάθε φορά για 5 min. Έπειτα ξεπλένουμε μία φορά με ddH2O για 1 min.

- ✓ **Διάλυμα 2**

  Σε 200 ml dd H2O προσθέτουμε 0,2 gr AgNO3, εκτελούμε μία πλύση με 200ml για 15 min. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε 2 φορές με ddH2O, για 1 min κάθε φορά.

- ✓ **Διάλυμα 3**

  Ζυγίστηκαν 3gr **NaOH**, O.O1 gr **NaBH4** (Natriumborhybrid) και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Προστέθηκαν 200 ml ddH_2O και 1ml φορμαλδεΰδη. Αναδεύτηκαν καλά με τη βοήθεια ενός μαγνήτη πάνω σε έναν αναδευτήρα. Το διάλυμα αφέθηκε στο gel μέχρι να είναι ευδιάκριτα ορατές οι μπάντες που μας ενδιαφέρουν. Ξεπλένουμε μία φορά με ddH_2O.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Μετά την χρώση και με τη βοήθεια του μάρτυρα και του άκοπου δείγματος μπορούμε να διαπιστώσουμε αν στα δείγματα υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού που χρησιμοποιήσαμε ή όχι. Υπάρχουν 3 ενδεχόμενα, το ένζυμο να κόβει στην θέση αναγνώρισης και το δείγμα να είναι ομόζυγο, το ένζυμο να μην έκοψε, διότι δεν υπάρχει η αλληλουχία αναγνώρισης και το δείγμα να είναι επίσης ομόζυγο και τρίτον το δείγμα να είναι ετερόζυγο, δηλαδή στο ένα ομόλογο χρωμόσωμα να υπάρχει η θέση αναγνώρισης για το ένζυμο και στο άλλο ομόλογο χρωμόσωμα να μην υπάρχει.

2.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για κάθε πολυμορφισμό ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών.

Η μεταβολή στον δείκτη PASI των ασθενών ≥75% θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με αντί - TNF παράγοντες (Enbrel, Remicade, Humira). Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη PASI ≤50% υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (Responders) και μη ανταποκριθέντες (Non-responders). Άτομα που έχουν λάβει περισσότερους από έναν αντί – TNF παράγοντα μελετήθηκαν ανεξάρτητα, αποτελώντας ξεχωριστό δείγμα για κάθε φάρμακο.

Οι συχνότητες των αλληλόμορφων εκτιμήθηκαν με την μέθοδο καταμέτρησης των γονιδίων. Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για όλους τους πολυμορφισμούς οι πληθυσμοί των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 6 μήνες θεραπείας για κάθε φάρμακο ξεχωριστά, μελετήθηκαν μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας. Κάθε πολυμορφισμός, ο οποίος πέρασε τα κριτήρια του Hardy-Weinberg, μελετήθηκε για συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, χρησιμοποιώντας το Cochran–Armitage trend τεστ καθώς και άλλα τέστ τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατής δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact τεστ και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA). Επιπρόσθετα της ανάλυσης μονού πολυμορφισμού κατασκευάστηκαν απλότυποι χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα του προγράμματος HapStat[131].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. *Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών*

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη θεραπεία φαίνονται στον πίνακα 6. Επιπλέον, φαίνεται το ποσοστό των ασθενών που τους χορηγήθηκαν οι αντι-TNF παράγοντες ξεχωριστά, καθώς επίσης και το ποσοστό των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στο κάθε φάρμακο.

Στη παρούσα εργασία έλαβαν μέρος συνολικά 72 ασθενείς με ψωρίαση, που λάμβαναν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF για τουλάχιστον 6 μήνες. Κάποιοι από τους ασθενείς έχουν λάβει περισσότερους από έναν αντι – TNF παράγοντα. Αυτές οι περιπτώσεις μελετήθηκαν ανεξάρτητα ανεβάζοντας τον αριθμό των ασθενών, υπό μελέτη, στους 80. Οι αντί – TNF παράγοντες που χορηγήθηκαν στους ασθενείς της παρούσας μελέτης είναι το infliximab, το etanercept και το adalimumab. Αρχικά έγινε γονοτύπηση των ασθενών για τέσσερις πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τον TNFα και τον έναν υποδοχέα του. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι οι εξής: TNF G-238A, TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR2 T676G. Όμως, όσον αφορά τους πολυμορφισμούς TNF G-238A και TNF G-308A στην συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι είναι μη πληροφοριακοί καθώς σε όλα τα άτομα για τον TNF G-238A υπάρχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο A καθώς επίσης και τα περισσότερα άτομα για τον TNF G-308A έχουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο G. Επομένως, αποκλείστηκαν από τη μελέτη αφού δεν είναι δυνατό να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την πιθανή εμπλοκή του στην ψωρίαση των ασθενών ή στην ανταπόκριση της θεραπείας τους με παράγοντες αντι–TNFα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Πίνακας 6. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος±ΤΑ*	48.08±14.39
Φύλο Α/Θ	37/43
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος±ΤΑ*	15.3±12.2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος±ΤΑ*	39.3±17.8
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	36/80 (45%)
Αρχικό PASI, μέσος±ΤΑ*	19.22±10.22
PASI στους 6 μήνες, μέσος±ΤΑ*	3.97±4.40
Ανταποκριθέντες, ποσοστό	63 (78.8%)
Μη-ανταποκριθέντες, ποσοστό	17 (21.2%)
Anti-TNF παράγοντες	
Enbrel	55% (Ανταποκριθέντες: 81.8%)
Remicade	27.5% (Ανταποκριθέντες: 72.7%)
Humira	17.5% (Ανταποκριθέντες: 78.6%)

*ΤΑ = Τυπική απόκλιση

Από τον πίνακα 6 φαίνεται ότι από τους 80 ψωριασικούς ασθενείς, οι 37 είναι άντρες και οι 43 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια κατανομή. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 48 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 39 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 15 έτη. Στο 45% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση με άλλες ασθένειες, η επονομαζόμενη συν-νοσηρότητα, με το μεγαλύτερο ποσοστό να εκδηλώνει καρδιαγγειακές παθήσεις.

Στους 80 αυτούς ασθενείς χορηγήθηκε θεραπεία με αντί-TNF παράγοντες για τουλάχιστον 6 μήνες. Ένα σημαντικό ποσοστό (78,8%) των ασθενών αυτών ανταποκρίθηκε πλήρως στη θεραπεία αυτή με σημαντική βελτίωση του PASI score, από αρχικό μέσο PASI score 19,22 σε μέσο PASI score 3,97. Ειδικότερα, στη πλειοψηφία των ασθενών (55%) χορηγήθηκε το φάρμακο Enbrel, με ένα υψηλό ποσοστό ανταπόκρισης, 81,8%, ενώ, σε ένα χαμηλότερο ποσοστό 27,5% χορηγήθηκε το φάρμακο Remicade και σε 17,5% το φάρμακο Humira με ποσοστά ανταπόκρισης 72,7% και 78,6%, αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

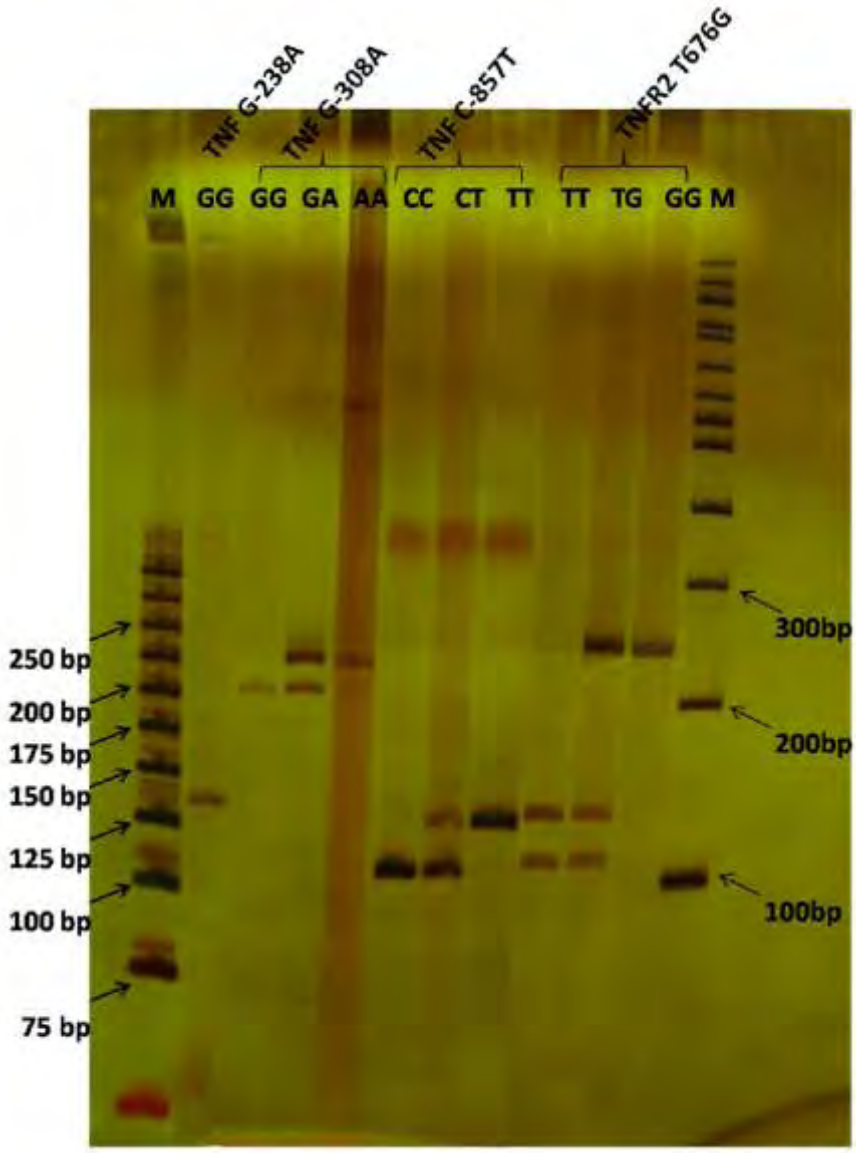
Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι στο 55% των 80 ασθενών της μελέτης προτιμήθηκε η χορήγηση του φαρμάκου Enbrel, το οποίο είχε υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης (81,8%). Αυτό, καθιστά σημαντικά αξιόπιστο το υψηλό αποτέλεσμα ανταπόκρισης του συγκεκριμένου φαρμάκου. Αντίθετα, στους παράγοντες Remicade και Humira, η ανταπόκριση κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, όμως δεν αποτελούν τόσο υψηλό μέρος του στατιστικού δείγματος και, συνεπώς, δεν μπορούν να θεωρηθούν το ίδιο αξιόπιστα όσο το ποσοστό ανταπόκρισης στο Enbrel.

3.2. RFLP – PAGE γονοτύπηση πολυμορφισμών

Η εικόνα 25 παρουσιάζει τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν μετά από τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο. Για τους τέσσερις πολυμορφισμούς (TNF G-308A, TNF C-857T, TNFR2 T676G) προσδιορίστηκαν και οι τρεις πιθανοί γονότυποι, ενώ για τον πολυμορφισμό TNF G-238A όλοι οι ασθενείς είχαν το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Οι πολυμορφισμοί TNF C-857T, TNFR2 T676G βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg σε αντίθεση με τους TNF G-308A και TNF G-238A πολυμορφισμούς όπου αποκλείστηκαν από την περαιτέρω ανάλυση. Στον πίνακα 7 αναλύεται η συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και του αποτελέσματος της 6μηνης αντι-TNF θεραπείας σε ψωριασικούς ασθενείς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 25 RFLP-Page γονοτύπηση των υπό μελέτη πολυμορφισμών

Αναλυτικά οι απλότυποι που προέκυψαν για κάθε πολυμορφισμό παρουσιάζονται στον πίνακα 7 που ακολουθεί.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

3.3. Μελέτες συσχέτισης και ανάλυση αποτελεσμάτων

Πίνακας 7. Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και αποτελεσμάτων θεραπείας αντί-TNF για 6 μήνες

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	*P*
TNFα C-857C>T	Genotypic [CC/CT/TT]	41/20/2	6/9/2	0.059
	Cochran-Armitage [C/T]	102/24	21/13	**0.019**
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	61/2	15/2	0.197
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	41/22	6/11	**0.027**
TNFRII T676T>G	Genotypic [TT/TG/GG]	35/22/6	4/8/5	**0.027**
	Cochran-Armitage [T/G]	92/34	16/18	**0.004**
	Επικρατών [(TT+TG)/GG]	57/6	12/5	0.055
	Υπολειπόμενο [TT/(TG+GG)]	35/28	4/13	**0.019**

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης του γονοτύπου στους ασθενείς για τους μελετώμενους πολυμορφισμούς. Τα παραπάνω στοιχεία αναδεικνύουν ως στατιστικά σημαντική την αύξηση της συχνότητας του C αλληλόμορφου του πολυμορφισμού TNFα C-857T στους ασθενείς με ανταπόκριση στην θεραπεία, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ανταπόκριση (P=0.019), ενώ είναι επίσης εξαιρετικά αξιοσημείωτο το αποτέλεσμα ότι οι ασθενείς ομόζυγοι για το κοινό αλληλόμορφο C σχετίζονται με θετική ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί-TNF παράγοντα (P=0.027). Αντίστοιχα, προκύπτει ανάλογο συμπέρασμα για τον πολυμορφισμό TNFR2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

T-676G, όπου η αύξηση της συχνότητας του T αλληλόμορφου είναι εμφανής στους ανταποκριθέντες ασθενείς (P=0.004). Επιπρόσθετα οι ασθενείς ομόζυγοι για το κοινό αλληλόμορφο T σχετίζονται με θετική ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF παράγοντα (P=0.019).

Τα παραπάνω στοιχεία και τιμές αναλύονται και για τα επιμέρους φάρμακα στους Πίνακες 8 και 9, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλύονται ξεχωριστά για τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τον παράγοντα Enbrel και για το σύνολο των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με Remicade ή Humira. Ο διαχωρισμός των αποτελεσμάτων έγινε κατά αυτό τον τρόπο για δύο λόγους: **α.** Λόγω του διαφορετικού μηχανισμού δράσης του παράγοντα Enbrel σε σχέση με τους Remicade και Humira, **β.** λόγω του μικρότερου στατιστικού δείγματος των δύο τελευταίων φαρμάκων που δεν καθιστά αξιόπιστη την αξιολόγηση του καθενός ξεχωριστά.

Πίνακας 8. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελέσματος της αντί-TNF θεραπείας μόνο για το Enbrel, στους 6 μήνες θεραπείας

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	*P*
TNFα C-857C>T	Genotypic [CC/CT/TT]	27 /8/1	1 /7/0	**0.002**
	Cochran-Armitage [C/T]	62/10	9/7	**0.012**
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	35/1	8/0	1.00
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	27/9	1/7	**0.002**
TNFRII T676T>G	Genotypic [TT/TG/GG]	24/11/1	0/4/4	**0.0001**
	Cochran.. [T/G]	59/13	4/12	**0.0001**
	Επικρατών [(TT+TG)/GG]	35/1	4/4	**0.002**
	Υπολειπόμενο [TT/(TG+GG)]	24/12	0/8	**0.001**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 8, για τον βιολογικό παράγοντα Enbrel, εξάγουν παρόμοια συμπεράσματα με τον Πίνακα 7, για το σύνολο της θεραπείας. Παρατηρείται σημαντική αύξηση της συχνότητας του αλληλόμορφου C στον πολυμορφισμό TNFaC-857T και του αλληλόμορφου (TT) στον TNFR2T-676G, στους ασθενείς με ανταπόκριση, σε σύγκριση με τους μη-ανταποκριθέντες (P=0.012 και P=0.0001, αντίστοιχα). Επίσης οι ασθενείς ομόζυγοι για το κοινό αλληλόμορφο C σχετίζονται εξαιρετικά σημαντικά με θετική ανταπόκριση στην θεραπεία με Enbrel (P=0.002 και P=0.001, αντίστοιχα).

Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελέσματος της αντί-TNF θεραπείας μόνο για τα Remicade και Humira, στους 6 μήνες θεραπείας

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	*P*
TNFα C-857C>T	Genotypic [CC/CT/TT]	14 /12/1	5 /2/2	0.161
	Cochran-Armitage [C/T]	40/14	12/6	0.543
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	26/1	7/2	0.148
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	14/13	5/4	1.00
TNFRII T676T>G	Genotypic [TT/TG/GG]	11/11/5	4/4/1	0.875
	Cochran-Armitage [T/G]	33/21	12/6	0.673
	Επικρατών [(TT+TG)/GG]	22/5	8/1	1.00
	Υπολειπόμενο [TT/(TG+GG)]	11/16	4/5	0.845

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Τα αποτελέσματα για τους βιολογικούς παράγονες Remicade και Humira, στον Πίνακα 9, δείχνουν μία σαφώς διαφορετική εικόνα για το μελετώμενο πληθυσμό. Δεν προκύπτει καμία σαφής συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και της ανταπόκρισης ή μη στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τα δύο αυτά φάρμακα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών TNFα C-857T και TNFR2 T-676G με θετική ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες (Πίνακας 8) οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στο Enbrel.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα δοκιμών συσχέτισης του απλοτύπου με τη συσχέτιση στην αντί-TNF θεραπεία σε ψωριασικούς ασθενείς μετά από θεραπεία 6 μηνών

Απλότυπος	Ανταποκριθέντες	Μη-ανταποκριθέντες	*P*
C-T	0.399	0.638	**<0.05**
C-G	0.219	0.171	**<0.05**
T-T	0.072	0.092	>0.05
T-G	0.310	0.098	**<0.05**

Στον Πίνακα 10 εμφανίζονται οι δοκιμαζόμενοι απλότυποι που αντιστοιχούν στα TNFα (g.-857C>T)-TNFR2 (c.676T>G). Εμφανίζονται οι συχνότητες απλοτύπων για τους ανταποκριθέντες και μη-ανταποκριθέντες. Η δοκιμή υλοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού HapStat. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την συσχέτιση των δυο πολυμορφισμών με θετική ανταπόκριση στην θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες, όπως αντικατοπτρίζεται από την αλλαγή των συχνοτήτων των απλοτύπων μεταξύ ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων ατόμων (Πίνακας 10).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Πίνακας 11. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελέσματος της αντί-TNF θεραπείας μετά από 6 μήνες, στους ασθενείς με συν-νοσηρότητα

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	*P*
TNFα C-857C>T	Genotypic [CC/CT/TT]	14/10/1	2/8/1	0.108
	Cochran-Armitage [C/T]	38/12	12/10	0.10
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	24/1	10/1	0.524
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	14/11	2/9	0.067
TNFRII T676T>G	Genotypic [TT/TG/GG]	12/9/4	2/5/4	0.188
	Cochran-Armitage [T/G]	33/17	9/13	**0.047**
	Επικρατών [(TT+TG)/GG]	21/4	7/4	0.214
	Υπολειπόμενο [TT/(TG+GG)]	12/13	2/9	0.142

Απομονώνοντας τα αποτελέσματα της αντι-TNF θεραπείας, σε σχέση με το γονότυπο, μόνο για τους ασθενείς που έχουν συν-νοσηρότητα, προκύπτουν τα αποτελέσματα του Πίνακας 11. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν μπορεί να αναδείξει κάποια στατιστικά αξιόπιστη συσχέτιση για τους συγκεκριμένους ασθενείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τιμή του P για το test Cochran-Armitage, που είναι 0.047 παρότι ικανοποιεί το υφιστάμενο κριτήριο $P<0.05$, παραμένει οριακά αξιόπιστο και, συνεπώς, δε λαμβάνεται υπόψη, δεδομένου του περιορισμένου εξεταζόμενου δείγματος (36 ασθενείς για συν-νοσηρότητα) και του γεγονότος ότι η τιμή είναι οριακά στο κατώφλι της στατιστικής αξιοπιστίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ψωρίαση είναι μια κοινή, χρόνια, φλεγμονώδης κατάσταση του δέρματος, με τη συμμετοχή τόσο των γενετικών όσο και των περιβαλλοντικών παραγόντων να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Η ψωρίαση συνδέεται με σημαντική νοσηρότητα, με το 20-30% των ασθενών που πάσχουν να έχουν σοβαρή μορφή της νόσου[132]. Οι περισσότερες από τις παραδοσιακές θεραπείες που είναι διαθέσιμες μέχρι σήμερα όπως η τοπική και η συστηματική θεραπεία, στοχεύουν στη βελτίωση της κλινικής εικόνας της νόσου χωρίς να στοχεύουν σε παράγοντες που προκαλούν την ψωρίαση. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ανοσολογία βασίζονται στην αύξηση της κατανόησης της βασικής παθοφυσιολογία της νόσου και η έλευση της γενετικής μηχανικής έχουν δείξει το δρόμο σε μια νέα ομάδα φαρμάκων που αναφέρονται ως βιολογικοί παράγοντες[133]. Τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν κυρίως την δράση του TNFα, διατηρώντας τα φυσιολογικά τους επίπεδα[130]. Οι θεραπείες με τους βιολογικούς παράγοντες έχουν βελτιώσει σε μεγάλο βαθμό τα συμπτώματα της ψωρίασης στην πλειονότητα των ασθενών και προσφέρουν μια καλή επιλογή για τους ασθενείς με σοβαρή μορφή ψωρίασης όπως επίσης και σ' αυτούς που δεν επαρκεί η μεθοτρεξάτη[134]. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι παράγοντες χορηγούνται σε συνδυασμό με τη μεθοτρεξάτη, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι ο συνδυασμός των δύο είναι αποτελεσματικότερος και προκαλεί λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς[135,136]

Ακόμη και αν, η αντι-TNF θεραπεία έχει αποδειχθεί να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της ψωρίασης, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Ειδικότερα περίπου ένα 50-70% των ασθενών ανταποκρίνονται πλήρως στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες[112]. Τα φάρμακα αυτά είναι αρκετά ακριβά και έχει επιβεβαιωθεί ότι συνοδεύονται από αρκετές παρενέργειες. Για τους λόγους αυτούς υπάρχει μεγάλη ανάγκη χρήσης κατάλληλων βιοδεικτών για τη πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και την εξατομίκευση της φροντίδας των ασθενών με ψωρίαση. Ο προσδιορισμός των φαρμακογενετικών δεικτών της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ανταπόκρισης στη θεραπεία δύναται να είναι χρήσιμος στην πρόβλεψη της κλινικής ανταπόκρισης στη θεραπεία της ψωρίασης και θα βοηθούσε στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης θεραπείας. Αυτό μπορεί να αυξήσει την αποδοτικότητα του κόστους θεραπείας και να μειώσει τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Δυστυχώς ελάχιστες φαρμακογενετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα στην ψωρίαση, εστιάζοντας κυρίως στην μεθοτρεξάτη και στην κυκλοσπορίνη[137,138], για τις οποίες ήταν δυνατόν η συλλογή ικανοποιητικού αριθμού ασθενών δεδομένου της ευρείας χρήσης τους. Όσον αφορά τους αντί-TNF υπάρχει ανάλογη μελέτη στην παγκόσμια βιβλιογραφία, όσον αφορά την ψωρίαση, ενώ τα τελευταία χρόνια διερευνάται ενδελεχώς η ρευματοειδής αρθρίτιδα[139]. Εντούτοις ακόμη και στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, δεν έχει βρεθεί κάποια αξιόλογη συσχέτιση μεταξύ κάποιου πολυμορφισμού, συγκεκριμένα, και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες[140]. Ωστόσο, είναι αρκετά πιθανό να υπάρχει κάποια συσχέτιση η οποία δεν έχει ακόμη ανακαλυφθεί ή εξαρτάται από την ταυτόχρονη χρήση άλλων βιοδεικτών ή κλινικών δεικτών, όπως λόγου χάρη του δείκτη CRP, όπως σιγά σιγά διαφαίνεται στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

Στη παρούσα λοιπόν μελέτη 44 από τους 80 ασθενείς με ψωρίαση έλαβαν το φάρμακο Enbrel, ενώ οι υπόλοιποι έλαβαν Remicade ή Humira. Από αυτούς που έλαβαν το Enbrel, 8 στους 10 ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (PASI>75%). Τα υψηλά επίπεδα ανταπόκρισης ενδέχεται να οφείλονται στην καλύτερη αποδοτικότητα του φαρμάκου, σε σύγκριση με τα άλλα δύο φάρμακα, ωστόσο το μέγεθος του εξεταζόμενου δείγματος (κυριότερα, το περιορισμένο μέγεθος των 2 άλλων φαρμάκων) δεν είναι ικανό να αποκλείσει την πιθανότητα λανθασμένου θετικού αποτελέσματος για το συγκεκριμένο φάρμακο.

Επίσης, παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση του TNF C-857T με ανταπόκριση στο Enbrel. Γενικά, ο πολυμορφισμός TNF C-857T πιθανώς σχετίζεται με την ανταπόκριση στο Enbrel[141]. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος TNF-857CC φαίνεται ότι σχετίζεται με την καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με το Enbrel[142]. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, μια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

άλλη αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο, δείχνουν ότι το Τ αλληλόμορφο είναι αυτό που εμπλέκεται στη θεραπεία με το Enbrel και έχει όντως βρεθεί ότι είναι πιο συχνό στους ασθενείς που είχαν καλή ανταπόκριση στο φάρμακο αυτό[143,141].

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό TNFR2 T676G, έχει βρεθεί ότι ο γονότυπος TNFR2 676TT έχει μεγαλύτερη ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί – TNF παράγοντες στη ψωρίαση σε σχέση με τους γονότυπους TNFR2 676TG και TNFR2 676GG. Η παρουσία του αλληλόμορφου G φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση στην θεραπεία με αντί – TNFα παράγοντες[142,143,144].Βάσει των αποτελεσμάτων της γενετικής ανάλυσης εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ασθενείς σε ομοζυγωτία για το κοινό αλληλόμορφο και των δύο πολυμορφισμών που μελετήθηκαν, το οποίο συναντάται σε αρκετά μεγάλη συχνότητα στον γενικό πληθυσμό, δύναται να ανταποκριθούν θετικά σε θεραπεία με Enbrel, κάτι το οποίο αν επιβεβαιωθεί σε μεταγενέστερες μελέτες μεγαλύτερου πληθυσμού ασθενών, θα οδηγούσε στην κύρια επιλογή βιολογικού παράγοντα στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ψωρίασης.

Επιπρόσθετα, το 45% των ασθενών που μελετήθηκε έπασχε από συν-νοσηρότητα και μελετήθηκε επιμέρους. Η ανάλυση του δείγματος αυτού δεν έδειξε κάποια συσχέτιση μεταξύ της ψωρίασης και των συνοδών νοσημάτων. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο της συσχέτισης, αφού το δείγμα των ασθενών με συν-νοσηρότητα είναι σχετικά περιορισμένο και, συνεπώς, όχι απόλυτα αντιπροσωπευτικό. Επίσης θα μπορούσε κανείς να μελετήσει την επίδραση της φαρμακευτικής αγωγής στην έκβαση των συνοδών νοσημάτων, αν είχε στην διάθεσή του τους αντίστοιχους κλινικούς δείκτες πριν και μετά την εφαρμογή της θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες, κάτι που θα μπορούσε να συμπεριληφθεί ως επιπλέον ερευνητικός στόχος σε μελλοντικές μελέτες.

Ωστόσο, παρά την εκτεταμένη μελέτη των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία αντί-TNFα, ως σήμερα δεν έχουν βρεθεί στοιχεία που να συνδέουν πειστικά τη θεραπευτική έκβαση (θετική ή αρνητική) με τα γενετικά χαρακτηριστικά του ασθενούς υπό θεραπευτική αγωγή. Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη ενός προγνωστικού γενετικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

απλοτύπου για την ανταπόκριση σε αντί-TNFα θεραπεία στον ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο είναι αναγκαία η συνέχιση και επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με ψωρίαση από όλη την Ελλάδα, καθώς και με ισότιμη κατανομή των βιολογικών παραγόντων ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτική η μελέτη και να μην είναι προκατειλημμένη ή περιορισμένη σε ένα μόνο φάρμακο. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός των γονοτύπων συγκεκριμένων πολυμορφισμών, δηλαδή η χρήση ενός αντιπροσωπευτικού απλοτύπου για την ψωρίαση, πιθανόν να παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία πρόβλεψης σε σχέση με τη χρήση ενός ή δύο μόνο πολυμορφισμών, παρέχοντας έτσι ένα αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή της πιο αποτελεσματικής θεραπείας εξατομικευμένα για κάθε ασθενή με ψωρίαση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Michelle A. Lowes, Anne M. Bowcock and James G. Krueger, Pathogenesis and therapy of psoriasis , Laboratory for Investigative Dermatology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 178, New York, New York 10021, USA, *Nature* 445:866-73

2. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol* Venereol 2001; 15: 16–17

3. Gelfand JM, Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Thomas J, Kist J, Rolstad T, Margolis DJ. The prevalence of psoriasis in African Americans: results from a population-based study. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Jan;52(1):23-6

4. Smith AE, Kassab JY, Rowland Payne CM, Beer WE. Bimodality in age of onset of psoriasis, in both patients and their relatives. Dermatology1993;186:181–6

5. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:450–6.

6. Robert Sabat, Sandra Philipp,Conny Höflich,Stefanie Kreutzer,Elizabeth Wallace,Khusru Asadullah,Hans-Dieter Volk,Wolfram Sterry,Kerstin Wolk. Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental dermatology*. 11/2007; 16(10):779-98

7. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985: 13: 450–456

8. Bowcock AM. Psoriasis genetics: the way forward. J. Invest. Dermatol. 122:xv-xvii (2004)

9. Bowcock AM, and Barker JN. Genetics of psoriasis: The potential impact on new therapies. *J. Am. Acad. Derm.* 49:S51-52 (2003)

10. Allen M, Barker JWN, Bowcock AM, Burden AD, Chia N, Capon F, Christophers E, Daly MJ, Elder JT, Helms C, Henseler T, Jenisch S, Menter A, Mistry R, Nair RP, Stuart PE, Tillman D, Trembath RC, Veal C,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

and Voorhees JJ. The international psoriasis genetics study: Assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a 942 affected-sib-pair cohort. *Am. J. Hum. Genet.* 73:430-437 (2003)

11. Langley R G, Krueger G G, Griffiths C E. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005: 64 (Suppl. 2): ii18–23; discussion ii24–25.

12. Schon M P, Boehncke W H. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005: 352: 1899–1912

13. Bowcock A M, Krueger J G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005: 5: 699–711

14. Raychaudhuri SP , Gross J . Psoriasis risk factors: role of lifestyle practices. Cutis. 2000 Nov; 66(5): 348-52

15. Kassab JY, Beer WE, Smith AE, Rowland Payne CME .Risk factors in early and late onset psoriasis : Family history ,stress, alcohol ,smoking and a life . Les Nouvelles Dermatologiques 1995 :14 :48-53 .

16. http://www.psorinfo.gr

17. Krueger GG, Feldman SR, Camisa C, Duvic M, Elder JT, Gottlieb AB, et al. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: what defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? *J Am Acad Dermatol* 2000

18. McCall, Calvin O. MD. Psoriasis: Clinical Features and Pathology. Pathology Case Reviews: January/February 2011 - Volume 16 - Issue 1 - pp 2-9

19. http://www.psoriasis360.gr/bgdisplay.jhtml?itemname=psoriasis_types

20. Sampogna F, Gisondi P, Melchi CF, et al. Prevalence of symptoms experienced by patients with different clinical types of psoriasis. Br J Dermatol. 2004;151:594–599.

21. http://www.psoriaticarthritissymptoms.net/

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

22. D Gladman, C Antoni, P Mease, et al. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 2005 64: ii14-ii17

23. Bruce IN. Psoriatic arthritis: clinical features. In: Hochberg MC, Silman JS, Smolen ME, Weinblatt M, Weisman M, eds. Rheumatology, 3rd edn. Philadelphia: Mosby, 2003:1241–52

24. Brockbank JE, Schentag C, Rosen C, Gladman DD. Psoriatic arthritis (PsA) is common among patients with psoriasis and family medical clinic attendees [abstract]. Arthritis Rheum2001;44 (suppl 9) :S94

25. Ulrich Mrowietz and Kristian Reich. Psoriasis—New Insights Into Pathogenesis and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2009 January; 106(1-2): 11–19.

26. Reich K, Mrowietz U. Treatment goals in psoriasis. J Dtsch Dermatol Ges. 2007;5:566–574

27. Nast A, Kopp IB, Augustin M, et al. Evidence-based (S3) guidelines for the treatment of psoriasis vulgaris. J Dtsch Dermatol Ges. 2007;5(Suppl 3):111–119

28. Finlay AY. Current severe psoriasis and the rule of tens. Br J Dermatol. 2005;152:861–867

29. Smith CH, Anstey AV, Barker JN, et al. British Association of Dermatologists. British Association of Dermatologists guidelines for use of biological interventions in psoriasis 2005. Br J Dermatol. 2005;153:486–497.

30. Charles C, *Handbook of Psoriasis.* Maiden, Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004.

31. Menter A., Smith C, Barker J., *Ψωρίαση.* Αθήνα: Εκδόσεις «Βαγιονάκη», 2006.

32. Habif T., Campbell J., Quitadamo M., Zug K., *Δερματικά Νοσήματα: Διάγνωση και θεραπεία,* Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2002

33. **http://wordinfo.info/unit/3348/ip:15/il:P,** Illustration from the U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

34. Γερμενής Α. *«Ιατρική Ανοσολογία»,* Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2000, ISBN: 960-02-1397-6

35. Lebwohl M. Psoriasis. Lancet 2003; 361: 1197 - 204.

36. Mohammad El-Darouti and Rania Abdel Hay. Psoriasis: Highlights on Pathogenesis, Adjuvant Therapy and Treatment of Resistant and Problematic Cases (Part I). Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Cairo University, Egypt.

37. Mehlis S, Gordon KB. From laboratory to clinic: Rationale for biologic therapy. Dermatol Clin 2004;22:371-7

38. http://www.cmaj.ca/cgi/content-nw/full/170/13/1933/F427

39. Guenther LC, Ortonne JP. Pathophysiology of psoriasis: Science behind therapy. *J Cutan Med Surg* 2002; 6: 2 - 7.

40. Lee RE, Gaspari AA, Lotze MT, Chang AE, Rosenberg SA. Interleukin 2 and psoriasis. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1811 - 5.

41. Krueger G, Ellis CN. Psoriasis-recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: S94-100

42. Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: Implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol* 2002; 1: 264 - 75.

43. Winterfield L, Menter A. Psoriasis and its treatment with infliximab-mediated tumor necrosis factor alpha blockade. *Dermatol Clin.* 2004;22:437-447.

44. Koo JY, *Cutis*, 2007;79:11–7.

45. Lebwhol M, *J Am Acad Dermatol*, 2005;53:S59–69.

46. Arzu Kilic and Ulker Gul. Treatment Options for Patients with Psoriasis. *European Dermatology,* 2010;5:16–21

47. Lebwohl M, Suad A. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. J Am Acad Dermatol 2001; 45:487-98

48. Cornell RC. Clinical trials of topical corticosteroids in psoriasis: correlations with vasoconstrictor assay. Int J Dermatol 1992; 31(Suppl 1):38-40.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

49. Ortonne JP, Humbert P, Nicolas JF et al. Intra–individual comparison of the cutaneous safety and efficacy of calctriol 3μg g-1 ointment and calcipotriol 50μg g-1 ointment on chronic plaque psoriasis localizes in facial, hairline, retroauricular or flexural areas. Br J Dermatol 2003

50. Lebwohl M, Suad A. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. J Am Acad Dermatol 2001; 45:487-98

51. Coven TR, Burack LH et al. Narrowband UVB produces superior clinical and histopathological resolution of moderate-to-severe psoriasis in patients compared with broadband UV-B. Arch Dermatol 1997; 133:1514-22

52. Zanolli M. Phototherapy arsenal in the treatment of psoriasis. Dermatol Clin 2004; 22:397-406.

53. Stern RS, Laird N et al. Cutaneous squamous cell carcinoma in patients treated with PUVA. N Engl J Med 1982; 310:1156-61.

54. Ράπτης Σ.Α., Εσωτερική Παθολογία, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2008

55. McKendry RJ, Dale P. Adverse effects of low dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1993;20:1850–6.

56. Griffiths CEM et al. Ciclosporin in psoriasis clinical practice: an international consensus statement. Br J Dermatol 2004; 150(Suppl.67) 11-23.

57. M. Farber E, Nail L. Conquering psoriasis. Empowering press Hamilton Canada 1997

58. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature 2007; 22:866-873.

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

60. Cristina Russo and Riccardo Polosa. TNF-*α* as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. Clinical Science (2005) 109, 135–142 (Printed in Great Britain)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

61. Ignacio Rego-Pérez, Mercedes Fernández-Moreno and Francisco J. Blanco, Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis, Current Genomics, 2008;9:381-393

62. Kircik LH, Del Rosso JQ, *J Drugs Dermatol*, 2009;8:546–59.

63. Papp KA, *Clin Dermatol*, 2008;26:515–21

64. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. N Engl J Med. 349: 2003; 2014-2022.

65. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: A phase III, multicentre, double-blind trial. Lancet. 366: 2005; 1367-1374.

66. Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis. Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 52: 2005; 3279-3289.

67. Stoll JG & Yasothan U, Rheumatoid arthritis market, Nat Rev Drug Discov 2009; 8: 693-4

68. Ignacio Garcia-Valladares, Raquel Cuchacovich, and Luis R Espinoza. Comparative assessment of biologics in treatment of psoriasis: drug design and clinical effectiveness of ustekinumab. Drug Des Devel Ther. 2011; 5: 41–49.

69. Gospodarevskaya E, Picot J, Cooper K, Loveman E, Takeda A. Ustekinumab for the treatment of moderate to severe psoriasis. Health Technol Assess. 2009;13(Suppl 3):61–66.

70. Wikipedia, the free encyclopedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha

71. Bradley JR, TNF-mediated inflammatory disease, J Pathol 2008; 214: 149-160

72. National center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov

73. Haitham T.I., Naismith J.H., TNFa and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s), Microscopy research and technique, 2000; 50:184–195

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

74. Choy EH., Panayi GS., Cytokines pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, New England J Med 2001; 344:907-16

75. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med. 1996;334: 1717-25.

76. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. Br J Pharmacol. 2002;135:855-75.

77. EMBL-EBI, http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1tnr, http://smart.embl heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?ACC=SM00207

78. Mizutani H, Ohmoto Y, Mizutani T, et al. Role of increased production of monocytes TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in psoriasis:relation to focal infection, disease activity and responses to treatments. Journal of Dermatological Science 1997; 14(2):145-53.

79. Kristensen M, Chu CQ, Eedy DJ, et al. Localization of turnout necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic skin:epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. Clinical & Experimental Immunology 1993;94(2):354-62

80. Segui B, Cuvillier O, Adam-Klages S, et al. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. The Journal of Clinical Investigation 2001; 108(1):143-151.

81. Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, et al. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. Clinical & Experimental Immunology 1994; 96(1):146-51.

82. Sugano M, Tsuchida K, Tomita H, et al. Increased proliferation of cells with overexpression of soluble TNF-alpha receptor I gene. Atherosclerosis 2002; 162(1):77-84.

83. ModBase, Database of Comparative Protein Structure Models, http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi?queryfile=1264121497_2269&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

84. Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, et al. Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p 75. Journal of Immunology 1997; 159(12):6148-55.

85. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, et al Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. Journal of Immunology 1993; 151 (9):4637-41.

86. Vandenabeele P, Declercq W, Vercammen D, et al. Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoura. Journal of Experimental Medicine 1992; 176(4):1015-24.

87. Tracey D., Klareskog L., Sasso E. H., Salfeld J. G., Tak P. P., Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review, Pharmacology & Therapeutics, 2008; 117:244-279

88. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W., Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. J Biol Chem 1993;268(4):2762–2766.

89. Winzen R, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Brakebusch C, Kemper O, et al., Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells, J Immunol 1992;148(11):3454–3460.

90. Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H., Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. J Immunol 1993; 150(10):4346–4353.

91. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik, Immunobiology, the immune system in health and disease, Garland Science Publishing, 2005

92. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P., Tumor necrosis factor signaling, Cell Death Differ, 2003; 10 (1): 45–65.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

93. Chen G, Goeddel DV., TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, Science, 2002; 296 (5573): 1634–5.

94. Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000) TNF *α* and the TNF receptor superfamily: structure–function relationship(s). Microsc. Res. Tech. 50, 184–195

95. Mayo, M. W., & Baldwin, A. S., The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance, Biochim Biophys Acta, 2000; 1470: M55−M62

96. Charles J. Oh, Kiron M. Das, Alice B. Gottlieb, Treatment with anti-tumor necrosis factor α (TNF-α) monoclonal antibody dramatically decreases the clinical activity of psoriasis lesions. Journal of the American Academy of Dermatology. Volume 42, Issue 5, May 2000, Pages 829-830

97. Chunying Li, Gang Wang, Ying Gao, Ling Liu and Tianwen Gao. *TNF-α* Gene Promoter *-238G>A* and *-308G>A* Polymorphisms Alter Risk of Psoriasis Vulgaris: A Meta-Analysis. Journal of Investigative Dermatology (2007) 127, 1886–1892;

98. Wilson, A.G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F.S., van der Putte, L.B., Duff, G.W., An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles, J. Exp. Med, 1993;177: 557-560.

99. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., McDevitt H.O., AND Duff G.W., Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation, Immunology, 1997; 94:3195–3199

100. Jacob C.O., Fronek Z., Lewis G.D., Koo M., Hansen J.A., McDevitt H.O., Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990; 87: 1233-1237

101. Kim TG, Pyo CW, Hur SS et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta genes in Korean patients with psoriasis. Arch Dermatol Res 2003; 295:8–13

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

102. Arias AI, Giles B, Eiermann TH et al. Tumor necrosis factoralpha gene polymorphism in psoriasis. Exp Clin Immunogenet 1997; 14:118–22

103. Kristian Reich, Ulrike Huffmeier,Inke R. Konig, Jesus Lascorz, Jorg Lohmann,Jorg Wendler, Heiko Traupe, Rotraut Mossner, Andre Reis, and Harald Burkhardt. TNF Polymorphisms in Psoriasis: Association of Psoriatic Arthritis With the Promoter Polymorphism TNF*-857 Independent of the PSORS1 Risk Allele. Arthritis & Rheumatism Vol. 56, No. 6, June 2007, pp 2056–2064**.**

104. Jacob C.O., Fronek Z., Lewis G.D., Koo M., Hansen J.A., McDevitt H.O., Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990; 87: 1233-1237.

105. Santee, S.M., Owen-Schaub, L.B., Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization, J. Biol. Chem., 1996; 271: 21151-21159.

106. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, et al., TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study, Genes and Immunity 2004; 5:631–640

107. G. Emilien, M. Ponchon, C. Caldas, O. Isaacson, J.M. Maloteaux, "Impact of Genomics on Drug Discovery and Clinical Medicine", *QJM*, Vol. 93 pp.391 – 423, 2000.

108. Roses AD. Pharmacogenetics and the future of drug development and delivery. Lancet. 2000;355:1358–1361.

109. Roses, A.D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. Nature, 405, 857–865.

110. Poolsup, N., Li Wan Po, A. and Knight, T.L. (2000) Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. J. Clin. Pharm. Ther., 25, 197–220.

111. Julie A. Johnson. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through

genetics. Trends in Genetics Vol.19 No.11 November 2003

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

112. A.M. Thielen, S. Kuenzli, J.-H. Saurat. Cutaneous Adverse Events of Biological Therapy for Psoriasis: Review of the Literature. *Dermatology* 2005;211:209-217

113.M. Seitz, U. Wirthmuller, B. Moller nd P. M. Villiger The −308 tumour necrosis factor-α gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFα-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients Rheumatology (2007) 46 (1): 93-96

114. Guy Serre, Jean Roudier, Chantal Roudier Influence of −308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor α gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis, Arthritis Care & Research, Volume 57, Issue 8, pages 1426-1430, 2007

115. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989

116. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erich H.A., Primer detected amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science 1988;239:487-491

117. Elles Rob, Mountford Roger, Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Humana Press, 2003

118.

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/5/56/20060729145920!Pcr.png

119. Fontaine-Bisson B, Wolever TM, Chiasson JL, Rabasa-Lhoret R, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NW, Ryan EA, El-Sohemy A., Tumor necrosis factor alpha -238G>A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus, Metabolism. 2007 May; 56(5):649-55.

120. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM., Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis., J Exp Med. 1995 Nov 1;182(5):1259-64.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

121. Lee GH, Choi YM, Kim SH, Hong MA, Oh ST, Lim YT, Moon SY., Association of tumor necrosis factor-{alpha} gene polymorphisms with advanced stage endometriosis Hum Reprod., 2008 Apr;23(4):977-81. Epub 2008 Feb 12.

122. Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL., An MspA1 I polymorphism in exon 1 of the human TNF receptor type I (p55) gene, Eur J Immunogenet. 1998 Apr-Jun; 25(2-3):269-70.

123. Teramoto M, Kitawaki J, Koshiba H, Kitaoka Y, Obayashi H, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Matsushita M, Maruya E, Saji H, Ohta M, Honjo H., Genetic contribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene promoter (-1031, -863 and -857) and TNF receptor 2 gene polymorphisms in endometriosis susceptibility, Am J Reprod Immunol. 2004 May; 51(5):352-7.

124. James D. Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkowski, Ανασυνδυασμένο DNA (γονίδια και γονιδιώματα – μία συνοπτική παρουσίαση), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2007

125. Lela Buckingham, Maribeth L. Flaws, Molecular Diagnostics (Fundamentals, Methods, Clinical Applications), F. A. Davis Company, 2007

126. Ruifang Zhang, Zanhua Zhu, Hongming Zhu, Tu Nguyen, Fengxia Yao, Kun Xia, Desheng Liang and Chunyu Liu, SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR–RFLP assay design, Nucleic Acids Research, 2005;33: 489–492

127. http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/protein/page.jpg

128. Ainsworth P. J., Surh L.C., Coulter-Mackiel M.B, Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non- radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs Bi variant, Nucleic Acids Research 1991;19: 405-406.

129.L S Winterfield, A Menter, K Gordon, A Gottlieb. Psoriasis treatment: current and emerging directed therapies.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

130. Hohckberg (ed) Rheumatology, 4th edition, 2008. Principles of management, chapter 43 pp 550

131. Lin DY, Hu Y, Huang BE (2008) Simple and efficient analysis of disease association with missing genotype data. Am J Hum Genet 82:444-452.

132. Smith CH, Anstey AV, Barker JN, Burden AD, Chalmers RJ, Chandler D, *et al* . British association of Dermatologists guidelines for use of biological interventions in psoriasis 2005. Br J Dermatol 2005;153:486-97.

133. Mehlis S, Gordon KB. From laboratory to clinic: Rationale for biologic therapy. Dermatol Clin 2004;22:371-7.

134. Maini R, St Clair EW, Breedveld F et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. Lancet 1999; 354:1932–9.

135. Bansard C., Lequerre T., et al., Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?, Rheumatology 2009;48:1021–1028

136. Andreakos E.T., Foxwell B.M., Brennan F.M., Maini R.N., Feldmann M., Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future, Cytokine & Growth Factor Reviews 2002;13: 299–313

137. Tang, LC Chan and A Heng. Use of cyclosporine in the treatment of psoriasis. Malaysian Journal Of Dermatology *Jurnal Dermatologi Malaysia,2005*

138. R.B. Warren, R.L. Smith, E. Campalani,_ S. Eyre, C.H. Smith,_ J.N.W.N. Barker,_ J. Worthington and C.E.M. Griffiths. Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms. British Journal of Dermatology, 2008

139. Chatzikyriakidou A., Georgiou I., Voulgari P.V., Venetsanopoulou A. I., Drosos A.A., Combined tumour necrosis factor-a and tumour necrosis factor receptor genotypes could predict rheumatoid arthritis patients' response to anti-TNF-a therapy and explain controversies of studies based on a single polymorphism, Rheumatology 2007;46:1034–1035

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

140. Kang, C.P., Lee, K.W., Yoo, D.H., Kang, C., Bae, S.C., The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor alpha gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis., Rheumatology (Oxford) 2005; 44: 547-552

141 N. DE VRIES and P. P. TAK, The response to anti-TNF-*a* treatment: gene regulation at the bedside Rheumatology 2005;44:705–707

142. Fabris, M., Tolusso, B., Di Pol, E., Assaloni, R., Sinigaglia, L., Ferraccioli, G., Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2002; 29: 1847-1850.

143. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H et al., Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis., Arthritis Rheum 2001;44:2819–27.

144. Zink A, Strangfeld A, Schneider M et al., Effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis in an observational cohort study: comparison of patients according to their eligibility for major randomized clinical trials. Arthritis Rheum 2006; 54:3399–407.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Επιπολασμός ψωρίασης 2

Εικόνα 2: Ψωρίαση κατά πλάκας[16] 3

Εικόνα 3: Σταγονοειδής ψωρίαση[19] 4

Εικόνα 4: Φλυκταινώδης ψωρίαση 4

Εικόνα 5: Ερυθροδερμική Ψωρίαση 5

Εικόνα 6: Ψωριασική Αρθρίτιδα[21] 5

Εικόνα 7: Ιστολογική εικόνα ψωριασικού δέρματος σε σύγκριση με το φυσιολογικό[33]. 8

Εικόνα 8: Έναρξη της ψωριασικής ανοσολογικής απόκρισης με ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων από τα APCs με αποτέλεσμα τη παραγωγή κυτταροκίνων και την έναρξη της παθογένεσης.[38] 10

Εικόνα 9: Εντοπισμένη ανοσολογική απάντηση. Τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα συναντούν το αρχικό αντιγόνο, και απελευθερώνουν κυτταροκίνες, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην φαινοτυπική έκφραση της ψωρίασης[38] 11

Εικόνα 10: Σκεύασμα Μεθοτρεξάτης 14

Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των τριών ανταγωνιστών του TNFα[60] 16

Εικόνα 12: Μοριακός μηχανισμός του etanercept[61] 16

Εικόνα 13: Μοριακός μηχανισμός του infliximab[61] 17

Εικόνα 14: Μοριακός μηχανισμός του adalimumab[61] 18

Εικόνα 15: Αυξανόμενο κόστος των βιολογικών παραγόντων[67] 19

Εικόνα 16: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFα[70] 20

Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR1[77] 22

Εικόνα 18: Κρυσταλλική δομή του μορίου TNFR2[83] 23

Εικόνα 19: Τα μονοπάτια σηματοδότησης που προκαλούνται από τις ενδοκυτταρικές δράσεις του TNFα[71] 25

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

Εικόνα 20: - Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNFα[61] 28

Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση τμήματος του γονιδίου TNFR1[106] 29

Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Προετοιμασία της πηκτής και "φόρτωση" των δειγμάτων[115,70] 40

Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR[118] 42

Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (RFLP) και ακόλουθη χρώση[127] 53

Εικόνα 25 RFLP-Page γονοτύπηση των υπό μελέτη πολυμορφισμών 60

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συνθήκες PCR για κάθε πολυμορφισμό 44

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό 45

Πίνακας 3. Αναλογίες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR 46

Πίνακας 4. Συνοπτική παρουσίαση των ενζύμων και των προϊόντων πέψης. 50

Πίνακας 5. Αναλογίες των αντιδραστηρίων για τις πέψεις με ένζυμα περιορισμού 51

Πίνακας 6. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη 58

Πίνακας 7. Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και αποτελεσμάτων θεραπείας αντί-TNF για 6 μήνες 61

Πίνακας 8. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελέσματος της αντί-TNF θεραπείας μόνο για το Enbrel, στους 6 μήνες θεραπείας 62

Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελέσματος της αντί-TNF θεραπείας μόνο για τα Remicade και Humira, στους 6 μήνες θεραπείας 63

Πίνακας 10. Αποτελέσματα δοκιμών συσχέτισης του απλοτύπου με τη συσχέτιση στην αντί-TNF θεραπεία σε ψωριασικούς ασθενείς μετά από θεραπεία 6 μηνών 64

Πίνακας 11. Συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου SNP και του αποτελεσματος της αντί-TNF θεραπείας μετά από 6 μήνες, στους ασθενείς με συν-νοσηρότητα 65

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
17/10/2023 00:28:46 EEST - 167.114.118.212