



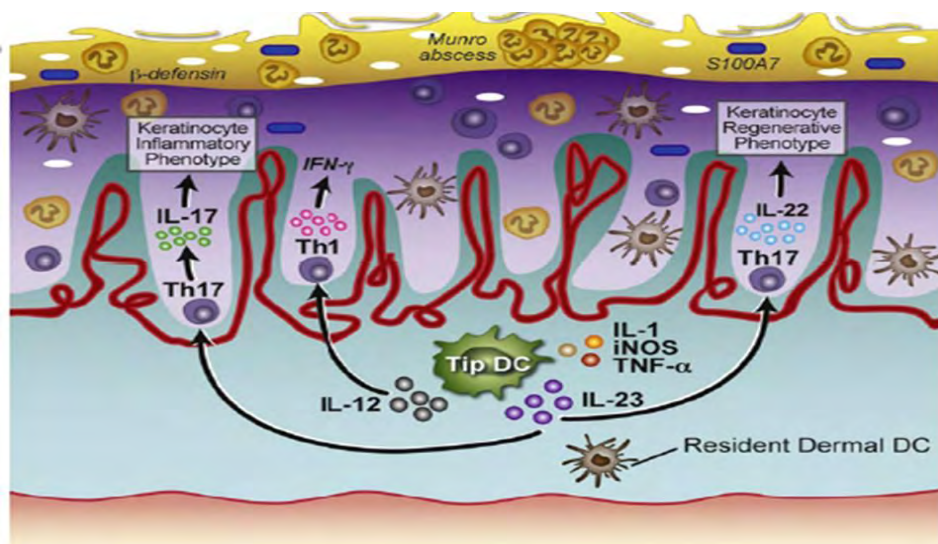
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

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

**Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης
πολυμορφισμών γονιδίων και ανταπόκρισης σε
θεραπεία σε ασθενείς με ψωρίαση στον
ελληνικό πληθυσμό.**

Ντούμου Ελένη



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης
πολυμορφισμών γονιδίων και ανταπόκρισης σε
θεραπεία σε ασθενείς με ψωρίαση στον
ελληνικό πληθυσμό.**

**Pharmacogenetic association study of gene polymorphisms
and treatment response to patients with psoriasis in the
Greek population**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

κ. Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κ. Ρουσσάκη Αγγελική-Βικτώρια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

κ. Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ζήση Μαμούρη, καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Θεολογία Σαραφίδου, λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε και το χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον κ. Ιωάννη Βασιλόπουλο, για την πολύτιμη βοήθειά του που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ρουσσάκη Αγγελική-Βικτώρια, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Κωνσταντίνο Σταμάτη, μεταδιδακτορικό ερευνητή και τον κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη, υποψήφιο διδάκτορα για την μετάδοση των γνώσεων τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους φίλους μου και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, για την ολόψυχη συμπαράστασή και την υπομονή τους.

Ελένη Ντούμου

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Σεπτέμβριο του 2011 έως το Μάρτιο του 2012. Επιβλέπων Καθηγητής ήταν ο κ. Ζήσης Μαμούρης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
1. Εισαγωγή.....	3
1.1. Ψωρίαση.....	3
1.1.2 Επιδημιολογία της ψωρίασης.....	3
1.1.3 Κλινικά Χαρακτηριστικά-τύποι ψωρίασης.....	3
1.1.4 Ιστολογικά Χαρακτηριστικά των ψωριασικών βλαβών.....	6
1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί Παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση.....	8
1.1.6 Ανοσοπαθγένεση της ψωρίασης.....	11
1.1.7 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης.....	15
1.2 Θεραπεία της ψωρίασης.....	16
1.2.1 Τοπική θεραπεία.....	16
1.2.2 Συστηματικές θεραπείες.....	17
1.3 Φαρμακογενετική.....	20
1.3.1 Φαρμακογενετική στη μεθοτρεξάτη.....	21
1.3.2 Φαρμακογενετική στη κυκλοσπορίνη.....	25
1.4 Σκοπός.....	28
2. Υλικά και μέθοδοι.....	29
2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	30
2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.....	32
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain reaction).....	33
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	37
2.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism).....	39
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	42
3. Αποτελέσματα- Συζήτηση.....	46
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	47

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών.....	.47
3.3 Ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων ABCB1 και MTHFR με PCR.....	48
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP.....	49
3.5 Στατιστική ανάλυση.....	52
3.6 Μελέτες συσχέτισης και ανάλυση αποτελεσμάτων.....	53
3.7 Συμπεράσματα.....	55
Βιβλιογραφία.....	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, μη μεταδοτική, φλεγμονώδης ασθένεια του δέρματος. Είναι μια σχετικά συχνή ασθένεια που επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού παγκοσμίως, προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και μεγάλη οικονομική επιβάρυνση. Υπάρχουν αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ψωρίασης. Η συστηματική θεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση σοβαρών μορφών ψωρίασης. Η θεραπεία με τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη, ή με συνδυασμό των δύο φαρμάκων αποτελεί την πιο συχνή μορφή θεραπείας. Ωστόσο, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν ετερογένεια στην απόκριση στην θεραπεία, η οποία να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η συσχέτιση των πολυμορφισμών C677T του γονιδίου *MTHFR*, C1236T και G2677T του γονιδίου *ABCB1*, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία της μεθοτρεξάτης, της κυκλοσπορίνης ή σε συνδυασμό των δυο φαρμάκων.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 45 ασθενείς με ψωρίαση, από την Ελλάδα. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Η απόκριση στην θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα και την μεταβολή του PASI. Η γονοτύπηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών με την μέθοδο PCR-RFLP.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου *MTHFR* και των πολυμορφισμών C1236T και G2677T του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή κυκλοσπορίνη για 3 μήνες.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic, non-contagious, inflammatory skin disease. It is a common disease that affects 2-3% of the population worldwide, causing significant morbidity and high financial burden. There are several therapeutic approaches to the treatment of psoriasis. Systemic treatments are often used from moderate to severe forms of psoriasis. The use of immunosuppressive drugs, cyclosporine or methotrexate, or a combination of them in the treatment of psoriasis, is considered to be first-line systemic therapies. However, patients exhibit heterogeneity in the response to therapy, which could be due to genetic factors.

The aim of this study was to study the putative association of 3 single nucleotide gene polymorphisms (C677T in *MTHFR*, C1236T and G2677T in *ABCB1*) with methotrexate or/and cyclosporine treatment responsiveness to psoriasis patients.

In this study, 45 patients with psoriasis from Greece, were genotyped for those polymorphisms by PCR-RFLP assays. Patients were diagnosed with Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score, before the treatment. Treatment response was assessed according to clinical protocols and changes in PASI.

Analysis of results showed no statistically significant association for the above polymorphisms and the response of patients to treatment with methotrexate or cyclosporine for 3 months.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

1.1.1 Γενικά

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

1.1.2 Επιδημιολογία της ψωρίασης

Παρά το γεγονός ότι η ψωρίαση εμφανίζεται παγκοσμίως, η συχνότητα εμφάνισής της ποικίλλει σημαντικά. Στις ΗΠΑ, περίπου το 2% του πληθυσμού εμφανίζει την ασθένεια. Η ψωρίαση επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού της Ευρώπης, είναι λιγότερο συχνή σε άτομα ασιατικής καταγωγής (0,1% ή λιγότερο), και είναι εξαιρετικά σπάνια στην Αφρική (Bhalerao and Bowcock, 1998). Η συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης είναι χαμηλή σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες, όπως οι Ιάπωνες, και απουσιάζει σε αυτόχθονες Αυστραλούς (Green, 1984) και σε Ινδιάνους της Νότιας Αμερικής (Convit, 1962).

Η ψωρίαση μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, έχει αναφερθεί κατά την γέννηση αλλά και σε άτομα προχωρημένης ηλικίας. Σε πολλές εκτενείς μελέτες αναγνωρίστηκε ότι η μέση ηλικία έναρξης της νόσου για την πρώτη εμφάνιση της ψωρίασης είναι μεταξύ 15 και 20 ετών, ενώ μια δεύτερη κορύφωση συμβαίνει στα 55-60 χρόνια (Burch and Rowell 1981, Smith et al 1993, Ferrandiz et al 2002, Henseler and Christophers 1985).

Σύμφωνα με τις δύο διαφορετικές κλινικές εμφανίσεις της ψωρίασης σε διαφορετική ηλικία έναρξης, η ψωρίαση διακρίνεται σε δυο κατηγορίες τύπου I και τύπου II. Η ψωρίαση τύπου I αρχίζει πριν την ηλικία των 40 ετών ενώ η τύπου II μετά την ηλικία των 40 ετών. Η ψωρίαση τύπου I ευθύνεται για το περισσότερο από το 75% των περιπτώσεων (Henseler and Christophers, 1985). Μια πρόωρη έναρξη (πριν την ηλικία των 15) σχετίζεται με μια πιο βαριά μορφή της νόσου όσον αφορά το ποσοστό της επιφάνειας του σώματος που προσβάλλεται και την απόκριση στην θεραπεία. (Melski and Stern, 1981).

Επιπλέον, υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA)-Cw6 σε ασθενείς με πρόωμη έναρξη, σε σύγκριση με μια μεταγενέστερη έναρξη της ψωρίασης (Farber and Nall, 1974).

1.1.3 Κλινικά Χαρακτηριστικά-τύποι ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια αυτοάνοση φλεγμονώδης δερματοπάθεια με μεταβλητή μορφολογία, κατανομή, σοβαρότητα και αιτία. Οι βλάβες της ψωρίασης είναι πολύ καλά οριοθετημένες, κυκλικές, κόκκινες βλατίδες ή αργυρόχρονες πλάκες. Επιπλέον, οι βλάβες συνήθως κατανέμονται συμμετρικά στο τριχωτό της κεφαλής, στους αγκώνες, στα γόνατα, καθώς και στις πτυχές του σώματος. Η ψωρίαση μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε περιοχή τραύματος ή σε πληγές (φαινόμενο του Koebner). Εάν η ψωρίαση είναι σε προχωρημένο στάδιο ή ανεξέλεγκτη, μπορεί να οδηγήσει σε μια γενικευμένη αποφολιδωτική ερυθροδερμία. Οι βλάβες στην περιοχή των νυχιών μπορεί να εμφανιστούν, κυρίως σε περιπτώσεις ψωριασικής αρθρίτιδας. Μερικές φορές η ψωρίαση μπορεί να εμφανίζεται στον

βλεννογόνο του στόματος ή της γλώσσας. Η μορφολογία μπορεί να κυμαίνεται από μικρές βλατίδες (σταγονοειδής ψωρίαση), σε φλύκταινες (φλυκταινώδης ψωρίαση) και σε γενικευμένο ερύθημα και πλάκες (ερυθροδερμική ψωρίαση). Επιπλέον, αυτές οι διαφορετικές μορφές μπορεί να εμφανίζονται σε τοπικό ή σε εκτεταμένο επίπεδο. Η ψωρίαση μπορεί να έχει μεταβλητή διάρκεια, εμφανιζόμενη ως χρόνιες, σταθερές πλάκες ή μπορεί να παρουσιάσει οξεία φάση με ταχεία εξέλιξη και εκτεταμένες βλάβες. Η ψωρίαση μπορεί να είναι συμπτωματική με τους ασθενείς να αναφέρουν έντονο κνησμό ή κάψιμο.

Οι κυριότεροι τύποι της ψωρίασης είναι:

1. Κοινή ψωρίαση ή κατά πλάκας

Αυτή η μορφή της ψωρίασης αποτελεί την συνηθέστερη, στην οποία οι ασθενείς μπορεί να έχουν έντονα οριοθετημένες, στρογγυλές ή οβάλ πλάκες. Οι ψωριασικές βλάβες μπορούν αρχικά να ξεκινήσουν ως ερυθματώδεις πλάκες με διάμετρο από ένα έως μερικά εκατοστά. Ένα λευκό δαχτυλίδι, γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff,



Εικόνα 1.1: Κατά πλάκας ψωρίαση (Griffiths and Barker, 2007)

μπορεί να παρατηρηθεί στο δέρμα που περιβάλλει μια ψωριασική πλάκα. Οι πλάκες χαρακτηρίζονται από αργυρό-λευκό χρώμα, ενώ μπορεί να ποικίλουν σε πάχος. Η αφαίρεση των πλακών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μικρών σημείων αιμορραγίας (Auspitz sign). Το ποσοστό του σχηματισμού πλακών ποικίλλει μεταξύ των ασθενών, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών περιοχών του σώματος του ίδιου ασθενή. Στην οξεία φλεγμονώδη ή εξανθηματική ψωρίαση, η εμφάνιση πλακών μπορεί να είναι ελάχιστη και το ερύθημα είναι το κυρίαρχο σύμπτωμα.

2. Γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση



Εικόνα: 1.2 Φλυκταινώδης ψωρίαση (Freedberg et al, 2003)

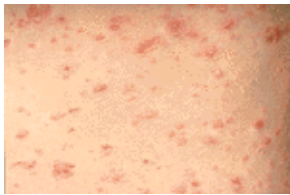
Η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση (von Zumbusch) είναι σπάνια και αποτελεί μια ενεργή, ασταθή νόσο. Ο ασθενής εμφανίζει πυρετό, κόκκινες και επώδυνες φλεγμονές του δέρματος που αποτελούνται από μονομορφικές φλύκταινες, οι οποίες μπορεί να ενώνονται. Οι ασθενείς με γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση συχνά πρέπει να εισαχθούν στο νοσοκομείο.

Παλαμοπελματιαία φλυκταινώδης ψωρίαση:

Η παλαμοπελματιαία φλυκταινώδης ψωρίαση παρουσιάζει μονές, κίτρινες φλύκταινες πάνω σε ένα ερύθημα, που εμφανίζονται στις παλάμες και στα πέλματα. Οι φλύκταινες είναι μαλακές και έχουν σκούρο καφέ χρώμα. Η φλυκταινώδης ψωρίαση συνδέεται συχνά με ψωριασική συμμετοχή των νυχιών (Langley et al, 2005). Περίπου το 25% των περιπτώσεων συνδέεται με την κοινή ψωρίαση, αλλά θεωρείται ότι η παλαμοπελματιαία

φλυκταινώδης ψωρίαση μπορεί να μην είναι μια μορφή ψωρίασης (Asumalahti et al, 2003). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από γενετικές μελέτες που δεν δείχνουν καμία συσχέτιση με το HLA-Cw6 ή άλλους δείκτες στο χρωμοσωμικό βραχίονα 6p που συνδέονται με χρόνια κατά πλάκας και σταγονοειδή ψωρίαση. Τα δημογραφικά στοιχεία της παλμοπελματιαίας φλυκταινώδης ψωρίαση διαφέρουν σημαντικά από εκείνα της χρόνιας κατά πλάκας ψωρίαση, καθόσον πλήττει συχνότερα τις γυναίκες (9:1), παρουσιάζεται πιο συχνά μεταξύ των 40 και 60 ετών, και εμφανίζει μια πολύ ισχυρή συσχέτιση με το κάπνισμα, σε ποσοστό 95% των ατόμων (O'Doherty et al, 1985).

3. Σταγονοειδής ψωρίαση :



Εικόνα 1.3:
Σταγονοειδής
ψωρίαση (Freedberg
et al)

Αυτή η μορφή περιγράφει την οξεία έναρξη πολλών μικρών (διάμετρου 2-10 χιλιοστά) βλαβών της ψωρίασης. Αυτές συνήθως κατανέμονται με κεντρομόλο τρόπο, παρόλο που οι σταγονοειδείς βλάβες μπορεί να εμφανίζονται και στο κεφάλι και στα άκρα. Συνήθως, η σταγονοειδής ψωρίαση εμφανίζεται αμέσως μετά από μια οξεία τύπου Β αιμολυτική στρεπτοκοκκική λοίμωξη του φάρυγγα ή των αμυγδαλών και περιστασιακά, σε ενήλικες. Η σταγονοειδής ψωρίαση αποτελεί το 2% των συνολικών περιπτώσεων της ψωρίασης. Σε ενήλικες, μπορεί οι σταγονοειδείς εξάρσεις να μεταπίπτουν σε χρόνια κοινή ψωρίαση (Langley et al, 2005). Αν και λίγες

μελέτες έχουν αξιολογήσει την μακροπρόθεσμη πρόγνωση των παιδιών με οξεία σταγονοειδή ψωρίαση, μια μικρή μελέτη αποκάλυψε ότι το 33% των ασθενών με οξεία σταγονοειδής ψωρίαση τελικά ανέπτυξε χρόνια κοινή ψωρίαση (Martin et al, 1996).

4. Ανάστροφη ψωρίαση (ψωρίαση των πτυχών)

Η ψωρίαση που επηρεάζει τις επιφάνειες των πτυχών, ιδιαίτερα τις μηροβουβωνικές περιοχές, τις μασχαλιαίες, τις υπομαστικές, την μεσογλουτιαία σχισμή, τις παλάμες και τα πέλματα, διακρίνεται μορφολογικά από τις παραδοσιακές πλάκες που εμφανίζονται σε άλλα σημεία στον κορμό και στα άκρα. Οι βλάβες των πτυχών εμφανίζονται ως ερυθρές, σαφώς διαχωρισμένες πλάκες και περιστασιακά συγχέονται με σημηματορροϊκή δερματίτιδα, παράτριμμα ή δερμοφυτίαση.

5. Ερυθροδερμική ψωρίαση

Η ερυθροδερμική ψωρίαση αντιπροσωπεύει την γενικευμένη μορφή της νόσου, που επηρεάζει όλα τα σημεία του σώματος, το πρόσωπο, τα χέρια, τα πόδια, τα νύχια, τον κορμό και τα άκρα. Αν και εμφανίζονται όλα τα συμπτώματα της ψωρίασης, το ερύθημα είναι το σημαντικότερο χαρακτηριστικό.



Εικόνα 1.4:
Ερυθροδερμική
ψωρίαση (Freedberg et

Η ερυθροδερμική ψωρίαση μπορεί να εμφανίζεται με διαφορετικούς βαθμούς δραστηριότητας της νόσου, να παρουσιάζεται ξαφνικά ως ένα γενικευμένο ερύθημα ή να εξελίσσεται σταδιακά από ψωρίαση κατά πλάκας, σε μια γενικευμένη αποφολιδωτική φάση. Στην τελευταία φάση υπάρχουν συνήθως μερικές περιοχές μη προσβεβλημένου δέρματος. Η ερυθροδερμική ψωρίαση είναι δυνατόν να εμφανιστεί ως απόκριση σε μη ανεκτική τοπική θεραπεία (π.χ. anthralin, υπεριώδης Β, ή UVB) αντιπροσωπεύοντας μια γενικευμένη αντίδραση Koebner. Γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση ενδέχεται να μετατραπεί σε ερυθροδερμία, χωρίς τον σχηματισμό των φλύκταινων. Αυτή η μορφή εμφανίζει

όλα τα χαρακτηριστικά της φλυκταινώδης ψωρίασης, όπως πυρετός, κακουχία, συχνές υποτροπές και σχετικά υψηλή θνησιμότητα. Μπορεί να υπάρξει πλήρης απώλεια της ανάπτυξης των νυχιών εξαιτίας της καταστροφής της μήτρας των νυχιών τους (Freedberg et al, 2003).

6. Η ψωριασική νόσος των νυχιών



Εικόνα 1.5:
Ψωριασική νόσος των
νυχιών (Langley et al,
2005)

Τα νύχια των χεριών επηρεάζονται πιο συχνά από αυτά των ποδιών. Το συνηθέστερο εύρημα είναι μικρά κοιλώματα στην επιφάνεια του νυχιού, με αποτέλεσμα τον ατελή σχηματισμό της μήτρας του νυχιού. Τα νύχια μπορεί να αποκολληθούν από την βάση τους, μια διαδικασία που ονομάζεται ονυχόλυση.

Χαρακτηριστικές υποκίτρινες περιοχές σχηματίζονται κάτω από το νύχι, οι οποίες ονομάζονται “σταγόνες ελαίου”. Επιπλέον, η επιφάνεια του νυχιού μπορεί να γίνει παχύρρευστη, δυστροφική και αποχρωματισμένη ενώ κίτρινο, κεράτινο υλικό να συγκεντρωθεί κάτω την επιφάνεια του νυχιού (υπονύχια υπερκεράτωση) (Langley et al, 2005).

1.1.4 Ιστολογικά Χαρακτηριστικά των ψωριασικών βλαβών

Η ιστολογική εικόνα μιας τυπικής ψωριασικής δερματικής βλάβης χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο. Η ψωρίαση έχει τρία κύρια ιστολογικά χαρακτηριστικά: επιδερμική υπερπλασία, διεσταλμένα προεξέχοντα στο αιμοφόρα αγγεία και φλεγμονώδη διήθηση των λευκοκυττάρων στο χόριο. Η ιστολογία της κλινικά ασυμπτωματικής περιοχής του δέρματος είναι φυσιολογική. Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως

ως αυξανόμενες, καλά οριοθετημένες, ερυθματώδεις οβάλ πλάκες με προσκολλημένα αργυρόχρα λέπια. Τα λέπια είναι αποτέλεσμα μιας υπερπλασίας της επιδερμίδας με πρόωρη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και ελλιπής κερατινοποίηση με διατήρηση των πυρήνων στην κεράτινη στιβάδα (παρακεράτωση). Το ποσοστό των μιτωτικών βασικών κερατινοκυττάρων αυξάνεται σε σύγκριση με εκείνο στο κανονικό δέρμα. Ως αποτέλεσμα, η επιδερμίδα γίνεται παχύνεται (ακάνθωση). Δηλαδή οι επιμήκεις ραβδώσεις Rete, σε συνδυασμό με την δερματική φλεγμονώδη διήθηση, συμβάλλει στην συνολική πάχυνση των ψωριασικών περιοχών. Στην φλεγμονώδη διήθηση συμμετέχουν κυρίως από τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα T κύτταρα του χορίου και τα ουδετερόφιλα, με μερικά T-κύτταρα στην επιδερμίδα. Η ερυθρότητα των βλαβών οφείλεται σε αύξηση του αριθμού των ελικοειδών τριχοειδών αγγείων που φτάνουν στην επιφάνεια του δέρματος μέσω λέπτυνσης του επιθηλίου (Nestle et al, 2009).



Εικόνα 1.6: Κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης. Εμφάνιση ψωριασικών βλαβών (A,B,C). Η ιστοπαθολογική εικόνα χαρακτηρίζεται από πάχυνση της επιδερμίδας, παρακεράτωση, επιμήκεις ραβδώσεις Rete, και κυτταρική διήθηση (D) (Nestle et al, 2009)

1.1.5 Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, όπου οι γενετικοί παράγοντες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της ψωρίασης. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν σε γενετικώς προδιαθετημένα άτομα και διεγείρουν την ανοσολογική διαταραχή.

Γενετικοί παράγοντες

Η συμπτωτικότητα της ψωρίασης (72%) σε μονοζυγωτικά δίδυμα είναι μεγαλύτερη από ότι στα διζυγωτικά δίδυμα (5-23%). (Brandrup et al 1978, Duffy et al 1993) Αυτά τα στοιχεία συμφωνούν με την ύπαρξη ισχυρής γενετικής συνιστώσας στην νόσο. Επιπλέον, στα μονοζυγωτικά δίδυμα η νόσος τείνει να είναι παρόμοια ως προς την ηλικία έναρξης, την κατανομή, την σοβαρότητα και την πορεία, ενώ αυτό δεν συμβαίνει στα διζυγωτικά δίδυμα (Brandrup et al, 1982). Αυτό υποδεικνύει ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην προδιάθεση της ασθένειας. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι, σε μελέτες σε δίδυμους, η συμπτωτικότητα δεν φτάνει ποτέ το 100% σε κάθε δεδομένο πληθυσμό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του γενετικού ανασυνδυασμού μέσα σε γονίδια του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR), ο οποίος είναι ουσιαστικά τυχαίος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορετικές εξειδικεύσεις για ενδογενή ή εξωγενή αντιγόνα σε κάθε δίδυμο. Δέκα γενετικές σαρώσεις του γονιδιώματος έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα DNA, που προέρχονται από οικογένειες που νοσούν από ψωρίαση, για να εντοπιστούν τα γονίδια που προσδίδουν ευαισθησία στην ψωρίαση (Bowcock et al, 2004). Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην ταυτοποίηση τουλάχιστον 19 διαφορετικών γενετικών τόπων. Μερικά από τα γονίδια μέσα σε αυτούς τους γενετικούς τόπους έχουν προσδιοριστεί και η συσχέτιση τους με την ψωρίαση δεν επαναλήφθηκε σε όλες τις μελέτες άλλων πληθυσμών. Αυτό θα μπορούσε, εν μέρει, να οφείλεται στον χαμηλό κίνδυνο, που προέρχεται από την προδιάθεση στην ασθένεια και τις πιθανές γεωγραφικές διαφορές. Στην συνέχεια θα αναλυθούν 5 γενετικές περιοχές

Γενετικός τόπος PSORS1- MHC (6p21)

Αυτή η χρωμοσωματική περιοχή είναι η μόνη που έχει επανειλημμένα ταυτοποιηθεί σε γενετικές σαρώσεις οικογενειών που υποφέρουν από ψωρίαση. Για την ψωρίαση, οι ισχυρότερες συσχετίσεις εμφανίζονται με τα HLA τάξης I αλληλόμορφα. Σύμφωνα με έρευνες, η PSORS1 μπορεί να είναι ένα αλληλόμορφο που ρυθμίζει την έκφραση ορισμένων γονιδίων της περιοχής MHC τάξης I (Veal et al, 2002). Δύο γονίδια της περιοχής PSORS1 έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με το ρόλο τους στην προδιάθεση της ψωρίασης. Το πρώτο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CCHCR1 και το άλλο κωδικοποιεί την corneodesmosin (CDSN). Αυτά τα γονίδια έχουν διαφορετική έκφραση σε μη προσβεβλημένο δέρμα σε σχέση με το ψωριασικό. Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης CCHCR1, που κωδικοποιείται από τον απλότυπο που σχετίζεται με την ψωρίαση, προβλέπεται να έχει μικρότερη την επικράτεια της πρώτης α-έλικας, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την αντιγονικότητα ή τις βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης (Asumalahti et al, 2002). Η CCHCR1 υπερεκφράζεται στα κερατινοκύτταρα των ψωριασικών περιοχών σε σχέση με τα δείγματα του υγιούς δέρματος (Asumalahti et al, 2000) και η έκφρασή της ρυθμίζεται από την IFN- γ . Σε ψωριασικές βλάβες η CCHCR1 είναι παρούσα στους πυρήνες και στο κυτταρόπλασμα των κερατινοκυττάρων, στις άκρες των δερματικών θηλών, αλλά είναι απύουσα από την ακρολοφία Rete. Αυτό δηλώνει ότι η CCHCR1 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της διαφοροποίησης ή του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Σύμφωνα με αυτό, η υπερέκφραση της CCHCR1 σε δέρμα μύος καταλήγει σε μερικά από τα χαρακτηριστικά της

ψωριασικής βλάβης (για παράδειγμα, αύξηση της έκφρασης των κερατινών -6, -16 και -17) (Elomaa et al, 2004). Η CDSN εκφράζεται στα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκυττάρια και στον εσωτερικό θυλάκα της τρίχας (Allen et al, 2001). Αυτή εντοπίζεται στα τροποποιημένα δεσμοσώματα, που εξασφαλίζουν την μεσοκυττάρια συνοχή των κερατινοκυττάρων στα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας (δηλαδή, στην κοκκιώδη και την κεράτινη στιβάδα). Οι πλούσιες σε σερίνη και γλυκίνη επικράτειες του CDSN, οι οποίες είναι απαραίτητες για την προσκόλληση των κυττάρων, πέπτονται διαδοχικά κατά την απόπτωση των κυττάρων της επιδερμίδας (Simon et al, 2001). Το γονίδιο CDSN υπερεκφράζεται στις περιοχές του δέρματος που παρουσιάζουν βλάβες στους ασθενείς με ψωρίαση. Αυτή η αυξημένη έκφραση στα ψωριασικά κερατινοκύτταρα θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη απολέπιση, οδηγώντας σε ανώμαλη κλιμάκωση των ψωριασικών βλάβων (Allen et al, 2001). Η διεισδυτικότητα του PSORS1 εκτιμάται σε 10-15%, υποδεικνύοντας ότι και άλλα γονίδια ή περιβαλλοντικές επιδράσεις απαιτούνται για την ανάπτυξη της ασθένειας. Η αναγνώριση αυτών των παραγόντων είναι σημαντική για να κατανοήσουμε τη συμμετοχή του PSORS1 στην ψωρίαση. Αν ο γενετικός τύπος PSORS1 αντιστοιχεί σε ένα αλληλόμορφο ειδικό για το δέρμα, παρά σε ένα κλασικό αλληλόμορφο HLA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, τότε η συμβολή του στην ψωρίαση μπορεί να είναι αποτέλεσμα απόκρισης των κερατινοκυττάρων σε ένα ανοσολογικό ερέθισμα και τα τροποποιητικά αλληλόμορφα να είναι αυτά που αλλάζουν την δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Γενετικός τύπος PSORS2 (17q25)

Μια γενετική υποπεριοχή που βρίσκεται μέσα στο PSORS2 περιλαμβάνει το γονίδιο προδιάθεσης για την ψωρίαση SLC9A3R1 και ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας, N-ακετυλοτρανσφεράση 9 (NAT9) που έχει όμως σχετιστεί με προδιάθεση για την ψωρίαση. Η πρωτεΐνη SLC9A3R1 έχει δύο επικράτειες PDZ, οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Το καρβοξυτελικό άκρο της SLC9A3R1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού Ezrin, radixin και moesin, οι οποίες με τη σειρά τους δεσμεύουν την ακτίνη (Reczek et al, 1997). Στα T-κύτταρα, η πρώτη επικράτεια PDZ της SLC9A3R1 δεσμεύει την PAG (φωσφοπρωτεΐνη που συνδέεται με περιοχές της μεμβράνης που είναι πλούσιες σε γλυκολιπιδία-CBP). Η PAG, η οποία είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε λιπιδικές στοιβάδες, συνδέεται με την CSK (Src κινάση) (Itoh et al, 2002). Μετά από την διέγερση των T-κυττάρων, οι πρωτεΐνες στην λιπιδική στοιβάδα οργανώνονται σε ένα υπερμοριακό ενεργοποιημένο σύμπλοκο στο χώρο διεπαφής μεταξύ των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και των T-κυττάρων, ο οποίος είναι γνωστός ως ανοσολογική σύναψη. Το σύμπλοκο PAG–SLC9A3R1–ezrin–radixin–moesin ρυθμίζει την δυνατότητα της μεμβράνης για τον σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης και την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (Bromley et al, 2001).

Μια δεύτερη γενετική υποπεριοχή που σχετίζεται με προδιάθεση στην ψωρίαση μέσα στην περιοχή PSORS2 περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την RAPTOR (μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που σχετίζεται με την MTOR) (Kim et al, 2002). Η MTOR είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μετά από απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, τα μιτογόνα ή οι κυτοκίνες, και αποτελεί στόχο των ανοσοκατασταλτικών φάρμακων tacrolimus και rapamυκίνη. Η RAPTOR συνδέεται με την MTOR, και με αυτό τον τρόπο αναστέλλει τη δράση της. Η RAPTOR εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, στα νεφρά και τους μυς, αλλά και σε ψωριασική επιδερμίδα. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της RAPTOR εντοπίζονται σε μη κωδική περιοχή και ως εκ τούτου είναι πιθανό να έχουν ρυθμιστικό ρόλο, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης του RAPTOR υπό ορισμένες συνθήκες. Αυτό θα μπορούσε να

ενδεχομένως να επηρεάσει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των T-κυττάρων και/ή των κερατινοκυττάρων ως απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Caron et al, 2004). Συνεπώς, στην χρωμοσωματική περιοχή 17q25 είναι πιθανό να υπάρχουν τουλάχιστον τρία γονίδια που σχετίζονται με προδιάθεση στην ψωρίαση, δύο χαμηλής διεισδυτικότητας τύπους (SLC9A3R1 και NAT9) και έναν υψηλής διεισδυτικότητας τύπο (RAPTOR). Ωστόσο, ακόμη και στην περίπτωση του RAPTOR, ο βαθμός της σοβαρότητας και η παρουσία της ψωριασικής αρθρίτιδας ποικίλλει στα νοσούντα μέλη της οικογένειας, υποδεικνύοντας ότι παίζουν ρόλο τροποποιητές ή περιβάλλοντικές επιδράσεις.

Γενετικός τόπος (PSORS4) (Σύμπλοκο επιδερμικής διαφοροποίησης στο χρωμόσωμα) 1q21

Το σύμπλοκο επιδερμικής διαφοροποίησης (EDC) εκτείνεται σε μήκος τουλάχιστον 2 Mb και περιέχει αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην επιδερμική διαφοροποίηση (Caron et al 1999, Bhalerao & Bowcock 1998). Το EDC περιέχει ομάδες γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες S100, πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη μικρού μοριακού βάρους (SPRRs) και πρωτεΐνες late envelope (LEPs). Η οικογένεια γονιδίων S100 κωδικοποιεί 21 πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (9-13 kDa) που χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο EF-hand μοτίβων, τα οποία δεσμεύουν ασβέστιο (Eckert et al, 2004). Από τα γονίδια της οικογένειας S100, τα 14 βρίσκονται εντός του EDC. Κατά τα τελικά στάδια της επιδερμικής διαφοροποίησης σχηματίζεται μια δομή κερατινοκυττάρων με πολλά λιπίδια στην εξωτερική επιφάνεια που είναι απαραίτητη για την λειτουργία του επιδερμικού φραγμού, η οποία προστατεύει τον οργανισμό από την περιβαλλοντική επίθεση και την απώλεια του ύδατος (De Heller-Milev et al, 2000). Αυτό συνεπάγεται τη μετατροπή της πλασματικής μεμβράνης σε κερατινοποιημένο φάκελο με διαδοχική ενσωμάτωση των πρόδρομων πρωτεϊνών του EDC, όπως η involucrin, οι SPRRs, η Ioricrin και τουλάχιστον 18 LEPs (Marshall et al, 2001).

Η χαρτογράφηση της PSORS4 σε μια υποπεριοχή του EDC, και η πιθανή αναγνώριση του CDSN ή του CCHCR1 ως γονίδια της περιοχής PSORS1, δείχνει ότι η ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων θα μπορούσε να συμβάλλει άμεσα στην παθογένεση της νόσου. Ωστόσο, οι επιδερμικές αλλαγές που καθορίζουν την ψωρίαση κατά πλάκας αντιστρέφονται από θεραπείες που στοχεύουν εξειδικευμένα στην κυτταρική ανοσία ή σε προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Έτσι, είναι μάλλον απίθανο ότι η ψωρίαση προκαλείται από μόνιμη μεταβολή της ανάπτυξης των κερατινοκυττάρων, ωστόσο οι γενετικές αλλαγές των κερατινοκυττάρων μπορούν να μεταβάλουν την απόκριση τους στην ανοσία ή σε προ-φλεγμονώδεις παράγοντες. Πράγματι, μερικοί από τους γενετικούς τροποποιητές που βρίσκονται στην PSORS1 (όπως SLC9A3R1 και NAT9) θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε τροποίσεις στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό δείχνει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η παθογένεια της ψωρίασης βασίζεται σε μια σχέση μεταξύ ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος ή φλεγμονής και επιδερμικής υπερπλασίας.

Γενετικός τόπος PSORS5 (3q21)

Το SLC12A8, που εντοπίζεται εντός της περιοχής PSORS5, είναι το πρώτο γονίδιο που προτάθηκε ότι σχετίζεται με την ψωρίαση. Ταυτοποιήθηκε σε μια μελέτη ασθενών από την Σουηδία (Hewett et al, 2002). Αυτό το γονίδιο είναι μέλος της οικογένειας των συμμεταφορέων που είναι συζευγμένοι με κατιόντα-χλωρίου (Hebert et al, 2004). Οι

πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που σχετίζονται με αυτά τα φλεγμονώδη νοσήματα ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το SLC12A8, δηλαδή το SLC22A4, καθώς και το SLC22A5, το SLC9A3 και ο ρυθμιστής SLC9A3R1 (κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ευαισθησίας στην ψωρίαση που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q25). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες αναφέρονται να είναι μέλη ενός πολυ-πρωτεϊνικού σύμπλοκου που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 1 που περιέχει την επικράτεια PDZ (PDZK1) (Gisler et al, 2003). Η PDZK1 εμπλέκεται στην ξενοβιοτική μεταφορά, και το μονοπάτι που εμπλέκεται αλλάζει σε μια αυτοάνοση ασθένεια.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η ψωρίαση μπορεί να προκληθεί από μηχανικό, υπεριώδη και χημικό τραυματισμό, από διάφορες λοιμώξεις, την χρήση φαρμάκων, το ψυχολογικό στρες, το κάπνισμα και άλλους παράγοντες (Peters et al, 2000). Ο πιο σημαντικός είναι η λοίμωξη από στρεπτόκοκκο τύπου A (Baker et al, 1997).

Φυσικό τραύμα: Το φαινόμενο Koebner

Το 1872, ο Koebner περιέγραψε έναν ασθενή, ο οποίος πέντε χρόνια μετά την ανάπτυξη της ψωρίασης, σημείωσε ότι τα διάφορα τραύματα στο δέρμα του είχαν ως αποτέλεσμα ψωριασικές βλάβες. Συγκεκριμένα, η ψωρίαση σημειώθηκε κατά τα ακριβή σημεία όπου το άλογο του τον είχε δαγκώσει. Λίγο αργότερα η ψωρίαση του έγινε γενικευμένη. Ο Koebner υπέθεσε ότι υπήρχαν διαστήματα κατά τη διάρκεια της ψωρίασης, όπου οι τραυματισμοί του δέρματος έχουν ως αποτέλεσμα τη νόσο. Η αρχική περιγραφή από τον Koebner δείχνει ότι η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου Koebner σε περιπτώσεις ψωρίασης αυξάνεται όταν η νόσος είναι ενεργοποιημένη.

Λοιμώξεις: Οι λοιμώξεις έχουν αναγνωριστεί ως ένα έναυσμα για την έναρξη ή την επιδείνωση της ψωρίασης. Η οξεία σταγονοειδής ψωρίαση συχνά εμφανίζεται από 1 έως 2 εβδομάδες μετά από μια οξεία στρεπτοκοκκική λοίμωξη. Μεταξύ των ασθενών με οξεία σταγονοειδής ψωρίαση, το 56 – 85% έχουν την στρεπτοκοκκική νόσο.

Στρες: Κλινικές μελέτες υποστηρίζουν τις αντιλήψεις των ασθενών ότι η ψωρίαση επιδεινώνεται από το stress σε περίπου 30 – 40 τοις εκατό των περιπτώσεων.

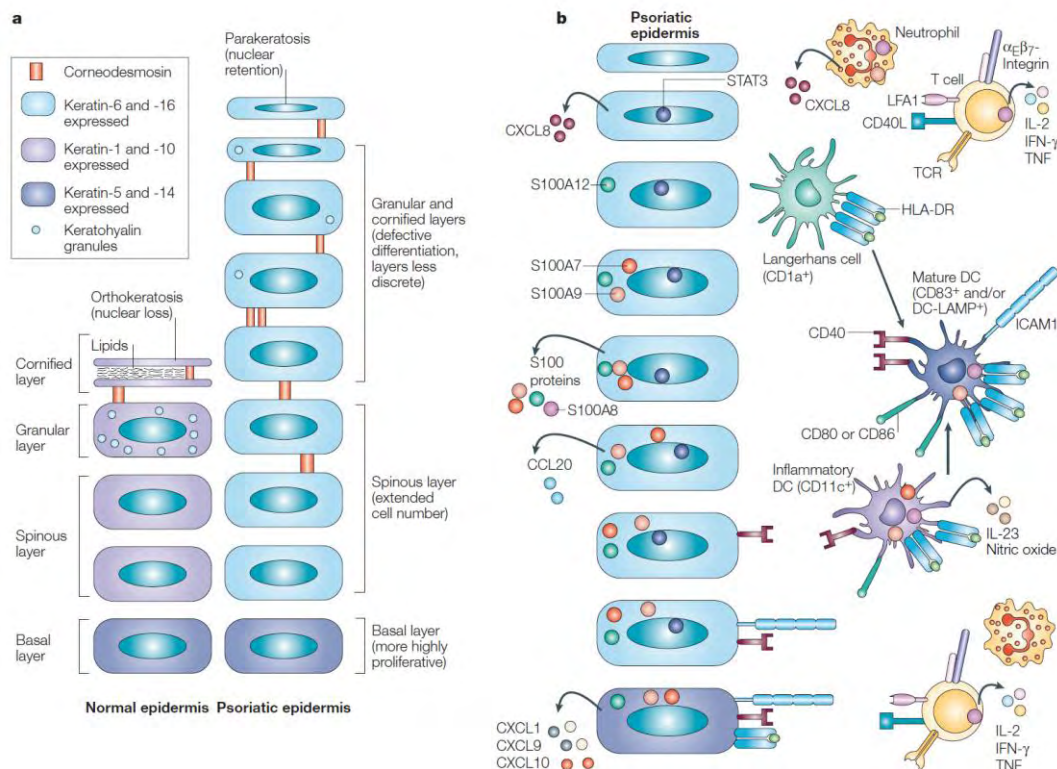
Αλκοόλ: Το αλκοόλ θεωρείται ότι έχει αρνητική επίδραση στην ψωρίαση, αλλά η υπόθεση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί. Αυτή η υπόθεση φαίνεται να βασίζεται στις παρατηρήσεις των αλκοολικών που υποφέρουν από ψωρίαση, οι οποίοι όταν αρχίζουν να πίνουν υπερβολική ποσότητα αλκοόλ, εμφανίζουν έξαρση της νόσου (Freedberg et al, 2003).

Φάρμακα: Οι β-αδρενεργικοί αναστολείς μπορεί να επιδεινώσουν την ψωρίαση ή να πυροδοτήσουν την ανάπτυξη των πρώτων αλλοιώσεων. Το λίθιο είναι ένας ισχυρός επαγωγέας των βλαβών της ψωρίασης. Ορισμένοι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, επίσης, έχουν αναφερθεί ως φάρμακα που επιδεινώνουν την ψωρίαση (Tsankov et al, 2000).

1.1.6 Ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης

Η ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει αλλαγές στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα, τα νευρικά κύτταρα, τα σιτευτικά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα) και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα (T-λεμφοκύτταρα). Τα ενεργοποιημένα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, παράγουν αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες που δρουν στα κύτταρα του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος (Lowe et al, 2007). Αρχικά γίνεται ενεργοποίηση των κυττάρων του επίκτητου ανοσοποιητικού

συστήματος (των δενδριτικών κυττάρων και των κερατινοκυττάρων). Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το μηχανικό τραύμα, οι λοιμώξεις, τα φάρμακα και το συναισθηματικό στρες μπορεί να προκαλέσουν την έναρξη της ασθένειας. Το μηχανικό τραύμα, π.χ. μπορεί να ενεργοποιήσει τα κερατινοκύτταρα, που αρχίζουν να απελευθερώνουν κυτοκίνες (IL-1 και ο TNF-α) και πρωτεΐνες heat shock. Αυτές ενεργοποιούν τα δενδριτικά κύτταρα στην επιδερμίδα και το χορίο. Επίσης η σύνδεση των αντιγόνων των μολυσματικών παραγόντων με τους toll-like υποδοχείς στα δενδριτικά κύτταρα και στα κερατινοκύτταρα είναι δυνατόν να οδηγήσει στην ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα και τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα παράγουν πολυάριθμες χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Lowe et al, 2007). Μόλις ενεργοποιηθούν τα δενδριτικά κύτταρα επεξεργάζονται ένα αντιγόνο και μεταναστεύουν στην περιφέρεια όπου το αντιγόνο παρουσιάζεται στα T-λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 1.7: Διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων-ψωριασικές πλάκες σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα: α) Τα βασικά κερατινοκύτταρα διαφοροποιούνται μέσω της ακανθώδους και κοκκώδους στοιβάδας της επιδερμίδας προς ώριμα κερατινοκύτταρα. Τα ώριμα κερατινοκύτταρα του κερατινοποιημένου στρώματος (cornified layer) στερούνται πυρήνα, έχουν κερατινοποιημένους φακέλους και χωρίζονται από λιπίδια. Σε ψωριασικές βλάβες, υπάρχει αυξημένη ανάπτυξη και αλλαγή της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και στο κοκκώδες και στο κερατινοποιημένο στρώμα. Η διαδικασία της τερματικής διαφοροποίησης είναι ατελής: τα κύτταρα ωριμάζουν με διατηρημένο τον πυρήνα, η λιπιδική έκκριση μειώνεται, και λιγότεροι κόκκοι είναι παρόντες. β) Η επιδερμίδα σε μια ψωριασική πλάκα χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από τα κερατινοκύτταρα - όπως ICAM1, CD40 και HLA-DR - και από την παρουσία αρκετών τύπων διεισδυτικών λευκοκυττάρων. Τα CD11c + φλεγμονώδη δενδριτικά κύτταρα, τα ώριμα (CD83 + και τα DC-LAMP +) δενδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα T κύτταρα είναι παρόντα μόνο σε δέρμα ασθενών. Επίσης στην ψωριακή επιδερμίδα εντοπίζονται CD8 + T κύτταρα.

Προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα Τ-λεμφοκύτταρα, εκτός από την σύνδεση των πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης των δενδριτικών κυττάρων (ICAM-1, LFA-3, CD80/CD86) με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης των Τ-λεμφοκυττάρων (αντίστοιχα LFA-1, CD2, CD28), είναι απαραίτητη η σύνδεση του αντιγόνου (συνδεδεμένου στο MHC μόριο στην μεμβράνη των δενδριτικών κυττάρων) στον υποδοχέα των λεμφοκυττάρων (Nickoloff et al, 2004).

Ως εκ τούτου, για να επέλθει η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, πρέπει να δημιουργηθεί η ανοσολογική σύναψη μεταξύ των πρωτεϊνών της μεμβράνης του κυττάρου του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και των Τ-λεμφοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση διαφέρουν σε CD4 τύπου 1 (LTh1: που παράγουν την INF- γ , τον TNF- α και την IL-2) και τύπου 17 (LTh17: που παραγούν την IL-17, τον TNF- α , την IL-6 και την IL-22) και το CD8 τύπου 1 (LTc1: που παραγούν την TNF- α , την IFN- γ , τις περφορίνες και το granzyme B) (Lowe et al, 2007).

Τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο δέρμα μέσω της σύνδεσης των μορίων προσκόλλησης που εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη τους (CLA και LFA-1) με τα μόρια προσκόλλησης που βρίσκονται στην μεμβράνη των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων του δέρματος (E-σελεκτίνες και ICAM-1). Τα CD8 τύπου 1 Τ-λεμφοκύτταρα συγκεντρώνονται στην επιδερμίδα και τα CD4 Τ-λεμφοκύτταρα στο χορίο. Στην χορίο τα Τ-λεμφοκύτταρα CD4 συναντούν και αλληλεπιδρούν με τα δενδριτικά κύτταρα σχηματίζοντας νέες ανοσολογικές συνάψεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή πολυάριθμων κυτοκινών που ενισχύουν την διαδικασία της φλεγμονής (Lowe et al 2007, Nickoloff et al 2004). Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα και τα ιστιοκύτταρα παράγουν IL-12 και IL-23 (Mackenzie et al, 2006). Η IL-12 ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των CD4 τύπου 1 Τ-λεμφοκυττάρων (Th1) και η IL-23 τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων τύπου 17 (Th17) (Mackenzie et al 2006, Guttman-Yassky et al 2007). Ο πολλαπλασιασμός των Th17 και των Th1 στην ψωρίαση επίσης συνεισφέρει στην αύξηση των ρυθμιστικών Τ-λεμφοκυττάρων (Lowe et al 2007, Guttman-Yassky et al 2007, Sugiyama et al 2005). Στην ψωρίαση τα δερματικά δενδριτικά κύτταρα που βρίσκονται σε μεγαλύτερο αριθμό είναι τα μυελοειδούς τύπου (DC11c). Αυτά τα κύτταρα λειτουργούν όπως τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στα Τ-λεμφοκύτταρα και επίσης ως αντιφλεγμονώδη κύτταρα, ως σημαντικοί παραγωγοί της IL-20, ως επαγωγείς της παραγωγής του νιτρικού οξειδίου (iNOS), καθώς και της IL-23 και του TNF- α (Lowe et al 2007, Guttman-Yassky et al 2007). Η IL-20 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και την αγγειοδιαστολή από το μονοξειδίου του αζώτου. Η IL-23, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των LTh17 και την επακόλουθη παραγωγή της IL-22 και της IL-6 (που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων). Η IL-17 διεγείρει τα κερατινοκύτταρα να παράγουν defensins (πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη μόλυνση των ψωριασικών περιοχών) και την IL-8.

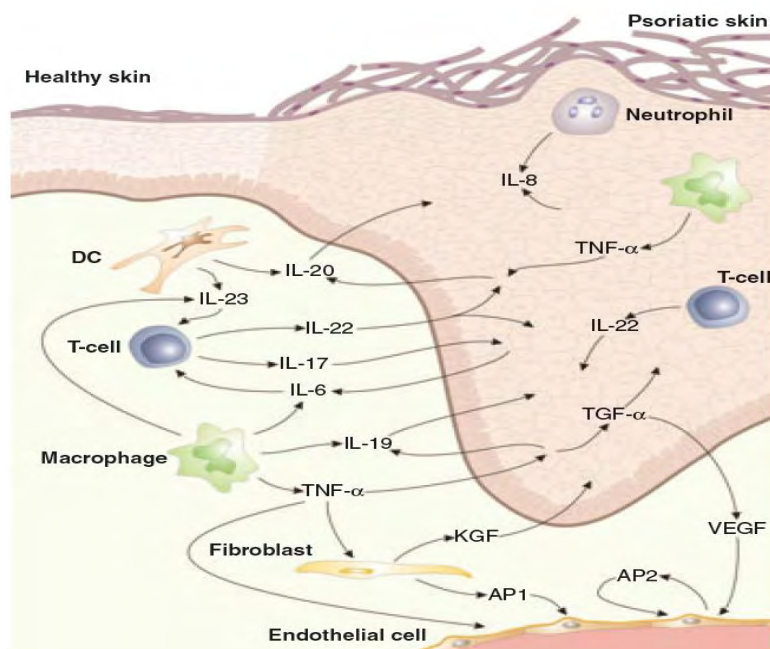
Ο TNF- γ διεγείρει τα κερατινοκύτταρα ώστε να παράγουν την IL-8 και την IP-10 (χημειοτακτικές πρωτεΐνες των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων αντίστοιχα), την IL-1 και τον TNF- α , εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες που ευνοούν την αγγειογένεση.

Ως εκ τούτου, οι κυτταροκίνες του Th17 διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν πολυάριθμες φλεγμονώδεις πρωτεΐνες. Ο πολλαπλασιασμός των LTh1 που προκαλείται από την IL-12 οδηγεί στην παραγωγή του TNF- α και της IFN- γ . Η IFN- γ επίσης διεγείρει την παραγωγή της IL-12, της IL-8, της IP-10, της IL-23, των defensins και του iNOS από τα κερατινοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (Gottlieb et al 2005, Zaba et al 2007). Οι ιντερφερόνες, οι TNFs και η IL-20 είναι ενεργοποιητές μεταγραφικών παραγόντων (STAT-1, STAT-3 και του NF- κ B). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες, ελέγχουν κάποιες ομάδες γονιδίων που κωδικοποιούν φλεγμονώδεις μεσολαβητές στην ψωρίαση (Lowe et al 2007, Guttman-Yassky 2007).

Πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με etanercept αποκαλύπτουν ότι

ο TNF ρυθμίζει την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων των ψωριασικών κυττάρων. Η παρεμπόδιση του TNF από αυτό τον θεραπευτικό παράγοντα μειώνει την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και κατά συνέπεια, αναστέλει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή χυμοκινών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα T-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κυτταρα και τα κερατινοκύτταρα (Gottlieb et al 2005, Zaba et al 2007). Η σύνθεση του TNF από τα κύτταρα μπορεί να προκαλείται από μια ποικιλία ερεθισμάτων. Τα μακροφάγα συνθέτουν TNF παρουσία βακτηρίων, ιών, ανοσολογικών συμπλόκων και κυτταροκινών (όπως η IL-1, η IL-7, το GM-CSF, η IFN- γ), του συμπληρώματος, των καρκινικών κύτταρων, της ακτινοβολίας, της ισχαιμίας, της υποξίας και του τραύματος. Αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν τη μεταγραφή και την πρωτεϊνοσύνθεση του TNF. Όταν βρίσκεται στην μεμβράνη, ο TNF επάγει τη σύνθεση άλλων κυτταροκινών όπως η IL-1, η IFN- α και η IL-2, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν την παραγωγή του TNF. Παρ' όλα αυτά, ο TNF είναι σε θέση να προκαλέσει τη σύνθεση των ρυθμιστικών παραγόντων, όπως η IL-10, οι προσταγλανδίνες και τα κορτικοστεροειδή, τα οποία αναστέλλουν την μεταγραφή και εμποδίζουν την περαιτέρω απελευθέρωση αυτών των κυτταροκινών (Tracey et al, 2008). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του TNF μόλις ενσωματωθεί στο κυτταρόπλασμα από τους υποδοχείς του, είναι να συνθέσει τον NF- κ B1. Ο NF- κ B1 ελέγχει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων φλεγμονής, προωθώντας την προγραμματισμένη απόπτωση που είναι εξαρτημένη από την δράση της κασπάσης-8 και την αύξηση του αριθμού των μιτώσεων, που οφείλεται στην μείωση της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου των κερατινοκυττάρων και, κατά συνέπεια, από την ελλιπή ωρίμανση.

Αυτό μειώνει τη σύνθεση των λιπιδίων από τα κερατινοκύτταρα. Από την άλλη, τα Tc1 λεμφοκύτταρα (CD8 +) επιτίθενται στις ψωριασικές περιοχές με την απελευθέρωση κυτοκινών και διαπερνούν τα μεσοκυττάρια διαστήματα των κερατινοκυττάρων, διευκολύνοντας τη φλεγμονώδη διαδικασία. (Emedicine.com)



Εικόνα 1.8: Διάφοροι πληθυσμοί κυττάρων και οι μεσολαβητές τους (Sabat et al, 2007).

1.1.7 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης

Η ψωρίαση έχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης, προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και μεγάλη οικονομική επιβάρυνση (Griffiths and Barker, 2007). Μια ευρεία ποικιλία συστημάτων βαθμολόγησης έχει προταθεί για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της ψωρίασης. Παρά την σπουδαιότητα της αξιολόγησης της ψωρίασης, υπάρχει έλλειψη συναίνεσης για το πλέον κατάλληλο κριτήριο. Μεταξύ των συστημάτων βαθμολόγησης, το psoriasis area and severity index (PASI) είναι το παλιότερο και το πιο αποδεκτό στην κλινική έρευνα και από τις υγειονομικές αρχές για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων (European Medicines Agency, Emea, 2005). Για αυτό το λόγο, το PASI θεωρήθηκε ως το σύστημα βαθμολόγησης αναφοράς βάσει του οποίου μπορούν να συγκριθούν και τα υπόλοιπα (Ashcroft et al, 1999).

Ο δείκτης PASI αναλύει τις τέσσερις περιοχές του σώματος (το κεφάλι, τον κορμό, τα άνω και τα κάτω άκρα) σε σχέση με το ερύθημα, την σκλήρυνση (πάχος), την απολέπιση των πλακών, και την επιφάνεια της περιοχής του σώματος που επηρεάζεται (BSA) (Jacobson et al, 2004). Οι βαθμολογίες 0 - 4 που αποδίδονται στο ερύθημα, στην σκλήρυνση και στην κλιμάκωση, με βάση την έντασή τους (0- απόντα, 1 - ήπια, 2- μέτρια, 3- έντονη, 4-σοβαρά). Η BSA παίρνει βαθμολογίες από 1 έως 6 που αντιστοιχούν στο ποσοστό (1 έως 100%) που προσβάλλεται. Έτσι, η βαθμολογία 1 σημαίνει είναι προσβεβλημένο λιγότερο από το 10% της περιοχής του σώματος, το 2 αντιστοιχεί από 10-29%, το 3 σε 30-49%, το 4 από 50 – 69%, το 5 από 70-89%, το 6 από 90-100%. Το PASI είναι το πιο διαδομένο εργαλείο σε κλινικές δοκιμές, έχει επικριθεί για την μη-γραμμική κλίμακα και την πολυπλοκότητά του (Carlin et al, 2004). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη παραμέτρος για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της νόσου στην ποιότητα ζωής είναι η dermatology life quality index (DLQI). Η DLQI μπορεί να πάρει τιμές από 0 έως 30 (Both et al, 2007).

Δεν υπάρχει κοινά αποδεκτός ορισμός της περιορισμένης (ήπιας) σε σχέση με την μέτρια ή την σοβαρή ψωρίαση. Σε μια δήλωση συμφωνίας από το Εθνικό Ίδρυμα Ψωρίασης των ΗΠΑ, χωρίζουν τα άτομα που πάσχουν από κατά πλάκας ψωρίαση σε «υποψήφιους ασθενείς για την τοπική θεραπεία» με BSA <5 και «υποψήφιους ασθενείς για συστηματική και / ή φωτοθεραπεία» (BSA ≥ 5). Επιπλέον, υπάρχει ο «κανόνας των δεκάδων», που καθορίζει την τρέχουσα σοβαρή ψωρίαση αν οι τιμές του BSA ή του PASI ή του DLQI είναι πάνω από 10 (BSA > 10 ή PASI > 10 ή DLQI > 10), ο οποίος προτάθηκε ως ένα εργαλείο για την βαθμολόγηση της κλινικής σοβαρότητας (Finlay 2005, Pariser 2007).

Η ελάχιστη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα της κάθε θεραπείας ορίστηκε να είναι τουλάχιστον 50% μείωση στο αρχικό PASI, ανεξάρτητα από το DLQI. Εάν αυτό δεν τηρηθεί, η θεραπεία θα πρέπει να τροποποιηθεί. Αυτή η τροποποίηση θα μπορούσε να είναι η προσαρμογή της δόσης, μαζί με άλλη θεραπεία (θεραπεία συνδυασμού) ή αλλαγή φαρμάκου. Όταν το PASI μειωθεί κατά τουλάχιστον 75%, η θεραπευτική αγωγή μπορεί να συνεχιστεί. Αν το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι η μείωση του PASI τουλάχιστον 50% αλλά λιγότερο από το 75%, συνιστάται να αποφασιστεί εάν θα τροποποιηθεί η θεραπευτική αγωγή, σύμφωνα με τον DLQI. Ένα κριτήριο για να τροποποιηθεί η θεραπεία προτάθηκε η τιμή του DLQI εάν είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη του 5 (Hongbo et al, 2005).

1.2 Θεραπεία της ψωρίασης

Λόγω των διαφορετικών εκδηλώσεων της ψωρίασης, οι προσεγγίσεις στη θεραπεία πρέπει να εξατομικεύονται ανάλογα με τη φύση και την έκταση της νόσου, τις ανατομικές περιοχές, τις συνέπειες στην ποιότητα της ζωής των ασθενών, την συνυπάρχουσα ψωριασική αρθρίτιδα, τους παράγοντες που την προκαλούν (όπως λοιμώξεις, φάρμακα και στρες), και την δέσμευση του ασθενούς στη θεραπεία. Τρεις θεραπευτικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνες ή σε συνδυασμό: οι τοπικοί παράγοντες (τα στεροειδή και τα μη στεροειδή), η υπεριώδης ακτινοβολία από κατάλληλα μήκη κύματος (UVR), και η συστηματική φαρμακευτική αγωγή (Menter and Griffiths, 2007).

1.2.1 Τοπική θεραπεία

Η τοπική θεραπεία παραμένει η κύρια θεραπεία για τους περισσότερους ασθενείς με ψωρίαση, ιδιαίτερα εκείνους που έχουν περιορισμένη μορφή της νόσου. Αν και είναι αποτελεσματική για μεμονωμένες πλάκες, είναι χρονοβόρα θεραπεία, και η συμμόρφωση είναι ένα σημαντικό ζήτημα.

Τοπικά κορτικοστεροειδή

Τα τοπικά κορτικοστεροειδή παραμένουν η ευρύτερα συνταγογραφούμενη θεραπεία για την ψωρίαση σε όλο τον κόσμο. Οι πιο ισχυροί παράγοντες παρέχουν ταχεία αποτελεσματικότητα και ευελιξία στην χρήση (Menter and Griffiths, 2007). Τα τοπικά κορτικοστεροειδή είναι αντιφλεγμονώδη και αγγειοσυσταλτικά και μειώνουν την διαίρεση των κερατινοκυττάρων (Page et al, 1997). Οι κυριότερες παρενέργειες σε τοπικό επίπεδο είναι: η ατροφία του δέρματος, η τελαγγειεκτασία, η εμφάνιση ραβδώσεων και πορφυρότητας και σε συστηματικό επίπεδο: το ιατρογενές σύνδρομο του Cushing και η καταστολή του υποθαλαμιακού-υποφυσιακού-επινεφριδιακού άξονα (Bruner et al, 2003).

Τα ανάλογα της βιταμίνης D

Από την εισαγωγή τους στις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι παράγοντες αυτοί έχουν γίνει πρώτης γραμμής θεραπεία για την ψωρίαση κατά πλάκας, είτε μόνοι τους ή σε συνδυασμό. Τρεις ανάλογες ενώσεις της βιταμίνης D είναι διαθέσιμες: η καλσιτριόλη (ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D) και τα συνθετικά της ανάλογα, το tacalcitol και το calcipotriol. Η βιταμίνη D₃ και τα ανάλογά της αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και επάγουν την τελική διαφοροποίηση (VAN DE KERKHOFF, 1995). Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των ενώσεων αυτών περιλαμβάνουν την αναστολή του NF-κB που οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή της IL-2 (Yu et al, 1995). Η καλσιτριόλη και η καλσιποτριόλη εμποδίζουν την παραγωγή της IL-6 και μειώνουν την αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία των κυττάρων Langerhans. Η καλσιτριόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων (Penna et al, 2000). Ο ερεθισμός του δέρματος των ψωριασικών περιοχών ή των διπλανών περιοχών από τα ανάλογα της βιταμίνης D, εκδηλώνεται ως κνησμός, κάψιμο, οίδημα, απολέπιση, ξηρότητα, ερύθημα και παρατηρείται σε ποσοστό έως το 35% των ασθενών, το οποίο φαίνεται να μειώνεται με συνεχιζόμενες θεραπείες (Bruner et al, 2003). Ένα αδιαμφισβήτητο πλεονέκτημα των αναλόγων της βιταμίνης D είναι η αξία τους στην συνδυαστική θεραπεία,

καθώς επιτρέπουν την μείωση της δόσης και της διάρκειας των άλλων αντιψωριασικών παραγόντων. Ως εκ τούτου, μπορούν να βελτιώσει την σχέση όφελους-κινδύνου για αυτές τις αγωγές (Menter and Griffiths, 2007).

Tazarotene

Το Tazarotene είναι το μόνο τοπικό ρετινοειδές (παράγωγο της βιταμίνης Α) που διατίθενται για τη θεραπεία της ψωρίασης κατά πλάκας (Weinstein et al, 2003).

Πίσσα άνθρακα

Η πίσσα άνθρακα, είναι ένα μείγμα από χιλιάδες ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της ψωρίασης για περισσότερο από ένα αιώνα. Ο ερεθισμός του δέρματος, η θυλακίτιδα, η οσμή και η χρώση των ρούχων περιορίζουν την χρήση πίσσας άνθρακα ως θεραπεία ρουτίνας σε συνδυασμό με το ογκογόνο δυναμικό που εμφανίζει (Fiala et al, 2006).

Φωτοθεραπεία

PUVA φωτοχημειοθεραπεία

Ο συνδυασμός της κατάποσης ψωραλενίου και η έκθεση στις ακτίνες UVA είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική θεραπεία για την ψωρίαση που οδηγεί σε σημαντική διάρκεια ύφεσης. Τα ψωραλένια παρεμβάλλονται στο DNA. Με την ενέργεια του UVA, τα ψωραλένια συνδέονται ομοιοπολικά με διασταυρούμενη σύνδεση νουκλεϊκών οξέων μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων της διπλής έλικας του DNA. Ο σχηματισμός αυτών των διασταυρούμενων διλειτουργικών φωτοπαραγώγων οδηγεί σε μη αναστρέψιμη φωτοαναστολή της σύνθεσης του DNA και της μίτωσης (Pathak et al, 1974). Οι παρενέργειες της υπερδοσολογίας περιλαμβάνουν ναυτία, ζάλη, κεφαλαλγία. Οι μακροπρόθεσμες παρενέργειες είναι σημαντικές και καθιστούν αναγκαίο τον περιορισμό του PUVA σε ασθενείς με εκτεταμένη και σοβαρή ψωρίαση. Μια σημαντική παρενέργεια είναι ο κνησμός, ο οποίος συνήθως μπορεί να αντιμετωπιστεί με την τοπική χρήση μαλακτικών ή χαμηλής ισχύος γλυκοκορτικοειδών. Υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης πρόωρης δερματικής γήρανσης και μη μελανωματικού δερματικού καρκίνου και πιθανού μελανώματος, ειδικά σε ανοιχτόχρωμο δέρμα (Stern and Lange 1988, Stern 2001).

UVB

Η θεραπεία με UVB, χωρίς UVA, είναι γνωστή ως επιλεκτική φωτοθεραπεία UVB (SUP), μπορεί να εκτελείται μόνη της ή κατά προτίμηση σε συνδυασμό με τοπικές θεραπείες, όπως τα γλυκοκορτικοειδή, η βιταμίνη D3 και τα ανάλογα της, η ταζαροτένη ή η anthralin. Η SUP είναι πολύ αποτελεσματική σε σταγονοειδή ψωρίαση και επίσης βελτιώνει τις βλάβες της κατά πλάκας ψωρίασης.

1.2.2 Συστηματικές θεραπείες

Η συστηματική θεραπεία αποτελεί την βάση της θεραπείας για ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή μορφή της νόσου και για εκείνους που δεν ανταποκρίνονται στους τοπικούς παράγοντες ή στην φωτοθεραπεία. Επιπλέον, οι ασθενείς μπορεί να είναι κατάλληλοι για

συστηματική θεραπεία εάν έχουν φυσικούς περιορισμούς για την τοπική θεραπεία (π.χ. ψωρίαση στο χέρι ή στο πόδι, που σχετίζεται με την ψωριασική αρθρίτιδα).

Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη, ως ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος, παρεμβαίνει στην σύνθεση των πουρινών και ως εκ τούτου αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης έχει κατασταλτική δράση στα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα. Παρά την έλευση των νέων θεραπειών, η μεθοτρεξάτη εξακολουθεί να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αντιμετώπιση της ψωρίασης και της ψωριασική αρθρίτιδας. Η μεθοτρεξάτη αναστέλλει τη σύνθεση του DNA (S φάση του κυτταρικού κύκλου), θεωρείται ότι δρα κυρίως στα ταχέως διαιρούμενα κερατινοκύτταρα της ψωριασικής βλάβης (Genestier et al 1998, Heenen 1998). Τα φυλλικό οξύ είναι μονοανθρακικός συμπαράγοντας της βιοσύνθεσης της πουρίνης και της πουριμιδίνης. Η μεθοτρεξάτη μεταφέρεται ενεργητικά, διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, εντός του κυτταροπλάσματος, όπου συνδέεται και αδρανοποιεί το διϋδροφυλλικό. Η ελεύθερη μεθοτρεξάτη συναγωνίζεται με τις αυξημένες συγκεντρώσεις του διϋδροφυλλικού για την αναστολή της αναγωγής του διϋδροφυλλικού. Ο κυτταρικός μηχανισμός είναι η μείωση της διαθεσιμότητας του θυμιδικού. Η μεθοτρεξάτη δρα στην σύνθεση της πουρίνης, όπου το 10-φορμυλ-διϋδροφυλλικό αποτελεί απαραίτητο συμπαράγοντα σε δυο στάδια για την de novo σύνθεση της πουρίνης (Page et al, 1997). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η μεθοτρεξάτη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης του 5-αμινοιμιδαζολο-4-καρβοξαμιδικού ριβονουκλεοτιδίου (AICAR), αυξάνοντας έτσι την απελευθέρωση της αδενοσίνης. Η αδενοσίνη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση, κυρίως στα ουδετερόφιλα, όπου γίνεται αναστολή της προσκόλλησης και άμεση παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Η μεθοτρεξάτη επάγει την απόπτωση στα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα και τα κερατινοκύτταρα (Genestier et al 1998, Heenen 1998). Ανθεκτικότητα στην μεθοτρεξάτη συνήθως μπορεί να εμφανιστεί λόγω μειωμένης διαμεμβρανικής μεταφοράς, μειωμένης συγγένειας της αναγωγής του διϋδροφυλλικού προς την μεθοτρεξάτη, της αυξημένης συγγένειας της αναγωγής του διϋδροφυλλικού, την μειωμένη πολυγλουταμινοποίηση λόγω της μείωσης της πολυγλουταμυλ-συνθεσίας του φυλλικού, της μειωμένης σύνθεσης του θυμιδικού (Page et al, 1997). Η θεραπεία με μεθοτρεξάτη οδηγεί σε μείωση πάνω από 75% στην κλινική βαρύτητα, όπως εκτιμάται από τον δείκτη PASI σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 60% των ασθενών (Heydendael et al, 2003). Η μεθοτρεξάτη εμφανίζει αρκετές σοβαρές παρενέργειες. Πρώτον, εξαιτίας της τερατογένεσης, η μεθοτρεξάτη αντενδείκνυται κατά την εγκυμοσύνη (Bawle et al, 1998). Με τη μακροχρόνια χρήση της μεθοτρεξάτης υπάρχει πιθανότητα πρόκλησης ηπατικής ίνωσης και κίρρωσης σε ασθενείς με ψωρίαση (Roeningk et al, 1998). Πολύ συχνά αναφέρονται ως ανεπιθύμητα αποτελέσματα η ναυτία, η ανορεξία, η κόπωση, οι πονοκέφαλοι, η νεφροτοξικότητα και η αλωπεκία. Ανάπτυξη λευκοπενίας και θρομβοπενίας δείχνει σοβαρή δυσλειτουργία του μυελού των οστών και μπορεί να είναι ένα σημάδι της υπερδοσολογίας της μεθοτρεξάτης. Η μεθοτρεξάτη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία σε συνδυασμό με την κυκλοσπορίνη (Clark et al, 1999)

Ρετινοειδή

Τα πόσιμα ρετινοειδή (ανάλογα της βιταμίνης Α) είναι συνθετικές ορμόνες που συνδέονται με πυρηνικούς υποδοχείς ρετινοειδών, μεταβάλλοντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και την διαφοροποίηση στα φυσιολογικά επίπεδα. Η αρχική τρίτη γενιά των ρετινοειδών που χρησιμοποιήθηκε για την ψωρίαση, η ετρετινάτη, αντικαταστάθηκε από φυσικό μεταβολίτη της, την ακιτρετίνη, που φάνηκε να έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα με καλύτερο φαρμακοκινητικό πρότυπο (Moy et al, 1985). Τα συστηματικά ρετινοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην θεραπεία των ερυθροδερμικών και φλυκταινωδών μορφών της ψωρίασης (Van Zander et al, 2005). Τα συστηματικά ρετινοειδή θα πρέπει να δίνονται με μεγάλη προσοχή σε γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία, λόγω της τερατογένεσης. Η συστηματική τοξικότητα των ρετινοειδών είναι παρόμοια με υπερβιταμίνωση Α. Ως εκ τούτου, εμφανίζονται βλεννογονοδερματικές παρενέργειες (π.χ. χειλίτιδα, ξηρότητα του δέρματος, επιπεφυκίτιδα, και απώλεια μαλλιών). Άλλες παρενέργειες περιλαμβάνουν την υπερλιπιδαιμία, την οστεοπόρωση, την απευαισθητοποίηση των συνδέσμων και σκελετικές ανωμαλίες. Σπάνιες παρενέργειες των ρετινοειδών περιλαμβάνουν ηπατίτιδα και ψευδοόγκο του εγκεφάλου (DiGiorganna et al 1995, Wilson et al 1988).

Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη είναι μια χρήσιμη βραχυπρόθεσμη θεραπεία για μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Heydendael et al, 2003). Πρόκειται για ένα μακροκυκλικό ανοσοκατασταλτικό που συνδέεται με την ανοσοφιλίνη και αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων, που ενεργοποιείται από την φωσφατάση της καλσινευρίνης, μπορεί επίσης να ασκήσει άμεση επίδραση στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα (Santini et al, 2001). Η κυκλοσπορίνη συνδέεται με την ανοσοφιλίνη και το προκύπτον σύμπλεγμα ενσωματώνεται κατόπιν στην καλσινευρίνη αναστέλλοντας την δραστηριότητα της ως φωσφατάσης και άρα την μετατόπιση προς τον πυρήνα ενός τμήματος του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων. Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την παραγωγή IL-2, τον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων, τη δραστηριότητα των TH-κυττάρων που ενέχονται στην παραγωγή αντισωμάτων, και την αναπαραγωγή των Tc κυττάρων. Σε αντίθεση με τη μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη δεν εμφανίζει ούτε τερατογόνο δράση ούτε μυελοκατασταλτική δράση (Raddadi et al, 1999) αλλά απαιτεί προσεκτική παρακολούθηση για νεφροτοξικότητα και υπέρταση (Lowe et al, 1996). Επιπλέον, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης μη-μελανωματικού καρκίνου του δέρματος, ειδικά σε ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως αγωγή με PUVA. Η κυκλοσπορίνη μπορεί να οδηγήσει σε θεραπεύσιμες ανωμαλίες (υπερλιπιδαιμία, υπομαγνησιαίμια και υπερκαλιαιμία), υπερτρίχωση, υπερπλασία των ούλων, γαστρεντερικές και νευρολογικές διαταραχές (Paul et al, 2003).

Βιολογικοί παράγοντες

Η κατανόηση των ανοσοποιητικών μονοπατιών, τα οποία είναι κρίσιμα για την παθογένεια της ψωρίασης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων παραγόντων, που στοχεύουν σε συγκεκριμένα βήματα των μονοπατιών. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι ανασυνδυασμένα μόρια που είναι συχνά παρόμοια ή ίδια με τις πρωτεΐνες που παράγονται από τον

άνθρωπο. Πρόκειται για πρωτεΐνες σύντηξης, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (π.χ. κυτοκίνες, ειδικούς υποδοχείς) και μονοκλωνικά αντισώματα, και είναι κοινές θεραπείες για αυτοάνοσες ασθένειες (Menter et al, 2007).

T-κυτταρικοί παράγοντες

Alefacept

Το Alefacept ήταν ο πρώτος βιολογικός παράγοντας ειδικά σχεδιασμένος και εγκεκριμένος για τη θεραπεία της ψωρίασης (το 2003, στις ΗΠΑ). Είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που προήλθε από την σύντηξη του ανθρώπινου λεμφοκυτταρικού αντιγόνου-3 με τμήματα Fc της IgG1. Αυτή συνδέεται με το μόριο CD2 στα δραστικά ή στα μνήμης T-κύτταρα, παρεμβαίνει επιλεκτικά στην λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και, ως εκ τούτου, στην T-κυτταρική ενεργοποίηση. Ένας πρόσθετος και σημαντικός μηχανισμός δράσης είναι η απόπτωση των μνήμης και δραστικών CD45RO-θετικών T κύτταρων στο δέρμα (Chamian et al 2005, Krueger et al 2004).

Efalizumab

Το Efalizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με την υπομονάδα (CD11a) του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου-1. Εκ τούτου αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και την προσκόλληση τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που αποτρέπει στα κυκλοφορούντα T-κύτταρα την είσοδο στο δέρμα. Η μόνη τοξική παρενέργεια στα όργανα φαίνεται να είναι σπάνια περιστατικά θρομβοπενίας και αιμολυτική αναιμία, γι' αυτό απαιτείται η συστηματική παρακολούθηση του αριθμού των αιμοπεταλίων (Leonardi, 2004).

TNFα αναστολείς

Etanercept

Η Etanercept, είναι μια ανθρώπινη ανασυνδυασμένη μορφή της p75 πρωτεΐνης, που είναι υποδοχέας του TNF. Η Etanercept συνδέεται με τον TNFα και β και περιορίζει τις βιολογικές δράσεις του (Yamauchi et al, 2004).

Infiximab

Το Infiximab είναι ένα χμαιοκλικό μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον TNFα και εξουδετερώνει τη δράση του (Winterfield et al, 2004).

Adalimumab

Το adalimumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο, αντι-TNFα μονοκλωνικό αντίσωμα.

1.3 Φαρμακογενετική

Φαρμακογενετική είναι η μελέτη της μεταβλητότητας στην ανταπόκριση των φαρμάκων που οφείλεται στο γενετικό υπόβαθρο. Η μελέτη του ρόλου της ποικιλότητας του γονιδιώματος στις ατομικές διαφορές στην ανταπόκριση των φαρμάκων, παρέχει την δυνατότητα να αναγνωριστεί το σωστό φάρμακο και η σωστή δόση για κάθε ασθενή.

Ακόμα κι αν οι ατομικές διαφορές για την ανταπόκριση σ' ένα φάρμακο μπορεί να προκληθούν από τις επιπτώσεις της ηλικίας, του φύλου, της μορφής μιας ασθένειας, ή τις αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα, οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν τόσο την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου όσο και την πιθανότητα μιας ανεπιθύμητης παρενέργειας (Kalow 1962, Price 1993, Weber 1997). Όταν ένα φάρμακο χορηγείται, απορροφάται και κατανέμεται στην περιοχή της δράσης, όπου αλληλεπιδρά με τους στόχους (όπως υποδοχείς και ένζυμα), μεταβολίζεται και στη συνέχεια αποβάλλεται (Wilkinson 2001). Σε κάθε μια από αυτές τις διαδικασίες θα μπορούσε να εμφανίζεται ένας κλινικά σημαντικός γενετικός πολυμορφισμός.

Ωστόσο, η φαρμακογενετική προήλθε ως αποτέλεσμα της παρατήρησης ότι υπάρχουν κλινικά σημαντικές διαφορές στο μεταβολισμό των φαρμάκων, που έχουν γενετικό υπόβαθρο. Ωστόσο, ισχύουν παρόμοιες αρχές κατά την ποικιλότητα κατά τη μεταφορά και τη διανομή των φαρμάκων και την αλληλεπίδρασή τους με τους θεραπευτικούς στόχους. Η έννοια της φαρμακογενετικής προήλθε από την κλινική παρατήρηση ότι υπάρχουν ασθενείς με πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα ή στα ούρα, ακολουθούμενη από τη συνειδητοποίηση ότι τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που οδηγούν σε αυτή την αλλαγή στην ανταπόκριση στο φάρμακο είναι κληρονομήσιμα. Όταν αργότερα εντοπίστηκαν κάποια ένζυμα μεταβολισμού, αυτή η ανακάλυψη ακολουθήθηκε από την αναγνώριση των γονιδίων που κωδικοποιούνται οι πρωτεΐνες και το DNA-πολυμορφισμό μέσα στα γονίδια που συνδέονται με το κληρονομικό χαρακτηριστικό. Σήμερα γίνεται συστηματική έρευνα για τον εντοπισμό λειτουργικά σημαντικών διαφορών σε γονίδια που επηρεάζουν την επίδραση των διαφόρων φαρμάκων (Evans and McLeod, 2003).

Η πιο συχνή μορφή γενετικής ποικιλότητας είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP), όπου ένα μόνο νουκλεοτίδιο τροποποιείται ή εξαλείφεται ή ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο εισάγεται. Εκτιμάται ότι μια τέτοια αλλαγή (ή πολυμορφισμός) εμφανίζεται κάθε 500-1000 βάσεις σε ένα γονίδιο. Τα SNPs μπορεί να εμφανιστούν εντός της κωδικής ή της μη κωδικής περιοχής του γονιδίου. Τα SNPs μέσα στην κωδική περιοχή μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στο αμινοξύ που κωδικοποιείται. Τα SNPs στη μη κωδική περιοχή μπορεί να επηρεάσουν την μεταγραφή των γονιδίων ή την σταθερότητα του mRNA (Pirmohamed et al, 2001). Η σύγκλιση της φαρμακογενετικής και της ταχείας εξέλιξης στην ανθρώπινη γενωμική έχει ως αποτέλεσμα τον τομέα της φαρμακογενωμικής, δηλαδή τη μελέτη της επιρροής της ποικιλότητας της αλληλουχίας του DNA στον μεταβολισμό του φαρμάκου. Η εξέλιξη της φαρμακογενετικής και της γονιδιωματικής δίνει την δυνατότητα για την εξατομικεύση της θεραπείας στην περίπτωση ορισμένων φαρμάκων. Καθώς η γνώση μας για γενετικές παραλλαγές σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πρόσληψη, τη διανομή, το μεταβολισμό, και την δράση των διαφόρων φαρμάκων αυξάνεται, βελτιώνεται η ικανότητα να ελεγχθεί αυτός ο πολυμορφισμός και, ως εκ τούτου, να επιλεγεί το καλύτερο φάρμακο, στην βέλτιστη δόση για κάθε ασθενή (Guttmacher and Collins, 2003)

1.3.1 Φαρμακογενετική στη μεθοτρεξάτη

Ενδοκυτταρικός μεταβολισμός της μεθοτρεξάτης:

Η μεθοτρεξάτη (MTX) εισέρχεται στο κύτταρο με ενεργή μεταφορά μέσω του μεταφορέα του φυλλικού οξέος (RFC) (Genestier et al, 2000). Η MTX εξέρχεται από το κύτταρο με αρκετούς από τους μεταφορείς τύπου ATP-binding cassette (ABC), ιδίως το ABCC1-5 και το ABCG2 (Hooijberg et al, 1999). Στο εσωτερικό του κυττάρων, η MTX υφίσταται πολυγλουταμινοποίηση με την προσθήκη δύο ομάδες γλουταμινικού οξέος. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από το ενζύμο φυλλ-πολυγλουταμική συνθετάση (FPGS). Η πολυγλουταμική μορφή δεν μεταφέρεται τόσο εύκολα στην κυτταρική μεμβράνη, και έτσι ο

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι ο μηχανισμός δράσης της MTX στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση εξαρτάται από την μεταβολή των ενδοκυττάρων επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Phillips et al, 2003), την αναστολή των των ενζύμων του μονοπατιού της πυριμιδίνης (Quemeneur et al, 2003), στην αύξηση της CD95 ευαισθησίας των κυττάρων CD45+RO (ενεργοποιημένων T κυττάρων) που οδηγεί σε αύξηση της απόπτωσης (Strauss et al, 2002), την μείωση της δραστηριότητας της μεθυλοτρανσφεράσης που σχετίζεται με την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση κάποιων ενζύμων (Winter-Vann et al, 2003) και την μείωση των νουκλεοτιδίων ή και του φολικού οξέος (Moller et al, 2002). Οι περισσότερες μελέτες περιγράφουν μια δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη επίδραση της MTX στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την επαγωγή της απόπτωσης (Phillips et al, 2003). Προτείνεται ότι η MTX επάγει την απόπτωση μόνο σε ενεργοποιημένα κύτταρα. Φαίνεται να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων όσον αφορά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα παραγωγής ROS, δεδομένου ότι η MTX βρέθηκε να είναι κυτταροτοξική σε διαφορετικό βαθμό για τις λεμφοκυτταρικές και μονοκυτταρικές κυτταρικές σειρές μετά από 24 ώρες επώασης (Herman et al, 2005). Η κυτταροτοξική δράση της MTX σε μονοκύτταρα πιστεύεται ότι οφείλεται σε διαφορετικό μηχανισμό δράσης από την παραγωγή ROS. Διατυπώθηκε η άποψη ότι μονοκύτταρα παρουσιάζουν ένα υψηλότερο επίπεδο αντιοξειδωτικών στο εσωτερικό τους, όπως η γλουταθειόνης, η οποία εμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται από τα ROS (Phillips et al, 2003). Έμμεση απόδειξη για τον μηχανισμό δράσεων της MTX στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και της απόπτωσης μέσω της αύξησης της παραγωγής ROS δίνεται από τη μελέτη του ρόλου της υπερέκφρασης της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC) (Huang et al, 2005). Η ODC είναι το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι των πολυαμινών. Η υπερέκφραση της ODC οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα πολυαμινών και σπερμίνης, οι οποίοι είναι προσδέτες ROS. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης είναι ότι η MTX αναστέλλει έμμεσα τα ένζυμα που παράγονται από τις πολυαμίνες. Κατά συνέπεια, η μειωμένη παραγωγή πολυαμινών οδηγεί σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS. Εν ολίγοις, η MTX επάγει τα ROS με ένα χρόνο-και ένα εξαρτώμενο από την συγκέντρωση τρόπο. Τα υψηλότερα επίπεδα των ROS βρέθηκαν σε ενεργά λεμφοκύτταρα και μπορούν να προκαλέσουν αποπτωτική απόκριση, ενώ στα μονοκύτταρα, μια προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μεθοτρεξάτη μπορεί να διαδραματίσει έναν ρόλο στην ομοιοστάση των T-κυττάρων μέσω άλλων μηχανισμών εκτός από την παραγωγή ROS (Strauss et al, 2002). Εν κατακλείδι, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των πολλαπλών στόχων της MTX. Τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι πιο έντονα σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, με την παραγωγή ROS ως το βασικό μηχανισμό δράσης.

Η απελευθέρωση αδενοσίνης

Υπάρχουν πολλές αναφορές που δείχνουν ότι MTX άμεσα ή έμμεσα απελευθερώνει ενδογενή αντιφλεγμονώδη αδενοσίνη (Cronstein, 2005). Η αδενοσίνη είναι μια πουρίνη που συνδέεται με τέσσερις ειδικούς υποδοχείς αδενοσίνης A1, A2A, A2β και A3. Οι

υποδοχείς αυτοί διαφέρουν στην συγγένεια για την αδενοσίνη, στην επικράτηση τους σε διαφορετικά κύτταρα και ασκούν διαφορετικές επιδράσεις στην ανοσορύθμιση (Hasko and Cronstein, 2004). Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η MTX μπορεί να ενεργεί μέσω της απελευθέρωση της αδενοσίνης. Επιπλέον, ανταγωνισμός των υποδοχέων της αδενοσίνης έδειξε ότι μειώνει την αντι-φλεγμονώδη δράση της MTX (Montesinos et al, 2000). Εκτός από τις γενετικές διαφορές στην απελευθέρωση της αδενοσίνης, οι μεταβολικές δραστηριότητες του ενζύμου που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της αδενοσίνης μπορεί να ευθύνεται για τις μειωμένες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της αδενοσίνης. Αυξημένη δραστηριότητα της ADA1 (απαμινάση της αδενοσίνης 1) μπορεί να περιορίσει τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της αδενοσίνης και στην συνέχεια της MTX (Nakamachi et al, 2003).

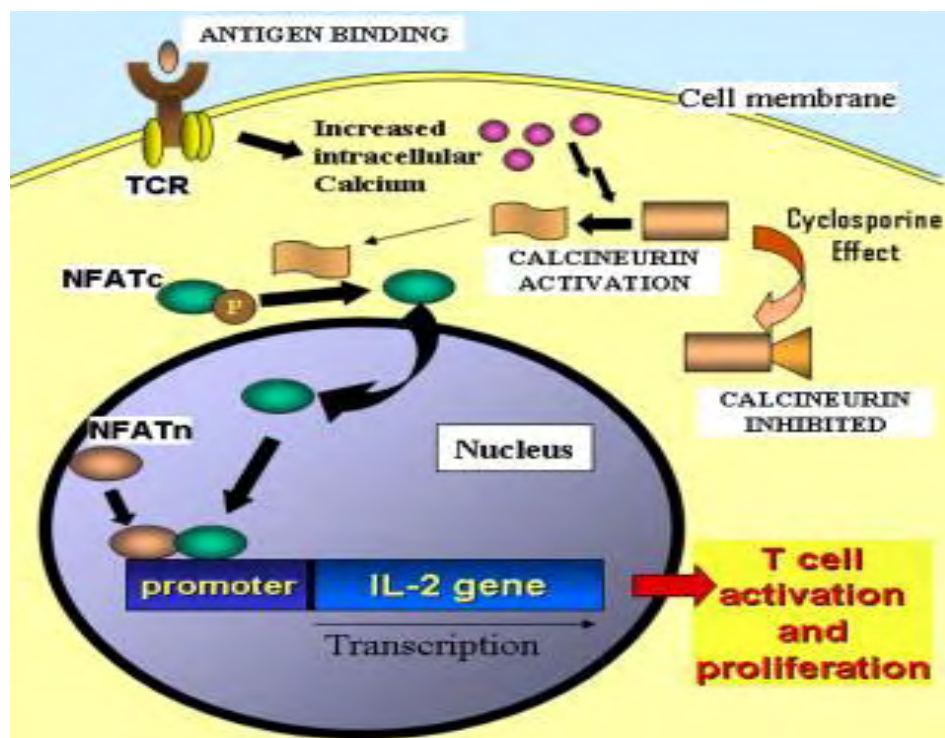
MTHFR

Το γονίδιο MTHFR είναι το καλύτερα μελετημένο μέχρι σήμερα σε σχέση με τον μεταβολισμό της MTX. Το MTHFR είναι ένα κεντρικό ρυθμιστικό ένζυμο στο μονοπάτι του φυλλικού οξέος και καταλύει τη μετατροπή του 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολικό σε 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό, το οποίο είναι συν-υπόστρωμα για την μεθυλίωση της ομοκυστεΐνης (van Ede et al, 2001). Σοβαρή ανεπάρκεια του ενζύμου MTHFR οδηγεί σε υπερομοκυστεϊναιμία με επακόλουθη ζημιά στο κεντρικό νευρικό σύστημα και το αγγειακό σύστημα (Schwahn and Rozen, 2001). Τουλάχιστον 15 πολυμορφισμοί στο γονίδιο MTHFR έχουν περιγραφεί (Rozen, 1996) αν και δεν υπάρχουν σχετικά δεδομένα για την λειτουργία όλων. Δύο μη-συνώνυμα SNPs (C677T και A1298C) έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ο πολυμορφισμός C677T οδηγεί σε αντικατάσταση της αλανίνης σε βαλίνη στο κωδικόνιο 222. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενζύμου με μειωμένη δραστηριότητα (Frosst et al, 1995). Περίπου, το 50% των Καυκάσιων φέρουν τουλάχιστον ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (Ulrich et al, 2002). Οι ετεροζυγώτες (CT) έχουν περίπου 60% ενζυμική ενεργότητα in vitro και περίπου 40% ενζυμική δραστηριότητα στους Καυκάσιους. Τα ομόζυγα άτομα με TT γονότυπο αντιστοιχούν στο 10% των Καυκάσιων και εμφανίζει μόνο το 30% της ενζυμικής δραστηριότητας των ομοζυγωτών άγριου τύπου (CC) (Ranganathan et al, 2006). Ένας δεύτερος κοινός πολυμορφισμός (A1298C) στο κωδικόνιο 429 οδηγεί στην αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη και σε μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα (Weisberg et al, 1998). Το αλληλόμορφο C έχει συχνότητα 32% στους Καυκάσιους. Είναι ενδιαφέρον, ότι οι ασθενείς που είναι ετερόζυγοι και για τα δύο SNPs (15% του πληθυσμού του Καυκάσου) είναι κλινικά παρόμοιοι με άτομα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό C677T, γεγονός που υποδηλώνει μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο SNP (Ulrich et al, 2002). Θα μπορούσε κανείς να προβλέψει ότι οι ασθενείς με μειωμένη δράση του ενζύμου MTHFR, θα ήταν πιο ευαίσθητοι στις τοξικές επιδράσεις της MTX λόγω των επιπτώσεων στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, αν και είναι πιο δύσκολο να καθοριστεί ο τρόπος που θα μπορούσαν οι πολυμορφισμοί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

1.3.2 Φαρμακογενετική στην κυκλοσπορίνη

Μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης

Η κύρια δράση της κυκλοσπορίνης είναι η καταστολή μιας T-κυτταρικής απόκρισης, κυρίως των CD4+ T-κυττάρων. Η κυκλοσπορίνη παρεμβάλλεται πρώιμα στην T-κυτταρική ενεργοποίηση, αναστέλλοντας την μεταγραφή των λεμφοκυτταροκινών από τα T-κύτταρα, όπως είναι η γ-ιντερφερόνη, ο χημειοτακτικός παράγοντας των μακροφάγων και ο ανασταλτικός παράγοντας των μακροφάγων. Η παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 από τα T-κύτταρα αναστέλλεται από την κυκλοσπορίνη. Έτσι αναστέλλεται η περαιτέρω ενεργοποίηση των T-κυττάρων (Bos et al, 1988). Ο κυτταροπλασματικός υποδοχέας για την κυκλοσπορίνη είναι μια ουβιτικουιτινιλωμένη πρωτεΐνη, η κυκλοφιλίνη, ένα ένζυμο αναγκαίο στο αναδίπλωμα των πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι η δέσμευση της κυκλοσπορίνης σε αυτό το μόριο αναστέλλει το δίπλωμα των πρωτεϊνών. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης και της μεταγραφής των γονιδίων των λεμφοκυτταροκινών (Takahashi et al, 1989). Ο στόχος του συμπλόκου κυκλοφιλίνη A-κυκλοσπορίνη A είναι η καλσινευρίνη, μια φωσφατάση σερίνης-θρεονίνης (Liu et al, 1991). Η καλσινευρίνη είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια καταλυτική και μία ρυθμιστική υπομονάδα, που ενεργοποιούνται από την καλμοδουλίνη ως απόκριση στην αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου (Klee et al, 1988). Κατά την διάρκεια της T-κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω του T-κυτταρικού υποδοχέα, η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη, αυξάνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Η καλσινευρίνη ενεργοποιείται και αποφωσφορυλώνει την κυτταροπλασματική υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται με άλλες υπομονάδες που περιέχουν Fos και Jun. Έτσι ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων της T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Το σύμπλοκο κυκλοφιλίνης A-κυκλοσπορίνης A προσδένεται και αναστέλλει την καλσινευρίνη και σταματάει την T-κυτταρική ενεργοποίηση, αποτρέποντας την εισαγωγή του NF-AT (Franz et al, 1994). Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει επίσης την έκλυση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και δρα κατασταλτικά μειώνοντας τα διάφορα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης, δίνοντας τους αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα (Mrowietz et al, 1999).



Εικόνα 1.10: Δράση της κυκλοσπορίνης στα Τ-κύτταρα. Αναστολή της δραστηριότητας της καλσινευρίνης από την κυκλοσπορίνη οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση της μεταγραφής της IL-2. TCR: Τ-κυτταρικός υποδοχέας, NFAT: πυρηνικός υποδοχέας των Τ-κυττάρων, NFATc: κυτταροπλασματικό μονομερές του NFAT, NFATn: πυρηνικό μονομερές του NFAT (Chinen and Shearer, 2010)

ABCB1

Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-gr) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην απορρόφηση και στην κατανομή των φαρμάκων στον οργανισμό, ενεργώντας ως διαμεμβρανική αντλία εκροής, συμμετέχοντας στην ενεργειακά-εξαρτώμενη εκροή των ξενοβιοτικών ουσιών από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Ο φυσιολογικός ρόλος φαίνεται να περιλαμβάνει την αποτροπή της εισόδου των δυνητικά τοξικών συστατικών από το έντερο στο αίμα και την προστασία συγκεκριμένων οργάνων, όπως ο εγκέφαλος, από ενώσεις που αποκτούν πρόσβαση στην κυκλοφορία. Η Ρ-gr ενεργεί ως ένας φραγμός της απορρόφησης των ξενοβιοτικών ουσιών στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, τα κύτταρα του ήπατος, τα νεφρικά κύτταρα της επιφάνειας του αυλού των εγγύς σωληναρίων, τα κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου, των όρχεων και των ωοθηκών, προωθώντας την απέκκριση τους στη χολή και στα ούρα. Η Ρ-gr εκφράζεται επίσης στα παγκρεατικά κύτταρα, στα επινεφρίδια, και στα λεμφοκύτταρα (Fromm et al, 2007), σε διάφορες κατηγορίες λευκών αιμοσφαιρίων, συμπεριλαμβανομένων των Τ και Β λεμφοκυττάρων και στα δενδριτικά κύτταρα. Η Ρ-gr είναι ένα σχετικά μη πολικό μόριο και εντοπίζεται στην λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η στρατηγική της θέσης επιτρέπει στην Ρ-gr να απομακρύνει μη πολικές ενώσεις ή να λειτουργήσει ως

«φλιπάση», μεταφέροντας τα μόρια των φαρμάκων από το εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στον εξωκυτταριο χώρο (Sharom et al, 2006). Η P-gr διαθέτει 2 διαμεμβρανικές περιοχές, η καθέμία με 6 διαμεμβρανικά τμήματα, και 2 περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων. Η αναγνώριση του υποστρώματος αρκετών φάρμακων συμβαίνει εντός των διαμεμβρανικών περιοχών σε πολλαπλές επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης (Ambudkar et al, 2003). Η P-γλυκοπρωτεΐνη κωδικοποιείται από το ABCB1 (adenosine triphosphate binding cassette B1) γονίδιο. Περισσότεροι από 50 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) του γονιδίου ABCB1 έχουν αναγνωρισθεί, ορισμένοι από τους οποίους έχουν συσχετιστεί με διαφορές στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών και τη λειτουργία. Οι πιο κοινοί και εκτενώς μελετημένοι SNPs περιλαμβάνουν μια αντικατάσταση C σε T στη θέση 3435 στο εξόνιο 26 (rs1045642). Μια αντικατάσταση από C σε T στη θέση 1236 στο εξόνιο 12 (rs1128503) και μια αντικατάσταση από G σε T ή A στη θέση 2677 στο εξόνιο 21 (rs20325S2) (Kroetz et al, 2003). Ο C1236T πολυμορφισμός αλλάζει το κωδικόνιο GGC σε GGT, στην αμινοξική θέση 412 του πολυπεπτιδίου, και τα δύο κωδικόνια κωδικοποιούν Gly (Kimchi-Sarfaty et al, 2007). Παρόλο που είναι ένας σιωπηλός πολυμορφισμός, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή από ένα συχνό σε ένα σπάνιο κωδικόνιο και γι' αυτό μπορεί να επιβραδύνει την ριβοσωμική κυκλοφορία στην αντίστοιχη περιοχή του mRNA. Δηλαδή, αυτή η αλλαγή μπορεί να επηρεάσει το συμμεταφραστικό μονοπάτι αναδίπλωσης της P-γλυκοπρωτεΐνης, με αποτέλεσμα μια διαφορετική τελική διαμόρφωση στο χώρο (Komar, 2006). Ο 2677 T/G/A πολυμορφισμός, αφορά την αμινοξική αντικατάσταση της Ser στην αμινοξική θέση 893 σε Ala ή Thr. Η συχνότητα εμφάνισης των ομοζυγωτών για τον 2677G πολυμορφισμό είναι μεγαλύτερη από 81% στους Αφρικάνικους πληθυσμούς, σε σχέση με τους Ινδιάνους, τους Μεξικάνους, τους Ιταλούς και τους Καυκάσιους. Ο πολυμορφισμός 2677A είναι εξαιρετικά σπάνιος (Cascorbi et al 2001, Yamauchi, 2002). Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα από έρευνες, κάποια υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του 2677T πολυμορφισμού και της αλλαγής στη δραστηριότητα και στην έκφραση της P-gr ενώ άλλα την καταρρίπτουν (Kim et al 2001, Eichelbaum et al 2004, Owen et al 2005).

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η συσχέτιση των πολυμορφισμών C677T του γονιδίου MTHFR, C1236T και G2677T του γονιδίου ABCB1, με την κλινική απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία της μεθοτρεξάτης, της κυκλοσπορίνης ή σε συνδυασμό των δυο φαρμάκων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση έγινε από κύτταρα περιφερικού αίματος 45 ασθενών με ψωρίαση, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή με κυκλοσπορίνη Α ή σε θεραπεία που περιλαμβάνει συνδυασμό και των δύο. Οι ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ψωρίαση, βάσει του κριτηρίου PASI κατά την εισαγωγή τους στην θεραπεία. Τα δείγματα δόθηκαν με έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση DNA εξαρτώνται από το πρωτογενές υλικό, την ηλικία και το μέγεθος του δείγματος. Παρά την ευρεία ποικιλία των μεθόδων που χρησιμοποιούνται, υπάρχουν κάποιες ομοιότητες μεταξύ τους. Σε γενικές γραμμές, έχουν ως στόχο να διαχωρίσουν το DNA, που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου, από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Η παρουσία των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των πολυσακχαριτών και κάποιων άλλων οργανικών και ανόργανων ενώσεων κατά την προετοιμασία του DNA μπορεί να παρέμβει στις μεθόδους ανάλυσής του, ή να μειώσουν την ποιότητα και την διάρκεια ζωής του.

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε γενωμικό DNA, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο επώασης με πρωτεϊνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Ο ρόλος των αντιδραστηρίων:

-**SSC (Standard Sodium Citrate)**: ήπιο διάλυμα.

-**Οξικό νάτριο**: κάνει τις μεμβράνες και τις διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες να καθιζάνουν.

- **SDS**: είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο αντιδρά σε χαμηλές συγκεντρώσεις με υδροφοβικές περιοχές της πρωτεΐνης, προσδένοντας κυτταρικές πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες και σχηματίζοντας σύμπλοκα. Αφαιρεί ιόντα από την πρωτεΐνη και καταστρέφει την διαμόρφωσή της. Έτσι, οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης καταστρέφονται και τα λιπιδικά συστατικά διαλύονται, συνεπώς γίνεται η λύση του κυττάρου.

- **Πρωτεϊνάση K**: είναι μια πρωτεάση σερίνης, η οποία χρησιμοποιείται σε πολλά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA για να πέψει πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες και να απελευθερώσει το DNA. Επιπλέον, επειδή μπορεί να υπάρχουν νουκλεάσες (ένζυμα που διασπούν νουκλεϊκά οξέα), η πρωτεϊνάση K διασπά αυτές τις νουκλεάσες και προστατεύει έτσι τα νουκλεϊκά οξέα. Επιπλέον, επειδή η πρωτεϊνάση K είναι σταθερή σε μεγάλο εύρος pH, είναι κατάλληλη για χρήση κατά την απομόνωση του DNA.

- **Φαινόλη/ χλωροφόρμιο:** χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από την λύση των κυττάρων. Οι πολικές φωσφορυλιωμένες ομάδες των σακχάρων του DNA προωθούν τον διαχωρισμό του DNA στην υδατική φάση ενώ τα υδρόφοβα λιπίδια διαμένουν στην οργανική φάση. Οι πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση. Το DNA συγκεντρώνεται στην υδατική στιβάδα (Borst and Miller, 1990). Γενικά η φαινόλη είναι ένας αποτελεσματικός αποδιατακτικός παράγοντας πρωτεϊνών ενώ το χλωροφόρμιο είναι περισσότερο αποτελεσματικό σε πολυσακχαρίτες.

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

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

Διαλύματα:

➤ **20x SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0):**

175,4 gr NaCl

88,2 gr Sodium Citrate

1Lt ddH₂O

Ρύθμιση του pH στο 7,0 με σταγόνες HCl

Για την παρασκευή του διαλύματος 1x SSC γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 20x SSC.

➤ **3 M Sodium acetate (Οξικό Νάτριο)**

40,81 gr sodium citrate σε

100 ml ddH₂O τελικό όγκο

Ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH₃COOH

Για την παρασκευή του διαλύματος Sodium acetate 0,2 M γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 3 M Sodium acetate.

➤ **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**

10 gr SDS τελικό όγκο

100 ml ddH₂O

Ρύθμιση του pH στο 7,2 με σταγόνες HCl

Για την παρασκευή του διαλύματος 5 % SDS γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 10% SDS.

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

24 ml χλωροφόρμιο

1 ml ισοαμυλική αλκοόλη

Διαδικασία:

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 0,5 ml δείγματος σε σωλήνα erpendorf, όπου προστίθεται 1ml 1x SSC buffer. Στη

- συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 2 min στις 12000 rpm.
2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1 ml 1x SSC buffer, γίνεται ανάδευση στην συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 2 min στις 12000 rpm.
 3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, προστίθεται 0,5 ml οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,2 M, ανάδευση σε συσκευή vortex 50 ml SDS 5% και 10 ml διαλύματος πρωτεΐνης K συγκέντρωσης 10 ng/μl. Η επώαση γίνεται στους 55^o C για 1h ενώ ταυτόχρονα τα δείγματα αναδεύονται ήπια.
 4. Προστίθεται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης [24:1], και ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm, στους 4^o C.
 5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και γίνεται προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης [24:1] και ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm, στους 4^o C.
 6. Στην συνέχεια γίνεται μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf, όπου γίνεται προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης και επώαση για τουλάχιστον 20 min στους -20^o C. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 12000 rpm, στους 4^o C για να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
 7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml κρύας αιθανόλης 70 %. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm, στους 4^o C.
 8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αποξηραίνουμε την πελλέτα στους 55^o C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
 9. Αφού στεγνώσει εντελώς, προσθέτουμε 100 μl ddH₂O στο DNA, κάνουμε ανάδευση και τα τοποθετούμε στους 55^o C για 15 min, έτσι ώστε να επαναδιαλυθεί το DNA.
 10. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20^o C.

2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

Παρασκευή πηκτής:

- Προσθέτουμε 40 ml TAE 1x και 0,3 gr αгарόζης σε κωνική φιάλη.
- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη.
- Προσθήκη 4 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και γίνεται καλή ανακίνηση.
- Στην συνέχεια χύνεται σε ειδικό καλούπι και τοποθετούνται τα χτενάκια.
- Το διάλυμα αφήνεται μέχρι να πήξει.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης:

- Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 2μl DNA (από τα 100 μl που έχουν προκύψει από την απομόνωση) μαζί με 2 μl loading buffer.
- Εφαρμόζεται τάση 150 V για 15 min περίπου.
- Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή UV.

- Το πήκτωμα φωτογραφίζεται.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase chain reaction)

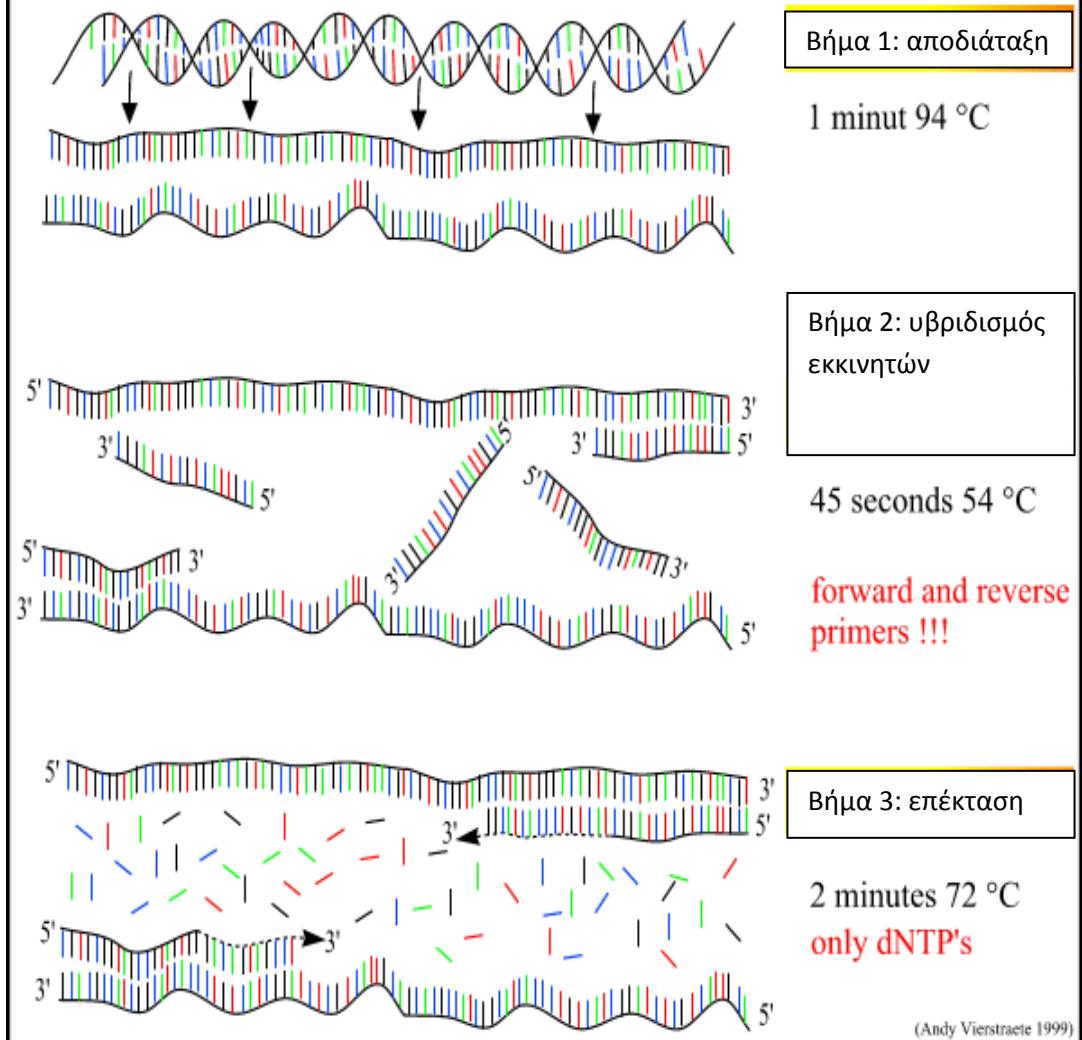
Η μέθοδος PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα το 1985 από τον εφευρέτη της Karry Mullis, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993. Σήμερα η PCR θεωρείται μια από τις πιο επαναστατικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20ου αιώνα η οποία συνέβαλε αποφασιστικά στην ευρεία εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην ιατρική έρευνα και διάγνωση. Η PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια :

1. αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (Denaturation)
2. υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing)
3. σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (primer extension).

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας την θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA γίνονται μονόκλωνοι. Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50°-65°C επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία υβριδίζονται με την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά μόνο με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηρίου (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR. Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ακόμη και μικροσκοπικών δειγμάτων, ή ελάχιστων κυττάρων (Mullis et al 1994, Αναστασιάδου και Καπράνος 1998)

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Εικόνα 2.1: Τα βήματα της PCR (Andy Vierstraete, 1999)

Συνθήκες PCR:

Για την βελτιστοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση πολλών και διαφορετικών παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος. Στην PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε για 35 φορές, με σκοπό την εκθετική αύξηση του προϊόντος.

Πίνακας 2.1: Συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων MTHFR και ABCB1

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία / Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95° C/5 min
Αποδιάταξη	95° C/45 s
Υβριδοποίηση εκκινητών	58° C/45 s
Επέκταση	72° C/1 min
Τελική επέκταση	95° C/10 min
	Διατήρηση στους 4° C

Διαδικασία PCR:

1. Παρασκευή μίγματος αντίδρασης που περιέχει PCR Buffer, MgCl₂, dH₂O, primers και την Taq πολυμεράση (Πίνακας 2.2), ανάμιξη με την πιπέτα και στιγμιαία φυγοκέντριση.
2. Προσθήκη του DNA.
3. Το μίγμα μοιράζεται ισόποσα στα tubes που περιέχουν το DNA και πραγματοποιείται στιγμιαία φυγοκέντριση.
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή.
5. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20°C.

Πίνακας 2.2: Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dH ₂ O		38,8 μl
PCR buffer(10 X) + Mg	1X	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	1 μl
dNTPs	0,8 mM	1 μl
Primer forward	1 pmol/μl	1 μl
Primer reverse	1 pmol/μl	1 μl
Taq polymerase	1 Unit	0,2 μl
DNA		2 μl (100-200 ng)
Τελικός όγκος		50 μl

Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων για κάθε πολυμορφισμό.

Πολυμορφισμός	Εκκινήτες	Μέγεθος προϊόντος
rs1801133	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' (Forward) 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (Reverse)	198 kb
rs1128503	5'-TCT TTG TCA CTT TAT CCA GC-3' (Forward) 5'-TCT CAC CAT CCC CTC TGT-3' (Reverse)	502 kb
rs2032582	5'-TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG-3' (Forward) 5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G-3'	220 kb

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μόριων του DNA ανάλογα με το μέγεθος. Επίσης είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους μορίων αγνώστου μήκους συγκρίνοντας την μετακίνησή τους σε σχέση με μόρια γνωστού μήκους. Τα μόρια DNA έχουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες σε κάθε νουκλεοτίδιο. Ως αποτέλεσμα, τα μόρια DNA και RNA κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο κατά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος. Τα μικρότερα μόρια κινούνται πιο εύκολα από τα μεγαλύτερα μόρια, έτσι ώστε τα μόρια διαφορετικού μήκους να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός γίνεται σε "ζώνες", των οποίων το πλάτος ισούται με τα πηγαδάκια όπου το αρχικό μείγμα DNA τοποθετήθηκε. Στο πηκτώμα προστίθεται η φθορίζουσα χρωστική ουσία αιθίδιο. Αυτή συνδέεται με το DNA μεταξύ των ζευγών βάσεων. Ως αποτέλεσμα, όταν το πηκτώμα φωτίζεται με υπεριώδες φως, οι περιοχές που περιέχουν DNA φθορίζουν έντονα (Harvey et al, 2000).

Οι παρακάτω παράγοντες καθορίζουν την μετακίνηση των μορίων DNA μέσω πηκτών αγαρόζης:

- **Το μοριακό βάρος του DNA.** Τα μόρια του DNA μεταναστεύουν μέσω του πηκτώματος σε ποσοστά που είναι αντιστρόφως ανάλογα με τον \log_{10} του αριθμού των ζευγών βάσεων. Τα μεγαλύτερα μόρια μεταναστεύουν πιο αργά, καθώς περνούν μέσα από τους πόρους της πηκτής λιγότερο αποτελεσματικά από ότι τα μικρότερα μόρια.
- **Η συγκέντρωση της αγαρόζης.** Ένα γραμμικό τμήμα DNA συγκεκριμένου μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικούς ρυθμούς μέσω πηκτωμάτων που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ του λογαρίθμου της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA και της συγκέντρωσης του πηκτώματος.
- **Η διαμόρφωση του DNA.** Το υπερελικωμένο κυκλικό DNA, το διακεκομένο κυκλικό, και το γραμμικό DNA μεταναστεύουν με διαφορετικούς ρυθμούς.
- **Η παρουσία των βρωμιούχου αιθιδίου.** Η παρεμβολή του βρωμιούχου αιθιδίου προκαλεί μείωση του αρνητικού φορτίου του DNA και μείωση της κινητικότητας του.
- **Η εφαρμοζόμενη τάση.** Σε χαμηλές τάσεις, η μετανάστευση των γραμμικών τμημάτων του DNA είναι ανάλογο με την τάση που εφαρμόζεται. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου αυξάνεται, η κινητικότητα των υψηλού μοριακού βάρους τμημάτων αυξάνει διαφορικά. Έτσι, το εύρος του διαχωρισμού σε πηκτές αγαρόζης μειώνεται καθώς η τάση αυξάνεται.
- **Το είδος της αγαρόζης.**
- **Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύνθεση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (Sambrook and Russel, 2001).

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%:

Διαλύματα:

➤ **50x TAE (2M Tris- acetate, 0,5 M EDTA):**

121 gr Tris base

28,5 ml Acetic acid

50 ml EDTA 0,5 M

Έως τα 500 ml ddH₂O

Για την παρασκευή διαλύματος 1x TAE αραιώνουμε το διάλυμα 50xTAE.

➤ **6x Loading buffer:**

1 ml Bromophenol blue 1% w/v

1 ml 10x TBE

5ml γλυκερόλη 100%

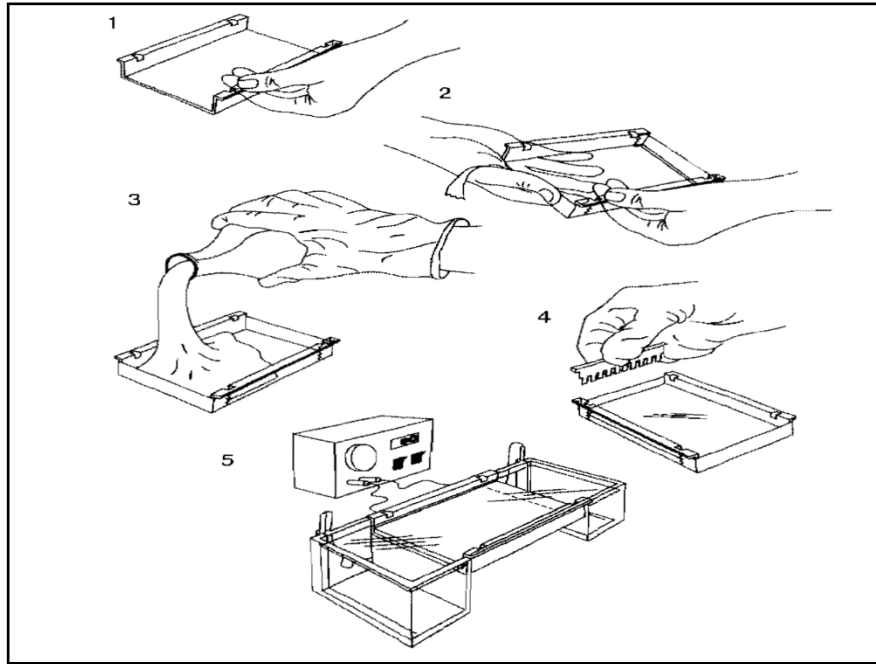
Έως τα 10 ml ddH₂O

Διαδικασία:

- Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για την παρασκευή του τζελ, τοποθετώντας ταινία στις δύο πλευρές.
- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0,6 gr αγαρόζης και 40 ml 1x TAE.
- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Προσθήκη 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και γίνεται καλή ανάδευση του διαλύματος.
- Το παρασκεύασμα χύνεται στην ειδική πλάκα και τοποθετούνται τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια της πηκτής.
- Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται να πήξει για 30 λεπτά περίπου.
- Τα χτενάκια αφαιρούνται.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση:

- Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, την οποία έχουμε γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE.
- Ανάμιξη 3μl loading buffer με 5μl προϊόν PCR και φόρτωση στα πηγαδάκια.
- Παροχή ρεύματος στα 100V. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20 λεπτά μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση μέσα στο πήκτωμα.
- Γίνεται παρατήρηση του τζελ κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και το αποτέλεσμα φωτογραφίζεται.



Εικόνα 2.2: Διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αгарόζης (Sambrook and Russel, 2001)

2.5 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Ορισμένοι πολυμορφισμοί του DNA μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα ως διαφορές στο μήκος των τμημάτων του DNA μετά από πέψη της με συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού (RFLP). Τα RFLPs μπορούν να κληρονομηθούν ως απλοί μεντελικοί συνεπικρατείς δείκτες. Τα περιοριστικά ένζυμα DNA αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και καταλύουν ενδονουκλεοτιδικές πέψεις, παράγοντας τμήματα καθορισμένου μήκους. Τα τμήματα περιορισμού, που μπορεί να ταυτοποιηθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές, διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό μέγεθός τους (Botstein et al, 1990).

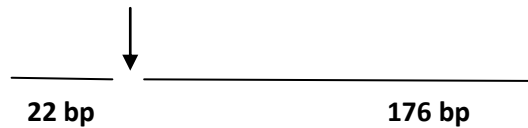
Στην παρούσα έρευνα, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση συγκεκριμένων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs). Η PCR-RFLP είναι μια κλασική και σχετικά ανέξοδη μέθοδος γονοτυπικής ανάλυσης που βασίζεται σε πέψη από ενδονουκλεάση. Ένα SNP που μεταβάλλει μια αλληλουχία περιορισμού μπορεί να υποβληθεί σε γονοτυπική ανάλυση με κανονική PCR-RFLP.

Για τον κάθε πολυμορφισμό βρέθηκε το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού με την χρήση του εργαλείου webcutter 2.0.

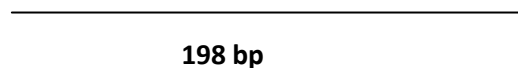
-Το ένζυμο *Hinf I* χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού **rs1801133** του γονιδίου *MTHFR*, επειδή αναγνωρίζει και κόβει στην αλληλουχία G/ANTC, όπου T ο πολυμορφισμός που μελετάμε. Επομένως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία G/ANTC και κόβει μόνο σε ένα σημείο. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν δύο τμήματα **22** bp και **176** bp. Ενώ αν στην θέση του

πολυμορφισμού υπάρχει C τότε το ένζυμο δεν αναγνωρίζει καμία αλληλουχία και το προϊόν της PCR παραμένει άκοπο με **198 bp**.

- Αν το SNP είναι T:

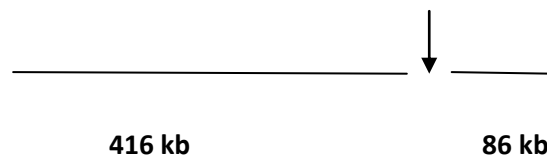


- Αν το SNP είναι C :

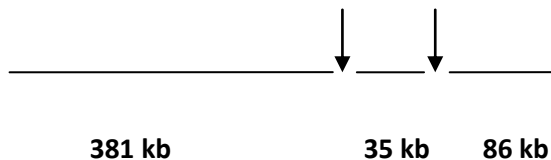


-Το ένζυμο **HaeIII** χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού **rs1128503** (ABCB1 C1236T), επειδή αναγνωρίζει και κόβει στην αλληλουχία GG/CC. Αυτή η περιοχή υπάρχει και σε άλλο σημείο στο προϊόν PCR εκτός από το σημείο πολυμορφισμού. Επομένως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία GG/CC και κόβει μόνο σε ένα σημείο. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν δύο τμήματα **416 bp** και **86 bp**. Ενώ αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει C τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία GG/CC και κόβει σε δύο σημεία. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν τρία τμήματα **381 bp**, **35 bp** και **86 bp**.

- Αν το SNP είναι T:



- Αν το SNP είναι C :

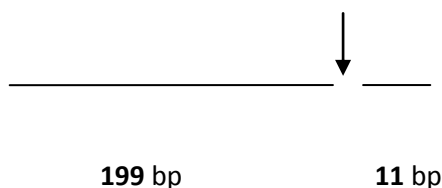


-Το ένζυμο **BanI** χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού **rs2032582** (ABCB1 G2677T), επειδή αναγνωρίζει και κόβει στην αλληλουχία G/GYRCC. Στην θέση του Υ βρίσκεται η θέση του πολυμορφισμού που μελετάμε. Επομένως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει G τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει μόνο σε ένα σημείο. Σε αυτή την περίπτωση προκύπτουν δύο τμήματα **199 bp** και **11 bp**. Ενώ αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο δεν κόβει το προϊόν της PCR, **220 bp**.

- Αν το SNP είναι T:



- Αν το SNP είναι G :



Διαδικασία RFLP :

- Για την πέψη χρησιμοποιείται συγκεκριμένη ποσότητα από το προϊόν PCR (ανάλογα την ένταση των ζωνών).
- Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα και ένζυμο και μοιράζεται στα δείγματα DNA σε τελικό όγκο 10 μl (Πίνακας 4).
- Εφαρμόζεται στιγμιαία φυγοκέντρηση και τα δείγματα επωάζονται στους 37° C ολονύχτια.

Πίνακας 2.4: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση πέψης.

Αντιδραστήρια	Πέψη με HaeIII	Πέψη με HinfI	Πέψη με BstI
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1 μl NEB4	1 μl NEB4	1 μl NEB4
Ένζυμο	0,2 μl (10 u/μl)	0,2 μl (20 u/μl)	0,2 μl (10 u/μl)
BSA (Bovine Serum Albumin)			0,1 μl
dH₂O	3,8 μl	5,8 μl	5,7 μl
Τελικός όγκος	10 μl	10 μl	10 μl

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι πιο αποτελεσματικά για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5 -500 bp). Η αναλυτική ισχύ τους είναι εξαιρετικά υψηλή, και τα τμήματα του DNA που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο 1 bp στο μήκος ή στο 0.1% της μάζας τους μπορεί να διαχωριστούν DNA σε ορισμένα πηκτώματα ακρυλαμίδης. Ωστόσο, αυτά τα πηκτώματα, έχουν το μειονέκτημα ότι προετοιμάζονται και χειρίζονται δυσκολότερα από τις πηκτές αгарόζης. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου τρέχουν σε κάθετη διαμόρφωση σε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο (Sambrook and Russel, 2001).

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8% :

Διαλύματα:

➤ **Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:**

29 gr πολυακρυλαμίδης
1 gr bis- NN-methylene ακρυλαμίδη
εώς τα 100 ml ddH₂O

• **10x TBE (890mM Tris, 890mM Boric acid, 20mM EDTA) :**

121 gr Tris base
61,7 gr Boric acid
80 ml EDTA 0,5 M
εώς τα 2 lt ddH₂O

• **APS 20% :**

2 gr Ammonium persulfate
10 ml ddH₂O

Διαδικασία:

- Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προσθέτουμε
-8 gr ουρία
-16,63 ml μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30%
-8,25 ml 10x TBE
-ddH₂O έως τα 40 ml
- Στην συνέχεια το γίνεται ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία.
- Το διάλυμα διηθείται, χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος ρυθμίζεται ddH₂O έως τα 62,5 ml.

- Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 62,5 μl TEMED και 400 μl APS.
- Τοποθετείται το χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια.
- Το διάλυμα περιχύνεται στην συσκευή όπου και πολυμερίζεται για περίπου 45 λεπτά.
- Αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται προσεχτικά τα πηγαδάκια από υπολείμματα της πηκτής.

Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης στην πηκτή πολυακρυλαμίδης

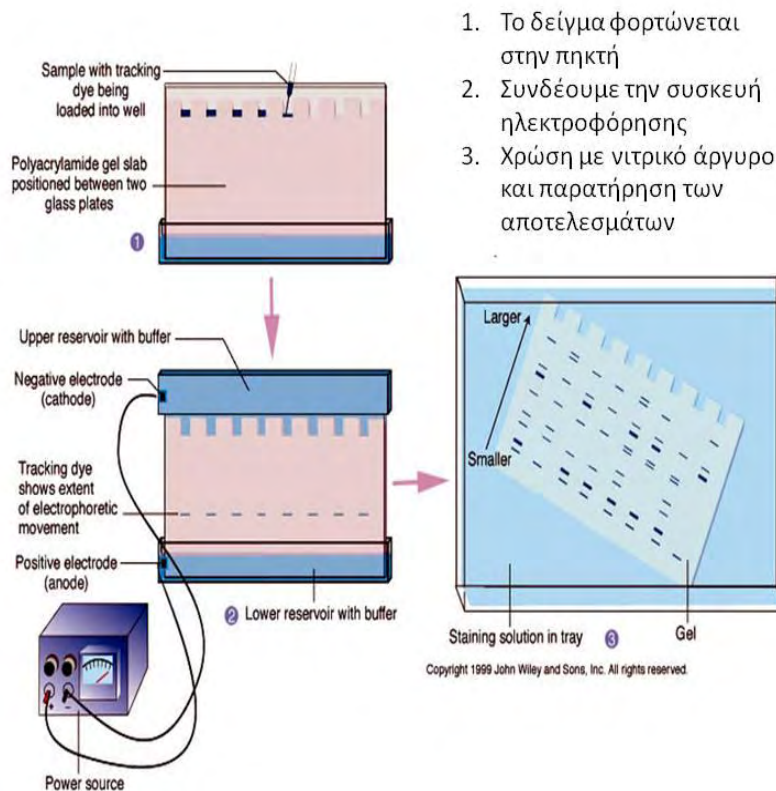
- Τοποθετούμε την πηκτή σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Γεμίζουμε με 1x TBE την συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Τοποθετούμε τα προϊόντα της πέψης (10 μl) μαζί με 5 μl loading buffer στα πηγαδάκια.
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, για 2 h και 30 min με τάση 200 Volts.

Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική για την μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηκτές πολυακρυλαμίδης. Η διακριτική ικανότητα είναι <1.0 ng DNA (Sambrook et al, 2001).

Διαλύματα

- **Διάλυμα Α:**
10 ml αιθανόλη 100%
0,5 ml οξικό οξύ 99%
Ως τα 400 ml ddH₂O
- **Διάλυμα Β (διάλυμα νιτρικού αργύρου)**
200 ml ddH₂O
0,2 gr AgNO₃
- **Διάλυμα Γ:**
3 gr NaOH
0,01 gr NaBH₄
1 ml φορμαλδεΐδη
Έως τα 200 ml ddH₂O



1. Το δείγμα φορτώνεται στην πηκτή
2. Συνδέουμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης
3. Χρώση με νιτρικό άργυρο και παρατήρηση των αποτελεσμάτων

Εικόνα 2.3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (John Wiley and sons, 1999).

Διαδικασία

- Οι πηκτές επωάζονται δύο φορές με το διάλυμα Α για 3 min ενώ συγχρόνως αναδεύονται. Στην συνέχεια γίνεται πλύση με απεσταγμένο νερό για 1 min.
- Γίνεται επώαση με το διάλυμα Β με ταυτόχρονη ανάδευση για 15 min. Ακολουθούν δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό (κάθε πλύση έχει διάρκεια 1 min).
- Τέλος γίνεται επώαση με το διάλυμα Γ υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA (περίπου 20 min) .
- Παρατήρηση της πηκτής σε φώς και καταγραφή των αποτελεσμάτων.

2.7 Στατιστική ανάλυση

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

Η μεταβολή στον δείκτη PASI των ασθενών $\geq 75\%$ θεωρήθηκε ως θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή με κυκλοσπορίνη. Αντίθετα η μεταβολή στις τιμές του δείκτη PASI $\leq 50\%$ υποδείκνυε τη μη ανταπόκριση του ασθενή στη θεραπεία. Βάσει αυτού του

κριτηρίου, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες (Responders) και μη ανταποκριθέντες (Non-responders).

Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Για όλους τους πολυμορφισμούς οι πληθυσμοί των ασθενών με θετική ή αρνητική ανταπόκριση, στους 3 μήνες θεραπείας 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 επικρατή δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher’s exact τεστ και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA).

3. Αποτελέσματα- Συζήτηση

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 45 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με μεθοτρεξάτη ή με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες. Μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί C1236T (rs1128503) και G2677T (rs2032582) του γονιδίου ABCB1 και C677T (rs1801133) του γονιδίου MTHFR.

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

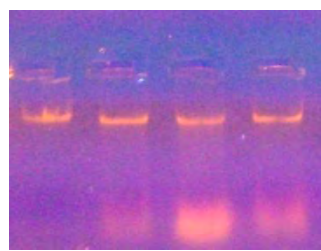
Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος±ΤΑ*	43.14±11.47
Φύλο Α/Θ	24/21
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος±ΤΑ*	8.3±5.2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος±ΤΑ*	35.4±12.6
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	18/45 (40%)
Αρχικό PASI, μέσος±ΤΑ*	15.67±6.34
PASI στους 3 μήνες, μέσος±ΤΑ*	8.56±5.88
Θεραπεία	
Κυκλοσπορίνη	20/45 (Ανταποκριθέντες: 44.4%)
Μεθοτρεξάτη	12/25 (Ανταποκριθέντες: 48%)

ΤΑ: Τυπική απόκλιση

Από τον πίνακα 3.1 φαίνεται ότι από τους 45 ψωριασικούς ασθενείς, οι 24 είναι άντρες και οι 21 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια κατανομή. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 43 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 35 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 8 έτη. Στο 40% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση με άλλες ασθένειες, η επονομαζόμενη συν-νοσηρότητα, με το μεγαλύτερο ποσοστό να εκδηλώνει καρδιαγγειακές παθήσεις.

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

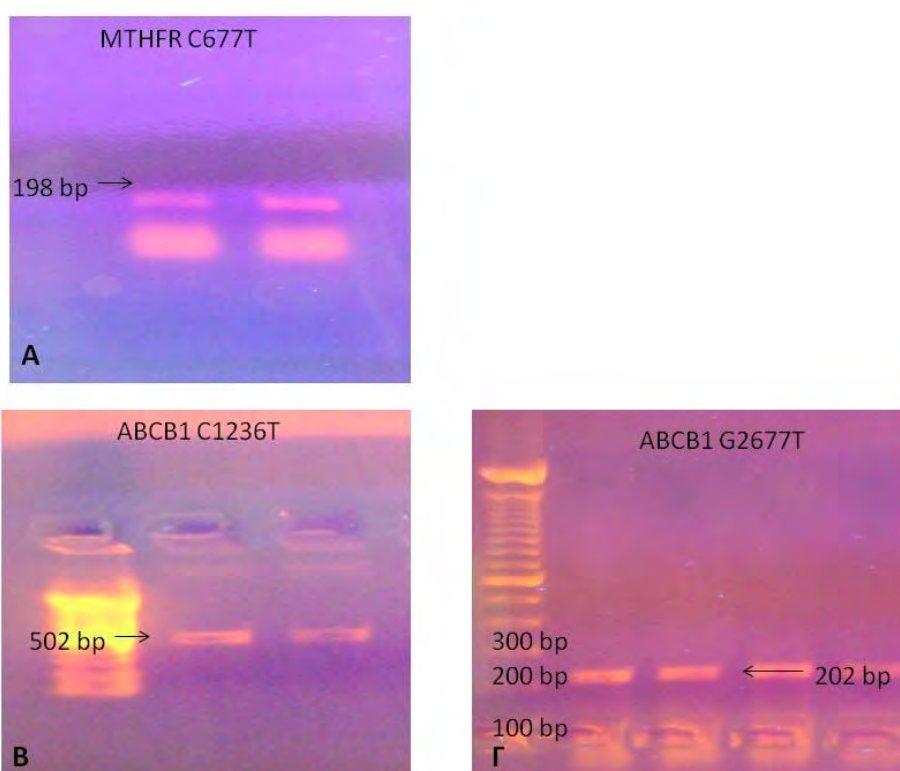
Από όλους τους ασθενείς με ψωρίαση απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι έντονες ζώνες που φαίνονται κάτω από τα πηγαδάκια απεικονίζουν το γενωμικό DNA (εικόνα 3.1). Τα δείγματα που εμφανίζουν ευκρινείς ζώνες μεγάλου μοριακού μεγέθους, έχουν ικανοποιητική ποσότητα και ποιότητα DNA για να γίνει η γονοτύπηση τους .



Εικόνα 3.1: Έλεγχος του απομονωμένου γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 Ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων *ABCB1* και *MTHFR* με PCR

Τα τμήματα των γονιδίων *ABCB1* και *MTHFR*, τα οποία περιέχουν τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, ενισχύθηκαν με την μέθοδο PCR. Για τον πολυμορφισμό C677T (rs1801133) του γονιδίου *MTHFR*, ενισχύθηκε τμήμα 198 bp (εικόνα 3.2, A). Για τον πολυμορφισμό C1236T του γονιδίου *ABCB1* (rs1128503) ενισχύθηκε τμήμα 502 bp (εικόνα 3.2, B), ενώ για τον πολυμορφισμό G2677T του γονιδίου *ABCB1* (rs1801133) ενισχύθηκε τμήμα 220 bp (εικόνα 3.2, Γ). Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, χρησιμοποιώντας 5 μl από τα 50μl της αντίδρασης. Επίσης ελέγχθηκε η εμφάνιση τυχόν επιμολύνσεων με την χρήση αρνητικού δείγματος. Το μέγεθος των προϊόντων διαπιστώθηκε συγκρίνοντάς τα με ειδικό ladder.



Εικόνα 3.2: Διαχωρισμός των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης του τμήματος που ενισχύθηκε για τον πολυμορφισμό: A) C677T του γονιδίου *MTHFR* (rs1801133, 198 bp), B) C1236T του γονιδίου *ABCB1* (rs1128503, 502 bp) και Γ) G2677T του γονιδίου *ABCB1* (rs1801133, 220bp).

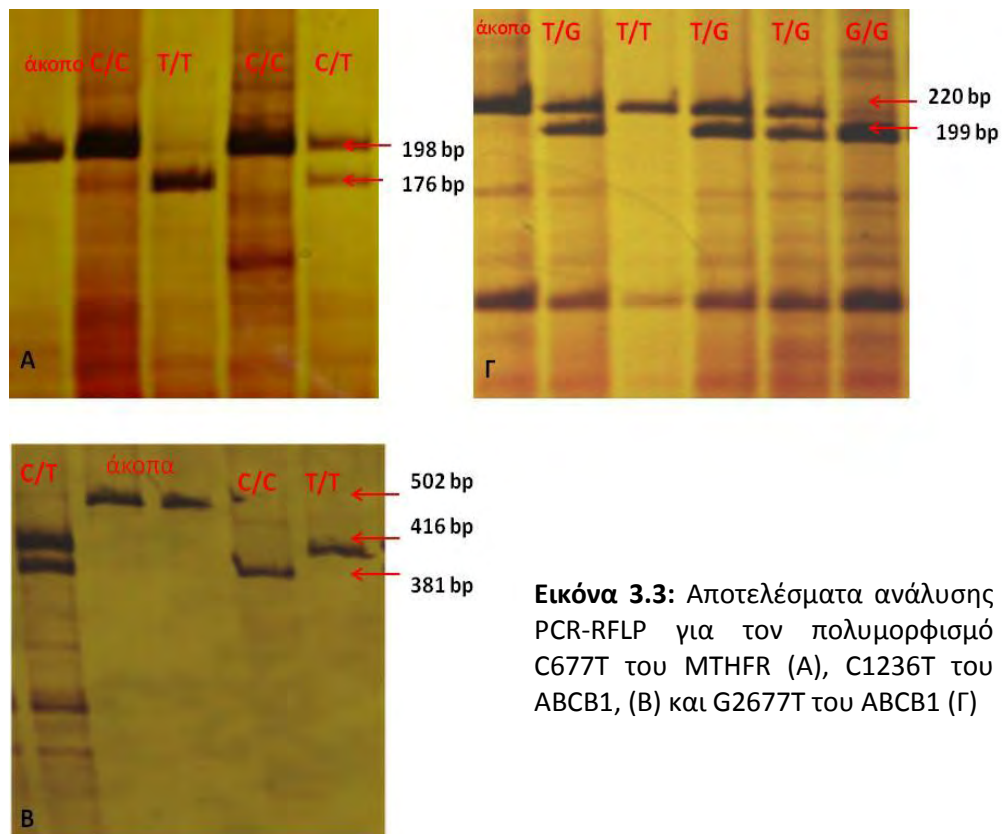
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων των ασθενών έγινε την μέθοδο RFLP. Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP φαίνονται στην εικόνα 3.3 A, B και Γ. Συγκεκριμένα, φαίνεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της πέψης, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο.

Στα προϊόντα PCR του γονιδίου *MTHFR*, έγινε πέψη με το ένζυμο *Hinf I*. Από αυτή την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο T, προκύπτουν δύο τμήματα 22 bp και 176 bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (TT), ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (CC), και ετερόζυγων ατόμων (TC). Στην πηκτή, τα άτομα με γονότυπο CC εμφανίζουν μια ζώνη με μήκος 196 bp, τα άτομα με γονότυπο TC εμφανίζουν δύο ζώνες με μήκους 176 bp και μια 196 bp και τα άτομα με γονότυπο TT εμφανίζουν μια ζώνη μήκους 176 bp (εικόνα 3.3, Α).

Στα προϊόντα PCR για τη μελέτη του πολυμορφισμού C1236T του γονιδίου *ABCB1*, έγινε πέψη με το ένζυμο *Hae III*. Από αυτή την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτουν τρία τμήματα 381 bp, 35 bp και 86 bp, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο T προκύπτουν δύο τμήματα 416 bp και 86 bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (CC), ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (TT), και ετερόζυγων ατόμων (TC). Στην πηκτή τα άτομα CC εμφανίζουν μια ζώνη με μήκος 381 bp (οι μικρότερες δεν φαίνονται), τα άτομα TC εμφανίζουν δύο ζώνες, μια μήκους 416 bp και μία 381 bp, ενώ τα άτομα TT εμφανίζουν μια ζώνη μήκους 416 bp (εικόνα 3.3, Β).

Στα προϊόντα PCR για τη μελέτη του πολυμορφισμού G2677T του γονιδίου *ABCB1*, έγινε πέψη με το ένζυμο *BanI*. Από αυτή την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο G προκύπτουν δύο τμήματα 199 bp και 11 bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (GG), ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (TT), και ετερόζυγων ατόμων (GT). Στην πηκτή τα άτομα GG εμφανίζουν μια ζώνη με μήκος 199 bp, τα άτομα GT εμφανίζουν δύο ζώνες, μια μήκους 220 bp και μια 199 bp, και τα άτομα TT εμφανίζουν μια ζώνη μήκους 220 bp (εικόνα 3.3, Γ). Επίσης τα άτομα ελέγχθηκαν με το ένζυμο *KpnI* για την ύπαρξη του σπάνιου πολυμορφισμού A αλλά δεν βρέθηκε κανένα άτομο με αυτόν στο γονότυπο.



Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό C677T του MTHFR (A), C1236T του ABCB1, (B) και G2677T του ABCB1 (Γ)

Συνδυαστικά, όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης και για τους τρεις πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, παρατίθενται στον Πίνακα 3.2

Πίνακας 3.2: Γονότυποι των 45 ασθενών για τον πολυμορφισμό C677T του MTHFR (rs 1801133), C1236T του ABCB1 (rs1128503) και G2677T του ABCB1 (rs2032582).

Κωδικός δείγματος DNA	Γονότυπος C677T	Γονότυπος C1236T	Γονότυπος G2677T
1Θ	C/T	C/C	T/G
2Θ	C/T	C/C	T/G
3Θ	C/C	C/T	T/G
4Θ	C/C	C/T	T/G
5Θ	C/T	C/T	T/G
6Θ	C/C	C/C	T/G
7Θ	C/T	C/T	T/G
8Θ	C/T	C/C	T/T
9Θ	C/T	C/T	T/G
10Θ	T/T	T/T	T/T
11Θ	C/C	C/T	G/G
12Θ	C/C	C/T	G/G
13Θ	C/T	C/C	G/G
14Θ	T/T	C/C	G/G
15Θ	C/T	C/T	T/G
16Θ	T/T	C/T	T/G
17P	C/C	C/T	T/T
18P	C/C	T/T	T/T
19P	T/T	T/T	T/T
20P	C/C	T/T	T/G
21P	C/T	C/T	T/G
22P	C/C	C/T	T/T
23P	C/C	C/T	T/T
24P	T/T	C/C	T/G
25P	C/T	C/C	G/G
26P	C/T	C/T	T/G
27P	C/C	C/C	G/G
28P	C/T	C/C	G/G
29P	C/T	C/C	T/G
30P	T/T	C/C	G/G
31P	C/C	C/C	G/G
32P	C/C	T/T	T/T
33P	C/C	C/T	T/G
34P	C/C	C/T	T/G
35P	C/T	C/C	T/G
36P	C/T	C/C	G/G
37P	C/C	C/C	G/G
38P	C/T	C/C	G/G
39P	C/C	C/C	G/G
40P	C/T	C/C	G/G
41P	C/C	T/T	T/T
42P	T/T	C/C	G/G
43P	T/T	C/T	T/G
44P	C/T	C/C	G/G
45P	C/T	C/T	T/G

3.5 Στατιστική ανάλυση

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για κάθε πολυμορφισμό ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.7). Τα αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων ABCB1 και MTHFR αντίστοιχα, φαίνονται στους Πίνακες 3.3 και 3.4.

Πίνακας 3.3: Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και αποτελεσμάτων θεραπείας με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες (n=45)

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
ABCB1 C1236T (rs1128503)	Genotypic [CC/CT/TT]	8/8/4	13/10/2	0.259
	Cochran-Armitage [C/T]	24/16	36/14	0.265
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	16/4	23/2	0.383
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	8/12	13/12	0.550
ABCB1 G2677T (rs2032582)	Genotypic [GG/GT/TT]	7/8/5	9/12/3	0.627
	Cochran-Armitage [G/T]	11/9	15/9	0.760
	Επικρατών [(GG+GT)/TT]	15/5	21/5	0.726
	Υπολειπόμενο [GG/(GT+TT)]	8/12	13/12	0.550

Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης του γονοτύπου στους ασθενείς για τους μελετώμενους πολυμορφισμούς. Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ως μη στατιστικά σημαντική την εμφάνιση του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού C1236T του γονιδίου ABCB1 με την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ανταπόκριση (P=0.265). Επιπλέον, μη στατιστικά σημαντική είναι η εμφάνιση ομόζυγων ασθενών CC (P=0.550) και TT (P=0.383) σε σχέση με την ανταπόκριση στην θεραπεία. Επίσης μη στατιστικά σημαντική είναι η εμφάνιση του αλληλομόρφου T του

πολυμορφισμού G2677T του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ανταπόκριση ($P=0.760$). Τέλος, μη στατιστικά σημαντική είναι η εμφάνιση ομόζυγων ασθενών GG ($P=0.550$) και TT ($P=0.760$) σε σχέση με την ανταπόκριση στην θεραπεία.

Από την στατιστική ανάλυση της παρούσας έρευνας, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση των πολυμορφισμών C1236T και G2677T του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ωστόσο, επειδή το δείγμα των ασθενών είναι σχετικά μικρό και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα με παρόμοιες μελέτες, θα μπορούσε να γίνει η περαιτέρω διερεύνηση αυτής της συσχέτισης σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ασθενών ώστε να οδηγηθούμε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Πίνακας 3.4: Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και αποτελεσμάτων θεραπείας με μεθοτρεξάτη για 3 μήνες ($n=25$)

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες (PASI >75%)	Μη-ανταποκριθέντες (PASI <50%)	P
MTHFR C677T (rs1801133)	Genotypic [CC/CT/TT]	6/5/1	7/6/0	0.459
	Cochran-Armitage [C/T]	17/7	17/3	0.305
	Επικρατών [(CC+CT)/TT]	11/1	13/0	0.480
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	6/6	7/6	0.992

Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης του γονοτύπου στους ασθενείς για τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου *MTHFR*. Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ως μη στατιστικά σημαντική την εμφάνιση του αλληλομόρφου T του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου *MTHFR* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με μεθοτρεξάτη, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ανταπόκριση ($P=0.305$). Επιπλέον, μη στατιστικά σημαντική είναι η εμφάνιση ομόζυγων ασθενών CC ($P=0.992$) και TT ($P=0.480$) σε σχέση με την ανταπόκριση στην θεραπεία.

Από την στατιστική ανάλυση της παρούσας έρευνας, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου *MTHFR* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με μεθοτρεξάτη. Την άποψη αυτή ενισχύει, προηγούμενη έρευνα που διεξήχθη από τους Warren *et al* (2009) σε 374 ασθενείς και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Οπότε θεωρούμε ότι δεν χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

3.6 Συμπεράσματα

- Δεν ταυτοποιήθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου *MTHFR* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με μεθοτρεξάτη.
- Δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών C1236T και G2677T του γονιδίου *ABCB1* με την ανταπόκριση στην θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ωστόσο, επειδή το δείγμα των ασθενών είναι σχετικά μικρό, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

Βιβλιογραφία

1. Αναστασιάδου Κ, Καπράνος Ν. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. 1998. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 12:100-108
2. Allen M., Ishida-Yamamoto A., McGrath J., Davison S., Iizuka H., Simon M., Guerrin M., Hayday A., Vaughan R., Serre G., Trembath R. and Barke J., 2001, Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders, *Lab. Invest.* 81: 969–976.
3. Ambudkar SV., Kimchi-Sarfaty C., Sauna ZE. and Gottesman MM., 2003, P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene* 22: 7468-7485.
4. Asumalahti K., Ameen M., Suomela S., Hagforsen E., Michaelsson G., Evans J. et al., 2003, Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis, *J Invest Dermatol.* 120:627–32.
5. Asumalahti K., Laitinen T., Itkonen-Vatjus R., Lokki ML., Suomela S., Snellman E., Saarialho-Kere U., Kere J., 2000, A candidate gene for psoriasis near HLA-C, HCR (Pg8), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele, *Hum. Mol. Genet.* 9 (10): 1533–42.
6. Asumalahti K., Veal C., Laitinen T., Suomela S., Allen M., Elomaa O., Moser M., Cid R., Ripatti S., Vorechovsky I., Marcusson Jan A., Nakagawa H., Lazaro C., Xavier E., Capon F., Giuseppe N., 2002, The Psoriasis Consortium, Saarialho-Kere Ulpu, Barker Jonathan, Trembath Richard and Kere Juha. Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus, *Hum. Mol. Genet.* 11: 589–597.
7. Baker BS., Garioch JJ., Hardman C., Powles A., Fry L., 1997, Induction of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression by group A streptococcal antigens in psoriasis, *Arch. Dermatol.* 289:671-6.
8. Bawle EV., Conard JV., Wiess L., 1998, Adult and two children with fetal methotrexate syndrome, *Teratology* 57: 51–55.
9. Bhalerao J. and Bowcock A., 1998, The genetics of psoriasis : a complex disorder of the skin and immune system, *Hum. Mol. Genet.* 7:1537–1545.
10. Bos JD., 1998, The pathomechanisms of psoriasis; the skin immune system and cyclosporine. *Br J Dermatol.* 118:141–55.
11. Bos JD., 1988, The pathomechanisms of psoriasis; the skin immune system and cyclosporine, *Br. J. Dermatol.* 141–55.
12. Both H., Essink-Bot ML., Busschbach J., Nijsten T., 2007, Critical review of generic and dermatology-specific health-related quality of life instruments, *J. Invest. Dermatol.* 127:2726–2739.
13. Botstein, D., White R.L., Skolnick M. and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* 32:314-331.
14. Borst M., Miller D., DNA isolation and Southern analysis: a clinician's view. 1990. *Am J Med Sci*;299:356-60
15. Bowcock AM., 2004, Psoriasis genetics: the way forward, *J. Invest. Dermatol.* 122, xv–xvii.
16. Brandrup F., Hauge M., Henningsen K. and Erikse B., 1978, Psoriasis in an unselected series of twins, *Arch. Dermatol.* 114:874–878.
17. Brandrup, F., Holm N., Grunnet, N., Henningsen, K. and Hansen HE., 1982, Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution, *Acta Derm. Venereol.* 62:229–236.

18. Bromley S K., Burack WR., Johnson KG., Somersalo K., Sims TN., Sumen C., Davis MM., Shaw AS., Allen PM. and Dustin ML., 2001, The immunological synapse, *Annu.Rev. Immunol.* 19: 375–396.
19. Bruner CR., Feldman SR., Ventrapragada M., Fleischer AB Jr., 2003, A systematic review of adverse effects associated with topical treatments for psoriasis. *Dermatol Online J.* 9: 2.
20. Burch PR., Rowell NR., 1981, Mode of inheritance in psoriasis, *Arch. Dermatol.* 117:251–2.
21. Capon F., Helms C., Veal C D., Tillman D., Burden A D., Barker JN., Bowcock AM., Trembath RC., 2004, Genetic analysis of PSORS2 markers in a UK dataset supports the association between RAPTOR SNPs and familial psoriasis, *J. Med. Genet.* 41:459–460.
22. Capon F., Novelli G., Semprini S., Clementi M., Nudo M., Vultaggio P., Mazzanti C., Gobello T., Botta A., Fabrizi G., Dallapiccola B., 1999, Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1, *J. Invest. Dermatol.* 112:32–35.
23. Carlin CS., Feldman SR., Krueger JG., Menter A., Krueger GG., 2004, A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 50:859–66.
24. Cascorbi I., Gerloff T., Johne A., Meisel C., Hoffmeyer S., Schwab M., Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U., Roots I., (2001) Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.*69:169–174
25. Chamian F., Lowes MA., Lin SL. et al., 2005, Alefacept reduces infiltrating T cells and activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2075–80.
26. Chinen J., William TS., 2010, Secondary immunodeficiencies, including HIV infection, *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl. 2):S195-203.
27. Committee for medicinal products for human use. Guidelines on clinical investigation of medicinal products for the treatment of psoriatic arthritis. European Medicines Agency, Emea, 2005; 1–10
28. Convit J., 1962, Investigation of the incidence of psoriasis amongst Latin-American Indians, In: *Proceedings of 13th Congress on Dermatology.* Amsterdam: Excerpta Medica 196.
29. Farber EM., Nall LM., 1974, The natural history of psoriasis in 5600 patients, *Dermatologica* 148:1–18.
30. Cronstein BN., 1997, The mechanism of action of methotrexate, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 23:739–55.
31. Cronstein BN., 2005, Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis, *Pharmacol. Rev.* 57:163–72.
32. Clark CM., Kirby B., Morris AD., Davison S., Zaki I., Emerson R., Saihan EM., Chalmers RJ., Barker JN., Allen BR., Griffiths CE., 1999, Combination treatment with methotrexate and cyclosporin for severe recalcitrant psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 141(2):279–82.
33. De Heller-Milev M., Huber M., Panizzon R. and Hohl D., 2000, Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases, *Br. J. Dermatol.* 143:733–740.
34. Duffy D L., Spelman LS. and Martin N G.,1193, Psoriasis in Australian twins, *J. Am. Acad. Dermatol.* 29: 428–434.

35. DiGiovanna JJ., Sollitto RB., Abangan DL., Steinberg SM., Reynolds JC., 1995, Osteoporosis is a toxic effect of long-term etretinate therapy, *Arch. Dermatol.* 131:1263–67.
36. Eckert R L., Broome AM., Ruse M., Robinson N., Ryan D., Lee K., 2004, S100 proteins in the epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 123:23–33.
37. Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. (2004) *Ther Drug Monit.*;26:180–185
38. Elomaa O., Majuri I., Suomela S., Asumalahti K., Jiao H., Mirzaei Z., Rozell B., Dahlman-Wright K., Pispá J., Juha Kere and Saarialho-Kere U., 2004, Transgenic mouse models support HCR as an effector gene in the PSORS1 locus, *Hum. Mol. Genet.* 13:1551–1561.
39. Emedicine.com [Internet]. Lui H, Mamelak AJ. Psoriasis, plaque. 2007. [cited 2007 Jul 22]. Available from: <http://www.emedicine.com/derm/topic365.htm>.
40. Evans WE., McLeod HL., 2003, Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects, *N. Engl. J. Med.* 348:538-49.
41. Ferrandiz C., Pujol RM., Garcia-Patos V., Bordas X., Smandia JA., 2002, Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain, *J. Am. Acad. Dermatol.* 46:867–73.
42. Franz B., Norby EC., Bren G., Steffen N., Paya CV., Kincaid RL., Tocci MJ., O’Keefe SJ., O’Neill E A., 1994, Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF- κ B, *EMBO J.* 13:861–870.
43. Freedberg M I., Eisen ZA., Wolff K., Austen F., Goldsmith AL., Katz S. et al., 2003, *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, (6th ed.), McGraw-Hill. ISBN 0-07-138076-0
44. Freeman W., Mullis K., Ferre F., Gibbs R., 1994, *The polymerase chain reaction.* Birkhauser, Boston
45. Frosst P., Blom HJ., Milos R., et al., 1995, A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, *Nat. Genet.* 10:111–3.
46. Finlay AY., 2005, Current severe psoriasis, the rule of tens, *Br. J. Dermatol.* 152:861–867.
47. Genestier L., Paillet R., Fournel S., Ferraro C., Miossec P., Revillard J., 1998, Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells, *J. Clin. Invest.* 102:322-8.
48. Genestier L., Paillet R., Quemeneur L., Izeradjene K., Revillard JP., 2000, Mechanisms of action of methotrexate, *Immunopharmacology* 47:247–57.
49. Gisler SM., Pribanic S., Bacic D., Forrer P., Gantenbein A., Sabourin LA., Tsuji A., Zhao ZS., Manser E., Biber J., Murer H.. 2003, PDZK1: I. A major scaffold in brush borders of proximal tubular cells, *Kidney Int.* 64:1733–1745.
50. Green AC. , 1984, Australian Aborigines and psoriasis, *Australas J. Dermatol.* 25:18–24.
51. Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Carroll S, 2008, *Introduction to Genetic Analysis*, New York, 9th edition
52. Griffiths CE., Barker JN., 2007, Pathogenesis and clinical features of psoriasis, *Lancet* 370: 263–271.
53. Griffiths Christopher E M, Barker Jonathan N W N Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007;370(9583):263-71.
54. Guttmacher AE, Collins FS, Inheritance and Drug Response, *N Engl J Med*, 2003;348(6):529–37.
55. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33–9.

56. Hebert SC., Mount DB. and Gamba G., 2004, Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family, *Pflugers Arch.* 447:580–593.
57. Heenen M., Laporte M., Noel JC. and de Graef C., 1998, Methotrexate induces apoptotic cell death in human keratinocytes, *Arch. Dermatol. Res.* 290:240.
58. Henseler T., Christophers E., 1985, Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.* 13:450–6.
59. Herman S., Zurgil N., Deutsch M., 2005, Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines, *Inflamm. Res.* 54:273–8.
60. Hewett D., Samuelsson L., Poldinga J., Enlundb F., Smarta D., Cantonea K., See CG., Chadhaa S., Inerotc A., Enerbackb C., Montgomerya D., Christodolou C., Robinson P., Matthews P. , Plumpton M., Dykes C., Wahlstromb J., Swanbeck G., Martinsson T., Roses A., Rileya J., Purvisa I., 2002, Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map, *Genomics* 79:305–314.
61. Huang CC., Hsu PC., Hung YC., Liao YF., Liu CC., Hour CT., Kao MC., Tsay GJ., Hung HC., Liu GY., 2005, Ornithine decarboxylase prevents methotrexate induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production, *Apoptosis* 10:895–907.
62. Itoh K., Sakakibara M., Yamasaki S., Takeuchi A., Arase H., Miyazaki M., Nakajima N., Okada M. and Saito T., 2002, Negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp–EBP50–ERM assembly, *J. Immunol.* 168: 541–544.
63. Jacobson CC., Kimball AB., 2004, Rethinking the psoriasis area and severity index: the impact of area should be increased, *Br. J. Dermatol.* 151:381-7.
64. Kalow W., 1962, *Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs*, Philadelphia: W.B. Saunders.
65. Kim R., Leake B., Choo E., Dresser G., Kubba S., Schwarz U., Xie H., McKinsey J., Zhou S., Lan L., Schuetz J., Schuetz E., Wilkinson G., Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. (2001) *Clin Pharmacol Ther.* 70:189–199.
66. Kim DH., Sarbassov DD., Ali SM., King JE., Latek RR., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini DM., 2002, mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery, *Cell* 110:163–175.
67. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, Kim IW, Jones A, Arora M, Gribar J, Gurwitz D, Gottesman MM Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics.* 2007 Jan;8(1):29-39.
68. Klee CB., Draetta GF., Hubbard MJ., 1988, Calcineurin, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 61:149–200.
69. Komar AA. Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science.* 2007 Jan 26;315(5811):466-7.
70. Kourosch AS., Miner A., Menter A., 2008, Psoriasis as the marker of underlying systemic disease, *Skin Therapy Lett.* 13:1-5.
71. Kroetz DL., Pauli-Magnus C., Hodges LM., Huang CC., Kawamoto M., Johns SJ., Stryke D., Ferrin TE., DeYoung J., Taylor T., Carlson EJ., Herskowitz I., 2003, Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene, *Pharmacogenetics* 13 (8):481-94.
72. Krueger GG., 2004, Current concepts and review of alefacept in the treatment of psoriasis, *Dermatol. Clin.* 22: 407–26.
73. Langley RG., Krueger GG., Griffiths CE., 2005, Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life, *Ann. Rheum. Dis.* 64 Suppl. 2:ii18-23.

74. Leonardi CL., 2004, Current concepts and review of efalizumab in the treatment of psoriasis, *Dermatol. Clin.* 22:427–35.
75. Liu J., Farmer JD Jr., Lane WS., Friedman J., Weissman I., Schreiber SL., 1991, Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell* 23;66(4):807–815.
76. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J., 2000, *Molecular Cell Biology*. 4th edition.
77. Lowes MA., Bowcock AM., Krueger JG., 2007, Pathogenesis and therapy of psoriasis, *Nature* 445:866-73.
78. Mackenzie B., Kastelein RA., Cua DJ., 2006, Understanding the IL-23 – IL-17 immune pathway, *Trends Immunol.* 27:17-23.
79. Mallon E., Bunce M., Savoie H., Rowe A., Newson R., Gotch F., Bunker CB., 2000, HLA-C and guttate psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 143:1177-82.
80. Martin BA., Chalmers RJ., Telfer NR., 1996, How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis, *Arch. Dermatol.* 132:717–18. Melski JW., Stern RS., 1981, The separation of susceptibility to psoriasis from age of onset, *J. Invest. Dermatol.* 77:474.
81. Menter A., Griffiths CE., 2007, Current and future management of psoriasis, *Lancet* 21;370(9583):272-84.
82. Menter A., Gottlieb A., Feldman SR., Van Voorhees A., Leonardi CL., Gordon KB. et al., 2008, Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics, *J. Am. Acad. Dermatol.* 58:826-50.
83. Moller B., Kukoc-Zivojnov N., Okamgba S., Kessler U., Puccetti E., Ottmann OG., Kaltwasser JP., Hoelzer D., Ruthardt M., 2002, Folinic acid antagonizes methotrexate induced differentiation of monocyte progenitor, *Rheumatol. Int.* 22:60–7.
84. Moy RL., Kingston TP., Lowe NJ., 1985, Isotretinoin versus etretinate therapy in generalized pustular and chronic psoriasis, *Arch. Dermatol.* 121:1297–301.
85. Mrowietz U., Ruzicka T., 1999, Cyclosporin A for psoriasis, *Dermatologic Ther.* 11:60–6.
86. Montesinos MC., Yap JS., Desai A., Posadas I., McCrary CT., Cronstein BN., 2000, Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the anti-inflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis, *Arthritis Rheum.* 43:656–63.
87. Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T., Hatachi S., Saura R., Kurosaka M., Kusaka H., Kumagai S., 2003, Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 48:668–74.
88. Nestle F., Kaplan D. and Barker J., 2009, Psoriasis, *Mechanisms of Disease*, *N. Engl. J. Med.* 361:496-509.
89. Nickoloff BJ., Nestle FO., 2004, Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities, *J. Clin. Invest.* 113:1664-75.
90. O’Doherty CJ., MacIntyre C., 1985, Palmoplantar pustulosis and smoking, *BMJ (Clin Res Ed)* vol. 291:861–4.
91. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. (2005) *Br J Clin Pharmacol.*59:365–370.
92. Page CP., Curtis MJ., Sutter MC., Walker MJA, Hoffman BB, editors. *Integrated Pharmacology*. Mosby International: London; 1997. 34
93. Pariser DM., Bagel J., Gelfand JM. et al., 2007, National Psoriasis Foundation clinical consensus on disease severity, *Arch. Dermatol.* 143:239–242.

94. Parrish JA., Fitzpatrick TB., Tanenbaum L., Pathak MA., 1974, Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long-wave ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.* 291:120.
95. Pathak MA., Kramer DM., Fitzpatrick, Photobiology and photochemistry of furocoumarins (psoralens), in *Sunlight and Man: Normal and Abnormal Photobiologic Responses*, edited by MA Pathak, TB Fitzpatrick, Tokyo, Tokyo University Press, 1974, p 25.
96. Peters BP., Veal C D., Capon F., Allen MH., Heath EK., Evans JC., Jones A., Patel S., Burden D., Weissman FG., Gill MA., 2000, Pathophysiology and treatment of psoriasis, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 57:645-59.
97. Phillips DC., Woollard KJ., Griffiths HR., 2003, The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species, *Br. J. Pharmacol.* 138:501–11.
98. Pirmohamed M., 2001, Pharmacogenetics and pharmacogenomics, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52:345–7.
99. Price Evans DA. 1993, Genetic factors in drug therapy: clinical and molecular pharmacogenetics. Cambridge, England: Cambridge University Press.
100. Quemeneur L., Gerland LM., Flacher M., Ffrench M., Revillard JP., Genestier L., 2003, Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides, *J. Immunol.* 170:4986–95.
101. Raddadi AA., Baker JN., Damanhoury Z., 1999, Cyclosporin and pregnancy, *Br. J. Dermatol.* 140: 1197–98.
102. Ranganathan P., McLeod HL., 2006, Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 54:1366–77.
103. Roenigk Jr HH., Auerbach R., Maibach H., Weinstein G., Lebwohl M., 1998, Methotrexate in psoriasis: consensus conference, *J. Am. Acad. Dermatol.* 38: 478–85.
104. Rozen R., 1996, Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 19:589–94.
105. Sambrook J., Russel D., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
106. Santini MP., Talora C., Seki T., Bolgan L., Dotto GP., 1988, Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21WAF1/CIP1 expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9575–80. Stern RS, Lange R. Non-melanoma skin cancer occurring in patients treated with PUVA five to ten years after first treatment, *J. Invest. Dermatol.* 91: 120–24.
107. Seitz M., 1999, Molecular and cellular effects of methotrexate, *Current Opinion in Rheumatology* 11:226–32.
108. Sharom FJ, 2006, Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1), *Biochem. Cell Biol.* 84:979.
109. Stern RS., 2001, PUVA follow up group: the risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA, *J. Am. Acad. Dermatol.* 44:755–61.
110. Strauss G., Osen W., Debatin KM., 2002, Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs, *Clin. Exp. Immunol.* 128:255–66.
111. Simon M., Jonca N., Guerrin M., Haftek M., Bernardi D., Caubet C., Egelrud T., Schmidt R. and Serre G., 2001, Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation, *J. Biol. Chem.* 276:20292–20299.
112. Smith AE., Kassab JY., Rowland Payne CM., Beer WE., 1993, Bimodality in age of onset of psoriasis, in both patients and their relatives, *Dermatology* 186:181–6.

113. Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E., Garaczi E., Shimada S., Stevens SR. et al., 2005, Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation, *J. Immunol.* 2005;174:164-73.
114. Tillman D., Barker JN., Trembath RC., 2002, Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis susceptibility locus, *Am. J. Hum. Genet.* 71: 554–564.
115. Tokuhira S., Yamada R., Chang X., A. Suzuki, Y. Kochi, T. Sawada, M. Suzuki, M. Nagasaki M., Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K., 2003, An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 35:341–8
116. Tracey D., Klareskog L., Sasso EH., Salfeld JG., Tak PP., 2008, Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review, *Pharmacol . Therap.* 117:244-79.
117. Reczek D., Berryman M. and Bretschke A., 1997, Identification of EBP50: a PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin–radixin–moesin family. *J. Cell Biol.* 139, 169–179.
118. Tsankov N., Angelova I. , Kazandjieva J. , 2000, Drug-induced psoriasis. Recognition and management, *Am. J. Clin. Dermatol.* 1:159
119. Ulrich CM., Robien K., Sparks R., 2002, Pharmacogenetics and folate metabolism – a promising direction, *Pharmacogenomics* 3:299–313.
120. Van Ede AE., Laan RF., Blom HJ. et al., 2001, The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients, *Arthritis Rheum.* 44:2525–30.
121. Van de Kerkhof P.C., 1995, Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms, *British Journal of Dermatology,* 132:675–682.
122. Weber WW, 1997, *Pharmacogenetics.* New York: Oxford University Press.
123. Weinstein GD., Koo JY., Kreuger GG. et al., 2003, Tazarotene cream in the treatment of psoriasis: two multicenter, double-blind randomised, vehicle-controlled studies of the safety and efficacy of tazarotene creams 0.05% and 0.1% applied once daily for 12 weeks, *J. Am. Acad. Dermatol.* 48:760–67.
124. Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R., 1998, A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity, *Mol. Genet. Metab.* 64:169–72.
125. Wilkinson GR., 2001, Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. New York: McGraw-Hill 3:29.
126. Wilson DJ., Kay V., Charig M., Hughes DG., Creasy TS., 1988, Skeletal hyperostosis and extraosseous calcification in patients receiving long-term etretinate, *Br. J. Dermatol.* 119: 597–607.
127. Yamauchi A., Ieiri I., Kataoka Y., Tanabe M., Nishizaki T., Oishi R., Higuchi S., Otsubo K., Sugimachi K., Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene.(2002) *Transplantation.* 74:571–572.